



**SORAYA MARX BAMBERG**

**CONVENTIONAL AND SYNCHROTRON-  
BASED X-RAY STUDIES FOR  
CHARACTERIZATION OF SOIL SYMBIONTS**

**LAVRAS-MG  
2019**

**SORAYA MARX BAMBERG**

**CONVENTIONAL AND SYNCHROTRON-BASED X-RAY STUDIES  
FOR CHARACTERIZATION OF SOIL SYMBIONTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro  
Orientador

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Bamberg, Soraya Marx.

Conventional and synchrotron-based X-ray studies for  
characterization of soil symbionts / Soraya Marx Bamberg. - 2019.  
80 p. : il.

Orientador(a): Marco Aurélio Carbone Carneiro.

Coorientador(a): Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. XRF. 2. Fixação biológica. 3. Micorrizas arbusculares. I.  
Carneiro, Marco Aurélio Carbone. II. Guilherme, Luiz Roberto  
Guimarães. III. Título.

**SORAYA MARX BAMBERG**

**CONVENTIONAL AND SYNCHROTRON-BASED X-RAY STUDIES  
FOR CHARACTERIZATION OF SOIL SYMBIONTS**

**ESTUDOS CONVENCIONAIS E BASEADOS EM RAIO-X  
SÍNCROTRON PARA CARACTERIZAÇÃO DE SIMBIOTES  
MUTUALISTAS DO SOLO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2019.

Dra. Cynthia Oliveira

Dr. Eduardo Alves

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Dr. Guilherme Lopes

Dr. Orivaldo José Saggin Junior

DCS/UFLA

DFP/UFLA

DBI/UFLA

DCS/UFLA

Embrapa Agrobiologia

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2019**

*Aos meus pais, Heitor e Suzana, às irmãs Jussara e Angelina e às avós  
Adélia e Glória.*

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir toda essa conquista!

À Universidade Federal de Lavras e ao seu Departamento de Ciência do Solo, a oportunidade de realização do doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – PROEX – 0487.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento das ações de pesquisa.

Ao professor Dr. Marco Aurélio C. Carneiro, a orientação, aos conselhos e por confiar em meu trabalho. Ao professor Dr. Luiz Roberto G. Guilherme, a coorientação e ao apoio.

À minha família por todo o apoio durante essa trajetória. Angelina e Jussara, minhas irmãs, vocês foram essenciais para eu chegar até aqui. Aos meus pais, por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial. Vó Adélia, com seu apoio que tornou esse caminho mais doce! Vó Glória, obrigada pelo carinho de sempre! Aos primos e primas, obrigada por deixarem tudo mais divertido. Aos tios e tias, obrigada pela atenção e receptividade que sempre tiveram comigo.

Ao meu namorado João Paulo Ananias pelo companheirismo e paciência durante o doutorado. Às amigas Luiza Helena e Marina Faleiro, que mesmo de longe sempre participaram dessa conquista. Julia e Ana Carolina obrigada pelo ombro amigo!

Obrigada aos técnicos do DCS/UFLA, em especial ao “Seu” Manoel, Dirce, Dulce e Geila.

Ao professor Dr. Alfredo Lopes, “Alfredão”, agradeço por compartilhar seus conhecimentos e suas experiências de vida, e ao grande amigo que é.

Às amigas Jéssica e Monna Lysa por tornarem meu convívio cada dia mais agradável, vocês são demais. Aos amigos da graduação Ana Luisa e Lucas por todo o suporte e amparo. Ao cunhadinho Leco e ao primo Zé Arthur por sempre tornarem os momentos familiares mais agradáveis. Às amigas Mariel, Marina (bichim), e Gabi pela torcida fantástica. Aos queridos Cristiane, Cristiano, Sassá, Eduardo, Aryane, Anita, Serginho, Sara, Geanderson, Fábio, Bárbara, Douglas, Bruna, Ivan, Ju (*in memorian*), Maria Jéssica, Maíra, Marisângela, Aline, Karl, Ediu, Flávia, Franklin, Zélio, Corguinha e Cynthia obrigada pela amizade e toda a convivência.

**MUITO OBRIGADA!**

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*

*Leonardo da Vinci*



## RESUMO

As bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) nodulíferas, em simbiose com leguminosas formam estruturas denominadas nódulos que aumentam a eficiência da fixação de N. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são conhecidos por sua eficiência em disponibilizar P para as plantas. A simbiose tripla entre leguminosas, FMAs, e BFN é denominada de tripartite. Na relação tripartite a formação do nódulo protege a BFN, os FMAs fornecem P para o sistema, e as leguminosas fornecem fotoassimilados para ambos simbioses. Tendo em vista os benefícios nutricionais dessas relações a tese tem como objetivo avaliar o estado nutricional dos microrganismos da associação tripartite e identificar os possíveis mecanismos de FMAs na absorção e compartimentalização de Se em seus esporos como possível estratégia de proteção às plantas. No primeiro estudo feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus* L. Walp) foi cultivado em vasos, aos quais foram adicionados isolados de FMAs (*Glomus macrocarpum* e *Acaulospora colombiana*) e de BFN (*Bradyrhizobium japonicum*), e plantas controle. A quantificação dos elementos minerais nos componentes simbiose tripartida foi realizada utilizando-se espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS), e para identificar estruturas utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O segundo estudo foi conduzido com capim braquiária (*Urochloa decumbens*) cultivados por 30 dias em vaso, utilizando os isolados fúngicos (*Acaulospora morrowiae*, *Dentiscutata heterogama* e *Rhizophagus clarus*), plantas controle não inoculadas, e cinco doses de selenato de sódio (0, 2, 4, 6 e 8 mg kg<sup>-1</sup> Se). Um experimento paralelo foi conduzido em meio ágar utilizando placas de Petri com as mesmas doses de Se do experimento em vaso, o que permitiu que sete esporos de *Dentiscutata heterogama* crescessem por 15 dias a 37 °C. Foram avaliados a colonização micorrízica e o acúmulo de Se na parte aérea da planta, além da quantificação e visualização de Se nas estruturas de FMAs através de microanálises de fluorescência de raio-X síncrotron (S-XRF). A análise de EDX detectou 13 elementos, mostrando os de ocorrência em todos os tecidos, nas raízes, na epiderme e nos nódulos de feijão. A distribuição dos elementos no feijão foi relacionada à sua função na simbiose. Os fungos alcançaram altas taxas de colonização nas plantas de braquiária. O acúmulo de Se na parte aérea indicou um possível efeito protetor proporcionado por *R. clarus* em *U. decumbens* ao evitar acúmulo de Se. A análise por S-XRF identificaram Se uma vesícula de *R. clarus*, dentro de um fragmento de raiz, além de Se em esporos de *D. heterogama* cultivados em placa de Petri. Diante dos trabalhos executados as técnicas de MEV-EDS e S-XRF foram eficientes para a caracterização de simbioses do solo, permitindo uma contribuição científica de aplicabilidade desses microrganismos.

**Palavras-chave:** XRF. Fixação biológica. Micorrizas arbusculares.

## ABSTRACT

Nitrogen-fixing bacteria (NFB) in symbiosis with legumes form structures called nodules that increase the N fixation efficiency. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are known by their efficiency in obtain P available to plants. The triple symbiosis between legumes, FMAs, and NFB is denominated tripartite. In the tripartite symbiosis the nodule formation protects the NFB, the AMF provide P to the system, and the legumes provide photoassimilates for both symbionts. In view of the nutritional benefits of these relationships the thesis aims are to evaluate the nutritional status of the tripartite association microorganisms and to identify the possible AMF mechanisms in the absorption and compartmentalization of Se in their spores, as a possible strategy to the plant protection. In the first study lima-bean (*Phaseolus lunatus* L. Walp) was cultivated in pots, to which were added AMF isolates (*Glomus macrocarpum* and *Acaulospora colombiana*) and NFB (*Bradyrhizobium japonicum*), also control plants were added. The quantification of the mineral elements in the tripartite symbiosis components was performed using X-ray dispersive energy spectroscopy (EDX), and scanning electron microscopy (SEM) was used to identify structures. The second study was conducted with Brachiaria decumbens (*Urochloa decumbens*) cultivated for 30 days in pot, using AMF isolates (*Acaulospora morrowiae*, *Dentiscutata heterogama* and *Rhizophagus clarus*), uninoculated control plants, and five doses of sodium selenate (0.2 , 4, 6 and 8 mg kg<sup>-1</sup> Se). A parallel experiment was conducted on agar medium using Petri dishes with the same Se doses from the pot experiment, which allowed seven spores of *Dentiscutata heterogama* fungi to grow for 15 days at 37 °C. Mycorrhizal colonization and the Se in shoot plant accumulation were evaluated, as well as the quantification and visualization of Se in the AMF structures by microanalyses of synchrotron X-ray fluorescence (S-XRF). EDX analysis detected 13 elements, showing the occurrence in all tissues, roots, epidermis and nodules. The distribution of the elements in the bean was related to its symbiosis function. The fungi reached high colonization rates in the brachiaria plants. The Se accumulation in shoot plants indicated a possible protective effect provided by *R. clarus* in *U. decumbens* to avoid Se accumulation. The S-XRF analysis identified Se in a vesicle of *R. clarus* within a root fragment, and also, Se presence in *D. heterogama* spores germinated in Petri dish. In view of the thesis studies, the SEM-EDX and S-XRF techniques were efficient for the soil symbionts characterization allowing a scientific contribution of applicability of these microorganisms.

**Keywords:** XRF. Biological fixation. Arbuscular mycorrhizae.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Simbioses do solo.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1 Nitrogenase .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2 Caracterização morfológica .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Micorrizas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.1 Micorrizas arbusculares e selênio.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Simbiose tripartite .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Luz Síncrotron .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.1 Linha de luz fluorescência de raio-X.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia dispersiva de raio-X .....</b>	<b>30</b>
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. ARTIGO 1 - X-RAY MICROANALYTICAL STUDIES OF MINERAL ELEMENTS IN THE TRIPARTITE SYMBIOSIS BETWEEN LIMA BEAN, N<sub>2</sub>-FIXING BACTERIA AND MYCORRHIZAL FUNGI .....</b>	<b>39</b>
<b>5. ARTIGO 2 - SELENIUM COMPARTMENTALIZATION IN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN ASYMBIOTIC STAGE AND ASSOCIATED WITH BRACHIARIA GRASS.....</b>	<b>61</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO**

A simbiose pode ser definida como uma associação permanente ou duradoura entre organismos, a qual é caracterizada pelo contato físico, troca de metabólitos e de nutrientes, integração morfofisiológica e regulação funcional entre os parceiros. Podem ser caracterizadas como mutualistas, quando os dois organismos são beneficiados, ou ainda parasíticas, quando um dos indivíduos é beneficiado e o outro prejudicado.

Os simbiosiontes do solo são de extrema importância no funcionamento do planeta, pois participam de processos indispensáveis para o “ecossistema solo”, tais como: a mineralização da matéria orgânica do solo (MOS) e de xenobióticos, o controle biológico de pragas e doenças, a ciclagem de nutrientes e formação de húmus, além de participarem do equilíbrio biológico.

Em uma dimensão rizosférica destacam-se os microrganismos que se nutrem de substâncias oriundas da simbiose com plantas. Os simbiotróficos, assim denominados, recebem a transferência de fotoassimilados, especialmente através das raízes e estabelecem relações mutualistas ou parasíticas, dando sequência aos processos microbiológicos do solo.

As bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) destacam-se entre os organismos simbiotróficos, que além de se associarem individualmente com as plantas, podem, também, formar uma associação tripla, denominada de tripartite.

As BFN são notadas, de relevância por sua eficiência em fixar nitrogênio atmosférico, principalmente em leguminosas, uma vez que a adubação nitrogenada pode ser suprimida em até 80% de N, no caso da soja, gerando uma economia monetária e energética considerável (SENAR, 2015).

Considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) baseia-se na quebra da tripla ligação de dois átomos do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) através dos microrganismos diazotróficos, resultando em amônia ( $NH_3$ ), que é assimilável pelas plantas.

As BFN podem ser caracterizadas como de vida livre, associativas ou nodulíferas, as quais formam os nódulos e podem ser consideradas como simbiose mutualistas. O tipo mais comum de simbiose ocorre entre as espécies da família Leguminosae e as bactérias de solo dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rizobium* e *Sinorhizobium* (popularmente denominados de rizóbios).

Os FMAs são conhecidos principalmente por sua eficiência em disponibilizar o fósforo para as plantas e por colonizarem até 80% das espécies vegetais existentes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A ampla existência dessa simbiose proporcionou a descoberta de outros benefícios atribuídos aos FMAs, tais como: absorção de nutrientes, regulação da absorção de oligoelementos, maior alcance da água, dentre outros (BERBARA et al., 2006; MELLONI et al., 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOARES; CARNEIRO, 2010).

As micorrizas são as associações mutualistas formadas pelos FMAs e as espécies vegetais. Sua versatilidade de uso é empregada desde programas de biofortificação, reabilitação de áreas degradadas, fitoestabilização e até fitoremediação (NOGUEIRA; SOARES, 2010), sendo que, a última situação ainda necessita de maior interpretação a respeito dos mecanismos dessa proteção às plantas. Um estudo realizado por Bamberg et al. (2015), mostrou que em doses excessivas de selênio (Se), a presença de FMAs proporcionou maior crescimento às plantas de braquiária quando comparada as plantas sem esses fungos, comprovando a eficiência dos mesmos em promover a tolerância ao Se e auxílio no desempenho nutricional da planta. Entretanto novas investigações a respeito do mecanismo de proteção dos FMAs quando em excesso de Se devem

ser realizadas, levando em conta as hipóteses de compartimentalização ou exclusão desse elemento em estruturas fúngicas.

A associação de plantas leguminosas, FMAs e BFN constitui uma simbiose tripartite de interesse especial do ponto de vista ambiental e nutricional, pois, esses microrganismos oferecem características benéficas para a planta hospedeira, tais como maior aporte de N e P, e por consequência, para a manutenção do ecossistema, pois podem minimizar o uso de adubos fosfatados e nitrogenados. Esses benefícios são conferidos ao desenvolvimento de estruturas especializadas, como nódulos em raízes de plantas, formadas por expansão de células do crescimento das BFN nodulíferas e por uma rede de hifas fúngicas, o que aumenta o volume de solo explorado.

Alguns autores relatam que esta simbiose pode evoluir para uma interação mais específica, desenvolvendo contato direto (face a face) entre os microrganismos, ou seja, estruturas fúngicas que colonizam o tecido nodular. Os primeiros relatos dessa interação entre microrganismos foram feitos com microscopia de luz, sendo observados apenas em nódulos senescentes - sem atividade (BAIRD; CARUSO, 1994; SCHEUBLIN; VAN DER HEIJDEN, 2006).

A quantificação e o balanço nutricional da simbiose tripartite só era possível nas plantas hospedeiras dessa associação, devido à disponibilidade de material para análise e aos vários métodos estabelecidos para isso. No entanto, em estudos com microrganismos, a quantificação elementar é limitada por suas dimensões. Com os avanços nas técnicas de visualização, particularmente na microscopia eletrônica de varredura com espectrometria de energia dispersiva de raio-X (MEV-EDX), possibilitou-se a realização de análises multielementares não destrutiva em materiais biológicos pequenos, tais como nódulos, raízes e esporos de FMA. Dessa forma tornou possível a averiguação do balanço nutricional em uma simbiose tripartite.

O uso da luz síncrotron para pesquisas em materiais nano e micrométricos vem mostrando-se eficiente e confiável, especialmente para analisar e caracterizar as estruturas e matérias presentes em microrganismos (STAEDLER; MASSON; SCHÖNENBERGER, 2013; SZCZEPANOWSKA; JHA; MATHIA, 2015). Através da linha de fluorescência de raio-X (XRF) faz-se possível identificar os elementos químicos e sua forma estrutural, na presença de padrões de identificação, em materiais com 50 a 200 micrometros de espessura, obtendo-se elevada precisão.

Observadas as singularidades e lacunas nas investigações micromorfológicas desses microrganismos do solo, a linha XRF do laboratório nacional de luz síncrotron (LNLS) mostra-se como uma alternativa de elevado amparo tecnológico e confiabilidade para identificar as especificidades da colonização micorrízica em estruturas específicas, como nódulos, e da compartimentalização do Se nessas estruturas, quando existir excesso desse elemento no solo. Dessa maneira, justifica-se o emprego dessas técnicas nas investigações microbiológicas em simbioses do solo.

Reafirmando as potencialidades das técnicas de raios-X para caracterizar os simbioses do solo, os objetivos desta tese são: avaliar e caracterizar através de MEV- EDX a distribuição de elementos minerais absorvidos durante a simbiose tripartite em *Phaseolus vulgaris*, FMAs e BFN; identificar os possíveis mecanismos do FMAs na absorção e redução de translocação de Se em esporos como possível estratégia de proteção às plantas; verificar se há compartimentalização de Se em estruturas de armazenamento de FMAs. Desta forma podendo elucidar particularidades em cada simbiose.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Simbioses do solo**

Relação simbiótica é uma associação estabelecida entre seres vivos, em que os organismos criam uma relação permanente ou duradoura caracterizada pelo contato físico, troca de metabólitos e nutrientes, integração morfofisiológica e regulação funcional entre os mesmos.

Os organismos em simbiose podem ter relação parasítica ou mutualista dependendo da característica da interação. Caso seja positiva podem ser mutualista, mas em caso de algum dos indivíduos serem prejudicados, a relação é parasítica.

As interações simbióticas positivas, também denominadas mutualistas, permitem que organismos de diferentes nichos possam sobreviver em locais onde nenhum dos dois tipos sobreviveria individualmente, ou, ainda, permitir que estes, ao se complementarem, utilizem uma maior abrangência de recursos para sua manutenção. As interações negativas podem ser consideradas como danosas, ao analisarmos somente o indivíduo na interação, mas, em um espectro maior, ao exemplo de populações e ecossistema, podem ser consideradas benéficas, devido ao impedimento de explosões populacionais e contribuírem para a seleção natural, gerando novas adaptações (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002).

