



Desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* inoculada com o protozoário *Acanthamoeba castellanii*

Raul Matias Cezar⁽¹⁾; Katharina Sklorz⁽²⁾; Julierme Zimmer Barbosa⁽¹⁾; Fabiane Machado Vezzani⁽³⁾; Michael Bonkowski⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Doutorandos em Ciência do Solo; Universidade Federal do Paraná; Curitiba, Paraná; raulmatiascezar@yahoo.com.br; barbosajz@yahoo.com.br. ⁽²⁾ Doutoranda; University of Cologne; Köln; Alemanha; kskloz@uni-koeln.de. ⁽³⁾ Professora; Universidade Federal do Paraná; Curitiba; Paraná; fabianevezzani@gmail.com; ⁽⁴⁾ Professor; University of Cologne; Köln, Alemanha; mbonkowski@uni-koeln.de

RESUMO: O efeito dos protozoários no crescimento vegetal é geralmente avaliado na presença de bactérias, contudo, a inoculação em meio sem bactérias vem recebendo pouca atenção. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* inoculada com o protozoário *Acanthamoeba castellanii*. O experimento foi conduzindo em delineamento completamente casualizado com dois tratamentos (com e sem inoculação) e quinze repetições. As plantas foram cultivadas em microcosmos contendo 200 g de areia esterilizada, que recebeu 700.000 protozoários/microcosmo. Durante todas as etapas de isolamento, cultivo e inoculação dos protozoários, foi realizada a esterilização (autoclave) dos meios de cultura e materiais utilizados, para eliminar a presença de bactérias. Foram determinados: acúmulo de matéria seca, teor de N e conteúdo de N na parte aérea e na raiz e, atributos radiculares (comprimento, área superficial, volume, ápices e número de forquilhas por planta). A inoculação aumentou o volume radicular, a porcentagem de N na parte aérea e o conteúdo de N na raiz. Em adição, observou-se tendência de redução da ramificação do sistema radicular na presença de protozoários. A inoculação com *A. castellanii* afetou a morfologia radicular e a aquisição de N pelas plantas de *A. thaliana*, indicando que o protozoário teve efeito direto no desenvolvimento das plantas.

Termos de indexação: auxinas; protistas, nitrogênio.

INTRODUÇÃO

Na rizosfera ocorre uma expressiva variedade de moléculas de baixo peso molecular exsudadas pelas raízes (Bais et al., 2006). Para ter noção disso, basta citar os principais grupos de compostos detectados nesse microambiente: carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, esteróis, vitaminas, flavonoides, enzimas e proteínas (metabolismo primário e metabolismo secundário) (Badri & Vivanco, 2009).

Em decorrência da riqueza de compostos orgânicos, no solo rizosférico tem-se mais C e N do que no solo distante das raízes (Hamer &

Makeschin, 2009; Koranda et al., 2011). Dessa forma, o crescimento microbiano é estimulado (Zhang et al., 2014). Em geral, na presença de protozoários têm sido verificados diferentes impactos sobre as populações microbianas, com destaque para o estímulo a produção de auxina por bactérias (Bonkowski & Brandt, 2002). Por outro lado, a predação das bactérias pelos protozoários pode elevar a disponibilidade de N na rizosfera (Clarholm, 1985). Assim, a interação de protozoários e bactérias podem afetar as plantas, tendo em vista que auxina é um hormônio vegetal e N um nutriente essencial para as plantas. Entretanto, o efeito direto dos protozoários no crescimento vegetal vem recebendo pouca atenção.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* inoculada com o protozoário *Acanthamoeba castellanii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *A. thaliana* foram esterilizadas superficialmente utilizando solução de etanol 70% por 5 min e, em seguida solução de NaCl 5% por 5 min. Após a esterilização as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo camada de agar 1% com 2,2 g de meio Murashige-Skoog esterilizado.

