



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Brasil

Kiriaczek, Soraya Gabriela; Carvalho Basilio de Azevedo, Lucas; Pereira Peres, Lázaro Eustáquio;
Rodrigues Lambais, Marcio

REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 33, núm. 1, enero-febrero, 2009, pp. 1-16

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180214067001>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

REVISÃO DE LITERATURA

REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES⁽¹⁾

**Soraya Gabriela Kiriachek⁽²⁾, Lucas Carvalho Basilio de Azevedo⁽²⁾,
Lázaro Eustáquio Pereira Peres⁽³⁾ & Marcio Rodrigues Lambais⁽²⁾**

RESUMO

As micorrizas arbusculares (MAs) são associações simbióticas mutualistas entre fungos do filo Glomeromycota e a maioria das plantas terrestres. A formação e o funcionamento das MAs depende de um complexo processo de troca de sinais, que resulta em mudanças no metabolismo dos simbiontes e na diferenciação de uma interface simbiótica no interior das células das raízes. Os mecanismos que regulam a formação das MAs são pouco conhecidos, mas sabe-se que a concentração de fosfato (P) na planta é um fator determinante para o desenvolvimento da simbiose. A disponibilidade de P na planta pode afetar o balanço de açúcares e de fitormônios (FHS), além da expressão de genes de defesa vegetal. Com o advento da genômica e proteômica, vários genes essenciais para o desenvolvimento das MAs já foram identificados e seus mecanismos de regulação estão sendo estudados. Até o presente, sabe-se que as plantas secretam substâncias que estimulam a germinação de esporos e o crescimento de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Há evidências também de que os FMAs sintetizam moléculas sinalizadoras, que são reconhecidas pelas plantas hospedeiras. Pelo menos três genes são essenciais para o reconhecimento dessa molécula e a transdução do sinal molecular. Discutem-se os papéis desses genes e os possíveis mecanismos que regulam sua expressão, bem como os papéis dos FHS na regulação de MAs são discutidos.

Termos de indexação: micorriza arbuscular, sinalização, fitormônios, genes de defesa, fosfato.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em junho de 2008 e aprovado em novembro de 2008.

⁽²⁾ Departamento de Ciência do Solo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ. Caixa Postal 09, Av. Pádua Dias 11, CEP 13418-900 Piracicaba (SP). E-mails: skiriaczek@gmail.com; lucascba@cefeturutai.edu.br; mlambais@esalq.usp.br

⁽³⁾ Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ. E-mail: lazaropp@esalq.usp.br

SUMMARY: REGULATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAE DEVELOPMENT

Arbuscular mycorrhizae (AM) are mutualistic symbiotic associations between fungi of the phylum Glomeromycota and most terrestrial plants. The formation and functioning of AM depend on a complex signal exchange process, which ultimately results in shifts in the metabolism of the symbionts and differentiation of a symbiotic interface in cortical root cells. The mechanisms regulating AM development are not well understood, but it is known that phosphate (P) concentration in plants plays a key role in this process. Plant P concentration may affect the balance of sugars and phytohormones (PH), as well as the expression of plant defense-related genes. With the advent of genomics and proteomics, several genes essential for the development of AM have been identified and their regulation mechanisms are being elucidated. Hitherto, it is known that plants secrete several compounds that stimulate spore germination and the growth of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). There is also evidence that AMF synthesize molecules that are recognized by the host plants. At least three genes are essential for the recognition of this molecule and the transduction of the molecular signal. The roles of these genes and the possible mechanisms regulating their expression, as well as the role of PH in controlling AM development are discussed in this review.

Index terms: arbuscular mycorrhiza, signaling, phytohormones, defense genes, phosphate.

INTRODUÇÃO

Plantas e microrganismos formam diversos tipos de interações simbióticas que podem variar do parasitismo ao mutualismo. As raízes das plantas podem se associar a fungos do filo Glomeromycota formando micorrizas arbusculares (MAs), associações simbióticas mutualistas, que ocorre em mais de 80 % das plantas vasculares (Smith & Read, 1997; Schübler et al., 2001).

No estabelecimento das MAs, a troca de sinais inicia-se antes do contato físico entre os simbiontes, com a secreção de exsudatos capazes de estimular a ramificação das hifas dos FMAs pelas raízes. Essas hifas diferenciam-se em apressórios na superfície da raiz e colonizam o tecido cortical, tanto intercelular quanto intracelularmente. No córtex, algumas hifas intracelulares diferenciam-se em arbúsculos, estruturas responsáveis pela troca de metabólitos entre os simbiontes (Bonfante-Fasolo, 1984).

Apesar de não ocorrerem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas por FMAs, a formação das MAs é acompanhada de consideráveis mudanças no metabolismo de ambos os simbiontes e pela diferenciação de uma interface simbiótica ao redor dos arbúsculos (Harrison, 2005). A formação de MAs é um processo complexo, cujos mecanismos de regulação são poucos conhecidos. No entanto, sabe-se, de longa data, que a concentração de P nas plantas tem grande efeito no desenvolvimento da simbiose (Smith & Read, 1997). Em baixa concentração de P, a simbiose desenvolve-se plenamente, enquanto em alto P, seu desenvolvimento é restrito. Os mecanismos pelos quais o P regula o desenvolvimento da simbiose também são desconhecidos. Tem sido relatado que o

P pode afetar o balanço de açúcares nas raízes, o balanço de fitormônios e, ou, a expressão de genes de defesa vegetal (Siqueira, 1983; Lambais & Mehdy, 1995). Contudo, o avanço das pesquisas nessas áreas tem sido limitado pela impossibilidade de manipulação genética dos FMAs. Recentemente, a identificação de mutantes vegetais defectivos na formação de MAs e o advento da genômica e proteômica têm propiciado um avanço considerável do conhecimento dos mecanismos de regulação do desenvolvimento e da fisiologia de MAs.

SINALIZAÇÃO MOLECULAR E TRANSDUÇÃO DE SINAIS EM MAs

Em várias interações planta-microrganismo, a mútua percepção dos organismos envolvidos ocorre antes do contato físico propriamente dito. O processo de comunicação interespecífica mais estudado em interações simbióticas é aquele que ocorre entre leguminosas e rizóbios. No início da interação leguminosa-rizóbio, as raízes das plantas hospedeiras liberam flavonóides que são reconhecidos pelas bactérias e induzem a expressão dos genes *nod*. Os produtos desses genes são responsáveis pela síntese de lipoquitooligossacarídeos sinalizadores chamados fatores Nod, os quais são essenciais para a formação dos nódulos nas raízes. Receptores transmembrânicos nas células epidérmicas das raízes reconhecem os fatores Nod e ativam uma cascata de sinais, cujo resultado final é o encurvamento do pelo radicular, bem como a formação do cordão de infecção e o desenvolvimento do primórdio nodular (Fisher & Long, 1992; Denarié & Cullimore, 1993; Denarié et al., 1996).

Vários genes essenciais para a formação dos nódulos em leguminosas são conhecidos, assim como alguns aspectos de seus mecanismos de regulação (Riely et al., 2004). Já no caso das MAs, os mecanismos de comunicação entre os simbiontes são pouco conhecidos, e o estudo desses processos tem sido dificultado pela incapacidade de se cultivarem os FMAs na ausência do hospedeiro.

A germinação dos esporos dos FMAs no solo não necessita de um sinal vegetal para ter início, uma vez que pode ocorrer em água (Paula & Siqueira, 1990; Harrison, 2005). Contudo, a presença de exsudatos de raízes ou de compostos voláteis, como o CO₂, pode estimular a germinação dos esporos e o crescimento do tubo germinativo, indicando que os FMAs são sensíveis aos compostos presentes na rizosfera (Bécard & Piché, 1989; Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Nair et al., 1991).

Estudos *in vitro* mostraram que as hifas dos FMAs crescem mais rapidamente e apresentam uma intensa ramificação nas proximidades da raiz hospedeira (Buée et al., 2000), sugerindo que moléculas sinalizadoras exsudadas pelas raízes são efetivamente reconhecidas pelos FMAs. Esse processo de estímulo de crescimento e ramificação das hifas não ocorre na presença das raízes de plantas não-hospedeiras, indicando a existência de um mecanismo de distinção entre plantas hospedeiras e não-hospedeiras ativo nessa fase (Giovannetti et al., 1993; Buée et al., 2000). Além da ramificação das hifas, os FMAs apresentam aumento na atividade respiratória quando em contato com exsudatos de raízes (Tamasloukht et al., 2003). Adicionalmente, exsudatos de raízes de cenoura parcialmente purificados induzem o acúmulo de proteínas mitocondriais em esporos de *Gigaspora rosea* em períodos menores do que uma hora de contato, enquanto a indução do acúmulo de proteínas mitocondriais em hifas de *Glomus intraradices* ocorre entre 2 e 3 h após a exposição aos exsudatos radiculares (Tamasloukht et al., 2003).

Diversos trabalhos com o objetivo de isolar o “fator de ramificação das hifas” (*Branching Factor*, BF) foram realizados ao longo dos anos, e levaram à descoberta de que plantas nutricionalmente deficientes em P contêm mais compostos ativos do que plantas bem nutridas em P (Tawaraya et al., 1998; Nagashashi & Douds, 2000). Dentre os compostos comumente encontrados nos exsudatos de raízes de plantas deficientes em P estão os flavonóides, muitos dos quais podem estimular o crescimento fúngico (Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Siqueira et al., 1991; Tsai & Philips, 1991; Baptista & Siqueira, 1994; Vierheilig et al., 1996; Akiyama et al., 2002). Entretanto, experimentos com mutantes de milho deficientes na produção de flavonóides mostraram que eles não são essenciais para o estabelecimento de MAs (Bécard et al., 1995).