Devido à ocorrência e importância ecológica e econômica de algumas simbioses, existem duas principais no ecossistema solo, sendo elas os nódulos fixadores de nitrogênio e as micorrizas. Essas simbioses são indispensáveis para a funcionalidade do ecossistema solo, pois além de beneficiarem nutricionalmente, as espécies vegetativas contribuem com a manutenção do meio em que se encontram através da inserção de fotoassimilados no complexo rizosférico.



Essas simbioses também são conhecidas como relação de simbiotrofismo, isto é, os organismos crescem e se nutrem de substâncias oriundas de organismos vivos. A ocorrência de cada uma dessas simbioses se dá através da interação entre plantas da família leguminosa e as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), entre plantas e os FMAs, para as micorrizas, e ainda há uma particularidade das micorrizas, que conseguem se associar às plantas leguminosas, caracterizando uma relação de mutualismo entre três organismos do solo, as BFN os FMAs e as espécies vegetativas leguminosas, denominada de tripartite.

## **2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio**

Devido à importância nutricional do N para as plantas e o elevado custo de produção de fertilizantes nitrogenados, a FBN passa a ser fundamental para a sustentabilidade do planeta. Estima-se que essa aquisição biológica de N é responsável por reduzir 258 milhões de toneladas de N atmosférico em amônia por ano, evitando gastos energéticos para a produção de fertilizantes nitrogenados e gastos econômicos para a aquisição desses insumos (EMBRAPA, 2017; FREIBERG et al., 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A FBN é o processo pelo qual o  $N_2$  é assimilado pelas BFN através da quebra da ligação tripla do N atmosférico, e então é disponibilizado para plantas em formas assimiláveis (MOREIRA et al., 2010; SAMPAIO; COSTA, 2011). Os mecanismos utilizados pelas bactérias para a redução do N atmosférico se deve à quebra da tripla ligação proporcionada pela enzima nitrogenase, que por sua vez é produzida por esses microrganismos. Essa conversão é caracterizada como a principal via de incorporação de N à biomassa terrestre.

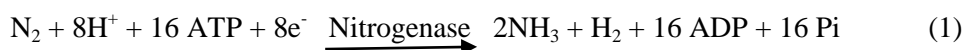
As BFN são também denominadas de organismos diazotróficos e podem ser caracterizadas de acordo com a relação que estabelecem com as plantas, sendo elas: de vida livre, associativas ou, ainda, simbióticas, nesse caso quando

as BFN dos gêneros *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phylorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* realizam uma relação de mutualismo com leguminosas (MOREIRA et al., 2010; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SANTOS; REIS, 2008).

Apesar de presente em um grande número de espécies, a capacidade de FBN não é comum a todas as leguminosas, variando entre sub-famílias, gêneros e até mesmo entre espécies dentro de um mesmo gênero (SAMPAIO; COSTA, 2011).

### 2.2.1 Nitrogenase

A nitrogenase é um complexo enzimático responsável pela fixação biológica de nitrogênio em nódulos radiculares das leguminosas. São encontrados na estrutura interna desses nódulos, os denominados bacteroides, os quais sintetizam as proteínas desse complexo enzimático, bem como reduzem, no interior de seu citoplasma, o nitrogênio molecular para  $\text{NH}_3$  (Equação 1), que então é rapidamente convertida a amidas e/ou ureídeos, para nutrirem a planta hospedeira (MOREIRA et al., 2010; RODAK et al., 2017; SANTOS; REIS, 2008).



O complexo enzimático é constituído de proteínas distintas: a ferro proteína ou dinitrogenase, constituída pelo átomo de Fe; a Molibdenio-ferro proteína ou dinitrogenase redutase, formada por átomos de Mo e Fe; a Vanádio-ferro proteína, que ocorre quando o vanádio substitui o molibdênio, encontrados nas bactérias *Clostridium*, *Rhodobacter*, *Anabaena*, *Rhodospirillum*, *Heliobacterium* e *Azospirillum*; e ainda há um quarto tipo de nitrogenase, encontrada na bactéria *Streptomyces thermoautotrophicus*, cuja propriedade mais notável é a dependência de oxigênio e do radical superóxido, diferindo das

demais proteínas, que são extremamente sensíveis à presença de oxigênio (BURÉN; RUBIO, 2018; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; WANG et al., 2016).

Por apresentarem na maioria das espécies de diazotróficos, a Fe-proteína e a FeMo-proteína são consideradas unidades básicas da nitrogenase. A Fe-proteína é a doadora de elétrons para a MoFe-proteína, que por sua vez reduz o substrato, em processo bastante energético (MAYER et al., 1999; VRUBEL, 2007). Além do nitrogênio molecular, outros substratos também podem ser catalizados pela nitrogenase, tais como: acetileno, cianeto, óxido nitroso e isocianeto de metilo.

Devido à sua falta de toxicidade e fácil disponibilidade, o acetileno ( $C_2H_2$ ) é frequentemente utilizado para mensurar a atividade da nitrogenase. No procedimento de ensaio, os nódulos radiculares das leguminosas são expostos a 25% de acetileno na mistura de ar e incubados a 25 - 30°C. O etileno ( $C_2H_4$ ) produzido pela redução do acetileno é medido por cromatografia gasosa. Embora a redução de acetileno seja um método sensível para avaliar a atividade da nitrogenase, a informação de redução não pode ser traduzida em N fixado devido a frequentes desacordos teóricos na estequiometria dos dois processos de redução, entretanto permite uma estimativa da capacidade de fixação biológica de  $N_2$ .

### **2.2.2 Caracterização morfológica**

As BFN nodulíferas (BFNNL) são aquelas com a presença do gene nod e possuem a capacidade de colonizar endofiticamente as raízes de leguminosas, formando estruturas altamente especializadas conhecidas como nódulos (BROUGHTON et al., 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nódulos são órgãos novos, que consistem de células infectadas das plantas com microrganismos diazotróficos, que por sua vez promovem a fixação biológica do nitrogênio (SANTOS; REIS, 2008).

A formação dessa estrutura é iniciada pela etapa de exsudação e quimiotaxia radicular, ou seja, há emissão de compostos flavonoides das raízes das plantas, os quais percorrem os poros do solo e ativam a regulação da expressão gênica dos genes NodD das BFNNL, que por sua vez direcionam a síntese de lipo-quito-oligossacarídeo do fator Nod e então as secretam, permitindo o reconhecimento pelas células da raiz da leguminosa e conseqüentemente proporcionam a adesão do rizóbio ao pêlo radicular, bem como a deformação e encurvamento do mesmo para a penetração das bactérias e formação de um canal de infecção (BROUGHTON et al., 2006; FREIBERG et al., 1997; PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000). O cordão de infecção consiste de uma extensão tubular interna contendo bactérias, que avançam em direção à base do pelo que infectaram. Ao adentrarem a base há fusão da membrana plasmática com vesículas derivadas do Complexo de Golgi, chamado de sítio de infecção.

Em seguida, através das camadas do parênquima do córtex da raiz, continuando frequentemente o seu desenvolvimento até atingirem as células exteriores à endoderme. A partir de então ocorre a divisão celular, hiperplasia, e a ramificação do cordão de infecção nas células adjacentes, que através da multiplicação bacteriana ocasiona o enchimento da cavidade celular dos tecidos atingidos. Dessa forma o parênquima cortical e a epiderme são forçados para fora, formando na raiz uma entumescência lateral denominada nódulo (CARVALHO, 1946; COSTA, 2011; FREIBERG et al., 1997).

### **2.3 Micorrizas**

As micorrizas são relações simbióticas, não patogênicas e benéficas entre certos fungos de solo e plantas superiores (MIRANDA; MIRANDA, 1997). Essas associações são caracterizadas como o tipo de mutualismo mais comum na natureza (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002), possuindo

dessa forma uma grande variedade de espécies de fungos e condições para o estabelecimento da simbiose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A classificação dessa associação é baseada na morfologia e anatomia e podem ser divididas em seis tipos anatômico-funcionais: ectomicorriza, ectendomicorriza, micorrizas orquidóides, micorrizas arbutóides, micorrizas ericóides e micorrizas arbusculares, sendo esta última de maior ocorrência no planeta (MIRANDA; MIRANDA, 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os FMAs são pertencentes ao filo Glomeromycota, o qual é dividido em três classes (*Archaeosporomycetes*, *Glomeromycetes* e *Paraglomeromycetes*), cinco ordens (*Glomerales*, *Diversisporales*, *Gigasporales*, *Archaeosporales*, e *Paraglomerales*), quinze famílias, 38 gêneros e atualmente, compõem uma diversidade fúngica com, aproximadamente, 270 espécies descritas (CASTILLO et al., 2016).

A ocorrência dos FMAs é ampla, podendo ser encontrada em todas as latitudes e em quase todos os ecossistemas terrestres, além disso, mais de 80% das espécies vegetais existentes estão aptas a realizarem essa simbiose, sendo considerada como regra no ecossistema solo (SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

O funcionamento dessa relação ocorre através do fornecimento de fotoassimilados da planta, oriundos da fotossíntese para os fungos, que em contrapartida absorvem nutrientes minerais e água do solo translocando-os para a planta (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006).

O desenvolvimento dessa simbiose começa a partir da emissão exsudatos pelas plantas hospedeiras, que por sua vez estimulam o crescimento e ramificações micelial dos FMAs. Ocorre, então, a formação de hifas na superfície da raiz, através de trocas de sinais bioquímicos e reconhecimento de sinais topográficos pelos FMAs, que por sua vez diferenciam-se em apressórios, ao qual dá início à colonização de todo o tecido cortical. Ao penetrar a parede celular, a hifa se torna extremamente fina, reduzindo seu diâmetro a menos de 1

µm, para então ramificar-se e formar uma matriz de troca com a plasmalema da célula vegetal sem, entretanto, ultrapassá-la. (KIRIACHEK et al., 2009; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

A penetração e o crescimento das hifas micorrizicas no córtex radicular são considerados pré-requisitos para o desenvolvimento de arbúsculos, que são estruturas similares a um haustório excessivamente ramificado e sua função é de trocas de nutrientes das micorrizas (BONFANTE; ANCA, 2009; KIRIACHEK et al., 2009). Após a hifa penetrar em uma célula do córtex, os arbúsculos são originados a partir da intensa divisão dicotômica do ápice da hifa, juntamente com o rearranjo da parede e membrana celular vegetal, que sofrem influência desse processo infectivo. Além da formação de arbúsculos, as hifas de FMAs, ao crescerem, vão se acomodando entre as paredes celulares da raiz de sua hospedeira, até alcançarem o córtex, onde também é possível a colonização intracelular e formação de hifas intracelulares enoveladas, vesículas e células auxiliares (KIRIACHEK et al., 2009).

Alguns dos mecanismos utilizados pelos FMAs em simbiose são a absorção e mobilização de nutrientes através de suas hifas externas, que por sua vez possuem uma extensão prolongada (até 8mm de distância em média das radículas) e pequeno diâmetro, permitindo uma maior exploração dos espaços do volume do solo, inalcançáveis pelas raízes (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 2006; MELLONI; CARDOSO, 1999). Dessa forma proporcionam para sua hospedeira melhorias na parte nutricional e ambiental, já que a planta estará menos susceptível a estresses (hídrico, por exemplo) ou antrópicos (solos contaminados).

Existem vários estudos mostrando a eficiência dos FMAs na absorção de diversos elementos, entretanto sua eficiência foi amplamente documentada e estabelecida para o P, Zn e Cu (BRESSAN et al., 2001; SIQUEIRA et al., 1998; SIQUEIRA; SAGGIN-JÚNIOR, 2001). Marschner e Dell, (1994) constataram

até 80% de eficiência na absorção de P em plantas micorrizadas, bem como 25% para o Zn e 60% para o Cu. Os efeitos nutricionais nas plantas resultam, principalmente, da ação do fungo na absorção e, em alguns casos, de modificações na translocação e eficiência de utilização dos nutrientes absorvidos pelas micorrizas ou raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; POUYÚ-ROJAS; SIQUEIRA, 2000).

De modo geral, quando o teor do elemento que limita o desenvolvimento da planta é baixo no solo, a micorrização, ou seja, a capacidade de estabelecimento de micorrizas, resulta em grandes benefícios para o crescimento e o desenvolvimento da planta. A colonização e relação trófica entre o fungo e planta é regulada principalmente pelo requerimento nutricional da planta e pela sua habilidade em adquirir os nutrientes minerais do solo (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). A exploração de maior volume de solo, proporcionada pelos FMAs, envolve a maior aquisição de nutrientes pouco móveis no solo, a exemplo do P, podendo influenciar também a absorção de outros elementos ali presentes (HART; FORSYTHE, 2012).

Outras interações nutricionais entre FMAs e bactérias tem mostrado um efeito benéfico aos FMAs junto ao desenvolvimento de BFN nodulíferas e vice-versa, a exemplo da aquisição nutricional do N, que também é um nutriente absorvido por esses fungos. Os genes envolvidos na absorção orgânica e inorgânica de N foram identificados em FMAs, além de que ocorre a ativação de transportadores de N na planta hospedeira durante a micorrização, o que sugere que esses fungos liberam uma quantidade substancial de N para seus hospedeiros e tem o aporte desse elemento auxiliado pelas BFN (BONFANTE; ANCA, 2010; GUETHER et al., 2009).

Há grande interesse em conhecer os potenciais efeitos das micorrizas na absorção de outros elementos de ocorrência natural no solo, visto que essa simbiose poderia auxiliar em programas de biofortificação alimentar ou ainda de

fitorremediação. Como, por exemplo, no caso do selênio - Se, um elemento essencial aos humanos e animais e benéfico às plantas, que em solos brasileiros possuem baixa ocorrência natural, em média  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , já em solos chilenos, chineses e russos podem ser encontrados em doses altamente tóxicas às plantas, acima de  $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$  (FORDYCE, 2013).

Sabe-se que os FMAs podem exercer efeitos variados na absorção de metais e ametais pelas plantas, podendo aumentar ou diminuir a absorção dependendo da concentração no solo (SOARES; MACHADO, 2007). Alguns estudos mostram diferentes consequências para as hospedeiras dessa simbiose micorrizica, como por exemplo, em estudo com *U. decumbens*, Silva et al. (2006) relataram que várias espécies de FMAs aumentaram a absorção de metais pesados do solo, já em *Sorghum vulgare*, as plantas micorrizadas obtiveram maior tolerância ao Ni, quando cultivadas em solos ultramáficos (AMIR et al., 2013) em contrapartida, Goicoechea et al., (2015) adicionaram Se e FMAs em plantas de alface e observaram o surgimento de compostos bioativos em partes comestíveis desse vegetal, elevando o seu valor nutritivo.

Avaliar, conhecer a absorção e transferência de elementos que as micorrizas podem proporcionar para as plantas, assim como os mecanismos envolvidos neste processo merece elevada atenção. Dessa forma estudos direcionados para a investigação de FMAs faz-se de elevado interesse tecnológico para os setores agrícola e ambiental.

### **2.3.1 Micorrizas arbusculares e selênio**

Os relatos na literatura científica sobre a influência das micorrizas arbusculares na absorção e acúmulo de Se nas plantas ganharam maior visibilidade a partir da década de 90, sendo, portanto, considerados ainda recentes e requerem ampla diversidade de espécies vegetais a serem pesquisadas (GOICOECHEA et al., 2015; WANEK; VANCE; STAHL, 1999; YU et al.,



2011; YULING; YUANYING, 2014). Entretanto há várias investigações sobre o comportamento desses fungos na absorção de elementos-traço, os quais englobam o Se (NOGUEIRA; SOARES, 2010).

Quando ocorre a alta concentração de elementos traço no ambiente, os FMAs comportam-se como agentes tamponantes (ANZANELLO et al., 2011; NOGUEIRA; SOARES, 2010), ou seja regulam a absorção desses elementos para a planta, aumentando a absorção pela planta quando há menor disponibilidade no solo ou reduzindo a absorção quando ocorre o contrário. Dessa forma contribuindo com a fertilização de Se nas plantas, visto que os limites das dosagens no solo para ser considerado um elemento benéfico ou tóxico são próximos.

Estudos promissores quanto à aplicação de Se e FMAs vem sendo relatado, principalmente nas duas últimas década, entretanto, ainda são necessárias maiores investigações para as diversas espécies vegetais hospedeiras dessa simbiose na presença desse metalóide. Como exemplo, as flores de *Antirrhinum majus* L. foram avaliadas quanto à inoculação de *Rhizophagus intraradices* e pulverização foliar de ácido selenídrico, demonstrando melhor desempenho de altura, comprimento e diâmetro basal das hastes florais quando aplicados esses dois tratamentos (TOGNON et al., 2016). No Sul do Chile, um estudo com trigo, selenobactéria e fungo micorrízico *Claroideoglossum claroideum* demonstrou um sinergismo entre esses componentes, resultando em um incremento de aproximadamente 23% no teor de Se na planta (DURÁN et al., 2013). O teor de Se em alho foi elevado na planta quando, juntamente à fertilização do solo, foi inoculado o fungo micorrízico *Glomus intraradices* (LARSEN et al., 2006).

Em contrapartida, estudos envolvendo a absorção do Se e inoculação de *Funneliformis mosseae*, em alfafa, milho e soja mostraram, que o teor de Se nas raízes e parte aérea diminuíram quando se aplicou uma menor dosagem de Se

(entre 0 e 2 mg kg<sup>-1</sup>) em conjunto com esse FMAs. Em alfafa e milho obteve-se maior acumulação de Se, quando se aplicou 20 mg kg<sup>-1</sup> desse elemento, também na presença de FMAs (YU et al., 2011). Efeito indiferente quanto à absorção de Se em trigo foi observado, quando inoculou-se *Claroideoglonus claroideum* e fertilizou-se com Se as plantas, apesar de haver um aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) (DURÁN et al., 2018).

