

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Efeito de Fungos *dark septate* sobre a Eficiência de Aproveitamento de Fontes Nitrogenadas em Arroz e Tomate e Expressão de Isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e Transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em Plantas de Arroz**

**Carlos Vergara Torres Júnior**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**EFEITO DE FUNGOS *DARK SEPTATE* SOBRE A EFICIÊNCIA DE  
APROVEITAMENTO DE FONTES NITROGENADAS EM ARROZ E  
TOMATE E EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE PM H<sup>+</sup>-ATPASE E  
TRANSPORTADORES DE NO<sub>3</sub><sup>-</sup> EM PLANTAS DE ARROZ**

**CARLOS VERGARA TORRES JÚNIOR**

*Sob a Orientação do Pesquisador*

**Jerri Édson Zilli**

*e Co-orientação do Pesquisador e Professor*

**Gustavo Ribeiro Xavier e Leandro Azevedo Santos**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor**, em  
Agronomia, Área de Concentração em  
Ciência do Solo.

Seropédica, R J  
Fevereiro de 2018

T693e

Torres-Júnior, Carlos Vergara, 1984-

Efeito de fungos *dark septate* sobre a eficiência de aproveitamento de fontes nitrogenadas em arroz e tomate e expressão de isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em plantas de arroz / Carlos Vergara Torres Júnior.-2018. 110 f.

Orientador: Jerri Édson Zilli.

Coorientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo, 2018.

1. Dark Septate Endophytic Fungi. 2. Isótopo <sup>15</sup>N. 3. Micronutrientes. 4. ATPases. 5. Colonização DSE. I. Zilli, Jerri Édson, 1974-, orient. II. Xavier, Gustavo Ribeiro, 1973-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Agronomia-Ciência do Solo. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO**

**CARLOS VERGARA TORRES JÚNIOR**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 20/02/2018

---

Jerri Édson Zilli. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

---

Orivaldo José Saggin Júnior. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Márcio dos Reis Martins. Dr. Embrapa Agrobiologia

## DEDICATÓRIA

*Esta Tese é dedicada aos meus pais, aos meus irmãos e à Karla, pelo incentivo, amor e carinho.*

*Será que os sonhos se realizam?*

*Quando criança, sonhava em ser um cientista!*

*Dedico também, às crianças, que sempre sonham, mesmo sem vislumbrarem qualquer tipo de oportunidade.*

## AGRADECIMENTOS

Esta Tese cobre quatro anos de doutorado e mais dois anos de mestrado de acúmulos de idéias e construção de conhecimentos que representam a minha atual formação.

Deixo os meus sinceros agradecimentos registrados aqui, para todas as pessoas, cujas idéias e/ou trabalho transformaram-se nesta Tese.

Meu maior agradecimento devo aos meus **pais, irmãos** e à **Karla**, os quais são o alicerce do meu legado.

Serei sempre grato aos professores da UFRRJ, **Jorge Jacob Neto, Leandro Azevedo Santos** e **Sônia Regina de Souza**; ao professor **André Rodrigues** (UNESP) e à professora **Claudete Santa Catarina** (UENF); aos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Drs. **Jerri Édson Zilli, Gustavo Ribeiro Xavier** e **Segundo Urquiaga**; e aos meus amigos e colaboradores da UFRRJ, **Luiziene Soares Alves** e Drs **Marcus Vinícius Loss Sperandio** e **Osmário José Lima De Araújo** que influenciaram o meu pensamento e estimularam a minha imaginação.

Meu sincero apreço ao **PPGA-CS**, à **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, à **Embrapa Agrobiologia**, à **CAPES** e à **FAPERJ**.

Carlos Vergara Torres Júnior  
Seropédica, fevereiro 2018.

## **BIOGRAFIA**

Carlos Vergara Torres Júnior nasceu na cidade de Maputo, Moçambique, em 07 de Agosto de 1984. Em 2006 recebeu o diploma de Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, em Muzambinho – MG. Chegou à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2007, diplomando-se em Agronomia em 2012 e em Ciências Agrícolas e mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da UFRRJ em 2014, mesmo ano, em que iniciou o doutorado deste mesmo curso de pós-graduação; em 2018, concluindo, na presente data, a Tese, sob a orientação dos Drs. Jerri Édson Zilli, Gustavo Ribeiro Xavier e Leandro Azevedo Santos.

## RESUMO GERAL

TORRES-JÚNIOR, Carlos Vergara. **Efeito de fungos *dark septate* sobre a eficiência de aproveitamento de fontes nitrogenadas em arroz e tomate e expressão de isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em plantas de arroz.** 2018. 110p. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Uma planta colonizada por fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE), pode aproveitar melhor os nutrientes a ela fornecidos, quando a interação mutualista é estabelecida, gerando economia financeira ao produtor. Entretanto, uma série de funções ecológicas dos fungos DSE, ainda precisam ser esclarecidas. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito de fungos endofíticos *dark septate* sobre a eficiência de aproveitamento de fontes nitrogenadas em tomate e arroz, e sobre a expressão das isoformas de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase) e transportadores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em plantas de arroz. Os experimentos para estudar o efeito dos fungos DSE, na recuperação pelas plantas do arroz e tomate do N derivado de diferentes fontes, foram conduzidos em solo não esterilizado, em casa de vegetação, em delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições. Os tratamentos consistiram de plantas de tomate (cv Santa Clara I-5300) inoculadas com os fungos DSE A101, A104 ou A105 ou de plantas de arroz (variedade Piauí) inoculadas com os fungos DSE A101 ou A103 e de plantas deixadas sem inoculação (controle). Vasos contendo amostra de horizonte superficial de um Planossolo Háplico não esterilizado, receberam sulfato de amônio marcado com 1% de átomos de <sup>15</sup>N em excesso ou *Canavalia ensiformis* [L.] finamente triturada enriquecida com 2,15% ou 0,7 átomos de <sup>15</sup>N em excesso, como única fonte de N. Indicadores de crescimento, acúmulo de matéria seca e nutrientes e a eficiência de recuperação de <sup>15</sup>N foram avaliados aos 54 dias após o transplantio e no estágio de maturação do arroz (130 dias após o transplantio) e aos 50 dias após o transplantio de plântulas de tomate. A expressão de transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e isoformas PM H<sup>+</sup>-ATPase e atividade de bombas de H<sup>+</sup> foram também avaliados em plantas de arroz inoculadas com A103, em condições esterilizadas. Em comparação com o controle, as plantas de arroz e tomate foram mais eficientes no aproveitamento de nutrientes, em especial do N derivado da *C. ensiformis*. As plantas de arroz também responderam positivamente à inoculação, sob suplementação com sulfato de amônio, acumulando mais matéria seca e nutrientes em relação ao controle, e quando foram inoculadas com o fungo A103 em ambiente esterilizado, aumentaram a atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase e da H<sup>+</sup>-pirofosfatase vacuolar e abundância de transcritos das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase *OsA5* e *OsA8*. Os fungos A101, A104 e A105 são benéficos para o tomate e os fungos A101 e A103 para o arroz.

**Palavras chave:** *Oryza sativa* [L.]. *Solanum lycopersicum*. Potássio. Níquel. Fungos DSE. Fósforo. *Canavalia ensiformis* [L.]. Ferro. <sup>15</sup>N. Inoculação. H<sup>+</sup>-ATPase. Pirofosfato.

## GENERAL ABSTRACT

TORRES-JÚNIOR, Carlos Vergara. **Effect of dark septate endophytic fungi on the nitrogen recovery efficiency in tomato and rice, and PM H<sup>+</sup>-ATPase isoforms and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters expression in rice plants.** 2018. 110p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A plant colonized by dark septate endophytic (DSE fungi) fungi can better recovery the nutrients provided to it when mutualistic interaction is established, generating financial savings to the farmer. However, several ecological functions of DSE fungi still need to be clarified. The present study aimed to evaluate the effect of dark septate endophytic fungi on the nitrogen recovery efficiency in tomato and rice plants and on the expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase (PM H<sup>+</sup>-ATPase) isoforms and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) transporters in rice plants. The experiments with tomato and rice were conducted in non-sterile greenhouse soil in a randomized complete block design with five replicates. The treatments consisted of tomato (Santa Clara I-5300 variety) or rice (Piauí variety) plants without (control) and inoculated with DSE fungi A101, A104 and A105, and A101 and A103, respectively. Pots containing non-sterile material from the surface horizon of a Fragiudult soil, received ammonium sulfate enriched with 1 atom % <sup>15</sup>N excess or finely ground *Canavalia ensiformis* [L.] enriched with 2.15 or 0.7 atom % <sup>15</sup>N excess as the sole source of N. Growth plant indicators, accumulation of plant dry matter and nutrients, and recovery efficiency of <sup>15</sup>N were evaluated at 54 days after transplanting and at maturity stage of rice plants, and at 50 days after transplanting of tomato seedlings. Expression of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters and PM H<sup>+</sup>-ATPase isoforms and H<sup>+</sup> pumps activity was also evaluated in rice plants inoculated with A103. Compared with control, rice and tomato plants were more proficient in the recovery of nutrients, especially N derived from *C. ensiformis*. Rice plants also responded positively to the inoculation under ammonium sulfate supplementation, accumulating more dry matter and nutrients in relation to the control, and when rice plants were inoculated with the A103 fungus in a sterile environment, activity of PM H<sup>+</sup>-ATPase and of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, and transcripts abundance of PM H<sup>+</sup>-ATPase isoforms *OsA5* and *OsA8* increased. A101, A104 and A105, and A101 and A103 fungi are beneficial for tomato and rice, respectively.

**Keywords:** *Oryza sativa* [L.]. *Solanum lycopersicum*. Potassium. Nickel. DSE fungi. Phosphorus. *Canavalia ensiformis* [L.]. iron. <sup>15</sup>N. Inoculation. Manganese. H<sup>+</sup>-ATPase. Pyrophosphate.

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Indicadores de crescimento de plantas de tomate, aos 50 dias após o transplântio, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate (fungos DSE) e adubadas com a fonte orgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -Canavalia ensiformis [L.] finamente triturada)..... 32
- Tabela 2.** Indicadores de crescimento de plantas de tomate, aos 50 dias após o transplântio, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate (fungos DSE) e adubadas com fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio). ..... 33
- Tabela 3.** Indicadores de crescimento de plantas arroz (variedade Piauí), aos 54 após o transplântio, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate, A101 e A103 e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -Canavalia ensiformis (L.) finamente triturada como a única fonte orgânica de N..... 51
- Tabela 4.** Massa seca de raiz e palha e massa de panículas e grãos cheios (13% de umidade) no estágio de maturação de plantas de arroz da variedade Piauí sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate A101 e A103 e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -Canavalia ensiformis (L.) finamente triturada como a única fonte orgânica de N..... 51
- Tabela 5.** Conteúdo de Ca, Mg, P e K no estágio de maturação de plantas de arroz da variedade Piauí sem (controle) e inoculadas com fungos endofíticos dark septate, A101 e A103, e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -Canavalia ensiformis (L.) finamente triturada como única orgânica de N.55
- Tabela 6.** Indicadores de crescimento de plantas de arroz (variedade Piauí) aos 54 dias após o transplântio. As plantas foram inoculadas com os fungos endofíticos dark septate A101 e A103, ou deixadas sem inoculação, e adubadas com sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  como a única fonte inorgânica de N. .... 71

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Raiz hipotética colonizada pelo fungo micorrízico arbuscular (FMA). (A) A raiz da planta hospedeira sinaliza que está apta a estabelecer a simbiose micorrízica arbuscular com a liberação de estrigolactona que promove a germinação de esporos fúngicos do FMA e estimula a ramificação do seu micélio extrarradicular, e o FMA responde com a produção dos fatores micorrízicos (Fatores Mic: lipo-quito-oligossarídeos e quito-oligossarídeos) que são reconhecidos pela sua planta hospedeira. (B-C) O contato físico entre a superfície da raiz e o FMA permite a formação do hifopódio que leva a proliferação intercelular do micélio intrarradicular nas células do córtex e ao desenvolvimento intracelular de arbúsculos circundados pela membrana periarbuscular derivada da membrana plasmática da célula vegetal. .... 4
- Figura 2.** Via de absorção pela planta e pela micorriza arbuscular. **Símbolos amarelos:** transportadores localizados na epiderme e nos pelos radiculares. **Símbolos vermelhos ou verdes:** transportadores do fungo localizados no micélio extrarradicular. **Símbolos roxos:** transportadores da planta induzidos pela micorriza arbuscular que estão localizados na membrana periarbuscular. .... 6
- Figura 3.** Transporte de N e P através da via de absorção pela micorriza arbuscular. O modelo é baseado em modelos presentes na literatura. Destaca a absorção de P e N pelo micélio extrarradicular (ERM), através dos transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (preto),  $\text{NO}_3^-$  (roxo) ou  $\text{NH}_4^+$  (vermelho); assimilação e concentração de N dentro da  $\text{Arg}^+$  e a conversão de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  em polifosfatos (PolyP<sup>-</sup>); o transporte de  $\text{Arg}^+$  e PolyP<sup>-</sup> do ERM para o micélio intrarradicular (IRM); através da rota catabólica do ciclo da ureia a quebra da  $\text{Arg}^+$  em  $\text{NH}_4^+$  e do PolyP<sup>-</sup> em  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ; efluxo de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (azul),  $\text{NH}_4^+$  (vermelho) para o espaço periarbuscular, e a subsequente absorção de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  pela planta hospedeira, através dos transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  localizados na membrana periarbuscular da planta. (Modelo baseado em BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015; FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; GOVINDARAJULU et al., 2005; JIN et al., 2005; TIAN, C. et al., 2010). R-COO<sup>-</sup>: ânion carboxilato. .... 14
- Figura 4.** Raiz hipotética colonizada pelo fungo endofítico *dark septate* (fungo DSE). A) Ramificação do micélio presente no disco do meio de cultura em direção ao sistema radicular; B) Penetração da hifa no pelo radicular acessando as células do córtex; C) Formação de diversas estruturas do fungo DSE em células do córtex. Hifa septada melanizada e intracelular (**hsmi**); Microescleródios melanizados (**mm**); Microescleródios corados no estágio jovem (**mj**); d) hifa hialina septada e intracelular (**hh**); hifa septada melanizada e intercelular (**hsm**). .... 20
- Figura 5.** Aspectos morfológicos de raízes de tomate (cv Santa Clara I-5300) inoculados com os fungos DSE A101, A104 e A105 aos 50 dias após o transplante. As hifas septadas melanizadas circundam (seta aberta) ou não (seta fechada) as células da epiderme (B, J, M e A, E, F e N, respectivamente) e do córtex (K e C, H e L, respectivamente) e da região entre o córtex e o feixe vascular (D). Estruturas semelhantes aos microscleródios (seta com círculo na base) formadas na epiderme (A, E, F, G, I, J, M e N), no córtex (C, H, K e L) e na região entre córtex e feixe vascular (D) pelos fungos. Vesículas hialinas (seta com base de losango) formadas na epiderme (M) e no córtex (K). As amostras foram coradas com 0,01% de azul de metila, exceto H, que foi obtido a partir de um corte transversal que não foi corado. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . .... 31
- Figura 6.** Quantidade ( $Q^{15}\text{NdF}$ ) e eficiência de recuperação ( $ER^{15}\text{N}$ ) do nitrogênio derivado de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio ou  $^{15}\text{N}$ -Canavalia ensiformis (L.) finamente triturada na parte aérea de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300), com 50 dias após transplante, sem

(controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate A101, A104 e A105 e adubada com fonte inorgânica ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio (a) e (b), respectivamente) ou orgânica (*Canavalia ensiformis* [L.]- $^{15}\text{N}$  finamente triturada, (c) e (d), respectivamente). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ )..... 34

**Figura 7.** Eficiência aparente de recuperação (EAR) de P e K, aos 50 dias após o transplântio, de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate A101, A104 e A105 e adubadas com fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, (a), (b), respectivamente) ou orgânica (*Canavalia ensiformis* [L.]- $^{15}\text{N}$  finamente triturada, (c), (d), respectivamente). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). ..... 35

**Figura 8.** Conteúdo de N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e), Fe (f), Mn (g) e Zn (h) aos 50 dias após o transplântio de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem e com inoculação com fungos endofíticos dark septate A101, A104 e A105 e adubadas com fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ )..... 36

**Figura 9.** Conteúdo de N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e), Fe (f), Mn (g) e Zn (h) aos 50 dias após o transplântio de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem e com inoculação com fungos endofíticos dark septate A101, A104 e A105 e adubadas com fonte orgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* [L.] finamente triturado). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ )..... 37

**Figura 10.** Aspectos morfológicos de raízes de arroz (variedade Piauí) inoculadas com os fungos A101 e A103. Hifas septadas melanizadas (Ponta de seta) nas células da epiderme (A e F) e córtex (G) e na região entre o córtex e os feixes vasculares da raiz principal, conectando duas das suas raízes laterais (L). Microescleródios (seta) formados pelos fungos na epiderme (A-E e G), no córtex (F-J) e na região entre córtex e feixe vascular (K). As amostras foram coradas com 0,002% de azul de metila. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . ..... 49

**Figura 11.** Eficiência de recuperação ( $\text{ER}^{15}\text{N AV}$ ) e quantidade ( $\text{Q}^{15}\text{Nd AV}$ ) do nitrogênio derivado da  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada na parte aérea, aos 54 dias após o transplântio (A e B, respectivamente), e na raiz, palha e grãos no estágio de maturação (C e D, respectivamente) em plantas de arroz da variedade Piauí sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate*, A101 e A103 e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* (L.) finamente triturada como única fonte orgânica de N. Entre os tratamentos, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). Letras sublinhadas (C e D) indicam comparação de  $\text{ER}^{15}\text{N AV}$  e  $\text{Q}^{15}\text{Nd AV}$  na parte aérea (palha + grão) entre os tratamentos. Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=5$ )..... 52

**Figura 12.** Conteúdo de N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e), Fe (f), Mn (g) e Zn (h) aos 54 dias após o transplântio de plantas de arroz (variedade Piauí) sem e com inoculação com

fungos endofíticos *dark septate*, A101 e A103, e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como única fonte de N. Em cada gráfico de barras, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). ..... 54

**Figura 13.** Percentual de colonização de raízes de arroz (A), conteúdo do N (B), proteína bruta (C) e, micronutrientes (D) do grão arroz (variedade Piauí) no estágio de maturação sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* A101 e A103 e, adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como única fonte orgânica de N. Entre os tratamentos, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). Letras sublinhadas (B) indicam comparação do conteúdo de N na parte aérea (palha + grão) entre os tratamentos. A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). ..... 56

**Figura 14.** Aspectos morfológicos de raízes de plantas de arroz (variedade Piauí) inoculada com fungos DSE A101 e A103. Hifa septada melanizada (Ponta de seta) nas células da epiderme (B). Microescleródios (seta) formados pelos fungos na epiderme (A e B) e córtex (C e D). Amostras coradas com 0,002 % de azul de metila. Barra = 20 $\mu\text{m}$ . ..... 70

**Figura 15.** Eficiência de recuperação ( $\text{ER}^{15}\text{N}$ ; a) e quantidade de nitrogênio ( $\text{Q}^{15}\text{NdF}$ ; b) na planta derivado de sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$ , conteúdos de N (c), P (d), K (e), Mg (f), Fe (g), Ca (h), Zn (i) e Mn (j) aos 54 dias após o transplante de plantas de arroz (variedade Piauí). As plantas foram inoculadas com os fungos endofíticos *dark septate* A101 e A103, ou deixadas sem inoculação, e adubadas com sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  como a única fonte inorgânica de N. Entre os tratamentos, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). ..... 72

**Figura 16.** Atividade ao longo do tempo de  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática (a),  $\text{H}^+$ -pirofosfatase vacuolar (b) e  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar (c) e expressão relativa de genes que codificam para transportadores de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (OsNRT2.1 e OsNRT2.2), proteína acessória OsNAR2.1 (OsNAR2.1) (d-f) e isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase (OsA1, OsA2, OsA3, OsA5, OsA7 e OsA8) (g-l) de raízes de plantas de arroz (variedade Piauí aos 41 dias após a germinação). As plantas foram inoculadas com o fungo endofítico *dark septate* A103, ou deixadas sem inoculação (controle) e expostas à 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , 72 h após a privação com nitrogênio. As avaliações foram realizadas às 0 h, 3 h, 6 h, 9 h e 24 h após a adição de 0,2 mM  $\text{NO}_3^-$ . Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=4$ ). \* indica diferenças significativas entre o tratamento de inoculação com A103 e controle não inoculado (Teste t;  $p < 0,05$ ). ..... 74

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Abordagem Geral da Interação Simbiótica Fungo Micorrízico-Planta .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Raízes Micorrízicas Apresentam Duas Vias para a Absorção de Nutrientes .5</b>	
<b>2.3</b>	<b>Genes Induzidos pela Interação Micorríza Arbuscular.....</b>	<b>6</b>
2.3.1	A H <sup>+</sup> -ATPase, HA5, no FMA é induzida pela micorriza arbuscular .....	6
2.3.2	A H <sup>+</sup> -ATPase, HA1, da planta é induzida pela micorriza arbuscular .....	7
2.3.3	Transportadores de H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> no FMA induzidos pela micorriza arbuscular ....	8
<b>2.4</b>	<b>Absorção do N através do ERM e Arbúsculo do FMA .....</b>	<b>9</b>
2.4.1	Cinética de absorção de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> no FMA Glomus intraradices .....	9
2.4.2	Transportadores de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (AMTs) no FMA induzíveis pela micorriza arbuscular	10
2.4.3	Transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (NRTs) no FMA responsivos a micorriza arbuscular	10
<b>2.5</b>	<b>Assimilação de N e Transporte pelo FMA.....</b>	<b>11</b>
2.5.1	Redução de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> no FMA.....	11
2.5.2	Redução de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> no FMA.....	11
2.5.3	Assimilação de N em esqueletos de carbono nos FMA .....	12
2.5.4	Transporte de N a partir do ERM para IRM.....	12
<b>2.6</b>	<b>Transporte de N e P do Espaço Periarbuscular para a Planta .....</b>	<b>15</b>
2.6.1	Transportador de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (AMT) na planta induzido pela MA .....	15
2.6.2	Transportador de H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> da planta, PT4, é induzido pela MA .....	15
<b>2.7</b>	<b>Efeito Conjunto da Nutrição com N e P na Micorriza Arbuscular .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8</b>	<b>Fungos Promotores de Crescimento de Plantas: Eficiência de Aproveitamento de Fontes Nitrogenadas .....</b>	<b>17</b>
2.8.1	Fungos formadores de micorriza arbuscular (FMA) .....	17
2.8.2	<i>Piriformospora indica</i> .....	18
2.8.3	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	18
2.8.4	Fungos endofíticos dark septate (fungos DSE) .....	19
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>22</b>
	<b>FUNGOS DARK SEPTATE AUXILIAM PLANTAS DE TOMATE A ADQUIRIREM NUTRIENTES A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL TRITURADO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.4.1	Coleta do solo, calagem e adubação.....	27
3.4.2	Adubação nitrogenada (fonte inorgânica e orgânica) marcada com <sup>15</sup> N.....	27
3.4.3	Preparo do inóculo e inoculação.....	28
3.4.4	Delineamento experimental e condições de crescimento .....	28
3.4.5	Observações de sintomas de patogenicidade e de colonização de raízes ....	29
3.4.6	Variáveis avaliadas .....	29
3.4.7	Análises estatísticas .....	30
<b>3.5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
3.5.1	Patogenicidade e colonização de raízes.....	31
3.5.2	Efeito da inoculação com fungos DSE sobre o crescimento da planta .....	32
3.5.3	Eficiência de recuperação do <sup>15</sup> N, P e K .....	33
3.5.4	Acúmulo de macro e micronutrientes.....	35

3.6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
3.7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
4	<b>CAPÍTULO II</b> .....	42
	<b>FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE INCREMENTAM A EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DO <sup>15</sup>N-ADUBO VERDE, CONTEÚDO DE N E MICRONUTRIENTES EM PLANTAS DE ARROZ</b> .....	42
4.1	<b>RESUMO</b> .....	43
4.2	<b>ABSTRACT</b> .....	44
4.3	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	45
4.4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
4.4.1	Coleta do solo, calagem e adubação.....	47
4.4.2	Adubação nitrogenada (fonte orgânica de N) marcada com <sup>15</sup> N.....	47
4.4.3	Preparo do inóculo e inoculação.....	47
4.4.4	Delineamento experimental e condições de crescimento .....	47
4.4.5	Observações de sintomas de patogenicidade e de colonização de raízes .....	48
4.4.6	Variáveis avaliadas .....	48
4.4.7	Análises estatísticas .....	48
4.5	<b>RESULTADOS</b> .....	49
4.5.1	Patogenicidade e colonização de raízes.....	49
4.5.2	Indicadores de crescimento e acúmulo de matéria seca .....	50
4.5.3	Eficiência de recuperação de <sup>15</sup> N derivado de <i>C. ensiformis</i> (L.) .....	52
4.5.4	Acúmulo de nutrientes.....	53
4.6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
4.7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
5	<b>CAPÍTULO III</b> .....	61
	<b>FUNGOS ENDOFÍTICOS DARK SEPTATE AUMENTAM A ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS, A EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE <sup>15</sup>N-SULFATO DE AMÔNIO, CONTEÚDO DE N E MICRONUTRIENTES EM PLANTAS DE ARROZ</b> .....	61
5.1	<b>RESUMO</b> .....	62
5.2	<b>ABSTRACT</b> .....	63
5.3	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	64
5.4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
5.4.1	Experimento 1 em solo não esterilizado para avaliar a promoção do crescimento de plantas de arroz.....	67
5.4.1.1	Coleta do solo, calagem e adubação .....	67
5.4.1.2	Adubação nitrogenada (fonte inorgânica de N) marcada com <sup>15</sup> N.....	67
5.4.1.3	Preparo do inóculo e inoculação.....	67
5.4.1.4	Delineamento experimental e condições de crescimento .....	67
5.4.1.5	Variáveis avaliadas .....	67
5.4.2	Experimento 2 para analisar a expressão gênica das isoformas de H <sup>+</sup> -ATPase da membrana plasmática (PM), transportadores NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e a atividade de bombas de H <sup>+</sup>	67
5.4.2.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	68
5.4.2.2	Extração de vesículas da membrana plasmática e avaliação da atividade de bombas de H <sup>+</sup>	69
5.4.3	Observações de sintomas de patogenicidade e de colonização de raízes .....	69
5.4.4	Análises estatísticas .....	69
5.5	<b>RESULTADOS</b> .....	70
5.5.1	Patogenicidade e colonização de raízes.....	70

5.5.2	Crescimento de plantas de arroz inoculadas com fungos DSE .....	70
5.5.3	Eficiência de recuperação de <sup>15</sup> N-sulfato de amônio.....	71
5.5.4	Acúmulo de macro e micronutrientes.....	73
5.5.5	Atividade das bombas de H <sup>+</sup> .....	73
5.5.6	Expressão gênica .....	75
<b>5.6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>5.7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE) são um grupo diverso e cosmopolita de endófitos ascomicetos conidiais ou estéreis. Apresentam hifas septadas melanizadas em sua colônia de cor marrom a mais escura, que colonizam a epiderme e o córtex da planta hospedeira de forma intercelular e intracelular e eventualmente formam microescleródios (aglomerações de hifas lobadas com formato predominantemente esférico) hialinos a melanizados. Estes fungos que pertencem a diferentes ordens do filo Ascomycota (por exemplo, *Capnodiales*, *Eurotiales*, *Helotiales*, *Hypocreales*, *Microascales*, *Pleosporales*, *Sordariales*, *Xylariales*) colonizam mais de 600 espécies vegetais de 320 gêneros e 114 famílias, podendo promover seu crescimento (ANDRADES-LINARES; FRANKEN, 2013; JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998; NEWSHAM, 2011). Na família *Poaceae* e *Solanaceae*, por exemplo, fungos DSE isolados de raízes saudáveis do arroz silvestre (*Oryza granulata* Nees et Arn. ex Watt. e *Oryza glumaepatula* Steud.) e tomate (*Solanum Lycopersicum* [L.]) são capazes de colonizar o arroz (*Oryza Sativa* [L.]) e o tomate comercial e promover seu crescimento, sem, no entanto, desencadear qualquer sintoma de doença (ANDRADE-LINARES, D. R. et al., 2011; ANDRADE-LINARES, DIANA ROCIO et al., 2011; RIBEIRO, 2011; TORRES-JÚNIOR, 2014; YUAN, Z. L. et al., 2010).

O *status* de N de plantas associadas com fungos DSE tem sido o principal alvo de pesquisas geralmente realizadas em condições *in vitro*, onde a interação DSE-planta recebe fontes orgânicas ou inorgânicas de N. Nestas condições, a resposta da planta hospedeira à inoculação com estes fungos é bastante variável e complexa, com efeitos positivos, neutros ou negativos sobre o crescimento e acúmulo de biomassa da planta, e as melhores respostas de promoção de crescimento ocorrem em plantas suplementadas com fontes orgânicas de N (predominantemente aminoácidos) (NEWSHAM, 2011).

Pelo fato de pesquisas com fungos DSE serem relativamente recentes comparativamente a outros estudos envolvendo outros fungos promotores de crescimento (por exemplo fungos micorrízicos arbusculares), ainda há muitas questões a serem esclarecidas na literatura, como por exemplo: (i) A resposta positiva da planta hospedeira à inoculação com estes fungos se reproduz em condições de solo não esterilizado de casa vegetação e de campo?; (ii) Os diferentes efeitos de promoção de crescimento (positivos ou neutros ou negativos) afetam o rendimento do produto colhido na planta hospedeira? e; (iii) Quais são os mecanismos que regulam a absorção de nutrientes quando a interação DSE-planta é estabelecida?

Em estudos prévios com plantas de arroz e tomate inoculadas com fungos DSE, crescidas em condições controladas e suplementadas com nitrato de amônio foram observados incrementos significativos na matéria seca da planta, N-amino, açúcares solúveis, número de perfilhos (plantas de arroz) e alteração dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) da absorção de  $NO_3^-$  (TORRES-JÚNIOR, 2014).

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito de fungos endofíticos *dark septate* sobre a eficiência de aproveitamento de fontes nitrogenadas em tomate e arroz e sobre a expressão das isoformas de  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática (PM  $H^+$ -ATPase) e transportadores de nitrato ( $NO_3^-$ ) em plantas de arroz.

Para atingir este objetivo geral, este estudo foi subdividido em três capítulos contendo os seguintes objetivos específicos:

a) Investigar o efeito da inoculação de fungos DSE (isolados A101, A104 e A105) na eficiência de recuperação e acúmulo nutrientes e crescimento do tomate (S.

*Lycopersicum* [L.] cv. Santa Clara I-5300) adubado com fonte orgânica ( $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* [L.]) ou inorgânica ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio) de N

b) Avaliar o acúmulo de macro e micronutrientes, matéria seca e proteína e a eficiência recuperação do nitrogênio de  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturado pela cultura do arroz inoculada com fungos *dark septate* (isolados A101 e A103);

c) Avaliar (i) os efeitos da inoculação com fungos DSE em plantas de arroz cultivadas em solo arenoso (não esterilizado) contendo o sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  como a fonte de inorgânica de N em casa de vegetação e (ii) contribuir para o entendimento fisiológico e molecular dos mecanismos de promoção de crescimento destes fungos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão tem por objetivo fazer uma abordagem bioquímica, fisiológica e molecular da interação planta-fungo micorrízico; desde absorção do fósforo e nitrogênio pelo micélio extrarradicular até a transferência bidirecional destes nutrientes entre os simbiontes, além de analisar a resposta da planta inoculada com diferentes fungos promotores de crescimento de plantas.

### 2.1 Abordagem Geral da Interação Simbiótica Fungo Micorrízico-Planta

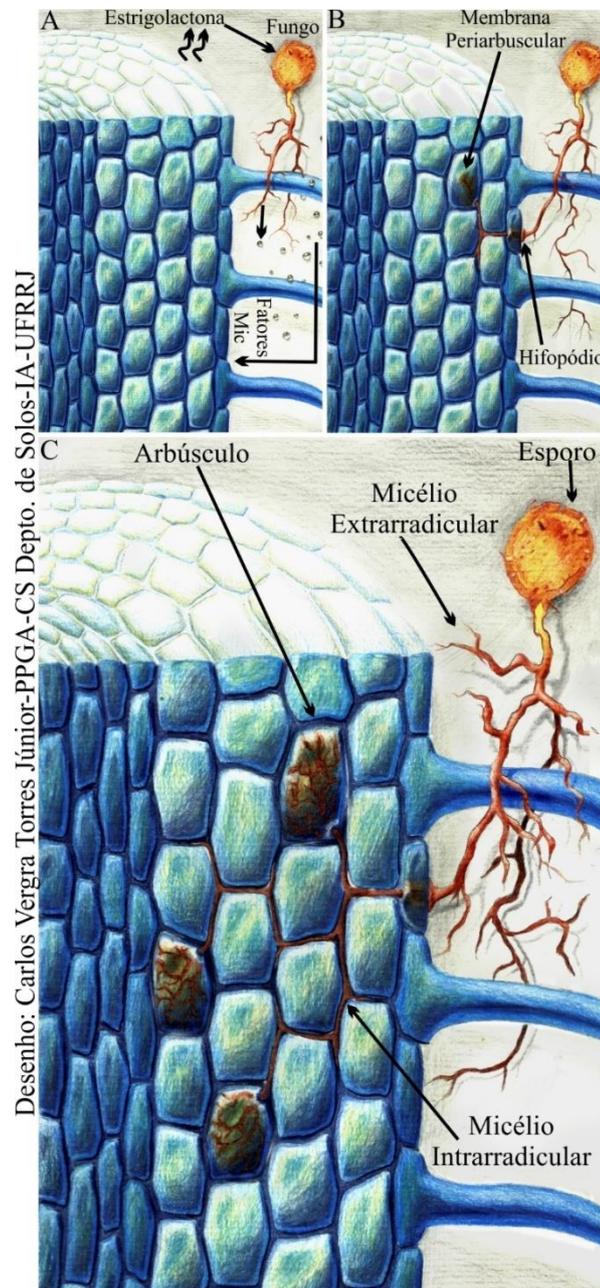
Muitas espécies vegetais estabelecem associações simbióticas com uma série de micro-organismos que podem resultar em interações benéficas para ambos os simbiontes (OLDROYD, 2013). Muitos fungos podem estabelecer interações com plantas, desde interações mutualistas até doenças devastadoras para as culturas. Embora doenças de plantas sejam bem conhecidas e tenham importância econômica, o fato de que não existem ou raramente existem plantas sem infecção fúngica, tanto endofítica quanto micorrízica ainda não é amplamente considerado.

Entre as associações simbióticas envolvendo os fungos, a melhor estudada ocorre entre vegetais e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (OLDROYD, 2013). A micorriza arbuscular (MA) é uma simbiose muito antiga que é formada entre fungos biotróficos obrigatórios do filo Glomeromycota (FMA) e 70-90% das espécies vegetais, mediada por transferência bidirecional de nutrientes entre o hospedeiro e o FMA (SMITH, S. E.; READ, 2008; SMITH, SALLY E.; SMITH, 2012). Acredita-se que esta simbiose tenha facilitado a colonização dos solos por plantas evoluídas do meio aquático há aproximadamente 450 milhões de anos (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000). Deve ser destacado que há outros grupos de fungos que formam simbiose com plantas, como por exemplo: fungos ectomicorrízicos (ECM), *Piriformospora indica*, *Trichoderma* sp e fungos endofíticos *dark septate* (ou fungos DSE). Diferentes dos FMA, estes fungos não são biotróficos obrigatórios.

A troca de sinais químicos entre a planta e os FMA possibilita a formação da MA (BONFANTE; REQUENA, 2011; OLDROYD, 2013). Esta comunicação tem como etapa inicial a liberação de estrigolactona na rizosfera pelas raízes da planta (OLDROYD, 2013) ([Figura 1a](#)). A percepção da estrigolactona promove a germinação de esporos fúngicos e estimula a ramificação da hifa (BONFANTE; GENRE, 2010; HARRISON, MARIA J., 2012; OLDROYD, 2013) ([Figura 1a](#)). Por sua vez, o FMA produz os fatores micorrízicos (Fatores Mic), que incluem lipo-quito-oligossarídeos e quito-oligossarídeos que são reconhecidos pela planta hospedeira e ativam a via de sinalização da simbiose na raiz, levando a oscilações de cálcio (GENRE et al., 2013; MAILLET et al., 2011).

