

## NOVAS PERSPECTIVAS DA SIMBIOSE MICORRÍZICA E SEUS FACILITADORES TRANSMEMBRÂNICOS NA INTERFACE DA TROCA BIDIRECIONAL DE NUTRIENTES MINERAIS: REVISÃO

**Carlos Moacir Colodete** (a)

Doutorando em Ecologia de Ecossistemas/Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia-  
LMAB/UVV/ES

carloscolodete@gmail.com

**Sávio Bastos de Souza** (b)

Graduado em Ciências Biológicas/Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia-  
LMAB/UVV/ES

saviobas@gmail.com

**Juliano de Oliveira Barbirato** (c)

Doutorando em Ecologia de Ecossistemas/Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia-  
LMAB/UVV/ES

julianoob@hotmail.com

**Katherine Fraga Ruas** (d)

Mestranda em Ecologia de Ecossistemas/Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia-  
LMAB/UVV/ES

katherinefraga@yahoo.com.br

### RESUMO

Na simbiose dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em raízes de plantas, inicia-se uma cascata de eventos cinéticos e moleculares, os quais levam a uma integração morfofuncional gerando diferentes tipos de interfaces simbióticas: assimbiótica, pré-simbiótica e simbiótica, sendo dependente do fungo que penetra a célula vegetal hospedeira. Aqui apresentamos a associação micorrízica através de inéditos modelos: (i) estruturas de colonização em raízes de plantas (ecto e endomicorriza); (ii) estrutura de um arbúsculo e a interfaces de troca; (iii) transporte bidirecional de nutrientes na interface arbuscular em células de plantas. As membranas biológicas contêm proteínas de transporte que facilitam a passagem de íons e de outras moléculas polares específicas. Relatamos que tanto em plantas quanto em fungos, a absorção de nutrientes, ocorre principalmente via transportadores específicos, encontrados nas membranas de células de raízes e hifas. Finalmente, demonstramos que proteínas ajudam a manter o gradiente iônico entre o meio intra e extracelular, entre as quais, a H<sup>+</sup>-ATPase tem um importante destaque.

**Palavras-chave:** FMAs, troca bidirecional, H<sup>+</sup>-ATPase

**ABSTRACT**

In symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on plant roots, triggers a cascade of cellular and molecular events which lead to an integration Morphological generating symbiotic different types of interfaces: asymbiotic pre-symbiotic and symbiotic being dependent on the way the fungus penetrates into the host cell. Here we present the mycorrhizal association through unpublished models: (i) structures of colonization in plant roots (ecto and endomycorrhizae), (ii) structure of a arbúsculo interfaces and exchange, (iii) bidirectional transport of nutrients in arbuscular interface cells plants. The biological membranes contain transport proteins which facilitate the passage of ions and other polar molecules specific. We report that both plants and fungi, nutrient absorption occurs primarily via specific transporters found in the membranes of cells of roots and hyphae. Finally, we demonstrate that proteins help maintain the ionic gradient between intracellular and extracellular environment, including the  $H^+$ -ATPase plays an important focus.

**Keywords:** FMAs, bidirectional exchange,  $H^+$ -ATPase

**1. INTRODUÇÃO**

Os problemas globais sobre degradação ambiental e a necessidade de uma produção agrícola sustentável e agroecologicamente correta, enfatiza-se a necessidade de estudos sobre os processos microbiológicos do solo, pois estes são parte essencial do funcionamento de todos os ecossistemas terrestres. Os microrganismos do solo desempenham um papel essencial na produtividade de ecossistemas agrícolas e no funcionamento dos ecossistemas naturais, podendo esse papel ser benéfico ou danoso (STÜRMER, 2012; COLODETE, 2013).

Entre os microrganismos do solo com papel benéfico, estão os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que incrementam a nutrição vegetal na maioria dos ecossistemas terrestres (ALLEN, 1996; NGOSONG *et al.*, 2014). Estudo de fósseis de plantas da era Devoniana evidenciam que a associação micorrízica arbuscular (MA) existem há pelo menos 400 milhões de anos (REMY *et al.*, 1994; RAMOS *et al.*, 2011). Os FMAs são reconhecidos pelo seu importante papel no aumento na absorção de nutrientes pelas plantas hospedeiras e incremento na tolerância aos estresses bióticos e abióticos (GAXIOLA *et al.*, 2012, 2013). O principal mecanismo responsável pelo aumento na absorção de íons pelos FMAs tem sido relacionado com o aumento do volume de exploração do sistema radicular pelo micélio externo (RAMOS *et al.*, 2011).

Os gradientes intra e extracelulares de  $H^+$  estão associados com o crescimento polarizado em células de plantas (FEIJÓ *et al.*, 2004) e fungos (RAMOS *et al.*, 2008a). Em hifas de FMAs, aumentos na expressão de uma isoforma de  $H^+$ -ATPases (REQUENA *et al.*, 2003), efluxo de  $H^+$  (RAMOS *et al.*, 2008a) e consequente alcalinização do citossol (JOLICOEUR *et al.*, 1998) foram observados na presença de fatores radiculares. Estudos citoquímicos têm mostrado, que na simbiose micorrízica arbuscular, um movimento bidirecional de íons opera na interface fungo-planta, sugerindo a presença de sistemas especializados de transporte ativo na membrana periarbuscular (MARX *et al.*, 1982; GIANINAZZI-PEARSON, 1996; COLODETE, 2013). Tanto em plantas quanto em fungos, a absorção de nutrientes ocorre, principalmente, via transportadores específicos encontrados nas membranas de células de raízes e hifas. Estes transportadores secundários necessitam de um aporte de energia que é fornecido pelos sistemas de transporte primários, constituídos, essencialmente pelas bombas de prótons que nas plantas incluem vários tipos de  $H^+$ -ATPases (MORSOMME & BOUTRY, 2000) e uma  $H^+$ -pirofosfatase vacuolar ( $H^+$ -PPases) (REA *et al.*, 2000; GAXIOLA *et al.*, 2013; COLODETE, 2013). A fração microssomal, obtida por fracionamento celular de tecidos vegetais, é constituída principalmente por vesículas de membranas oriundas da membrana plasmática e do tonoplasto, e as principais enzimas responsáveis pela hidrólise de ATP são as  $H^+$ -ATPases da membrana plasmática ( $H^+$ -ATPases do tipo P) e  $H^+$ -ATPases do tonoplasto ( $H^+$ -ATPases do tipo V) presentes nestas membranas (SZE *et al.*, 1999; GAXIOLA *et al.*, 2012; COLODETE, 2013). Nas plantas, em diversas condições fisiológicas e de estresse, o pirofosfato ( $PP_i$ ) pode assumir o papel do ATP, atuando como doador de energia metabólica da célula (REA *et al.*, 2000; GAXIOLA *et al.*,

2007). No tonoplasto, a  $H^+$ -PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundários da membrana vacuolar, atuando também no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a V-ATPase de tonoplasto e com a  $H^+$ -ATPase de plasmalema (SZE *et al.*, 1999).

São abordados nesta revisão, aspectos gerais da associação micorrízica, características anatômico-funcionais, estruturais, bem como suas interfaces simbióticas na troca bidirecional de nutrientes.