A purificação de BFs é um processo trabalhoso, já que essas moléculas parecem ser instáveis e estão

presentes em concentrações extremamente baixas nos exsudatos das raízes. Mas, apesar dessas dificuldades, um BF foi isolado de raízes de *Lotus japonicus*, e foi identificado como 5-desoxiestrigol, uma estrigolactona do grupo das lactonas de sesquiterpenos (Akiyama et al., 2005). As estrigolactonas também são conhecidas por sua capacidade em estimular a germinação de sementes das plantas parasitas *Striga* spp. e *Orobanche* spp., e sua síntese é induzida em condições limitantes de P inorgânico, que favorecem a proliferação dessas plantas parasitas (Yoneyama et al., 2001). As vias metabólicas que levam à biossíntese de estrigolactonas não são totalmente conhecidas, mas o uso de mutantes de milho defectivos no metabolismo de carotenóides mostrou que elas são derivadas das vias biossintéticas dos carotenóides (Matusova et al., 2005).

Tanto estrigolactonas naturais como sintéticas são capazes de induzir a ramificação das hifas de *Gigaspora margarita* quando presentes em baixas concentrações no meio (Akiyama et al., 2005). Além do efeito no crescimento e morfologia das hifas, as estrigolactonas causam aumento na densidade e atividade de mitocôndrias nas hifas de *G. rosea*, sugerindo que elas podem estimular o catabolismo de lipídios do fungo na fase pré-simbiótica (Besserer et al., 2006). Embora as estrigolactonas possam estimular a ramificação de hifas, sua essencialidade para a formação das MAs ainda não foi demonstrada.

A partir da suposição de que plantas hospedeiras produzem um fator estimulante da MA e que a produção deste fator é induzida em condições limitantes de P, é esperado que plantas não-hospedeiras sejam incapazes de produzi-lo. Assim, a análise de dois mutantes *pmi* (*pre-mycorrhizal infection*) de tomateiro, *pmi1* e *pmi2*, defectivos para a formação de MAs, mostrou que seus exsudatos radiculares não estimulam o crescimento das hifas de *G. intraradices* (David-Schwartz et al., 2001, 2003). Porém, análises mais detalhadas dos exsudatos de *pmi1* mostraram que, em vez da falta de um fator estimulante havia um inibidor do crescimento do fungo (Gadkar et al., 2003). Aparentemente, as plantas sintetizam um fator inibidor do crescimento dos FMAs, além dos BFs, impedindo o desenvolvimento da simbiose. Porém, em condições favoráveis, a síntese desse fator é suprimida, permitindo o desenvolvimento da simbiose. Isolar e caracterizar esse inibidor, bem como desvendar seu mecanismo de ação, seria essencial para compreender esse processo de comunicação.

O processo de comunicação entre os simbiontes envolve não somente moléculas de origem vegetal, mas também sinais moleculares de origem fúngica. Em experimentos com plantas transgênicas de *M. truncatula*, contendo o sistema repórter *pMtENOD11-gusA*, foi observado que os FMAs produzem uma molécula difusível em meio de cultura capaz de ativar a expressão de *MtENOD11*. O gene *MtENOD11* codifica uma proteína rica em hidroxiprolina, componente da

matriz extracelular que tem a sua expressão induzida durante o desenvolvimento de MAs e na presença de fatores Nod (Journet et al., 2001; Chabaud et al., 2002; Kosuta et al., 2003). Embora essa molécula não tenha sido identificada e a sua essencialidade para o estabelecimento das MAs demonstrada, esse dado é evidência direta da troca de sinais entre plantas e FMAs.

O fato de alguns mutantes de leguminosas não-nodulantes (*nod*⁻) serem incapazes de formar MAs (*myc*⁺) sugere que parte das vias de transdução de sinais nas duas simbioses é comum (Lambais, 2006). Pelo menos três genes essenciais para a nodulação são também essenciais para a formação de MAs, são os chamados *DMI* (*Does not Make Infection*), identificados em *M. truncatula*. Os mutantes *dmi* de *M. truncatula* e os *Ljsym* de *L. japonicus* são fenotipicamente similares ao primeiro mutante *myc*⁺ de ervilha e têm o processo de infecção bloqueado no estágio de penetração das células epidérmicas (Harrison, 2005), sugerindo que os produtos desses genes estão envolvidos nas fases iniciais do processo de percepção e transdução dos sinais moleculares.

De fato, o gene *DMI2* de *M. truncatula* e seu ortólogo *SYMRK* de *L. japonicus* codificam receptores transmembrânicos com atividade de quinase de proteínas essenciais para a formação das MAs e nódulos (Stracke et al., 2002). A caracterização do gene *SYMRK* permitiu a identificação de um domínio extracelular rico em leucina que estaria envolvido na percepção de moléculas sinais (fator Nod e, ou, um possível fator Myc), um domínio transmembrânico e um domínio quinase de proteína intracelular, o qual permite a transdução dos sinais moleculares (Yoshida & Parniske, 2005). A fosforilação de três resíduos serina/treonina do domínio quinase de proteína intracelular foi descrita como essencial para a completa ativação do receptor e transdução do fator Nod (Yoshida & Parniske, 2005). Porém, o complexo protéico necessário para o reconhecimento do fator Nod é formado pelo produto de dois outros genes: *LjNFR1* e *LjNFR5*. Esses genes codificam proteínas similares a receptores transmembrânicos com atividade de quinase de proteínas. Mutantes *nfr1* e *nfr5* não respondem aos fatores Nod, mas podem formar MAs, i.e., são *nod*⁻ *myc*⁺. Esses dados sugerem que essas proteínas estão especificamente envolvidas na percepção do sinal bacteriano e não interferem na percepção do fator Myc (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003).

Outro gene essencial para o desenvolvimento de nódulos e MAs em *M. truncatula* é *DMI1* (Endre et al., 2002). A proteína codificada por *DMI1* atua após *DMI2/SYMRK* na cascata de transdução do sinal molecular e codifica um canal de cátions putativo, possivelmente envolvido na oscilação da concentração de Ca^{2+} ("Ca²⁺ spiking") no citoplasma vegetal (Oldroyd & Downie, 2004). Em raízes de *M. truncatula*, a proteína *DMI1* está localizada na membrana nuclear (Riely et al., 2007). Porém, dois genes homólogos à

DMI1, *CASTOR* e *POLLUX*, identificados em *L. japonicus*, codificam proteínas localizadas em plastídios, podendo não ser as responsáveis pela oscilação da concentração de Ca^{2+} no citoplasma (Imaizumi-Anraku et al., 2005). Oscilações na concentração de Ca^{2+} no citoplasma são essenciais para o desenvolvimento dos nódulos, mas a sua essencialidade para a formação de MAs ainda não foi demonstrada. O fato de o gene *Nup133* de *L. japonicus*, que codifica uma nucleoporina localizada no envelope nuclear das células das raízes, ser necessário para as oscilações de Ca^{2+} , aliado ao fato de mutantes *nup133* não formarem MAs, sugere que as oscilações de Ca^{2+} são também essenciais para o desenvolvimento de MAs (Kanamori et al., 2006).

O terceiro gene essencial para o desenvolvimento de MAs em *M. truncatula* é *DMI3*. Esse gene possui alta similaridade com genes que codificam quinases de proteínas dependentes de cálcio e calmodulina (CCAMKs – *calcium/calmodulin-dependent protein kinases*), cuja localização é nuclear. Mutantes *dmi3* apresentam oscilações da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, mas não expressam genes de nodulinas precoces. É possível que *DMI3* seja essencial para o reconhecimento dos padrões das oscilações da concentração de Ca^{2+} no citoplasma e ative fatores de transcrição específicos para a regulação de genes envolvidos em nodulação, como *NSP1* e *NSP2*, e para a formação de MAs ainda desconhecidos (Levy et al., 2004; Lambais, 2006).

As respostas de mutantes *dmi1*, *dmi2* e *dmi3* em *M. truncatula* a fatores Nod e um fator Myc difusível, avaliados utilizando-se o sistema repórter *MtENOD11-gusA*, sugerem que os genes *DMI* não são essenciais para a expressão de *MtENOD11* induzida pelo fator Myc difusível, como o são pelo fator Nod (Kosuta et al., 2003). Esses dados sugerem também que há pelo menos dois fatores Myc, um produzido no ponto de contato entre os simbiontes e transduzido por uma via dependente de *DMI*, e outro difusível, transduzido por uma via independente de *DMI* (Kistner et al., 2005; Lambais, 2006).

Um dos processos decorrentes do reconhecimento de moléculas sinais vegetais pelos FMAs é a diferenciação do apressório, que se inicia logo após o contato da hifa com a superfície da raiz e envolve trocas de sinais bioquímicos entre os simbiontes e reconhecimento de sinais topográficos específicos pelos FMAs (Requena et al., 2002; Gianinazzi-Pearson & Brechenmacher, 2004). A formação do apressório é observada somente na presença de tecidos radiculares, não sendo observada em superfícies sintéticas, mesmo na presença de exsudatos radiculares que estimulam o crescimento das hifas (Harrison, 1998). Já foi demonstrado também que *G. margarita* pode formar apressório sobre a parede de células epidérmicas isoladas de raízes de cenoura (planta hospedeira) *in vitro*, mas não sobre paredes isoladas de células epidérmicas de raízes de beterraba açucareira (planta não-hospedeira) (Nagashashi & Douds, 1997).