O contato físico entre o FMA e a superfície da raiz permite a formação de estrutura fúngica globosa de infecção, o hifopódio ([Figura 1b](#)), também chamado de apressório (BONFANTE; GENRE, 2010), que tem sua penetração facilitada pelos sinais liberados pela cutina da planta (WANG, E. et al., 2012). Uma vez que as paredes celulares das células da epiderme são violadas, o fungo cresce intercelularmente ou intracelularmente criando invaginações nos citoplasmas e se espalhando através do córtex radicular (BONFANTE; GENRE, 2010). Então, dentro das células do córtex, formam estruturas de hifas altamente enoveladas, denominadas pelotões, ou estruturas de hifas altamente ramificadas, denominadas arbúsculos (HARRISON, MARIA J, 2005; PARNISKE, 2008) ([Figura 1c](#)), os quais exercem a função de haustórios. O desenvolvimento dos arbúsculos é acompanhado pela invaginação da membrana celular da planta, formando a membrana periarbuscular ([Figura 1b](#)), a qual é

distinta da plasmalema (PUMPLIN; HARRISON, 2009). O arbúsculo formará com a membrana periarbuscular uma grande interface de troca de nutriente (BONFANTE; GENRE, 2010; PARNISKE, 2008).



**Figura 1.** Raiz hipotética colonizada pelo fungo micorrízico arbuscular (FMA). (A) A raiz da planta hospedeira sinaliza que está apta a estabelecer a simbiose micorrízica arbuscular com a liberação de estrigolactona que promove a germinação de esporos fúngicos do FMA e estimula a ramificação do seu micélio extrarradicular, e o FMA responde com a produção dos fatores micorrízicos (Fatores Mic: lipo-quito-oligossarídeos e quito-oligossarídeos) que são reconhecidos pela sua planta hospedeira. (B-C) O contato físico entre a superfície da raiz e o FMA permite a formação do hifopódio que leva a proliferação intercelular do micélio intrarradicular nas células do córtex e ao desenvolvimento intracelular de arbúsculos circundados pela membrana periarbuscular derivada da membrana plasmática da célula vegetal.

Com o estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular, ocorrem modificações na expressão de genes da planta e do fungo acompanhadas por mudanças morfológicas e fisiológicas necessárias para a transferência bidirecional de nutrientes entre os simbioses (REQUENA et al., 2003). A absorção de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  é considerada um processo fisiológico chave, pelo qual os FMA promovem o crescimento dos vegetais (BUCHER, M., 2007). Com efeito, os FMA apresentam transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  capazes de absorver esse íon do solo e permitir sua liberação na interface com a planta (HARRISON, MARIA J; VAN BUUREN, 1995). Por outro lado, a planta possui transportadores que são específicos para interface MA, cujo papel é absorver o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  a partir do espaço periarbuscular e liberá-lo no citoplasma da planta (GUETHER et al., 2009). Da mesma forma que acontece para o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , os FMA podem promover o crescimento dos vegetais através da transferência de nitrogênio (N) (GOVINDARAJULU et al., 2005; GUETHER et al., 2009; JIN et al., 2005; SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011), que é também absorvido pelo micélio extrarradicular (ERM) (LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006), e liberado no espaço periarbuscular pelos transportadores localizados no micélio intrarradicular (IRM) (GOVINDARAJULU et al., 2005). Posteriormente, o N é transferido para o citosol pelos transportadores da planta específicos para interface MA (GUETHER et al., 2009).

## 2.2 Raízes Micorrízicas Apresentam Duas Vias para a Absorção de Nutrientes

Um FMA vive em dois ambientes, nas raízes onde recebe o carbono (C) orgânico e no solo onde absorve nutrientes minerais (SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011). O micélio intrarradicular (IRM) cresce num ambiente controlado pela homeostase da planta enquanto que o extrarradicular (ERM) vive sob consideráveis variações ambientais, tais como pH do solo, disponibilidade de nutrientes e umidade do solo (SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011).

A grande vantagem das raízes micorrízicas em relação as não micorrízicas é que as primeiras apresentam duas vias para a absorção de nutrientes ([Figura 2](#)): (i) a via da absorção pela planta (PP) e (ii) a via da absorção pela micorriza arbuscular (MP) (BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015; SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011). A MP envolve a absorção de nutrientes através do ERM, sua rápida translocação, por vezes de muitos centímetros para o IRM, liberação no espaço periarbuscular e transferência para as plantas (BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015; SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011). A membrana periarbuscular, aquela que cerca tanto os arbúsculos quanto hifas intracelulares (PUMPLIN; HARRISON, 2009), contém transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (JAVOT et al., 2007; VOLPE et al., 2016),  $\text{NH}_4^+$  (GUETHER et al., 2009; PEREZ-TIENDA et al., 2014) e  $\text{NO}_3^-$  (DRECHSLER et al., 2017) que são preferencialmente ou especificamente expressos nas raízes micorrízicas, e contém bombas de prótons ( $\text{H}^+$ -ATPases) que energizam o transporte de nutrientes (GIANINAZZI-PEARSON et al., 2000; GIANINAZZI-PEARSON et al., 1991; KRAJINSKI et al., 2014; WANG, E. et al., 2014). Por outro lado, a PP absorve nutrientes da rizosfera através de transportadores que estão localizados na epiderme e nos pelos radiculares (BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015; SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011).



**Figura 2.** Via de absorção pela planta e pela micorriza arbuscular. **Símbolos amarelos:** transportadores localizados na epiderme e nos pelos radiculares. **Símbolos vermelhos ou verdes:** transportadores do fungo localizados no micélio extrarradicular. **Símbolos roxos:** transportadores da planta induzidos pela micorriza arbuscular que estão localizados na membrana periarbuscular.

## 2.3 Genes Induzidos pela Interação Micorriza Arbuscular

### 2.3.1 A $H^+$ -ATPase, HA5, no FMA é induzida pela micorriza arbuscular

As bombas de prótons da membrana plasmática (PM  $H^+$ -ATPases) desempenham um papel chave no estabelecimento do gradiente do potencial eletroquímico de  $H^+$  necessário para a transferência de nutrientes através da membrana plasmática de fungos e plantas (DUBY; BOUTRY, 2009). Análise de dados moleculares demonstram que a maioria dos fungos possui um a dois genes, que codificam para  $H^+$ -ATPases, e que apenas um destes, normalmente, codifica para PM  $H^+$ -ATPase (BALESTRINI et al., 2007; REQUENA et al., 2003). Por exemplo, a levedura de Brewer possui dois genes de  $H^+$ -ATPases (DE KERCHOVE D'EXAERDE; SUPPLY; GOFFEAU, 1996), enquanto *Uromyces viciae-fabae* possui apenas um gene (STRUCK; HAHN; MENDGEN, 1996). No FMA *Glomus mosseae*<sup>1</sup>, a primeira isoforma de  $H^+$ -ATPases a ser descrita foi a GmHA5 (FERROL; BAREA; AZCÓN-AGUILAR, 2000) e, posteriormente, o gene que codifica para a isoforma GmPMA1 (REQUENA et al., 2003). Essas isoformas de  $H^+$ -ATPases têm massa molecular de 105 e 100 kDa, respectivamente, dez hélices transmembrana, com o domínio catalítico incluindo os sítios de fosforilação E1-E2 (REQUENA et al., 2003). O gene *GmPMA1* é expresso em altos níveis no ERM preferencialmente durante a fase do crescimento não simbiótico, com baixos níveis de expressão durante a fase simbiótica (redução de cerca de cinco vezes) (BALESTRINI et al., 2007; REQUENA et al., 2003). Ao contrário, o gene *GmHA5* é pouco expresso durante o crescimento não simbiótico e fortemente induzido (indução de 50 vezes) no IRM e ERM (indução de oito vezes) na fase simbiótica. O acompanhamento das etapas do desenvolvimento do IRM aos 15, 20, 23, e 28 dias após a inoculação com a respectiva expressão de *GmPMA1* e *GmHA5* revelou que embora se observem poucas estruturas fúngicas aos 15 dias (basicamente apenas múltiplos apressórios na epiderme), a expressão de *GmHA5* já é claramente detectável (REQUENA et al., 2003). Com o avanço da infecção, os

<sup>1</sup> Neste texto as espécies de FMA serão designadas por seu Basônimo.

níveis de expressão de *GmHA5* são aumentados e ambos genes passam a apresentar níveis de expressão similar (REQUENA et al., 2003).

O sequenciamento de nova geração, tem permitido a análise do transcriptoma do genoma de FMA e a quantificação dos níveis de transcritos, o que possibilita a confirmação ou revisão de resultados obtidos anteriormente, ou até mesmo o direcionamento de novas pesquisas. Por exemplo, com esta tecnologia foi possível identificar a presença da PM H<sup>+</sup>-ATPase HA5 no genoma de *Gigaspora margarita* (XIE et al., 2016) e outras H<sup>+</sup>-ATPases no genoma *Glomus intraradices* que ainda não foram completamente caracterizadas (TISSERANT, E. et al., 2012; TISSERANT, EMILIE et al., 2013)

### 2.3.2 A H<sup>+</sup>-ATPase, HA1, da planta é induzida pela micorriza arbuscular

A H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase) da superfamília das ATPases do tipo P é a principal bomba de prótons da membrana plasmática de plantas (JANICKA-RUSSAK, 2011). Em muitas espécies vegetais, a PM H<sup>+</sup>-ATPase é codificada por uma família de aproximadamente 12 genes, subdivida em cinco subfamílias (ARANGO et al., 2003; TAIZ et al., 2017). Os genes *MtHA1* de *Medicago truncatula*, *OsA8* (ARANGO et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011) (também conhecido como *OsHA1*) de *Oryza sativa* (L.) e *SIHA8* de *Solanum lycopersicum* (L.), aninhados na subfamília V, são os únicos genes ortólogos de PM H<sup>+</sup>-ATPase exclusivamente expressos em células radiculares que contêm arbúsculos (KRAJINSKI et al., 2014; LIU et al., 2016; WANG, E. et al., 2014). A primeira isoforma da PM H<sup>+</sup>-ATPase diferencialmente expressa em resposta à colonização micorrízica foi descrita em cevada (*Hordeum vulgare*) (MURPHY; LANGRIDGE; SMITH, 1997) e logo em seguida, outras duas isoformas da PM H<sup>+</sup>-ATPase foram identificadas na MA do tabaco (*Nicotiana tabacum*) (GIANINAZZI-PEARSON et al., 2000). Tem sido considerado que estas isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase contribuem para absorção de ânions e outros nutrientes no espaço peri-arbuscular através de um processo ativo que ocorre em simporte com H<sup>+</sup> (KARANDASHOV; BUCHER, 2005).

A expressão do gene *HA1* durante a MA propicia uma colonização adequada do fungo, melhora a absorção do H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> para planta e energiza a membrana peri-arbuscular (WANG, E. et al., 2014). A HA1 energiza a membrana peri-arbuscular de *O. sativa* e de *M. truncatula* para facilitar o transporte de nutrientes, como o H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, mais provavelmente através da ação de OsPT11 e MtPT4 (transportadores de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> de arroz e *M. truncatula*, respectivamente) (VOLPE et al., 2016; WANG, E. et al., 2014).

O período em que o *MtHA1* (exclusivamente expresso em células contendo arbúsculos) e *OsHA1* são fortemente induzidos, entre 28 e 35 dias após a inoculação, é consistente com o tempo de desenvolvimento dos arbúsculos (WANG, E. et al., 2014) e, portanto, com o período em que ocorrem trocas nutricionais entre os simbiossiontes de forma mais intensa. Portanto, espera-se que o gene *SIHA8*, ortólogo de *MtHA1* e *OsHA1*, também seja fortemente induzido em células que contêm arbúsculos e inativado em plantas não colonizadas com fungos micorrízicos cultivadas sob condições normais, ou de estresse nutricional ou salino (LIU et al., 2016).

Como os genes *MtPT4* e *MtHA1* são coexpressos, podem desempenhar funções associadas. De fato, ao reduzir os níveis de expressão de *MtHA1* se observa redução da aquisição do fosfato simbiótico pelas plantas mutantes (WANG, E. et al., 2014). Além disso, os mutantes *mtpt4* e *mtha1-1* exibem o mesmo fenótipo, especialmente a redução do nível de colonização e um vertiginoso decréscimo no número de arbúsculos totalmente desenvolvidos (JAVOT et al., 2007; WANG, E. et al., 2014).

Na MA, a atividade da bomba de H<sup>+</sup> é extremamente dependente de HA1, uma vez que, nem a PM H<sup>+</sup>-ATPase fúngica e nem qualquer outra isoforma da PM H<sup>+</sup>-ATPase da

planta pode compensar um mutante defectivo em *HAI* (KRAJINSKI et al., 2014). Se os níveis de transcritos de *HAI* são aumentados em função da colonização por FMA, portanto, a *HAI* é também responsável pelo gradiente de  $H^+$  (KRAJINSKI et al., 2014) que torna o espaço periarbuscular mais ácido. Há que salientar, entretanto, que o gradiente de  $H^+$  que torna o espaço periarbuscular ácido é formado pelos  $H^+$  da PM  $H^+$ -ATPases da planta, do fungo e dos processos de desprotonação da  $NH_4^+$  (GUETHER et al., 2009).

### 2.3.3 Transportadores de $H_2PO_4^-$ no FMA induzidos pela micorriza arbuscular

O  $H_2PO_4^-$  é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas é frequentemente limitante (HOLFORD, 1997), pois no solo sua concentração está em torno de 10  $\mu M$  (VANCE; UHDE- STONE; ALLAN, 2003). Portanto, o acesso ao  $H_2PO_4^-$  adicional transportado pela MP tem efeito significativo no crescimento e produção da planta (MALDONADO-MENDOZA; DEWBRE; HARRISON, 2001). Estudos com radioisótopos demonstraram que o ERM é responsável pela absorção de  $H_2PO_4^-$ , o qual é posteriormente translocado para IRM e em seguida liberado para planta (JAKOBSEN; ABBOTT; ROBSON, 1992).

Transportadores de  $H_2PO_4^-$  acoplados ao  $H^+$  foram identificados sobre a membrana plasmática dos FMA e na membrana periarbuscular da planta (BENEDETTO et al., 2005; TISSERANT, E. et al., 2012; VOLPE et al., 2016). É sabido que o gradiente de  $H^+$  energiza a membrana para transporte de nutrientes (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007). Observações sobre absorção de  $H_2PO_4^-$  em FMA mostram que estes fungos possuem no sistema de alta afinidade para o transporte de  $H_2PO_4^-$  o  $K_m$  variando entre 1,8-3,1  $\mu M$  e entre 10,2-11,3 mM no sistema de baixa afinidade (THOMSON; CLARKSON; BRAIN, 1990). Este parâmetro cinético apresenta semelhança com a descrição feita recentemente para GigmPT, que funciona como transportador de alta afinidade para o fósforo no ERM de *G. margarita* e em células que contêm arbúsculos, com um  $K_m$  de  $1,8 \pm 0,7 \mu M$  (XIE et al., 2016).

Foi clonado a partir do FMA *Glomus versiforme* um transportador de  $H_2PO_4^-$  de alta afinidade (GvPT;  $K_m = 18 \mu M$ ), (HARRISON, MARIA J; VAN BUUREN, 1995) o qual compartilha semelhanças estruturais e alta similaridade de suas sequências com outro transportador de alta afinidade, que atua em simporte com um  $H^+$ , de *S. cerevisiae* (PHO84) (BUN-YA et al., 1991; TISSERANT, E. et al., 2012) e *N. crassa* (PHO-5) (VERSAW, 1995). Em nível de aminoácidos, GvPT compartilha 47,9% de identidade com PHO84 de *S. cerevisiae*, 45% com PHO5 de *N. crassa* e 95% com o transportador de  $H_2PO_4^-$  de alta afinidade (GiPT) do ERM e IRM de *G. intraradices* (FIORILLI; LANFRANCO; BONFANTE, 2013; HARRISON, MARIA J; VAN BUUREN, 1995; MALDONADO-MENDOZA et al., 2001; TISSERANT, E. et al., 2012). O GiPT compartilha 73% de identidade com transportador de  $H_2PO_4^-$  de alta afinidade (GmosPT) presente no IRM e ERM de *G. mosseae* que atua em simporte com um  $H^+$  (BALESTRINI et al., 2007; BENEDETTO et al., 2005). GvPT, GiPT e GmosPT absorvem o  $H_2PO_4^-$  no solo e apresentam alta similaridade entre si e filogeneticamente se agrupam aos transportadores de fungos, os quais são separados do grupo de transportadores das plantas (BENEDETTO et al., 2005; HARRISON, MARIA J; VAN BUUREN, 1995; MALDONADO-MENDOZA et al., 2001). GmosPT e GvPT são induzidos no ERM por concentrações micromolares de  $H_2PO_4^-$  (BENEDETTO et al., 2005; MALDONADO-MENDOZA et al., 2001). O GmosPT apresentou níveis de expressão similares no ERM e IRM e, portanto, tem sido sugerido que poderia controlar o efluxo de  $H_2PO_4^-$  no espaço periarbuscular através da reabsorção parcial deste nutriente (BALESTRINI; LANFRANCO, 2006; BENEDETTO et al., 2005). A reabsorção de  $H_2PO_4^-$  do espaço periarbuscular, também tem sido atribuída ao GigmPT, pois

a sua inativação retarda o crescimento do fungo e prejudica o desenvolvimento do arbúsculo de *G. margarita* (XIE et al., 2016), o que sugere que o metabolismo do fósforo nos arbúsculos pode depender exclusivamente do  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  absorvido pelo GigmPT.

*Glomus intraradices* é capaz de perceber e responder aos níveis de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  que cercam o seu ERM (MALDONADO-MENDOZA et al., 2001). O gene *GiPT* é expresso no ERM em resposta a condições de baixo  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  no ambiente que envolve o ERM e do *status* de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  na micorriza arbuscular (MALDONADO-MENDOZA et al., 2001). Estes autores detectaram aumentos de transcritos de *GiPT* acompanhado de redução da concentração  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  quando o ERM da micorriza arbuscular *Daucus carota* L. – *G. intraradices* foi exposto a diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (1, 5, 10, 20 e 35  $\mu\text{M}$ ), mas não quando ERM recebeu zero ou 3,5 mM de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , indicando que este transportador opera quando a concentração de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  é baixa no meio externo. Há que salientar que mecanismos moleculares que promovem o efluxo do  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  no IRM, ou seja, nas estruturas fúngicas que estão na raiz, não são ainda amplamente conhecidos (BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015; SMITH, SALLY E.; SMITH, 2011; TISSERANT, E. et al., 2012).

## 2.4 Absorção do N através do ERM e Arbúsculo do FMA

### 2.4.1 Cinética de absorção de $\text{NH}_4^+$ no FMA *Glomus intraradices*

A absorção de  $\text{NH}_4^+$  pelo ERM de *G. intraradices* é mediada pelos sistemas de transporte de baixa (LATS) e alta (HATS) afinidade (PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012). Os dois sistemas de transporte de  $\text{NH}_4^+$  do *G. intraradices* são dependentes da energia metabólica e do gradiente do potencial eletroquímico de  $\text{H}^+$ , gerado pelas PM  $\text{H}^+$ -ATPases (FERROL et al., 2000; PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012; REQUENA et al., 2003). De fato, os HATS e, pouco menos, os LATS foram inibidos por carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e inibidor da síntese de ATP, 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) (PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012). Efeitos inibitórios similares de CCCP e 2,4-DNP foram demonstrados para a absorção de  $\text{NH}_4^+$  em outros fungos, como *Paxillus involutus* (JAVELLE et al., 1999).

Nas concentrações menores que 1 mM de  $\text{NH}_4^+$ , a absorção de amônio é mediada pelo sistema de transporte saturável de alta afinidade, HATS, com  $K_m$  de  $2,53 \pm 0,25 \mu\text{M}$ , indicando que o ERM pode absorver quantidades suficientes de N no solo a partir de concentrações muito baixas de N (PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012). O HATS para o  $\text{NH}_4^+$  tem sido relatado em outros fungos, tais como *Laccaria bicolor* ( $K_m = 6 \mu\text{M}$ ; JONGBLOED; CLEMENT; BORST-PAUWELS, 1991), *S. cerevisiae* ( $K_m = 1-10 \mu\text{M}$ ; MARINI, A M et al., 1997; MARINI, A. M. et al., 1994) e *Agaricus bisporus* ( $K_m = 3,7 \mu\text{M}$ ; KERSTEN et al., 1999). No HATS do *G. intraradices* certamente há a contribuição do GintAMT1 (transportador de  $\text{NH}_4^+$  de alta afinidade do ERM do *Glomus intraradices*) pois o seu  $K_m$  aparente é  $26 \mu\text{M}$  e com dependência à atividade de  $\text{H}^+$ -ATPase, característica do transportador de  $\text{NH}_4^+$  de alta afinidade. Interessante é que o HATS do *G. intraradices* tem cinco vezes mais afinidade pelo  $\text{NH}_4^+$  do que o HATS das plantas, o que permitiria aos FMA absorverem o  $\text{NH}_4^+$  no solo mesmo sob baixas concentrações (PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012). Nas plantas, os valores de  $K_m$  do HATS para  $\text{NH}_4^+$  são tipicamente mais altos do que os valores de  $K_m$  do HATS nos fungos (D'APUZZO et al., 2004; HOWITT; UDVARDI, 2000; PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012). Nas concentrações maiores que 1 mM, a taxa de absorção do ERM do *G. intraradices* é diretamente proporcional as concentrações de  $^{15}\text{NH}_4^+$  no meio externo, indicando a ação dos não saturáveis LATS que atualmente possuem apenas um representante, o GintAMT3, também do *G. intraradices* (CALABRESE et al., 2016).

#### 2.4.2 Transportadores de $\text{NH}_4^+$ (AMTs) no FMA induzíveis pela micorriza arbuscular

FMA podem absorver e transportar grandes quantidades de N para as plantas (JIN et al., 2005; WANG, Y. et al., 2017). Em *G. intraradices*, três genes de transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (AMTs), *GintAMT1* (LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006), *GintAMT2* (PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011) e *GintAMT3* (CALABRESE et al., 2016) já foram clonados e caracterizados. *GintAMT1*, *GintAMT2* e *GintAMT3* codificam cadeias polipeptídicas de 479, 471 e 454 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e constituem 11 domínios transmembrana (CALABRESE et al., 2016; LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006; PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011). Os transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (AMT), *GintAMT1* e *GintAMT2*, compartilham alta similaridade com AMTs de outros fungos anteriormente caracterizados e possuem 50kDa de massa molecular (LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006; PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011). *GintAMT2* é parálogo do *GintAMT3* (CALABRESE et al., 2016) e mostra alta similaridade com os AMTs funcionalmente caracterizados, tais como *GintAMT1* de *G. intraradices* (LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006), *HcAMT1* e *TbAMT1* de fungos ectomicorrizícos (ECM) *Hebeloma cylindrosporum* (JAVELLE et al., 2001) e *Tuber borchii* (MONTANINI et al., 2002), respectivamente. A expressão heteróloga de *GintAMT1*, *GintAMT2* e *GintAMT3* em levedura mutante (defectiva em *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*) complementa o defeito da estirpe para crescer na presença de menos do que 1 mM de  $\text{NH}_4^+$ , o que indica que são três transportadores funcionais de  $\text{NH}_4^+$  (CALABRESE et al., 2016; LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006; PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011). *GintAMT1* é induzido pelo  $\text{NH}_4^+$  e preferencialmente expresso no ERM (LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006; PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011). *GintAMT1* e *GintAMT2* são transportadores de alta afinidade envolvidos com absorção de  $\text{NH}_4^+$  presente em baixas concentrações (LÓPEZ-PEDROSA et al., 2006; PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011). Ao contrário do *GintAMT1*, *GintAMT2* é preferencialmente expresso no IRM e não é induzido pelo seu substrato. Estes dois transportadores são expressos em células contendo arbúsculos (PÉREZ-TIENDA, JACOB et al., 2011), o que indica que podem controlar o efluxo de N no espaço peri-arbuscular através da absorção deste elemento (BAPAUME; REINHARDT, 2012). *GintAMT3* localizado na membrana plasmática e vacuolar, é um transportador de baixa afinidade que é mais expresso no IRM do que no ERM (CALABRESE et al., 2016), o que confirma que a absorção de  $\text{NH}_4^+$  pelo ERM de *G. intraradices* é também mediada pelo sistema de baixa afinidade (PÉREZ-TIENDA, J. et al., 2012). A presença deste transportador no IRM sugere que o FMA pode apresentar um mecanismo para retirada de um eventual excesso de  $\text{NH}_4^+$  acumulado no espaço peri-arbuscular e o compartimentalizar em vacúolos por exemplo, e neutralizar um eventual efeito fitotóxico deste nutriente na planta hospedeira.

#### 2.4.3 Transportadores de $\text{NO}_3^-$ (NRTs) no FMA responsivos a micorriza arbuscular

Os FMA absorvem  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ; mas uma clara preferência por  $\text{NH}_4^+$  tem sido demonstrada, o que pode ser explicado, em parte, pelo fato de parte da energia do fungo ser dissipada durante a redução do  $\text{NO}_3^-$  para  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado em compostos orgânicos (GACHOMO et al., 2009; MARZLUF, 1996). Por outro lado, excesso de  $\text{NH}_4^+$  é tóxico a menos que seja rapidamente assimilado em compostos orgânicos (TEMPLE; VANCE; STEPHEN GANTT, 1998).

Os transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (NRTs) do FMA ainda não foram completamente caracterizados, porém estudos de transcriptoma tem revelado a existência de vários NRTs no esporo, ERM e IRM do FMA *G. intraradices* (TISSERANT, E. et al., 2012; TISSERANT, EMILIE et al., 2013). Um provável transportador de alta afinidade de *G. intraradices*, *GiNT*,

é induzido pelo suprimento de  $\text{NO}_3^-$  no ERM (KOEGL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010).

Com base em mudanças de pH provocadas pelo ERM quando a hifa é suplementada com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , tem sido proposto que a absorção de  $\text{NO}_3^-$  pela hifa seja um processo ativo que ocorre em simporte com  $\text{H}^+$ , enquanto a absorção de  $\text{NH}_4^+$  opera em antiporte com efluxo de  $\text{H}^+$  (BAGO et al., 1996).

## 2.5 Assimilação de N e Transporte pelo FMA

### 2.5.1 Redução de $\text{NO}_3^-$ no FMA

Após absorção pela planta ou pelo fungo, o  $\text{NO}_3^-$  é reduzido pela nitrato redutase (NR) a  $\text{NO}_2^-$ . Estudos de transcriptoma tem revelado a existência de vários NRs no esporo, ERM e IRM do FMA *G. intraradices* (TISSERANT, E. et al., 2012; TISSERANT, EMILIE et al., 2013). Os genes *GiNR1* e *GiNR2* que codificam para a NR são induzidos no ERM em MA de *G. intraradices* – *Sorghum bicolor* (L.) Moench sob privação de N ou suplementação de ureia (KOEGL, SALLY et al., 2015). Estes mesmos genes mais o gene *GiNR3* também são induzidas no IRM quando o ERM é suprido com glicina como a única fonte de N (KOEGL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010), o que sugere que a NR do FMA pode atuar também de forma complementar na nutrição nitrogenada da planta hospedeira, reduzindo o  $\text{NO}_3^-$  remobilizado dos vacúolos para fornecer mais  $\text{NH}_4^+$  para planta hospedeira.

Os fungos utilizam preferencialmente a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como poder redutor para formação de  $\text{NO}_2^-$  (KALDORF; SCHMELZER; BOTHE, 1998; TISSERANT, EMILIE et al., 2013). Por exemplo, a formação de  $\text{NO}_2^-$  catalisada pela NR foi principalmente NADPH dependente nas raízes de plantas colonizadas por FMA, mas não no controle (KALDORF et al., 1998). A atividade da NR em raízes (BABITA RANI et al., 2017; HAWKINS; GEORGE, 1999; SUBRAMANIAN; CHAREST, 1998) e parte aérea (BABITA RANI et al., 2017; FAURE et al., 1998; HAJONG; KUMARIA; TANDON, 2013) da planta colonizada por FMA é geralmente mais alta do que no controle não colonizado. Nas plantas não colonizadas por FMA, a redução de  $\text{NO}_3^-$  é realizada principalmente nas folhas, enquanto nas plantas colonizadas o  $\text{NO}_3^-$  é predominantemente reduzido nas raízes (KALDORF et al., 1998; VÁZQUEZ; BAREA; AZCÓN, 2001).

### 2.5.2 Redução de $\text{NO}_2^-$ no FMA

A segunda etapa da assimilação de N é a conversão da  $\text{NO}_2^-$  para  $\text{NH}_4^+$  pela nitrito redutase (NiR). Gene que codifica para uma NiR do FMA *G. intraradices*, predita por software, mostra a expressão desta enzima no esporo, ERM e IRM (TISSERANT, E. et al., 2012; TISSERANT, EMILIE et al., 2013). A expressão de *TbNiR1*, um gene que codifica para NiR do ECM *T. borchii*, é induzida pelo  $\text{NO}_3^-$ , mas reprimida quando as fontes de N mais preferidas, tais como  $\text{NH}_4^+$  ou glutamina (gln) se tornam disponíveis (GUESCINI et al., 2007).

Tem sido demonstrado em ECM que a atividade da NiR fúngica controla a expressão do gene que codifica para NiR na planta. Quando a planta é colonizada pelo fungo *wild type*, a expressão da NiR da planta é reprimida, mas a expressão aumenta em raízes colonizadas pelo fungo com NiR fúngica defectiva (BAILLY et al., 2007). De fato, em raízes colonizadas por fungos micorrízicos, os níveis de transcritos da NiR são mais baixos do que em raízes de plantas controle não colonizadas (HILDEBRANDT, ULRICH; SCHMELZER, ELMON; BOTHE, HERMANN, 2002; KALDORF et al., 1998), o que sugere que a expressão da NiR

da planta é reprimida pela transferência de composto reduzidos de N do fungo para a planta hospedeira (BAILLY et al., 2007).

### 2.5.3 Assimilação de N em esqueletos de carbono nos FMA

Normalmente, o  $\text{NH}_4^+$  absorvido pelo ERM é assimilado pela via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) (KOEGL, SALLY et al., 2015). Na via GS-GOGAT, a glutamina (Gln) é produzida a partir do Glu e  $\text{NH}_4^+$  pela glutamina sintetase, e em seguida a Gln e 2-oxoglutarato são convertidos pela glutamato sintase (também conhecida como glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase) em duas moléculas de Glu (FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; TIAN, C. et al., 2010)

Duas diferentes isoformas funcionais de GS de *G. intraradices*, GiGS1 e GiGS2 e uma de GOGAT, GiGluS (KOEGL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010) foram identificadas. GiGS1 tem  $K_m$  menor do que GiGS2, e é expressa constitutivamente em altos níveis no ERM, enquanto GiGS2 é fortemente induzida pela adição de  $\text{NO}_3^-$  ao ERM, o que indica que GiGS1 é a principal enzima funcional para assimilação de N em baixas concentrações e que GiGS2 pode desempenhar uma função mais expressiva na assimilação de N em condições de alto suprimento (GOMEZ et al., 2009; KOEGL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010). Independente da fonte de N, GiGluS é mais expressa no ERM do que no IRM (KOEGL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010). Corroborando a via GS-GOGAT, Gln torna-se fortemente marcado quando o  $^{15}\text{N-NH}_4^+$  é suplementado ao FMA e representa um dos maiores drenos de N (CLIQUET; STEWART, 1993; GACHOMO et al., 2009; JIN et al., 2005). Gln desempenha uma função central no metabolismo de N, sendo doador de N, precursor para muitos metabólitos essenciais como ácidos nucleicos, aminoácidos como histidina, tirosina e asparagina e, regulador de genes envolvidos no metabolismo de N (JAVELLE et al., 2003; MARZLUF, 1996; NAVARRO et al., 2006). Devido a estas funções importantes, os níveis de Gln livres em FMA são rigidamente controlados (GACHOMO et al., 2009).

### 2.5.4 Transporte de N a partir do ERM para IRM

O N absorvido pelo ERM é rapidamente transformado em aminoácidos, principalmente arginina ( $\text{Arg}^+$ ) que é acumulada em altas concentrações no ERM (CRUZ et al., 2007; GOVINDARAJULU et al., 2005; TIAN, C. et al., 2010). Assimilação de  $\text{NO}_3^-$  (GOVINDARAJULU et al., 2005; TIAN, C. et al., 2010) ou  $\text{NH}_4^+$  marcado com  $^{15}\text{N}$  (CRUZ et al., 2007; GOVINDARAJULU et al., 2005) indica que a  $\text{Arg}^+$  é a principal forma de N transportada a partir do ERM para o IRM. Por exemplo, no ERM foram observadas maiores concentrações de  $\text{Arg}^+$  em relação aos tecidos de raízes colonizadas e não colonizadas com FMA (JIN et al., 2005).  $\text{Arg}^+$  é o mais abundante aminoácido livre e pode representar mais que 90% dos aminoácidos livres no ERM (CALABRESE et al., 2016). Níveis de  $\text{Arg}^+$  acima de 200 nM  $\text{mg}^{-1}$  de peso seco foram relatados em ERM (JIN et al., 2005). Devido à baixa razão C/N, 6:4,  $\text{Arg}^+$  desempenha importante papel no armazenamento e transferência de N do ERM para IRM (CRUZ et al., 2007; GOVINDARAJULU et al., 2005; JIN et al., 2005).

No IRM ocorre a quebra da  $\text{Arg}^+$  através da rota catabólica do ciclo da ureia, que libera o  $\text{NH}_4^+$  e esqueleto de carbono (CRUZ et al., 2007; KOEGL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010; TISSERANT, E. et al., 2012). Enquanto o esqueleto de carbono fica retido no fungo, o  $\text{NH}_4^+$  é transferido para as células da planta hospedeira. Por exemplo, os aminoácidos das proteínas de raízes colonizadas não foram detectavelmente marcados com  $^{13}\text{C}$  mesmo com grandes quantidades de N sendo transferidas do fungo para a planta hospedeira, o que mostra, portanto, que os aminoácidos foram translocados para IRM,

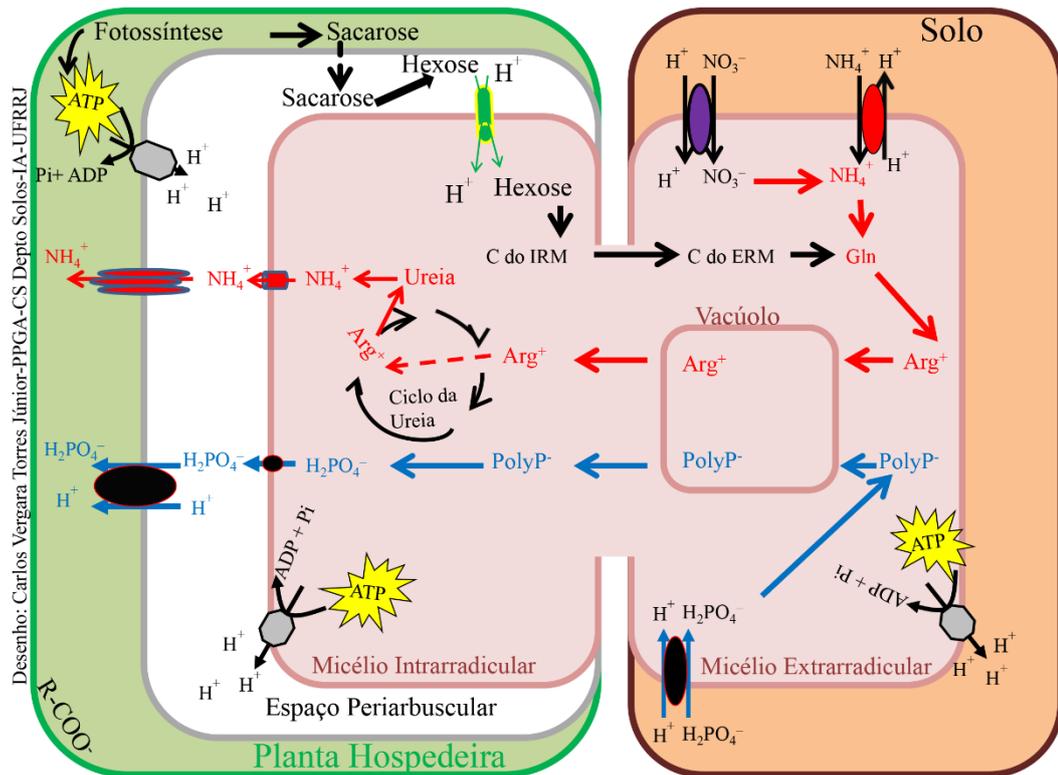
quebrados e N inorgânico transferido para espaço periarbuscular (GOVINDARAJULU et al., 2005). Além disso, a forte marcação por  $^{15}\text{N}$  observada em aminoácidos livres e aminoácidos obtidos por hidrólises de proteínas de raízes colonizadas, demonstra a translocação e a transferência de N do ERM para as células da planta hospedeira (GOVINDARAJULU et al., 2005).