## 2. REVISÃO

### 2.1. Aspectos gerais da associação micorrízica arbuscular

As micorrizas são divididas em dois principais grupos: ectomicorrizas e micorrizas arbusculares. As micorrizas arbusculares formam associação com a maioria das plantas vasculares de importância econômica, enquanto as ectomicorrizas são específicas de essências florestais como o pinus e eucalipto. Na associação micorrízica diversos tipos de benefícios são conferidos à planta hospedeira: maior crescimento das plantas, maior tolerância à patógenos, maior resistência ao estresse hídrico e, maior capacidade de absorção de nutrientes do solo tais como fósforo (P), nitrogênio (N) e potássio (K) (RAMOS *et al.*, 2008; GAXIOLA *et al.*, 2013). Entre os diversos grupos de fungos do solo associados maioria das plantas vasculares, exceto uma minoria não micotrófica (PASZKOWSKI *et al.*, 2002), destacam-se os FMAs do filo *Glomeromycota* (SCHÜBLER *et al.*, 2001), que realizam simbiose mutualística obrigatória. Atualmente são classificados em cinco ordens, quatorze famílias e vinte e seis gêneros, com pouco mais de 230 espécies descritas (STÜRMER, 2012).

A micorriza arbuscular (MA), de ocorrência generalizada, é a mais disseminada nos trópicos, sendo formada pelos FMA, que se associam simbioticamente a espécies de Briófitas, Pteridófitas, Gimnospermas e Angiospermas (DE SOUZA *et al.*, 2008; NGOSONG *et al.*, 2014). Os glomerosporos assexuais (GOTO & MAIA, 2006) servem para dispersão e sobrevivência à curto prazo dos organismos e contêm a maioria da diversidade morfológica para a identificação das espécies. O corpo vegetativo desses fungos se diferencia em diversas estruturas. As hifas fúngicas são importantes e dentre outros aspectos, como propágulo para iniciar nova colonização micorrízica (GRAHAM *et al.*, 1982; FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012). As vesículas são estruturas globosas que ocorrem intra e extracelularmente e possuem a função de reserva e armazenamento para o fungo, as quais são formadas em alguns gêneros (DE SOUZA *et al.*, 2008). A principal característica desta associação está na formação do córtex radicular de estruturas denominadas arbúsculos. Além disso, os FMAs proporcionam redução aos ataques patogênicos nas raízes do hospedeiro (BORGES *et al.*, 2007; PEREIRA, 2006), aumentam a resistência ao déficit hídrico (MORATELLI *et al.*, 2007) e a tolerância das plantas a condições de estresse (SANNAZZARO *et al.*, 2006). A formação de hifas desses fungos permite ainda uma maior estabilidade de agregados no solo (NÓBREGA *et al.*, 2001). São também consideradas multifuncionais nos agroecossistemas, melhorando potencialmente a qualidade física, química e biológica do solo (BERBARA *et al.*, 2006), componentes estes da chamada fertilidade ampla do solo. Pesquisas realizadas no Brasil com diversas espécies de plantas e ecossistemas comprovam os benefícios desses fungos para o crescimento de plantas (MIRANDA, 2008; BERBARA *et al.*, 2006).

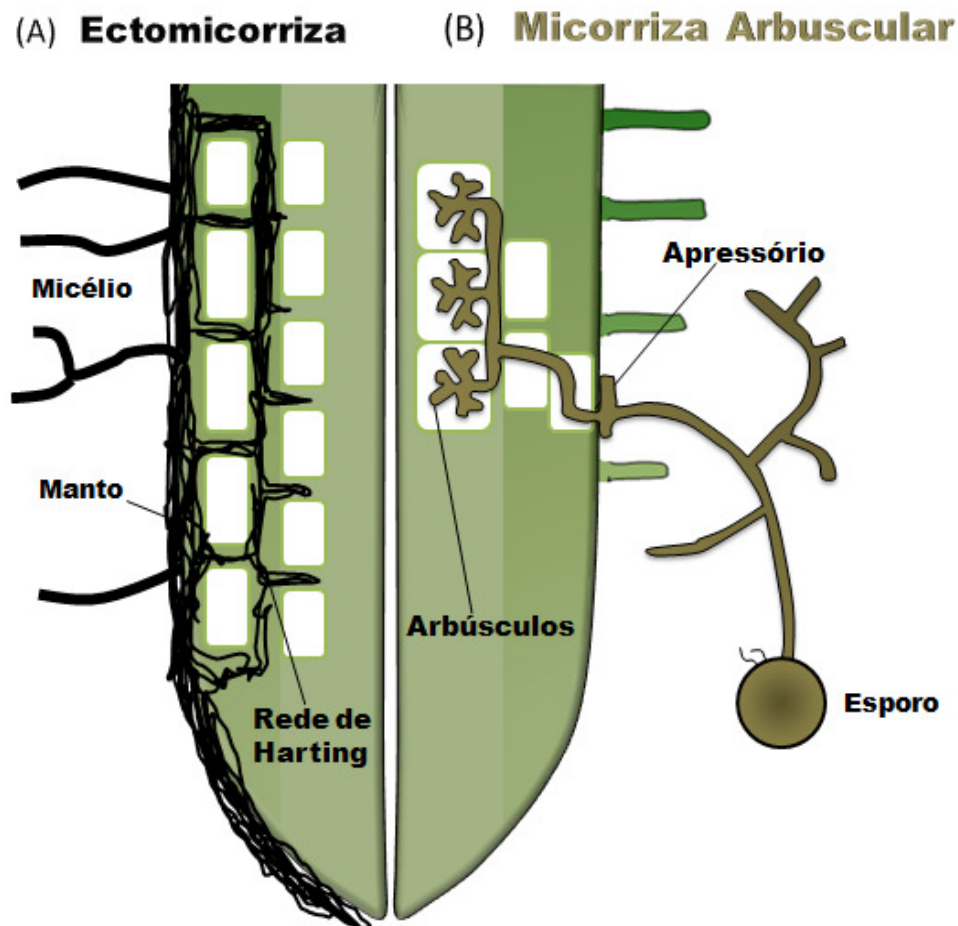
### 2.2. Características anatômico-funcionais e estruturais de colonização em micorrizas

Um resumo das características mais importantes desses tipos de micorrizas encontra-se na Tabela 1, bem como suas principais estruturas de colonização em micorrizas: A **Ectomicorriza** Figura 1A é caracterizada pela presença de três componentes: manto fúngico que é formado pelo tecido

fúngico que cobre a estrutura radicular; um labirinto que penetra entre as células da epiderme e do córtex, formando a *Rede de Harting*; e estruturas externas ao sistema radicular que são compostos por hifas e rizomorfos que são essenciais para conexão com o solo e a formação de corpos de frutificação dos fungos formadores de ectomicorrizas (RAMOS *et al.*, 2008a) e **Micorrizas Arbusculares** Figura 1B onde o micélio é asseptado, embora ocorra a formação ocasional de septos, principalmente em partes senescentes do micélio, como por exemplo hifas esporógenas após a formação do esporo em alguns gêneros (*Gigaspora* e *Scutellospora*). Os esporos formados pelos Glomeromicetos apresentam-se entre os maiores do Reino Fungi, variando em tamanho de 22 a 1050 µm em diâmetro. Os *arbusculos* são o resultado da interação morfológica e funcional entre fungo-planta, dando origem a uma estrutura de troca de nutrientes (STÜRMER, 2012; COLODETE, 2013). As vesículas são formação em alguns gêneros, podendo assumir um padrão *Arum* ou *Paris* (TALAAT & SHAWKY, 2014).