A absorção do Se também foi avaliada em rabanetes, azevém, milho e alface, sob condições de solo argiloso, com o FMAs *Funneliformis mosseae*, e os resultados obtidos variaram de acordo com a espécie hospedeira. A maior produção de biomassa foi observada no rabanete e a menor no azevém, que por sua vez não sofreram alterações de crescimento significativas com a inoculação do fungo (MUNIER-LAMY et al., 2007).

A presença de Se em conjunto com a simbiose micorrízica ocasiona diferentes respostas nutricionais na planta hospedeira, tornando inconclusivos os efeitos da micorrizas arbusculares na presença desse elemento. Maiores investigações fazem-se necessárias para estabelecer as possíveis aplicações das micorrizas em solos com teores extremos de Se, a exemplo de solos do cerrado que possuem baixo teor, 0,04 mg kg<sup>-1</sup>, e solos de algumas regiões da China com 2000 mg kg<sup>-1</sup>, visto que essa simbiose pode, então, ser a chave para enriquecer, ou amenizar estresse nutricional da espécie vegetal.

#### **2.4 Simbiose tripartite**

Plantas da família *Leguminosae* podem se associar simbioticamente com BFNNL e FMAs, simultaneamente, resultando em uma interação denominada simbiose tripartite. Geralmente, essa interação é tida como mutualista, uma vez que as leguminosas são altamente micorrizadas, implicando em maior disponibilidade de P para a tripla interação, além disso, são capazes de formar nódulos, o que agrega maior aporte de N para esse sistema, indiretamente a

planta hospedeira quando bem nutrida fornece para esses microrganismos maior conteúdo de fotoassimilados (BONFANTE; ANCA, 2010; CARVALHO; MOREIRA, 2010; RODAK et al., 2017).

Vários efeitos positivos foram descritos em relação à simbiose tripartite com destaque para a sua funcionalidade nutricional em solos tropicais. Notadas as características de baixa disponibilidade de P, principalmente nos Latossolos, que abrangem maior parte de solos cultivados com soja no Brasil, e a elevada demanda energética do processo de FBN, as micorrizas favorecem a disponibilidade deste macronutriente no sistema tripartite (CARVALHO; MOREIRA, 2010). Segundo Vadez et al. (1997), os nódulos são considerados um forte dreno de P, devido ao teor desse elemento nessa estrutura, que em comparação com os demais órgãos da leguminosa, ser cerca de três vezes maior.

Outro aspecto importante dessa tripla simbiose é o prolongamento da extensão radicular que os FMAs proporcionam às leguminosas, que por sua vez adquirem nutrientes com maior eficiência, devido à micorrização, e consequentemente, devido aos ganhos nutricionais. A planta tem maior capacidade de desenvolvimento radicular, ampliando, então, a área para formação de nódulos pelas BFNNL (BRESSAN; VASCONCELLOS, 2002; ISOPI et al., 1995; SIQUEIRA et al., 1994).

A autorregulação, processo pertinente à simbiose de BFNNL e das micorrizas, é entendida pela formação não infinita de nódulos ou colonização micorrízica desses organismos, ou seja, quando a planta é suprida de N ou P ou quando há disponibilidade e quantidade suficientes no solo, interrompe-se a exudação de flavonoides e demais compostos que permitem a formação contínua dessa simbiose (RAMOS; MARTINS, 2010).

Até meados dos anos 80, acreditava-se que a formação de nódulos poderia inibir a micorrização através da autorregulação ou vice-versa, resultando em antagonismo (BETHEMFALVAY; YODER, 1981). Em 2005 um estudo

com um mutante de soja, que não fazia a autorregulação com rizóbio e FMAs, mostrou que havia uma dinâmica benéfica entre os processos regulatórios do estabelecimento de ambas simbioses (MEIXNER et al., 2005). A partir de então, vários outros estudos mostraram que o estabelecimento da tripartite com efeitos sinérgicos era concretizado quando as colonizações eram feitas simultaneamente ou ainda, que a presença da BFN era suficiente para promover o processo de micorrização, como por exemplo Antunes et al. (2006) observaram que isoflavonoides emitidos pelas raízes de soja, em função da micorrização, propiciavam a nodulação por *Bradyrhizobium japonicum*, assim como Mortimer et al. (2008) mostraram que para plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e Abdalla et al. (2014) para o feijão fava (*Vicia faba L.*), que o estabelecimento das micorrizas arbusculares, também, favorece a nodulação, devido aos benefícios nutricionais promovidos pelo FMAs.

Em face às variadas respostas nutricionais e fisiológicas ocasionadas em decorrência da simbiose tripartite e a possível aplicabilidade da mesma em agroecossistemas produtivos, a investigação elementar nos três simbioses torna-se de elevado cunho tecnológico, uma vez que a quantificação dos minerais que compõem cada microrganismo, após o estabelecimento da tripartite, pode elucidar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos nesta relação.

## **2.5 Luz Síncrotron**

A luz, ou radiação, síncrotron é um tipo de radiação eletromagnética de alto fluxo e alto brilho que se estende por uma faixa ampla do espectro eletromagnético desde a luz infravermelha, passando pela radiação ultravioleta e chegando aos raios-X. Ela é produzida quando partículas carregadas, aceleradas a velocidades próximas à velocidade da luz, têm sua trajetória desviada de direção por campos magnéticos. Sua utilização é de extrema importância, pois, é

capaz de penetrar a matéria e revelar características de sua estrutura molecular e atômica (TASCH; DAMIANI, 2000).

Essa radiação é exponencialmente mais intensa que a radiação produzida por fontes convencionais de raios-X e cobre uma ampla faixa espectral, o que não se consegue em demais aparelhos ou lasers disponíveis. Características como brilho de alta intensidade, pequenas dimensões espaciais, e amplitude espectral fazem necessárias e desejáveis a utilização da luz síncrotron em pesquisas científicas envolvendo materiais de escala nano e micrométrica (LNLS, 2017; SCHUBERT et al., 2017).

No acelerador do tipo síncrotron, um feixe de partículas carregadas é acelerado em um intensificador e então é guiado para um grande anel, movimentando-se em órbitas circulares através de um conjunto de eletroímãs, que geram um campo magnético. A luz síncrotron é obtida quando os elétrons perdem energia ao passarem pelos campos magnéticos de eletroímãs e a partir de então é direcionada para as linhas de luz, onde será canalizada e filtrada de acordo com a necessidade experimental (FIGURA 1) (LNLS, 2017).

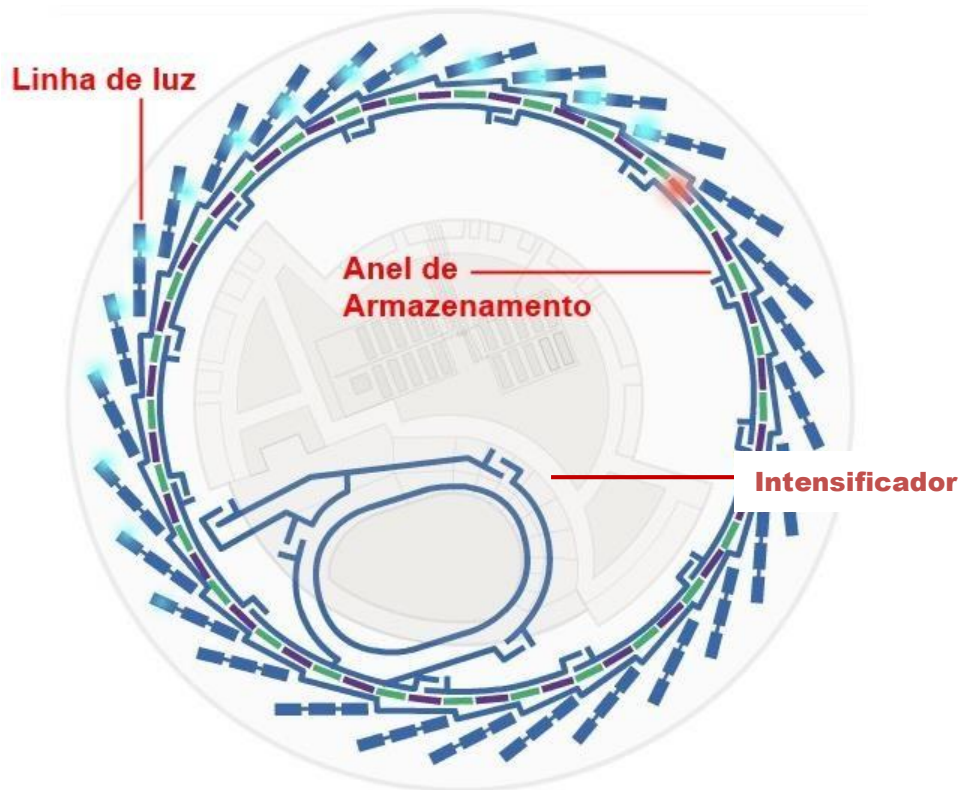
### **2.5.1 Linha de luz fluorescência de raio-X**

O objetivo dessa linha de luz é determinar e mapear elementos traço em amostras com aplicações nos campos de química analítica, biomedicina, geoquímica ambiental e ciência dos materiais. A faixa de energia utilizada no LNLS para essa linha de luz é de 5 a 20 keV e sua fonte energética é um ímã de 1,67T.

A fluorescência de raios-X (FRX) para medição de concentrações elementares de amostras biológicas vem sendo empregada durante anos. A FRX do LNLS usa uma fonte de raios-X de alta energia para irradiar um alvo para produzir um vazio nas camadas internas dos átomos que compõem o material. Devido às leis da física esse vazio será preenchido pelo elétron da camada

subsequente, que é quando raios-X característicos daquela amostra são emitidos e detectados, sendo utilizados para análise qualitativa e quantitativa da concentração elementar.

Figura 1- Modelo do acelerador de partículas sincrotron. Adaptado “Diamond”, 2017



A espectrometria de fluorescência de raios-X do LNLS é uma técnica multielementar, algumas vezes não destrutiva, capaz de identificar elementos de número atômico maior ou igual a 11 (Mg ao U). As amostras terão seus elétrons excitados devido a irradiação pelos feixes de raios-X com alto brilho, denominado de luz síncrotron, e assim emitindo fótons (fluorescência) que são expressados como picos posteriormente detectados e quantificados dos

elementos químicos. Tais picos possuem um comprimento de onda e uma energia específica que são característicos de cada elemento presente na amostra. Conseqüentemente, a análise quantitativa de cada elemento pode ser descoberta através da intensidade da fluorescência, que por sua vez é mensurada pela quantidade de picos com o comprimento de onda específico de cada elemento (JONES et al., 1988; LNLS, 2017).

As aplicações da linha de luz de FRX incluem o mapeamento elementar da amostra, a especiação de elementos-traço com resolução de 20 microns, informação 3D de elementos em amostras volumétricas e análise de massas muito pequenas depositadas em substratos planos.

## **2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura com Energia dispersiva de raio-X**

A microscopia eletrônica de varredura com espectrometria de energia dispersiva de raio-X (MEV-EDX) é uma técnica analítica que possibilita a realização de análise rápida e multielementar de diversos materiais. Geralmente essa análise é realizada por um equipamento acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), o qual possibilita a avaliação química qualitativa e semiquantitativa de amostras.

O funcionamento da análise MEV-EDX ocorre através da irradiação por um fino feixe de elétrons na amostra e como resultado da sua interação com a região analisada, várias radiações são emitidas, dentre elas: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-x característicos, fótons, etc. Ao passo que a amostra é varrida pelos elétrons irradiados, as radiações geradas vão sofrendo modificações de acordo com as variações de superfície. Os elétrons secundários e retroespalhados fornecem imagem de topografia e da característica de composição do material, os raios-X característicos gerados propiciam informações qualitativas e quantitativas da composição elementar da amostra analisada (SOARES; SARON, 2010).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os simbioses BFN e FMAs possuem um papel indispensável para a manutenção do ecossistema solo gerando benefícios, não só para o seu hospedeiro, mas também para a sociedade, visto que o emprego deles pode reduzir a aplicação de fertilizantes, tais como N e P.

A elucidação da presença de Se em estruturas fúngicas faz-se necessária e permite-se viável através da utilização da luz síncrotron, visto que a mesma possibilita a análise *in natura* da amostra.

Investigar os simbioses do solo, desde a sua composição, até à sua caracterização da formação física permite o melhor entendimento das potencialidades desses indivíduos no ambiente. Ainda que várias de suas funções já estejam bem elucidadas, tais estudos contribuirão com o avanço do uso da biotecnologia na agricultura e na recuperação de ambientes contaminados, como visto para o Se que ocorre nos solos em concentrações extremas (0,4 a 2000 mg kg<sup>-1</sup>).



## REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H. et al. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 1, p. 49–58, jan. 2014.
- AMIR, H. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. **Mycorrhiza**, New York, v. 23, n. 7, p. 585–595, out. 2013.
- ANTUNES, P. M.; RAJCAN, I.; GOSS, M. J. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 38, n. 3, p. 533–543, mar. 2006.
- ANZANELLO, R.; de SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, Campinas, v. 70, p. 409–415, 2011.
- BAIRD, L. M.; CARUSO, K. J. Development of root nodules in *Phaseolus vulgaris* inoculated with *Rhizobium* and Mycorrhizal Fungi. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 155, n. 6, p. 633–639, nov. 1994.
- BAMBERG, S. M. et al. Selenium and mycorrhiza on grass yield and selenium content. In: BANUELOS, S. G. et al. (Org.). **Global advances in selenium research from theory to application**. London: CRC Press Taylor & Francis, 2015. p. 1–207.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, M. A. C. H. III - Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. (Org.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 74-85.
- BETHEMFALVAY, G. J.; YODER, J. F. The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 52, n. 1, p. 141–145, maio 1981.
- BONFANTE, P.; ANCA, I.-A. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, n. 1, p. 363–383, out. 2009.

BONFANTE, P.; ANCA, I.-A. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. **Plant Hormones**, v. 1, n. 1, p. 363–383, 2010.

BRESSAN, W. et al. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 315–323, fev. 2001.

BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C. A. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 509–517, 2002.

BROUGHTON, W. J. et al. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 10, p. 3654–3663, 2006.

BURÉN, S.; RUBIO, L. M. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 365, n. 2, 1 jan. 2018.

CARVALHO, T. S. de; MOREIRA, F. M. de S. Simbioses tripartites: leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Org.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Ed UFLA, 2010. p. 383–413.

CARVALHO, R. DE S. As bactérias dos nódulos das raízes das leguminosas. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 3, n. 0, p. 9–26, 1946.

CASTILLO, C. G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity: prospecting in Southern-Central zone of Chile. A review. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 16, n. 2, p. 400–422, maio 2016.

COSTA, M. R. **Caracterização molecular de isolados bacterianos de nódulos e rizosfera de soja em diferentes manejos de cultivo**. 2011. 72 p. Dissertação (Genética e melhoramento de plantas) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2011.

DURÁN, P. et al. Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A preliminary study as a potential Se biofortification strategy. **Journal of Cereal Science**, London, v. 57, n. 3, p. 275–280, maio 2013.

DURÁN, P. et al. Endophytic selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus for Selenium biofortification and *Gaeumannomyces graminis* biocontrol. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 18, n. 4, p. 1021-1035, 2018.

EMBRAPA. Fixação Biológica de Nitrogênio. Disponível em:  
<<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>>.

FORDYCE, F. M. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: SELINUS, O. (Org.). **Essentials of medical geology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 375-413.

FREIBERG, C. et al. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, London, v. 387, p. 394-401, 1997.

GOICOECHEA, N. et al. Selenium fertilization and mycorrhizal technology may interfere in enhancing bioactive compounds in edible tissues of lettuces. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 195, p. 163–172, nov. 2015.

GUETHER, M. et al. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. **New Phytologist**, Hoboken, v. 182, n. 1, p. 200–212, abr. 2009.

HART, M. M.; FORSYTHE, J. A. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 148, p. 206–214, dez. 2012.

ISOPI, R. et al. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. **Symbiosis**, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 43–55, 1995.

JONES, K. W. et al. X-ray fluorescence with synchrotron radiation. **Ultramicroscopy**, Amsterdam, v. 24, n. 2-3, p. 313–328, jan. 1988.

KIRIACHEK, S. G. et al. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1–16, fev. 2009.

LARSEN, E. H. et al. Uptake and speciation of selenium in garlic cultivated in soil amended with symbiotic fungi (mycorrhiza) and selenate. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 385, n. 6, p. 1098–1108, 13 jun. 2006.

LNLS. Laboratório Nacional de Luz Sincrotron. Disponível em: <<http://www.lnls.cnpm.br/o-lnls/o-que-e-uma-linha-de-luz/>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 159, n. 1, p. 89–102, 1994.

MAYER, S. M. et al. New insights into structure-function relationships in nitrogenase: A 1.6 Å resolution X-ray crystallographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe-protein. **Journal of molecular biology**, London, v. 292, n. 4, p. 871–891, 1999.

MEIXNER, C. et al. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. **Planta**, New York, v. 222, n. 4, p. 709–715, 15 nov. 2005.

MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas: II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 59–67, mar. 1999.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. D. S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 267–279, 2003.

MIRANDA, J. C. C. de; MIRANDA, L. N. de. Micorriza Arbuscular. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Orgs.). **Bilogia dos solos dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1997. p. 67–111.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006. cap.10, p. 543, 661.

MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.

MORTIMER, P. E.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, M. A.; VALENTINE, A. J. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 40, n. 5, p. 1019–1027, maio 2008.

MUNIER-LAMY, C. et al. Selenium bioavailability and uptake as affected by

four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass. **Journal of environmental radioactivity**, Kidlington, v. 97, n. 2-3, p. 148–58, jan. 2007.