Estudos de expressão gênica são consistentes com relação a biossíntese de  $\text{Arg}^+$  no ERM. Logo após o suprimento com  $\text{NO}_3^-$  ou com outras fontes de N, o nível de transcritos da carbamoil fosfato sintetase (CPS), argininosuccinato sintase (ASS), e argininosuccinato liase (AL) são induzidos no ERM (FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; KOEGEL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010; TISSERANT, E. et al., 2012). Todas estas enzimas estão envolvidas na biossíntese da  $\text{Arg}^+$ ; CPS catalisa a formação de carbamoil-fosfato a partir de  $\text{CO}_2$ , ATP e  $\text{NH}_3$ , que juntamente com ornitina (sintetizada a partir do Glu) são convertidos a citrulina e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  pela ornitina transcarbamilase (OTC) (CRUZ et al., 2007; KOEGEL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010; TISSERANT, E. et al., 2012). Citrulina e aspartato são convertidos em argininosuccinato (AS) pela ASS, e AL converte argininosuccinato a fumarato e  $\text{Arg}^+$  (JENNINGS, 1995; TIAN, C. et al., 2010; TISSERANT, E. et al., 2012). Ao contrário, no IRM, arginase fúngica (CAR1), urease (URE) (hidrolisa a ureia em  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{CO}_2$ ) e ornitina aminotransferase (AOT) são fortemente induzidas para participarem do catabolismo da  $\text{Arg}^+$  (CRUZ et al., 2007; KOEGEL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010; TISSERANT, E. et al., 2012). A biossíntese de  $\text{Arg}^+$  no ERM e a subsequente quebra de  $\text{Arg}^+$  no IRM são processos espacialmente separados, mas com sincronismo, que ocorrem num FMA, através da rota anabólica e catabólica do ciclo da ureia, respectivamente (CRUZ et al., 2007; TIAN, C. et al., 2010). A sincronização destes processos sugere que a  $\text{Arg}^+$  desempenha um papel importante na translocação de N do ERM para IRM (CRUZ et al., 2007; GOVINDARAJULU et al., 2005; JIN et al., 2005; TIAN, C. et al., 2010).

Tanto a planta hospedeira como o FMA conseguem monitorar e discriminar entre diversos parceiros, aquela que é mais fiel nas trocas nutricionais, o qual passa a ser recompensado com mais carbono ou mais nutrientes minerais (BÜCKING, HEIKE; SHACHAR-HILL, 2005; FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; FELLBAUM, CARL R. et al., 2014; HAMMER et al., 2011; KIERS et al., 2011). Um aumento na oferta de C pela planta leva a maior indução de genes envolvidos com a assimilação de N (*GluS*, *GSI*, *GS2*) e a biossíntese da  $\text{Arg}^+$  (CPS, ASS, AL), mas com baixa indução da URE, CAR1 e NRTs no ERM, (FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; FELLBAUM, CARL R. et al., 2014), o que reduz o catabolismo, estimula a biossíntese e a transferência de  $\text{Arg}^+$  do ERM para IRM. Ao contrário, no IRM, um aumento da URE e CAR1, AOT1 e AOT2 e baixa indução dos genes envolvidos com biossíntese de  $\text{Arg}^+$  são observados, o que favorece o catabolismo de  $\text{Arg}^+$  e previne a reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  liberado no IRM (CRUZ et al., 2007; FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; KOEGEL, SALLY et al., 2015; TIAN, C. et al., 2010). Isto demonstra que a planta hospedeira é capaz de regular a expressão gênica do fungo com a oferta de C e estimular o transporte de N em direção ao espaço periarbuscular (FELLBAUM, CARL R. et al., 2012).

O FMA regula o transporte de nutriente para a planta hospedeira pela acumulação ou remobilização de  $\text{PolyP}^-$  e  $\text{Arg}^+$  no IRM e em função da quantidade de carbono oferecida pela planta hospedeira, o que pode reduzir (em condição de baixo suprimento de carbono) ou estimular (em condição de alto suprimento de carbono) a quebra a  $\text{PolyP}^-$  e  $\text{Arg}^+$  para liberação  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no espaço periarbuscular (BÜCKING, H.; HEYSER, 2003; BÜCKING, HEIKE; SHACHAR-HILL, 2005; FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; KIERS et al., 2011).

Um modelo de absorção de N e P pela via de absorção pela micorriza arbuscular (MP), transporte e liberação destes nutrientes no espaço periarbuscular e associação com C está representado na [Figura 3](#): (i) o ERM absorve o P e N inorgânico pelos transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  energizados pela PM  $\text{H}^+$ -ATPase; (ii) enquanto o N é assimilado e concentrado principalmente sob a forma de  $\text{Arg}^+$  pela via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT), asparagina sintetase e a rota anabólica do ciclo da ureia, o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  é convertido em  $\text{PolyP}^-$  no ERM; (iii) ainda no ERM, a  $\text{Arg}^+$  é transportada para o vacúolo fúngico, onde se liga ao  $\text{PolyP}^-$ ; (iv) a  $\text{Arg}^+$  e o  $\text{PolyP}^-$  são transportados do ERM para o IRM; (v) no IRM, a  $\text{Arg}^+$  (através da rota catabólica do ciclo da ureia) e o  $\text{PolyP}^-$  são hidrolisados para liberação de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ; (vi) o efluxo de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  é dirigido ao espaço periarbuscular; (viii) a partir do espaço periarbuscular, a planta hospedeira absorve o P e N através de transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{H}^+$ -ATPase localizados na membrana periarbuscular e induzíveis pela micorriza arbuscular; (ix) o P e N absorvidos, estimulam a fotossíntese e a liberação de sacarose em direção ao espaço periarbuscular; (x) no espaço periarbuscular ocorre a hidrólise da sacarose através das invertases ácidas da planta hospedeira e absorção de hexoses através dos transportadores de monossacarídeos localizados na membrana plasmática do IRM.



**Figura 3.** Transporte de N e P através da via de absorção pela micorriza arbuscular. O modelo é baseado em modelos presentes na literatura. Destaca a absorção de P e N pelo micélio extrarradicual (ERM), através dos transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (preto),  $\text{NO}_3^-$  (roxo) ou  $\text{NH}_4^+$  (vermelho); assimilação e concentração de N dentro da  $\text{Arg}^+$  e a conversão de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  em polifosfatos ( $\text{PolyP}^-$ ); o transporte de  $\text{Arg}^+$  e  $\text{PolyP}^-$  do ERM para o micélio intrarradicual (IRM); através da rota catabólica do ciclo da ureia a quebra da  $\text{Arg}^+$  em  $\text{NH}_4^+$  e do  $\text{PolyP}^-$  em  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ; efluxo de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (azul),  $\text{NH}_4^+$  (vermelho) para o espaço periarbuscular, e a subsequente absorção de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  pela planta hospedeira, através dos transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{NH}_4^+$  localizados na membrana periarbuscular da planta. (Modelo baseado em BÜCKING, HEIKE; KAFLE,

2015; FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; GOVINDARAJULU et al., 2005; JIN et al., 2005; TIAN, C. et al., 2010). R-COO<sup>-</sup>: ânion carboxilato.

## 2.6 Transporte de N e P do Espaço Periarbuscular para a Planta

### 2.6.1 Transportador de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (AMT) na planta induzido pela MA

A MA induz a expressão de alguns AMTs de plantas como LjAMT2;2 em *Lotus Japonicus* (GUETHER et al., 2009), GmAMT1.4; GmAMT3.1, GmAMT4.1 (mais fortemente induzido), GmAMT4.3 e GmAMT4.4 na soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (KOBAE et al., 2010), OsAMT3.1 no arroz (PEREZ-TIENDA et al., 2014) e seus homólogos, SbAMT3;1 e SbAMT4 no sorgo (*S. bicolor*) (KOEGL, S. et al., 2013). Quatro membros da família de transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/transportadores de peptídeos (NPF2.2/PTR2, NPF1.3, NPF6.4 e NPF4.12) que transportam NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, peptídeos, aminoácidos e fitormônios (auxina, ácido abscísico e jasmônico) também são induzidos pela MA (DRECHSLER et al., 2017).

O gene *LjAMT2;2* ortólogo de *GmAMT4.1* e o *SbAMT3;1* ortólogo de *OsAMT3.1* pertencentes à subfamília AMT2 e AMT3, respectivamente, codificam para AMTs de alta afinidade e estão localizados em células que contêm arbúsculos (GUETHER et al., 2009; KOBAE et al., 2010; KOEGL, S. et al., 2013). O GmAMT4.1 está localizado em ramificações da membrana periarbuscular, mas não na região do tronco do arbúsculo, o que indica que de fato a transferência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ocorre nas ramificações do arbúsculo (KOBAE et al., 2010). A expressão heteróloga de LjAMT2;2, GmAMT4.1 e SbAMT3;1 e SbAMT4 em levedura mutante (defectiva em MEP1, MEP2 e MEP3) complementa o defeito da estirpe para crescer na presença de 3 mM, 1,5 mM e 1 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, respectivamente, o que indica que são transportadores funcionais de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (GUETHER et al., 2009; KOBAE et al., 2010; KOEGL, S. et al., 2013). O AMT LjAMT2;2 é pH dependente, com altas taxas de absorção em pH ácido, que recruta o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no espaço periarbuscular, o desprotona (retira um próton) antes do seu transporte pela membrana e, libera a NH<sub>3</sub> no citoplasma da planta (GUETHER et al., 2009; LAMOUREUX et al., 2010).

Recentemente, dois AMTs de *M. truncatula* (AMT2;3 e AMT2;4) foram identificados como tendo um papel no ciclo dos arbúsculos (BREUILLIN-SESSOMS et al., 2015). Arbúsculos são prematuramente degradados em mutantes *mtp4*, onde PT4 (transportador de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> da planta induzível pela micorriza) não é expresso, o que é crítico para absorção de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> no espaço periarbuscular. Esta prematura degradação de arbúsculos é reprimida pela expressão de AMT2;3 quando a planta cresce sob estresse de N, mas não pelo AMT2;4. Entretanto, apenas AMT2;4 foi um transportador funcional, tendo sido capaz de auxiliar o crescimento da levedura mutante no ensaio de complementação de levedura (BREUILLIN-SESSOMS et al., 2015). Isto sugere que AMT2;3 e AMT2;4 diferem na sua função e que AMT2;3 poderia desempenhar uma função mais sensível ou de sinalização que não está presente em outros AMTs (BREUILLIN-SESSOMS et al., 2015). Tem sido proposto que alguns transportadores de nutrientes induzíveis pela micorriza que estão localizados na membrana periarbuscular poderiam atuar como transceptores (XIE et al., 2013).

### 2.6.2 Transportador de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> da planta, PT4, é induzido pela MA

A micorriza arbuscular induz a expressão de alguns transportadores de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> em plantas como MtPT4 (JAVOT et al., 2007) em *M. truncatula*, OsPT11 em *Oryza Sativa* (L.) (PASZKOWSKI et al., 2002) e AsPT1 em *Astragalus sinicus* (XIE et al., 2013). Esses

transportadores estão localizados em um domínio específico da membrana periarbuscular e permitem que a planta tenha acesso ao  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  liberado pelo micélio intrarradicular (IRM) através da energia do gradiente do potencial eletroquímico gerado pelas  $\text{H}^+$ -ATPases (KRAJINSKI et al., 2014; WANG, E. et al., 2014). O MtPT4 mostra alta atividade para transportar  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  em condições ácidas (HARRISON, MARIA J; DEWBRE; LIU, 2002). LjPT4, um transportador encontrado em *L. japonicus* (VOLPE; DELL'AGLIO; BONFANTE, 2013), e MtPT4 são transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  da família PHT1 induzíveis pela MA (HARRISON, MARIA J et al., 2002; VOLPE et al., 2016). Por exemplo, a partir da fusão do promotor do gene *LjPT4* com *Uida*, um gene repórter que codifica a enzima fluorescente  $\beta$ -glucuronidase (GUS), se observou que a atividade da GUS esteve concentrada em células que contêm arbúsculos, confirmando que o transportador LjPT4 é induzível pela MA (VOLPE et al., 2016). O LjPT4 é fundamental para o desenvolvimento de uma simbiose funcional e para assegurar a transferência de fosfato do fungo para planta (VOLPE et al., 2016). As células que contêm os arbúsculos precisam do LjTP4 para sinalizar uma formação adequada do arbúsculo no lado do fungo e para melhorar absorção do fosfato do lado da planta (VOLPE et al., 2016). Se esse transportador é expresso em baixos níveis, as estruturas do fungo apresentarão fenótipo anormal, com arbúsculos pequenos e apresentando tronco principal inchado e pouco ramificado (JAVOT et al., 2007; KRAJINSKI et al., 2014; WANG, E. et al., 2014). Por exemplo, examinando o silenciamento do gene *LjPT4* através de RNA interferente, se observou em linhagem do PT4i que 70% dos arbúsculos apresentavam fenótipo anormal, enquanto que na GUSi (controle) se observou morfologia normal dos arbúsculos (VOLPE et al., 2016). Com relação à concentração do fosfato na raiz, as linhagens do PT4i mostraram menos fósforo que GUSi.

Os transportadores LjPT4 e MtPT4 são capazes de perceber as condições externas de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , regular a formação de raízes laterais e a interação com FMA (VOLPE et al., 2016). O LjPT4 pode ter um modo de ação similar ao do AtNRT1.1 (REMANS et al., 2006), um transceptor. Portanto, ao detectar a concentração do  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  no solo, o LjPT4 poderia ativar os fatores de transcrição, ainda a serem caracterizados, envolvidos na formação de raízes laterais (VOLPE et al., 2016). A alta ramificação do sistema radicular sob baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , eventualmente aumentaria as chances de encontrar algum FMA e/ou  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (VOLPE et al., 2016).

A partir de experimentos de localização, com a fusão do promotor do gene à região codificante da proteína repórter GUS e qPCR em tempo real foi possível concluir que além dos transportadores LjPT4 e MtPT4 serem expressos na membrana periarbuscular também são expressos no ápice de raízes (VOLPE et al., 2016). Além disso, os níveis de transcritos destes transportadores foram dependentes dos níveis de fosfato. Por outro lado, mutantes *mpt4* mostraram um aumento na expressão de um receptor chave de auxina, METIR1 em baixo fósforo, aumentando a sensibilidade da auxina, formação e emergência de raízes laterais (PÉREZ-TORRES et al., 2008).

## 2.7 Efeito Conjunto da Nutrição com N e P na Micorriza Arbuscular

A colonização da planta hospedeira é controlada por mecanismos de *feedback* de N e P e, portanto, estes dois nutrientes são determinantes para a simbiose MA (FELLBAUM, CARL R. et al., 2012; FELLBAUM, CARL R et al., 2014; KIERS et al., 2011). Por exemplo, a falta de P e N na planta induz o transcriptoma de estresse por estes nutrientes que é favorável à colonização por FMA (BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015). Sob estresse de P e N, a planta diminui os níveis de expressão de genes de defesa e aumenta os níveis dos genes envolvidos com a biossíntese de estrigolactona (BONNEAU et al., 2013). Estrigolactona serve como um

importante sinal para os FMA no solo que estimula a ramificação da sua hifa durante a fase pré-simbiótica (BESSERER et al., 2006). Frequentemente, a alta disponibilidade de P reduz a colonização da planta por FMA, mas a falta de N desencadeia sinais que promovem a colonização por FMA, o que inverte os efeitos inibitórios da alta disponibilidade de P sobre colonização da planta por FMA (BREUILLIN-SESSOMS et al., 2015; NOURI et al., 2014). Os FMA podem escapar da degeneração dos seus arbúsculos em mutantes de *mtpt4* sob condições de falta de N e tem sido demonstrado que a expressão dos transportadores de P induzidos pela micorriza arbuscular não é crítica para a micorriza arbuscular, enquanto a planta é cultivada sob baixas condições de N (JAVOT et al., 2011).

## **2.8 Fungos Promotores de Crescimento de Plantas: Eficiência de Aproveitamento de Fontes Nitrogenadas**

### **2.8.1 Fungos formadores de micorriza arbuscular (FMA)**

Os efeitos negativos (GEORGE; MARSCHNER; JAKOBSEN, 1995), neutros (HAWKINS; GEORGE, 1999) ou positivos (MENSAH et al., 2015) da MA na nutrição nitrogenada têm sido relatados. Por exemplo, o transporte de 1% a 7% de  $^{15}\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  a partir do ERM do FMA *Glomus mosseae* para o trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Hano) tem sido demonstrado quando o ERM foi suplementado com 0,2 mM e 2 mM de  $^{15}\text{N-NH}_4\text{NO}_3$ , respectivamente (HAWKINS; GEORGE, 1999). Contudo, estes autores relataram que o suprimento de N pela hifa não foi suficiente para assegurar uma adequada nutrição do hospedeiro sob condições limitantes de N. Por outro lado, estudos tem mostrado que o FMA pode aumentar aquisição de N nas plantas colonizadas quando comparado com o controle não colonizado (AZCON-AGUILAR et al., 1993; BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015; JIN et al., 2005). MENSAH et al. (2015) verificaram que a habilidade dos FMA para melhorarem a nutrição nitrogenada da sua planta hospedeira foi relativamente dispersa dentro do filo Glomeromycota e que há alta diversidade intraespecífica entre diferentes isolados de uma única espécie de FMA, o que indica que o alto desempenho simbiótico de cada isolado é independente da espécie a que o isolado pertence. Estes autores relataram ainda que entre 31 isolados fúngicos que testaram, apenas seis foram capazes de aumentar a biomassa da planta (*Medicago sativa*) em mais do que 170% (em relação à média) e promover um aumento de 2,4 vezes na concentração de N relativamente ao controle.

Os estudos com raiz transformada de cenoura e suplementada com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  marcado com  $^{15}\text{N}$  mostraram que ERM do FMA *G. intraradices* tem a capacidade de transferir entre 30% (GOVINDARAJULU et al., 2005) a 50% (JIN et al., 2005) de N para a raiz transformada, e que grande proporção da biomassa da raiz é formada após a marcação. No milho, 75% do N nas folhas foram absorvidos pelo ERM de um FMA (TANAKA; YANO, 2005). Além disso, o  $^{15}\text{N}$  de aminoácidos livres de raízes colonizadas após suprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  marcado com  $^{15}\text{N}$  ao compartimento fúngico foi muito alto, mesmo quando os níveis de N suplementados nas raízes colonizadas foram três vezes mais altos (ou seja, passaram de 4 mM de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  para 12 mM). Isso mostra que a absorção de N pelo ERM e translocação para as raízes colonizadas ocorre mesmo se as raízes da planta hospedeira estão em condições limitantes de N ou não (GOVINDARAJULU et al., 2005).

SAIA, S et al. (2014) observaram que durante a fase de perfilhamento do trigo (*Triticum durum*), houve aumento da biomassa da planta inoculada com FMA comparativamente ao controle não inoculado independente da fertilização com N. A micorriza arbuscular tem tido efeito positivo sobre o crescimento do trigo, com a planta colonizada

produzindo mais do que 7% da biomassa do controle não colonizado, 7 semanas após transplântio (SAT) e mais do que 20% aos 9 SAT (SAIA, S et al., 2014).

### 2.8.2 Piriformospora indica

O fungo endofítico *Piriformospora indica* foi isolado do deserto Thar, na Índia. Pertence à família Sebacinaceae (ordem Sebaciales) e coloniza raízes de diversas espécies vegetais promovendo seu crescimento (KUMARI et al., 2003; VARMA et al., 1999). Assim como acontece na simbiose micorrízica arbuscular (BÜCKING, HEIKE; KAFLE, 2015), a simbiose de *P. indica* com raízes de plantas é acompanhado por uma enorme aquisição de N (SHERAMETI et al., 2005). De fato, CRUZ et al. (2013) observaram que a taxa de absorção do  $\text{NH}_4^+$  marcado com  $^{15}\text{N}$  pelo ERM na interação tomate – *P. indica* foi maior do que na interação tomate – *G. intraradices*, sendo similar a quantidade de nitrogênio transferido para as raízes do tomate. Da mesma forma, SHERAMETI et al. (2005) mostraram que as plântulas de tabaco inoculadas com *P. indica* foram maiores, mais pesadas, com incremento de  $41,0 \pm 4,0\%$  na massa seca,  $42,2 \pm 3,1\%$  no conteúdo de proteína,  $21,4 \pm 4,4\%$  no conteúdo de N da parte aérea,  $50,2 \pm 4,2\%$  e  $12,2 \pm 1,2\%$  na atividade da nitrato redutase NADH dependente da raiz e da parte aérea, respectivamente. Estes efeitos foram atribuídos a maior absorção de  $\text{NO}_3^-$  e expressão de genes da  $\text{NO}_3^-$  redutase (*Nia2*) e glucano-água-diquinases (*SEX1*) envolvidos no processo de degradação de amido. A expressão desses genes foi observada na raiz e parte aérea de plântulas inoculadas com *P. indica*.

### 2.8.3 Trichoderma harzianum

*Trichoderma* spp são fungos endofíticos simbiotes de plantas, capazes de colonizar suas raízes (células da epiderme e o exterior de células de córtex) sem causar patologias, atuando como agentes de biocontrole de doenças de plantas e como promotores de crescimento vegetal (HARMAN, GARY E., 2011; HARMAN, GARY E. et al., 2004; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010). Estes fungos melhoram o crescimento e desenvolvimento de plantas através da exsudação de auxina ou outros metabólitos (CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al., 2014; CONTRERAS-CORNEJO, HEXON ANGEL et al., 2009), os quais aumentam a hidrólise de ATP em  $\text{PM H}^+$ -ATPase resultando em maior atividade desta enzima (ou maior acidificação extracelular) (LOPEZ-CORIA; HERNANDEZ-MENDOZA; SANCHEZ-NIETO, 2016). As auxinas e  $\text{PM H}^+$ -ATPase estimulam o alongamento de pelos radiculares (LOPEZ-CORIA et al., 2016) e a ramificação de raízes laterais, ampliando a superfície radicular a ser colonizada pelo fungo e de absorção de água e nutrientes (CONTRERAS-CORNEJO, HEXON ANGEL et al., 2009); a  $\text{PM H}^+$ -ATPase, ainda energizam os sistemas de transporte de nutrientes. Portanto, as plantas inoculadas passam a apresentar um melhor desempenho em diversos processos fisiológicos e indicadores de crescimento, o que se traduz em maior produtividade. De fato, em lavouras comerciais dos EUA, avaliou-se a resposta do milho inoculado com o agente de biocontrole *Trichoderma harzianum* T-22 (Ascomiceto) a diferentes doses de N (20, 40, 80, 150, 240  $\text{kg ha}^{-1}$ ) e observou-se que as plantas com T-22 responderam mais rapidamente a doses de N menor ou igual a 150  $\text{kg ha}^{-1}$ , estando mais verdes na fase do pendoamento, com maior altura da planta e, na fase de maturação, com maior rendimento de silagem e grão relativamente ao controle não inoculado (HARMAN, GARY E, 2000). Foi relatado também que na presença de T-22 se obteve máxima produtividade com menos de 38% de N que o controle. Da mesma forma, indicadores de crescimento (altura da planta, número de folhas, área foliar e massa seca da parte aérea e raiz), conteúdo de clorofila, ácidos nucleicos, proteína, amido e fitormônios foram incrementados em plantas de milho (*Zea mays* (L.)) inoculadas com o micélio seco ao

ar ou com solução metabólica de *Trichoderma harzianum* T-22 (AKLADIOUS; ABBAS, 2014). Além disso, em plantas de arroz inoculadas com *Trichoderma* spp e cultivadas em condições de solo em casa de vegetação, incrementos na altura da planta, número de folhas, número de perfilhos, comprimento de raiz e massa fresca de raiz e diversos processos fisiológicos, tais como, taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, concentração interna de CO<sub>2</sub> e eficiência do uso da água foram observados (DONI et al., 2014).

Dados obtidos em condições de campo com várias monocotiledôneas indicam que a quantidade de fertilizantes aplicados pode ser reduzida em 40-50% na presença de *Trichoderma* sem redução de produtividade (HARMAN, GARY E., 2011). De fato, AL-EZERJAWI; KADHIM (2012), mostraram aumentos na altura da planta, N-total, conteúdo de clorofila a, b, peso de 1000 grãos e rendimento de grãos em plantas de trigo cultivadas em condições de campo com palhada de arroz tratada com *T. harzianum*.

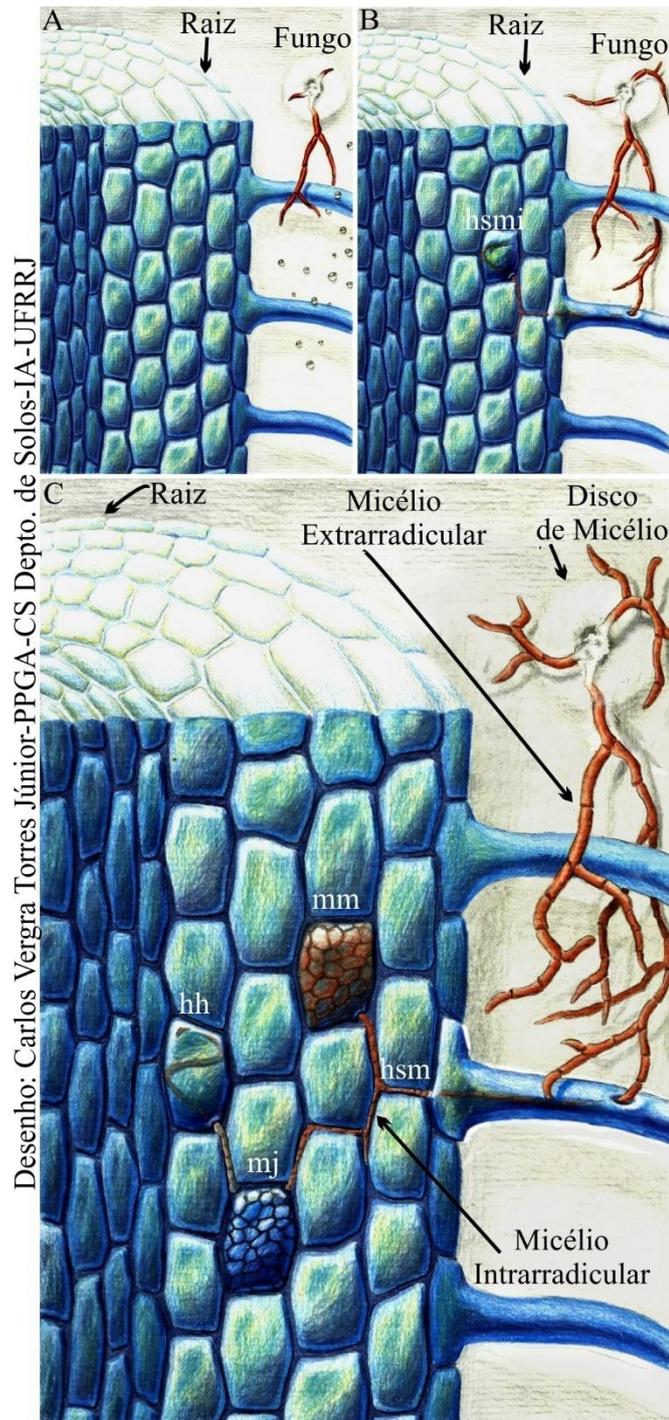
#### 2.8.4 Fungos endofíticos dark septate (fungos DSE)

Os fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE) são ascomicetos, caracterizados por apresentarem pigmentação escura, hifas septadas e microesclerodios que colonizam a epiderme e o córtex radicular inter e intracelularmente (Figura 4) e apresentam ubiquidade em raízes saudáveis de diversos vegetais (JUMPPONEN, A., 1998). Estes fungos foram primeiramente descritos por MELIN (1922) como “*mycelium radicus astrovirens*”, e o termo “dark septate endophytes” (DSE) foi eventualmente introduzido por STOYKE; CURRAH (1991).

Os fungos DSE constituem um grupo parafilético (YUAN, Z.-L. et al., 2011) com espécies saprofíticas e simbióticas (MANDYAM, KEERTHI; JUMPPONEN, ARI, 2005) que habitam frequentemente solos oligotróficos em todas as regiões climáticas, como ambientes áridos, semiáridos (BARROW, J.; AALTONEN, 2001; BARROW, J. R., 2003), polares (GARDES; DAHLBERG, 1996) e tropicais (BONFIM et al., 2016; PEREIRA et al., 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017).

A forma como os fungos DSE estabelecem associação com sua planta hospedeira ainda não é totalmente compreendida. Mas estudos indicam que a promoção do crescimento pode se dar tanto de forma indireta, através da proteção da planta a estresses abióticos tais como seca (SANTOS, S. G. et al., 2017; ZHANG, Q. et al., 2017), salinidade (QIN et al., 2017), altas concentrações de metais pesados (WEI et al., 2016) e pela produção de fitormônios ou substâncias análogas (BERTHELOT et al., 2016), quanto direta pela facilitação de absorção de nutrientes, principalmente a partir de fontes orgânicas (USUKI; NARISAWA, 2007; VERGARA; ARAUJO; URQUIAGA; et al., 2017). Em *Brassica campestris* (L.), foi constatada uma associação mutualista com o fungo *Heteroconium chaetospora*, na qual o fungo fornece o N para a planta e a planta C ao fungo, acarretando em incrementos significativos na biomassa da planta (USUKI; NARISAWA, 2007).

As respostas de plantas à inoculação com fungos DSE são mais evidentes quando se utilizam fontes orgânicas de N (NEWSHAM, 2011; QIN et al., 2017). Contudo, devido à ocorrência generalizada dos fungos DSE nos mais diversos ambientes (GARDES; DAHLBERG, 1996; SHARMA; JHA, 2017), é provável que ocorram fungos DSE também capazes de auxiliar o vegetal na absorção de nutrientes de fontes inorgânicas (USUKI; NARISAWA, 2007)



**Figura 4.** Raiz hipotética colonizada pelo fungo endofítico *dark septate* (fungo DSE). A) Ramificação do micélio presente no disco do meio de cultura em direção ao sistema radicular; B) Penetração da hifa no pelo radicular acessando as células do córtex; C) Formação de diversas estruturas do fungo DSE em células do córtex. Hifa septada melanizada e intracelular (**hsmi**); Microescleródios melanizados (**mm**); Microescleródios corados no estágio jovem (**mj**); d) hifa hialina septada e intracelular (**hh**); hifa septada melanizada e intercelular (**hsm**).

USUKI; NARISAWA (2007) avaliaram a capacidade do fungo DSE *H. chaetospora* em utilizar diferentes aminoácidos e fontes inorgânicas de N e, observaram aumento

significativo na massa seca do fungo nos meios modificados com fontes orgânicas de N, comparativamente ao meio suplementado com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou sem N. Os mesmos autores, ao inocularem este fungo em plantas de repolho chinês (*Brassica campestris* (L.)) suplementados com as mesmas fontes de N, observaram que a inoculação promoveu a utilização de todos os aminoácidos e  $\text{NaNO}_3$ , com efeitos no crescimento da planta. Relatos semelhantes a estes têm sido comuns na literatura (DIENE; WANG; NARISAWA, 2013; MAHMOUD; NARISAWA, 2013).

Entretanto, em pepino (*Cucumis sativus* (L.)) inoculado com o DSE *Pseudosigmoidea ibarakiensis* e suplementado com apenas leucina, houve redução de 44% na massa seca da planta (DIENE et al., 2013). Por outro lado, em plantas de arroz inoculadas com fungos DSE, crescidas em condições controladas e suplementadas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foram observados incrementos significativos na matéria seca da planta, N-amino, açúcares solúveis, número de perfilhos (plantas de arroz) e alteração dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) da absorção de  $\text{NO}_3^-$  (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). Com base em ZHANG, H.-H. et al. (2012), estes autores deduziram que os acúmulos de açúcares solúveis relatados podem estar relacionados com aumento do conteúdo de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II em plantas inoculadas com fungos DSE, indicando que estes fungos podem também melhorar a eficiência da atividade fotossintética da sua planta hospedeira.

### 3 CAPÍTULO I

## **FUNGOS *DARK SEPTATE* AUXILIAM PLANTAS DE TOMATE A ADQUIRIR NUTRIENTES A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL TRITURADO**

### 3.1 RESUMO

Os fungos endofíticos *dark septate* (DSE) são biotróficos facultativos que se associam com centenas de espécies vegetais, podendo contribuir para o seu crescimento e na busca pela agricultura sustentável. Entretanto, uma série de funções ecológicas dos fungos DSE ainda precisam ser esclarecidas. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da inoculação de fungos DSE na eficiência de recuperação e acúmulo de nutrientes e no crescimento de plantas de tomate adubadas com fonte orgânica de N ou inorgânica. Dois experimentos sob condições de casa de vegetação foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições, com mudas de tomate crescidas em vasos contendo amostra de horizonte superficial de um Planossolo Háplico não esterilizado. Mudas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem (controle) e com inoculação com fungos DSE (isolados A101, A104 e A105) foram transplantadas para vasos contendo 12 kg de solo que havia recebido material vegetal da parte aérea finamente triturado (*Canavalia ensiformis* [L.] enriquecido com 0,7 % de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso (experimento com fonte orgânica de N) ou sulfato de amônio enriquecido com 1% de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso (experimento com fonte inorgânica de N). Aos 50 dias após o transplântio, indicadores de crescimento, conteúdo de nutrientes, quantidade e eficiência de recuperação de  $^{15}\text{N}$  e a eficiência aparente de recuperação de P e K foram quantificados na parte aérea do tomate. Os tratamentos inoculados com fungos DSE e supridos com fonte orgânica de N, incrementaram significativamente a quantidade e a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$  e a eficiência aparente de recuperação de P e K, bem como o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, altura da planta, número de folhas e matéria seca da parte aérea. Ao contrário, na presença da fonte inorgânica de N, o efeito positivo da inoculação foi somente observado para a eficiência de recuperação do K, conteúdo de K e aérea foliar nas plantas inoculadas com o fungo A104. A inoculação com A101, A104 e A105 promove o crescimento do tomate usando a fonte orgânica de N (*C. ensiformis*- $^{15}\text{N}$  finamente triturado).

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum* (L.).  $^{15}\text{N}$ . Fungos DSE. Eficiência de recuperação do nutriente. Potássio. Fósforo. *Canavalia ensiformis* (L.).

### 3.2 ABSTRACT

Dark septate endophytic (DSE) fungi are facultative biotrophs that associate with hundreds of plant species, thus contributing to their growth and in the search for sustainable agriculture. However, several ecological functions of DSE fungi still need to be clarified. The present study aimed to investigate the effect of DSE fungi inoculation on nutrient recovery efficiency and nutrient accumulation and growth of tomato fertilized with organic and inorganic N sources. Two experiments under greenhouse conditions were carried out in randomized blocks design, with five replicates of tomato seedlings grown in pots filled with non-sterile sandy soil. Tomato seedlings (cv. Santa Clara I-5300) inoculated with DSE fungi (isolates A101, A104, and A105) and without it (control) were transplanted to pots filled with 12 kg of material from the surface horizon of a Fragiudult soil, which had previously received a finely ground plant material (*Canavalia ensiformis* [L.] shoot enriched with 0.7 atom %  $^{15}\text{N}$  (organic N source experiment) or ammonium sulfate- $^{15}\text{N}$  enriched with 1 atom %  $^{15}\text{N}$  (mineral N source experiment). At 50 days after transplanting, growth indicators, nutrient content, amount of nitrogen (N) in the plant derived from fertilizer- $^{15}\text{N}$  or *C. ensiformis*- $^{15}\text{N}$ , and fertilizer- $^{15}\text{N}$ , -P and -K or *C. ensiformis*- $^{15}\text{N}$  ground material recovery efficiency by plants were quantified. Treatment inoculated with DSE fungi and supplied with N organic source significantly increased the amount of N, P and K, and the recovery efficiency of this nutrients, as well as the content of N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, plant height, leaf number, leaf area, and shoot dry matter. Contrary, positive effect in the presence of N inorganic source was only observed to fertilizer-K recovery efficiency, the content of K, and leaf area when inoculated with the fungus A104. Inoculation with A101, A104, and A105 promoted the growth of tomato using organic N source (*C. ensiformis*- $^{15}\text{N}$  ground plant material).

**Keywords:** *Solanum lycopersicum* (L.).  $^{15}\text{N}$ . DSE fungi. Nutrient recovery efficiency. Potassium. Phosphorus. *Canavalia ensiformis* (L.) - $^{15}\text{N}$ .