As placas de Petri permaneceram por uma semana em câmara climatizada com: 12/12h h de dia/noite; 24/18°C dia/noite; intensidade luminosa de 160 $\mu\text{m s}^{-1}$ e 70% de umidade relativa. As plântulas foram transferidas cuidadosamente para frascos de acrílico contendo 200 g de areia esterilizada, sendo uma plântula por vaso. Em seguida foram adicionados 8 mL de água destilada e os microcosmos vedados com fita microporosa e, colocados na câmara climatizada supracitada. Após três dias foi adicionado o inoculo de *A. castellanii* em 15 microcosmos e, em outros 15 microcosmos, não foi adicionado.

Os protozoários (grupo: amebas) utilizados foram isolados de um solo (em bosque) em Göttinger, Alemanha (Bonkowski & Brandt, 2002). Antes da inoculação, os protozoários foram cultivados em



meio de levedura peptose glucose (2% peptona, 1% glucose e 0,5% extrato de levedura). Posteriormente, o inóculo foi preparado por 4 repetições de limpeza por centrifugação (800 rpm por 5 min a 2 °C) em solução nutritiva, com densidade final de 560.000 protozoários por mL. Cada planta nos tratamentos com protozoário recebeu 1,125 mL de solução nutritiva contendo 700.000 protozoários, enquanto que nas plantas do tratamento controle foi adicionado apenas 1,125 mL de solução nutritiva. Após uma semana da inoculação e permanência na câmara climatizada, as plantas receberam 2 mL de meio Murashigue-Skoog contendo: 1,650 mg $(\text{NH}_4)(\text{NO}_3)$, 0,006 mg H_3BO_3 , 0,3322 mg CaCl_2 , 0,0000250 mg CoCl_2 , 0,0000250 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,03726 mg $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02780 mg $\text{FeO}_4\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 mg $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, 0,1807 mg MgSO_4 , 0,0169 mg MnSO_4 , 0,1 mg $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 0,0005 mg $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, 0,00083 mg KI, 1,9 mg KNO_3 , 0,17 mg KH_2PO_4 , 0,0005 mg $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$, 0,000250 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 mg $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HC}$ e 0,0086 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, as plantas permaneceram por mais semana na câmara climatizada.

As plantas foram separadas em parte aérea e raízes. As raízes foram colocadas em bandejas de acrílico transparente, sendo obtidas imagens por meio de escâner. As imagens foram analisadas com o programa WinRhizo®, sendo determinado os seguintes atributos radiculares: comprimento, área superficial, volume, número de ápices e número de forquilhas. Posteriormente, as raízes e a parte aérea das plantas foram submetidas a secagem em estufa (60°C por 24 h). Transcorrido o período de secagem, foi determinada a matéria seca (MS) da parte aérea e das raízes, que depois foram moídas e analisadas os teores de N via combustão em analisador elementar (Flash 2000 CHNS/O®). O conteúdo de N foi obtido com base nas concentrações do elemento e do acúmulo de matéria seca da parte aérea e das raízes.

O experimento foi conduzindo em delineamento completamente casualizado com dois tratamentos (com e sem inoculação) e quinze repetições. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) e, quando a ANOVA foi significativa ($p < 0,05$), ao teste de Tukey. Para as análises foi utilizado o programa R-Studio®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação com protozoários aumentou o volume radicular, a porcentagem de N na parte

aérea e o conteúdo de N na raiz (Tabela 1). Embora não tenha sido detectado efeito da inoculação em outras variáveis pela ANOVA, em termos relativos, verificamos que a inoculação com protozoários afetou o desenvolvimento de *A. thaliana* (Figura 1). O aumento relativo do crescimento do sistema radicular foi acompanhado por tendência de redução da ramificação, considerando os atributos número de ápices e número de forquilhas, comprimento, área superficial, volume e MS do sistema radicular.

Tabela 1. Matéria seca (MS), atributos radiculares, teor de N e conteúdo de N em *A. thaliana* sem (controle) e com inoculação de protozoários *A. castellanii*

Atributos ¹	Unidade	Controle	<i>A. castellanii</i>
MS-parte aérea	g planta ⁻¹	24	42
MS-raiz	g planta ⁻¹	33	50
Comprimento	cm planta ⁻¹	21,7	29,3
Área superficial	cm ² planta ⁻¹	1,12	1,71
Volume	cm ³ planta ⁻¹	0,0045 b	0,0081 a
Ápices	nº planta ⁻¹	203	166
Forquilhas	nº planta ⁻¹	264	186
N-parte aérea	%	6,2 b	6,6 a
N-raiz	%	0,9	0,9
Conteúdo N parte aérea	mg mg ⁻¹	0,21	0,22
Conteúdo de N raiz	mg mg ⁻¹	0,06 b	0,07 a

¹ Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância. Médias sem letras não diferem entre si.