Adicionalmente, foi observado que o fungo reconhece especificamente o tipo de célula, não formando apressório sobre a parede de células corticais e vasculares (Gadkar et al., 2001). Apressórios formados em fragmentos de parede celular desenvolvem hifas que não penetram completamente na célula e não se diferenciam em arbúsculos, sugerindo que o desenvolvimento dos arbúsculos requer células intactas (Harrison, 1998). Portanto, os sinais moleculares para a formação do apressório estão presentes na parede celular da epiderme, mas os componentes necessários para o desenvolvimento pleno das MAs estão presentes em células íntegras (Harrison, 1998; Gadkar et al., 2001). De maneira geral, a penetração e o crescimento dos FMAs no córtex radicular são pré-requisitos para o desenvolvimento de arbúsculos (Genre & Bonfante, 2002).

As análises de mutantes de *L. japonicus* têm mostrado que a colonização das raízes por FMAs é controlada em três pontos: (1) abertura das células superficiais da epiderme, (2) passagem intracelular através da exoderme da raiz, e (3) formação dos arbúsculos nas células corticais mais internas (Demchenko et al., 2004). O gene *SYM15* é necessário para a abertura das células superficiais e para a formação do arbúsculo como demonstrado por Demchenko et al. (2004). As raízes de mutantes *sym15-2* de *L. japonicus* não apresentam abertura das células da epiderme na presença de hifas de *G. intraradices* e a penetração do fungo é bloqueada (Demchenko et al., 2004; Kistner et al., 2005). Já os mutantes *sym2*, *sym3* e *sym4* de *L. japonicus* não são capazes de formar MAs e têm o processo de infecção bloqueado na passagem intracelular pela exoderme, impossibilitando a colonização das células corticais (Wegel et al., 1998; Demchenko et al., 2004). É provável que nesta etapa ocorra o acionamento do sistema de defesa nas células do hospedeiro com a consequente morte delas e bloqueio do crescimento dos FMAs (Bonfante et al., 2000).

Após a formação do apressório na epiderme e penetração na raiz, a hifa cresce intercelularmente, acomodando-se entre as paredes celulares do tecido vegetal e alcançando o córtex, onde ocorre também colonização intracelular. No interior de algumas células corticais, a intensa divisão dicotómica do ápice da hifa, concomitante com o rearranjo da parede e membrana celular vegetal, dá origem ao arbúsculo. Durante o desenvolvimento dos arbúsculos ocorre a invaginação da membrana plasmática da célula vegetal e a formação da membrana periarbuscular (Bonfante-Fasolo, 1984). A parede celular do fungo se torna menos espessa e organizada no arbúsculo, enquanto na célula vegetal ocorre a fragmentação do vacúolo, o desaparecimento de amiloplastos e o posicionamento do núcleo na região central da célula infectada (Bonfante & Perotto, 1995). No espaço apoplástico, entre a membrana plasmática vegetal e fúngica, forma-se uma matriz extracelular, através da qual os metabólitos são trocados entre os

simbiontes. Os arbúsculos senescem e são degradados entre 4 e 12 dias após sua formação. Após a degradação do arbúsculo, a célula vegetal retoma seu metabolismo normal e está apta para abrigar um novo arbúsculo.

Após a infecção, e durante a colonização do tecido cortical da raiz, além da diferenciação de arbúsculos, pode ocorrer a formação de hifas intracelulares enoveladas, vesículas ou células auxiliares. O ciclo dos FMAs se completa com a formação de esporos, o que usualmente ocorre no solo, porém a colonização da raiz pode continuar após o início da esporulação.

REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE MAs

Regulação pelo P

O P é o mais importante nutriente inorgânico que afeta o desenvolvimento de MAs, controlando principalmente a taxa de crescimento fúngico intrarradicular. Normalmente, altas concentrações de P na planta inibem a colonização das raízes, enquanto baixas concentrações favorecem a colonização intrarradicular. Várias hipóteses já foram propostas para explicar a regulação do desenvolvimento de MAs por P. O P pode afetar a exsudação radicular, cujos componentes podem ser importantes para a nutrição do fungo e, ou, sinalização molecular durante os processos de pré-infecção e colonização. Evidências circunstanciais que suportam esta hipótese foram apresentadas por Graham et al. (1981), os quais demonstraram que, em alta concentração de P, a permeabilidade da membrana e a exsudação radicular diminuem. Siqueira (1983), por outro lado, relata que em altas concentrações de P a concentração de sacarose translocada via floema até as raízes aumenta, inibindo o crescimento fúngico. Já Lambais & Medhy (1993) sugeriram que a concentração de P na planta afeta a expressão de genes envolvidos na defesa vegetal, que poderiam regular o crescimento fúngico intrarradicular. Lambais & Medhy (1993) sugeriram também que a modulação da expressão de genes de defesa pelo P pode envolver alterações no balanço de fitormônios (FHS) nos tecidos vegetais. De maneira geral, os FMAs poderiam causar alterações no balanço de FHS nas raízes, alterando a expressão de genes de defesa vegetal ou genes simbiose-específicos e regulando o desenvolvimento da simbiose.

Regulação por fitormônios

Os papéis dos FHS no controle do desenvolvimento de MAs têm sido pouco estudados e merecem especial atenção. Os FHS podem ser importantes na comunicação entre plantas e microrganismos, e podem exercer importantes papéis regulatórios. Há evidências de que auxinas, citocininas, giberelinas (GAs), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido

jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) podem estar envolvidos no controle do desenvolvimento das MAs por mecanismos ainda não compreendidos.

Aumentos na concentração de auxinas, como ácido indolil-3-acético (AIA) e ácido indolil-3-butírico (AIB), em raízes colonizadas por FMAs têm sido observados em várias plantas. Em raízes de milho micorrizadas, as concentrações de AIB são maiores do que em raízes não-micorrizadas, e esses aumentos de concentração estão associados ao aumento da atividade enzimática para síntese de AIB (Ludwig-Müller et al., 1997). Kaldorf & Ludwig-Müller (2000) observaram que a aplicação exógena de AIB altera a morfologia de raízes de milho da mesma maneira que a formação de MA. Tem sido demonstrado também que a aplicação exógena de auxina estimula o desenvolvimento de MAs (Gunze & Hennessy, 1980), e que o tratamento de raízes com ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA), um inibidor do transporte polar de auxinas que pode levar a seu acúmulo em certos tecidos, resulta em aumento da colonização de raízes de *Lablab purpureus* por *Glomus mosseae* (Xie et al., 1998).

Análises de auxinas por cromatografia gasosa-espectrometria de massas mostraram que as concentrações de AIA, AIB e ácido fenilacético (AFA) em raízes de *Tropaeolum majus* colonizadas por *G. intraradices* são diferencialmente alteradas em relação ao controle não-micorrizado (Jentschel et al., 2007). Nos estádios iniciais (10 dias após a inoculação), as concentrações de AIA e AIB livres são menores nas raízes colonizadas, enquanto a concentração de AFA aumenta em relação aos controles não-micorrizados. Porém, em estádios mais tardios (20 dias após a inoculação), a concentração de AFA diminui, enquanto a concentração de AIB aumenta em raízes micorrizadas, quando comparadas com os controles não-micorrizados. Fenômeno similar foi observado em raízes de *M. truncatula* colonizadas por *G. intraradices* (Campanella et al., 2008). Esses aumentos de concentração de AIB são decorrentes de maior síntese do FH, conforme demonstrado com o uso de precursores marcados com isótopos estáveis (^{13}C , ^{15}N e ^2H) em *T. majus* (Jentschel et al., 2007). Esses resultados sugerem que o acúmulo preferencial de AIB em MAs pode contribuir para a regulação do desenvolvimento da simbiose. O aumento da concentração de auxinas nas raízes, em particular AIB, pode facilitar a colonização do hospedeiro por meio do aumento do número de raízes laterais ou pêlos radiculares (Zolman et al., 2000).

Yao et al. (2005) estudaram os efeitos da inoculação de *G. intraradices* e *G. margarita* sobre a morfologia das raízes e os níveis endógenos de AIA em *Litchi chinensis*, e encontraram maior número de raízes laterais de primeira ordem em plantas inoculadas. Uma vez que as plantas inoculadas apresentaram uma concentração 2 a 5 vezes maior de auxina nas raízes do que as plantas não-inoculadas, foi sugerido que a mudança na morfologia de raízes é decorrente das

mudanças nos teores desse FH. Adicionalmente, o aumento na concentração de auxinas nas raízes pode estar associado à formação de células poliploidies e diferenciação de arbúsculos (Torelli et al., 2000), já que há alta correlação entre poliploidia e presença de arbúsculos em células corticais (Tahiri-Alaoui et al., 2002). No entanto, as alterações das concentrações de auxinas e outros FHs devem ser examinadas nas vizinhanças das células colonizadas pelos FMAs, pois efeitos localizados podem ser mais importantes para o controle da interação planta-FMA do que efeitos sistêmicos.

Alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo (biossíntese ou inativação) de auxinas também têm sido observadas em MAs. Em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* em baixo P, o acúmulo de transcritos codificando uma nitrilase, enzima envolvida na conversão de indolil-3-acetonitrila a AIA, é maior do que em raízes micorrizadas em alto P (Takahashi, 2005). Já em *M. truncatula* colonizada por *G. intraradices*, o acúmulo de transcritos codificando duas auxina-amidoldrolases putativas, envolvidas na hidrólise de AIA-aspartato e AIB-alanina, é altamente induzido em relação ao controle não-inoculado (Campanella et al., 2008), sugerindo a existência de um preciso mecanismo de regulação de auxinas livres e conjugadas em MAs.