### 3.3 INTRODUÇÃO

Na agricultura, especialmente de baixo uso de insumos, os vegetais podem se beneficiar da interação com microrganismos, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (HE; NARA, 2007). Neste caso, o micélio extrarradicular de um FMA proporciona uma maior zona de interceptação de nutrientes e maior eficiência de absorção nutrientes, o que reduz doses de fertilizantes aplicadas e perdas de nutrientes no solo e melhora a nutrição e crescimento dos vegetais (CAVAGNARO et al., 2015; FINLAY; SÖDERSTRÖM, 1992; HE; NARA, 2007; HOGBERG, 1989). Além disso, há evidências de que um FMA pode ser capaz de adquirir nutrientes a partir da matéria orgânica, provavelmente após a sua mineralização, e transferi-los para a planta hospedeira (HODGE, ANGELA; CAMPBELL; FITTER, 2001; HODGE, A.; FITTER, 2010). Contudo, tanto estudos básicos como a produção de um inóculo de qualidade (livre de impurezas) de um FMA é limitado pelo fato destes fungos serem biotróficos obrigatórios, necessitando estabelecer associações efetivas com raízes metabolicamente ativas para desenvolverem-se e multiplicarem-se (SYLVIA; JARSTFER, 1994).

Os fungos endofíticos *dark septate* (DSE) são ascomicetos biotróficos facultativos, bastante diversos, caracterizados pela pigmentação escura, hifas melanizadas septadas e formação de microescleródios. Estes fungos são capazes de colonizar tecidos radiculares de forma intra e intercelular de mais de 600 espécies vegetais (incluindo o tomate *Solanum lycopersicum* L. e espécies não micorrízicas) sem causar patologias e podendo atuar como promotores de crescimento (ANDRADE-LINARES, D. R. et al., 2011; ANDRADE-LINARES, DIANA ROCIO et al., 2011; JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998; MAHMOUD; NARISAWA, 2013; PEREIRA et al., 2011; UPSON; READ; NEWSHAM, 2009; YUAN, Z.-L. et al., 2011).

O tomate, membro da família *Solanaceae* é considerado a segunda cultura economicamente mais importante mundialmente depois da batata (FOOLAD, 2004; REIS FILGUEIRA, 2008). Além de ser uma importante fonte de licopeno, que possui atividades antioxidantes, anticancerígenas e hipolipidêmicas (VIUDA-MARTOS et al., 2014), os frutos de tomate são livres de colesterol e ricos em sais minerais, vitaminas A e C e fibras (BLOCK; PATTERSON; SUBAR, 1992; GERSTER, 1997; RAO; AGARWAL, 2000; VIUDA-MARTOS et al., 2014).

Pesquisas recentes sugerem que os fungos DSE quando associados aos vegetais sejam capazes de acessar compostos complexos de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) no solo (MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A., 2005) e disponibilizar os nutrientes à sua planta hospedeira (MANDYAM, KEERTHI, 2008). Possivelmente pela sua capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, as quais promovem a liberação dos nutrientes que são absorvidos pelas plantas, e/ou então, pela absorção de compostos orgânicos como aminoácidos e pequenos peptídeos que são transferidos diretamente à planta hospedeira (JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998), promovendo melhor aproveitamento de fontes orgânicas de nutrientes (REEVE et al., 2008).

Em estudos anteriores, estruturas típicas e colonização por três isolados de fungos DSE (A101, A104 e A105), da ordem *Pleosporales* (subordem *Massarineae*) que colonizam o arroz silvestre (*Oryza glumaepatula* Steud.) e o comercial (*Oryza Sativa* L.) foram avaliados em plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300), as quais apresentaram microescleródios nos seus tecidos radiculares e ausência de sintomas de patogenicidade com percentuais de colonização ao redor de 80% (RIBEIRO, 2011; TORRES-JÚNIOR, 2014; VERGARA;

ARAÚJO; ALVES; et al., 2017). Além disso, no conteúdo de N de plantas inoculadas por estes fungos, foi observado um efeito neutro quando a fonte inorgânica  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi suplementada às plantas.

No presente estudo, o acúmulo de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn), a quantidade de nitrogênio na planta derivado do  $^{15}\text{N}$ -fertilizante (QNPdf), a eficiência de recuperação (ER) de  $^{15}\text{N}$ -fertilizante, P-fertilizante e K-fertilizante pela planta e o crescimento de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) inoculada pelos fungos A101, A104 e A105 e supridas com a parte aérea de *Canavalia ensiformis* enriquecida com  $^{15}\text{N}$  e finamente moída ou  $^{15}\text{N}$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram determinados em cultivo em solo não esterilizado em condições de casa de vegetação. Desta forma, este estudo teve por objetivo investigar a influência de fonte de N orgânica ou inorgânica no crescimento de plantas de tomate inoculadas com fungos *dark septate*, bem como o acúmulo e eficiência de recuperação de nutrientes (ou seja, a fração do nutriente aplicado sob a forma de fertilizante que foi absorvido pela planta) por esta hospedeira.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, *Canavalia ensiformis* (L.) e sulfato de amônio marcado com átomos de  $^{15}\text{N}$  foram utilizados como fonte de N. Como existem enormes diferenças entre estas duas fontes de N, foram conduzidos dois experimentos, em paralelo: (i) experimento com a fonte inorgânica de N, o sulfato de amônio e; (ii) experimento com a fonte orgânica de N, a parte aérea de *C. ensiformis* finamente triturada. O sulfato de amônio é uma importante fonte de N, mas também fornece o enxofre para as plantas. Por outro lado, o adubo verde *C. ensiformis* (uma leguminosa), devido a sua associação com bactérias fixadoras de N, contribui com consideráveis quantidades de N no sistema solo-planta (PERIN; GUERRA; TEIXEIRA, 2003), além de outros benefícios que advêm da incorporação dos seus resíduos, tais como manutenção da umidade do solo, melhoria das propriedades físicas do solo, incremento nos níveis de fertilidade do solo (TEJADA et al., 2008), mobilização de nutrientes tais como o P e alguns micronutrientes (LAMBERS et al., 2015).

#### 3.4.1 Coleta do solo, calagem e adubação

Para ambos experimentos, a amostra de solo foi coletada na profundidade de 0-20 cm no Sistema Integrado de Produção Agroecológica em Seropédica, Rio de Janeiro. O solo foi classificado como Planossolo Háptico (de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação do Solo). Sua análise apresentou as seguintes características químicas: pH=5,61;  $\text{Al}^{3+}=0,0$  e  $\text{H+Al}=2,95$   $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{+2}=1,21$  e  $\text{Mg}^{+2}=0,65$   $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; P:10,27 e  $\text{K}^{+1}:63,92$   $\text{mg L}^{-1}$ ; N: 0,07 e C=0,54%. Vasos com a capacidade de 14 L que foram usados como unidades experimentais, receberam 12 kg de solo destorroado e homogeneizado. Dois meses após a aplicação do calcário (*MineralCal*), na dose de  $1,94 \text{ t ha}^{-1}$ , para corrigir as deficiências de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , o solo foi adubado com o equivalente a  $320 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (superfosfato simples),  $68 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$  (sulfato de potássio) e  $30 \text{ kg ha}^{-1}$  de micronutrientes (FTE BR 12) de acordo com a recomendação para a cultura do tomate (MACEBO et al., 2013). O potássio foi parcelado aos 25 ( $27 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e aos 40 dias ( $41 \text{ kg ha}^{-1}$ ) após o transplantio (DAT).

#### 3.4.2 Adubação nitrogenada (fonte inorgânica e orgânica) marcada com $^{15}\text{N}$

O sulfato de amônio foi usado como a fonte inorgânica de N. A aplicação do sulfato de amônio enriquecido com 1% de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio) foi parcelado em duas doses iguais ( $0,428 \text{ g de N por vaso}$ , equivalente a  $15 \text{ kg ha}^{-1}$  de N) aos 25 e 45 dias após o transplantio (DAT) (MACEBO et al., 2013). No dia da adubação com  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, o sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  foi dissolvido em água destilada e 500 mL da solução homogeneizada foram uniformemente distribuídos nos vasos para a padronização da marcação do solo por umedecimento completo do solo.

Para o experimento com a fonte orgânica de N, a parte aérea de plantas de *Canavalia ensiformis* [L.] finamente trituradas foram usadas. A *C. ensiformis* foi previamente cultivada em solo enriquecido com  $^{15}\text{N}$  para fins de adubação verde e a sua parte aérea seca (por 72h;  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ) enriquecida com 0,7% átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso ( $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis*) foi coletada com aproximadamente 60-70 dias após germinação (época de floração). A parte aérea seca de *C. ensiformis* foi finamente moída e posteriormente esterilizada por irradiação com raios gama (dose de 25 kGy). Este material apresentava a seguinte concentração de macronutriente ( $\text{g kg}^{-1}$ ) e micronutriente ( $\text{mg kg}^{-1}$ ): N=23,8; P=2,0; K=5,8; Ca=12,3; Mg=3,2; S=1,9; Cu=10,0;

Fe=792,0; Zn=39,0; Mn=50,0; B=27,0 e C=38,2%. Cada vaso contendo 12 kg de solo recebeu 37,81g de *C. ensiformis* finamente triturado, equivalente a dose de 150 kg ha<sup>-1</sup> de N, que foi aplicada de uma única vez no momento de plantio e completamente homogeneizada com solo.

### 3.4.3 Preparo do inóculo e inoculação

Os isolados (A101, A104 e A105) de fungos endofíticos *dark septate* que foram obtidos a partir de *O. glumaepatula* e identificados através da filogenia do ITS (RIBEIRO, 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017), estão depositados no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner ([www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd](http://www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd)). O inóculo destes isolados fúngicos foi preparado como descrito por ANDRADE-LINARES, DIANA ROCIO et al. (2011) com algumas modificações. Cada isolado de fungos DSE foi crescido num frasco Erlenmeyer de 300 ml contendo 150 ml de meio batata-dextrose (BD) por 2 semanas, à 28 °C e sob agitação de 80 rpm. O micélio fresco foi filtrado e lavado com água destilada autoclavada até que o líquido ficasse límpido para evitar qualquer transferência do meio BD para o inóculo. Em seguida, o micélio foi pesado e, parte dele, foi misturado com água destilada autoclavada por um minuto à velocidade mínima através de um misturador (Arno Optimix Plus, modelo LN27, Brasil) em um fluxo laminar para prevenir contaminação. A viabilidade de cada isolado foi verificada por plaqueamento do micélio no meio batata-dextrose-ágar (BDA). Para inoculação, a suspensão foi ajustada com água destilada autoclavada para a concentração de 1% (m/v).

### 3.4.4 Delineamento experimental e condições de crescimento

Os dois experimentos, foram conduzidos simultaneamente, em delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições. A unidade experimental (parcela) foi composta de um vaso com uma planta de tomate. Os experimentos foram conduzidos sob condições de casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, Brasil. Para ambos os experimentos, os tratamentos consistiram de plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Santa Clara I-5300) crescidas sem (controle) e com inoculação com os fungos DSE (isolados A101, A104 ou A105). Todos os tratamentos do experimento com a fonte inorgânica de N receberam <sup>15</sup>N-sulfato de amônio como sua única fonte de N, enquanto os tratamentos do experimento com a fonte orgânica de N foram supridos com <sup>15</sup>N-*C. ensiformis*. Santa Clara I-5300 é uma cultivar de tomate que possui crescimento indeterminado e pertence ao grupo de tomate Santa Cruz, que tem sido cultivado na região Brasileira Centro-Sul desde 1940 (Filgueira, 2007). As sementes do tomate foram inicialmente lavadas com álcool 70% por 3 minutos e desinfestadas com hipoclorito de sódio (2.5%) por 3 minutos, seguidas por oito sucessivas lavagens em água destilada autoclavada. Posteriormente foram pré-germinadas em ágar-água (8 g L<sup>-1</sup>) à 28 °C visando selecionar mudas homogêneas. As mudas de tomate no estádio de 1-2 folhas foram inoculadas com os fungos DSE pela imersão de suas raízes na suspensão micelial (1% m/v), enquanto as plantas do tratamento controle apenas receberam água destilada – autoclavada. O solo (12 kg) do tratamento de inoculação foi também umedecido completamente com 500 mL da suspensão (1% m/v) contendo o micélio fresco, enquanto o tratamento controle apenas recebeu a água destilada - autoclavada. Os vasos foram regados diariamente com 500 mL de água destilada para manter a umidade do solo próxima da capacidade de campo.

### 3.4.5 Observações de sintomas de patogenicidade e de colonização de raízes

Raízes frescas de plantas de tomate inoculadas com os fungos A101, A104 ou A105 foram lavadas e fixadas em etanol 50% para confirmar se foram colonizadas por estes fungos DSE. Em seguida, as amostras foram embebidas (de forma consecutiva) em hidróxido de potássio (2,5%) e em ácido clorídrico (1%) e acondicionadas à temperatura ambiente durante uma noite. Posteriormente, foram coradas com 0,01% (*m/v*) de azul de metila em uma mistura de 10:9:1 glicerol/água destilada/ácido clorídrico (GRACE; STRIBLEY, 1991; KOSKE; GEMMA, 1989; PHILLIPS; HAYMAN, 1970) e descoradas em etanol 50%. Segmentos de raízes de aproximadamente 3 cm foram colocadas em lâminas com glicerina e as hifas e outras estruturas destes fungos foram observadas com microscópio ótico Axioplan (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera digital Axiocam MRC5 (Carl Zeiss).

Para preparar os cortes transversais de raízes colonizadas para microscopia ótica, as amostras foram desidratadas duas vezes em uma série de etanol 70, 90 e 100% por 1 h cada. Após a desidratação, as raízes foram infiltradas com historesina (Leica, Wetzlar, Alemanha) e etanol (100%) (1: 1, *v/v*) por 12 h e depois por 24 h com historesina 100%, antes de serem embebidas com historesina. Cortes transversais de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  foram obtidos utilizando um micrótomo rotativo (Leica) (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). As amostras foram observadas e as imagens analisadas conforme descrito acima. Os sintomas de doenças nas plantas foram avaliados em uma escala de 0-3 (0: ausência de sintomas de doenças; 1: ligeiro amarelecimento da planta; 2: amarelecimento e crescimento tardio da planta; 3: murcha ou morte da planta) (DIENE et al., 2013; MAHMOUD; NARISAWA, 2013).

### 3.4.6 Variáveis avaliadas

A biomassa seca da parte aérea (65°C, 72h), o diâmetro do colo, o número de folhas, a área foliar total (com medidor LI-COR, modelo LI-3100C, Nebraska, USA) de plantas de tomate foram avaliadas aos 50 DAT em ambos os experimentos. A parte aérea seca foi moída em moinho do tipo Wiley (<40 mesh) e em moinho de rolagem para diminuição da granulometria das amostras (SMITH, J.; UM, 1990).

A concentração de N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn e abundância de  $^{15}\text{N}$  (% em átomos) foram determinados na parte aérea moída. A concentração de micronutrientes foi quantificada no extrato de água-régia (ISO 12914, 2012) através de um plasma (PerkinElmer<sup>®</sup> Optima<sup>™</sup> 8300) e a de macronutrientes conforme descrito por TEDESCO (1982).

A abundância de  $^{15}\text{N}$  foi determinada utilizando um espectrômetro de relação de massa isotópica de fluxo contínuo (espectrômetro de massa Finnigan DeltaPlus acoplado a um autoanalisador de C e N total Carlo Erba EA 1108 – Finnigan MAT, Bremen, Alemanha) (BODDEY; ALVES; URQUIAGA, 1994). O conteúdo de macro e micronutrientes ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) foi estimado de acordo com a equação (1), utilizando a concentração e matéria seca ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) acumulada pelas plantas de tomate em cada tratamento.

**Conteúdo do Nutriente ( $\text{mg planta}^{-1}$ )**

$$= [\text{Concentração do Nutriente (\%)} \times \text{Matéria Seca (\text{mg planta}^{-1})}] \div 100 \quad (1)$$

A fração (%) e a quantidade ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de N na planta derivado do  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio ou  $^{15}\text{N}$ -C. *ensiformis* finamente triturado, bem como a eficiência de recuperação de  $^{15}\text{N}$ , foram medidas usando equações (2), (3) e (4), de acordo com a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2001). Os átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso (%) foram obtidos pela

diferença entre a abundância de  $^{15}\text{N}$  na planta e a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  no ar (0.3663% de átomos).

**Fração do N na planta derivado do fertilizante marcado com  $^{15}\text{N}$  (%)**

$$= 100 \times \left( \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N excessos}_{\text{planta}}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N excessos}_{\text{fertilizante}}} \right) \quad (2)$$

**Quantidade de N na planta derivado do fertilizante marcado com  $^{15}\text{N}$  ( $\text{mg planta}^{-1}$ )**

$$= [\text{Fração do N na planta derivado do fertilizante marcado com } ^{15}\text{N} (\%) \times \text{Conteúdo do nitrogênio ( $\text{mg planta}^{-1}$ )}] \div 100 \quad (3)$$

**Eficiência de Recuperação do N**

$$= \frac{\text{Quantidade de N na planta derivado do fertilizante marcado com } ^{15}\text{N ( $\text{mg planta}^{-1}$ )}}{\text{Quantidade de N aplicado sob a forma de fertilizante marcado com } ^{15}\text{N ( $\text{mg pot}^{-1}$ )}} \times 100 \quad (4)$$

A eficiência aparente de recuperação de P e K pela parte aérea de plantas de tomate foi calculada de acordo com BALIGAR; FAGERIA (1997). A eficiência aparente de recuperação de nutrientes reflete a eficiência da planta em obter o nutriente a partir solo por unidade do nutriente aplicado, conforme descrito pela equação (5).

**Eficiência aparente de recuperação do nutriente (%)**

$$= 100 \times [(\text{nutriente absorvido por plantas de parcelas fertilizadas, } \text{mg plant}^{-1} - \text{nutriente absorvido por plantas de parcelas não fertilizadas, } \text{mg plant}^{-1}) \div \text{quantidade de nutriente aplicado, } \text{mg plant}^{-1}] \quad (5)$$

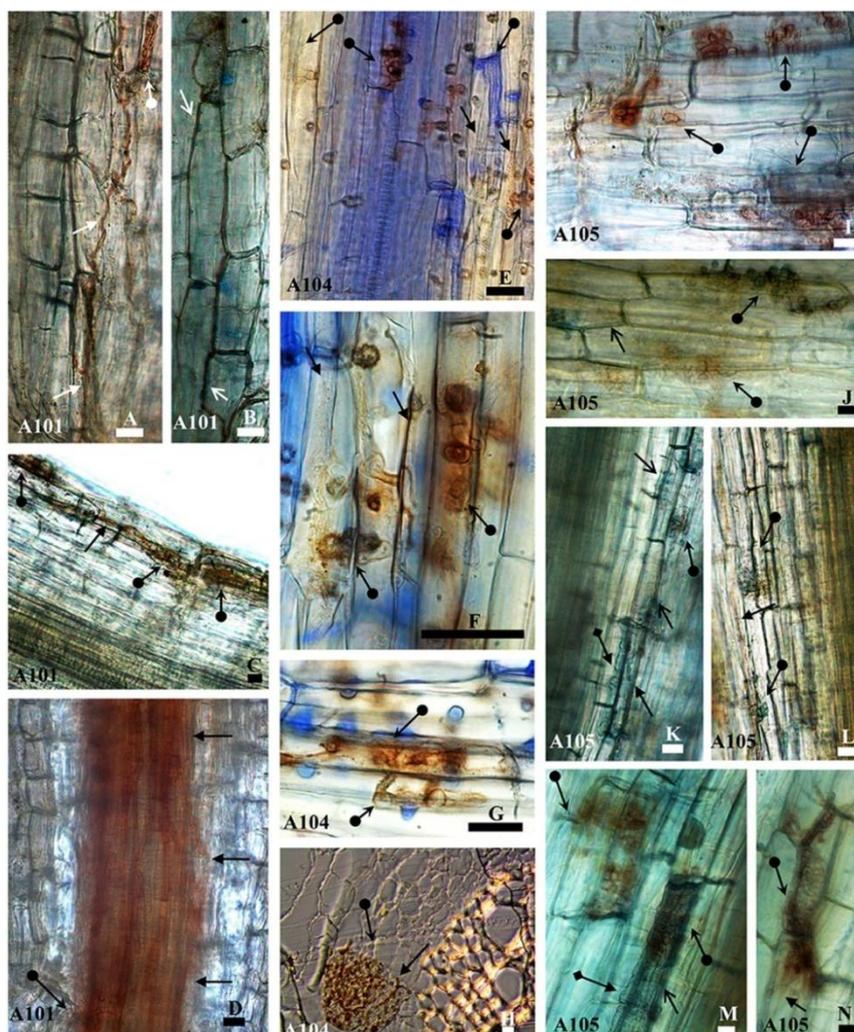
### 3.4.7 Análises estatísticas

Os dados de cada experimento foram individualmente submetidos ao teste de homogeneidade (*Bartlett*) da variância e normalidade (*Shapiro-Wilk*) dos resíduos e à análise de variância (ANOVA). Quando as diferenças significativas foram indicadas pela ANOVA, as médias dos tratamentos foram separadas utilizando-se as diferenças mínimas significativas (LSD) calculadas pelo teste t ao nível de 5%. O *software* R, versão R 3.4.1, (R Development Core Team, 2017) com RStudio (versão 1.0.153) e o pacote agricolae (DE MENDIBURU, 2017) foram utilizados para as análises e os dados estão apresentados no formato de média  $\pm$  erro padrão.

## 3.5 RESULTADOS

### 3.5.1 Patogenicidade e colonização de raízes

Os três isolados (A101, A104 e A105) ([Figuras 5 A-N](#)) colonizaram o tecido radicular de plantas de tomate com hifa colonizando a epiderme ([Figuras 5 A, B, E, F, J, M, N](#)), córtex ([Figuras 5 C, H, K, L](#)) e formando estruturas semelhantes a microescleródios ([Figuras 5 A, C, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N](#)), sem sintomas de doença aparente. Além disso, as hifas septadas melanizadas dos fungos A101 ([Figuras 5 B](#)) e A105 ([Figuras 5 J, M](#)) circundaram as células da epiderme. A105 também foi capaz de circundar as células do córtex ([Figuras 5 K](#)). Os três fungos diferiram em seus perfis de colonização. Enquanto A101 colonizou a região entre o córtex e o feixe vascular ([Figuras 5 D](#)), A104 formou uma rede na epiderme que conectou várias células ([Figuras 5 E com detalhes em F](#)) e A105 formou abundantes vesículas na epiderme ([Figuras 5 M](#)) e córtex ([Figuras 5 K](#)).



**Figura 5.** Aspectos morfológicos de raízes de tomate (cv Santa Clara I-5300) inoculados com os fungos DSE A101, A104 e A105 aos 50 dias após o transplante. As hifas septadas melanizadas circundam (**seta aberta**) ou não (**seta fechada**) as células da epiderme (**B, J, M e A, E, F e N**, respectivamente) e do córtex (**K e C, H e L**, respectivamente) e da

região entre o córtex e o feixe vascular (**D**). Estruturas semelhantes aos microscleródios (**seta com círculo na base**) formadas na epiderme (**A, E, F, G, I, J, M e N**), no córtex (**C, H, K e L**) e na região entre córtex e feixe vascular (**D**) pelos fungos. Vesículas hialinas (**seta com base de losango**) formadas na epiderme (**M**) e no córtex (**K**). As amostras foram coradas com 0,01% de azul de metila, exceto **H**, que foi obtido a partir de um corte transversal que não foi corado. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.5.2 Efeito da inoculação com fungos DSE sobre o crescimento da planta

Os três isolados (A101, A104 e A105) de fungos DSE promoveram o crescimento do tomate sem causar qualquer sintoma de doença na presença de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* finamente triturada como a única fonte orgânica de N, com incrementos significativos na biomassa seca da parte aérea (incrementos de 25, 34 e 41% para A101, A104 e A105, respectivamente), altura da planta e número de folhas relativamente ao tratamento controle ([Tabela 1](#)). O fungo A104, destacou-se dos demais, uma vez que, o número de folhas e a área foliar total de plantas inoculadas com este isolado também apresentaram incrementos significativos de 50% e 67%, respectivamente, em comparação com as plantas do tratamento controle ([Tabela 1](#)). Entretanto, a inoculação não teve efeito significativo sobre o diâmetro do colo. Da mesma forma, a interação fungos DSE – tomate não apresentou nenhum efeito sobre a biomassa seca da parte aérea, número de folhas e diâmetro do colo de plantas de tomate quando o N mineral foi suplementado como  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio ([Tabela 2](#)). Entretanto, diferenças significativas, foram detectadas para a aérea foliar total, destacando-se a inoculação dos fungos DSE, em relação ao tratamento controle não inoculado ([Tabela 2](#)).

**Tabela 1.** Indicadores de crescimento de plantas de tomate, aos 50 dias após o transplante, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE) e adubadas com a fonte orgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* [L.] finamente triturada).

Tratamento	Biomassa Seca				
	da Parte Aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Altura da Planta (cm planta <sup>-1</sup> )	Número de Folhas (unid. planta <sup>-1</sup> )	Área Foliar Total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	Diâmetro do Colo (cm planta <sup>-1</sup> )
<b>Controle</b>	10,8±0,05 b	53±0,41 b	14±0,20 c	1885±12 b	10±0,12
<b>A101</b>	14,5±0,34 a	63±3,35 a	18±0,47 b	2182±129 b	11±0,16
<b>A104</b>	13,6±0,90 a	63±2,95 a	21±1,52 a	3155±248 a	11±0,33
<b>A105</b>	15,2±1,03 a	66±2,25 a	18±1,25 b	2095±41b	11±0,68
<b>CV (%)</b>	10,37	8,23	11,46	12,15	7,24

Médias  $\pm$  SE (n=5) seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, p<0,05). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. SE: erro padrão. CV%: coeficiente de variação.

**Tabela 2.** Indicadores de crescimento de plantas de tomate, aos 50 dias após o transplante, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE) e adubadas com fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio).

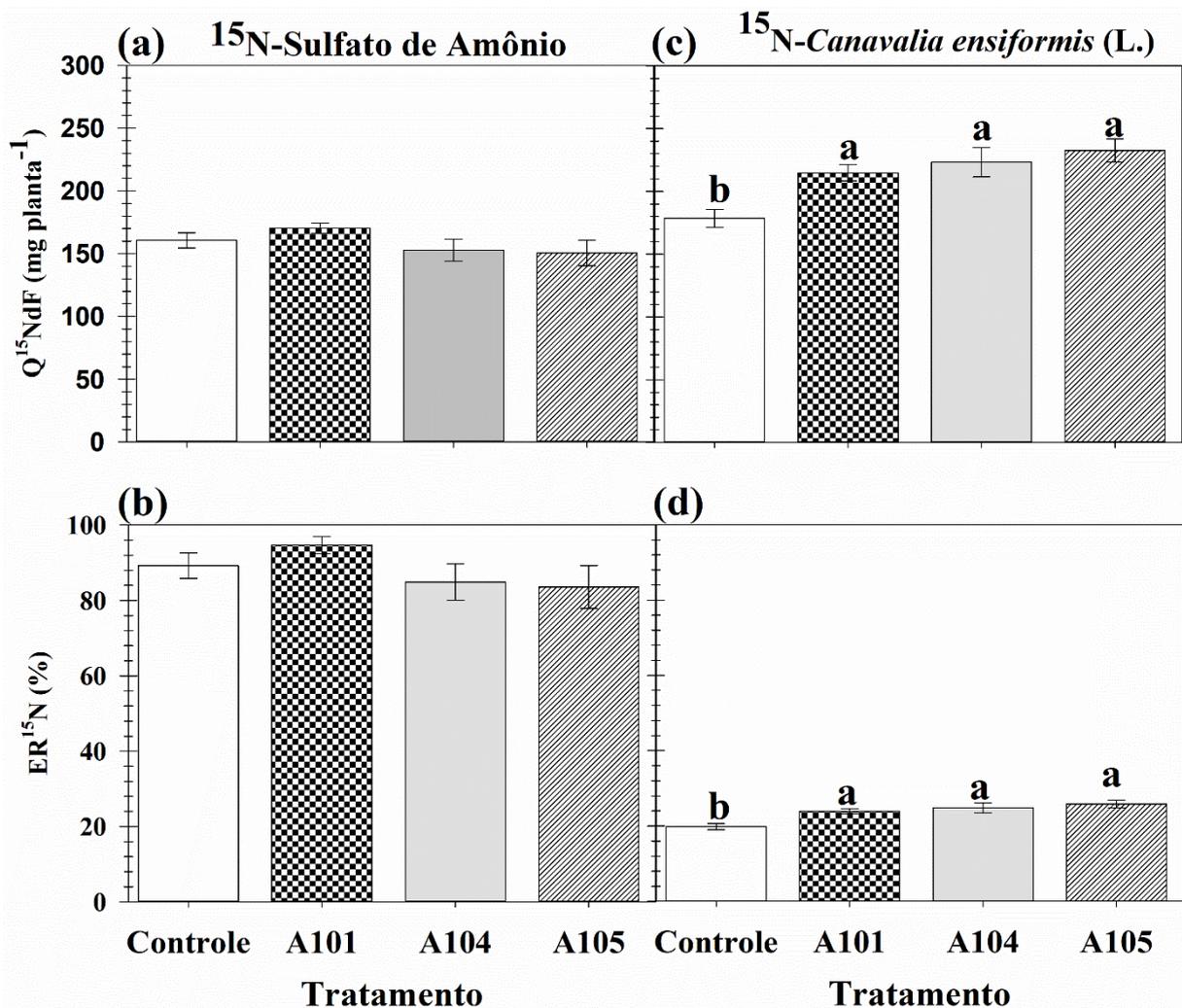
Tratamento	Biomassa Seca da Parte Aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Altura da Planta (cm planta <sup>-1</sup> )	Número de Folhas (unid. planta <sup>-1</sup> )	Área Foliar Total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	Diâmetro do Colo (cm planta <sup>-1</sup> )
Controle	16,9±0,6	63±1,82	14±0,66	1727±61 b	10±0,60
A101	17,1±0,6	68±1,38	15±0,73	2041±59 a	10±0,28
A104	18,4±0,5	67±2,07	16±0,51	2044±132 a	10±0,26
A105	17,4±0,5	67±0,81	16±0,40	2016±61 a	11±0,56
CV (%)	12,13	5,37	8,6	9,61	10,21

Médias ± SE (n=5) seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, p<0,05). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. SE: erro padrão. CV%: coeficiente de variação.

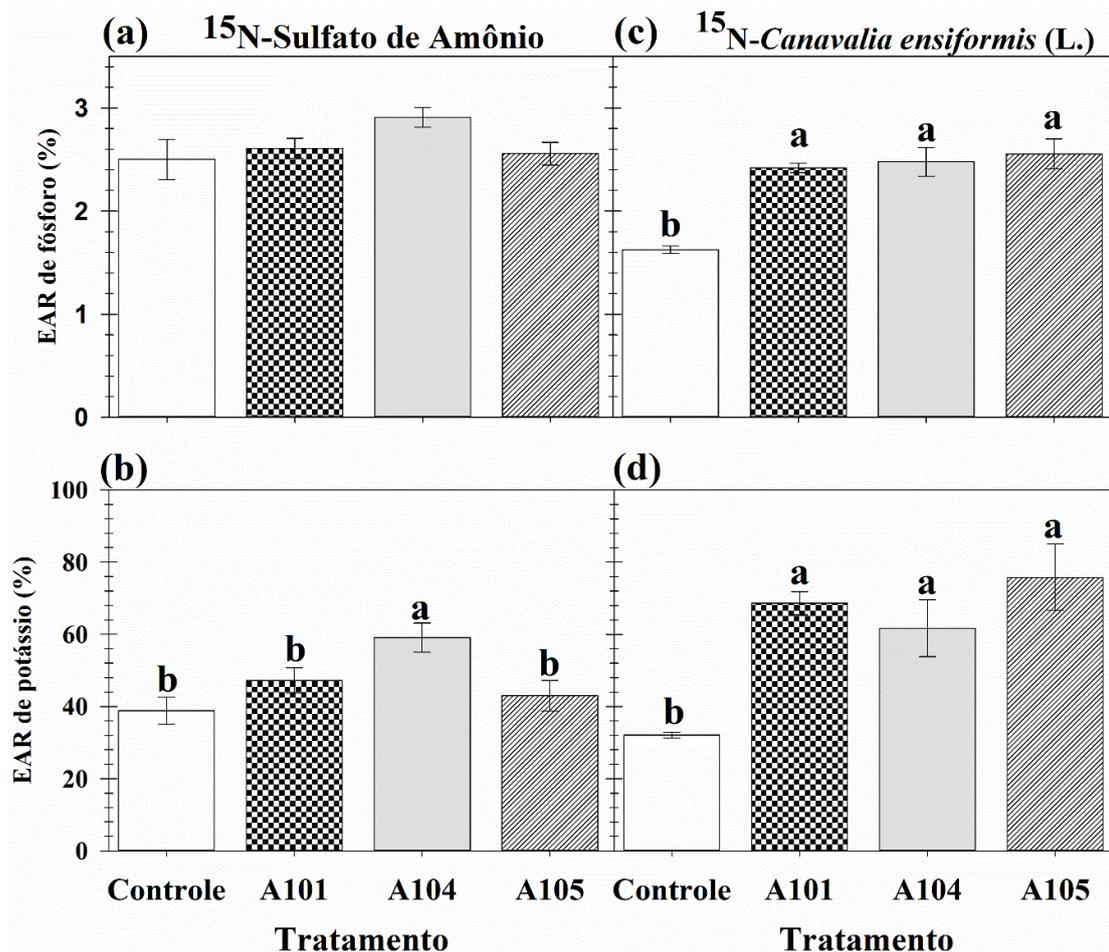
### 3.5.3 Eficiência de recuperação do $^{15}\text{N}$ , P e K

De uma maneira geral, as plantas de tomate não inoculadas (controle) e as inoculadas recuperaram  $^{15}\text{N}$  da fonte inorgânica ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio) mais eficientemente do que o da fonte orgânica ( $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* finamente triturada) (Figura 6). Entretanto, o efeito da inoculação com fungos DSE sobre o  $^{15}\text{N}$  foi evidente e significativo apenas quando as plantas de tomate foram adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* finamente triturada (Figura 6). A quantidade e a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$  derivado de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* finamente triturada na parte aérea do tomate foi significativamente incrementada na inoculação de fungos DSE em 20 a 30% respectivamente, comparativamente ao tratamento não inoculado (Figuras 6c, d). Ao contrário, as plantas de tomate adubadas com a fonte inorgânica de N não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto à quantidade e a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$  derivado de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio.

Na presença de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis*, os isolados de fungos DSE A101, A104 e A105 incrementaram significativamente a eficiência aparente de recuperação P e K em 49, 52 e 57% e em 114, 92 e 136%, respectivamente, relativamente às plantas controle não inoculadas (Figura 7). Entretanto, na presença de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, apenas a eficiência aparente de recuperação do potássio foi incrementada em 52% no fungo A104.



**Figura 6.** Quantidade ( $Q^{15}\text{NdF}$ ) e eficiência de recuperação ( $ER^{15}\text{N}$ ) do nitrogênio derivado de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio ou  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada na parte aérea de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300), com 50 dias após transplântio, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* A101, A104 e A105 e adubada com fonte inorgânica ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio (a) e (b), respectivamente) ou orgânica (*Canavalia ensiformis* [L.]- $^{15}\text{N}$  finamente triturada, (c) e (d), respectivamente). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).