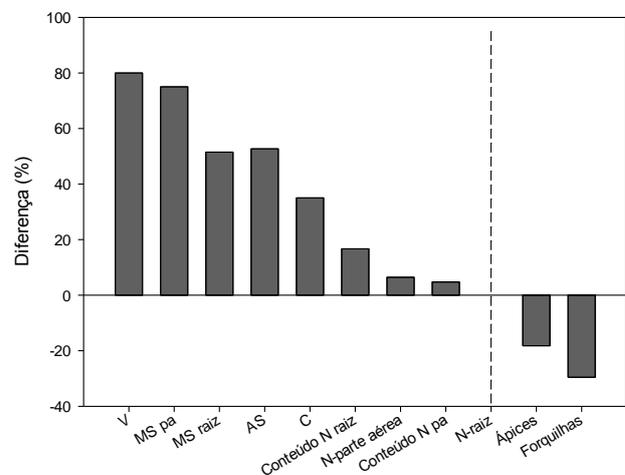


Figura 1. Diferença (%) do tratamento com inoculação de *A. castellanii* em relação ao tratamento controle (sem inoculação).



Os resultados indicam que o protozoário *A. castellanii* pode estimular as plantas de *A. thaliana* diretamente, sem o efeito da predação bacteriana. Provavelmente o estímulo deve-se a produção de auxina por *A. castellanii*, considerando que as modificações na morfologia radicular verificadas no presente estudo corroboram com estudos que avaliam a aplicação de auxinas em *A. thaliana* (Laskowski et al., 2006; Vanneste & Friml, 2009).

Resultados de Bonkowski & Brandt (2002) indicam que *A. castellanii* não produz auxinas. Contudo, recentemente foram identificados genes em *A. castellanii* que estão relacionados com a síntese de triptofano e outros genes relacionados a síntese de auxinas (Anderson et al., 2005; Clarke et al., 2013). Os genes identificados também foram encontrados no protozoário (flagelado) parasita de plantas *Phytomonas serpens* (Lenne et al., 2014). Os autores afirmam que a aquisição de um gene relacionado a decarboxilase, através da transferência horizontal de genes de bactérias, pode conferir a *P. serpens* a habilidade de descarboxilar o ácido indol-3-piruvato e, assim, sintetizar auxina.

A ausência de bactérias como fonte de alimento para *A. castellanii* pode ter afetado a expressão de genes do protozoário, considerando que os fatores ambientais alteram a expressão gênica (Choi et al., 1997). Assim, *A. castellanii* pode ter ativado a síntese de auxina como estratégia para aumentar a disponibilidade de alimento, uma vez que as auxinas ao estimular o crescimento radicular, elevam indiretamente a liberação de mucilagem (Somasundaram et al., 2008). A mucilagem é uma importante fonte de açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos na rizosfera (Nguyen, 2003). Considerando a ausência de bactérias, esses compostos orgânicos podem servir de fonte de C para os protozoários. Todavia, para comprovar essa hipótese são necessários mais estudos.

Os protozoários do solo são reconhecidos por elevar a mineralização de N imobilizado nas bactérias (Clarholm, 1985). Krome et al. (2009) verificaram que o incremento na porcentagem de N pode estar relacionado com a alocação de mais C para as raízes, elevando o crescimento e a absorção de N. Entretanto, alguns estudos reportam redução de nutrientes nas plantas devido a inoculação com protozoários (amebas) (Jentschke et al., 1995; Alphei et al., 1996).

CONCLUSÕES

A inoculação com *A. castellanii* afetou a morfologia radicular e a aquisição de N pelas

plantas de *A. thaliana*, indicando que o protozoário teve efeito direto nas plantas.