**Tabela 1.** Principais características dos tipos anatômico-funcionais em micorrizas

<b>I- MICORRIZA ARBUSCULAR</b>
<b>Microssimbiontes fúngicos:</b> fungos asseptados, Glomeromicetos (< 230 espécies).
<b>Exemplo de gêneros:</b> <i>Glomus</i> , <i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i> e <i>Scutellospora</i> .
<b>Macrossimbiontes vegetais:</b> mais de 80% das plantas terrestres.
<b>Colonização da raiz:</b> hifas penetram nas células vegetais corticais radiculares tanto entre as células como intracelularmente. Formam estruturas denominadas arbusculos, no interior das células corticais. Há morfologia radicular e celular não é alterada.
<b>Estruturas características:</b> arbusculos, vesículas (alguns gêneros), hifas e esporos.
<b>Ecossistemas predominantes:</b> denominada cosmopolita, mas predominante nos ecossistemas tropicais e são raros em ecossistemas polares.
<b>II- ECTOMICORRIZA</b>
<b>Microssimbiontes fúngicos:</b> fungos septados, principalmente à classe dos Basidiomicetos e Ascomicetos (> 5.000 espécies).
<b>Exemplo de gêneros:</b> <i>Amanita</i> , <i>Russula</i> , <i>Lactarius</i> , <i>Laccaria</i> , <i>Cortinarius</i> e <i>Inocybe</i>
<b>Macrossimbiontes vegetais:</b> grupo das Fanerógamas: Gimnospermas e Angiospermas (> 2.000 espécies).
<b>Colonização da raiz:</b> <b>Não penetram as células do córtex radicular.</b> Caracterizam-se pelo crescimento intercelular através da <i>Rede de Harting</i> , formando assim um manto de hifas externas ao redor da raiz. A morfologia da raiz é muito modificada.
<b>Estruturas características:</b> Rede de Harting, manto e rizomorfo.
<b>Ecossistemas predominantes:</b> formando simbioses em espécies florestais, sendo comuns em ecossistemas boreais e temperados.



**Figura1.** Ilustração das estruturas de colonização de raízes em **Ectomicorriza** (A) (preto/esquerda) e **Micorriza Arbuscular** (B) (marrom/direita). Modificado (BONFANTE & GENRE, 2010).

### 2.3. Potenciais transmembrânicos e a promoção na absorção de nutrientes

Geralmente, a velocidade de difusão de um soluto através de uma biomembrana, depende da diferença de concentração do soluto entre os compartimentos separados pela biomembrana, da resistência que o soluto tem que vencer para atravessar a espessura da biomembrana e da diferença da concentração de cargas entre os compartimentos (PRADO, 2013).

A diferença de concentração do soluto entre os compartimentos em uma mesma temperatura resulta na diferença de potencial químico. A diferença de concentração de cargas entre os compartimentos resulta na diferença de potencial elétrico. O soluto se move de um compartimento ao outro atravessando a biomembrana devido as diferenças de potencial químico e elétrico e por apresentar alguma permeabilidade na biomembrana de separação. No entanto, se o soluto apresentar cargas ou pólos a difusão através da biomembrana é difícil, pois a fase lipídica apolar de biomembrana impede a passagem desse soluto para o compartimento adjacente. Para atravessar uma biomembrana o soluto primeiro deve compatilhar a sua capa de solvatação com a superfície externa e polar da biomembrana. São polares as faces da biomembrana voltadas para cada um dos compartimentos adjacentes (PRADO, 2013).

Posteriormente, o soluto atinge o interior gorduroso da fase lipídica  $(CH_2)_n$  da biomembrana. Finalmente o soluto recupera sua capa de solvatação quando estiver saindo da biomembrana em direção ao compartimento adjacente. Esse processo é energeticamente desfavorável para íons, que não perdem a capa de solvatação devido à forte atração elétrica entre a água e a carga do íon. É o caso de todos os nutrientes minerais, que são íons nas suas formas absorvíveis e dificilmente atravessam, por

exemplo, o plasmalema ou o tonoplasto, sem um facilitador. Esses íons nutrientes dificilmente perdem a sua capa de solvatação para as faces polares da biomembrana (PRADO, 2013).

A permeabilidade (P) é o tempo em segundos (s) que um soluto demora em atravessar a espessura (cm) da biomembrana. Ou seja, P é expressa  $\text{cm s}^{-1}$ . Esse deslocamento para um soluto neutro e pequeno é de cerca de  $10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ , enquanto que para um soluto carregado de tamanho equivalente o deslocamento é mil vezes mais lento,  $10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ . A água, solvente universal para as reações bioquímicas, é um caso especial. A permeabilidade da água na biomembrana pode ser elevada ( $10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ ) apesar da água apresentar forte polaridade. Nesse caso da água os canais denominados de aquaporinas, quando estão abertos, facilitam a passagem de água através das biomembranas. Portanto, a água também precisa de um facilitador para atravessar e alcançar o comprimento adjacente. O processo de simples difusão de um determinado soluto através de uma biomembrana pode ser descrito formalmente pela equação de Fick.

$$J = PA (C_1 - C_2) *$$

\* Em que: **J**, o fluxo, e a quantidade do soluto (mV) atravessando a biomembrana em um dado momento por unidade de tempo (s). **P** é a permeabilidade do soluto em uma biomembrana específica, em  $\text{cm s}^{-1}$ . As membranas biológicas naturais são mais permeáveis aos solutos que as membranas artificiais. **A** é a área total da membrana onde a difusão está ocorrendo ( $\text{cm}^2$ ). **C<sub>1</sub>** é a concentração (mV) do soluto em um compartimento. **C<sub>2</sub>** é a concentração (mV) do soluto no compartimento adjacente).

## 2.4. Diferença de potencial elétrico

Considerando somente o potencial químico, as raízes deveriam perder e não absorver solutos com cargas como os nutrientes minerais. No entanto as células que acumulam cátions e ânions no seu interior. Além disso, a solução em um recipiente fechado deveria se concentrar como consequência da retirada da água por meio da absorção da raiz e posterior transpiração da copa, mas ocorre o contrário com a maioria dos íons conforme o curso dos dias. Após 4 dias de cultivo a solução nutritiva ficou mais diluída Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração de cátions e ânions em células das raízes de milho (M) e de feijoeiro (F) crescendo em solução nutritiva durante 4 dias. A água da solução nutritiva perdida por transpiração não foi repostada durante os dias de cultivo em um recipiente. Mesmo sem a reposição de água perdida por transpiração as concentrações da solução externa são geralmente menores após 4 dias de cultivo. Ce=concentração externa (solução nutritiva). Ci=concentração interna (células da raiz), segundo Marschner (1986).