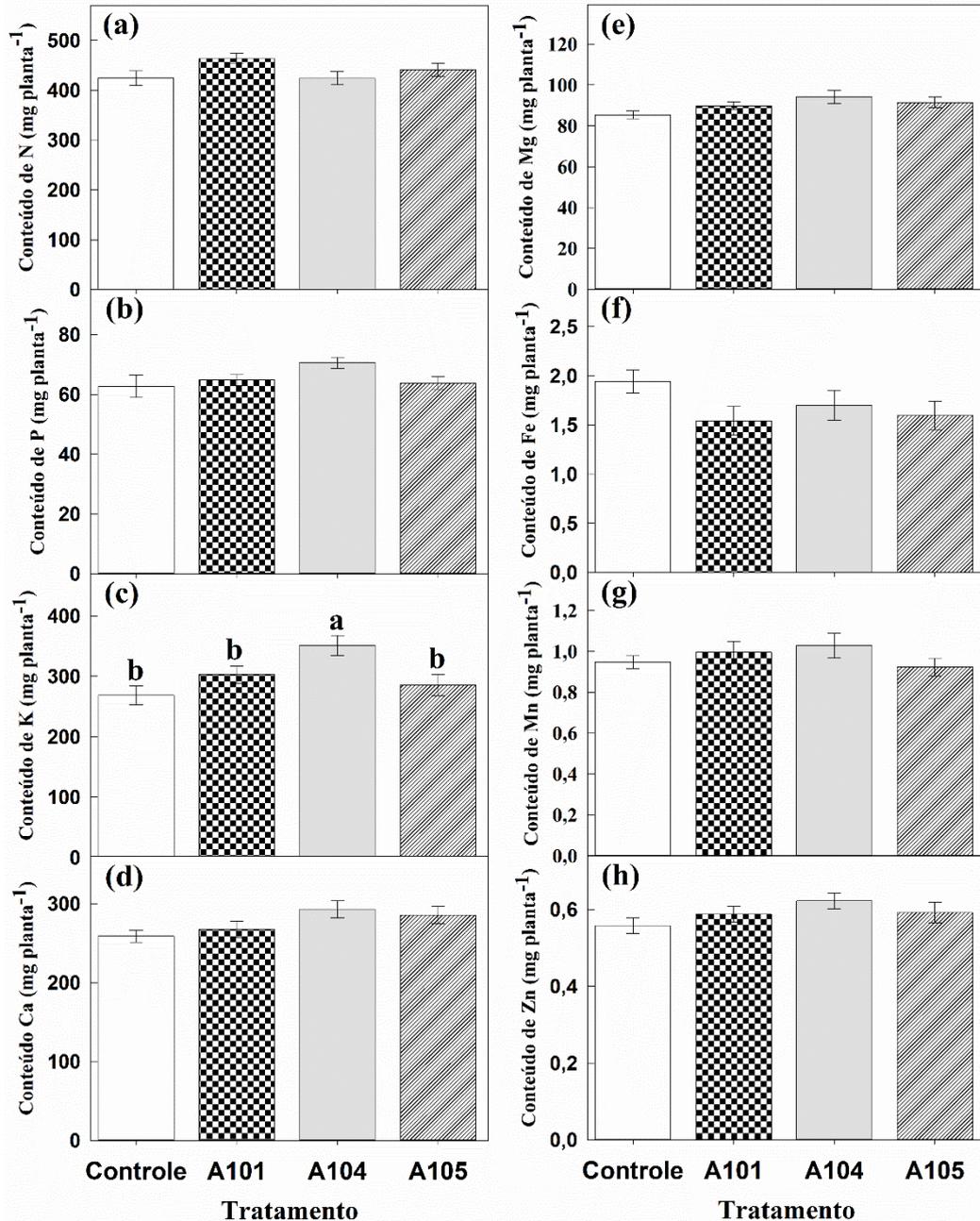


**Figura 7.** Eficiência aparente de recuperação (EAR) de P e K, aos 50 dias após o transplante, de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* A101, A104 e A105 e adubadas com fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, (a), (b), respectivamente) ou orgânica (*Canavalia ensiformis* [L.]- $^{15}\text{N}$  finamente triturada, (c), (d), respectivamente). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).

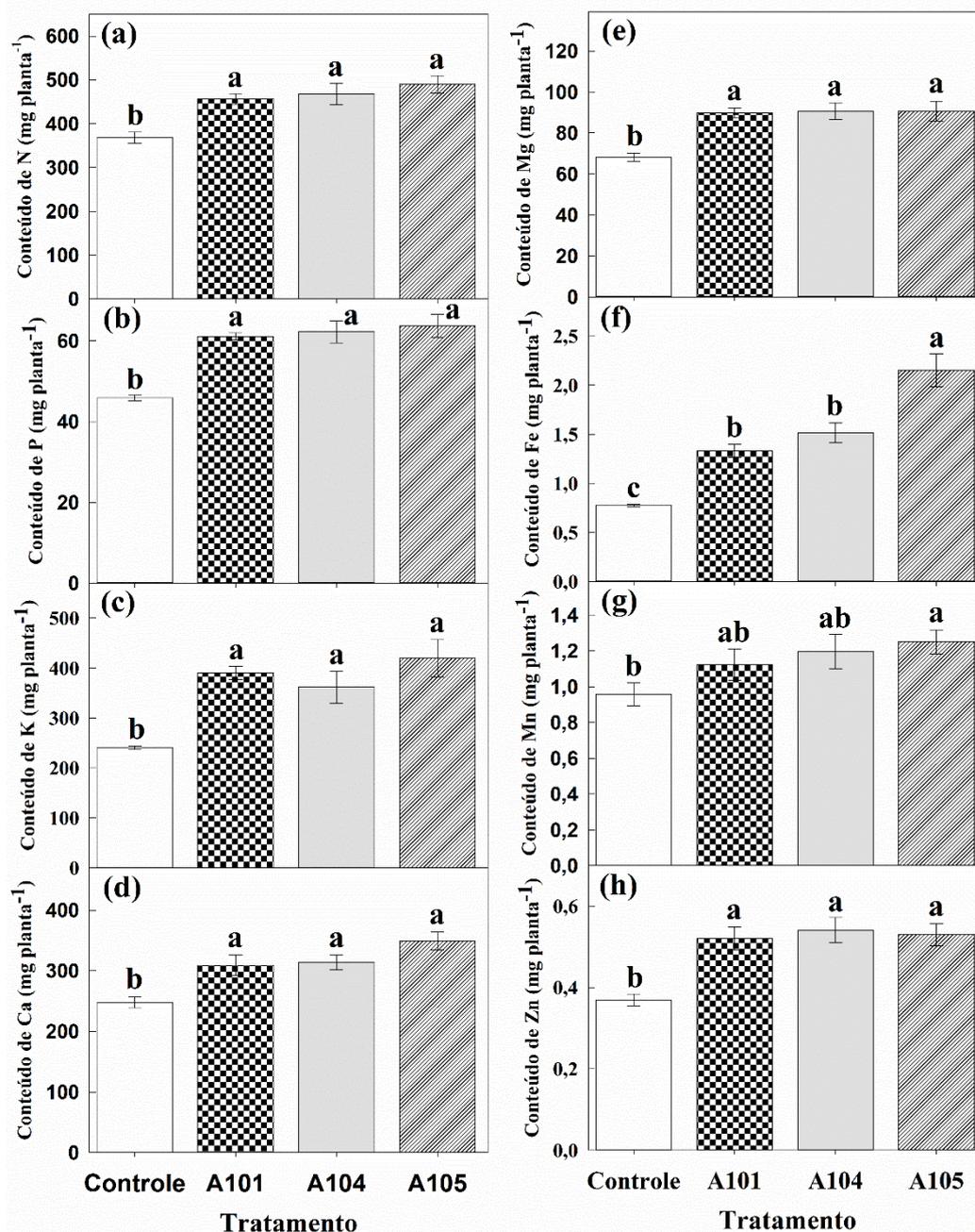
### 3.5.4 Acúmulo de macro e micronutrientes

Com relação ao acúmulo de nutrientes, os tratamentos de inoculação não afetaram os conteúdos de N, P, Ca, Mg, Fe, Mn, e Zn (Figura 8a-b e 8d-h) quando  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio foi aplicado, o que corrobora a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$  (Figura 6b) e P (Figura 7a) observada. Ao contrário, a inoculação com o fungo A104 levou a um acúmulo de potássio significativamente maior (um incremento de cerca de 30%) comparativamente ao tratamento controle e aos demais tratamentos (Figura 8c), assim, corroborando a alta eficiência aparente de recuperação de K neste tratamento (Figura 7b). Por outro lado, a interação DSE – tomate levou a um acúmulo significativamente maior de N, P, K, Ca, Mg, Fe (Figura 9a-f), e Zn (Figura 9h) relativamente ao tratamento controle, quando a fonte orgânica de N foi suplementada às plantas. Além disso, a inoculação com A105 resultou em alto acúmulo de Mn (Figura 9g) quando comparado com o tratamento controle, mas similar ao dos outros tratamentos de inoculação. Quanto aos conteúdos de N, P e K, os incrementos variaram de 24

a 33%, 33 a 39%, e 62 a 74%, respectivamente, corroborando a eficiência de recuperação do K, P derivado do adubo mineral e  $^{15}\text{N}$  derivado de *C. ensiformis* finamente triturado (Figura 6d). Com relação aos conteúdos de Ca, Fe, Mn, e Zn, os incrementos variaram de 25 a 41%, 72 a 178%, 17 a 31% e 41 a 46%, respectivamente, enquanto o conteúdo de Mg foi incrementado em 30%.



**Figura 8.** Conteúdo de N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e), Fe (f), Mn (g) e Zn (h) aos 50 dias após o transplante de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* A101, A104 e A105 e adubadas com fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t ( $p < 0.05$ ). A variável com valores sem letra não foi influenciada significativamente pelos tratamentos, de acordo com o teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erro representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).



**Figura 9.** Conteúdo de N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e), Fe (f), Mn (g) e Zn (h) aos 50 dias após o transplante de plantas de tomate (cv. Santa Clara I-5300) sem e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* A101, A104 e A105 e adubadas com fonte orgânica de N (<sup>15</sup>N-*Canavalia ensiformis* [L.] finamente triturado). Em cada gráfico de barras, valores seguidos pela mesma letra minúscula não diferem pelo Teste t (p<0,05). Barras de erro representam o erro padrão da média (n=5).

### 3.6 DISCUSSÃO

Os fungos DSE testados neste estudo foram obtidos de arroz silvestre (*O. glumaepatula*) coletado na região amazônica e identificados pela filogenia do ITS como pertencentes à ordem *Pleosporales* (subordem *Massarineae*) (A104 e A105) e um táxon desconhecido (A101) (RIBEIRO, 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). Estes fungos foram capazes de colonizar as raízes de plantas de tomate sem nenhum sintoma negativo, mesmo com as hifas colonizando as células da epiderme e o córtex de plantas e formando microescleródios em células de raízes. Outros estudos também relataram a colonização de fungos DSE nas células da epiderme e córtex de raízes de plantas de tomate sem sintomas de patologias (ANDRADE-LINARES, D. R. et al., 2011; MAHMOUD; NARISAWA, 2013).

O presente estudo mostrou, a exemplo de trabalhos anteriores sobre a resposta da planta à inoculação com fungos DSE (DIENE et al., 2013; MAHMOUD; NARISAWA, 2013; USUKI; NARISAWA, 2007), que a inoculação com fungos DSE incrementou a massa seca da parte aérea de tomate quando as plantas foram suplementadas com uma fonte orgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis*), não tendo sido observado o mesmo efeito quando as plantas receberam a fonte inorgânica de N ( $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio). Ao contrário, ANDRADE-LINARES, DIANA ROCIO et al. (2011), mostraram que a *Leptodontidium orchidicola* é capaz de incrementar a massa seca da parte aérea de plantas de tomate, assim como a massa e o conteúdo de glicose de seus frutos, mesmo quando as plantas foram cultivadas na presença da fonte inorgânica de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3^-$ ).

Em uma meta-análise realizada a partir de 18 estudos conduzidos independentemente, foi confirmado que a planta inoculada com fungos DSE criteriosamente selecionados, responde positivamente se a mesma for suprida com fontes orgânicas de N; apresentando incremento na massa seca e conteúdo de N e P que varia de 26 a 106% (NEWSHAM, 2011). Da mesma forma, neste estudo que foi conduzido em condições de casa de vegetação e de solo não esterilizado foi observado que a interação DSE-tomate foi mais eficiente no aproveitamento do N de fonte orgânica, aumentando a quantidade deste nutriente na planta derivado do  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis*, a eficiência de recuperação (ER) de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis*, P-fertilizante e K-fertilizante pela planta, o conteúdo de N, P, K, Ca e Mg, a altura da planta, número de folhas e área foliar total (no fungo A104) e propiciando incrementos na massa seca que variaram de 25% a 41% comparativamente ao controle. Estes resultados indicam que os fungos DSE A101, A104 e A105 podem auxiliar a planta de tomate a se nutrir e a crescer quando adubada com fonte orgânica de N. Ao contrário, quando as plantas foram supridas com fonte inorgânica de N, apenas foi observado efeito positivo da inoculação sobre a eficiência de recuperação de K-fertilizante pela planta, conteúdo de K, área foliar e as demais variáveis avaliadas apresentaram um efeito neutro, sugerindo que a cultivar Santa Clara I-5300 não precisa do fungo para absorção de N prontamente assimilável como  $\text{N-NH}_4^+$ , uma vez que os programas de melhoria sempre buscaram por plantas mais responsivas à adubação mineral. Em estudo realizado anteriormente em condições controladas também não foram observados incrementos significados no conteúdo de N da parte aérea usando-se fontes inorgânicas de N (TORRES-JÚNIOR, 2014), embora as condições experimentais tenham sido diferentes deste estudo.

A habilidade dos fungos DSE em promover o crescimento e incrementar o conteúdo de N e outros nutrientes em plantas de tomate adubadas unicamente com  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* como fonte de N sugere que estes fungos sejam capazes de degradar compostos orgânicos de

C, N e P, disponibilizando macro e micronutrientes para planta. De fato, há relatos na literatura de que os fungos DSE degradam compostos orgânicos tais como celulose, amido, proteína, lipídios, casaminoácidos, gelatina, ureia e pectina em condições *in vitro* (CALDWELL; JUMPPONEN; TRAPPE, 2000; MANDYAM, K.; LOUGHIN; JUMPPONEN, 2010; MENKIS et al., 2004; SURONO; NARISAWA, 2017) e de que promovem crescimento de diversas espécies vegetais suplementadas unicamente com fonte orgânica de N (aminoácidos) ou fonte orgânica de P (fitato) em condições *in vitro* (DIENE et al., 2013; MAHMOUD; NARISAWA, 2013; SURONO; NARISAWA, 2017; USUKI; NARISAWA, 2007). Recentemente, três isolados de *Phialocephala fortinii* promoveram o crescimento de *Asparagus officinalis* (L.) em meio ágar suplementado unicamente com solução de milho macerado (0,1%) ou com solução de milho macerado modificada com nutrientes inorgânicos (SURONO; NARISAWA, 2017). Embora a preferência em degradar determinada fonte orgânica de nutriente possa diferir entre as espécies de fungos DSE (DIENE et al., 2013; SURONO; NARISAWA, 2017), a literatura sugere que os fungos DSE podem mineralizar compostos orgânicos em formas de N e P disponíveis para as plantas. Recentemente foi demonstrado que os fungos DSE são capazes de mineralizar compostos orgânicos de P em condições *in vitro* (DELLA MONICA et al., 2015); entretanto, os mecanismos que levam ao incremento do crescimento de plantas inoculadas por fungos DSE ainda não são totalmente compreendidas.

O maior conteúdo e eficiência aparente de recuperação de potássio observada tanto na adubação com <sup>15</sup>N-sulfato de amônio (para o fungo A104), quanto com <sup>15</sup>N-C. *ensiformis* (em todos os tratamentos de inoculação) mostra que a interação DSE-tomate é mais responsiva ao K comparativamente aos demais nutrientes avaliados neste estudo. Não por acaso, o K é o cátion mais requerido pela planta e mais abundante no citosol e na matéria seca da planta (MARSCHNER, 1995; MEURER, 2006). O K atua em diversos processos fisiológicos no vegetal, tais como a fotossíntese, a ativação de mais de 60 sistemas enzimáticos; regulação da abertura e fechamento dos estômatos, crescimento e alongamento celular pela geração do turgor celular; síntese proteica (MARSCHNER, 1995).

Para que a absorção de K efetivamente ocorra, o K é transportado da solução do solo até a superfície radicular predominantemente por meio da difusão; e da mesma forma, o fluxo de massa pode ter contribuição significativa no transporte quando a concentração de K na solução do solo é elevada (BARBER, 1995; RUIZ; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 1999). Entretanto, a difusão é limitada a distâncias muito curtas da superfície da raiz, normalmente em torno de 1 a 4 mm (MEURER, 2006; TAIZ et al., 2017). Portanto, os maiores conteúdos e eficiência aparente de recuperação de potássio observados nos tratamentos de inoculação são fortes indícios de que estes fungos auxiliaram a planta de tomate a absorver o potássio provavelmente pela transposição da zona de depleção e interceptação do K em locais distantes e inatingíveis pela superfície radicular.

O maior conteúdo de K e N tem relação direta com a maior área foliar total da planta, uma vez que enquanto o K age sobre extensão celular, o N atua na alongamento foliar, o que resulta em ambos os casos em maior área foliar (CHAPMAN; LEMAIRE, 1993; MEIRI; SILK; LÄUCHLI, 1992; NETO; MONTEIRO; DECHEN, 2007) e conseqüentemente em maior exposição da planta à luz solar (NETO et al., 2007). Ao contrário de estudos anteriores (DIENE et al., 2013; MANDYAM, K. et al., 2010; MELIN, 1922; STOYKE; CURRAH, 1991; WILCOX; WANG, 1987), efeitos negativos da inoculação por fungos DSE no crescimento da planta não foram observados no presente estudo.

Os fungos DSE também podem facilitar a absorção de micronutrientes, como o ferro, presente no solo (BARTHOLDY; BERRECK; HASELWANDTER, 2001; HASELWANDTER, 2009). De fato, neste estudo, além de incrementar o conteúdo do Fe que variou de 72 a 178%, a inoculação incrementou o conteúdo de Mn e Zn, que variou de 17 a

25% e 41 a 46%, respectivamente. O incremento no conteúdo de Fe, Mn e Zn pela inoculação está relacionado ao melhor aproveitamento destes micronutrientes na sua fonte (solo, FTE BR12 e <sup>15</sup>N-*C. ensiformis*). BARTHOLDY et al. (2001) observaram que o fungo DSE, *Phialocephala fortinii*, sintetizou o sideróforo hidroxamato e incrementou a absorção de Fe (III) na planta hospedeira. O ferro absorvido pela planta participa de reações de oxidorredução em hemoproteínas, como citocromos e em proteínas não hémicas como ferredoxina (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). A ferredoxina e citocromos são transportadores de elétrons que atuam na fotossíntese (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). O Zn e Mn também atuam em enzimas envolvidas no metabolismo de carbono. Por exemplo, o Zn é constituinte estrutural da anidrase carbônica que catalisa a dissolução de CO<sub>2</sub> (uma etapa prévia à sua assimilação) e participa na ativação enzimática da trifosfato-desidrogenase, enzima esta, que é essencial na glicólise. O Mn participa do fotossistema II (no complexo mangânico) sendo responsável pela fotólise da água (BROADLEY et al., 2012) e atualmente tem sido reconhecido como indicador de eficiência de aquisição de P por plantas (LAMBERS et al., 2015). Portanto, o incremento no conteúdo de Fe, Mn e Zn corrobora estudos prévios (BAN et al., 2017; ZHANG, H.-H. et al., 2012) que sugerem o envolvimento dos fungos DSE na atividade fotossintética através do incremento dos níveis de clorofila, eficiência fotoquímica do fotossistema II, taxa fotossintética líquida, condutância estomática, taxa de transpiração, fato este, que melhor explica os maiores conteúdos de glicose no tomate (ANDRADE-LINARES, DIANA ROCIO et al., 2011) e açúcares solúveis em plantas arroz (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017) inoculadas com fungos DSE.

De uma maneira geral, quando as plantas de tomate foram adubadas com <sup>15</sup>N-*C. ensiformis* houve diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação, se destacando o fungo A104, o qual ocasionou maior número de folhas e área foliar das plantas, e o fungo A105 que proporcionou maior conteúdo de ferro nas plantas. Por outro lado, quando as plantas receberam <sup>15</sup>N-sulfato de amônio, diferenças significativas para o conteúdo e eficiência aparente de recuperação de potássio foram observadas, se destacando o fungo A104. Estas diferenças sugerem que a resposta da planta à inoculação de fungos DSE pode ser dependente da espécie a que isolado pertence, ou até mesmo, ser independente, quando houver alta diversidade intraespecífica entre diferentes isolados de uma única espécie e, este fato tem sido observado em FMA (MENSAH et al., 2015).

### 3.7 CONCLUSÃO

A análise conjunta dos dados revelou que as plantas de tomate inoculadas com fungos DSE foram mais eficientes em obter nutrientes a partir de *C. ensiformis* finamente triturada e, também do solo, resultando em maior crescimento quando comparado com plantas não inoculadas. Nossos dados sugerem que a inoculação com fungos DSE auxilia no crescimento do tomate através da otimização da absorção de macro e micronutrientes, em especial quando o N é aplicado à planta através de fontes orgânicas, que é essencial para o sistema de agricultura orgânica ou agricultura familiar, muito comum nos países em desenvolvimento. Entretanto, ainda há necessidade de um entendimento mais detalhado das interações bioquímicas e moleculares da interação fungos DSE-tomate, além da duração dos efeitos positivos da inoculação, de forma que a aplicação de fungos DSE possa ser uma prática usual na cultura do tomate. O isolado A104 parece ser uma melhor opção para a inoculação do tomate cv. Santa Clara I-5300, uma vez que os melhores resultados foram obtidos com este fungo.

## 4 CAPÍTULO II

### **FUNGOS ENDOFÍTICOS *DARK SEPTATE* INCREMENTAM A EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DO <sup>15</sup>N-ADUBO VERDE, CONTEÚDO DE N E MICRONUTRIENTES EM PLANTAS DE ARROZ**

## 4.1 RESUMO

O entendimento da interação fungos *dark septate*-arroz, pode originar práticas agrícolas sustentáveis, para elevação de produtividade, qualidade e melhoria do valor nutricional do grão do arroz; contribuindo para resolução de problemas de deficiência de micronutrientes que assolam países emergentes e ao mesmo tempo aproveitar melhor os insumos aplicados. Entretanto, esta interação ainda é pouco compreendida. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o acúmulo de macro e micronutrientes, matéria seca e proteína e a eficiência recuperação do nitrogênio de  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada pela cultura do arroz inoculada com fungos *dark septate*. Um experimento sob condições de casa de vegetação foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso com parcelas subdividas, com cinco repetições de plantas de arroz em vasos contendo amostra de horizonte superficial de um Planossolo Háplico não esterilizado. Mudanças da variedade de arroz Piauí (variedade local do estado de Maranhão, Brasil) com 6 dias após germinação inoculadas com fungos *dark septate* (isolados A101 e A103) e não inoculadas (controle) foram transplantadas para vasos contendo 12 kg solo que havia recebido anteriormente biomassa seca da parte aérea finamente triturada de *C. ensiformis* enriquecida com 2.15 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . Duas coletadas foram realizadas no experimento; uma aos 54 dias após o transplante e outra no estágio de maturação. Indicadores de crescimento (aos 54 dias após o transplante) e de rendimento de grãos (no estágio de maturação, ou seja, 130 dias após o transplante), conteúdo de nutrientes, eficiência de recuperação e quantidade de nitrogênio derivado de *C. ensiformis* foram quantificados. Aos 54 dias após o transplante, além das plantas inoculadas incrementarem significativamente o conteúdo de N, teor de clorofila e altura da planta relativamente ao controle, as mesmas foram mais hábeis no aproveitamento de nitrogênio derivado *C. ensiformis* e; da mesma forma, no estágio de maturação, o fungo A103 se destacou com a eficiência e quantidade de N derivado do *C. ensiformis*, conteúdo de N no grão e parte aérea igual ao A101 e maior do que o controle, resultando em maior acúmulo de proteína bruta e matéria seca do grão cheio e panícula na interação DSE-arroz. Além disso, o conteúdo de Fe e Ni no grão da interação DSE-arroz dobrou relativamente ao controle, sendo que na inoculação com A103 ainda foi possível observar acúmulo de Mn três vezes maior do que o dos demais tratamentos. Os fungos A101 e A103 são benéficos para a variedade de arroz Piauí.

**Palavras-chave:** *Canavalia ensiformis* (L.).  $^{15}\text{N}$ . *Oryza sativa*. Níquel. Ferro. Fungos DSE. Manganês. Grão. Nitrogênio. Adubo verde.

## 4.2 ABSTRACT

An understanding of the interaction between rice and dark septate endophytic fungi may lead to sustainable agricultural practices, increased yields and quality, and improvements in the nutritional value of rice grains. This in turn will contribute to resolving micronutrient deficiency problems in emerging countries, and also to facilitate a better use of applied inputs. Nevertheless, this interaction is still poorly understood. Therefore, in this study, we aimed to evaluate the accumulation of macro- and micronutrients, dry matter, and protein and the efficiency of nitrogen (N) recovery of finely ground *Canavalia ensiformis* (L.)-<sup>15</sup>N in rice inoculated with dark septate endophytic fungi. An experiment under greenhouse conditions was conducted in a randomized complete block design comprising subdivided plots, with five replicates of rice plants potted in non-sterile soil. Six days after germination, Piauí rice seedlings (a local variety from Maranhão State, Brazil) were inoculated with dark septate fungi (isolates A101 and A103) or left uninoculated (control) and transplanted into pots containing 12 kg of material from the surface horizon of a Fragiudult soil, which had previously been supplemented with finely crushed dry biomass of the aerial parts of *Canavalia ensiformis* enriched with 2,15 atoms % <sup>15</sup>N. Two collections were performed in the experiment: one at 54 days after transplanting and one at plant maturation. Growth indicators (at 54 days after transplanting) and grain yield (at maturation), nutrient content, recovery efficiency, and the amount of N derived from *C. ensiformis* were quantified. At 54 days after transplanting, the N content, chlorophyll content, and plant height of inoculated plants had increased significantly compared with the control, and these plants were more proficient in the use of N derived *C. ensiformis*. At the plant maturation, plants inoculated with the fungal isolate A103 were distinguished by the recovery efficiency and quantity of N derived from *C. ensiformis*, with N content in the grain and aerial parts being equal to that in plants inoculated with fungal isolate A101 and higher than that in the control, resulting in a higher accumulation of crude protein and dry matter in the full grain and panicle of rice inoculated with dark septate endophytic fungi. In addition, the content of Fe and Ni in the grains of rice inoculated with these fungi doubled with respect to the control, and in those plants inoculated with A103, we observed Mn accumulation that was three times higher than in the other treatments. These observations indicate that the fungal isolates A101 and A103 are beneficial to the Piauí rice variety.

**Keywords:** *Canavalia ensiformis* (L.). <sup>15</sup>N. *Oryza sativa*. Nickel. Iron. DSE fungi. Manganese. Grain. Nitrogen. Green manure.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O arroz, ao lado do milho e trigo é o cereal mais importante no mundo e, consumido por mais da metade da população (FAO, 2016), visando o suprimento de amido e proteínas (FITZGERALD; MCCOUCH; HALL, 2009; TIAN, Z. et al., 2009). Entretanto, a produção do arroz depende do uso intensivo de fertilizantes, em especial os nitrogenados, que via de regra, possuem baixa eficiência de recuperação, sendo aproximadamente a metade sujeita a perdas (LASSALETTA et al., 2014), que geram problemas ambientais e financeiros (CHARDON; NOEL; MASCLAUX-DAUBRESSE, 2012; SUTTON et al., 2013). Por outro lado, o uso da adubação verde aliada à microrganismos do solo, como os fungos endofíticos dark septate (fungos DSE) apresenta-se como uma estratégia economicamente positiva para produção do arroz, redução de perdas de nutrientes e melhoria da fertilidade do solo (AMBROSANO et al., 2011; CAVAGNARO et al., 2015).

Os fungos DSE, um grupo diverso de endófitos cosmopolitas, são ascomicetos conidiais ou estéreis, que de uma forma geral, apresentam micélio marrom a mais escura e hifas septadas melanizadas. São capazes de colonizar raízes de plantas de forma intercelular e intracelular, eventualmente formar microescleródios, e podem promover o crescimento da planta hospedeira sem ocasionar sintomas de doenças (DIENE et al., 2013; JUMPPONEN, ARI, 2001; JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998; KNAPP et al., 2015; THORMANN; CURRAH; BAYLEY, 1999; WILSON et al., 2004). Estes fungos colonizam aproximadamente 600 espécies de plantas de 320 gêneros e 114 famílias (JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998). Na família *Poaceae*, por exemplo, fungos DSE isolados de raízes saudáveis do arroz silvestre (*Oryza granulata* Nees et Arn. ex Watt. e *Oryza glumaepatula* Steud.) são capazes de colonizar o arroz comercial (*Oryza Sativa* [L.]) e promover seu crescimento, sem no entanto, desencadear qualquer sintoma de doença (PEREIRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; SANTOS, S. G. et al., 2017; YUAN, Z. L. et al., 2010).

Os efeitos positivos de inoculação de plantas com fungos DSE são mais evidentes em plantas supridas com fontes orgânicas de N e P do que com fontes inorgânicas (NEWSHAM, 2011; QIN et al., 2017; SURONO; NARISAWA, 2017). Os compostos orgânicos estimulam o carácter saprofítico destes fungos, que passam a secretar uma série de enzimas, tais como as endoglucanases, celulasas, amilases, pectinases, lacases, e metabólitos secundários que quebram compostos complexos de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), tais como celulose, amido, proteína e fitato e os converte em nutrientes para a absorção da planta hospedeira (ADEOYO; PLETSCHKE; DAMES, 2017; BERTHELOT et al., 2016; CALDWELL et al., 2000; CHOI; HODGKISS; HYDE, 2005; DOOLOTKELDIEVA; BOBUSHEVA, 2011; JUMPPONEN, ARI; MATTSON; TRAPPE, 1998; JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998; MANDYAM, K. et al., 2010; SURONO; NARISAWA, 2017; UPSON et al., 2009; USUKI; NARISAWA, 2007). Entretanto, apesar da literatura indicar que os fungos DSE são capazes de auxiliar a planta hospedeira a adquirir nutrientes a partir de fontes orgânicas de N, ainda são escassos trabalhos que avaliam o crescimento e o desenvolvimento de plantas supridas com adubo verde de leguminosas, como a única fonte de N.

Em estudos anteriores, dois isolados de fungos DSE, A101 e A103, obtidos do arroz silvestre (*O. glumaepatula*) foram determinados pela filogenia do ITS como pertencentes a ordem *Pleosporales* (subordem *Massarineae*) (A103) e a um táxon desconhecido (A101) (RIBEIRO, 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). Estes fungos colonizam o

arroz silvestre (*O. glumaepatula*) e o comercial sem causar qualquer sintoma de doença (RIBEIRO, 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017).

No presente estudo, o acúmulo de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn) e matéria seca, quantidade e a eficiência de recuperação do nitrogênio na planta derivado do adubo verde  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) aos 54 dias após o transplântio (parte aérea) e no estágio de maturação (raiz, palha e grão) em plantas de arroz (variedade Piauí) inoculada pelos fungos A101 ou A103 e supridas com a parte aérea de *Canavalia ensiformis* enriquecida com  $^{15}\text{N}$  e finamente moída foram determinados em cultivo de solo em condições de casa de vegetação. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar acúmulo de macro e micronutrientes, matéria seca e proteína e a eficiência de recuperação do nitrogênio de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* pela cultura do arroz inoculada com fungos *dark septate*.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Coleta do solo, calagem e adubação

A amostra do solo foi coletada na profundidade de 0-20 cm no Sistema Integrado de Produção Agroecológica em Seropédica, Rio de Janeiro. O solo foi classificado como Planossolo Háptico (de acordo com o sistema brasileiro de classificação do solo). A análise do solo apresentou as seguintes características químicas: pH=5,47;  $Al^{3+}=0,03$  e  $H+Al=1,86$   $cmol_c dm^{-3}$ ;  $Ca^{+2}=1,21$  e  $Mg^{+2}=0,41$   $cmol_c dm^{-3}$ ;  $P=6,74$  e  $K^{+1}=36,00$   $mg L^{-1}$ ;  $N=0,05$  e  $C=0,47\%$ . Vasos com a capacidade de 14 kg que foram usados como unidades experimentais, receberam 12 kg de solo destorroado e homogeneizado. Dois meses após a aplicação do calcário (*MineralCal*), na dose de  $1,62 t ha^{-1}$  para corrigir as deficiências de  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ , o solo foi adubado com o equivalente a  $27 kg P_2O_5 ha^{-1}$  (superfosfato simples),  $13 kg K_2O ha^{-1}$  (sulfato de potássio), e  $7 kg ha^{-1}$  micronutrientes (FTE BR-12) de acordo com a recomendação para a cultura (FREIRE et al., 2013).

### 4.4.2 Adubação nitrogenada (fonte orgânica de N) marcada com $^{15}N$

A parte aérea de plantas de *Canavalia ensiformis* [L.] descrita no [item 3.4.2](#) (Capítulo I), todavia, enriquecida com 2,15% átomos de  $^{15}N$  foi utilizada para a adubação nitrogenada. Cada vaso recebeu 5,04 g de parte aérea de *C. ensiformis* finamente triturada, o equivalente a  $20 kg ha^{-1}$  de N.

### 4.4.3 Preparo do inóculo e inoculação

Os isolados (A101 e A103) de fungos endofíticos *dark septate* foram obtidos, identificados e seu inóculo preparado conforme descrito [item 3.4.3](#) (Capítulo I).

### 4.4.4 Delineamento experimental e condições de crescimento

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, com cinco repetições (cada repetição com uma planta), sob condições de casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, Brasil. Os tratamentos consistiram de plantas de arroz (variedade Piauí) crescidas sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE, A101 e A103). Todos os tratamentos foram suplementados com  $^{15}N$ -*C. ensiformis*. Piauí é uma variedade local de arroz do estado do Maranhão-Brasil, utilizada em agrossistemas com baixa entrada de N. Piauí tem baixa constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para o nitrato (SANTOS, LEANDRO AZEVEDO et al., 2011), especialmente quando é inoculada com o fungo endofítico *dark septate*, A103 (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017) e alta eficiência de remobilização do nitrogênio (SOUZA; STARK; FERNANDES, 1998). As sementes de arroz foram inicialmente lavadas com álcool 70% por cinco minutos e desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos, seguidas por sucessivas lavagens com água destilada autoclavada (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017) e posteriormente pré – germinadas em ágar – água ( $8 g L^{-1}$ ) a  $28 ^\circ C$  visando selecionar plântulas homogêneas.

Plântulas homogêneas de arroz (6 dias após a germinação) foram inoculadas com fungos DSE por imersão de suas raízes em suspensão micelial (1% *m/v*), enquanto as plantas controle receberam apenas água destilada autoclavada. O solo (12 kg) do tratamento de inoculação foi também umedecido completamente com 500 mL da suspensão (1% *m/v*)

contendo o micélio fresco, enquanto o tratamento controle apenas recebeu a água destilada autoclavada. Os vasos foram regados diariamente com 500 mL de água destilada para manter a umidade do solo próxima da capacidade de campo.

#### 4.4.5 Observações de sintomas de patogenicidade e de colonização de raízes

As raízes das plantas de arroz inoculadas com os fungos A101 e A103 foram lavadas e fixadas em etanol a 50% para confirmar se foram colonizadas por estes fungos DSE. Em seguida, as amostras foram embebidas (de forma consecutiva) em hidróxido de potássio (2,5%) e ácido clorídrico (1%) e acondicionadas à temperatura ambiente durante uma noite. Posteriormente, foram coradas com 0,002% (*m/v*) de azul de metila [uma mistura de 10: 9: 1 glicerol/água destilada/ácido clorídrico; GRACE; STRIBLEY (1991)]. Segmentos de raízes de aproximadamente 4 cm foram colocadas em lâminas com glicerina e as hifas e outras estruturas destes fungos foram observadas com microscópio ótico Axioplan (Carl Zeiss, Jena, 151 Alemanha) equipado com uma câmera digital AxioCam MRC5 (Carl Zeiss). Os microescleródios e hifas intrarradiculares foram contados em 100 campos microscópicos por sistema radicular sob um aumento 200 ×. Os sintomas de doenças foram avaliados em uma escala de 0-3 (0: ausência de sintomas de doenças; 1: ligeiro amarelecimento da planta; 2: amarelecimento e crescimento tardio da planta; 3: murcha ou morte da planta) (DIENE et al., 2013; MAHMOUD; NARISAWA, 2013).

#### 4.4.6 Variáveis avaliadas

Diâmetro do colo, altura da planta, número de perfilhos e folhas, área foliar total (com medidor LI-COR, modelo LI-3100C, Nebraska, USA), teor de clorofila, massa seca (65°C, 72h), concentração de N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn e abundância de <sup>15</sup>N foram determinados na parte aérea de plantas do arroz aos 54 dias após o transplântio (DAT). A massa seca de raiz, palha, panículas, grãos cheios (umidade ajustada para 13%) e conteúdo de proteína foram medidos no estágio de maturação (130 dias após o transplântio), sendo a concentração de macronutrientes determinada na raiz, palha e grão, enquanto os micronutrientes foram determinados apenas no grão. A raiz, palha e grãos secos (65°C, 72h) foram moídos e a abundância do <sup>15</sup>N, concentração de macro e micronutrientes quantificada conforme descrito no [item 3.4.6](#) (CAPÍTULO I). O conteúdo de proteína bruta nos grãos foi obtido pela multiplicação do conteúdo de N por 5,95 (JULIANO, BIENVENIDO O. , 1985).