Além da alteração no metabolismo de auxinas, as MAs têm também o metabolismo de citocininas alterado. Normalmente, raízes micorrizadas apresentam maior acúmulo de citocininas do que as não-micorrizadas (Allen et al., 1980; Drüge & Schönbeck, 1992; van Rhijn et al., 1997; Yao et al., 2005). Dentre os genes que codificam nodulinas precoces, *MsENOD40*, com expressão induzida em raízes de alfafa colonizadas por *G. intraradices*, tem seu promotor ativado por citocinina (Hirsch et al., 1997; van Rhijn et al., 1997; Fang & Hirsch, 1998). Contudo, a condição de alta concentração de P coincide com elevação dos teores de citocininas (Barker & Tagu, 2000), o que seria contraditório se levássemos em conta que essa alta concentração inibe o desenvolvimento de MAs. Porém, a indução da expressão de *MsENOD40* pode ocorrer antes mesmo do aumento da concentração de P nos tecidos vegetais, embora uma indução de expressão decorrente de um influxo local e intenso de P do fungo para a planta no início da associação não possa ser descartada.

Hoje sabe-se que as citocininas são reguladores negativos das respostas de deficiência de P (Franco-Zorrilla et al., 2002), o que leva a crer que a deficiência de P só é completamente percebida pela planta se essa também está deficiente em citocininas. No referido trabalho, uma das respostas estudadas foi a elevação da razão raiz/caule, devido à maior inibição do crescimento dos caules em relação às raízes sob deficiência de P. Sabe-se que plantas transgênicas deficientes em citocininas possuem o mesmo fenótipo, ou seja, maior razão raiz/caule (Werner et al., 2003).

Isso é coerente com as observações de Franco-Zorrilla et al. (2002), que verificaram que a deficiência de P inibe a expressão do gene *CRE1*, o receptor de citocininas, e que a aplicação desse hormônio pode reverter a inibição de seu receptor e dos sintomas de deficiência de P em plantas normais, mas não no mutante *cre1* (defectivo para o receptor de citocinina) de *Arabidopsis*. Como *Arabidopsis* é uma planta não-micorrízica, a formação de MAs não pôde ser estudada nesse mutante. Contudo, pode se conjecturar que, assim como a elevação da razão raiz/caule, a formação de MAs estimulada em baixo P também depende de uma redução na sensibilidade ou do teor endógeno de citocininas. Como a simbiose envolve processo de divisão celular e expressão de genes controlados por citocininas (Allen et al., 1980; Drüge & Schönbeck, 1992; van Rhijn et al., 1997), esse hormônio deve ser necessário pelo menos após a sinalização pela baixa concentração de P. Citocininas poderiam também, direta ou indiretamente, alterar a expressão de genes de defesa vegetal. Tem sido observado que um incremento endógeno do teor de citocinina semelhante à zeatina ribosídeo (*ZR-like*) em raízes micorrizadas é concomitante com a supressão do acúmulo de transcritos codificando PR1a e uma quitinase básica, dois genes envolvidos nas repostas de defesa das plantas contra a infecção por patógenos (Ginzberg et al., 1998).

Como ocorre com os demais FHs mencionados, os estudos sobre os efeitos de GAs sobre o desenvolvimento de MAs ainda são incipientes. Aumento significativo das concentrações de GA endógena durante a colonização de raízes de tabaco por *G. intraradices* já foi observado (Shaul-Keinan et al., 2002). No entanto, a aplicação diária de ácido giberélico (GA_3) a *Pisum sativum* causa inibição da formação de arbúsculo (Slezack et al., 2000). Esses dados sugerem que há um limiar de concentração de GA acima do qual o desenvolvimento de arbúsculos é inibido. É sabido que *G. intraradices* possui um gene, *Ginmyc2*, homólogo ao gene *SPINDLY* (*SPY*) de *Arabidopsis* (Barker & Tagu, 2000), o qual é um repressor na via de transdução de sinal de GA. Quando um tecido ou órgão vegetal responde a GA endógena ou exógena, ocorre justamente uma inibição de *SPY* e de outras proteínas repressoras (e.g. proteínas DELLA), desreprimindo o crescimento (Ueguchi-Tanaka et al., 2007). Embora a ortologia entre *Ginmyc2* e *SPY* não tenha sido demonstrada, é possível que GAs sintetizadas pela planta inativem o produto do gene *Ginmyc2*, e assim desreprimam a diferenciação dos FMAs nas raízes. Outra possibilidade é que o GA seja produzido pelas próprias hifas intracelulares dos FMAs. Nesse caso, GA_3 (a principal forma de GA produzida por fungos) estimularia uma atividade de dreno de C na célula infectada, induzindo a diferenciação do arbúsculo (Blee & Anderson, 1998). No entanto, essa hipótese ainda não foi testada, e o papel das GAs nas MAs permanece obscuro. O uso de mutantes/plantas transgênicas

alterados na sensibilidade ou produção de GAs poderia contribuir significativamente para a elucidação de seu papel funcional nas MAs.

Ao contrário dos FHs discutidos anteriormente, a quantidade de informações sobre ET em MAs é considerável. O efeito inibitório do ET na formação de MAs tem sido demonstrado em várias combinações hospedeiro-FMA. Azcon-Aguilar et al. (1981) observaram um decréscimo da colonização intrarradicular por *Glomus mosseae* em alfafa e trigo como resultado do tratamento do substrato com um produto que libera ET, o ethrel (ácido 2-cloroetil fosfônico), e que a intensidade da inibição da colonização é maior em concentrações mais elevadas de ethrel. Da mesma forma, a aplicação semanal de ethrel ao solo resulta em redução significativa da colonização de raízes de soja por *Glomus fasciculatum* (Morandi, 1989). Esses dados são interessantes do ponto de vista da regulação da simbiose, uma vez que a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio (FBN) em soja parecem ser insensíveis ao ethrel (Lee & LaRue, 1992). Porém, deve-se considerar que uma das limitações da utilização do ethrel como fonte de ET para estudos de regulação de MAs é a liberação de fosfato, que inibe a formação da simbiose (Smith & Read, 1997). Em estudos semelhantes, decréscimos na colonização de raízes de ervilha e alho-porró por FMAs com o aumento da quantidade de ET aplicada, em baixas concentrações de P, também foram observados (Geil et al., 2001; Geil & Guinel, 2002; Guinel & Geil, 2002). Contudo, Ishii et al. (1996), usando *Poncirus trifoliata* inoculada com *Gigaspora ramisporophora*, demonstraram que o ET pode tanto inibir quanto estimular a formação da MA, dependendo da concentração aplicada: em concentrações muito baixas de ET ($0,05 \mu\text{L L}^{-1}$), há aumento da colonização das raízes de *P. trifoliata* por *G. ramisporophora*, enquanto em altas concentrações de ET ($1,0 \mu\text{L L}^{-1}$) a taxa de colonização das raízes diminui. Assim, a aplicação exógena de ET pode regular tanto positiva quanto negativamente o desenvolvimento de MAs. Porém, esses estudos devem ser vistos com cautela, uma vez que a aplicação exógena de ET pode não simular as condições do tecido vegetal colonizado pelos FMAs, e que um efeito localizado pode ser mais significativo na regulação da simbiose do que um efeito sistêmico.

Há evidências de que o acúmulo de ET nas raízes é regulado pela colonização micorrízica. McArthur & Knowles (1992) observaram que raízes de batata colonizadas por *G. fasciculatum*, em baixo teor de P, apresentam baixa atividade da enzima ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC-oxidase), que catalisa o último passo da via biossintética do ET. Em estudo semelhante com mamão colonizado por *G. margarita*, a diminuição da produção de ET em relação ao controle não-micorrizado também foi observada, mas somente em plantas sob estresse hídrico (Cruz et al., 2000). Em contraste, Vierheilig et al. (1994) observaram que a produção de ET não é alterada em

raízes de tomate colonizadas por *Glomus mosseae*, em relação ao controle não-inoculado. Esses dados sugerem que a síntese de ET na planta pode ser finamente regulada durante o processo de colonização das raízes por FMAs, e que pode depender da interação dos genótipos do fungo e da planta, bem como das condições ambientais.

O papel do ET no processo de formação de MAs não é conhecido. O etileno difundido através dos espaços intercelulares poderia agir como um sinal regulador da expressão de genes codificando enzimas envolvidas na degradação das paredes celulares da planta e do fungo, como glucanases e quitinases. A relação entre o teor de ET e a atividade de endocelulases foi analisada em mutantes simbóticos de ervilha inoculados com *G. mosseae* (Morales-Vela et al., 2007). Os resultados mostraram que o aumento de atividade das endoglucanases e exoglucanases está associado à penetração da epiderme, ao crescimento da hifa através do córtex e da formação dos arbúsculos. Porém, a produção de etileno não apresentou alterações nas raízes micorrizadas dos diferentes mutantes analisados (Morales-Vela et al., 2007). É possível que o conteúdo de ET seja importante para manter a atividade basal das endocelulases, no entanto a relação entre o teor de ET e o aumento da atividade das celulases em raízes micorrizadas, quando comparadas com raízes não-micorrizadas, não foi demonstrada (Morales-Vela et al., 2007).