Íon	Ce inicial	Concentração (mV) após 4 dias de cultivo					
		Ce final		Ci final		Ci/Ce finais	
		M	F	M	F	M	F
K <sup>+</sup>	2,00	0,14	0,67	160	84	1142	125
Ca <sup>2+</sup>	1,00	0,94	0,59	3,0	10	3,2	17
Na <sup>+</sup>	0,32	0,51	0,58	0,6	6	12	10
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,00	0,13	0,07	38	35	1,2	500
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,67	0,61	0,81	14	6	23	7,4

A diluição da solução ocorre em função da absorção dos cátions e dos ânions pela raiz. A absorção desses solutos eletrólitos é proporcionalmente maior que a absorção de água pelas raízes, resultando na diluição da solução. Como é possível esses eletrólitos na solução (no caso nutrientes minerais) atravessam as biomembranas, diluir a solução nutritiva apesar da concomitante absorção de água (Tabela 2) e ainda serem acumulados nas células da raiz após 4 dias de cultivo? Há vários fatores que facilitam a entrada do eletrólito na célula da raiz (PRADO, 2013).

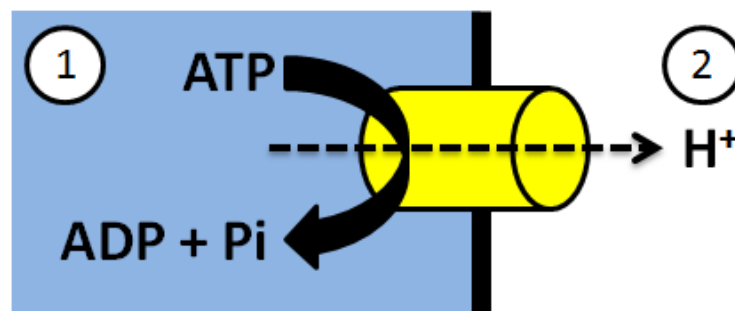
Se houver não só uma diferença de potencial químico, mas também uma diferença de potencial elétrico entre os compartimentos separados pela biomembrana ocorrerá naturalmente a atração de eletrólitos para um dos compartimentos. Por exemplo, se há  $\text{Ca}^{2+}$  fora e o interior celular é negativo, o  $\text{Ca}^{2+}$  é atraído para o interior da célula, podendo haver acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  em um compartimento. Por outro lado, estruturas ancoradas na biomembrana como canais iônicos, carregadores e bombas facilitam a passagem de eletrólitos através da fase gordurosa da biomembrana. Portanto, não é somente a diferença de potencial químico (concentração, equação I) que determina a tendência de passagem de eletrólitos através da biomembrana.

A diferença de potencial elétrico originada por meio da distribuição desigual de cargas entre os dois lados da biomembrana e a presença de facilitadores de transporte iônico (carregadores, bombas e canais) (COLODETE, 2013) também determinam a capacidade de acúmulo de cátions e ânions nos compartimentos celulares (PRADO, 2013).

A diferença de potencial elétrico entre compartimentos separados por biomembranas pode ocorrer de três principais formas não excludentes: (1) potencial de difusão, (2) força motora de prótons e (3) potencial de Donnan. Esses processos são também denominados de mecanismos 1, 2 e 3 respectivamente. Qualquer um desses três mecanismos resulta em um interior celular (citoplasma e vacúolo) mais negativo em relação ao exterior. Para acumular cargas negativas não é necessário importar essas cargas, basta exportar cargas positivas como, por exemplo, expulsar prótons  $\text{H}^+$ . Esses prótons estão mais ou menos disponíveis na solução aquosa da célula, dependendo do valor de pH em cada compartimento. Sob valor de pH mais ácido há mais cargas positivas disponíveis ( $\text{H}^+$ ). É importante notar que os prótons apresentam cargas, mas não são osmoticamente ativos, ou seja, o valor do potencial osmótico não é alterado diretamente pelo valor do pH.

Os prótons formam água ao reagirem com hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ) ou formam água protonada ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) ao reagirem com água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Transportar prótons através de biomembranas pode ser conveniente e vantajoso para criar um potencial elétrico transmembrânico e não alterar o potencial osmótico dos compartimentos adjacentes. O transporte de  $\text{H}^+$  requer certo gasto de energia, pois não ultrapassam as membranas facilmente.

Em compartimentos biológicos a expulsão de cargas positivas como o  $\text{H}^+$  é eficiente, pois cria uma diferença de potencial elétrico de até  $-130\text{mV}$ . Além de deixar o compartimento exportados mais negativo, o compartimento importador que recebe a carga  $\text{H}^+$  torna-se mais positivo. Portanto, a diferença de cargas entre compartimentos é duplamente alterada com apenas um movimento de transporte. Além disso, o compartimento que recebe  $\text{H}^+$  torna-se mais ácido.