A fração (%), a quantidade (mg planta<sup>-1</sup>) e a eficiência de recuperação do N derivado de <sup>15</sup>N-*C. ensiformis* finamente triturada, na raiz, palha e grãos, foram quantificadas por meio das equações (2), (3) e (4) conforme descrito no [item 3.4.6](#) do capítulo I.

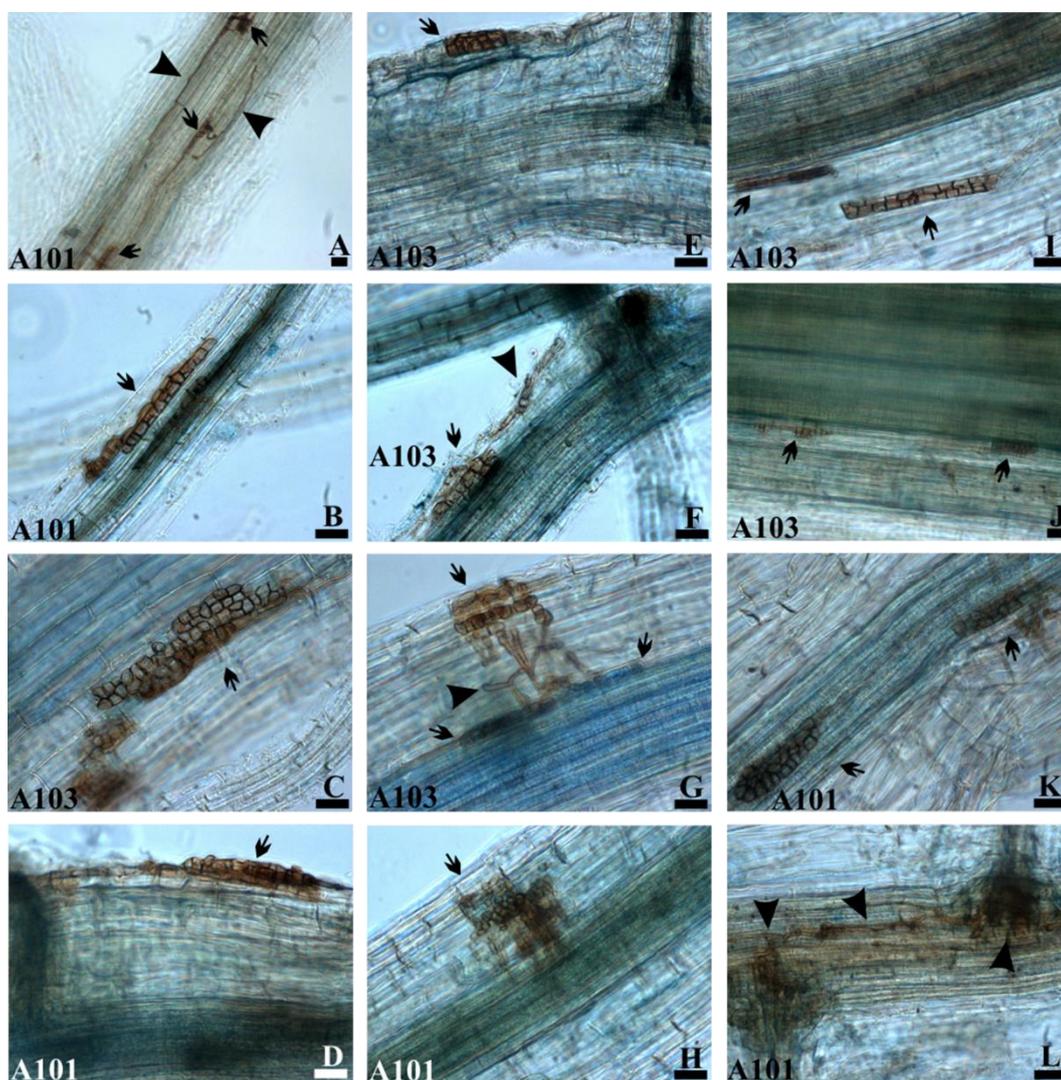
#### 4.4.7 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade (*Bartlett*) da variância, normalidade (*Shapiro-Wilk*) dos resíduos e à análise de variância (ANOVA). Quando as diferenças significativas foram indicadas pela ANOVA, as médias dos tratamentos foram separadas utilizando-se as diferenças mínimas significativas (LSD) calculadas pelo teste t ao nível de 5%. O *software* R, versão R 3.4.1 (R Development Core Team, 2017) e pacote ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013) foram usados para as análises e os dados são apresentados como média ± erro padrão.

## 4.5 RESULTADOS

### 4.5.1 Patogenicidade e colonização de raízes

Os dois isolados (A101 e A103) colonizaram abundantemente o tecido radicular de plantas de arroz ([Figuras 10 A-L](#) e [Figura 13 A](#)) com hifa colonizando a epiderme ([Figuras 10 A, F](#)), córtex ([Figura 10 G](#)) e formando microescleródios ([Figuras 10 A - L](#)), sem sintomas de doença aparente. Além disso, as hifas septadas melanizadas de A101 ([Figura 10 L](#)) colonizaram a região entre o córtex e os feixes vasculares da raiz principal, conectando duas das suas raízes laterais e formando microescleródios ([Figura 10 K](#)). Embora mais microescleródios tenham sido observados em raízes de plantas inoculadas com o fungo A103 do que com A101, a colonização total foi de aproximadamente 80% para os dois fungos DSE ([Figura 13 A](#)).



**Figura 10.** Aspectos morfológicos de raízes de arroz (variedade Piauí) inoculadas com os fungos A101 e A103. Hifas septadas melanizadas (Ponta de seta) nas células da epiderme (A e F) e córtex (G) e na região entre o córtex e os feixes vasculares da raiz

principal, conectando duas das suas raízes laterais (L). Microescleródios (seta) formados pelos fungos na epiderme (A-E e G), no córtex (F-J) e na região entre córtex e feixe vascular (K). As amostras foram coradas com 0,002% de azul de metila. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5.2 Indicadores de crescimento e acúmulo de matéria seca**

Com relação aos indicadores de crescimento e acúmulo de matéria seca, a interação DSE-arroz com 54 DAT apresentou incremento de 16% no teor de clorofila e na altura da planta que foi significativamente maior que o controle ([Tabela 3](#)), enquanto nenhum efeito foi observado no acúmulo de matéria seca da parte aérea, diâmetro do colmo, número de folhas e perfilhos e área foliar ([Tabela 3](#)). Diferente do que foi observado aos 54 DAT, no estágio de maturação se observou acúmulo significativo de matéria seca do grão cheio e panícula para a interação DSE-arroz que foi maior que o do controle, sendo que na inoculação com A101, ainda foi possível observar acúmulo de matéria seca de raiz que foi maior que o dos demais tratamentos, não havendo diferenças entre os tratamentos para o acúmulo de palha ([Tabela 4](#)).

**Tabela 3.** Indicadores de crescimento de plantas arroz (variedade Piauí), aos 54 após o transplântio, sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate*, A101 e A103 e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como a única fonte orgânica de N.

<b>Tratamento</b>	<b>Biomassa Seca da Parte Aérea (g planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Altura da Planta (cm planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diâmetro do Colo (cm planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de Folhas (unid. planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de perfilhos (unid. Planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área Foliar Total (cm<sup>2</sup> planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Clorofila</b>
<b>Controle</b>	4,5±0,25	87,2±1,36 b	11,5±0,45	18,20±0,77	4,2±0,20	439,2±31,9	34,8±1,58 b
<b>A101</b>	4,5±0,20	96,2±3,06 a	12,5±0,23	18,75±0,67	4,0±0,32	394,5±46,3	40,2±0,61 a
<b>A103</b>	4,7±0,23	94,5±1,24a	12,5±0,17	19,75±1,02	4,8±0,37	445,0±41,7	40,4±0,48 a
<b>CV (%)</b>	11,04	4,99	5,69	9,20	15,76	21,00	5,91

Médias ± SE (n=5) seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, p<0,05). A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. SE: erro padrão. CV%: coeficiente de variação.

**Tabela 4.** Massa seca de raiz e palha e massa de panículas e grãos cheios (13% de umidade) no estágio de maturação de plantas de arroz da variedade Piauí sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate* A101 e A103 e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como a única fonte orgânica de N.

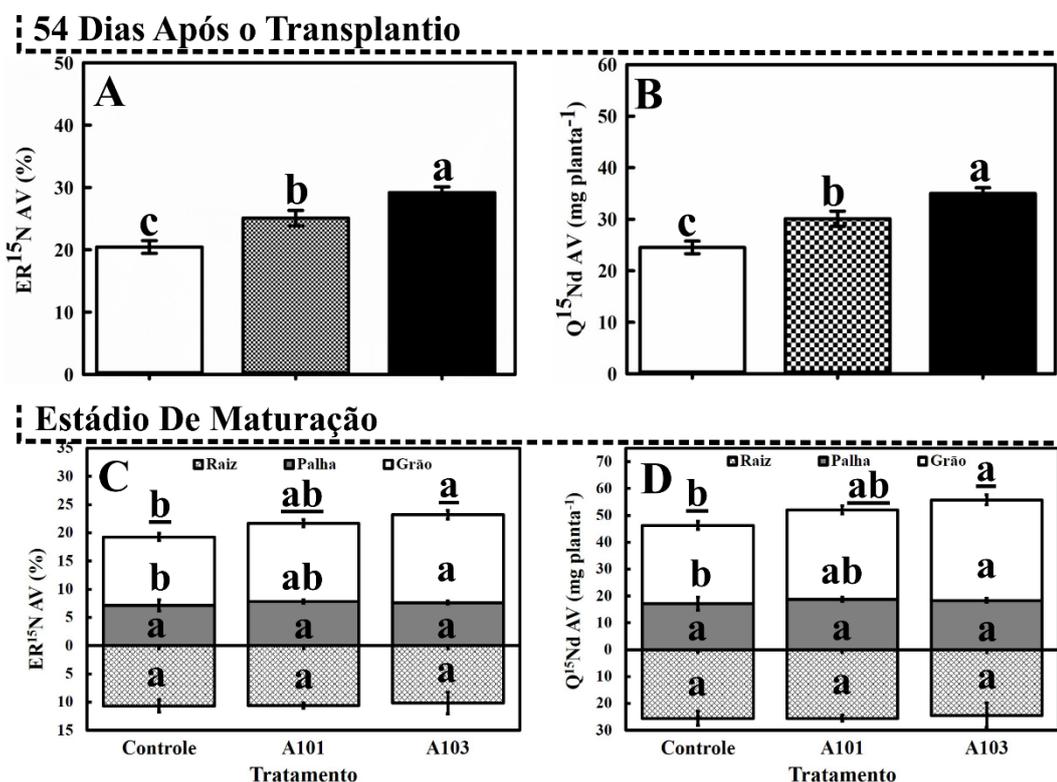
<b>Tratamento</b>	<b>Massa Seca de Raiz (g planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa Seca de Palha (g planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa de panículas (g planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa Seca de grão cheios (g planta<sup>-1</sup>)</b>
<b>Controle</b>	14,3±1,4 b	16,6±0,4	8,5±0,3 b	6,03±0,3 b
<b>A101</b>	18,0±0,7 a	17,7±0,9	10,7±0,6 a	7,51±0,4 a
<b>A103</b>	13,9±1,2 b	16,3±0,7	10,6±0,6 a	7,47±0,4 a
<b>CV (%)</b>	13,01	7,42	9,8	10,41

Médias ± SE (n=5) seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, p<0,05). A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. SE: erro padrão. CV%: coeficiente de variação.

#### 4.5.3 Eficiência de recuperação de $^{15}\text{N}$ derivado de *C. ensiformis* (L.)

Após determinar a abundância de  $^{15}\text{N}$  na matéria seca, a eficiência de recuperação e quantidade do nitrogênio derivado de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* finamente triturada na raiz, palha, grão e parte aérea foram determinados nos tratamentos sem (controle) e com inoculação com os fungos endofíticos *dark septate* (A101 e A103). Embora as plantas de arroz inoculadas com os dois fungos (A101 e A103) tenham diferido entre si, aos 54 DAT, com incrementos significativos de 23% para o A101 e 43% para o A103, na eficiência de recuperação e quantidade do nitrogênio (N) derivado do  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis*, respectivamente na parte aérea, foram mais hábeis na recuperação e no uso do N presente na  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* (Figura 11a-b), fornecido como sua única fonte de N, relativamente ao controle.

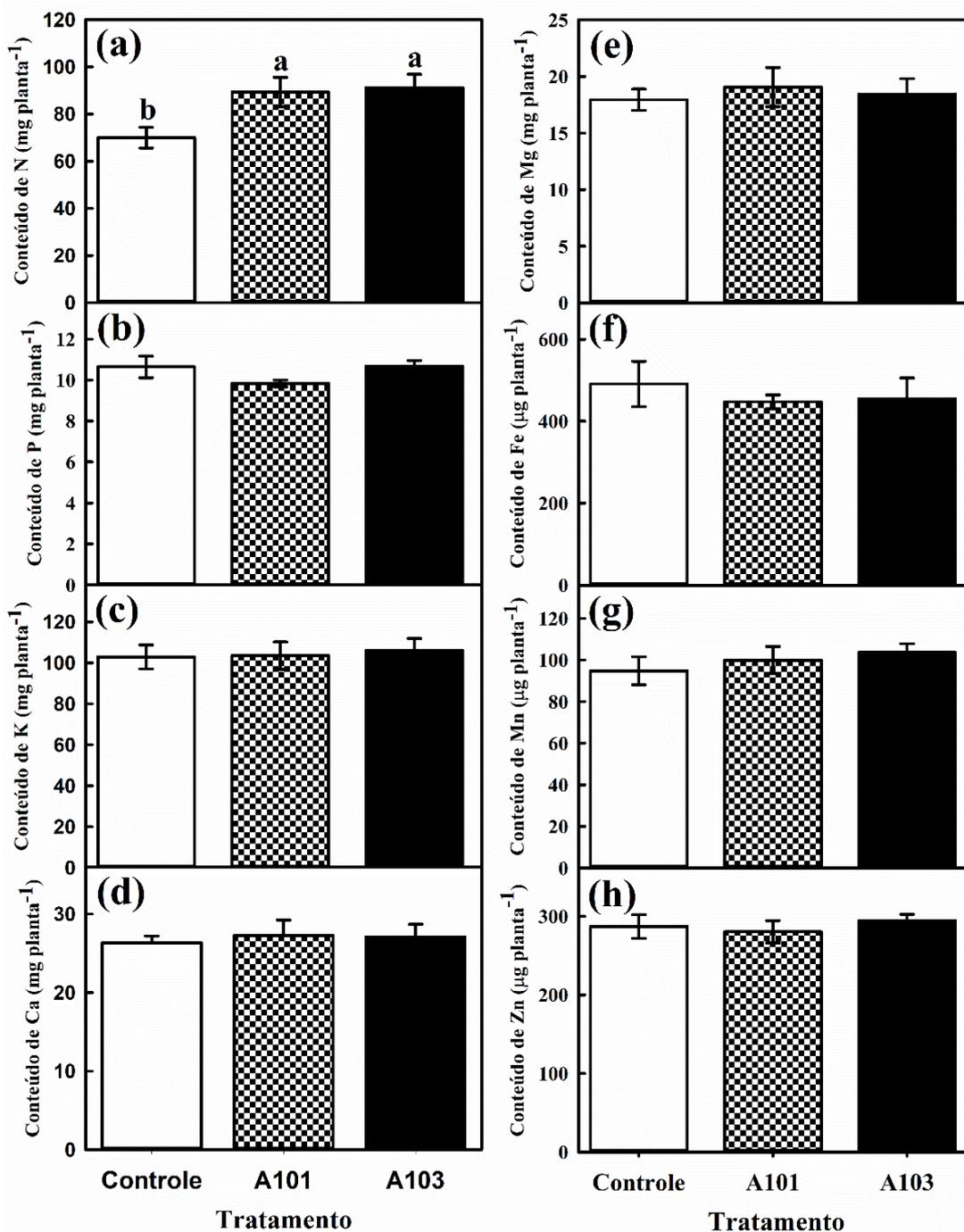
No estágio de maturação, o fungo A103 se destacou com a eficiência de recuperação e quantidade do nitrogênio derivado de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* no grão e parte aérea (palha e grão) igual ao fungo A101 e maior do que o do tratamento controle, não havendo diferenças significativas entre estes tratamentos na eficiência de recuperação e quantidade do nitrogênio derivado do  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* na raiz e palha (Figura 11c-d).



**Figura 11.** Eficiência de recuperação ( $\text{ER}^{15}\text{N AV}$ ) e quantidade ( $\text{Q}^{15}\text{Nd AV}$ ) do nitrogênio derivado da  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada na parte aérea, aos 54 dias após o transplântio (A e B, respectivamente), e na raiz, palha e grãos no estágio de maturação (C e D, respectivamente) em plantas de arroz da variedade Piauí sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate*, A101 e A103 e adubadas com  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* (L.) finamente triturada como única fonte orgânica de N. Entre os tratamentos, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). Letras sublinhadas (C e D) indicam comparação de  $\text{ER}^{15}\text{N AV}$  e  $\text{Q}^{15}\text{Nd AV}$  na parte aérea (palha + grão) entre os tratamentos. Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).

#### 4.5.4 Acúmulo de nutrientes

Aos 54 DAT, na interação DSE-arroz houve acúmulo significativo de N na parte aérea que foi maior que o do controle, o que corrobora a maior eficiência de recuperação de N derivado de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* (L.) observada ([Figura 12a](#)). Cu e Ni não foram detectados na parte aérea aos 54 DAT. O acúmulo de P, K, Ca, Mg, Zn, Fe e Mn não foi afetado por nenhum dos tratamentos de inoculação ([Figura 12b-h](#)). Efeito similar foi observado no estágio de maturação, para o acúmulo de Ca, Mg e K na raiz, palha, grão e parte aérea ([Tabela 5](#)), bem como para o acúmulo de N na raiz e palha ([Figura 13b](#)) e, Cu e Zn no grão ([Figura 13d](#)). Ao contrário, o fungo A103 se destacou com acúmulo de N no grão e parte aérea igual ao fungo A101 e maior do que o do controle ([Figura 13b](#)), o que corrobora a maior eficiência de recuperação do nitrogênio observada no grão e na parte aérea das plantas inoculadas ([Figura 11c](#)). Na inoculação com o fungo A101 houve acúmulo de P no grão que foi significativamente maior do que o dos demais tratamentos, embora o mesmo efeito não tenha sido observado na raiz, palha e na parte aérea ([Tabela 5](#)). Da mesma forma, no grão da interação DSE-arroz houve acúmulo significativo de Fe e Ni, que foi duas vezes maior do que o do controle, e na inoculação com A103 ainda foi possível observar acúmulo de Mn que foi três vezes maior do que o dos demais tratamentos ([Figura 13d](#)).

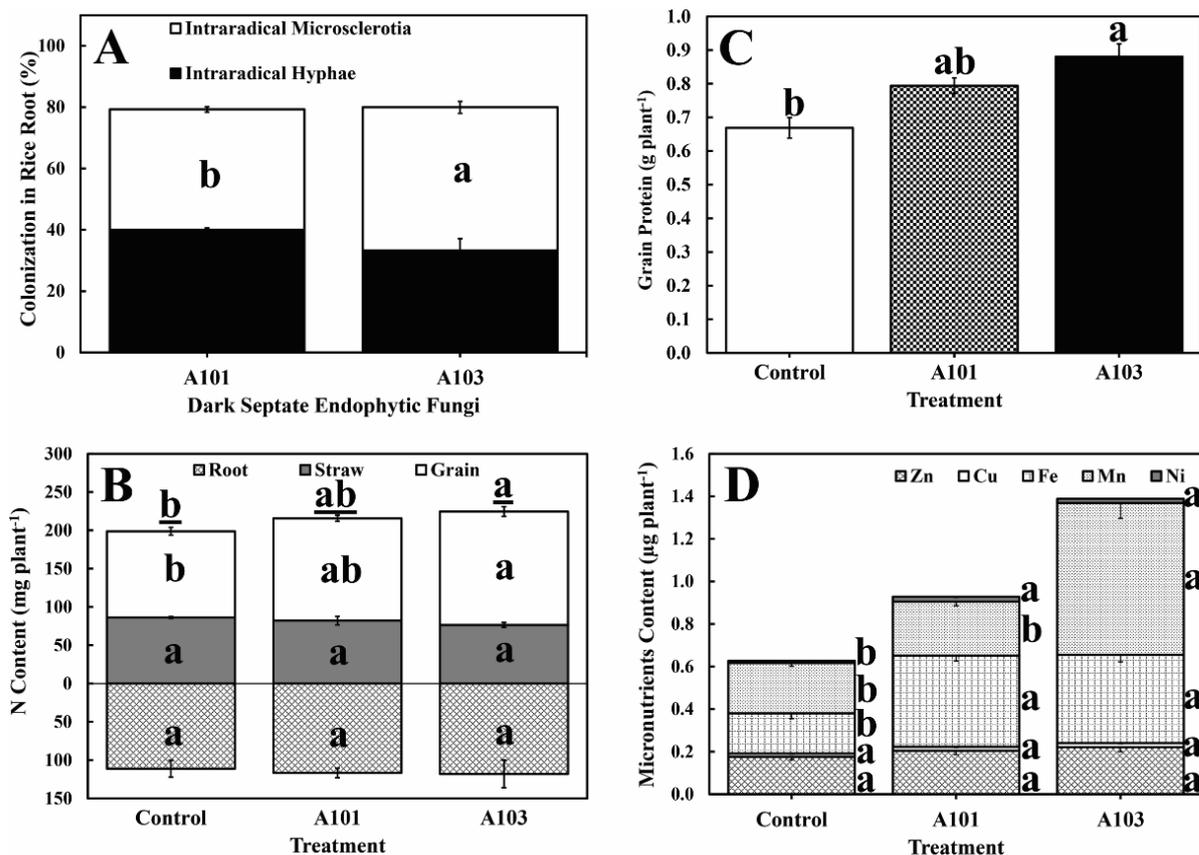


**Figura 12.** Conteúdo de N (a), P (b), K (c), Ca (d), Mg (e), Fe (f), Mn (g) e Zn (h) aos 54 dias após o transplante de plantas de arroz (variedade Piauí) sem e com inoculação com fungos endofíticos *dark septate*, A101 e A103, e adubadas com <sup>15</sup>N-*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como única fonte de N. Em cada gráfico de barras, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o erro padrão da média (n=5).

**Tabela 5.** Conteúdo de Ca, Mg, P e K no estágio de maturação de plantas de arroz da variedade Piauí sem (controle) e inoculadas com fungos endofíticos *dark septate*, A101 e A103, e adubadas com <sup>15</sup>N-*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como única orgânica de N.

<b>Tratamento</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>P</b>	<b>K</b>
----- mg planta <sup>-1</sup> -----				
<b>grãos</b>				
<b>Controle</b>	4,3±0,48	6,5±0,60	15,2±1,16 b	16,4±1,67
<b>A101</b>	4,7±0,04	6,3±0,76	19,4±0,33 a	18,5±0,58
<b>A103</b>	3,9±0,49	6,4±1,12	15,3±1,00 b	18,1±1,94
<b>CV (%)</b>	16,26	23,22	9,41	14,91
<b>palha</b>				
<b>Controle</b>	161,5±6,3	77,0±4,9	58,8±3,2	290,6±8,2
<b>A101</b>	181,0±18,1	82,3±2,7	57,2±1,8	301,3±7,6
<b>A103</b>	161,8±4,9	71,6±4,2	52,4±4,7	280,7±6,4
<b>CV (%)</b>	11,8	9,12	10,59	4,43
<b>Parte aérea (grãos + palha)</b>				
<b>Controle</b>	165,4±6,2	83,4±5,5	74,0±3,7	307,0±9,8
<b>A101</b>	185,3±18,1	88,8±2,1	76,5±1,7	319,8±7,0
<b>A103</b>	166,4±4,1	77,9±3,5	67,7±3,8	298,9±5,9
<b>CV (%)</b>	11,45	8,19	7,74	4,35

Médias ± SE (n=5) seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, p<0,05). A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. SE: erro padrão. CV%: coeficiente de variação.



**Figura 13.** Percentual de colonização de raízes de arroz (A), conteúdo do N (B), proteína bruta (C) e, micronutrientes (D) do grão arroz (variedade Piauí) no estágio de maturação sem (controle) e com inoculação com fungos endofíticos dark septate A101 e A103 e, adubadas com <sup>15</sup>N-*Canavalia ensiformis* (L.) finamente triturada como única fonte orgânica de N. Entre os tratamentos, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t ( $p < 0,05$ ). Letras sublinhadas (B) indicam comparação do conteúdo de N na parte aérea (palha + grão) entre os tratamentos. A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. Barras de erros representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).

## 4.6 DISCUSSÃO

Os isolados de fungos DSE estudados neste capítulo, também foram isolados de raízes de plantas arroz silvestres (*O. glumaepatula*) coletadas na região amazônica e identificados pela filogenia do ITS como pertencentes à ordem *Pleosporales* (suborden *Massarineae*) (A103) e um taxon desconhecido (A101) (RIBEIRO, 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). Os fungos DSE foram capazes de colonizar abundantemente (aproximadamente 80% de intensidade de colonização) as raízes das plantas de arroz sem causar qualquer sintoma de doença, mesmo quando as hifas colonizaram a epiderme e o córtex das plantas e a região entre o córtex e os feixes vasculares da raiz principal, conectando duas das suas raízes laterais e formando microescleródios nas células de raízes. Outros estudos também relataram a colonização de fungos DSE em células da epiderme e córtex de plantas de arroz sem sintomas de patologias (QIN et al., 2017; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017).

Na literatura, há relatos que indicam que gramíneas inoculadas com fungos DSE aproveitam melhor fontes orgânicas de N comparadas com fontes minerais deste elemento (NEWSHAM, 1999; QIN et al., 2017; UPSON et al., 2009; ZIJLSTRA et al., 2005). De fato, neste estudo, foi observado que as plantas inoculadas, em especial com o fungo A103, aproveitaram melhor, em comparação com plantas controle, o nitrogênio derivado do adubo verde  $^{15}\text{N-C. ensiformis}$  finamente triturado. Houve aumento da eficiência de recuperação e quantidade do nitrogênio derivado de  $^{15}\text{N-C. ensiformis}$  tanto no estágio vegetativo (54 DAT) quanto na maturação, favorecendo maior acúmulo de N e teores de clorofila e maior altura da planta no estágio vegetativo, bem como maior acúmulo de matéria seca de panículas e grãos e proteína bruta do grão no estágio de maturação. Estes resultados sugerem que estes fungos melhoram o aproveitamento do N presente no adubo verde por plantas de arroz quando inoculadas com fungos DSE, embora sejam necessários mais estudos para se avaliar diferentes doses  $^{15}\text{N-C. ensiformis}$  e monitorar a resposta da planta à inoculação com fungos DSE em diferentes períodos do seu ciclo.

A habilidade dos fungos DSE em promover o crescimento e acúmulo de N em plantas de arroz suplementadas unicamente com  $^{15}\text{N-C. ensiformis}$  como fonte de N sugere ainda que estes fungos sejam capazes de degradar composto orgânicos de C, N e P e disponibilizar nutriente para planta. De fato, há relatos de que os fungos DSE degradam compostos orgânicos tais como celulose, amido, proteína, lipídios, aminoácidos, gelatina, ureia e pectina em condições *in vitro* (CALDWELL et al., 2000; MANDYAM, K. et al., 2010; MENKIS et al., 2004; SURONO; NARISAWA, 2017) e de que promovem o crescimento de gramíneas (NEWSHAM, 1999; QIN et al., 2017; UPSON et al., 2009; ZIJLSTRA et al., 2005) e outras espécies vegetais suplementadas unicamente com fonte orgânica de N ou fonte orgânica de P (fitato) em condições *in vitro* (DIENE et al., 2013; MAHMOUD; NARISAWA, 2013; SURONO; NARISAWA, 2017; USUKI; NARISAWA, 2007). Além disso, tem sido demonstrado que os fungos DSE são capazes de produzir enzimas proteolíticas que podem degradar compostos orgânicos de N em formas de N disponíveis para as plantas (BIZABANI; DAMES, 2016; CALDWELL et al., 2000). Por exemplo, recentemente, três isolados de *Phialocephala fortinii* promoveram o crescimento de *Asparagus officinalis* (L.) em meio ágar suplementado unicamente com solução de milho macerado (0,1%) ou com solução de milho macerado acrescido de nutrientes inorgânicos (SURONO; NARISAWA, 2017). Embora, os mecanismos que levam ao incremento do conteúdo de N e de outros nutrientes e, matéria seca em plantas inoculadas com fungos DSE relativamente ao controle não inoculado, ainda não sejam totalmente compreendidos, esta associação se mostrou benéfica para as plantas

inoculadas uma vez que o fungo colonizou a planta hospedeira e incrementou o conteúdo de N, clorofila, altura da planta e rendimento de grãos de arroz e não ocorreu o aparecimento de sintomas de doenças.

Além de otimizar o aproveitamento de N derivado de  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* e propiciar maior acúmulo de matéria seca, a inoculação com os fungos DSE A101 e A103 também incrementou o conteúdo de micronutrientes no grão de arroz. De fato, os fungos DSE também podem facilitar a absorção de micronutrientes, como o ferro, presente no solo (BARTHOLDY et al., 2001; HASELWANDTER, 2009). Neste estudo, além da inoculação com os fungos DSE A101 e A103 dobrar o conteúdo de Fe e Ni relativamente ao controle, a inoculação com fungo A103 também triplicou o conteúdo de Mn no grão.

As plantas de arroz acumulam preferencialmente mais Mn do que o Fe (MANSELDT, 2004), podendo tolerar até 5000 mg kg<sup>-1</sup> de Mn na parte aérea sem demonstrar qualquer sintoma de fitotoxidez, enquanto a cevada, por exemplo, demonstra sintomas de fitotoxidez em concentrações menores do que 150 mg kg<sup>-1</sup> deste elemento (VLAMIS; WILLIAMS, 1964). De forma semelhante, neste estudo foi observado que as plantas do tratamento controle e de inoculação com o fungo A103 acumularam mais Mn do que o Fe.

O incremento no conteúdo de Mn que triplicou apenas na inoculação com o fungo A103 e de Fe que duplicou em ambos os fungos, relativamente ao controle, sugere que a inoculação com estes fungos, pode aumentar a eficiência de recuperação destes nutrientes no solo e/ou no FTE BR12 e/ou na  $^{15}\text{N}$ -*C. ensiformis* e otimizar atividade fotossintética e outros processos importante para crescimento e desenvolvimento da planta, que dependem de Fe e Mn para o seu adequado funcionamento, contribuindo para maior qualidade e rendimento de grãos. Com efeito, o Mn é essencial para as plantas (MCHARGUE, 1922), sendo requerido em diversos processos, tais como fotossíntese, respiração, síntese proteica, ativação hormonal e de mais de 30 enzimas, divisão celular e alongamento do ápice radicular (BURNELL, 1988; SHAO et al., 2017). Na fotossíntese, por exemplo, o Mn catalisa a reação de fotólise da água no fotossistema II (PSII) (SCHMIDT; JENSEN; HUSTED, 2016). De forma semelhante, o Fe que pode limitar o acúmulo de matéria seca de grãos no arroz (*O. sativa*) (TAKAHASHI et al., 2001), é também essencial para as plantas, inclusive por assegurar o fluxo dos elétrons entre o fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI) (BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015; EBERHARD; FINAZZI; WOLLMAN, 2008), permitindo a fixação fotossintética de CO<sub>2</sub>. A eficiência fotossintética, as estruturas e, a funcionalidade do aparato fotossintético são fortemente dependentes de Fe (LAYER et al., 2010; YADAVALLI et al., 2012). Não por acaso, o Fe é encontrado em três dos maiores complexos do aparato fotossintético. Dois átomos de Fe estão presentes no fotossistema II (PSII) e 12 átomos no fotossistema I (PSI). O citocromo *b<sub>6</sub>f* contém quatro átomos de Fe e há dois átomos nas proteínas do tipo Rieske. Além disso, os dois complexos antenas, captadores da energia luminosa, associados aos dois fotossistemas contêm clorofila cuja sua síntese é dependente de Ferro (BRIAT et al., 2015; EBERHARD et al., 2008); este fato, explica em parte, os maiores teores de clorofila observados em plantas inoculadas comparativamente ao controle, no estágio vegetativo. Embora ainda permaneçam obscuras, os detalhes de absorção e distribuição de Fe e Mn quando a interação DSE-arroz é estabelecida, o fato de plantas inoculadas terem triplicado o conteúdo de Mn (no fungo A103) e dobrado o conteúdo de Fe no grão sugere ainda que estes fungos podem ser potenciais produtores de sideróforos, o que favoreceria a absorção destes nutrientes pela planta inoculada, uma vez que, o DSE *Phialocephala fortinii* sintetiza o sideróforo hidroxamato e incrementa a absorção de Fe (III) na planta hospedeira (BARTHOLDY et al., 2001).

O incremento no conteúdo do Ni do grão observado em plantas inoculadas relativamente ao controle, sugere também uma maior eficiência de recuperação deste

nutriente por plantas de arroz inoculadas. Embora a concentração de Ni requerida pelas espécies vegetais seja muito baixa (0,05-10 mg kg<sup>-1</sup> de massa seca) (NIEMINEN et al., 2007), este nutriente é também essencial para as plantas (ESKEW; WELCH; CARY, 1983), sendo complementar ao Mn e Fe por atuar em outros diversos processos metabólicos, tais como a ureólise e metabolismo de hidrogênio. De fato, o Ni tem sido identificado como componente de uma série de enzimas, incluindo a urease, as glioxalases, peptídeos deformilases, metil coenzima M redutase e, algumas poucas superóxidos dismutases e hidrogenases (ERMLER et al., 1998; KÜPPER; KRONECK, 2007).

Portanto, os resultados do presente estudo indicam que os fungos endofíticos *dark septate* podem auxiliar as plantas de arroz a adquirirem macro e micronutrientes de substratos complexos, melhorando o crescimento e os processos fisiológico das plantas. Com um aumento no conteúdo e biodisponibilidade dos nutrientes das plantas, são obtidos plantas mais vigorosas e produtos vegetais de melhor qualidade (BRIAT et al., 2015) (Briat et al., 2015), aumentando assim o rendimento dos grãos e/ou sua qualidade para alimentação ou plantio (BRIAT et al., 2015; JULIANO, BIENVENIDO O, 1993; KRANNER; COLVILLE, 2011).

## 4.7 CONCLUSÃO

As plantas de arroz inoculadas com fungos endofíticos *dark septate*, em especial com o fungo A103, aproveitam melhor o N derivado do adubo verde  $^{15}\text{N}$ -*Canavalia ensiformis* (L.), o acumulando tanto no estágio vegetativo quanto no grão cheio sob a forma de proteína bruta. Além disso, dobram o conteúdo de Fe e Ni e triplicam o de Mn no grão, melhorando a qualidade e rendimento de grãos.

## 5      CAPÍTULO III

### **FUNGOS ENDOFÍTICOS *DARK SEPTATE* AUMENTAM A ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS, A EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DE <sup>15</sup>N-SULFATO DE AMÔNIO, CONTEÚDO DE N E MICRONUTRIENTES EM PLANTAS DE ARROZ**

## 5.1 RESUMO

Embora os fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE) beneficiem inúmeras plantas sob condições controladas, ainda são raras as informações sobre a resposta da planta hospedeira à inoculação com fungos DSE em solo não esterilizado, bem como os mecanismos pelos quais estes fungos melhoram o crescimento de plantas. Neste estudo, avaliou-se os indicadores de crescimento, a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$ , o acúmulo de nutrientes em plantas de arroz (variedade Piauí) sem (controle) e com inoculação com fungos DSE, A101 e A103, e supridas com sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  em cultivo em amostra de horizonte superficial de um Planossolo Háptico não esterilizado de casa de vegetação. Além disso, o estado da  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática (PM  $\text{H}^+$ -ATPase), uma enzima chave na regulação do crescimento de plantas, da  $\text{H}^+$ -pirofosfatase vacuolar e  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar, da proteína NAR2.1 e transportadores de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foi avaliada em raízes de plantas de arroz sem e com A103, expostas à 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$  em ambiente esterilizado. Os dois fungos colonizaram abundantemente a raiz, aumentando significativamente, na parte aérea, a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$ , o acúmulo de matéria seca, nutrientes e clorofila, área foliar e perfilhamento em relação ao controle. A atividade de PM  $\text{H}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -pirofosfatase e os níveis de transcritos de *OsA8* (isoforma de PM  $\text{H}^+$ -ATPase imprescindível para simbiose micorrízica arbuscular) foram estimulados pela inoculação e adição de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto a isoforma *OsA1* apenas foi induzida na ausência de N e *OsA5* permaneceu sempre induzida, independentemente da adição deste nutriente. Estas observações indicam que ambos os fungos promovem o crescimento de plantas de arroz em solo não esterilizado, e que a inoculação com o *Pleosporeales* A103 modifica a atividade PM  $\text{H}^+$ -ATPase e V- $\text{H}^+$ -PPase e os níveis de transcritos das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase, *OsA5* e *OsA8*.