A análise de mutantes de tomateiros superprodutor de ET (*epinastic*) e outro insensível ao ET (*Never ripe*), em uma mesma base genética (cv Micro-Tom), mostrou que eles apresentam menor taxa de colonização intrarradicular por *G. clarum* do que o genótipo não-mutante, principalmente em baixa concentração de P (Zsögön et al., 2008). Nessa condição, o nível de transcritos que codificam uma quitinase básica (*chi9*) é mais elevado nas raízes colonizadas do mutante *epinastic* e *Never ripe* do que do genótipo Micro-Tom, enquanto os níveis de transcritos de uma β -1,3-glucanase ácida classe III (*TomPR-Q'a*) é menor nas raízes colonizadas do mutante *epinastic* do que no genótipo Micro-Tom. Esses resultados sugerem que altas concentrações de ET podem inibir a colonização, mas as baixas concentrações podem estimular o estabelecimento da simbiose, corroborando os resultados observados por Ishii et al. (1996) com a aplicação exógena de ET. Isso pode ser explicado pelo envolvimento do ET em processos de indução ou supressão da expressão de genes codificando enzimas hidrolíticas, que podem tanto favorecer quanto prevenir a penetração do fungo. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de controle do desenvolvimento das MAs por ET.

Com relação ao ABA, a situação não é diferente daquela dos demais FHs. Pouco se conhece sobre a relação entre ABA e o desenvolvimento de MAs. Diferentes estudos têm mostrado uma alteração na produção de ABA durante o crescimento e

desenvolvimento de plantas micorrizadas (Murakami-Mizukami et al., 1991; Meixner et al., 2005). A produção de ABA também foi detectada nas hifas de FMAs em quantidades maiores do que nas raízes (Esch et al., 1994). Existem evidências de que a via de sinalização do ABA e a do ET são reguladas antagonicamente durante o desenvolvimento das plantas (Beaudoin et al., 2000) e em respostas à infecção por patógenos (Anderson et al., 2004). A aplicação exógena de ABA pode provocar um aumento da susceptibilidade a microrganismos patogênicos (Audenaert et al., 2002). Em contraste, mutantes de tomateiro deficientes na produção de ABA (*sitiens*) são menos suscetíveis à infecção por patógenos, provavelmente devido ao fato do ABA regular negativamente as respostas de defesa vegetal dependentes de AS (Audenaert et al., 2002).

No caso de MAs, foi relatado também que um aumento nos teores de ABA em raízes micorrizadas favorece a supressão do mecanismo de defesa ativado por AS, facilitando o crescimento intrarradical dos FMAs (Blilou et al., 1999; Herrera-Medina et al., 2003). Estudos realizados com mutantes *sitiens* de tomateiro mostraram que a taxa de colonização das raízes por *G. intraradices* é menor do que nas plantas selvagens (Herrera-Medina et al., 2007). Além disso, observações ao microscópio mostraram que a quantidade de arbúsculos nesse mutante deficiente em ABA é menor do que nas selvagens, e que a morfologia dos arbúsculos é diferente nos dois genótipos de plantas. Esses dados parecem corroborar sugestões anteriores de que o ABA é necessário para tornar as plantas suscetíveis à formação da simbiose e ao desenvolvimento e funcionalidade do arbúsculo. Contudo, é importante considerar que mutantes de tomateiro deficientes em ABA possuem teores elevados de ET (Sharp et al., 2000), o que, por si só, já é suficiente para inibir a formação de MA (Zsögön et al., 2008). Uma indicação disso foi o fato do tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação do ET, ter aumentado a taxa e a eficiência de colonização do controle e do mutante *sitiens* (Herrera-Medina et al., 2007). Como o tratamento com STS não foi capaz de resgatar totalmente a capacidade de formação de MA em *sitiens*, é possível que a deficiência de ABA também possui um efeito inibitório direto, além daquele mediado por ET (Herrera-Medina et al., 2007). Devido às incertezas inerentes aos estudos utilizando hormônios e inibidores exógenos (e.g. efeitos colaterais inespecíficos dessas substâncias), uma abordagem promissora seria o uso de mutantes de tomateiro em um mesmo background genético para que duplos mutantes combinando baixa síntese de ABA (*sitiens*) e baixa sensibilidade ao ET (*Never ripe*) pudessem ser construídos e sua capacidade de formar MAs avaliada.

O ácido jasmônico (AJ) e seu éster metílico (metiljasmonato, MeJA), encontrados em várias espécies vegetais, são reguladores conhecidos de inúmeros processos fisiológicos em plantas, e desempenham

papel importante na regulação da expressão de genes de defesa vegetal (Dong, 1998). Não se conhece completamente a função do AJ no estabelecimento das MAs, embora aumentos nos teores de AJ em raízes de *M. truncatula*, cevada (*Hordeum vulgare*) e outras plantas, quando colonizadas por FMAs, tenham sido observados (Hause et al., 2002; Vierheilig & Piché, 2002; Stumpe et al., 2005; Hause et al., 2007). Aumentos dos teores endógenos de AJ e seu aminoácido conjugado, JA-isoleucina, foram observados em raízes de cevada colonizadas por *G. intraradices* (Hause et al., 2002). Da mesma forma, foi observado que a aplicação exógena de AJ promove a colonização intrarradicular e aumenta o desenvolvimento de arbúsculos e vesículas em raízes de *Allium sativum* colonizadas por *Glomus* spp. (Regvar et al., 1996). Por outro lado, a supressão da expressão do gene *MtAOC*, que codifica uma oxidoalenociclase (AOC) envolvida na biossíntese do AJ, em raízes de *M. truncatula*, resulta na redução dos teores de AJ e na formação de MAs por *G. intraradices* (Isayenkov et al., 2005).

Usando hibridização *in situ* e imunocitoquímica, foi observado que a indução de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese do AJ, como AOC e oxidoalenosintase (AOS), além de uma proteína jasmonato-induzida (JIP23), ocorre especificamente nas células do córtex que contêm arbúsculos (Maucher et al., 2000; Hause et al., 2002; Isayenkov et al., 2005). Análises da variação do acúmulo de transcritos de AOS e JIP23 mostraram que o maior acúmulo desses transcritos ocorre 4 a 6 dias após a diferenciação do primeiro arbúsculo (Hause et al., 2002), sugerindo que o aumento da concentração de AJ endógeno poderia estar relacionado com a manutenção da simbiose, e não com o reconhecimento dos simbiontes, ou com o processo de infecção (Hause et al., 2002).

A promoção da colonização micorrízica por AJ poderia ocorrer via regulação da explosão oxidativa, que ocorre de forma reduzida em raízes colonizadas por FMAs. Análises de hibridização em microarranjos de cDNA mostraram que o MeJA induz o acúmulo de transcritos de genes que codificam proteínas envolvidas na degradação de espécies ativas de oxigênio (EAOs) e na morte celular programada, como catalase, glutationa S-transferase e cisteína protease (Schenk et al., 2000). A ação dessas enzimas, induzidas por jasmonato, reprimiria o efeito inibitório das EAOs geradas pelo mecanismo de defesa vegetal sobre os FMAs (Hause et al., 2002).

Fester & Hause (2005) verificaram acúmulo de H_2O_2 nas proximidades de células que contêm arbúsculos, usando coloração com diidrorrodamina 123, que é oxidada na presença de H_2O_2 e de peroxidases. Já em raízes micorrizadas de milho coloridas com cloreto de césio ($CsCl_3$), observou-se acúmulo de H_2O_2 no citoplasma das células vegetais que contêm arbúsculos integros ou colapsados. Como o acúmulo de EAOs no citoplasma e a senescência do fungo estão relacionadas, foi proposto que a difusão do

H_2O_2 através da fina parede da hifa dos arbúsculos poderia ser o sinal para iniciar o programa de senescência do fungo (Fester & Hause, 2005).

O envolvimento do ácido salicílico (AS) na indução de respostas de defesa vegetal em interações planta-patógenos sugere que esse fitormônio também poderia agir na regulação de MAs. Em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), Herrera-Medina et al. (2003) reportaram que os teores de AS estão inversamente correlacionados com o grau de colonização intrarradicular. Costa et al. (2000) também constataram diminuição da colonização intrarradicular em feijoeiro tratado com AS exógeno, em relação às plantas sem AS. No entanto, neste estudo, o aumento da concentração de P no solo inibiu a colonização micorrízica de forma independente da aplicação de AS. Com a aplicação de AS, a redução relativa da colonização foi mais pronunciada com alto teor de P no solo do que com baixo teor de P. Com baixo teor de P, a aplicação de AS resultou em níveis de colonização por *G. clarum* comparáveis aos verificados em raízes com alto teor de P e ausência de AS. Foi observado também que a aplicação de AS ao solo inibe a atividade de β -1,3-glucanases e aumenta a atividade de quitinases nas raízes (Costa et al., 2000). Dessa forma, o AS regularia a colonização intrarradicular induzindo a atividade de quitinases, que poderiam degradar as hifas dos FMAs.

Um mecanismo para permitir a colonização intrarradicular por FMAs seria a supressão da síntese de AS nas raízes, que pode envolver a ação de enzimas do estresse oxidativo. No estudo de Blilou et al. (2000a), foram observados aumentos das atividades de catalase e ascorbato peroxidase em tabaco aos 3 e 5 dias após a inoculação com *G. mosseae*, e um aumento do nível endógeno de AS aos 5 dias. Após esse período, ocorre diminuição da atividade dessas enzimas e dos níveis de AS. É possível que a indução de atividades de catalase e ascorbato peroxidase nas raízes micorrizadas seja resultado de um estresse oxidativo causado por infecção pelo FMA, com consequente aumento dos níveis de AS endógeno (Blilou et al., 2000a). Há indícios de que o H_2O_2 resultante do estresse oxidativo ative o ácido benzóico 2-hidroxilase (AB2-Hase), essencial para a síntese de AS (León et al., 1995). Dessa forma, o aumento de EAOs resultaria em aumento da atividade de AB2-Hase e, portanto, da síntese de AS. Para o crescimento fúngico intrarradicular, a maior atividade de catalase e peroxidase em raízes colonizadas diminuiria o nível de EAOs e, assim, regularia negativamente a atividade de AB2-Hase e a síntese de AS. O acúmulo transiente de AS apenas nos estádios iniciais da MA em raízes de arroz colonizadas por *G. mosseae* (Blilou et al., 2000b) sugere a ocorrência desse tipo de regulação. É possível que a diminuição do teor de AS atenuasse a indução da expressão de outros genes de defesa e isso permitiria maior colonização fúngica.