NOGUEIRA, M. A.; SOARES, C. R. F. S. Micorrizas arbusculares e elementos-traço. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Org.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 475–501.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 1, p. 180–201, 2000.

POUYÚ-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 103–114, jan. 2000.

RAMOS, A.C.; MARTINS, M. A. Fisiologia de micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Orgs.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 133–152.

RODAK, B. W. B. W. et al. X-ray microanalytical studies of mineral elements in the tripartite symbiosis between lima bean, N<sub>2</sub>-fixing bacteria and mycorrhizal fungi. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 132, p. 14–20, jan. 2017.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. D. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; SOUZA, R. J. C. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro **Revista Brasileira de Geografia Física**, Recife, v. 06, p. 1275–1291, 2011.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. A. Formação do Nódulo em Leguminosas. **EMBRAPA Documentos**, Seropédica, n. 251, p. 1-36, jun. 2008.

SCHEUBLIN, T. R.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species. **New Phytologist**, Hoboken, v. 172, n. 4, p. 732–738, 2006.

SCHUBERT, G. R. C. et al. IMX Beamline: X-ray Imaging. **Laboratório nacional de luz síncrotron –CNPEM**, Campinas, p. 1-27, fev. 2017.

SENAR, B. DO. SENAR. Disponível em:  
<<http://www.senar.org.br/biotecnologianosenar/category/soja/>>.

SILVA, S. DA; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1749–1757, dez. 2006.

SIQUEIRA, J. O. et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 1994.

SIQUEIRA, J. O. et al. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. **Mycorrhiza**, New York, v. 7, n. 6, p. 293–300, 26 maio 1998.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. Micorrizas. In: \_\_\_\_ **Biotecnologia do solo perspectivas e fundamentos**. 1. ed. Brasília: MEC; ABEAS; ESAL; FAEPE, 1988. p. 125–166.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos micorrízicos: origem e características dos fungos Glomaleanos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 25, p. 12-21, 2002.

SIQUEIRA, J.; SAGGIN-JÚNIOR, O. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. **Mycorrhiza**, New York, v. 11, n. 5, p. 245–255, 1 out. 2001.

SOARES, A. M. D. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas : sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, p. 9–19, 2007.

SOARES, C. M. B.; SARON, E. S. Microanálise elementar de materiais : aplicações do sistema mev-edx. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 1–4, 2010.

SOARES, C. R. F. S.; CARNEIRO, M. A. C. Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Orgs.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 441–474.

STAEDLER, Y. M.; MASSON, D.; SCHÖNENBERGER, J. Plant Tissues in 3D via X-Ray Tomography: Simple Contrasting Methods Allow High Resolution Imaging. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e75295, 27 set. 2013.

SZCZEPANOWSKA, H. M.; JHA, D.; MATHIA, T. G. Morphology and characterization of Dematiaceous fungi on a cellulose paper substrate using electron microscopy and confocal laser scanning. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 30, p. 651–657, 2015.

TASCH, P.; DAMIANI, F. Técnicas de Análise e Caracterização de materiais XRF X-Rays Fluorescence Spectroscopy. CAMPINAS. Disponível em: <<http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/XRF.pdf>>.

TOGNON, G. B. et al. Mycorrhizal inoculation and/or selenium application affect post-harvest performance of snapdragon flowers. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 78, n. 3, p. 389–400, 3 abr. 2016.

VADEZ, V. et al. Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N<sub>2</sub> fixation to limiting P nutrition in common bean. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 99, n. 2, p. 227–232, fev. 1997.

VRUBEL, H. **Desenvolvimento da química fundamental do molibdênio na modelagem biomimética funcional de molibdoenzimas**. 2007. 115 p. Dissertação (Química inorgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

WANEK, P. L.; VANCE, G. F.; STAHL, P. D. Selenium uptake by plants: Effects of soil steaming, root addition, and selenium augmentation. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 30, n. 1-2, p. 265–278, 11 jan. 1999.

WANG, Y. et al. Advances in the genetic modification of Rhodospirillum rubrum sphaeroides to improve hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 60, p. 1312–1318, jul. 2016.

YU, Y. et al. Accumulation and Speciation of Selenium in Plants as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus mosseae. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 143, n. 3, p. 1789–1798, 27 dez. 2011.

YULING, Y.; YUANYING, L. Distribution of selenium in selenite-enriched soybean. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 318–321, 2014.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS****4. ARTIGO 1 - X-RAY MICROANALYTICAL STUDIES OF MINERAL ELEMENTS IN THE TRIPARTITE SYMBIOSIS BETWEEN LIMA BEAN, N<sub>2</sub>-FIXING BACTERIA AND MYCORRHIZAL FUNGI**

Bruna Wurr Rodak, Douglas Siqueira Freitas, Soraya Marx Bamberg, Marco Aurélio Carbone Carneiro and Luiz Roberto Guimarães Guilherme

\*Article published in Journal of Microbiological Methods

doi: [10.1016/j.mimet.2016.11.006](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.006)

**Abstract**

The symbiosis between legumes, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, and N<sub>2</sub>-fixing bacteria (NFB) provides mutual nutritional gains. However, assessing the nutritional status of the microorganisms is a difficult task. A methodology that could assess this status, *in situ*, could assist managing these organisms in agriculture. This study used X-ray microanalyses to quantify and locate mineral elements in structures formed in a tripartite symbiosis. Lima bean (*Phaseolus lunatus* L. Walp) was cultivated in pots under greenhouse conditions, to which we have added AM fungal isolates (*Glomus macrocarpum* and *Acaulospora colombiana*) and NFB (*Bradyrhizobium japonicum*) inocula. Uninoculated control plants were also included. Symbionts were evaluated at the onset of flowering. Quantification of the mineral elements in the symbiotic components was performed using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and a scanning electron microscopy (SEM) was used to identify structures. EDX analysis detected 13 elements with the most abundant being N, Ca, and Se, occurring in all tissues, Fe in roots, Ni and Al in epidermis and P and Mo in nodules. Elemental quantification in fungal structures was not possible. The distribution of elements was related to their symbiotic function. X-ray microanalysis can be efficiently applied for nutritional diagnosis in tripartite symbiosis.



**Keywords:** *Phaseolus lunatus*, EDX mapping, SEM micrographs, quantification, distribution, nutritional status.

## 1. Introduction

The interaction between legumes, arbuscular mycorrhizal (AM), fungi and N<sub>2</sub>-fixing bacteria (NFB) results in a tripartite symbiosis, providing mutual nutritional gains for these organisms (Bonfante and Anca, 2009). Quantification of nutrients in plants is widely studied and various methods are established. However, in studies with microorganisms, mainly due to low availability of material for analysis, elemental quantitation is problematic.

The use of techniques that allow a better understanding of the nutritional behavior of microorganisms would assist with the application of these microorganisms in agricultural systems, thus improving soil fertility management, particularly in family farms.

A viable technique for *in situ* microanalytical studies of mineral elements that has the advantage of requiring small amount of material is scanning electron microscopy (SEM). This technique allows the identification of morphoanatomic structures and, its association with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), enables the quantification and distribution of elements in organisms (Chen et al., 2016, 2015; Kroukamp et al., 2016).

In this way, the aim of this study was to investigate, using SEM and EDX, the distribution of mineral elements formed during the tripartite symbiosis of lima bean, AM fungi and NFB.

## 2. Material and methods

The experiment was conducted under greenhouse condition in Lavras, Brazil, for 12 weeks. The treatments consisted of a dual inoculation of lima bean plants with AM fungi and NFB. An uninoculated control was included for

comparison. Treatments were allocated in a completely randomized design with four replications.

The soil used was a *Latosolo Vermelho Distrófico típico* (Embrapa Solos, 2013), corresponding to Oxisol (Soil Survey Staff, 1999) (Table 1). Before sowing, the soil was sterilized at 120 °C for 2 h on two consecutive days. After this procedure, the soil was transferred to 4-kg pots, limed, and fertilized according to Embrapa Cerrado (2004).

**Table 1**

Chemical characterization and particle size of a B-horizon of a *Latosolo Vermelho Distrófico típico* (Oxisol).

Elements	Units	Extractors	Concentration
<i>Chemical properties</i>			
SOM*	g kg <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 4N e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N	13.4
pH	-	Water	5.5
Al	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl 1 mol L <sup>-1</sup>	0.0
H + Al	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	SMP	2.9
P	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	0.6
K	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	22.0
Ca	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl 1 mol L <sup>-1</sup>	1.5
Mg	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl 1 mol L <sup>-1</sup>	0.1
S	mg kg <sup>-1</sup>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> in CH <sub>3</sub> COOH	21.2
Zn	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	1.9
Fe	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	28.6
Mn	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	7.8
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	1.8
B	mg kg <sup>-1</sup>	Hot water	0.3
<i>Particle size</i>			
Clay	g kg <sup>-1</sup>	Pipette	690
Silt	g kg <sup>-1</sup>	Pipette	140
Sand	g kg <sup>-1</sup>	Pipette	170

\*SOM - organic soil matter.

Inoculation was performed in each pot during sowing and consisted first of 50 cm<sup>3</sup> of AM fungi soil-inoculum, containing 60 spores of *Glomus macrocarpum* Tul. & Tul. and 40 spores of *Acaulospora colombiana* Spain & Schenck. Next, seeds were added to each pot together with a 1-mL suspension of

*Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan (strain INPA 54B), containing 10<sup>9</sup> colony forming units.

Symbionts were evaluated in the phenological stage R6 (first flower to open on 50% of plants) (Fernandez, 1986). At this stage, number and dry weight of nodules, percentage AM colonization (Giovannetti and Mosse, 1980; Koske and Gemma, 1989), and spore density (Gerdemann and Nicolson, 1963) were assessed.

Quantification of mineral elements in the symbionts was performed using a multi-channel detector for EDX on SEM (BRUKER - QUANTAX XFLASH 5010), at a voltage of 15 kV. Root samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% formaldehyde in a 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After that, samples were transferred to glycerol for 30 min. The root/nodule intersect was transversely cut in liquid nitrogen (freeze fracture). Removed sections were immersed in osmium tetroxide solution (1%) with a 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h. Samples were dehydrated in acetone gradient (25, 50, 75, 90, and 100%) for 10 min in each solution, followed by further two changes in 100% acetone. Next, samples were dried to the critical point (BALTEC - CPD 030), placed on stubs and subjected to carbon coated (BALZER - CED 020). Readings were taken with 5 min acquisition time and directed to K-series. The beam was centered in a square on the symbiosis region at a magnification of 200x and in each one of the isolated organisms at 500x. Counts were periodically equilibrated with standard spectrum. Four replicate analyses were performed for each tissue. The measured elements included macro- (N, P, K, Ca, Mg and, S) and micronutrients (Zn, Cu, Cl, Mo, Ni, Fe, B and, Mn) required by plants, as well as selected relevant toxic (Al) and beneficial (Se, Si and, Co) elements.

Identification of fungal, bacterial, and plant structures was performed using a scanning electron microscope (ZEISS - LEO EVO 40 PVX). Samples

for EDX analysis were gold coated (BALZERS - 004 SCD). The beam was centered on the symbiosis region at a magnification of 200x and, in specific zones of 1,500x. Employed voltage was 25 kV.

### 3. Results

Occurrence of nodulation and mycorrhizal colonization was only observed in the inoculated treatment. An average of 24 nodules per plant with a dry weight of 0.46 g per plant, associated with an average of 64% mycorrhizal colonization and spore density of 238 AM fungi spores per 1 dm<sup>3</sup> soil was recorded.

Through ultrastructural analysis it was possible to observe the contact zone between nodule and root, as well as AM fungal hyphae (Fig. 1a and 1c). Furthermore, fungal hyphae were observed along the entire root and next to the nodules formation spots. The presence of these structures confirmed the tripartite association.

Intercellular fungal hyphae were observed in the region of the root cortex (Fig. 1a and 1d). These hyphae were morphologically categorized as *Arum*-type, with aid of light microscope (images not shown).

Morphoanatomical results revealed that nodules were of determinate growth (Fig. 1a). Cortical cells and meristems were observed in the peripheral nodule regions (Fig. 1a and 1b), while bacterial infected cells were observed internally in the nodule (Fig. 1a and 1e). Electron dense compounds were observed in inter- and intracellular regions and were identified as lipids and polysaccharides (Fig. 1a and 1e).

Total quantification of mineral elements in symbionts demonstrated that macronutrients accounted for 76% of the weight. Concentration reduction was observed in the following order N > Ca > P > K (Table 2). Micronutrients

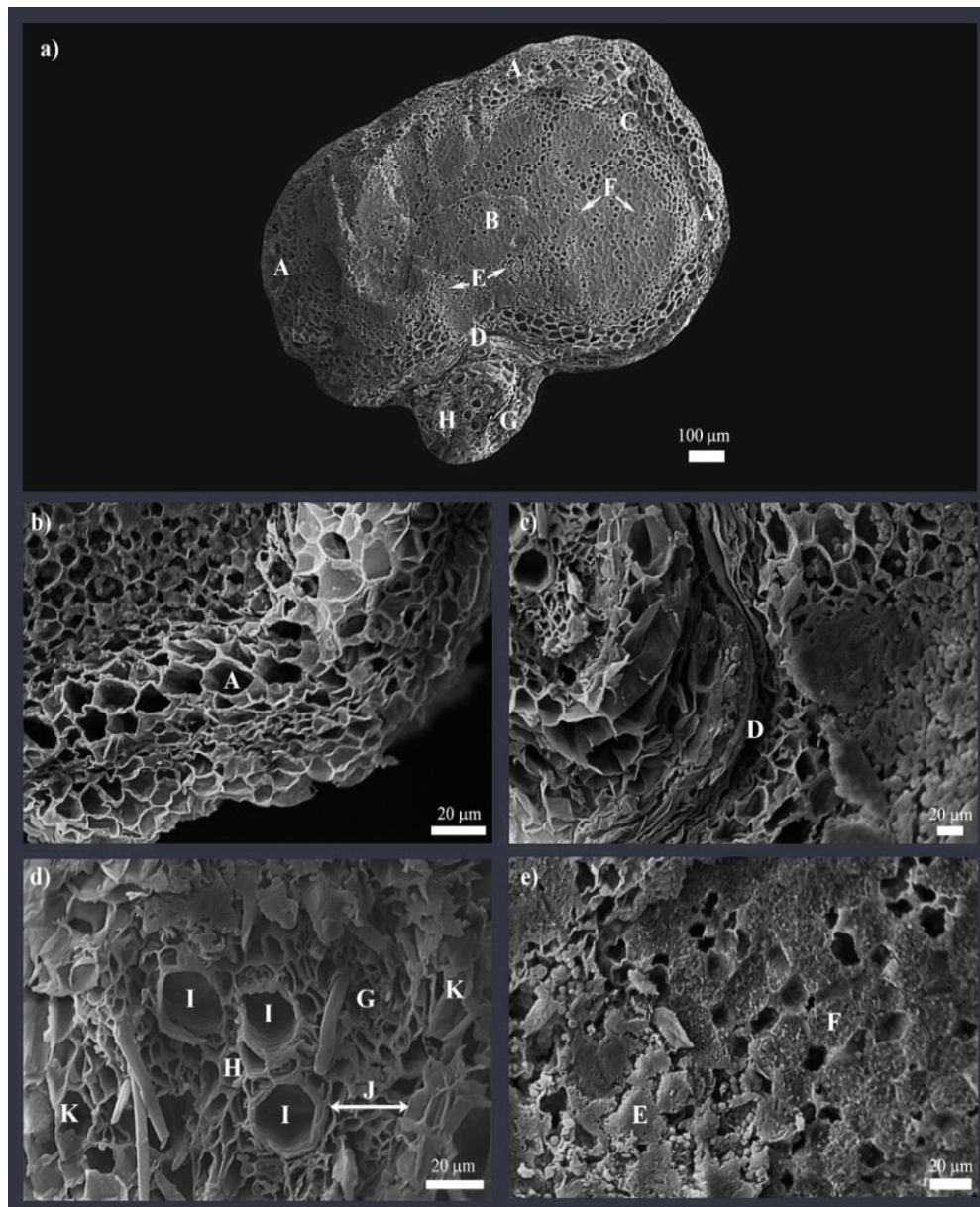


Fig. 1. Scanning electron microscopy micrographs showing cross section of nodule-root-hyphae intersect formed in tripartite symbiosis. a) Background was removed to facilitate visualization; b) peripheral nodule regions e) detail specific regions. A - cortical tissue cells; B - region of infection; C - meristems; D - contact region nodule-root; E - biopolymers; F - infected cells; G -hyphae; H - root tissues; I - vascular root tissue; J - root cortex; K - root epidermis.

corresponded to 11% of weight in the following order Fe > Zn > Mo > Cu. Beneficial elements represented 11% of the weight, decreasing in the following sequence Se > Si > Co. Approximately 2% of the weight corresponded to Al. Other elements were below quantification limits.

**Table 2**

Application of energy dispersive X-ray spectroscopy in a 200x magnification, showing concentration of mineral elements in a cross section of nodule-root-hyphae intersect (nutrient exchange zone) formed in tripartite symbiosis.

Element	Real weight	Normalized weight %	Error
<i>Macronutrients</i>			
N	4.224	60.96	0.978
Ca	0.864	12.47	0.058
P	0.198	2.86	0.037
K	0.012	0.17	0.002
<i>Micronutrients</i>			
Fe	0.352	5.08	0.046
Zn	0.130	1.88	0.041
Mo	0.127	1.84	0.035
Cu	0.125	1.80	0.04
<i>Benefic elements</i>			
Se	0.588	8.48	0.093
Si	0.150	2.17	0.035
Co	0.016	0.23	0.004
<i>Other elements</i>			
Al	0.137	1.98	0.036
Others	-	0.08	-

Regarding the distribution of elements, it was noteworthy that the Fe, Si, and Al had accumulated along the root-nodule contact region, at concentrated points (Fig. 2).