**Palavras-chave:** PM  $\text{H}^+$ -ATPase.  $^{15}\text{N}$ . Fe.  $\text{H}^+$ -pirofosfatase vacuolar. DSE. *OsA8*.  $\text{NO}_3^-$ . *Oryza sativa*.

## 5.2 ABSTRACT

Although dark septate endophytic fungi (DSE fungi) benefit countless of plants under controlled conditions, information on host plant response to inoculation with DSE fungi on non-sterile soil is still rare, as well as the mechanisms by which these fungi enhance the growth of plants. In this study, growth indicators, recovery efficiency of  $^{15}\text{N}$ , nutrient accumulation in rice plants (Piauí variety) inoculated with DSE fungi, A101 and A103 or left uninoculated (control) and supplemented with  $^{15}\text{N}$ -labelled sulfate ammonium were evaluated under non-sterile material from the surface horizon of a Fragiudult soil, in a greenhouse. In addition, the status of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase (PM  $\text{H}^+$ -ATPase), a key enzyme in plant growth regulation, vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase and vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase, NAR2.1 protein and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) transporters were evaluated in roots of rice plants with and without (control) A103 inoculation and exposed to 0.2 mM  $\text{NO}_3^-$  in a sterile environment. The two isolates of DSE fungi colonized abundantly the inner root endophytically, increasing significantly, in the shoot, the recovery efficiency of  $^{15}\text{N}$ , the accumulation of dry matter, nutrients and chlorophyll accumulations, leaf area and tillers in relation to the control. The activity of PM  $\text{H}^+$ -ATPase and  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase and the levels of *OsA8* transcripts (PM  $\text{H}^+$ -ATPase isoform essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis) were stimulated by inoculation and addition of  $\text{NO}_3^-$ , whereas the *OsA1* isoform was only induced in the absence of N and *OsA5* remained always induced, regardless of the addition of this nutrient. These observations indicate that both fungi promote the growth of rice plants in non-sterile soil and that inoculation with *Pleiosporales* A103 modifies the PM  $\text{H}^+$ -ATPase and V- $\text{H}^+$ -PPase activity and the transcript levels of the PM  $\text{H}^+$ -ATPase, *OsA5* and *OsA8*.

**Keywords:** PM  $\text{H}^+$ -ATPase.  $^{15}\text{N}$ . Fe. vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase. DSE. *OsA8*.  $\text{NO}_3^-$ . *Oryza sativa*.

### 5.3 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos *dark septate* (fungos DSE) são um grupo diverso e cosmopolita de endófitos ascomicetos conidiais ou estéreis encontrado em plantas saudáveis em mais de 600 espécies vegetais de 320 gêneros e 114 famílias, onde podem atuar como promotores de crescimento. Apresentam hifas septadas melanizadas em sua colônia de cor marrom a mais escura, que colonizam a epiderme e o córtex do sistema radicular da planta hospedeira de forma intercelular e intracelular e eventualmente formam microescleródios melanizados, sem desencadear qualquer sintoma de doença (JUMPPONEN, ARI, 2001; JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998; KNAPP et al., 2015).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a promoção de crescimento de plantas por fungos DSE. O primeiro envolve a produção de fitormônios, tais como o ácido indolacético e giberelina pelos fungos DSE (BERTHELOT et al., 2016; WAQAS et al., 2012); o segundo envolve a proteção da planta hospedeira contra patógenos do solo (MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A., 2005); e o terceiro envolve a produção de uma série de enzimas extracelulares pelos fungos DSE que quebram compostos complexos de carbono, nitrogênio e fósforo comumente presentes em solos e, portanto, potencialmente fornecem para as plantas, nutrientes, originalmente indisponíveis (CALDWELL et al., 2000; JUMPPONEN, ARI; TRAPPE, 1998; MANDYAM, K. et al., 2010; UPSON et al., 2009; USUKI; NARISAWA, 2007). Entretanto, embora outros fungos promotores de crescimento de plantas, tais como fungos micorrízicos arbusculares (FMA), *Trichoderma* sp e *Piriformospora indica* tenham como mecanismo central de promoção de crescimento, a indução de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase) de plantas (FELLE et al., 2009; KRAJINSKI et al., 2014; LIU et al., 2016; LOPEZ-CORIA et al., 2016; WANG, E. et al., 2014), se desconhece na literatura, algum trabalho que avaliou o comportamento PM H<sup>+</sup>-ATPase em plantas de arroz inoculadas com fungos DSE.

O genoma do arroz, uma planta modelo para estudos moleculares e umas das mais importantes fontes de grãos para alimentação humana, possui 10 isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase, que são codificados por uma família multigênica, com perfil de expressão gênica e papéis fisiológico distintos e/ou parcialmente sobrepostos, talvez para dar segurança a função de transporte de substância, que é tão importante em plantas (GAXIOLA et al., 2007; JANICKA-RUSSAK, 2011; TAIZ et al., 2017; YUAN, Q. et al., 2005).

A PM H<sup>+</sup>-ATPase é a maior bomba da membrana plasmática de plantas, ubíqua em todos os tipos de células e, membro da superfamília das ATPases do tipo P, que são caracterizadas pela formação de intermediários fosforilados durante a sua catálise (JANICKA-RUSSAK, 2011; KANCZEWSKA et al., 2005; OKUMURA et al., 2012). Esta glicoproteína com dez domínios transmembrana, hidrolisa o ATP na face citosólica para bombear eletrogenicamente o H<sup>+</sup> para fora da célula e estabelecer o gradiente do potencial eletroquímico de H<sup>+</sup> através da membrana plasmática, para a manutenção de muitos processos fisiológicos essenciais para o crescimento vegetal, tais como a absorção de nutrientes, homeostase do íon, regulação intracelular do pH, controle estomático e expansão celular (HARUTA et al., 2010; HARUTA; SUSSMAN, 2012; HAYASHI et al., 2014; MORSOMME; BOUTRY, 2000; MORTH et al., 2011; SPERANDIO et al., 2011).

A atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase é regulada pelo domínio autoinibitório, localizado na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica, que pode mudar a sua conformação dependendo do seu estado de fosforilação e da ligação com a proteína 14-3-3, ou por meio da interação com lipídeos específicos presentes em seu entorno; portanto, as modificações pós-

tradicionais permitem que esta enzima altere a sua atividade entre dois estados: ativada e inativa (FALHOF et al., 2016; HARUTA; GRAY; SUSSMAN, 2015; MORALES-CEDILLO et al., 2015).

Existe uma grande variedade de substâncias que podem alterar a atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPase. Por exemplo, a fusicocina, uma toxina fúngica secretada por *Fusicoccum amygdali*, ativa esta enzima por estabilizar a ligação entre a proteína 14-3-3 e domínio autoinibitório C-terminal (FALHOF et al., 2016; JOHANSSON; SOMMARIN; LARSSON, 1993; KORTHOUT; DE BOER, 1994). Por outro lado, a fumonisina B1, toxina produzida por *Fusarium verticillioides*, inibe a PM H<sup>+</sup>-ATPase (GUTIERREZ-NAJERA et al., 2005). Auxina, lisofosfolipídeos e ácidos graxos alteram a atividade da ATPase por mecanismos envolvendo a mudança conformacional do domínio autoinibitório C-terminal, enquanto a cumarina (metabolito secundário de plantas com efeito alelopático) aparentemente altera a atividade desta enzima a nível transcricional (LUPINI et al., 2017; MORALES-CEDILLO et al., 2015). A colonização de raízes por FMA, *Trichoderma* sp e *P. indica* também altera a atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPase (FELLE et al., 2009; KRAJINSKI et al., 2014; LIU et al., 2016; LOPEZ-CORIA et al., 2016; WANG, E. et al., 2014); portanto, é possível que a colonização de raízes por fungos DSE altere não somente a atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase, mas também a atividade de H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (V-H<sup>+</sup>-ATPase) e H<sup>+</sup>-pirofosfatase vacuolar (V-H<sup>+</sup>-PPase) e transportadores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

A V- H<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-PPase são bombas eletrogênicas que transportam em paralelo, prótons do citoplasma para interior do vacúolo e geram a força motriz de prótons através da membrana do vacúolo (tonoplasto). Para transportar um H<sup>+</sup> a V-H<sup>+</sup>-PPase utiliza a energia livre liberada da hidrólise do pirofosfato inorgânico (PP<sub>i</sub>) e V- H<sup>+</sup>-ATPase hidrolisa o ATP para transportar aparentemente dois H<sup>+</sup> (GAXIOLA et al., 2007; TAIZ et al., 2017).

Em solos aerados, o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) é rapidamente convertido em NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; portanto, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se torna a principal forma de N disponível para as plantas e para perdas de aproximadamente 50% (COLE, 1993; DE ANGELI et al., 2006; LASSALETTA et al., 2014). Em plantas, a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é mediada por dois sistemas com base na afinidade do transportador: o sistema de transporte de alta afinidade (HATS), atuando em concentrações externas abaixo de 1 mM e codificado por genes da família NRT2; e o sistema de transporte de baixa afinidade (LATS), atuando em concentrações externas acima de 1 mM e codificado pelos genes da família NRT1 (ASLAM; TRAVIS; HUFFAKER, 1993). O transporte do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e outros nutrientes através da membrana plasmática e do tonoplasto depende do suprimento de energia livre armazenado na forma de gradiente de H<sup>+</sup> gerada pelas PM H<sup>+</sup>-ATPase e V-H<sup>+</sup>-ATPase e V-H<sup>+</sup>-PPase, respectivamente (DE ANGELI et al., 2006; KREBS et al., 2010; MILLER et al., 2007; MILLER; SMITH, 1996; PALMGREN, 2001).

Os FMA, os mais estudados entre os fungos promotores de crescimento, além de otimizar a aquisição de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por plantas, preferencialmente através da forte indução da proteína acessória NAR 2.2 (responsável por direcionar o transportador NRT2.2 para a membrana) e dos transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NRT2.3, NFP1.3 e NFP6.3), também auxiliam as plantas a retirarem outros nutrientes do solo tais como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K, P, Zn, com a participação da isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase, *OsA8* (DRECHSLER et al., 2017; HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H., 2002; KRAJINSKI et al., 2014; SAIA, S. et al., 2015; WANG, E. et al., 2014). Da mesma forma, em trabalhos anteriores com plantas de arroz (variedade Piauí) inoculadas com os fungos DSE A101 (táxon desconhecido) e A103 (ordem *Pleosporales*, subordem *Massarineae*) observou-se menor constante de Michaelis-Menten (ou alta afinidade) para absorver NO<sub>3</sub><sup>-</sup> associado ao maior esgotamento deste nutriente no meio externo; e na inoculação com A103 se observou maior acúmulo de N, P, K, S, Ca, Mg e matéria seca na raiz e parte aérea e maior número de perfilhos em câmara de crescimento (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017).

Como a maioria dos trabalhos presentes na literatura (NEWSHAM, 2011), no trabalho de VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al. (2017), os efeitos da inoculação com fungos DSE foram observados em condições controladas de cultivo e ainda são muito pouco compreendidos, havendo necessidade de mais trabalhos que avaliem não somente os efeitos da inoculação em condições de solo não esterilizado marcado com  $^{15}\text{N}$  em casa de vegetação, como também mecanismos pelos quais estes fungos promovem o crescimento, a nível fisiológico e molecular à semelhança do que ocorre com estudos envolvendo FMA. Portanto, no presente estudo, o acúmulo de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn) e matéria seca (parte aérea), número de perfilhos e folhas, área foliar, eficiência de recuperação e quantidade de nitrogênio na planta derivado do  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio em plantas de arroz (variedade Piauí) inoculadas com os fungos DSE A101 e A103 e supridas com sulfato de amônio enriquecido com  $^{15}\text{N}$  em cultivo em solo não esterilizado de casa de vegetação foram determinados aos 54 dias após o transplantio. A atividade da PM  $\text{H}^+$ -ATPase e V- $\text{H}^+$ -ATPase e V- $\text{H}^+$ -PPase e a expressão gênica de seis isoformas (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) de PM  $\text{H}^+$ -ATPase e de dois genes (*NRT2.1* e *NRT2.2*) que codificam transportadores de  $\text{NO}_3^-$  e um gene (*NAR 2.1*) que codifica a proteína acessória NAR2.1 também foi determinada em raízes de Piauí inoculada com o fungo *Pleosporales*, A103 e submetidas a 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$  após 72 h de privação de N. Desta forma, este estudo teve como objetivo (i) avaliar os efeitos da inoculação com fungos DSE em plantas de arroz cultivadas em solo arenoso (não esterilizado) marcado com  $^{15}\text{N}$  em casa de vegetação e (ii) contribuir para o entendimento fisiológico e molecular dos mecanismos de promoção de crescimento destes fungos.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Experimento 1 em solo não esterilizado para avaliar a promoção do crescimento de plantas de arroz

#### 5.4.1.1 Coleta do solo, calagem e adubação

Como foi utilizado o mesmo solo do [item 4.4.1](#) (Capítulo II), a calagem e adubação com superfosfato simples, sulfato de potássio e com FTE BR-12 (micronutrientes) foi feita conforme descrito no [item 4.4.1](#).

#### 5.4.1.2 Adubação nitrogenada (fonte inorgânica de N) marcada com $^{15}\text{N}$

O sulfato de amônio descrito no [item 3.4.2](#) (Capítulo I) foi utilizado como a fonte inorgânica de N, todavia cada vaso recebeu 0,12g de N, o equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N.

#### 5.4.1.3 Preparo do inóculo e inoculação

Os isolados (A101 e A103) de fungos endofíticos *dark septate* foram obtidos, identificados e seu inóculo preparado conforme descrito [item 3.4.3](#) (Capítulo I).

#### 5.4.1.4 Delineamento experimental e condições de crescimento

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso com cinco repetições, com os mesmos tratamentos, condições de cultivo, variedade de arroz e desinfestação de sementes especificados no [item 4.4.4](#) (Capítulo II); entretanto, as plantas foram supridas com sulfato de amônio marcado com 1% de átomos de  $^{15}\text{N}$  ([item 3.4.2](#), Capítulo I).

#### 5.4.1.5 Variáveis avaliadas

Massa seca (65°C, 72h), número de perfilhos e folhas, área foliar total (com medidor LI-COR, modelo LI-3100C, Nebraska, USA), teor de clorofila, concentração de N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn e abundância de  $^{15}\text{N}$  foram determinados na parte aérea de plantas do arroz aos 54 dias após o transplântio (DAT). A parte aérea seca (65°C, 72h) foi moída e a abundância do  $^{15}\text{N}$ , concentração de macro e micronutrientes quantificada conforme descrito no [item 3.4.6](#) (CAPÍTULO I).

A fração (%), a quantidade (mg planta<sup>-1</sup>) e a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$  na planta derivado de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio foram quantificados por meio das equações (2), (3) e (4) conforme descrito no [item 3.4.6](#) do capítulo I.

### 5.4.2 Experimento 2 para analisar a expressão gênica das isoformas de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (PM), transportadores NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e a atividade de bombas de H<sup>+</sup>

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, com dois tratamentos (plantas de arroz da variedade Piauí com e sem inoculação com A103), cinco tempos de coleta (0, 3, 6, 9 e 24 h) e quatro repetições – quatro vasos independentes com quatro plântulas de arroz cada (dois tratamentos × cinco tempos de coleta

× quatro repetições = 40 vasos) – em condições de câmara de crescimento da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica, RJ, Brasil.

No dia da semeadura, as sementes de arroz foram lavadas com álcool 70% por cinco minutos e desinfestadas com hipoclorito de sódio (2,5%) por 10 minutos e seguidas dez lavagens sucessivas com água destilada autoclavada. Sementes desinfestadas foram semeadas em placas de Petri descartáveis (quatro sementes cada), previamente perfuradas e preenchidas com ágar-água (10 g L<sup>-1</sup>) esterilizada, para permitir o crescimento micelial dentro e fora da solução nutritiva (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). Um disco do meio batata-dextrose-ágar (BDA) (aproximadamente 6 mm de diâmetro) contendo micélio, previamente crescido (sete dias a 28°C), foi colocado ao lado de cada semente. As placas de Petri contendo as sementes do tratamento controle foram inoculadas com discos de BDA sem micélio fúngico. Após a semeadura, as placas foram incubadas (três dias a 28 °C) para favorecer a germinação e o estabelecimento do fungo. Decorrido três dias, placas de Petri (com quatro plântulas cada) com plântulas uniformes foram selecionadas e transferidas para vasos de vidro (quatro mudas por vaso) contendo apenas água destilada autoclavada (120 °C por 1 h) e cultivadas em câmara de crescimento com 384 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fluxos fótons fotossinteticamente ativos, fotoperíodo de 13 h/11 h (luz/escuro), umidade relativa do ar de 70% e temperaturas de 28 °C/24 °C (luz/escuro). Aos cinco dias após a germinação, a água contida nos vasos foi substituída por uma solução nutritiva com ¼ da força iônica e 1,5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub> como fonte de N) formulada a partir de HOAGLAND; ARNON (1950). Decorridos três dias, esta solução foi substituída por outra com ½ força iônica, 2,0 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,5 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, utilizando o Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fontes de N, respectivamente, ao pH 5,6. Essa estratégia foi adotada para evitar estresse salino às plântulas de arroz (FURLANI; FURLANI, 1988). Depois desse procedimento, a troca da solução com ½ força iônica foi realizada a cada três dias.

Trinta e oito dias após a germinação (DAG), as plantas foram privadas de N por um período de 72 h para aumentar a capacidade das raízes em absorver este elemento (LEE; RUDGE, 1986); a partir de então, foi aplicada uma solução nutritiva contendo 0,2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, usando novamente o KNO<sub>3</sub> como fonte de N. As raízes das plantas arroz com 41 DAG foram coletadas às 0, 3, 6, 9 e 24 horas após a privação de N e armazenadas a -80 °C para extração de RNA total e obtenção da fração microssomal para a atividade de bombas de H<sup>+</sup>.

#### 5.4.2.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA e PCR em tempo real

O RNA total de plantas de arroz (41 DAG) com e sem inoculação com o fungo A103 foi extraído de 100 mg de raiz fresca (pulverizada no N<sub>2</sub> líquido) com o kit *RNeasy Plant Mini* (Qiagen, Milano, Itália) seguindo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado em duplicata no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) e a sua qualidade foi verificada espectrofotometricamente por meio das razões A260/A230 e A260/A280 e visualização em gel de agarose (1,5%) com *GelRed* (Biotium, Hayward, CA, USA).

As amostras do RNA total utilizadas nas reações de síntese de cDNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen™ Carlsbad, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A fita simples de cDNA foi sintetizada utilizando o kit *High Capacity RNA to cDNA* (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, USA) e primer oligodT de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata no aparelho *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, USA) utilizando o kit *Fast EvaGreen® qPCR Master Mix* (Biotium, Hayward, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dois minutos a 95°C, quarenta e

cinco ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e finalmente a curva de dissociação (“melting”) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas.

As reações de PCR foram feitas para determinar a expressão de seis isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*), anteriormente detectadas em raízes de plantas de arroz (SPERANDIO et al., 2011), bem como para determinar a expressão de transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e proteína acessória *OsNAR2.1*. As sequências dos *primers* das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases e NRTs foram as mesmas daquelas utilizadas por SPERANDIO et al. (2011) e as sequências da proteína *OsNAR2.1* foram as mesmas daquelas utilizadas por BUCHER, C. A. et al. (2014). Fator de alongamento 1 (JAIN et al., 2006) foi usado como controle endógeno para normalizar os dados utilizados para calcular a expressão gênica relativa com o métodos de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### **5.4.2.2 Extração de vesículas da membrana plasmática e avaliação da atividade de bombas de H<sup>+</sup>**

Em raízes de plantas de arroz (com e sem inoculação com o fungo A103) coletadas às 24 h, as vesículas da membrana plasmática foram extraídas de acordo com os métodos de FACANHA; DE MEIS (1995) e SANTOS, L. A. et al. (2009) e a concentração da proteína quantificada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando a albumina do soro bovino como padrão. A atividade das bombas de H<sup>+</sup> foi calculada pela liberação de Pi (fósforo inorgânico) a partir da hidrólise de ATP (PM H<sup>+</sup>-ATPase e V-H<sup>+</sup>-ATPase) e PPi (pirofosfato) (H<sup>+</sup>-PPase) utilizando o método propostos por YAN et al. (2002) e ajustado por SANTOS, L. A. et al. (2009) e SPERANDIO et al. (2011).

#### **5.4.3 Observações de sintomas de patogenicidade e de colonização de raízes**

As hifas, os microescleródios e os sintomas de patogenicidade foram observados e avaliados conforme o [item 4.4.5](#) (Capítulo II).

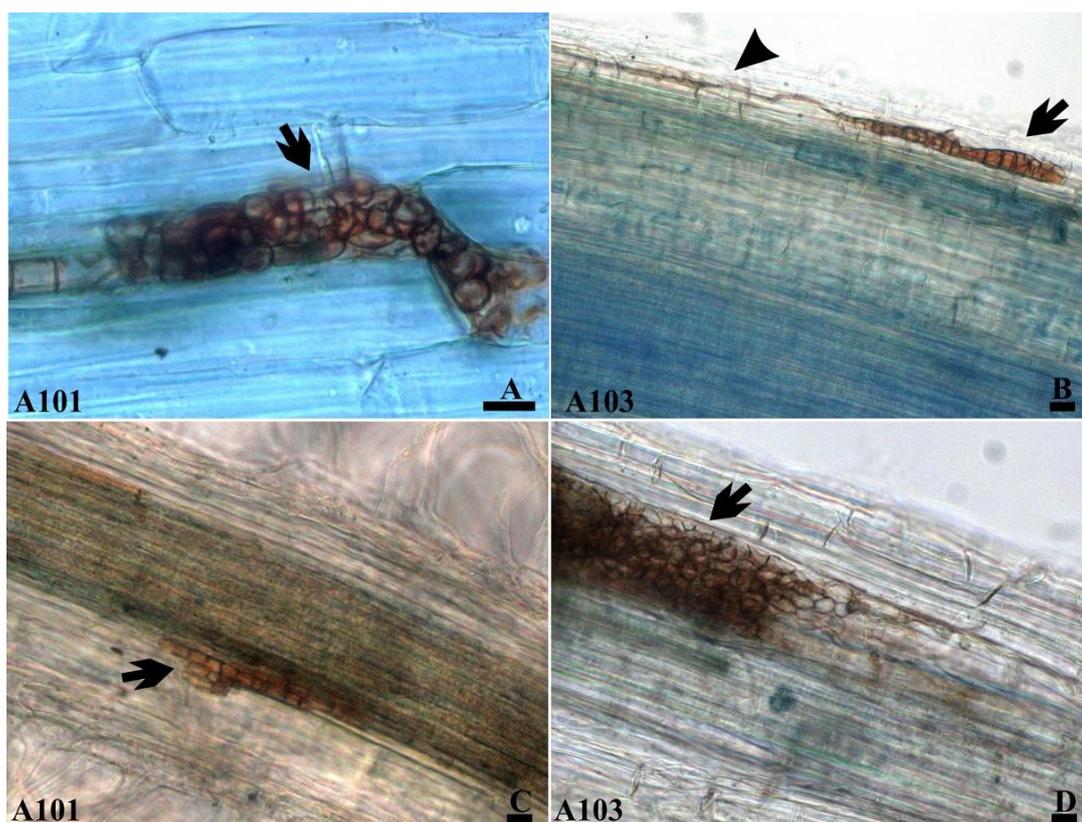
#### **5.4.4 Análises estatísticas**

Para cada experimento, os dados foram individualmente submetidos ao teste de homogeneidade (*Bartlett*) da variância e normalidade (*Shapiro-Wilk*) dos resíduos e à análise de variância (ANOVA). Para o experimento 2 (expressão gênica) as ANOVAs foram feitas independentemente para cada tempo de coleta (0, 3, 6, 9 e 24 horas). Quando as diferenças significativas foram indicadas pela ANOVA, as médias dos tratamentos foram separadas utilizando-se as diferenças mínimas significativas (LSD) calculadas pelo teste t ao nível de 5%. O *software* R, versão R 3.4.1, (R Development Core Team, 2017) com RStudio (versão 1.0.153) e o pacote agricolae (DE MENDIBURU, 2017) foram utilizados para as análises e os dados estão apresentados no formato de média ± erro padrão.

## 5.5 RESULTADOS

### 5.5.1 Patogenicidade e colonização de raízes

Os dois isolados (A101 e A103) colonizaram abundantemente o tecido radicular das plantas de arroz ([Figura 14 A-D](#)), com a hifa formando microescleródios na epiderme ([Figura 14 A, B](#)) e no córtex ([Figura 14 C, D](#)), sem qualquer sintoma de doença aparente. Os fungos A101 e A103 formaram  $43\pm 1,5$  e  $41\pm 0,9$  % de hifas intrarradiculares e  $44\pm 3,0$  e  $42\pm 0,9$  % de microescleródios intrarradiculares, resultando em um percentual de colonização de raízes de plantas de arroz de  $88\pm 3,5$  e  $84\pm 0,3$ %, respectivamente.



**Figura 14.** Aspectos morfológicos de raízes de plantas de arroz (variedade Piauí) inoculada com fungos DSE A101 e A103. Hifa septada melanizada (**Ponta de seta**) nas células da epiderme (**B**). Microescleródios (**seta**) formados pelos fungos na epiderme (**A e B**) e córtex (**C e D**). Amostras coradas com 0,002 % de azul de metila. Barra = 20 $\mu$ m.

### 5.5.2 Crescimento de plantas de arroz inoculadas com fungos DSE

Os dois isolados de fungos DSE (A101 e A103) promoveram o crescimento do arroz sem causar qualquer sintoma típico de doença em cultivo com  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio como a fonte de N mineral ([Figura 14](#) & [Tabela 6](#)). As plantas de arroz inoculadas apresentaram aumentos significativos na biomassa seca da parte aérea (aumento de aproximadamente 16%), número de perfilhos (aumento de 62 e 77% para A101 e A103, respectivamente) e folhas, área foliar (aumento de 19 e 23% para A101 e A103, respectivamente) e teor de clorofila, em relação ao tratamento não inoculado ([Tabela 6](#)).

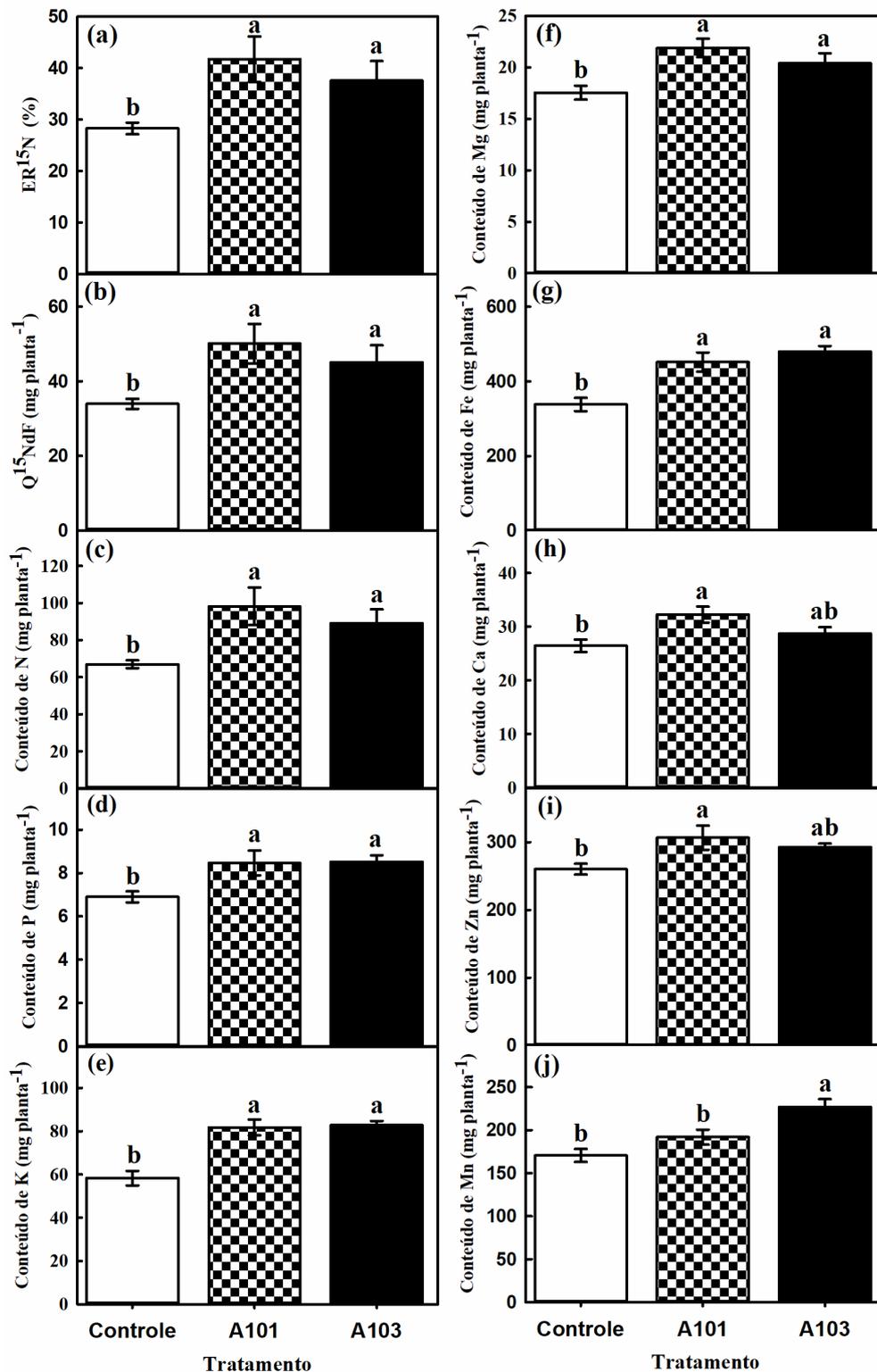
**Tabela 6.** Indicadores de crescimento de plantas de arroz (variedade Piauí) aos 54 dias após o transplântio. As plantas foram inoculadas com os fungos endofíticos *dark septate* A101 e A103, ou deixadas sem inoculação, e adubadas com sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  como a única fonte inorgânica de N.

<b>Tratamento</b>	<b>Biomassa Seca da Parte aérea (g planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de folhas (unid. Planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de Perfilhos (unid. planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área Foliar Total (cm<sup>2</sup> planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>Clorofila</b>
Controle	5,1±0,1 b	17,0±0,3 b	2,6±0,2 b	474±28 b	41,0±0,6 b
A101	5,9±0,1 a	20,5±0,2 a	4,2±0,2 a	564±36 a	44,1±0,9 a
A103	6,0±0,2 a	21,0±0,3 a	4,6±0,2 a	582±17 a	45,1±0,9 a
CV (%)	6,81	3,31	13,59	11,68	4,45

Médias ± SE (n=5) seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, p<0,05). SE: erro padrão. CV%: coeficiente de variação.

### 5.5.3 Eficiência de recuperação de $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio

Depois de determinar a abundância de  $^{15}\text{N}$  na matéria seca, determinou-se a eficiência de recuperação e a quantidade de  $^{15}\text{N}$  na planta derivada de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio nos tratamentos sem (controle) e com a inoculação com fungos DSE. Em comparação com controle, as plantas de arroz inoculadas com os fungos A101 e A103 foram mais hábeis na recuperação e uso de N presente em  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, fornecido como a única fonte de N, pois apresentaram incrementos significativos de 47% e 33% na eficiência de recuperação e quantidade de  $^{15}\text{N}$  na planta derivado de  $^{15}\text{N}$ -sulfato amônio, respectivamente ([Figura 15a-b](#)).



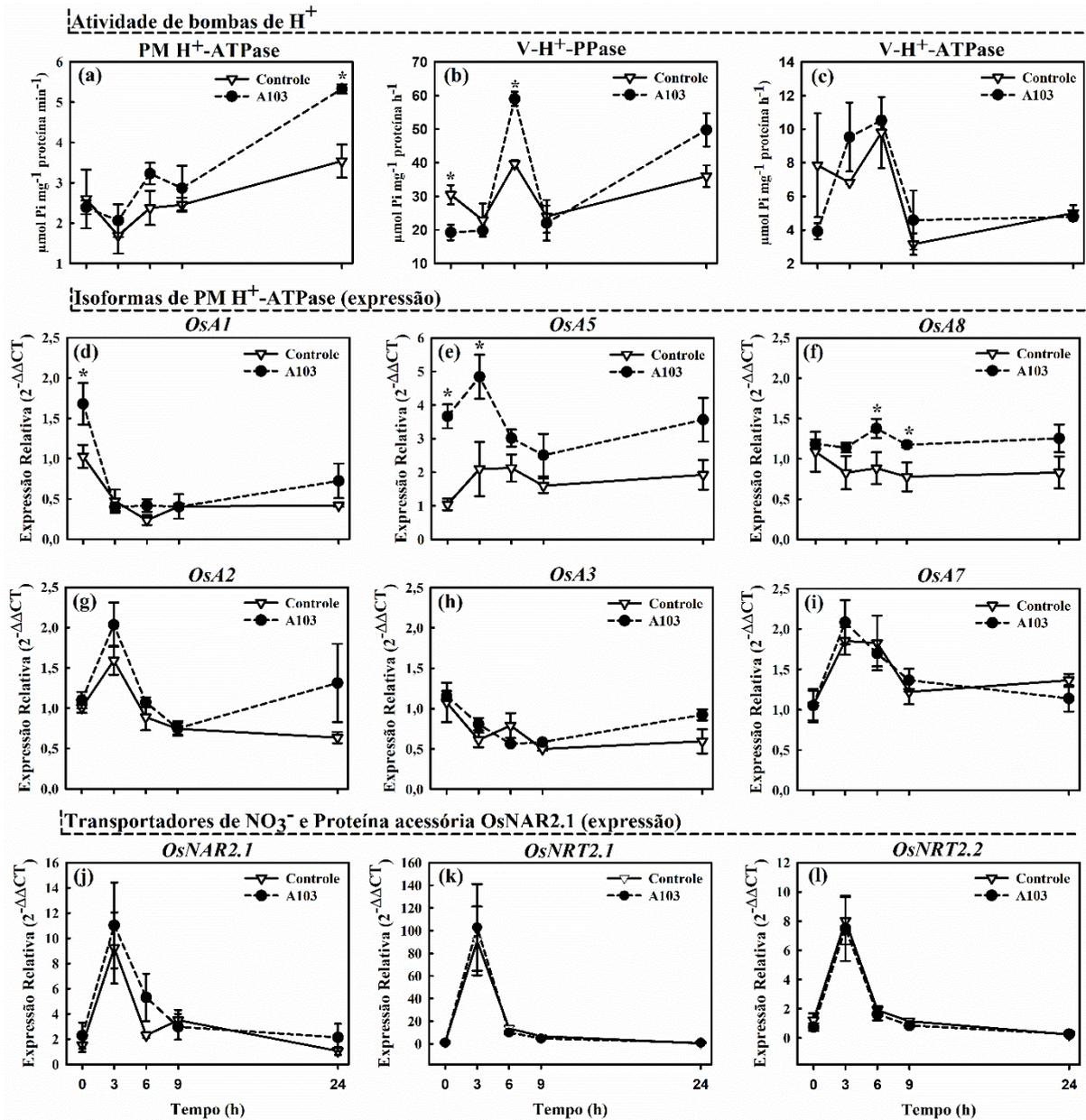
**Figura 15.** Eficiência de recuperação (ER<sup>15</sup>N; **a**) e quantidade de nitrogênio (Q<sup>15</sup>NdF; **b**) na planta derivado de sulfato de amônio marcado com <sup>15</sup>N, conteúdos de N (**c**), P (**d**), K (**e**), Mg (**f**), Fe (**g**), Ca (**h**), Zn (**i**) e Mn (**j**) aos 54 dias após o transplante de plantas de arroz (variedade Piauí). As plantas foram inoculadas com os fungos endofíticos *dark septate* A101 e A103, ou deixadas sem inoculação, e adubadas com sulfato de amônio marcado com <sup>15</sup>N como a única fonte inorgânica de N. Entre os tratamentos, mesma letra minúscula, não difere pelo Teste t (p<0,05). Barras de erros representam o erro padrão da média (n=5).