REFERÊNCIAS

ALPHEI, J.; BONKOWSKI, M. & SCHEU, S. Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europeus* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia*, 106:111–126, 1996.

ANDERSON, I.J.; WATKINS, R.F.; SAMUELSON, J.; SPENCER, D.F.; MAJOROS, W.H.; GRAY, M.W. & LOFTUS, B.J. Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist*, 156:203–214, 2005.

BADRI, D. V. & VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell Environ.*, 32:666–681, 2009.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S. & VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:233–266, 2006.

BONKOWSKI, M. & BRANDT, F. Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects? *Soil Biol. Biochem.*, 34:1709–1715, 2002.

CHOI, J.Y.; LEE, T.W.; JEON, K.W. & AHN, T.I. Evidence for symbiont-induced alteration of a host's gene expression: irreversible loss of SAM synthetase from *Amoeba proteus*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44:412–419, 1997.

CLARHOLM, M. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. Biochem.*, 17:181–187, 1985.

CLARKE, M.; LOHAN, A.J.; LIU, B.; LAGKOUVARDOS, I.; ROY, S.; ZAFAR, N.; BERTELLI, C.; SCHILDE, C.; KIANIANMOMENI, A.; BÜRGLIN, T.R.; FRECH, C.; TURCOTTE, B.; KOPEC, K.O.; SYNNOTT, J.M.; CHOO, C.; PAPONOV, I.; FINKLER, A.; HENG TAN, C.S.; HUTCHINS, A.P.; WEINMEIER, T.; RATTEI, T.; CHU, J.S.; GIMENEZ, G.; IRIMIA, M.; RIGDEN, D.J.; FITZPATRICK, D. A.; LORENZO-MORALES, J.; BATEMAN, A.; CHIU, C.-H.; TANG, P.; HEGEMANN, P.; FROMM, H.; RAOULT, D.; GREUB, G.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; CHEN, N.; NASH, P.; GINGER, M.L.; HORN, M.; SCHAAP, P.; CALER, L. & LOFTUS, B.J. Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.*, 14:R11, 2013.

HAMER, U. & MAKESCHIN, F. Rhizosphere soil microbial community structure and microbial activity in set-aside and intensively managed arable land. *Plant Soil*, 316:57–69, 2009.

IENNE, S.; FRESCHI, L.; VIDOTTO, V.F.; DE SOUZA, T. A.; PURGATTO, E. & ZINGALES, B. Auxin production by the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens* and auxin



homeostasis in infected tomato fruits. *Parasitology*, 1–12, 2014.

JENTSCHKE, G.; BONKOWSKI, M.; GODBOLD, D.L. & SCHEU, S. Soil protozoa and forest tree growth: non-nutritional effects and interaction with mycorrhizae. *Biol. Fertil. Soils*, 20:263–269, 1995.

KORANDA, M.; SCHNECKER, J.; KAISER, C.; FUCHSLUEGER, L.; KITZLER, B.; STANGE, C.F.; SESSITSCH, A.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. & RICHTER, A. Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech - The influence of plant C exudates. *Soil Biol. Biochem.*, 43:551–558, 2011.

KROME, K.; ROSENBERG, K.; BONKOWSKI, M. & SCHEU, S. Grazing of protozoa on rhizosphere bacteria alters growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana*. *Soil Biol. Biochem.*, 41:1866–1873, 2009.

KUZYAKOV, Y. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 165:382–396, 2002.

LASKOWSKI, M.; BILLER, S.; STANLEY, K.; KAJSTURA, T. & PRUSTY, R. Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: Toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol.*, 47:788–792, 2006.

NGUYEN, C. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls Christophe Nguyen To cite this version: Review article Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. 2003.

SOMASUNDARAM, S.; BONKOWSKI, M. & IJIMA, M. Functional Role of Mucilage - Border Cells: A Complex Facilitating Protozoan Effects on Plant Growth. *Plant Prod. Sci.*, 11:344–351, 2008.

VANNESTE, S. & FRIML, J. Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*, 136:1005–1016, 2009.

ZHANG, N.; WANG, D.; LIU, Y.; LI, S.; SHEN, Q. & ZHANG, R. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant Soil*, 374:689–700, 2014.