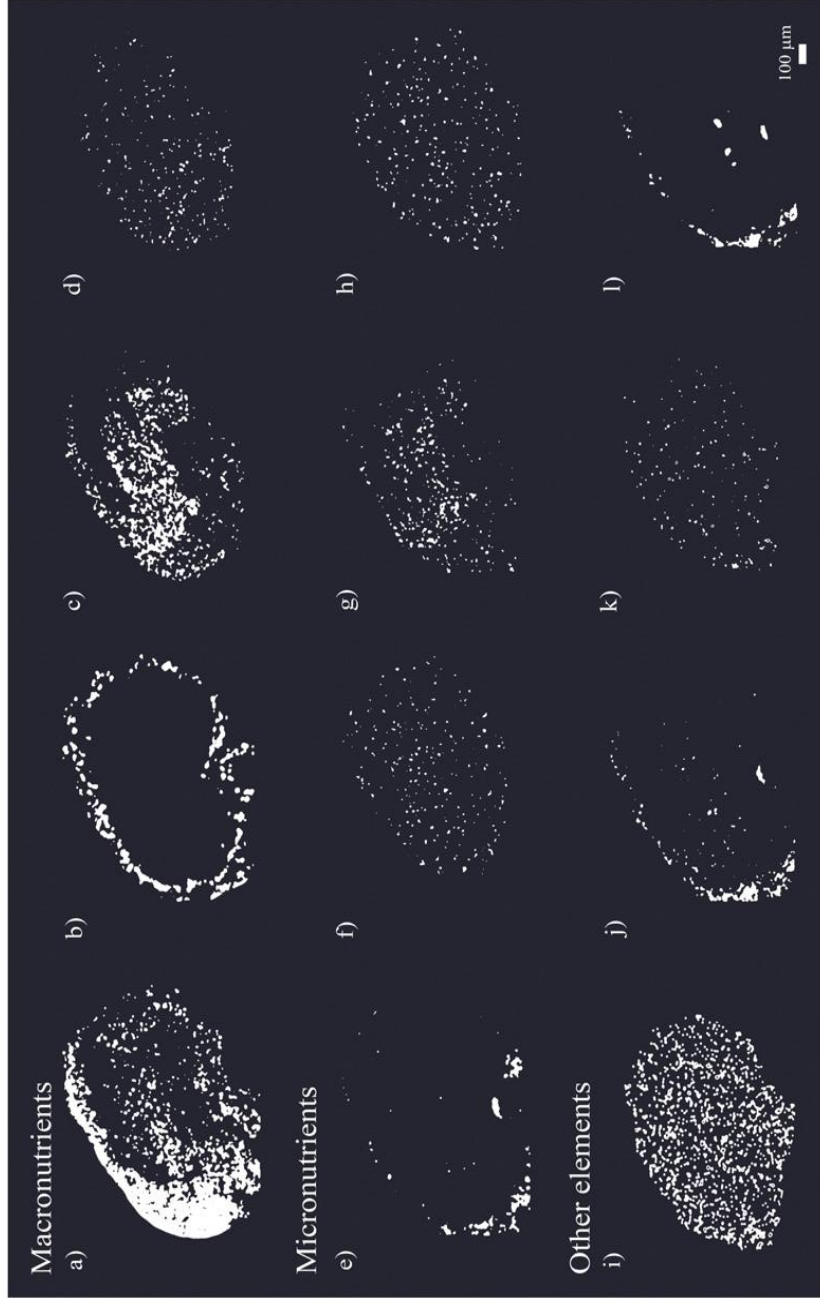


Fig. 2. Energy dispersive X-ray spectroscopy micrographs showing cross section of nodule-root-hyphae intersect formed in tripartite symbiosis showing the elements a) N; b) Ca; c) P; d) K; e) Fe; f) Zn; g) Mo; h) Cu; i) Se; j) Si; k) Co and l) Al.

Specific nodule quantification, infection and cortical regions, demonstrated the following composition order  $N > Ca > Se > P > Mo > Cu > Si > Zn$ , with other elements being below the limit of quantification (Table 3). Nodule quantification revealed that the macronutrients corresponded to 79% of the weight, in which P concentration was higher than the amounts quantified in the symbionts. Micronutrients represented 11% of the weight and 9% of the weight corresponded to beneficial elements. The higher concentrations of Mo, a micronutrient, as well as the beneficial element Se, was noteworthy.

**Table 3**

Application of energy dispersive X-ray spectroscopy in a 500x magnification, showing concentration of mineral elements in a cross section of nodule infection region and cortical tissue formed in tripartite symbiosis.

<b>Element</b>	<b>Real weight</b>	<b>Normalized weight %</b>	<b>Error</b>
<i>Macronutrients</i>			
N	3.488	61.04	0.624
Ca	0.639	11.18	0.046
P	0.367	6.42	0.041
<i>Micronutrients</i>			
Mo	0.367	6.42	0.040
Cu	0.187	3.28	0.036
Zn	0.094	1.65	0.033
<i>Benefic elements</i>			
Se	0.369	6.45	0.054
Si	0.126	2.20	0.032
Others	-	1.36	-

Distribution of elements N and Se occurred in all nodule tissues (Fig. 3a and 3c). Ca occurred in the cortical tissue cells (peripheral region) (Fig. 3b), while the elements P, Mo, Cu, Si, and Zn occurred in lower concentration, with a predominance in the region of infection (central region) (Fig. 3d to 3h).



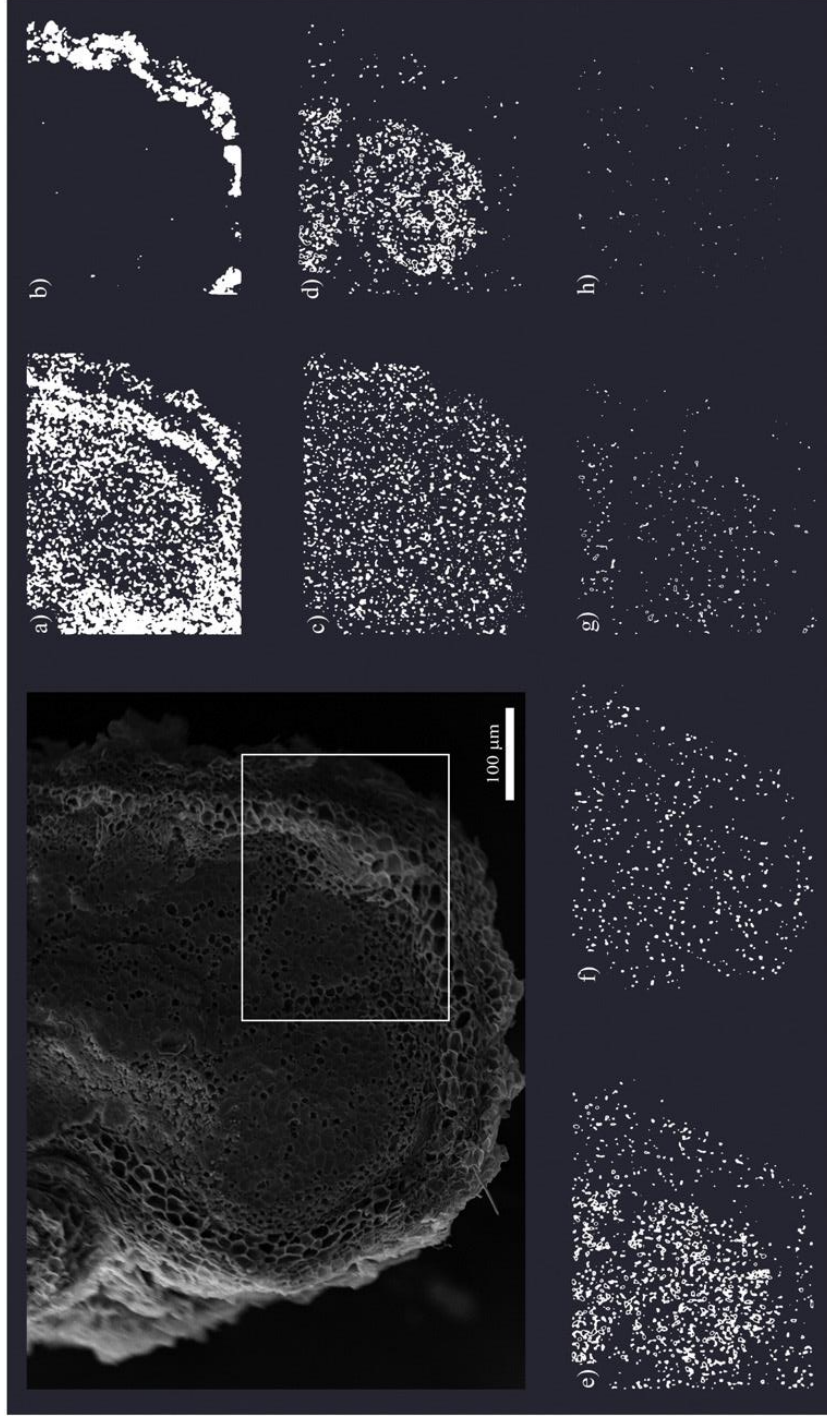


Fig. 3. Scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy images showing cross section of nodule formed in tripartite symbiosis showing the elements a) N; b) Ca; c) S; d) Mo; e) Cu; f) Si and h) Zn.

Elemental quantification in the root system revealed a decreasing mineral distribution in the following order N > Al > Fe > Ca > Se > Cu > Ni > Zn > Si > Co. In root cells, N and Ca were the only macronutrients that could be detected, representing 53% of the weight (Table 4). Micronutrients accounted for 19% of the weight and the occurrence of Ni is of note, as well as the high concentration of Fe. Percentage of beneficial elements amounted to 8% of the weight. The highest concentration of Al (19% of the weight) was recorded in the root, while other elements were not detected above quantification limits.

**Table 4**

Application of energy dispersive X-ray spectroscopy in a 500x magnification, showing concentration of mineral elements in a cross section of lima bean root formed in tripartite symbiosis.

Element	Real weight	Normalized weight %	Error
<i>Macronutrients</i>			
N	3.97	47.76	0.70
Ca	0.51	5.98	0.03
<i>Micronutrients</i>			
Fe	1.12	13.91	0.06
Cu	0.21	2.53	0.04
Ni	0.13	1.57	0.02
Zn	0.11	1.41	0.03
<i>Benefic elements</i>			
Se	0.48	5.93	0.07
Si	0.11	1.32	0.03
Co	0.07	0.85	0.02
<i>Other elements</i>			
Al	1.53	18.61	0.10
Others	-	0.13	-

Distribution of N and Se in the roots cells occurred in all tissues (Fig. 4a and 4e). Copper, Zn and Co occurred predominantly near the vascular tissues (central region) (Fig. 4f, 4h and 4j). The beneficial element Si occurred preferentially in the epidermal cells (peripheral region) with a lower concentration in the cortical cells adjacent to the vascular tissue (Fig. 4i).

Regarding the elemental distribution verified in the symbionts, Ca, Ni, and Fe showed some peculiarities in the root system. Calcium occurred predominantly in the cortex cells, at points and in low concentrations in the epidermis (Fig. 4d). Iron and Ni presented the opposite behavior of Ca (Fig. 4c and 4g), while Al is mainly located in epidermal cells (Fig. 4b).

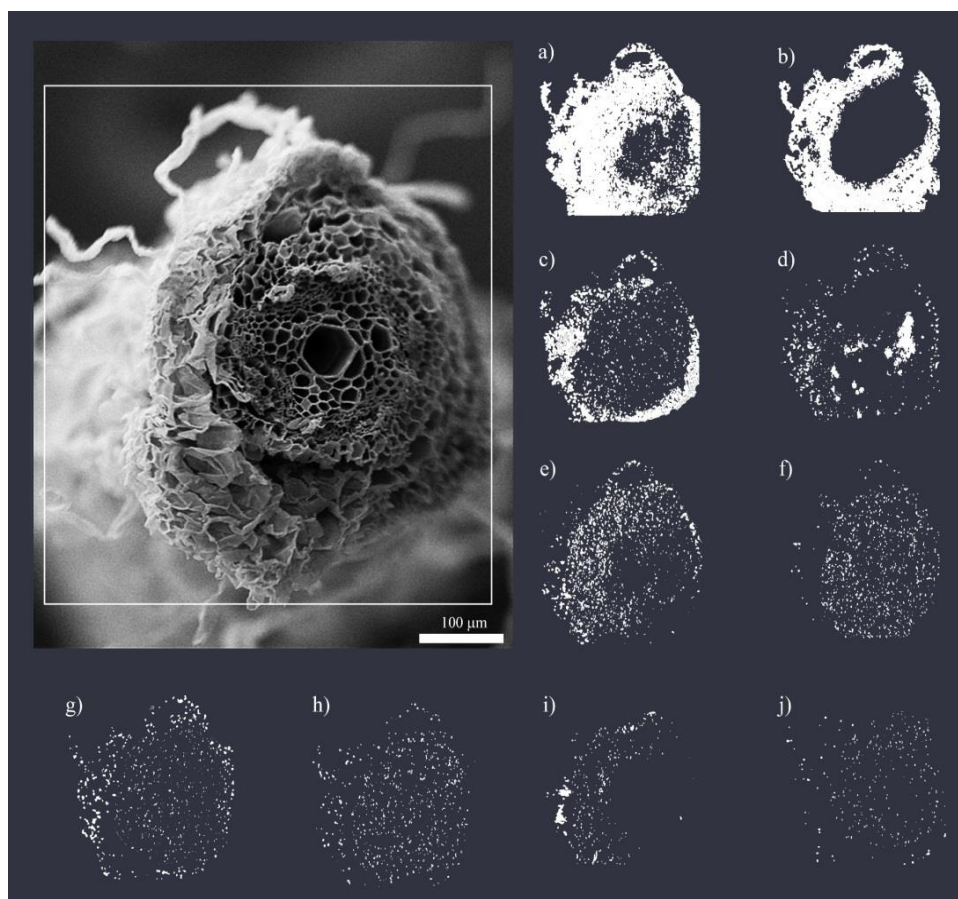


Fig. 4. Scanning electronmicroscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy micrographs showing cross section of roots of lima bean in tripartite symbiosis showing the elements a) N; b) Al; c) Fe; d) Ca; e) Se; f) Cu; g) Ni; h) Zn; i) Si and j) Co.

It was noteworthy that specific fungal quantification was not possible since we were not able to differentiate them from the other symbionts.

Morphoanatomic or ultrastructural differences were not found between repetitions.

#### **4. Discussion**

The methodology used in this study - the application of SEM and EDX- was efficient for quantification and localization of mineral elements in lima bean roots in symbiosis with *B. japonicum* and AM fungi. Its use has been reported for other plant species (Bueno Guerra et al., 2013; Durmuşkahya et al., 2016; Gallardo et al., 2016; Moore et al., 2014; Singh et al., 2014; Shi et al., 2016; Zhao et al., 2014) and bacteria (Adediran et al., 2016; Kanu et al., 2014; Laue and Fulda, 2013; Solís et al., 2011; Vardien et al., 2014; Xia et al., 2013). However, some adaptations such as increase acquisition time, changes in magnification and use of more sensitive detectors could be done in order to improve quantification limits for AM fungal structures (Bücking and Heysler, 2000; Fomina et al., 2007; Przybyłowicz et al., 2004; Seven and Polle, 2014; Weiersbye et al., 1999).

Organisms in tripartite symbioses have a high nutritional demand. According to Mortimer et al. (2008), in the symbiosis between nodulated legume roots and AM fungi, the symbionts can sink nutrients from each other. In this way, the mineral composition of each organism in symbiosis is changed as well as its distribution, which is related to the function performed.

Two elements, N and Ca, were the major ones occurring in the symbiotic components. According to O'Hara (2001) and González and Gonzalez-López (2013), these elements are described as macronutrients for both plants and nodules, and are essential components in the rhizobia-legume symbiosis. Nitrogen was observed in all tissues of the symbionts due to its broad functions, acting as a structural component of cell membranes and the wall, and participating in energy exchange reactions. Calcium occurred predominantly in

the cortical tissue of nodules and in the root epidermis, as well concentrated in points located in the root cortex. The distribution of this element was related to its function as a structural component of cell membranes and wall, an enzyme cofactor and as a mechanism to control osmosis and signaling.

Among other representative elements, Se was widely distributed in symbionts. Although not considered an essential element for plants (Terry et al., 2000), Se was evidenced as beneficial for some plants and bacteria that contain selenoenzymes and selenoproteins such as integralselenocysteine dehydrogenase and GSH peroxidase (GPX) (Broadley et al., 2006; Lobanov et al., 2007; Pilon-Smits et al., 2009). It is noteworthy that the presence of Se-methylselenocysteine and  $\gamma$ - glutamyl-Se-methylselenocysteine has been reported in lima bean (Birringer et al., 2002). In  $N_2$ -fixing bacteria, Se can replace one of the terminal Ni-cysteine ligands by selenocysteine resulting in an enzymatic subclass known by [NiFeSe]-hydrogenases. The enzyme is very effective in the  $H_2$  cycling process (Parkin et al., 2008). It is of note that, according to O'Hara (2001), Se should be considered a micronutrient for  $N_2$ -fixing bacteria.

In addition to the abovementioned occurrences, the high concentrations of P and Mo in nodules infection region are plausible. Phosphorus has an essential function in the energetic metabolism, which is very demanding in  $N_2$  fixation due to the high ATP required for nitrogenase reaction (Mortimer et al., 2013; Sulieman and Tran, 2015; Vardien et al., 2014). Furthermore, bacteroides can stock, in intra- and intercellular regions, phospholipids granules (Siebers et al., 2016). Molybdenum plays a major role in nodules, as a component of nitrogenase (Hu and Ribbe, 2013). This enzyme is responsible for breaking the triple bond of atmospheric  $N_2$  converting it to the  $NH_3$ .