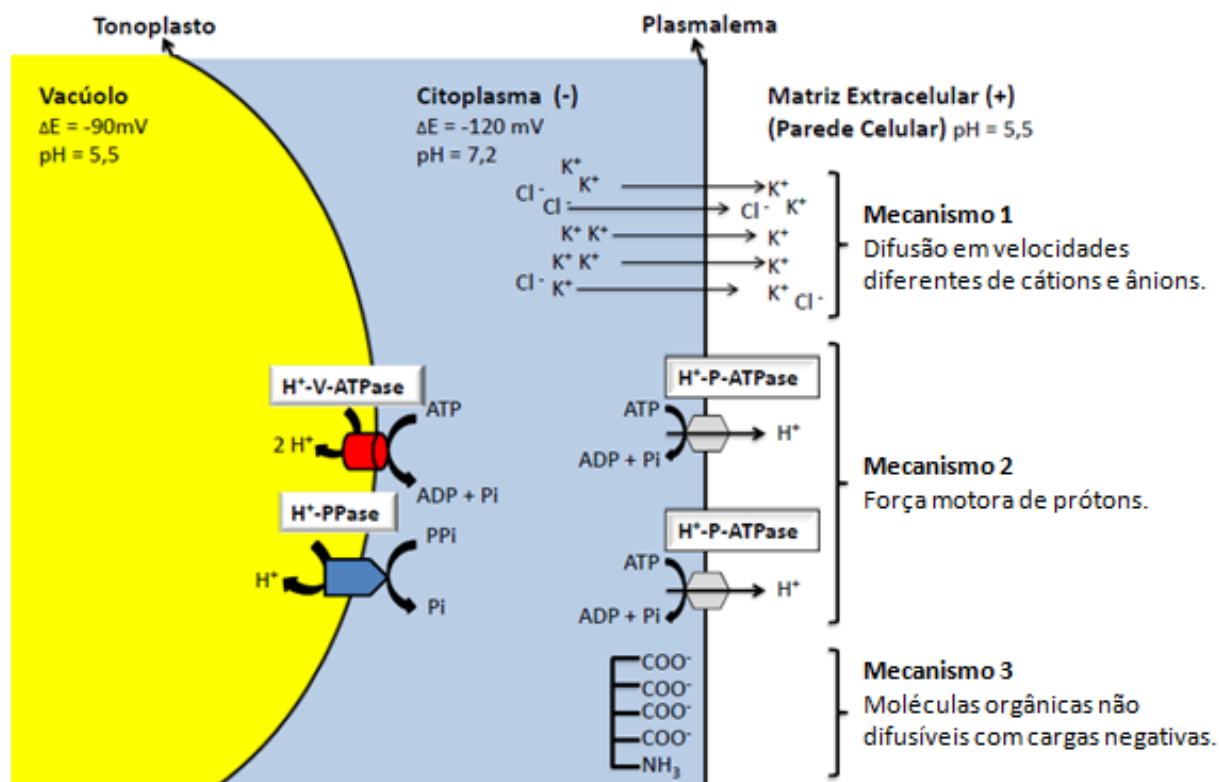


**Figura 2.** Atividade de uma bomba de prótons movimentando íons  $\text{H}^+$  através de uma biomembrana. O movimento de próton ocorre desde o compartimento 1 à esquerda para o compartimento 2 à direita, com o consumo simultâneo de ATP. Devido ao bombeamento de prótons de 1 para 2 o compartimento 2 torna-se mais positivo e mais ácido e o compartimento 1 mais negativo e mais básico, simultaneamente. Há, portanto quatro eventos decorrentes de um só movimento de carga, dois eventos em cada compartimento. O movimento de prótons não altera o potencial osmótico dos compartimentos. Modificado (PRADO, 2013).

## 2.5. Potencial elétrico de Goldman

A diferença de permeabilidade (valor de  $P$ ) entre cátions e ânions, especialmente entre  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , proporciona uma difusão mais rápida a favor do  $\text{K}^+$ . O valor de  $P$  para o  $\text{Cl}^-$  é maior que 1,0 % do valor de  $P$  para  $\text{K}^+$  em uma mesma biomembrana (para membranas artificiais a permeabilidade muda

completamente ( $K^+ < Cl^-$ ), sendo o valor de P menor que  $10 \text{ cm s}^{-1}$  para esses íons). Portanto cátions e ânions



**Figura 3.** A diferença de potencial elétrico ( $\Delta E$ ) é construída por meio de três principais processos complementares e não excludentes. Mecanismo 1: o potencial de difusão ou potencial elétrico de *Goldman*. Difusão diferenciada de cátions e ânions, principalmente entre  $K^+$  e  $Cl^-$ . Mecanismo 2: força motora de prótons: bombeamento de prótons  $H^+$  por meio de dois tipos de  $H^+$ -ATPases ( $V-H^+$ -ATPase no tonoplasto e  $P-H^+$ -ATPase na plasmalema) e por bombas de pirofosfato ( $H^+$ -PPase no tonoplasto). Mecanismo 3: potencial de *Donnan*, liberação de  $H^+$  dos radicais carboxílicos ( $-COOH$ ) terminais e adicionais (nos aminoácidos glutamato e aspartato) das proteínas. O valor de pH do vacúolo ( $\sim 5,5$ ) e o valor da  $\Delta E$  entre o vacúolo e o exterior adjacente celular ( $\sim 90 \text{ mV}$ ) são menores que os valores correspondentes da  $\Delta E$  e de pH para o citoplasma devido ao bombeamento de  $H^+$  para o interior do vacúolo. Por meio dos mecanismos 1, 2 e 3 o citoplasma torna-se negativo (-) e a matriz extracelular positiva (+). Modificado (PRADO, 2013).

## 2.6. A força motora de $H^+$

Bombas de prótons  $H^+$  ( $H^+$ -ATPases) Figura 3 (COLODETE, 2013) e a pirofosfatase ( $H^+$ -PPase) (Figura 3, mecanismo 2) (RAMOS, *et al.*, 2011; COLODETE, 2013) hidrolizam ATP ou pirofosfato (PPi), respectivamente para bombear prótons em direção ao compartimento (Figura 3, mecanismo 2). As  $H^+$ -ATPase que se localizam na plasmalema ( $P-H^+$ -ATPases) Figura 3 são diferentes na estrutura e funcionamento das ATPases ( $V-H^+$ -ATPases) Figura 3 que se localizam na membrana do vacúolo Figura 2 ou do complexo de Golgi (COLODETE, 2013). Diferente da  $P-H^+$ -ATPases Figura 3 são estruturalmente semelhantes às ATPases que sintetizam ATP na mitocôndria e no cloroplasto e também semelhantes as ATPases de bactérias ( $F-H^+$ -ATPases).

Há confusão quanto aos prefixos das ATPases (ATPase é uma grafia genérica, representando várias enzimas que sintetizam ATP utilizando a cinética de prótons ou que hidrolizam ATP e bombeiam prótons. Para as ATPases que sintetizam ATP utilizando a cinética de prótons há vários sinônimos: ATPsintase, ATPsintetase, F-ATPase em bactérias. As ATPases que hidrolizam ATP para bombear  $H^+$  podem ser  $V-H^+$ -ATPase ou  $P-H^+$ -ATPase. AS ATPases que bombeiam  $Ca^{2+}$  são



denominados  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. As ATPases que bombeiam moléculas orgânicas (antocianina e glutatona) para o interior do vacúolo são denominados ATP *binding* cassette (bombas ABC)).

## 2.7. Potencial de Donnan

Com o bombeamento de prótons para o vacúolo e para fora do protoplasto simultaneamente devido a atividade das ATPases Figura 3 o citoplasma torna-se levemente básico ( $\text{pH} \sim 7,2$ ) e o vacúolo e o exterior celular adjacente assumem comportamento ácido ( $\text{pH} \sim 5,5$ ). Nessa situação de menor concentração hidrogeniônica no citoplasma (mais básico) os agrupamentos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) das proteínas e dos aminoácidos livres tendem a perder o hidrogênio, tornando-se  $-\text{COO}^-$ .

A desprotonação de aminoácidos aumenta o número de cargas negativas no citoplasma. Os grupos carboxílicos nas proteínas que podem ser desprotonados ocorrem em uma das extremidades da molécula protéica, na outra extremidade a terminação é o agrupamento amínico,  $\text{NH}_3^+$ . Há um grupo carboxílico adicional nos aminoácidos glutamato e aspartato que também podem ser desprotonados. O aumento significativo de cargas negativas (de  $-\text{COOH}$  para  $-\text{COO}^-$ ) sob valor de diferença de potencial elétrico entre o citoplasma e o exterior celular adjacente.

As proteínas são difusíveis através da membrana, permanecendo negativas no citoplasma por meio dos grupos desprotonados  $-\text{COO}^-$ . O potencial elétrico condicionado por esse mecanismo 3 é denominado como potencial elétrico de Donnan Figura 3.