A resposta vegetal à infecção microbiana é extremamente complexa e envolve a interação entre

as vias de sinalização de ET, AJ e AS. A rede de comunicação entre essas moléculas sinalizadoras parece ter papel de regulação fina das respostas da planta à colonização microbiana (Kunkel & Brooks, 2002), podendo atuar também no estabelecimento de MAs. No modelo da via de transdução de sinais envolvendo ET, AJ e AS proposto por Glazebrook et al. (2003), a infecção de *Arabidopsis* por um isolado de *Pseudomonas syringae* pode ter três efeitos: ativar a via da sinalização do AS, a do AJ e a do ET. Na interação entre esses fitomônios, há os efeitos combinados da sinalização de AJ e ET que podem conduzir à expressão de um grupo específico de genes de defesa. Além disso, tanto o AJ quanto o ET têm efeito inibitório na sinalização por AS. Da mesma forma, o AS tem efeito inibitório sobre a via de sinalização do AJ.

Em MAs, é provável que o balanço entre os níveis hormonais na planta module a expressão de genes codificando proteínas reguladoras e de defesa vegetal, principalmente aqueles relacionados com a homeostase de EAOS, as quais poderiam estar envolvidas no controle da simbiose. Esse balanço hormonal pode ser governado pelas condições ambientais, principalmente pela concentração de P na planta, explicando parcialmente o efeito de P no desenvolvimento das MAs. Infelizmente, as coleções de mutantes de plantas micorrízicas não dispõe de genótipos adequados para avaliar o papel das interações hormonais na regulação das MAs. Além disso, a falta de sincronia no desenvolvimento da simbiose dificulta o estudo dos mecanismos de sua regulação já que diferentes mecanismos podem atuar nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Regulação pelo sistema de defesa vegetal

Aumentos transitórios seguidos da supressão das atividades e, ou, nível de transcritos de quitinases e β -1,3-glucanases têm sido observados em raízes micorrizadas (Spanu et al., 1989; Lambais & Medhy, 1993, 1998; Vierheilig et al., 1994). Adicionalmente, a regulação dessas hidrolases é dependente do teor de P no substrato de cultivo (Lambais & Medhy, 1995). No modelo proposto por Lambais & Medhy (1995), isoformas particulares de β -1,3-glucanase induzidas com baixo teor de P poderiam contribuir para a colonização das raízes por meio da hidrólise parcial da parede celular vegetal, facilitando a penetração do fungo. Em contraste, isoformas de quitinases induzidas localmente com alto teor de P regulariam negativamente o crescimento fúngico nas raízes, por meio da degradação controlada da parede celular fúngica. O processo de regulação da expressão desses genes de defesa em MAs ainda é pouco conhecido, mas é provável que envolva a homeostase de EAOS (Lambais, 2000).

Evidências do envolvimento de EAOS na regulação de MAs foram encontradas com a análise de atividades de enzimas antioxidantes em raízes micorrizadas (Bilou et al., 2000a; Lambais et al., 2003). Lambais

et al. (2003) observaram que a atividade da catalase aumenta em raízes micorrizadas quando comparada com raízes não-micorrizadas. Em condições de alta concentração de P, essa indução é atenuada, sugerindo que as catalases podem participar da regulação do crescimento intrarradicular do fungo e do desenvolvimento das MAs. A degradação de H_2O_2 pelas catalases seria um mecanismo eficiente para atenuar a resposta de defesa da planta, facilitando o crescimento intrarradicular do fungo e sua diferenciação. Usando hibridização em macroarranjos de cDNA, também foi demonstrado que o nível de transcritos de genes codificando proteínas envolvidas na atenuação do estresse oxidativo, como germina e catalase, é maior em raízes de cana-de-açúcar micorrizadas do que nos controles não-micorrizados (Kiriachek & Lambais, dados não publicados).

Peroxidases poderiam também ser importantes no controle da homeostase de EAOS em MAs. Em raízes de alho-porró inoculadas com *Glomus versiforme*, foi observado um aumento transitório da atividade de peroxidase, comparado com o controle não-inoculado nas etapas iniciais do processo de colonização (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988). Além disso, a localização celular dessas atividades mostrou acúmulo na lamela média próxima à extremidade da hifa do fungo durante a penetração na célula, enquanto, na parede de células corticais que já continham estruturas intracelulares, a atividade de peroxidases não foi detectada (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988; Salzer et al., 1999). Resultados semelhantes foram observados em raízes de milho colonizadas por *G. intraradices* (Fries et al., 1996). As atividades de peroxidases em MAs podem ser também moduladas pela concentração de P. Em raízes de juá (*Zizyphus joazeiro*) inoculadas com *G. fasciculatum*, foram observados aumentos das atividades de peroxidases em resposta ao incremento de P disponível para as plantas e indução de isoformas de peroxidases e polifenol oxidase em resposta à inoculação (Mathur & Vyas, 1995). McArthur & Knowles (1992), estudando o padrão de atividade de peroxidases em raízes de batata, observaram baixa atividade nas raízes em baixo teor de P e indução em alto teor de P. Já em raízes de *Phaseolus vulgaris* colonizadas por *G. clarum*, em condições de baixa concentração de P, uma indução transitória da atividade da guaiacol peroxidase (GPX) seguida de supressão foi observada (Lambais et al., 2003). No entanto, em alta concentração de P, a supressão da atividade GPX é atenuada nas raízes colonizadas por *G. clarum*, quando comparada àquela observada em baixas concentrações de P, sugerindo que a concentração de P na planta é determinante na modulação da atividade das peroxidases (Lambais et al., 2003).

A caracterização do proteoma diferencial do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum*, usando 2D-PAGE e espectrometria de massas, permitiu a identificação de uma peroxidase presente somente no fluido intercelular de raízes

colonizadas em baixa concentração de P, que poderia ser importante para o controle da colonização de MAs (Souza, 2006). Corroborando esses resultados, o nível de transcritos dessa peroxidase em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *G. clarum* em baixa concentração de P é maior do que em alta concentração de P (Takahashi, 2005), sugerindo que peroxidases podem ter papel importante no controle da colonização micorrízica, favorecendo a colonização intrarradicular em baixo teor de P.

CONCLUSÕES

Apesar dos avanços do conhecimento sobre os fatores que podem regular o desenvolvimento de MAs, a elucidação desses mecanismos ainda está longe de ser concluída. Mais esforços são necessários para se desenvolverem modelos biológicos mais adequados, como a obtenção e caracterização de mutantes vegetais defectivos em vários estádios do desenvolvimento das MAs. Com esses mutantes, pode-se facilmente identificar genes com expressão diferencial na simbiose em diferentes condições ambientais, e associá-los ao seu desenvolvimento. Outro aspecto importante para aumentar o conhecimento dessa simbiose seria desvendar a genética dos FMAs, o que é dificultado pelo simbiotrofismo obrigatório e pela complexidade genômica desses fungos. A utilização de genótipos mutantes fúngicos e vegetais no estudo da regulação de MAs seria fundamental para entender os mecanismos que governam o crescimento fúngico e diferenciação do FMAs, bem como a eficiência da simbiose.

LITERATURA CITADA

- AKIYAMA, K.; MATSUOKA, H. & HAYASHI, H. Isolation and identification of a phosphate deficiency-Induced C-Glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 15:334-340, 2002.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K. & HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435:824-827, 2005.
- ALLEN, M.F.; MOORE, T.S. & CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot.*, 58:371-374, 1980.
- ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R. & KAZAN K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:3460-3479, 2004.
- AUDENAERT, K.; GEERT B.; DE MEYER, M. & HÖFTE, M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol.*, 128:491-501, 2002.
- AZCON-AGUILAR, C.; RODRIGUEZ-NAVARRO D.N. & BAREA J.M. Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in *Medicago* and *Triticum*. *Plant Soil*, 60:461-468, 1981.
- BAPTISTA, M.J. & SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. *R. Bras. Fisiol. Vegetal*, 6:127-134, 1994.
- BARKER, S.J. & TAGU, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J. Plant Growth Regul.*, 19:144-154, 2000.
- BEAUDOIN, N.; SERIZET, C.; GOSTI, F. & GIRAUDAT, J. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell*, 12:1103-1116, 2000.
- BÉCARD, G. & PICHÉ, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytol.*, 112:785-791, 1989.
- BÉCARD, G.; TAYLOR, L.P.; DOUDS JR, D.D.; PFEFFER, P.E. & DONER, L.W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 8:252-258, 1995.
- BESSERER, A.; PUECH-PAGE'S, V.; KIEFER, P.; GOMEZ-ROLDAN, V.; JAUNEAU, A.; ROY, S.; PORTAIS, J.C.; ROUX, C.; BECARD, G. & SEJALON-DELMAS, N. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.*, 4:1241-1247, 2006.
- BLEE, K.A. & ANDERSON, A.J. Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant J.*, 16:523-530, 1998.
- BLILOU, I.; BUENO, P.; OCAMPO, J.A. & GARCÍA-GARRIDO, J.M. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycol. Res.*, 104:722-725, 2000a.
- BLILOU, I.; OCAMPO, J.A. & GARCÍA-GARRIDO, J.M. Induction of *Ltp* (lipid transfer protein) and *Pal* (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J. Exper. Bot.*, 51:1969-1977, 2000b.
- BLILOU, I.; OCAMPO, J.A.; & GARCIA-GARRIDO, J.M. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. *J. Exper. Bot.*, 50:1663-1668, 1999.
- BONFANTE, P.; GENRE, A.; FACCIO, A.; MARTINI, I.; SCHAUER, L.; STOUGAARD, J.; WEBB, J. & PARNISKE, M. The *Lotus japonicus* *ljsym4* gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 10:1109-1120, 2000.
- BONFANTE, P. & PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.*, 130:3-21, 1995.

- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J., eds. VA Mycorrhiza. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.5-33.
- BUÉE, M.; ROSSIGNAL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R. & BÉCARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 13:693-698, 2000.
- CAMPANELLA, J.J.; SMITH, S.M.; LEIBU, D.; WEXLER, S. & LUDWIG-MÜLLER, J. The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *J. Plant Growth Regul.*, 27:26-38, 2008.
- CHABAUD, M.; VENARD, C.; DEFAUX-PETRAS, A.; BÉCARD, G. & BARKER, D.G. Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 156:265-273, 2002.
- COSTA, H.S.; RÍOS-RUIZ, W.F. & LAMBAIS, M.R. Ácido salicílico inibe a formação de micorrizas arbusculares e modifica a expressão de quitinases e α-1,3-glucanases em raízes de feijoeiro. *Sci. Agric.*, 57:19-25, 2000.
- CRUZ, A.F.; ISHII, T. & KADOYA, K. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions. *Mycorrhiza*, 10:121-123, 2000.
- DAVID-SCHWARTZ, R.; GADKAR, V.; WININGER, S.; BENDOV, R.; GALILI, G.; LEVY, A. A. & KAPULNIK, Y. Isolation of a premycorrhizal infection (*pmi2*) mutant of tomato, resistant to arbuscular mycorrhizal fungal colonization. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 16:382-388, 2003.
- DAVID-SCHWARTZ, R.; BADANI, H.; SMADAR, W.; LEVY, A.A.; GALILI, G. & KAPULNIK, Y. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: Plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae. *Plant J.*, 27:561-569, 2001.
- DEMCHENKO, K.; WINZER, T.; STOUGAARD, J.; PARNISKE, M. & PAWLOWSKI, K. Distinct roles of *Lotus japonicus* *SYMRK* and *SYM15* in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol.*, 163:381-392, 2004.
- DÉNARIÉ, J. & CULLIMORE, J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, 74:951-954, 1993.
- DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F. & PROMÉ, J.C. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, 65:503-535, 1996.
- DONG, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1:316-323, 1998.
- DRÜGE, U., & SCHÖNBECK, F. Effect of vesicular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol.*, 141:40-48, 1992.
- ENDRE, G.; KERESZT, A.; KEVEI, Z.; MIHACEA, S.; KALO, P. & KISS, G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417:962-966, 2002.
- ESCH, H.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDER-POETSCH, H. & BOTHE, H. Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Sci.*, 99:9-16, 1994.
- FANG, Y.W. & HIRSCH, A.M. Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.*, 116:53-68, 1998.
- FESTER, T. & HAUSE, G. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, 15:373-379, 2005.
- FISHER, R.F. & LONG, S.R. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*, 357:655-660, 1992.
- FRANCO-ZORRILLA, J.M.; MARTIN, A.C.; SOLANO, R.; RUBIO, V.; LEYVA, A. & PAZ-ARES, J. Mutations at *CRE1* impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 32:353-360, 2002.
- FRIES, L.L.M.; PACOVSKY, R.S. & SAFIR, G.R. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biol. Biochem.*, 28:981-988, 1996.
- GADKAR, V.; DAVID-SCHWARTZ, R.; KUNIK, T. & KAPULNIK, J. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiol.*, 127:1493-1499, 2001.
- GADKAR, V.; DAVID-SCHWARTZ, R.; NAGAHASHI, G.; DOUDS JR, D.D.; WININGER, S. & KAPULNIK, J. Root exudate of pmi tomato mutant M161 reduces AM fungal proliferation in vitro. *FEMS Microbiol. Letters*, 223:193-198, 2003.
- GEIL, R.D.; PETERSON, R.L. & GUINEL, F.C. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza*, 11:137-143, 2001.
- GEIL, R.D. & GUINEL, F.C. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Can. J. Bot.*, 80:114-119, 2002.
- GENRE, A. & BONFANTE, P. Epidermal cells of a symbiosis-defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organization in the presence of a mycorrhizal fungus. *Protoplasma*, 219:43-50, 2002.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. & BRECHENMACHER, L. Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: Decoding the symbiotic cell program. *Can. J. Bot.*, 82:1228-1234, 2004.

- GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B. & GIANINAZZI, S. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, 7:243-255, 1989.
- GINZBERG, I.; DAVID, R.; SHAUL, O.; ELAD, Y.; WININGER, S.; BEN-DOR, B.; BADANI, H.; FANG, Y.; van RHIJN, P.; LI, Y.; HIRSCH, A. M. & KAPULNIK, Y. *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco roots. *Symbiosis*, 25:145-157, 1998.
- GIOVANNETTI, M.; SBRAAN, C.; AVIO, L.; CITERNESI, A.S. & LOGI, C. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol.*, 125:587-593, 1993.
- GLAZEBROOK, J.; CHEN, W.J.; ESTES, B.; CHANG, H.S.; NAWRATH, C.; METRAUX, J.P.; ZHU, T. & KATAGIRI, F. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.*, 34:217-228, 2003.
- GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T. & MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol.*, 68:548-552, 1981.
- GUINEL, F.C. & GEIL, R.D. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Can. J. Bot.*, 80:695-720, 2002.
- GUNZE, C.M.B. & HENNESSY, C.M.R. Effect of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpeas. *Trans. British Mycol. Soc.*, 74:247-251, 1980.
- HARRISON, M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 50:361-389, 1998.
- HARRISON, M.J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 59:9-42, 2005.
- HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R. & STRACK, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.*, 130:1-8, 2002.
- HAUSE, B.; MROSK, C.; ISAYENKOV, S. & STRACK, D. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, 68:101-110, 2007.
- HERRERA-MEDINA, M.J.; GAGNON, H.; PICHÉ, Y.; OCAMPO, J.A.; GARCÍA GARRIDO, J.M. & VIERHEILIG, H. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Sci.*, 164:993-998, 2003.
- HERRERA-MEDINA, M.J.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG, H.; OCAMPO-BOTE, J.A. & GARCÍA-GARRIDO, J.M. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.*, 175:554-564, 2007.
- HIRSCH, A.M.; FANG, Y.; ASAD, S. & KAPULNIK, Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant Soil*, 194:171-184, 1997.
- IMAIZUMI-ANRAKU, H.; TAKEDA, N.; CHARPENTIER, M.; PERRY, J.; MIWA, H.; UMEHARA, Y.; KOUCHI, H.; MURAKAMI, Y.; MULDER, L.; VICKERS, K.; PIKE, J.; DOWNIE, J.A.; WANG, T.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; TABATA, S.; YOSHIKAWA, M.; MUROOKA, Y.; WU, G. J.; KAWAGUCHI, M.; KAWASAKI, S.; PARNISKE, M. & HAYASHI, M. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, 433:527-531, 2005.
- ISAYENKOV, S.; MROSK, C.; STENZEL, I.; STRACK, D. & HAUSE, B. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol.*, 139:1401-1410, 2005.
- ISHII, T.; SHRESTHA, Y.H.; MATSUMOTO, I. & KADOYA, K. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. *J. Japan. Soc. Hortic. Sci.*, 65:525-529, 1996.
- JENTSCHEL, K.; THIEL, D.; REHN, F. & LUDWIG-MÜLLER, J. Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. *Physiol. Plant.*, 129:320-333, 2007.
- JOURNET, E.P.; EL-GACHTOULI, N.; VERNOULD, V.; BILLY, F.; PICHON, M.; DEDIEU, A.; ARNOULD, C.; MORANDI, D.; BARKER, D.G. & GIANINAZZI-PEARSON, V. *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 14:737-748, 2001.
- KALDORF, M. & LUDWIG-MÜLLER, J. SAM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butryric acid biosynthesis. *Physiol. Plant.*, 109:58-67, 2000.
- KANAMORI, N.; MADSEN, L.H.; RADUTOIU, S.; FRANTESCU, M.; QUISTGAARD, E.M.H.; MIWA, H.; DOWNIE, J.A.; JAMES, E.K.; FELLE, H.H.; HAANING, L.L.; JENSEN, T.H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; SANDAL, N. & STOUGAARD, J.A. nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. National Acad. Sci.*, 103:359-364, 2006.
- KISTNER, C.; WINZER, T.; PITZSCHKE, A.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; WEBB, J.K.; SZCZYGLOWSKI, K. & PARNISKE, M. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell*, 17:2217-2229, 2005.
- KOSUTA, S.; CHABAUD, M.; LOUGNON, G.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; BARKER, D.G. & BECARD, G. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 131:952-962, 2003.
- KUNKEL, B.N. & BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:325-331, 2002.

- LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. *Sci. Agric.*, 63:405-413, 2006.
- LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Can. J. Bot.*, 73:533-540, 1995.
- LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Spatial distribution of chitinases and b-1-3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytol.*, 140:33-42, 1998.
- LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, b-1-3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 6:75-83, 1993.
- LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K. & DOUDS, D.D. Current advances in mycorrhiza research. St. Paul, APS Press, 2000. p.45-59.
- LAMBAIS, M.R.; RIOS-RUIZ, W.F. & ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 160:421-428, 2003.
- LEE, K.H. & LARUE, T.A. Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol.*, 100:1759-1763, 1992.
- LEON, J.; LAWTON, M.A. & RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.*, 108:1673-1678, 1995.
- LEVY, J.; BRES, C.; GEURTS, R.; CHALHOUB, B.; KULIKOVA, O.; DUC, G.; JOURNET, E. P.; ANE, J.M.; LAUBER, E.; BISSELING, T.; DENAIRE, J.; ROSENBERG, C. & DEBELLE, F. A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbiosis. *Science*, 303:1361-1364, 2004.
- LUDWIG-MÜLLER, J.; KALDORF, M.; SUTTER, E.G. & EPSTEIN, E. Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays* L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant Sci.*, 125:153-162, 1997.
- MADSEN, E.B.; MADSEN, L.H.; RADUTOIU, S.; OLBRYT, M.; RAKWALSKA, M.; SZCZYGLOWSKI, K.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SANDAL, N. & STOUGAARD, J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425:637-640, 2003.
- MATHUR, N. & VYAS, A. Changes in nitrate reductase and glutamine synthetase activities in *Ziziphus mauritiana* by different VAM fungi. *Curr. Sci.*, 68:1144-1146, 1995.
- MATUSOVA, R.; RANI, K.; VERSTAPPEN, F.W.A.; FRANSSEN, M.C.R.; BEALE, M.H. & BOUWMEESTER, H.J. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.*, 139:920-934, 2005.
- MAUCHER, H.; HAUSE, B.; FEUSSNER, I.; ZIEGLER, J. & WASTERNACK, C. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): Tissue specific regulation in seedling development. *Plant J.*, 21:199-213, 2000.
- MCARTHUR, D.A. & KNOWLES, N.R. Resistance response of potato to vesicular-arbuscular fungi under varying abiotic phosphorus levels. *Plant Physiol.*, 100:341-351, 1992.
- MEIXNER, C.; LUDWIG-MÜLLER, J.; MIER SCH, O.; GRESSHoff, P.; STAHELIN, C. & VIERHEILIG, H. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. *Planta*, 222:709-715, 2005.
- MORALES-VELA, G.; MOLINERO-ROSALES, N.; OCAMPO, J.A. & GARCÍA-GARRIDO, J.M. Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutants but not with its ethylene content in root. *Soil Biol. Biochem.*, 39:786-792, 2007.
- MORANDI, D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 27:697-701, 1989.
- MURAKAMI-MIZUKAMI, Y.; YAMAMOTO, Y. & YAMAKI, S. Analyses of indole acetic acid and abscisic acid contents in nodules of soybean plants bearing VA mycorrhizas. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37:291-298, 1991.
- NAGAHASHI, G. & DOUDS, D.D. Apressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytol.*, 136:299-304, 1997.
- NAGAHASHI, G. & DOUDS, D.D. Partial separation of root exudates components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.*, 104:1453-1464, 2000.
- NAIR, M.G.; SAFIR, G. R. & SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:434-439, 1991.
- OLDROYD, G.E.D. & DOWNIE, J.A. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nature*, 5:566-576, 2004.
- PAULA, M.A. & SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. *New Phytol.*, 115:69-75, 1990.
- RADUTOIU, S.; MADSEN, L.H.; MADSEN, E.B.; FELLE, H.H.; UMEHARA, Y.; GRØNLUND, M.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; SANDAL, N. & STOUGAARD, J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425:585-592, 2003.
- REGVAR, M.; GOGALA, N. & ZALAR, P. Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytol.*, 134:703-707, 1996.
- REQUENA, N.; MANN, P.; HAMPP, R. & FRANKEN, P. Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: GmGIN1, a novel gene encoding a protein with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant Soil*, 244:129-139, 2002.

- RIELY, B.K.; ANE, J.M.; PENMETSA, R.V. & COOK, D.R. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:408-413, 2004.
- RIELY, B.K.; LOUGNON, G.; ANÉ, J.M. & COOK, D.R. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J.*, 49:208-216, 2007.
- SALZER, P.; CORBIÈRE, H. & BOLLER, T. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, 208:319-325, 1999.
- SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C. & MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS*, 97:11655-11660, 2000.
- SCHÜÄLER, A.; SCHWARZOTT, D. & WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: Phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 105:1413-1421, 2001.
- SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T. & GHERARDI, F. Endogenous ABA maintains growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. *J. Exper. Bot.*, 51:1575-1584, 2000.
- SHAUL-KEINAN, O.; GADKAR, V.; GINZBERG, I.; GRÜNZWEIG, J.M.; CHET, I.; ELAD, Y.; WININGER, S.; BELAUSOV, E.; ESHED, Y.; ATZMON, N.; BEN-TAL, Y. & KAPULNIK, Y. Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New Phytol.*, 154:501-507, 2002.
- SIQUEIRA, J.O. Nutritional and edaphic factors affecting spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Gainesville, University of Florida, 1983. 123p. (Tese de Doutorado)
- SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol.*, 118:187, 1991.
- SLEZACK, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; PAYNOT, M. & GIANINAZZI, S. Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 13:238-241, 2000.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. 2.ed. New York, Academic Press, 1997. 605p.
- SOUZA, S.L. Análise do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsável à micorriza arbuscular. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2006. 100p. (Tese de Doutorado)
- SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A. & BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: Regulation and localization. *Planta*, 177:447-455, 1989.
- SPANU, P. & BONFANTE-FASOLO, P. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.*, 109:119-124, 1988.
- STRACKE, S.; KISTNER, C.; YOSHIDA, S.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SZCZYGŁOWSKI, K. & PARNISKE, M. A plant receptor kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 417:959-962, 2002.
- STUMPE, M.; CARSJENS, J.G.; STENZEL, I.; GÖBEL, C.; LANG, I.; PAWLOWSKI, K.; HAUSE, B. & FEUSSNER, I. Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, 66:781-791, 2005.
- TAHIRI-ALAOUI, A.; LINGUA, G.; AVROVA, A.; SAMPÒ, S.; FUSCONI, A.; ANTONIW, J. & BERTA, G. A cullin gene is induced in tomato roots forming arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.*, 80:607-616, 2002.
- TAKAHASHI, D. Análise de sequências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2005. 117p. (Tese de Doutorado)
- TAMASLOUKHT, B.; SÉJALON-DELMAS, N.; KLUVER, A.; ROUX, C.; BÉCARD, G. & FRANKEN, P. Root factor induce mitochondrial-related-gene expression and fungal respiration during the developmental switch from a symbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol.*, 131:1468-1478, 2003.
- TAWARAYA, K.; HASHIMOTO, K. & WAGATSUMA, T. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*, 8:67-70, 1998.
- TORELLI, A.; TROTTA, A.; ACERBI, L.; ARCIDIACONO, G.; BERTA, G. & BRANCA, C. IAA and ZR content in leek (*Allium porrum* L.), as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. *Plant Soil*, 226:29-35, 2000.
- TSAI, S.M. & PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:1485-1488, 1991.
- UEGUCHI-TANAKA, M.; NAKAJIMA, M.; MOTOYUKI, A. & MATSUOKA, M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58:183-198, 2007.
- van RHIJN, P.; FANG, Y.; GALILI, S.; SAHUL, O.; ATZMON, N.; WININGER, S.; ESHED, Y.; LUM, M.; LI, Y.; TO, V.; FUJISHIGE, N.; KAPULNIK, Y. & HIRSCH, A.M. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc. National. Acad. Sci. USA*, 94:253-265, 1997.

- VIERHEILIG, H.; ALT, M.; GUT-RELLA, M.; LANGE, J.; BOLLER, T. & WIEMKEN A. Colonization of tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by arbuscular mycorrhizal fungi. In: AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J.M., eds. Mycorrhizas in integrated systems: From genes to plant development. Luxembourg, European Commission, 1996. p.270-273. (EUR 167280)
- VIERHEILIG, H.; ALT, M.; MOHR, U.; BOLLER, T. & WIEMKEN, A. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and b-1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.*, 143:337-343, 1994.
- VIERHEILIG, H & PICHÉ, Y. Signaling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. In: BUSLIG, B. & MANTHEY, J. ed. Flavonoids in cell functions. New York, Kluwer Academic, 2002. p.23-39.
- WEGEL, E.; SCHAUSEN, L.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. & PARNISKE, M. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 11:933-966, 1998.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; van ONCKELEN, H.; & SCHMÜLLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, 15:2532-2550, 2003.
- XIE, Z.-P., MÜLLER, J.; WIEMKEN, A.; BROUGHTON, W.J. & BOLLER, T. Nod factors and tri-iodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus*. *New Phytol.*, 139:361-366, 1998.
- YAO, Q.; ZHU, H.H. & CHEN, J.Z. Growth responses and endogenous IAA and iPAs changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation. *Sci. Hortic.*, 105:145-151, 2005.
- YONEYAMA, K.; TAKEUCHI, Y. & YOKOTA, T. Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. *Physiol. Plant.*, 112:25-30, 2001.
- YOSHIDA, S. & PARNISKE, M. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 280:9203-9209, 2005.
- ZOLMAN, B.K.; YODER, A. & BARTEL, B. Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics*, 156:1323-1337, 2000.
- ZSÖGÖN, A.; LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O. & PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. *Sci. Agric.*, 65:259-267, 2008.