In the nodule, the micronutrients Cu and Zn also occurred in the infection region. During symbiosis, Cu is an essential cofactor of superoxide dismutase enzymes (Cu or CuZn), which are responsible for cation

detoxification (Gonzalez and Gonzalez-Lopez, 2013). In addition, Cu is important to inhibit membrane lipid peroxidation, to preserve membrane integrity and to increase membrane permeability to ions (Bonilla and Bolaños, 2009). Copper plays an important role in Mo absorption (Hänsch and Mendel, 2009). Zinc is an essential element for symbiosis, acting in the genetic regulation, as described by Weisany et al. (2013) and, it is a micronutrient that can functionally replace Mg in leghemoglobin in *B. japonicum*.

The beneficial element Si occurred in both the nodule infection region and in the epidermis of the root. The function of Si in microorganisms and plants is uncertain, but is thought to play a structural and metabolic role in the DNA synthesis (Denance et al., 2014). Most studies involving the application of Si in plants are focused on its protective role by accumulation in epidermal cells, interfering in pathogen penetration (Fauteux et al., 2005).

In roots, Fe and Ni accumulated in the epidermis. The high Fe requirement in nodulated legumes is related to the composition of the leghemoglobin, required specifically during nodule formation (Weisany et al., 2013). Iron occurred in concentrated points at the root nodule transect. According to Brear et al. (2013) and Tejada-Jimenez et al. (2015), such behavior was also observed in other legume species, in which Fe is not translocated into the nodules. Although Ni could not be detected above the limit of quantification in the nodule, it should be stressed that this element is a cofactor of the urease and nitrogenase enzymes (Farrugia et al., 2013; Polacco et al., 2013).

In roots Cu, Zn, and Co occurred in low concentrations, predominantly in the vascular tissue indicating a possible redistribution. Probably, the redistribution behavior of these elements in plants can justify their low concentrations as well as their location.

The high Al concentration found in the epidermis was related to its occurrence in the soil (Hodson, 2002). Tropical soils are highly weathered, with

kaolinite and Fe and Al oxides as the major components of the clay fraction, which are frequently associated with high concentrations of Al potentially available to plants (Cristancho et al., 2014; Lopes and Guilherme, 2016). The occurrence of Al at concentrated points in epidermal cells and in the nodule root intersect could be a protective strategy against Al toxicity in the symbionts.

## **5. Conclusions**

This study used a methodology that allowed us to perform an advanced *in situ* quantification and localization of mineral elements in the lima, NFB-AM fungal tripartite symbiosis. Thirteen elements (N, Ca, P, K, Fe, Zn, Mo, Cu, Ni, Se, Si, Co, and Al) were detected. Among these elements, N, Ca, and Se occurred in all symbiotic tissues. The elements Fe, Ni, and Al were distributed predominantly in the epidermis, while in the nodule, P and Mo were detected in the region of infection. The localization of mineral elements was related to the role they play in the symbiosis. This methodology was useful for determining the elements required by the symbiosis, assisting in the management of these organisms in agricultural systems. Further studies, correlating the concentration of elements by other methods, e.g. synchrotron, as well as in other vegetable species and microorganisms, could refine further investigations.

## **Acknowledgements**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), and the Research Foundation of the State of Goiás (FAPEG - process 201310267001022).

## References

- Adediran, G.A., Ngwenya, B.T., Mosselmans, J.F.W., Heal, K.V., 2016. Bacteria-zinc co-localization implicates enhanced synthesis of cysteine-rich peptides in zinc detoxification when *Brassica juncea* is inoculated with *Rhizobium leguminosarum*. *New Phytol.* 209, 280–293. doi:10.1111/nph.13588
- Birringer, M., Pilawa, S., Flohe, L., 2002. Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* 19, 693–718. doi:10.1039/b205802m
- Bonilla, I., Bolaños, L., 2009. Mineral nutrition for legume-rhizobia symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co and Ni. A review. In: Lichtfouse, E. (Ed), *Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants. Sustainable Agriculture Reviews 1*. Springer, New York. pp. 253–274.
- Bonfante, P., Anca, I.A., 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 363–383. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073504
- Brear, E.M., Day, D.A., Smith, P.M.C., 2013. Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Front. Plant Sci.* 4, 1–15. doi:10.3389/fpls.2013.00359
- Broadley, M.R., White, P.J., Bryson, R.J., Meacham, M.C., Bowen, H.C., Johnson, S.E., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., Beward, N., Harriman, M., Tucker, M., 2006. Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65, 169–181. doi:10.1079/PNS2006490
- Bücking, H., Heyser, W., 2000. Subcellular compartmentation of elements in non-mycorrhizal and mycorrhizal roots of *Pinus sylvestris*: an X-ray microanalytical study. I. The distribution of phosphate. *New Phytol.* 145, 311–320. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00572.x
- Bueno Guerra, M.B., Schaefer, C.E.G.R., Carvalho, G.G.A., Souza, P.F., Júnior, D.S., Nunes, L.C., Krug, F.J., 2013. Evaluation of micro-energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plant materials. *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1096–1101. doi:10.1039/c3ja50084e
- Chen, Z., D’Alfonso, A.J., Weyland, M., Taplin, D.J., Allen, L.J., Findlay, S.D., 2015. Energy dispersive X-ray analysis on an absolute scale in



- scanning transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* 157, 21–26. doi:10.1016/j.ultramic.2015.05.010
- Chen, Z., Weyland, M., Sang, X., Xu, W., Dycus, J.H., LeBeau, J.M., D'Alfonso, A.J., Allen, L.J., Findlay, S.D., 2016. Quantitative atomic resolution elemental mapping via absolute-scale energy dispersive X-ray spectroscopy. *Ultramicroscopy* 168, 7–16. doi:10.1016/j.ultramic.2016.05.008
- Cristancho, R.J.A., Hanafi, M.M., Syed Omar, S.R., Rafii, M.Y., 2014. Aluminum speciation of amended acid tropical soil and its effects on plant root growth. *J. Plant Nutr.* 37, 811–827. doi:10.1080/01904167.2014.881856
- Denance, N., Szurek, B., Noel, L.D., 2014. Emerging functions of nodulin-like proteins in non-nodulating plant species. *Plant Cell Physiol.* 55, 469–474. doi:10.1093/pcp/pct198
- Durmuşkahya, C., Alp, H., Hortooğlu, Z.S., Toktas, Ü., Kayalar, H., 2016. X-ray fluorescence spectroscopic determination of heavy metals and trace elements in aerial parts of *Origanum sipyleum* L from Turkey. *Trop. J. Pharm. Res.* 15, 1013–1015. doi:10.4314/tjpr.v15i5.16
- Embrapa Cerrados, 2004. Cerrado: correção do solo e adubação. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Embrapa Solos, 2013. Sistema brasileiro de classificação de solos, 3ª edição revista e ampliada. Embrapa, Brasília.
- Farrugia, M.A., Macomber, L., Hausinger, R.P., 2013. Biosynthesis of the urease metallocenter. *J. Biol. Chem.* 288, 13178–13185. doi:10.1074/jbc.R112.446526
- Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G., Bélanger, R.R., 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 1–6. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.034
- Fernandez, C.F., 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol comun (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT, Cali.
- Fomina, M., Charnock, J., Bowen, A.D., Gadd, G.M., 2007. X-ray absorption spectroscopy (XAS) of toxic metal mineral transformations by fungi. *Environ. Microbiol.* 9, 308–321. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01139.x
- Gallardo, H., Queralt, I., Tapias, J., Guerra, M., Carvalho, M.L., Marguá, E., 2016. Possibilities of low-power X-ray fluorescence spectrometry methods for rapid multielemental analysis and imaging of vegetal

- foodstuffs. *J. Food Compos. Anal.* 50, 1–9. doi:10.1016/j.jfca.2016.04.007
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244. doi:10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
- González, M.B.R., Gonzalez-López, J., 2013. Beneficial plant-microbial interactions: ecology and applications. CRC Press, New York.
- Hänsch, R., Mendel, R.R., 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 259–266. doi:10.1016/j.pbi.2009.05.006
- Hodson, M.J., 2002. X-ray microanalytical studies of mineral localization in the needles of white pine (*Pinus strobus* L.). *Ann. Bot.* 89, 367–374. doi:10.1093/aob/mcf052
- Hu, Y., Ribbe, M.W., 2013. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Biol. Chem.* 288, 13173–13177. doi:10.1074/jbc.R113.454041
- Kanu, S.A., Barnabas, A.D., Przybylowicz, W.J., Mesjasz-Przybylowicz, J., Dakora, F.D., 2014. Elemental distribution in tissue components of N<sub>2</sub>-fixing nodules of *Psoralea pinnata* plants growing naturally in wetland and upland conditions in the Cape Fynbos of South Africa. *Protoplasma* 251, 869–879. doi:10.1007/s00709-013-0589-5
- Koske, R.E., Gemma, J.N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92, 486–488. doi:10.1016/S0953-7562(89)80195-9
- Kroukamp, E.M., Wondimu, T., Forbes, P.B.C., 2016. Metal and metalloid speciation in plants: overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements. *TrAC Trends Anal. Chem.* 77, 87–99. doi:10.1016/j.trac.2015.10.007
- Laue, M., Fulda, G., 2013. Rapid and reliable detection of bacterial endospores in environmental samples by diagnostic electron microscopy combined with X-ray microanalysis. *J. Microbiol. Methods* 94, 13–21. doi:10.1016/j.mimet.2013.03.026
- Lobanov, A.V., Fomenko, D.E., Zhang, Y., Sengupta, A., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2007. Evolutionary dynamics of eukaryotic

- selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biol.* 8, R198. doi:10.1186/gb-2007-8-9-r198
- Moore, K.L., Chen, Y., van de Meene, A.M.L., Hughes, L., Liu, W., Geraki, T., Mosselmans, F., McGrath, S.P., Grovenor, C., Zhao, F.J., 2014. Combined NanoSIMS and synchrotron X-ray fluorescence reveal distinct cellular and subcellular distribution patterns of trace elements in rice tissues. *New Phytol.* 201, 104–115. doi:10.1111/nph.12497
- Mortimer, P.E., Le Roux, M.R., Pérez-Fernández, M.A., Bénédicto, V.A., Kleinert, A., Xu, J., Valentine, A.J., 2013. The dual symbiosis between arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing bacteria benefits the growth and nutrition of the woody invasive legume *Acacia cyclops* under nutrient limiting conditions. *Plant Soil* 366, 229–241. doi:10.1007/s11104-012-1421-2
- Mortimer, P.E., Pérez-Fernández, M.A., Valentine, A.J., 2008. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1019–1027. doi:10.1016/j.soilbio.2007.11.014
- O’Hara, G.W., 2001. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Anim. Prod. Sci.* 41, 417–433. doi:10.1071/EA00087
- Parkin, A., Goldet, G., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J.C., Armstrong, F.A., 2008. The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production by the [NiFeSe]-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum*. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 13410–13416. doi:10.1021/ja803657d
- Pilon-Smits, E.A., Quinn, C.F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M., 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 267–274. doi:10.1016/j.pbi.2009.04.009
- Polacco, J.C., Mazzafera, P., Tezotto, T., 2013. Opinion – nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Sci.* 199-200, 79–90. doi:10.1016/j.plantsci.2012.10.010
- Przybyłowicz, W.J., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Migula, P., Turnau, K., Nakonieczny, M., Augustyniak, M., Głowacka, E., 2004. Elemental microanalysis in ecophysiology using ion microbeam. *Nucl. Instrum. Meth. B* 219-220, 57-66. doi:10.1016/j.nimb.2004.01.028

- Seven, J., Polle, A., 2014. Subcellular nutrient element localization and enrichment in ecto- and arbuscular mycorrhizas of field-grown beech and ash trees indicate functional differences. *PLoS One* 9(12), e114672. doi:10.1371/journal.pone.0114672
- Shi, Q., Wang, J., Zou, J., Jiang, Z., Wang, J., Wu, H., Jiang, W., Liu, D., 2016. Cd subcellular localization in root tips of *Hordeum vulgare*. *Pol. J. Environ. Stud.* 25, 903–908. doi:10.15244/pjoes/61112
- Siebers, M., Brands, M., Wewer, V., Duan, Y., Hölzl, G., Dörmann, P., 2016. Lipids in plant-microbe interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 16, 1388–1981. doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.021
- Singh, S.P., Vogel-Mikuš, K., Vavpetič, P., Jeromel, L., Pelicon, P., Kumar, J., Tuli, R., 2014. Spatial X-ray fluorescence micro-imaging of minerals in grain tissues of wheat and related genotypes. *Planta* 240, 277–289. doi:10.1007/s00425-014-2084-4
- Soil Survey Staff, 1999. Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. Natural Resources Conservation Service. Department of Agriculture, United States.
- Solís, C., Celis, H., Romero, I., Isaac-Olivé, K., Andrade, E., Eslava-Rosas, F., Monroy-Rosales, J.H., Cuevas-Moreno, R., 2011. Metal/protein ratio determination in the *Rhodobacter capsulatus* cytoplasmic pyrophosphatase enzyme by particle induced X-ray emission. *J. Microbiol. Methods* 84, 272–277. doi:10.1016/j.mimet.2010.12.005
- Suliman, S., Tran, L.S.P., 2015. Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. *Plant Sci.* 239, 36–43. doi:10.1016/j.plantsci.2015.06.018
- Tejada-Jiménez, M., Castro-Rodríguez, R., Kryvoruchko, I., Lucas, M.M., Udvardi, M., Imperial, J., González-Guerrero, M., 2015. *Medicago truncatula* natural resistance-associated macrophage protein1 is required for iron uptake by rhizobia-infected nodule cells. *Plant Physiol.* 168, 258–272. doi:10.1104/pp.114.254672
- Terry, N., Zayed, A.M., Souza, M.P., Tarun, A.S., 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 51, 401–432. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.401
- Vardien, W., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W.J., Wang, Y., Steenkamp, E.T., Valentine, A.J., 2014. Nodules from Fynbos legume *Virgilia divaricata* have high functional plasticity under variable P

- supply levels. *J. Plant Physiol.* 171, 1732–1739. doi:10.1016/j.jplph.2014.08.005
- Weiersbye, I.M., Straker, C.J., Przybylowicz, W.J., 1999. Micro-PIXE mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots and the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. *Nucl. Instrum. Meth. B* 158, 335–343.
- Weisany, W., Raei, Y., Allahverdipoor, K.H., 2013. Role of some of mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 2, 77–84.
- Xia, J.L., Liu, H.C., Nie, Z.Y., Peng, A.A., Zhen, X.J., Yang, Y., Zhang, X.L., 2013. Synchrotron radiation based STXM analysis and micro-XRF mapping of differential expression of extracellular thiol groups by *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown on  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{S}^0$ . *J. Microbiol. Methods* 94, 257–261. doi:10.1016/j.mimet.2013.06.030
- Zhao, F.J., Moore, K.L., Lombi, E., Zhu, Y.G., 2014. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends Plant Sci.* 19, 183–192. doi:10.1016/j.tplants.2013.12.001

## 5. ARTIGO 2 - SELENIUM COMPARTMENTALIZATION IN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN ASYMBIOTIC STAGE AND ASSOCIATED WITH BRACHIARIA GRASS

\*Article written according to the rules of Soil Biology and Biochemistry

**Soraya Marx Bamberg;** Ediu Carlos da Silva Júnior; Karl Kemmelmeier; Cynthia de Oliveira; Thais Diniz Manso; Teotônio Soares de Carvalho; Luiz Roberto Guimarães Guilherme and Marco Aurélio Carbone Carneiro.

### **Abstract**

Selenium importance is attributed to its essentiality to humans, animals and beneficial effect to higher plants. This trace element can be considered benefic or toxic to organisms, depending on the concentration available to them. Se soil concentration is unevenly distributed, deserving attention to mitigate its translocation to other organisms. Arbuscular mycorrhizae (AM) is the result of a symbiotic interaction between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants, that can either improve the uptake of nutrients or avoid metal phytotoxicity to plants. In this context, the aim of this study was to identify the possible mechanisms of AMF on Se absorption and compartmentalization in its spores as a protection strategy to the plants. The present study used Synchrotron X-ray fluorescence (S-XRF) microanalyses to quantify and visualize Se distribution in AMF structures. Brachiaria grass (*Urochloa decumbens*) was cultivated in pots under greenhouse conditions during thirty days, were inoculated AM fungal isolates (*Acaulospora morrowiae*, *Dentiscutata heterogama* and *Rhizophagus clarus*), uninoculated control plants and five Se doses as sodium selenate (0, 2, 4, 6 and 8 mg Se kg<sup>-1</sup> of soil) were assessed. A parallel experiment was conducted in agar medium using Petri dishes with the same five Se doses applied in the pot experiment, which allowed seven fungi spores of *Dentiscutata*

*heterogama* grow for 15 days at 37 °C. All samples were stored in distilled water at 4 °C until the S-XRF analysis. Mycorrhizal colonization and Se accumulation in shoot was evaluated. Our results showed high colonization rates, above 45% to all fungus treatments. Se accumulation in shoot was higher in plants inoculated with *A. morrowiae* and *D. heterogama*, especially at dose 8 mg kg<sup>-1</sup>, indicating a possible protective effect provided by *R. clarus* to *Urochloa decumbens* in avoiding Se accumulation. S-XRF analysis identified an AMF vesicle of *R. clarus*, inside a root fragment, showing a Se compartmentalization ten times higher than Se concentration in root tissues. S-XRF analysis also allowed the identification of Se in spores of *D. heterogama* cultivated in Petri dish, with a concentration in spore mass of 35.14 mg kg<sup>-1</sup> of Se, reaffirming the potential of these microorganisms to prevent greater damage to the plants caused by selenium toxicity.