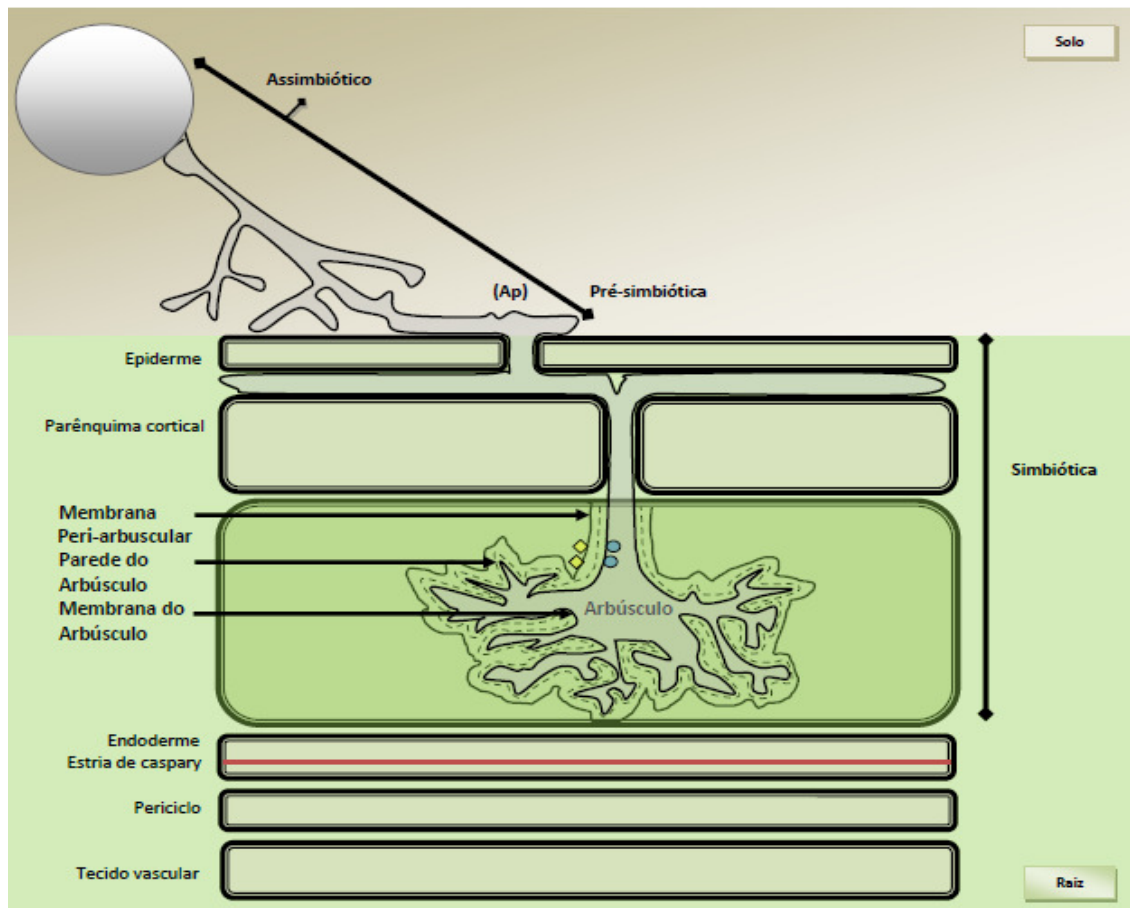
Esse potencial é de certa forma dependente da atividade das ATPases, que condicionam a diferença de pH entre compartimentos, mas não exige energia metabólica direta. Os potenciais elétricos de Goldman (Figura 3, mecanismo 1) e de Donnan (Figura 3, mecanismo 3) são capazes de estabelecer em conjunto momentaneamente um valor de  $\Delta E$  entre -50 e -80 mV.

## 2.8. Interfaces simbióticas dos FMAs e sua troca bidirecional de nutrientes

Na simbiose dos FMAs em raízes de plantas, inicia-se por uma cascata de eventos celulares, cinéticos e moleculares, os quais levam a uma integração morfofuncional entre as células da planta-fungo (CRUZ *et al.*, 2008). Isto gera diferentes tipos de interfaces simbióticas (Figura 4), as quais podem ser criadas durante a interação MA, porém sendo dependente do modo pelo qual o fungo penetra na célula hospedeira (Figura 4).

As interfaces intercelulares são formadas por hifas crescendo entre as células do córtex radicular, e as intracelulares quando a hifa intercelular penetra na parede celular da célula hospedeira e se desenvolve dentro da mesma, formando estruturas denominadas arbúsculos. Enquanto os arbúsculos são estruturas muito importantes para a simbiose MA e requer uma relação genética entre os simbiontes (LAMBAS, 2006).

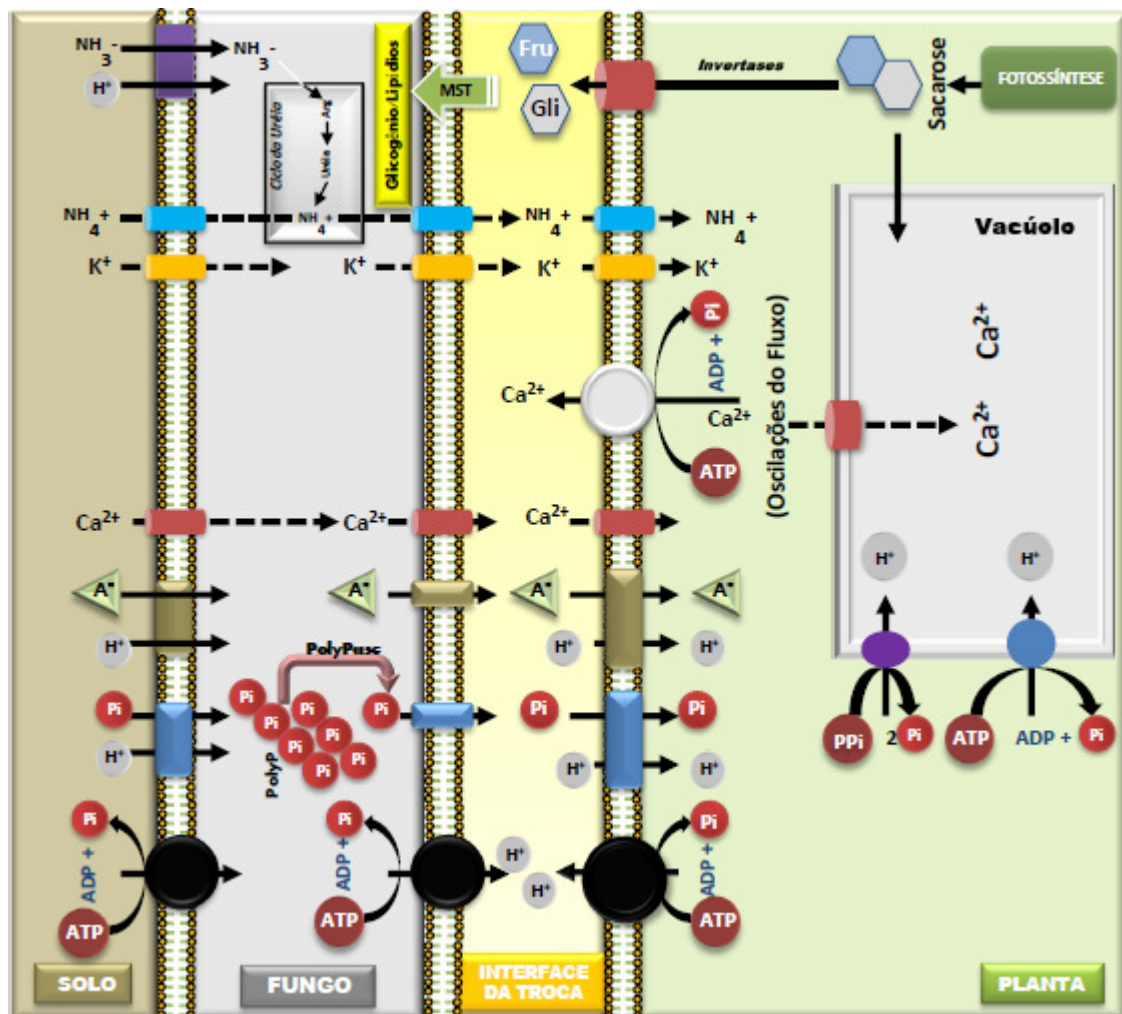
Com a penetração da hifa fúngica na célula cortical hospedeira, uma nova membrana plasmática da planta é sintetizada, estendendo-se ao longo da membrana plasmática original, sempre que o fungo está no apoplasto celular (HARRISON, 2005). Quando a hifa intercelular nas camadas corticais mais internas diferencia-se em arbúsculos, a membrana plasmática do hospedeiro modificada é referida como membrana Peri-arbuscular, sendo separada da membrana do arbúsculo pela “interface arbuscular” Figura 4.



**Figura 4.** Esquema da estrutura de um arbúsculo em uma célula cortical vegetal e a formação das interfaces de troca. Os círculos (*em azul*) representam a localização das proteínas de transporte  $H^+$ -ATPases da membrana Peri-arbuscular e os triângulos (*em amarelos*) as  $H^+$ -ATPases do FMA. É também apresentado as fases do desenvolvimento em MA. A fase **assimbiótica** compreende os eventos relacionados à germinação dos esporos no solo e crescimento do tubo germinativo. A fase **Pré-simbiótica** compreende nos eventos associados à ramificação das hifas esporofíticas em resposta a fatores de ramificação (FR) produzidos pelas plantas. A fase **simbiótica** compreende nos eventos associados à diferenciação do apressório (Ap), penetração, colonização intrarradicular e diferenciação e funcionamento do arbúsculo. Modificado (RAMOS *et al.*, 2005).

Os arbúsculos são considerados sítios-chaves na formação da interface simbiótica e no movimento bidirecional de carbono (C) e nutrientes orgânicos e inorgânicos, embora as outras interfaces também possam contribuir ativamente na troca de nutrientes (RAMOS *et al.*, 2005).

Nesta troca Figuras 4 e 5, as proteínas de transporte denominadas  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática do fungo e da planta, são responsáveis pela extrusão unidirecional de íons  $H^+$  e da quebra da molécula de ATP (transporte primário de  $H^+$ ). Assim, o gradiente eletroquímico gerado pelas ATPases impulsionam o transporte de  $P_i$ , sacarose (Sac), glicose (Gli), frutose (Fru) e outros nutrientes via transportadores de membrana (transporte secundário) (RAMOS *et al.*, 2011). Fósforo inorgânico ( $P_i$ ) absorvido do solo pelas hifas extrarradiculares são convertidos em grânulos de polifosfato para serem transportados e próximo à membrana do arbúsculo são convertidos em  $P_i$  novamente e transportados para a interface arbuscular, onde se ligam aos  $H^+$  para serem transportados para as células corticais da planta hospedeira Figura 5. O gradiente de  $H^+$  criado, ativa a abertura de canais de  $K^+$  em ambas as membranas e impulsiona a atividades dos transportadores de  $P_i$  (RAMOS *et al.*, 2011). Em troca, a planta repassa sacarose fotossintetizada à interface arbuscular, sofrendo degradação pela atividade de invertases e convertida em Gli e Fru que são transportadas para as células dos FMAs e posteriormente atingindo as rotas metabólicas para a síntese de glicogênio ou lipídeos Figura 5 (RAMOS *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Esquema do transporte bidirecional de nutrientes na interface arbuscular. As  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática do fungo e da planta são responsáveis pela transporte unidirecional de íons  $H^+$  a quebra da molécula de ATP (círculos pretos). Transportadores de fosfato, polifosfato hidrolisado por enzimas *PolyPhosphatase* (PolyPases) e atividade de canais iônicos de fungos e plantas são representados. Tanto fungos e plantas a  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática proporciona o transporte de  $H^+$  na interface e fora da célula fúngica criando um gradiente eletroquímico através da membrana que energiza o transporte secundário de  $P_i$ , de amônio ( $NH_4^+$ ), Nitrato ( $NO_3^-$ ),  $K^+$ , vários ânions ( $A^-$ ), sacarose, glicose (Gli) e frutose (Fru). A sacarose é hidrolisado (provavelmente por invertases) e os açúcares são transportados para as células fúngicas através de transportadores de monossacarídeos (MST) e posteriormente atingindo as rotas metabólicas para a síntese de lipídeos ou glicogênio. Oscilações no fluxo de  $Ca^{2+}$  e alterações no pH podem induzir a despolarização da membrana, durante a absorção de íons, o que resultando em  $Ca^{2+}$  e  $H^+$  específicas para a fase da interação micorrizal. Modificado (RAMOS *et al.*, 2011).

É relatado que a disponibilidade de C na interface possa regular a localização, distribuição e função dos arbúsculos no córtex radicular. Especula-se que a presença de diferentes interfaces (arbuscular e intercelular) possa conferir uma separação funcional e espacial dos diferentes processos de transporte na simbiose MA (RAMOS *et al.*, 2011). Deste modo, as interfaces intercelulares e as arbusculares possuiriam a mesma estrutura básica ao nível celular e bioquímico, predominando uma região apoplástica separando as membranas de ambos simbiotes. Embora a composição e estrutura do apoplasto possam afetar os processos de absorção e translocação de nutrientes entre os simbiotes, o movimento de nutrientes entre estes pode ser controlado por ambos, mas as proteínas de transporte em membrana da planta atuam mais eficientemente no controle da troca de solutos dentro e fora das células colonizadas (RAMOS *et al.*, 2011).

### 3. CONCLUSÃO

A pesquisa em micorrizas arbusculares na última década está passando por um momento especial, marcado por um melhor entendimento da biologia, genética e da ecologia desse grupo de fungos, e principalmente devido ao reconhecimento pela comunidade científica, em geral, da importância desses grupos para a manutenção da diversidade e produtividade de ecossistemas vegetais.

Além disso, apesar dos avanços do conhecimento sobre os fatores que regulam o desenvolvimento de MA, esforços adicionais são necessários para esclarecer as vias de sinalização e transdução de sinais em MA. Os estudos da genômica e proteômica, bem como a fisiologia de plantas e fungos, poderão contribuir de forma preponderante para o avanço dessa área de pesquisa. Trabalhos futuros, envolvendo microrganismos presentes no solo, acoplado à ecofisiologia e a biologia molecular (PCR-DGGE) serão importantes ferramentas para determinar uma maior amplitude das condições necessárias, favorecendo os processos de desenvolvimento do vegetal.

### 4. REFERÊNCIAS

ALLEN, M.F. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. **Mycological Research**, 769-782, 1996.