## HIGHLIGHTS

- Synchrotron XRF analysis helped elucidate the AMF protection against high levels of Se.
- Arbuscular mycorrhizal fungi can compartmentalize Se in its spores.
- Selenium accumulation in plant shoots can be affected differently by different AMF species.
- *Rhizophagus clarus* and *D. heterogama* demonstrated Se specificity in *Urochloa decumbens*.

## 1. INTRODUCTION

The essential trace mineral selenium (Se) is of fundamental importance to human health, being incorporated into selenoproteins, it plays both structural and enzymatic roles, also having a wide range of pleiotropic effects, ranging

from antioxidant and anti-inflammatory effects to the production of active thyroid hormone. Low selenium status has been associated with increased risk of mortality, poor immune function, and cognitive decline. Higher selenium status or selenium supplementation has antiviral effects, is essential for successful male and female reproduction, and reduces the risk of autoimmune thyroid disease (Rayman, 2000, 2002, 2012).

Selenium is one of the elements that plays an important role in animal and human health, being also essential to other organisms including bacteria and algae (Blazina et al., 2017; Vriens et al., 2016). In the environment, however, there are concerns about two problems of Se distribution, i.e., deficiency and toxicity are harmful to humans and animals, hence, all over the world it is called as two edged sword. Certain regions of the world are Se-deficient, e.g. oxisol from Brazil (Se content average of  $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), while others are becoming Se-toxic due to natural and anthropogenic activities, e.g. seleniferous soils (Se content above  $5.0 \text{ mg kg}^{-1}$ ) from China, Chile and Russia (Lopes; Ávila; Guilherme, 2017; Zhu et al., 2009).

Several studies report the beneficial effects of Se in plants, since it increases antioxidant activity, leading to higher plant yield, and also alleviates metal toxicity by preventing oxidative stress (Saidi et al., 2014; Lidon et al., 2018), on the other hand selenium induced oxidative stress, distorted protein structure and function, are the main causes of Se toxicity in plants at high doses. Plants can play a vital role in Se toxicity in different regions worldwide, hence, detailed mechanism of Se metabolism inside the plants is necessary for designing effective Se phytoremediation strategies (Gupta, 2017).

According to the most recent statistics, 90% of beef cattle are raised and finished on pasture in Brazil. In tropical regions, most production on pastures are covered by grasses of African origin, mainly *Urochloa* spp (Cardoso et al.,



2016). For this reason, the cultivation of brachiaria grass affects directly the quality of the cattle and beef production.

The response to Brachiaria grass to selenium forms applied in tropical soil was studied by Ramos et al., (2012), and they noticed that in tropical soil conditions, the Se application as selenate is more appropriate for *U. brizantha* uptake than selenite. Selenate, when applied to soil caused a significant increase in shoot biomass yield at lower rates, up to  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$  Se doses, and decreased both root and shoot biomass yield at the highest levels, mainly above  $1.0 \text{ mg kg}^{-1}$  Se doses.

The arbuscular mycorrhizae are symbiotic interaction between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plants. These microorganisms provide several benefits for the colonized plant species, such as: improve the nutrients uptake, avoid phytotoxicity by absorbing large concentrations of trace- elements, and even affect growth, mineral composition, proteins and sugar composition in plant (Sanmartín et al., 2014; Durán et al., 2016).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are able to colonize the root cortex of many plant species and develop an extraradical mycelium that radiates into the soil nearby plant roots. They expand the interface between plants and the surrounding soil contributing to plant uptake of low mobility mineral nutrients, such as P, N, Cu or Zn (Smith and Read, 2008).

However, under conditions of high levels of essential trace elements, AMF are able to alleviate metal toxicity in the plant. Alleviation of metal toxicity can be attributed not only to AM-mediated nutritional effects, but also to the impact of AMF on the element distribution at the soil-fungus-plant interface (Leyval et al., 1997; Hildebrandt et al., 2007; Meier et al., 2011). Some fungi species have Se tolerance and ability to produce  $\text{Se}^0$ , affecting plant Se speciation which can be applicable in phytoremediation, especially if they are promiscuous and affect Se tolerance in crop species (Lindblom et al., 2013).

The hypothesis, that will be propose here is related to trace-elements tolerance by AMF and is based in a previous study showing compartmentalization of Cu in spores as a survival strategy, which support the idea that some AMF are able to compartmentalize trace elements such as Se in spores cells depending on its affinity with the element in the soil (Cornejo et al., 2013; Lindblom et al., 2013). These fungi can also enhance Se content or avoid Se toxicity in the plants, depending on the quantity and species of Se available in soil (Bamberg et al., 2015; Durán et al., 2013). In this context, the aim of this study was to identify the possible mechanisms of the AMF on Se absorption and reduction in its spores as a protection strategy to the plants. Our assumption is that AMF association can allow the compartmentalization of Se in its storage structures.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Study approach**

The study involved the following steps: (a) Pot experiment with *U. decumbens* inoculated with different AMF species and received increasing levels of Se applied in soil followed by a experiment with increasing Se doses using Petri dishes; (b) Quantification of shoot dry mass followed by and analysis of Se concentration and (c) X-ray fluorescence (XRF) analysis in order to identify AMF structures presenting eventual Se accumulation. The methods used to reach our goals are described in the following sections.

### **2.2 Greenhouse and Petri dish experiment**

The experiment was carried out in a greenhouse with controlled temperature and humidity. Soil samples were sampled from a 0-20 cm layer of an Oxissol (LVAd). After air drying and sieved in a 2 mm mesh, physical and chemical analysis were performed (Table1). The soil was sterilized by autoclaving for two consecutive days at 120 °C for one hour in order to

eliminate all pre-existing living microorganisms, and then rested for 15 days in order to reach chemical stabilization. Limestone was applied in order to increase the base saturation to 70%, for 30 days.

**Table 1**

Chemical characterization and particle size of a B-horizon of a *Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico* (Oxisol).

Elements	Units	Extractors	Concentration
<i>Chemical properties</i>			
SOM*	g dm <sup>-3</sup>	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 4N e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N	1.4
pH	-	Water	4.9
Al	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl 1 mol L <sup>-1</sup>	0.0
H + Al	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	SMP	3.2
P	mg dm <sup>-3</sup>	Mehlich-1	0.8
K	mg kg <sup>-1</sup>	Mehlich-1	48.0
Ca	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl 1 mol L <sup>-1</sup>	0.1
Mg	cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl 1 mol L <sup>-1</sup>	0.1
Na	mg kg <sup>-1</sup>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> in CH <sub>3</sub> COOH	0
<i>Particle size</i>			
Clay	g dm <sup>-3</sup>	Pipette	25
Silt	g dm <sup>-3</sup>	Pipette	2
Sand	g dm <sup>-3</sup>	Pipette	73

\*SOM - organic soil matter.

The soil was placed in a 3 kg pots, with twenty seeds of *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster and after thinning, were allowed only ten plants to grow. Fertilization was performed according to Malavolta (1980), using 50% reduction of P in order to induce plant stress and favor fungal colonization.

Three AMF species, *Acaulospora morrowiae* (Spain & N.C. Schenck), *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) and *Rhizophagus clarus* (Nicolson & N.C. Schenck) were inoculated individually, with one hundred spores each. Five doses of Se as selenate (0, 2, 4, 6 and 8 mg kg<sup>-1</sup> of soil) were compared, based on the preliminary studies of Bamberg et al. (2015) with four replication. After one month, fifty cm<sup>3</sup> of soil from each pot were collected in order to extract spores and small root fragments for S-XRF analysis, these samples were stored in a distilled water for 24 hours until the S-XRF analysis.

A parallel experiment was conducted in 1% agar medium using Petri dishes with the same five doses of Se applied in the pot experiment, which allowed four fungus spores of *Dentiscutata heterogama* grow for 15 days at 37°C. Spores were harvested and washed five times in distilled water before S-XRF analysis.

## 2.2 Dry mass

Shoots were washed in distilled water, placed in a paper bag and oven dried at 60°C until constant weight to be taken on a precision scale.

## 2.3 Se concentration and accumulation in shoot

The dried and grinded tissues (approximately 500 mg) were weighed and acid digested in 10 mL HNO<sub>3</sub> in Teflon PTFE flasks (Corporation, Matthews, USA) and submitted to 0.76 MPa for 10 min in a microwave oven (CEM, model Mars 5 CEM Corporation, Matthews, USA). After cooling at room temperature, the extract was filtered (Whatman No. 40 filter) and diluted by adding 5 mL of bi-distilled water. Certified reference material (tomato leaves, NIST 1573a, National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, USA) were included for quality control. Three blank and certified reference samples were analysed along with every batch of digestion.

Se concentration was determined in a PerkinElmer Analyst 800 atomic absorption spectrophotometer (PerkinElmer Inc., San Jose, USA) with electrothermal atomization by (pyrolytic) graphite furnace.

The Se accumulation was determined according to the following equation:

$$\text{Se shoot accumulation } (\mu\text{g Se DW}) = \frac{\text{Shoot dry matter (g)} \times \text{Se concentration in shoot } (\mu\text{g kg}^{-1})}{1000}$$

## 2.4 Mycorrhizal colonization

After ninety days of experiment, the roots were harvested washed and one gram of fresh roots of each plant was taken to evaluate arbuscular mycorrhizal colonization. The washed root samples were cleared immersed in a 10% KOH (w/v) solution for 24 h, washed in water, immersed in 2% HCL (v/v) for 5 min, and stained with Trypan Blue (0,05%) for 24 h. The mycorrhizal colonization was quantified by the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse, 1980).

### **2.5 Synchrotron X-ray fluorescence analysis**

S-XRF measurements were carried out at the Brazilian Synchrotron Light National Laboratory (LNLS) in Campinas/SP, at the XRF beamline, through a polychromatic beam with an energy up to 20 keV for excitation and a Si (Li) detector with a resolution of 165eV at 5.9 keV. The measurement was performed in each spore and root fragment individually, which were inserted directly to Kapton polyimide tape and covered with ultralene thin film.

The multielementar standard Specsol (Quimilab) was used in order to obtain Se references to the follow dilutions 5.0; 25.0; 50.0; 100.0 and 125.0 ml L<sup>-1</sup>, and was recovered a hundred percent of Se.

All results for Se 2D mapping and measurements were compiled using the software PyMca 5.2.2 (Solé et al., 2007).

### **2.7 Statistical analysis**

Results were expressed as an average of four replicates. Treatment effects were determined by ANOVA followed by tukey HSD test at 5 % level for multiple comparisons. For quantitative data (dry mass as well as total Se accumulation in shoots) a regression model was employed for each treatment using the software R 3.4.4 (R Development Core Team, 2018).

## **3 RESULTS AND DISCUSSION**

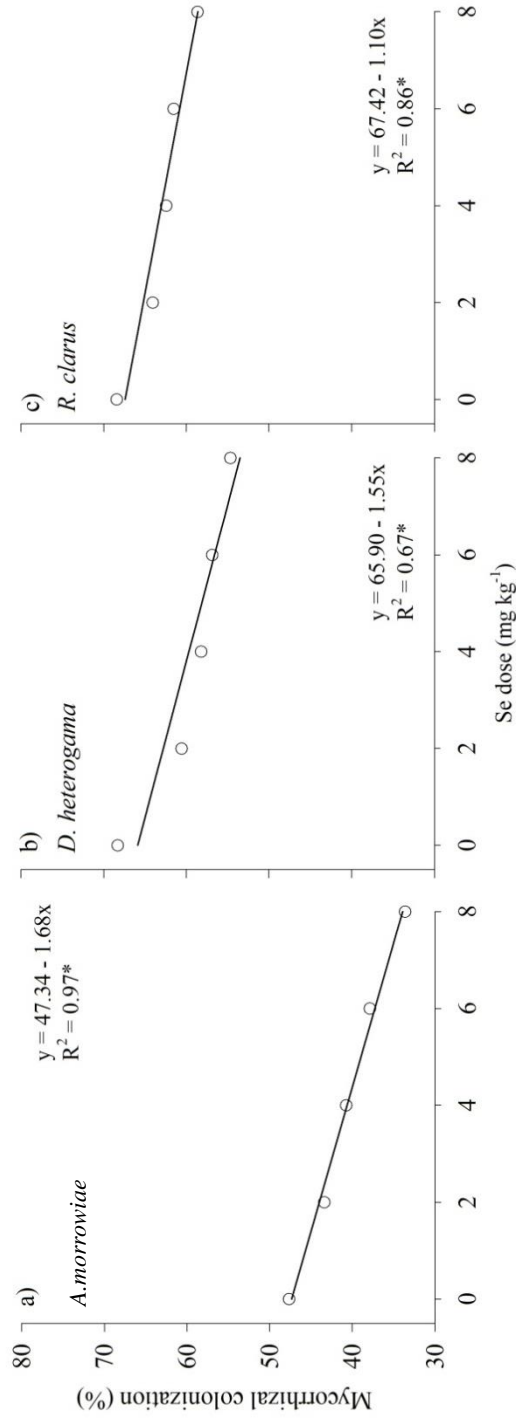
### **3.1 Mycorrhizal colonization**

The results obtained do not show colonization for the non-inoculated plants, indicating no contamination. All the AMF tested presented a decreasing linear statistical regression model (**Figure 1**). The highest percentages of colonization were obtained when Se was not applied in the soil, accounting for 47.34% for *A. morrowie*, 65.90% for *D. heterogama* and 67.42% for *R. clarus*. For all tested AMF, the higher Se dosage applied to soil provided the lower rate colonization obtained, resulting in a difference of colonization when compared to the initial colonization at dose 0.0 mg kg<sup>-1</sup>, of approximately: 28% for *A. morrowie*, 20% *D. heterogama* and 13% for *R. clarus*. The fungus *A. morrowie* showed to be the most sensitive specie to Se presence in soil.

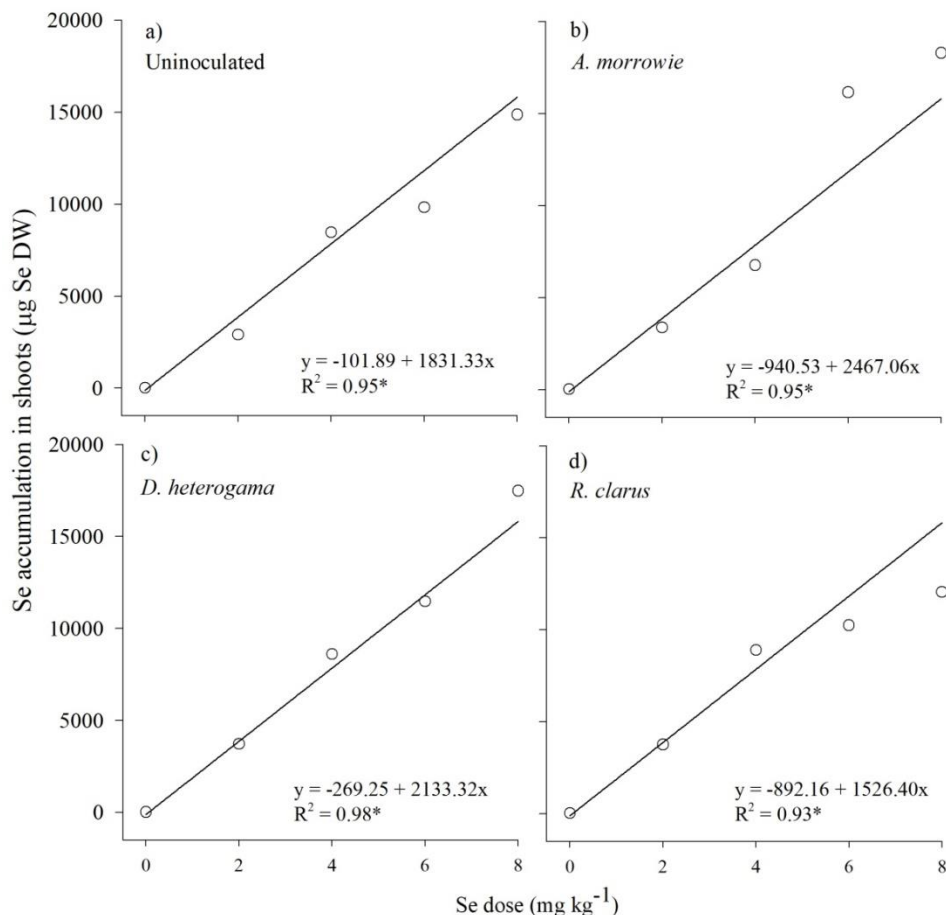
Mycorrhizal colonization is affected by several factor such as pH, nutrient availability, climate and plant host specificity (Laliberté, 2017; Soudzilovskaia et al., 2015). In general, when high Se doses are applied to the soil with FMA, the colonization rate tend to decrease as suggested by Tognon et al., (2016) that inoculated *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler and applied Se at 100 µg plant<sup>-1</sup> in snapdragon flower, they observed a reduction of 15.6% of colonization rate, as well as Yu et al., (2011b) in a soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, with *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson and Gerd.) C. Walker & A. Schüssler fungus and 20 mg kg<sup>-1</sup> Se on soil, noticing a decreasing in the colonization rate after Se application of less than 20%, which also corroborate with the present results.

### 3.2 Se accumulation in shoot

Se accumulation in shoots showed for all treatments, according to the linear regression, increased values from 0 varying to 18795.95 µg Se kg<sup>-1</sup> DW (**Figure 2**). The fungi *A. morrowiae* and *D. heterogama* were able to provide higher Se accumulations to the plants, especially at dose 8 mg kg<sup>-1</sup>, which obtained more than 2 µg Se g<sup>-1</sup> DW of difference.



**Figure 1.** Percentage of mycorrhizal colonization in Se doses applied of each fungi treatments inoculated. a) *A. morrowiae* b) *D. heterogama* c) *R. clarus*. (\* $P \leq 0.05$ )



**Figure 2.** Se accumulation in shoots according with Se doses applied on soil for each treatment. a) uninoculated b) *A.morrowiae* c) *D. heterogama* d) *R. clarus*. (\*P≤0.05).

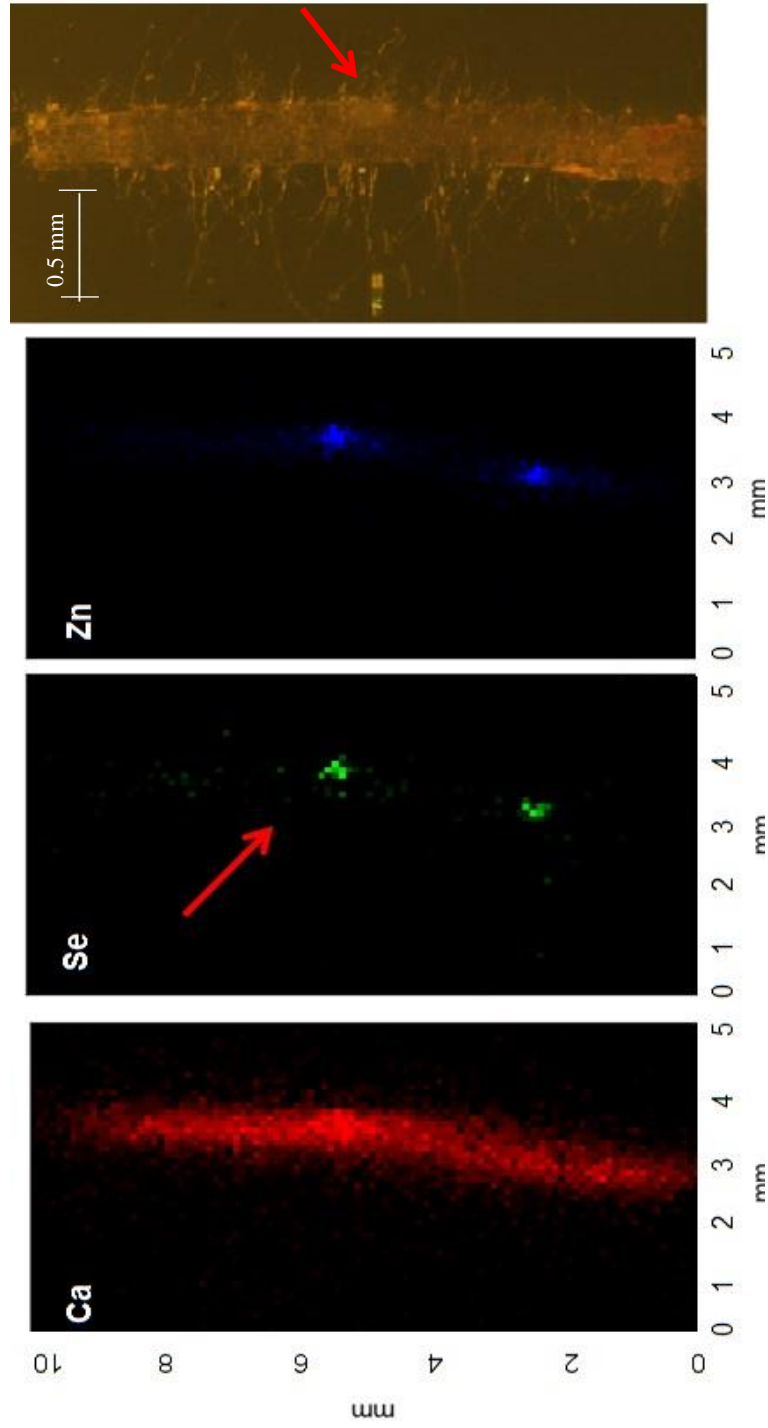
Shoots of plants colonized by *R. clarus* had lower accumulation than the other treatments showing to be Se tolerant and indicating a possible protective effect provided by these AMF in front of high Se doses to *U. decumbens*. Several functional traits of AMF appear to have a taxonomic basis, and some of them present potential to influence on host plant performance and ecosystem processes (Van Der Heijden and Scheublin, 2007), for example, fast-sporulating



Glomeraceae species would show positive selection in impacted environments, with some genera or species showing the ability to survive and propagate well using intraradical vesicles (Fortin et al, 2005) or abundant spores produced in the roots of vascular plants, as *Rhizophagus* spp. (Schüßler and Walker, 2010). The AMF association presumably avoided Se translocation to the shoot, as can be observed by the high Se storage in the AMF vesicle in a root of the same treatment (**Figure 3**).

In general, plants can store major and trace-elements in its vacuoles. AMF can also improve trace elements accumulation depending on its fungus specie (Hong-Bo et al., 2010; Phanthavongsa et al., 2017; Sessitsch et al., 2013; Yu et al., 2011a). AMF can avoid, to immobilize, fix on its polyphosphate granules or also retain trace-elements in its cell walls or structures as a protective mechanism to the plants (Cabral et al., 2015; Cornejo et al., 2013; Jin et al., 2018; Wang, 2010).

Se accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaves also decreased in a previous study when applied along with a mix of *Funneliformis mosseae* and *Rhizophagus intraradices* (Sanmartín et al., 2014). The effect of *Funneliformis mosseae* fungus with application of increasing Se doses was studied in alfafa (*Medicago sativa* L.), maize (*Zea mays* L.) and soybean by Yu et al. (2011b) and Se shoot accumulation in inoculated plants was lower than those not inoculated at all doses tested. Similar results were verified when the same AMF and different Se species was tested in maize, as a result the inorganic Se accumulation was higher in mycorrhizal plants (Yu et al., 2011a). On the other hand, garlic plants were investigated with the addition of Se doses and the individual inoculation of fungi *Rhizophagus fasciculatus* (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler) and *F. mosseae* and as a result, inoculated plants showed higher accumulation of Se than non-inoculated plants (Patharajan; Raaman, 2012).



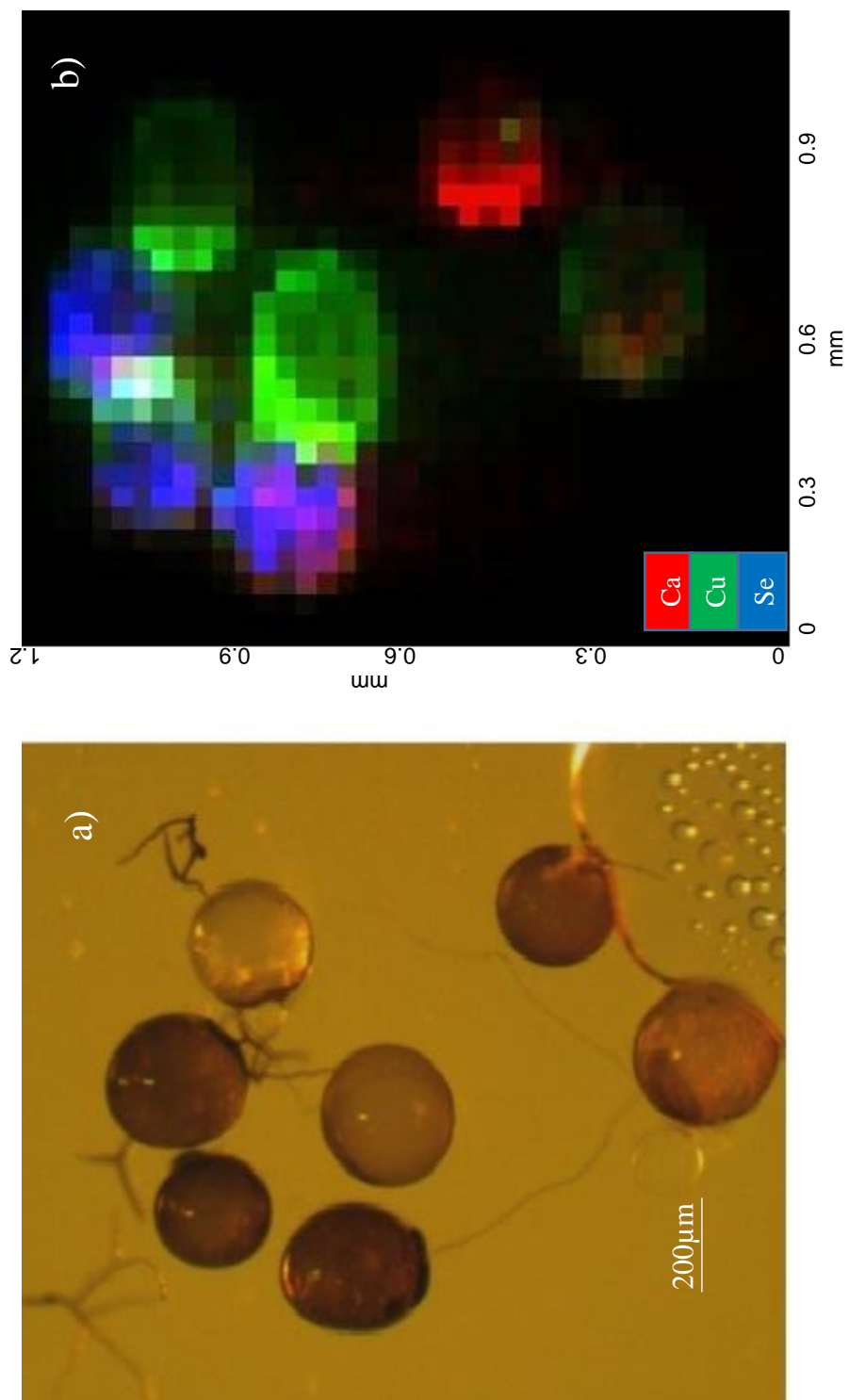
**Figure 3.** RGB image of synchrotron radiation micro X-ray fluorescence identifying Ca, Se, and Zn, and micrography obtained of *U. decumbens* root with a vesicle of *R. clarus* AMF inside its structure.

### 3.2 Synchrotron X-ray fluorescence analysis (LNLS)

Analyzes in the synchrotron laboratory allowed the identification of Se in AMF spores of *D. heterogama* that were germinated in Petri dish, with 8 mg kg<sup>-1</sup> of Se. Additionally, Se was not detected in spores control treatment. The Se concentration found in spore mass was 35.14 mg kg<sup>-1</sup>, which reaffirms the potential of these microorganisms to prevent greater damage to the plants causing by selenium toxicity (**Figure 4**).

In addition, in the *R. clarus* pot treatment of 8 mg kg<sup>-1</sup>, an AMF vesicle was identified inside a root fragment, showing Se compartmentalization, with a concentration in its structure of 16 mg kg<sup>-1</sup>, while the Se concentration in root material was 1.789 mg kg<sup>-1</sup> (**Figure 3**). The compartmentalization in the vesicle had a magnitude of a hundred times greater than the concentration observed in the root plant material, it also reaffirm the beneficial effect of the AMF to the *Brachiaria* grass in the presence of high Se levels.

The storage of trace-elements in the AMF structures avoid its translocation to the plant's vital tissues such as shoots, reaffirming, therefore, a protective mechanism against toxicity of trace elements (Cabral et al., 2015; Ferrol et al., 2009). AMF spores has been reported to compartmentalize and to bind with several heavy metal such as Cu, Zn and Cd (Cabral et al., 2015; Cornejo et al., 2013; Ferrol; Tamayo; Vargas, 2016), but it is the first time that Se compartmentalization is reported in this structure.



**Figure 4.** a) Micrograph of *D. heterogama* spores cultivated at Petri dishes at 8 mg kg<sup>-1</sup> of Se. b) RGB image of synchrotron radiation micro X-ray fluorescence identifying Ca, Cu and Se of *D. heterogama* spores.

#### 4. CONCLUSIONS

AMF has a protective effect against Se toxicity on brachiaria grass. The AMF mechanism of protection against high levels of Se in *Urochloa decumbens* is compartmentalize this element in its structures, such as vesicles or spores. According to the data obtained it is concluded that different AMF species may exhibit different functional traits as tolerance to Se; *A. morrowiae*, *D. heterogama* and *R.clarus* can survive in seleniferous soils; There is specificity between AMF and *Urochloa decumbens* on 8 mg kg<sup>-1</sup> Se presence; and AMF evaluated here may be selenotolerant, mainly *R. clarus*, requiring further studies in order to confirm such hypothesis.

#### Acknowledgments

The authors and S.M.B are grateful to the Brazilian Synchrotron Light Laboratory for technical support to develop this research, to CNPq, CAPES and FAPEMIG from Brazil for financial support to the research project and especially CAPES for granting the doctorate scholarship.

#### References

- BAMBERG, S. M. et al. Selenium and mycorrhiza on grass yield and selenium content. In: BANUELOS, S. G. et al. (Eds.). **Global Advances in Selenium Research from Theory to Application**. London: CRC Press Taylor & Francis, 2015. p. 1–207.
- BLAZINA, T. et al. Marine Primary Productivity as a Potential Indirect Source of Selenium and Other Trace Elements in Atmospheric Deposition. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 1, p. 108–118, 2017.
- CABRAL, L. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their

applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1655–1664, 7 nov. 2015.

CARDOSO, A. S. et al. Impact of the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. **Agricultural Systems**, v. 143, p. 86–96, 2016.

CORNEJO, P. et al. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 925–928, fev. 2013.

DURÁN, P. et al. Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: A preliminary study as a potential Se biofortification strategy. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 3, p. 275–280, maio 2013.

DURÁN, P. et al. Inoculation with selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi to enhance selenium content in lettuce plants and improve tolerance against drought stress. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 16, n. ahead, p. 0–0, 2016.

FERROL, N. et al. Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 3, p. 551–559, 21 out. 2009.

FERROL, N.; TAMAYO, E.; VARGAS, P. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 22, p. 6253–6265, 2016.

FORTIN, J. A.; DECLERCK, S.; STRULLU, D.-G. In Vitro Culture of Mycorrhizas. In: **In Vitro Culture of Mycorrhizas**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 3–14.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489–500, 1980.

GUPTA, M. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. January, p. 1–14, 2017.

HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, v. 68, n. 1, p. 139–146, 2007.

HONG-BO, S. et al. Understanding molecular mechanisms for improving phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 23–30, 12 mar. 2010.

JIN, Y. et al. Effects and Mechanisms of Microbial Remediation of Heavy Metals in Soil: A Critical Review. **Applied Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1336, 2018.

LALIBERTÉ, E. Below-ground frontiers in trait-based plant ecology. **New Phytologist**, v. 213, n. 4, p. 1597–1603, 2017.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, v. 7, n. 3, p. 139–153, 1997.

LIDON, F. C. et al. Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. **Journal of Cereal Science**, v. 81, p. 22–29, 2018.

LINDBLOM, S. D. et al. Influence of microbial associations on selenium localization and speciation in roots of *Astragalus* and *Stanleya* hyperaccumulators. **Environmental and Experimental Botany**, v. 88, p. 33–42, abr. 2013.

LOPES, G.; ÁVILA, F. W.; GUILHERME, L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 41, n. 6, p. 605–615, 2017.

MEIER, S. et al. Alleviation of Cu toxicity in *Oenothera picensis* by copper-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. **Applied Soil Ecology**, v. 48, n. 2, p. 117–124, 2011.

PATHARAJAN, S.; RAAMAN, N. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and selenium uptake by garlic plants. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v. 45, n. 2, p. 138–151, jan. 2012.

PHANTHAVONGSA, P. et al. Effect of mycorrhizal inoculation on metal accumulation by poplar leaves at phytomanaged sites. **Environmental and Experimental Botany**, v. 143, p. 72–81, nov. 2017.

RAMOS, S. J. et al. Response of brachiaria grass to selenium forms applied in a tropical soil. **Plant, Soil and Environment**, v. 58, n. 11, p. 521–527, 2012.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, n 9225, p.233–241, 2000.

RAYMAN, M.P. The argument for increasing selenium intake. **The Proceedings of the Nutrition Society**. v. 61, n. 2, p. 203–215, 2002.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–68, mar. 2012.

SAIDI, I.; CHTOUROU, Y.; DJEBALI, W. Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 5, p. 85–91, mar. 2014.

SANMARTÍN, C. et al. Mycorrhizal inoculation affected growth, mineral composition, proteins and sugars in lettuces biofortified with organic or inorganic selenocompounds. **Scientia Horticulturae**, v. 180, p. 40–51, 2014.

SCHÜSSLE, A.; WALKER, C. (Eds.). The Glomeromycota - a specie list. England: [s.n.]. p. 57. 2010

SESSITSCH, A. et al. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 182–194, 2013.

SMITH, S.E. & READ, D.J (Eds). Mycorrhizal symbiosis., 3.ed ed. Academic Press, London, 2008.

SOLÉ, V.A., PAPILLON, E., COTTE, M., WALTER, P., SUSINI, J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. V. 62, n. 1, p.63–68, 2007.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; SCHEUBLIN, T. R. Functional traits in mycorrhizal ecology: their use for predicting the impact of arbuscular mycorrhizal fungal communities on plant growth and ecosystem functioning. **New Phytologist**, v. 174, n. 2, p. 244–250, abr. 2007.



VRIENS, B. et al. Selenium Uptake and Methylation by the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 711–720, 2016.

WANG, F. Hotspots in arbuscular mycorrhiza assisted phytoremediation of heavy metal contaminated soils. In: **Soil Heavy Metals**. Soil Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 19p. 1086–1090.

YU, Y. et al. Influence of mycorrhizal inoculation on the accumulation and speciation of selenium in maize growing in selenite and selenate spiked soils. **Pedobiologia - International Journal of Soil Biology**, v. 54, n. 5-6, p. 267–272, out. 2011a.

YU, Y. et al. Accumulation and Speciation of Selenium in Plants as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. **Biological Trace Element Research**, v. 143, n. 3, p. 1789–1798, 27 dez. 2011b.

ZHU, Y.-G. et al. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in plant science*, v. 14, n. 8, p. 436–42, ago. 2009.