BERBARA, R.L.L.; SOUZA, A.F.; FONSECA, H.M.A.C. III Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. SBCS, Viçosa. In: Fernandes, MS. **Nutrição Mineral de Plantas**, 432: 54-85, 2006.

BONFANTE, P. & GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, 1: 48-59, 2010.

BORGES, G.R.A.; BRANDÃO, D.O.; MADEIRA, G.B.; NUNES, Y.R.F.E.; VELOSO, M.D.M. Variação das Guildas de Dispersão com a Distância da Borda em um Fragmento de Floresta Estacional Decidual, Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, 5: 903-905, 2007.

COLODETE, C.M. Fluxo molecular e iônico das proteínas de transporte em membranas. **Perspectivas online: Biológicas & saúde**, 11(3): 43-52, 2013.

CRUZ, C.; CORREIA, P.; RAMOS, A.C.; CARVALHO, L.; BAGO, A.; KLIRONOMOS, J.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Arbuscular mycorrhiza in plant physiological morphological adaptations. In: Ajit, V, Ed. *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Fuction, Biotechnology, Eco-physiology, Struncture and Systematics*. Heidelberg, **Springer-Verlag**, 733-754, 2008.

DE SOUZA, F.A.; DECLERCK, S.; SMIT, E.; KOWALCHUK, G.A. Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (*Glomeromycota*). **Mycol. Res**, 109: 697-706, 2008.

FEIJÓ, J.A.; COSTA, S.S.; PRADO, A.M.; BECKER, J.D.; CERTAL, A.C. Signalling by tips. **Current. Opinion in Plant Biology**, 7: 589-598, 2004.

FOLLI-PEREIRA, M.S.; MEIRA-HADDAD, L.S.; BAZZOLLI, D.M.S.; KASUYA, M.C.M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Rev. Bras. Ci. Solo**, 36, 1663-1679, 2012.

GAXIOLA, R.A.; SANCHEZ, C.A.; PAEZ-VALENCIA, J.; AYRE, B.G.; ELSER, J.J. Genetic manipulation of a vacuolar H<sup>+</sup>-PPase from salt tolerance to yield enhancement under. **Phosphorus Deficient Soils**. 159, 3-11, 2012.

GAXIOLA, R.A., PAEZ-VALENCIA, J., SANCHEZ-LARES, J., MARSH, E., DORNELES, L.T., SANTOS, M.P., SANCHEZ, D., WINTER, A., MURPHY, S., COX, J., TRZASKA, M., METLER, J., KOZIC, A., FAÇANHA, A.R., SCHACHTMAN, D., SANCHEZ, C.A. Enhanced Proton Translocating Pyrophosphatase. **Activity Improves Nitrogen**.161, 1557-1569, 2013.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **The plant cell**, 8: 1871-1883, 1996.

GOTO, B.T. & MAIA, L.C. *Glomerospores*: a new denomination for the spores of *Glomeromycota*, a group molecularly distinct from the *Zygomycota*. **Mycotaxon**, 96: 129-132, 2006.

GRAHAM, J.H. & EISSENSTAT, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. **Plant Soil**, 159: 179-185, 1982.

HARRISON, M.J. Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, 50: 1013-1022, 2005.

JOLICOEUR, M.; GERMETTE, S.; GAUDETTE, M.; PERRIER, M.; BÉCARD G. Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi: a symbiotic physiological marker. **Plant Physiology**, 116: 1279-1288, 1998.

LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, 63:405-413, 2006.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press Limited, London, 674p, 1986.

MARX, C.; DEXHEIMER, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Ultracitoenzymological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscular interface. **New Phytologist**, 90: 37-43, 1982.

MIRANDA, J.C.C. Cerrado: micorriza arbuscular - ocorrência e manejo. Planaltina, DF. **Embrapa Cerrados**,169, 2008.

MORATELLI, E.M.; KROKEN, S.; MEFFORD, M.J. Efeito da disponibilidade de água e de luz na colonização micorrízica e no crescimento de *Tabebuia avellanadae*. **Revista Árvore**, 31: 555-566, 2007.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. **Biochim Biophys Acta**, 1465: 1-16, 2000.

NOBREGA, J.Q.; FIDELIS, J.; BELTRÃO, N.E. Análise de crescimento do algodoeiro irrigado com água de esgotos tratados e de abastecimento. In: III Congresso Brasileiro de Algodão. **Journal of Plant**, 43: 431-434, 2001.

NGOSONG, C.; GABRIELB, E.; LILIANE, S. Collembola grazing on arbuscular mycorrhiza fungi modulates nutrient allocation in plants. **Pedobiologia - Journal of Soil Ecology**, 123: 1-9, 2014.

PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C. & BRIGGS, S.P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Natl Acad Sci Biol**, 99: 13324-13329, 2002.

PRADO, C.H.B.A. **Aquisição e uso dos nutrientes minerais da solução do solo**. São Carlos: Tipografia Editora Expressa, ISBN:978-85-66568-00-4.188p., 2013.

- RAMOS, A.C.; FAÇANHA, A.R.; FEIJÓ, J.A. Proton (H<sup>+</sup>) flux signature of the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol**, 178: 177-88, 2008a.
- RAMOS, A.C.; FAÇANHA, A.R.; FEIJÓ, J.A. A proton (H<sup>+</sup>) flux signature of the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol**, 178: 177-88, 2008c.
- RAMOS, A.C.; FAÇANHA, A.R.; PALMA, L.M.; OKOROKOV, L.A.; CRUZ, Z.M.A.; SILVA, A.G.; SIQUEIRA, A.F.; BERTOLAZI, A.A.; CANTON, G.C.; MELO, J.; SANTOS, W.O.; SCHIMITBERGER, V.M.B & OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. **Braz J. Plant Physiol**, 23(1): 79-89, 2011.
- RAMOS, A.C.; MARTINS, M.A. & FAÇANHA, R.A. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microcromossomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29: 207-213, 2005.
- RAMOS, A.C.; MARTINS, M.A.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; OLIVARES, F.L.; OKOROKOV, L.A.; RAMOS, A.C. **Papel da dinâmica do fluxo de prótons na sinalização das diferentes fases da interação micorrízica arbuscular**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, 2005.
- REA, P.A. & POOLE, R.J. Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 44: 157-180, 2000.
- REQUENA, N.; BREUNINGER, M.; FRANKEN, P.; OCON, A. Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Journal of Plant Physiology**, 132: 1540-1549, 2003.
- SANNAZZARO, A.I.; RUIZ, O.A.; ALBERTO, E.O. MENÉNDEZ, A.B. Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus intraradices*. **Journal of Plant Soil**, 285: 279-287, 2006.
- SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.E.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**. 105: 1413-1421, 2001.
- STÜRMER, S.L. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum *Glomeromycota*. **Mycorrhiza Springer Verlag**, 22: 247-258, 2012.
- SZE, H.; WARD, J.M.; LAI, S. Vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPases from plants. **Journal of Bioenerg Biomembrane**, 24: 371-38, 1999.
- TALAAT, N.B.; SHAWKY, B.T. Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. **Environmental and Experimental Botany**, 98: 20-31, 2014.