#### 5.5.4 Acúmulo de macro e micronutrientes

A inoculação de plantas de arroz com os dois fungos DSE (A101 e A103) propiciou um acúmulo significativo de N, P, K, Mg e Fe na parte aérea, que foi maior do que o das plantas do tratamento controle ([Figura 15c-g](#)). Além disso, a inoculação com A101 favoreceu a um acúmulo de Ca e Zn na parte aérea igual ao do tratamento de inoculação com A103 e maior do que o do controle ([Figura 15h-i](#)). Na inoculação com o fungo A103 ainda se observou maior acúmulo de Mn na parte aérea que foi significativamente maior do que o dos demais tratamentos ([Figura 15j](#)). O conteúdo de N, P e K aumentou em 47 e 33%, 23%, 40 e 42%, para os fungos A101 e A103, respectivamente, corroborando a eficiência de recuperação de  $^{15}\text{N}$ , enquanto o conteúdo de Ca e Mg aumentou em 22 e 9% e 25 e 16% e o do Fe, Zn e Mn aumentou em 34 e 42%, 46 e 32% e 12 e 33% na inoculação com A101 e A03, respectivamente.

#### 5.5.5 Atividade das bombas de $\text{H}^+$

A exposição das plantas inoculadas com o fungo A103 à 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , incrementou significativamente a atividade hidrolítica de ATP na PM  $\text{H}^+$ -ATPase em 50% comparativamente ao controle, às 24 h ([Figura 16a](#)). Do mesmo modo, a inoculação com este fungo também incrementou a atividade hidrolítica de PPi na V- $\text{H}^+$ -PPase em 49 e 38% às 6 h (aumento significativo) e 24 h (aumento não significativo), respectivamente, embora tenha sido reduzida significativamente pela inoculação em 37%, na ausência de  $\text{NO}_3^-$  (tempo zero) ([Figura 16b](#)). Por outro lado, a V- $\text{H}^+$ -ATPase não foi afetada pela inoculação ([Figura 16c](#)).



**Figura 16.** Atividade ao longo do tempo de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (a), H<sup>+</sup>-pirofosfatase vacuolar (b) e H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar (c) e expressão relativa de genes que codificam para transportadores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*), proteína acessória *OsNAR2.1* (*OsNAR2.1*) (d-f) e isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) (g-l) de raízes de plantas de arroz (variedade Piauí aos 41 dias após a germinação). As plantas foram inoculadas com o fungo endofítico *dark septate* A103, ou deixadas sem inoculação (controle) e expostas à 0,2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 72 h após a privação com nitrogênio. As avaliações foram realizadas às 0 h, 3 h, 6 h, 9 h e 24 h após a adição de 0,2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Barras de erros representam o erro padrão da média (n=4). \* indica diferenças significativas entre o tratamento de inoculação com A103 e controle não inoculado (Teste t; p<0,05).

### 5.5.6 Expressão gênica

Análises quantitativas de PCR em tempo real de componentes relacionados à absorção de  $\text{NO}_3^-$  (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) e atividade de PM  $\text{H}^+$ -ATPase (*OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8*) foram realizadas para avaliar a abundância relativa de transcritos após 0 h, 6 h, 9 h e 24 h de exposição das plantas (com e sem inoculação) a 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$ . Na ausência de  $\text{NO}_3^-$ , a inoculação com A103 induziu significativamente o nível de transcrito da isoforma de PM  $\text{H}^+$ -ATPase *OsA1* em aproximadamente 2 vezes, em relação ao controle; ao contrário, este gene não foi induzido quando este ânion foi adicionado na solução nutritiva ([Figura 16d](#)). A isoforma *OsA5*, foi induzida significativamente na ausência de  $\text{NO}_3^-$  (aproximadamente 4 vezes) e pelo seu ressuprimento em aproximadamente 2 vezes em relação ao controle, às 0 h e 3h (valor máximo), respectivamente ([Figura 16e](#)). A adição do  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva também aumentou significativamente (aproximadamente 2 vezes) a abundância de transcritos da *OsA8* às 6 e às 9 h ([Figura 16f](#)). Ao contrário, as isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase, *OsA2*, 3 e 7 ([Figura 16g-i](#)), os dois transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (*OsNRT2.1* e 2.2) e a proteína *OsNAR2.1* ([Figura 16j-l](#)) não foram induzidas pela inoculação.

## 5.6 DISCUSSÃO

Os fungos DSE estudados aqui foram obtidos de raízes de arroz silvestre (*O. glumaepatula*) coletado na região amazônica e identificados pela filogenia do ITS como pertencentes à ordem *Pleosporales* (suborden *Massarineae*) (A103) e a um taxon desconhecido (A101) (RIBEIRO, 2011; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). Estes fungos colonizaram abundantemente o tecido radicular de plantas de arroz, sem causar qualquer sintoma de doença, mesmo com a hifa colonizando as células da epiderme e córtex de plantas de arroz e formando microescleródios. Outros estudos também relataram a colonização por fungos DSE nestas células de plantas de arroz sem sintomas de patologias (QIN et al., 2017; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017; YUAN, Z. L. et al., 2010).

O cultivo de gramíneas (BERTHELOT et al., 2016; SANTOS, S. G. et al., 2017; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017; YUAN, Z. L. et al., 2010) e outras espécies vegetais (BERTHELOT et al., 2016; JUMPPONEN, ARI et al., 1998) inoculadas com fungos DSE em condições controladas de suprimento com fontes inorgânicas de nutrientes, indica uma maior eficiência de absorção de nutrientes em plantas inoculadas do que no controle não inoculado, com efeito positivo no acúmulo de matéria seca da raiz e parte aérea. Consistentemente, no presente estudo, conduzido em solo arenoso não esterilizado, além da inoculação com os fungos A101 e A103 aumentar significativamente a eficiência de recuperação do  $^{15}\text{N}$ , o acúmulo de macro (N, P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Fe, Zn e Mn) e clorofila, área foliar, perfilhamento e a matéria seca na parte aérea de plantas de arroz, em relação ao controle não inoculado, a inoculação com A103, também aumentou a atividade de PM  $\text{H}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -PPase vacuolar e os níveis de transcritos das isoforma de PM  $\text{H}^+$ -ATPase (*OsAI*, 5 e 8). Ao contrário, os genes que codificam transportadores de  $\text{NO}_3^-$ , proteína acessória *OsNAR2.1* e as isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase, *OsA2*, 3 e 7 não foram induzidos pelo fungo. Estes resultados indicam que a inoculação com estes fungos aumenta a eficiência de absorção e de utilização de nutrientes, embora sejam necessários mais estudos para se avaliar o rendimento de grãos e a sua qualidade.

O fato da inoculação com A103, após 24 h de exposição à 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$ , não ter afetado a abundância de transcritos do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, transportadores de  $\text{NO}_3^-$  estritamente envolvidos na atividade do sistema induzível de transporte de alta afinidade (iHATS) (OKAMOTO et al., 2006; ZHUO et al., 1999) e nem ter aumentado a expressão da proteína acessória *OsNAR2.1* em relação ao controle, sugere que se avalie outros transportadores de  $\text{NO}_3^-$ , induzidos por exemplo pela micorriza arbuscular, tais como *NRT2.3*, *NFP1.3* e, em especial o transceptor *NFP6.3* (anteriormente designado de *NRT1.1*) (DRECHSLER et al., 2017; HILDEBRANDT, U. et al., 2002; SAIA, S. et al., 2015) de dupla afinidade, que além operar em baixas e altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e perceber a concentração desde ânion no meio externo, regula o crescimento radicular para aumentar as chances de a planta encontrar  $\text{NO}_3^-$  (REMANS et al., 2006) e/ou algum fungo, que auxilie a planta a retirar este nutriente do solo, conforme anteriormente demonstrado em *Lotus Japonicus* para o transportador de fósforo, *LjPT4*, induzido pela micorriza arbuscular (VOLPE et al., 2016).

Nas condições do presente estudo, de solo arenoso irrigado à capacidade de campo, é de se esperar que as plantas de arroz tenham absorvido predominantemente  $\text{NO}_3^-$ , já que o  $\text{NH}_4^+$  é rapidamente convertido a  $\text{NO}_3^-$  em solos aerados (COLE, 1993). O  $\text{NO}_3^-$  presente no solo, entra na célula em simporte com dois prótons ( $2\text{H}^+$ :  $\text{NO}_3^-$ ) gerados pela PM  $\text{H}^+$ -ATPase (SONDERGAARD; SCHULZ; PALMGREN, 2004; THIBAUD; GRIGNON, 1981), onde

pode ser assimilado em aminoácidos através de uma série de enzimas, tais como a nitrato e nitrito redutases, glutamina sintetase, glutamato sintase, etc., ou estocado em vacúolos (DE ANGELI et al., 2006; YONEYAMA; ITO; ENGELAAR, 2003). O  $\text{NO}_3^-$  não reduzido e os aminoácidos são exportados através do xilema para parte aérea para construir proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes da planta necessários para o crescimento e produtividade da cultura, pois o nitrogênio é um macronutriente essencial que mais limita a produtividade (YONEYAMA et al., 1986; YONEYAMA et al., 2003). As raízes (particularmente o ápice radicular em crescimento) também recebem aminoácidos e amidas de órgãos maduros da parte aérea, via floema, para sintetizar proteínas para o seu crescimento (TATSUMI; KONO, 1980). Portanto, os incrementos de 47% e 33% observados na eficiência de recuperação e na quantidade de  $^{15}\text{N}$  na planta derivado do sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$ , bem como no conteúdo de N corroboram a maior massa seca da parte aérea observada em plantas inoculadas com os fungos A101 e A103, respectivamente.

O incremento significativo de aproximadamente 40% no conteúdo de K, observado em plantas inoculadas com os dois fungos (A101 e A103) relativamente ao controle, sugere que estes fungos auxiliaram as plantas de arroz a absorver o K por transposição da sua zona de depleção e sua intercepção em locais remotos inalcançáveis pela superfície radicular, uma vez que o K é transportado da solução do solo para a superfície radicular principalmente por difusão que se limita a distâncias muito curtas da superfície radicular (frequentemente 1-4 mm); ou por fluxo de massa, quando a concentração de K é alta (BARBER, 1995; MEURER, 2006; RUIZ et al., 1999; TAIZ et al., 2017). O K é o cátion mais requerido pelas plantas e o mais abundante no citossol e na matéria seca da planta (MARSCHNER, 1995; MEURER, 2006), atuando em diversos processos fisiológicos no vegetal, tais como a fotossíntese, ativação de mais de 60 sistemas enzimáticos, regulação da abertura e fechamento estomático, crescimento e alongamento celular pela geração do turgor celular e síntese proteica (MARSCHNER, 1995).

Os conteúdos de K e N mais elevados estão diretamente relacionados com maior área foliar total observada, uma vez que K atua na extensão celular e N sobre o alongamento da folha, levando a uma maior área foliar (CHAPMAN; LEMAIRE, 1993; MEIRI et al., 1992; NETO et al., 2007) e, portanto, maior exposição da planta à luz solar (NETO et al., 2007).

Os maiores conteúdos de P observados em plantas inoculadas são importantes porque indicam que em relação ao controle, a interação DSE-arroz competiu melhor com as reações de fixação de P no solo que restringem a recuperação deste nutriente a apenas 20% ou menos do total aplicado, mesmo sob uma fertilização adequada (RUSSELL, 1973); portanto, o P é frequentemente muito limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal (VANACE et al., 2003). Assim como N e K, o P atua em diversos processos, incluindo geração de energia, síntese de ácido nucleico, fotossíntese, glicólise, respiração, síntese e estabilidade da membrana, ativação/inativação de enzimas (VANACE et al., 2003).

Como o Ca assegura a integridade e seletividade da membrana plasmática (HANSON, 1984; HEPLER, PETER K., 2005), confere rigidez estrutural significativa à parede celular (HEPLER, P. K.; WINSHIP, 2010) e melhora a resistência do tecido vegetal (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; HEPLER, P. K.; WINSHIP, 2010; HIRSCHI, 2004), é possível, que o maior acúmulo de Ca observado em plantas inoculadas esteja associado a uma melhor proteção da planta hospedeira contra os estresses bióticos e abióticos (HONG-BO et al., 2008; KUDLA; BATISTIČ; HASHIMOTO, 2010).

Os fungos endofíticos *dark septate* também podem facilitar a absorção de Mg e micronutrientes tais como Fe, Zn e Mn, importantes para atividade fotossintética (BARTHOLDY et al., 2001; HASELWANDTER, 2009; VERGARA; ARAUJO; URQUIAGA; et al., 2017). Neste estudo, a inoculação com os fungos A101 e A103 incrementou o conteúdo de Mg e Fe em 25 e 16% e 34 e 42% e de Zn e Mn em 46 e 32% e

12 e 33%, respectivamente, em relação ao controle, o que está relacionado com melhor aproveitamento destes nutrientes na sua fonte (solo, FTE BR12 e *MineralCal*). O magnésio é importante na fotossíntese, porque a sua deficiência afeta importantes enzimas do cloroplasto e provoca a degradação da clorofila. Entretanto, um suprimento adequado de Mg torna a planta de arroz saudável e aumenta a biomassa da parte aérea, rendimento de grão, conteúdo de clorofila, taxa fotossintética e a atividade das enzimas antioxidantes (DING et al., 2008; HERMANS et al., 2010; SHAUL, 2002). O Fe absorvido pelas plantas participa de reações de oxirredução em hemoproteínas, como citocromos e em proteínas não hémicas, como a ferredoxina (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). A ferredoxina e citocromos são transportadores de elétrons que atuam na fotossíntese (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). Zn e Mn também atuam em enzimas envolvidas no metabolismo de C. Por exemplo, Zn é um componente estrutural da anidrase carbônica, que catalisa a dissolução do CO<sub>2</sub> (antes da sua assimilação), e ativa a trifosfato desidrogenase, uma enzima essencial para a glicólise (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). O Mn participa do fotossistema II (no complexo mangânico) sendo responsável pela fotólise da água (BROADLEY et al., 2012) e tem sido reconhecido como um indicador da eficiência de aquisição de P por plantas (LAMBERS et al., 2015). Portanto, o incremento no conteúdo de Mg, Fe, Mn e Zn corrobora estudos anteriores (BAN et al., 2017; ZHANG, H.-H. et al., 2012; ZHANG, Q. et al., 2017) que sugerem o envolvimento dos fungos DSE na atividade fotossintética pelo aumento dos níveis de clorofila (também observados neste estudo), eficiência fotoquímica do fotossistema II, taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e taxa de transpiração, levando a um maior acúmulo de glicose no tomate (ANDRADE-LINARES, DIANA ROCIO et al., 2011) e açúcares solúveis no arroz (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017). O incremento no conteúdo dos micronutrientes sugere que estes fungos podem ser potenciais produtores de sideróforos, o que favoreceria a absorção destes nutrientes pela planta inoculada. De fato, o fungo DSE *Phialocephala fortinii* sintetiza o sideróforo hidroxamato e incrementa a absorção de Fe (III) na planta hospedeira (BARTHOLDY et al., 2001).

A maior eficiência de recuperação do <sup>15</sup>N, o acúmulo de nutrientes e matéria seca, observado em plantas inoculadas, particularmente com o fungo *Pleosporeales* A103, pode estar relacionado com estímulo da PM H<sup>+</sup>-ATPase, uma enzima que participa da expansão celular, nutrição e regulação do pH intracelular (HARUTA et al., 2015), bem como com V-H<sup>+</sup>-PPase, outra importante enzima para atividade da própria PM H<sup>+</sup>-ATPase, para o transporte de auxina, crescimento da raiz e parte aérea no estágio vegetativo, absorção de N e P, resistência à seca e salinidade e atividade fotossintética (LI, J. et al., 2005; LI, X. et al., 2014; PAEZ-VALENCIA et al., 2013; PARK et al., 2005; YANG et al., 2014). De fato, a exposição das plantas inoculadas com o fungo A103 à 0,2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> incrementou significativamente a atividade da V-H<sup>+</sup>-PPase e PM H<sup>+</sup>-ATPase em 50 e 49% comparativamente ao controle, às 6h e 24 h, respectivamente. O aumento da atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase é essencial para a absorção ânions tais como NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, que requerem a força motriz de prótons (gradiente de H<sup>+</sup>) para vencer o potencial elétrico negativo (gradiente elétrico) que favorece a absorção de cátions através da membrana plasmática das células radiculares (DUBY; BOUTRY, 2009; SONDERGAARD et al., 2004).

O aumento da atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase foi antecedido pelo aumento da expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase, *OsA1*, *OsA5* e *OsA8*, membros das famílias I, II e V (ARANGO et al., 2003), respectivamente, não havendo aumento significativo da abundância de transcritos das isoformas *OsA2*, *OsA3* e *OsA7*. As isoformas *OsA1*, *OsA5* e *OsA8* foram diferentemente reguladas em plantas inoculadas. A inoculação com A103 com ou sem NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aumentou significativamente a abundância de transcritos de *OsA5* em relação ao controle; por outro lado, estimulou a isoforma *OsA1* apenas na ausência do ânion e a *OsA8* na sua presença, destacando a transcrição específica de *OsA5* sob a inoculação com este fungo. A isoforma

*OsA8/OsHA1* de arroz (ARANGO et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011) ortólogo de *MtHA1* de *Medicago truncatula* e *SlHA8* de *Solanum lycopersicum* (L.) propicia uma colonização adequada da raiz pelo fungo micorrízico arbuscular, melhora a absorção do  $H_2PO_4^-$  pela planta e energiza a membrana periarbuscular para a transferência bidirecional de nutrientes (KRAJINSKI et al., 2014; LIU et al., 2016; WANG, E. et al., 2014). Além disso, a *OsA5* e *OsA8* são associadas com a absorção de  $NO_3^-$  (SPERANDIO et al., 2011), e *OsA8* também com absorção e translocação de P para parte aérea (CHANG et al., 2009). Portanto, estes dados, sugerem que as isoformas *OsA5* e *OsA8* podem ser importantes para estabelecimento da interação entre fungos DSE e plantas de arroz.

A partir da análise conjunta de resultados obtidos em estudos anteriores e também no presente estudo constatou-se que os fungos DSE exsudam auxina e outros metabólitos (BERTHELOT et al., 2016; WAQAS et al., 2012), aumentam a biomassa do sistema radicular e da parte aérea (BERTHELOT et al., 2016; SANTOS, S. G. et al., 2017; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017; YUAN, Z. L. et al., 2010), diminuem a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para absorver  $NO_3^-$ , esgotam maior quantidade deste ânion no meio externo (VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017), incrementam o acúmulo de macro (JUMPPONEN, ARI et al., 1998; VERGARA; ARAUJO; ALVES; et al., 2017) e micronutriente (BARTHOLDY et al., 2001; HASELWANDTER, 2009; VERGARA; ARAUJO; URQUIAGA; et al., 2017) e induzem a atividade de PM  $H^+$ -ATPase e V- $H^+$ -PPase. Portanto, este estudo sugere, que estes fungos podem exsudar metabólitos que aumentariam a hidrólise de ATP em PM  $H^+$ -ATPase e/ou o número destas enzimas na membrana plasmática, com a V- $H^+$ -PPase otimizando o uso de ATP (através do uso PPI) resultando em maior atividade da PM  $H^+$ -ATPase (ou maior acidificação extracelular), que juntamente com a auxina estimularia o alongamento de pelos radiculares e a ramificação de raízes laterais, conforme a teoria do crescimento ácido (HAGER, 2003). Assim, a superfície radicular a ser colonizada pelo micélio intrarradicular, a superfície do micélio extrarradicular e absorção de água e nutrientes seria ampliada; e as plantas inoculadas passariam a apresentar um melhor desempenho em diversos processos fisiológicos e indicadores de crescimento. Entretanto, ainda são necessários mais estudos envolvendo plantas e fungos mutantes, para elucidação da exata função das isoformas de PM  $H^+$ -ATPase (*OsA5* e *OsA8*) e de outros prováveis transportadores responsivos a esta associação, bem como para a avaliação da possível contribuição da via de absorção do fungo endofítico *dark septate* e do seu transcriptoma para a planta hospedeira.

## 5.7 CONCLUSÕES

Este estudo indica que as plantas de arroz inoculadas com fungos endofíticos *dark septate* retiram macro e micronutrientes do solo mais eficientemente, e aumentam a quantidade e eficiência de recuperação do nitrogênio marcado com  $^{15}\text{N}$ , número de perfilhos e o crescimento. Estes efeitos são acompanhados pelo aumento da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática (PM  $\text{H}^+$ -ATPase) e  $\text{H}^+$ -pirofosfatase vacuolar (V- $\text{H}^+$ -PPase) e pela abundância de transcritos das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase, *OsA5* e *OsA8* em plantas arroz inoculadas com o *Pleosporales* A103.

Além disso, o estudo fornece uma visão abrangente dos componentes moleculares (transportadores de  $\text{NO}_3^-$ , proteína acessória NAR2.1 e isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPase) e fisiológicos (atividade de V- $\text{H}^+$ -ATPase, PM  $\text{H}^+$ -ATPase e V- $\text{H}^+$ -PPase) de plantas de arroz inoculadas com o fungo endofítico *dark septate* A103.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo mostrou, a exemplo de resultados na literatura, que a resposta da planta à inoculação com fungos endofíticos *dark septate* é complexa e que varia desde a promoção de crescimento da planta até a um efeito neutro da inoculação, não tendo sido observado nenhum efeito negativo da inoculação com estes fungos. Quando as plantas de tomate foram supridas com *C. ensiformis* (o equivalente a 150 kg N ha<sup>-1</sup>) como a única fonte de N, apresentaram maior crescimento, maior acúmulo de macro e micronutrientes, entretanto o mesmo efeito não foi observado quando o sulfato de amônio foi fornecido como a única fonte de N.

Por outro lado, as plantas de arroz responderam positivamente à inoculação com fungos DSE, independentemente da fonte de nitrogênio aplicada, havendo efeito positivo mais sutil no estágio vegetativo das plantas supridas com *C. ensiformis* (equivalente a 20 kg N ha<sup>-1</sup>), o que provavelmente esteve relacionado com imobilização de nutrientes pela biota do solo para degradar a *C. ensiformis* e/ou até mesmo com a baixa dose de N aplicada e liberação gradual e lenta do N e outros nutrientes presentes na *C. ensiformis* em comparação com o sulfato de amônio.

Esses resultados sugerem que a resposta da planta à inoculação de fungos DSE pode ser dependente (i) da família e/ou espécie que a planta hospedeira pertence, (ii) da diversidade inter e intraespecífica de um determinado grupo de fungos e/ou (iii) dos níveis de nutrientes no solo e do manejo da adubação. De fato, diferentes respostas da planta hospedeira (*Betula pendula*, *Eucalyptus globulus*, *Lolium perene*, *Arabidopsis thaliana*) como resultado da inoculação com diferentes isolados de *Leptodontidium*, *Phialophora*, *Periconia* ou *Microdochium* (BERTHELOT et al., 2016; FERNANDO; CURRAH, 1996; MANDYAM, K. G.; ROE; JUMPPONEN, 2013) e em função dos níveis da adubação nitrogenada em *Pinus contorta* inoculada com *Phialocephala fortinii* (JUMPPONEN, ARI et al., 1998) já foram relatadas.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

Os fungos endofíticos *dark septate*, criteriosamente selecionados, aumentam a eficiência de recuperação de nitrogênio em plantas de arroz e tomate em cultivo em solo não esterilizado de casa de vegetação e de suplementação com *C. ensiformis* como fonte orgânica de nitrogênio. Sob suplementação com sulfato de amônio, as plantas de arroz também apresentam maior eficiência de recuperação de nitrogênio; e na inoculação com A103, a atividade de H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase), H<sup>+</sup>-Pirofosfatase e a expressão das isoformas PM H<sup>+</sup>-ATPase, *OsA5* e *OsA8* são aumentadas. Com estas condições, os componentes morfológicos e de produção das plantas podem ser melhorados.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora ainda sejam necessários mais estudos, como por exemplo, a avaliação da contribuição da via de absorção dos fungos endofíticos *dark septate* para a planta hospedeira e desenvolvimento de inoculante, este estudo apresenta novas evidências de que este grupo de fungos pode afetar o crescimento da sua planta hospedeira pela modificação da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática e H<sup>+</sup>-pirofosfatase e a alteração das características agronômicas de uma determinada cultura; entretanto, deve-se investigar de que forma estes fungos modificam a atividade destas bombas de H<sup>+</sup> e com qual manejo o agrossistema poderia maximizar os efeitos benéficos destes fungos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEOYO, O.; PLETSCHKE, B.; DAMES, J. Improved endoglucanase production and mycelial biomass of some ericoid fungi. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 15, 2017.
- AKLADIOUS, S. A.; ABBAS, S. M. Application of *Trichoderma harzianum* t22 as a biofertilizer potential in maize growth. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 30-49, 2014/01/01 2014.
- AL-EZERJAWI, N. H.; KADHIM, J. Effect of Two Isolates of *Trichoderma harzianum* on Total Nitrogen, Chlorophyll a & b Contents and Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Class Eba'a-95. **International Journal of Science and Research**, v. 3, p. 1078-1083, 2012.
- AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMASS, E. A.; MURAOKA, T.; ROSSI, F. <sup>15</sup>N-labeled nitrogen from green manure and ammonium sulfate utilization by the sugarcane ratoon. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 361-368, 2011.
- ANDRADE-LINARES, D. R.; GROSCH, R.; FRANKEN, P.; REXER, K. H.; KOST, G.; RESTREPO, S.; DE GARCIA, M. C. C.; MAXIMOVA, E. Colonization of roots of cultivated *Solanum lycopersicum* by dark septate and other ascomycetous endophytes. **Mycologia**, v. 103, n. 4, p. 710-721, 2011.
- ANDRADE-LINARES, D. R.; GROSCH, R.; RESTREPO, S.; KRUMBEIN, A.; FRANKEN, P. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 5, p. 413-422, 2011.
- ANDRADES-LINARES, D. R.; FRANKEN, P. Fungal endophytes in plant Roots: taxonomy, colonization patterns and functions. In: AROCA, R. (Ed.). Noida: Springer, 2013. p.348-348.
- ARANGO, M.; GEVAUDANT, F.; OUFATTOLE, M.; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta**, v. 216, n. 3, p. 355-65, Jan 2003.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; HUFFAKER, R. C. Comparative Induction of Nitrate and Nitrite Uptake and Reduction Systems by Ambient Nitrate and Nitrite in Intact Roots of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. **Plant Physiol**, v. 102, n. 3, p. 811-819, Jul 1993.
- AZCON-AGUILAR, C.; ALBA, C.; MONTILLA, M.; BAREA, J. Isotopic (<sup>15</sup>N) evidence of the use of less available N forms by VA Mycorrhizas. **SYMBIOSIS-REHOVOT-**, v. 15, p. 39-39, 1993.
- BABITA RANI; SHASHI MADAN; K.D. SHARMA; POOJA; MUKESH KUMAR BERWAL; ASHWANI KUMAR. Effect of Mycorrhizal Colonization on Nitrogen and Phosphorous Metabolism in Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Water Deficit Stress. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 10, p. 916-929, 2017.

- BAGO, B.; VIERHEILIG, H.; PICHÉ, Y.; AZCÓN-AGUILAR, C. Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. **New Phytologist**, v. 133, n. 2, p. 273-280, 1996.
- BAILLY, J.; DEBAUD, J.-C.; VERNER, M.-C.; PLASSARD, C.; CHALOT, M.; MARMEISSE, R.; FRAISSINET-TACHET, L. How does a symbiotic fungus modulate expression of its host-plant nitrite reductase? **New Phytologist**, v. 175, n. 1, p. 155-165, 2007.
- BALESTRINI, R.; GÓMEZ-ARIZA, J.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P. Laser Microdissection Reveals That Transcripts for Five Plant and One Fungal Phosphate Transporter Genes Are Contemporaneously Present in Arbusculated Cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 9, p. 1055-1062, 2007/09/01 2007.
- BALESTRINI, R.; LANFRANCO, L. Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v. 16, n. 8, p. 509-524, 2006.
- BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in acid soils: nutrient management and plant use efficiency. In: MUNIZ, A. C. (Ed.). **Plant-Soil Interactions at low pH: Sustainable Agricultural and Forestry Production**. Campinas, Brazil: Brazilian Soil Science Society, 1997. p.75-93.
- BAN, Y.; XU, Z.; YANG, Y.; ZHANG, H.; CHEN, H.; TANG, M. Effect of Dark Septate Endophytic Fungus *Gaeumannomyces cylindrosporus* on Plant Growth, Photosynthesis and Pb Tolerance of Maize (*Zea mays* L.). **Pedosphere**, v. 27, n. 2, p. 283-292, 2017.
- BAPAUME, L.; REINHARDT, D. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. **Frontiers in plant science**, v. 3, 2012.
- BARBER. **Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach**. 2. New York: Wiley & Sons, 1995. 414-414
- BARROW, J.; AALTONEN, R. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. **Mycorrhiza**, v. 11, n. 4, p. 199-205, 2001.
- BARROW, J. R. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 5, p. 239-47, Oct 2003.
- BARTHOLDY, B.; BERRECK, M.; HASELWANDTER, K. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. **BioMetals**, v. 14, n. 1, p. 33-42, 2001.
- BENEDETTO, A.; MAGURNO, F.; BONFANTE, P.; LANFRANCO, L. Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza**, v. 15, p. 620-627, 2005.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct 2000.

BERTHELOT, C.; LEYVAL, C.; FOULON, J.; CHALOT, M.; BLAUDEZ, D. Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 10, p. fiw144, 2016.

BESSERER, A.; PUECH-PAGÈS, V.; KIEFER, P.; GOMEZ-ROLDAN, V.; JAUNEAU, A.; ROY, S.; PORTAIS, J.-C.; ROUX, C.; BÉCARD, G.; SÉJALON-DELMAS, N. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. **PLoS biology**, v. 4, n. 7, p. e226, 2006.

BIZABANI, C.; DAMES, J. F. Assimilation of organic and inorganic nutrients by *Erica* root fungi from the fynbos ecosystem. **Fungal biology**, v. 120, n. 3, p. 370-375, 2016.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-29, 1992.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo <sup>15</sup>N. In: HUNGRIA, M. e ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, Documentos, 46, 1994. p.471-494.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature communications**, v. 1, p. 48, 2010.

BONFANTE, P.; REQUENA, N. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 4, p. 451-457, 2011.

BONFIM, J. A.; VASCONCELLOS, R. L. F.; BALDESIN, L. F.; SIEBER, T. N.; CARDOSO, E. J. B. N. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, v. 20, n. Supplement C, p. 202-210, 2016/04/01/ 2016.

BONNEAU, L.; HUGUET, S.; WIPF, D.; PAULY, N.; TRUONG, H.-N. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, v. 199, n. 1, p. 188-202, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07/ 1976.

BREUILLIN-SESSOMS, F.; FLOSS, D. S.; GOMEZ, S. K.; PUMPLIN, N.; DING, Y.; LEVESQUE-TREMBLAY, V.; NOAR, R. D.; DANIELS, D. A.; BRAVO, A.; EAGLESHAM, J. B. Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter 4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2; 3. **The Plant Cell**, v. 27, n. 4, p. 1352-1366, 2015.

BRIAT, J.-F.; DUBOS, C.; GAYMARD, F. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 1, p. 33-40, 2015.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of Nutrients: Micronutrients. In: MARSCHNER, H. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. Academic press: Elsevier, 2012. p.191-248.

BUCHER, C. A.; SANTOS, L. A.; NOGUEIRA, E. D. M.; RANGEL, R. P.; DE SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. The transcription of nitrate transporters in upland rice varieties with contrasting nitrate-uptake kinetics. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 177, n. 3, p. 395-403, 2014.

BUCHER, M. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 11-26, 2007.

BÜCKING, H.; HEYSER, W. Uptake and transfer of nutrients in ectomycorrhizal associations: interactions between photosynthesis and phosphate nutrition. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 2, p. 59-68, April 01 2003.

BÜCKING, H.; KAFLE, A. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the nitrogen uptake of plants: current knowledge and research gaps. **Agronomy**, v. 5, n. 4, p. 587-612, 2015.

BÜCKING, H.; SHACHAR-HILL, Y. Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. **New Phytologist**, v. 165, n. 3, p. 899-912, 2005.

BUN-YA, M.; NISHIMURA, M.; HARASHIMA, S.; OSHIMA, Y. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 6, p. 3229-3238, 1991.

BURNELL, J. N. The biochemistry of manganese in plants. In: GRAHAM, R. D.; HANNAM, R. J. e UREN, N. C. (Ed.). **Manganese in soils and plants**. 1. Dordrecht: Springer, 1988. p.125-137.

CALABRESE, S.; PEREZ-TIENDA, J.; ELLERBECK, M.; ARNOULD, C.; CHATAGNIER, O.; BOLLER, T.; SCHUSSLER, A.; BRACHMANN, A.; WIPF, D.; FERROL, N.; COURTY, P. E. GintAMT3 - a Low-Affinity Ammonium Transporter of the Arbuscular Mycorrhizal *Rhizophagus irregularis*. **Front Plant Sci**, v. 7, p. 679, 2016.

CALDWELL, B. A.; JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Utilization of Major Detrital Substrates by Dark-Septate, Root Endophytes. **Mycologia**, v. 92, n. 2, p. 230-230, 2000.

CAVAGNARO, T. R.; BENDER, S. F.; ASGHARI, H. R.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. **TRENDS in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 283-290, 2015.

CHANG, C.; HU, Y.; SUN, S.; ZHU, Y.; MA, G.; XU, G. Proton pump OsA8 is linked to phosphorus uptake and translocation in rice. **J Exp Bot**, v. 60, n. 2, p. 557-65, 2009.

CHAPMAN, D. F.; LEMAIRE, G. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. Proceedings of the XVII International Grassland Congress, 1993. Palmerston North, Hamilton, Lincoln and Rockhampton, New Zealand and Australia. Grassland Association. p.95-104.

CHARDON, F.; NOEL, V.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3401-12, 2012.

CHOI, Y.; HODGKISS, I.; HYDE, K. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. **J Agric Technol**, v. 1, p. 55-66, 2005.

CLIQUET, J.-B.; STEWART, G. R. Ammonia assimilation in *Zea mays* L. infected with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **Plant Physiology**, v. 101, n. 3, p. 865-871, 1993.

COLE, J. Controlling environmental nitrogen through microbial metabolism. **Trends Biotechnol**, v. 11, n. 8, p. 368-72, Aug 1993.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACIAS-RODRIGUEZ, L.; ALFARO-CUEVAS, R.; LOPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma* spp. Improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 27, n. 6, p. 503-14, Jun 2014.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579, 2009.

CRUZ, C.; EGSGAARD, H.; TRUJILLO, C.; AMBUS, P.; REQUENA, N.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A.; JAKOBSEN, I. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant physiology**, v. 144, n. 2, p. 782-792, 2007.

CRUZ, C.; FEGGHI, Z.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A.; VARMA, A. Plant Nitrogen Use Efficiency May Be Improved Through Symbiosis with *Piriformospora indica*. In: VARMA, A.; KOST, G. e OELMÜLLER, R. (Ed.). **Piriformospora indica: Sebacinales and Their Biotechnological Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.285-293. ISBN 978-3-642-33802-1.

D'APUZZO, E.; ROGATO, A.; SIMON-ROSIN, U.; EL ALAOU, H.; BARBULOVA, A.; BETTI, M.; DIMOU, M.; KATINAKIS, P.; MARQUEZ, A.; MARINI, A.-M. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1763-1774, 2004.

DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J. M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, v. 442, n. 7105, p. 939-42, Aug 24 2006.

DE KERCHOVE D'EXAERDE, A.; SUPPLY, P.; GOFFEAU, A. Subcellular traffic of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 10, p. 907-916, 1996.

DE MENDIBURU, F. **Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package version 1.2-6**. Lima-PERU 2017.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. 1. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.253-280.

DELLA MONICA, I. F.; SAPARRAT, M. C. N.; GODEAS, A. M.; SCERVINO, J. M. The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. **Fungal Ecology**, v. 17, p. 10-17, 2015.

DIENE, O.; WANG, W.; NARISAWA, K. *Pseudosigmoidea ibarakiensis* sp. nov., a Dark Septate Endophytic Fungus from a Cedar Forest in Ibaraki, Japan. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 3, p. 381-387, 2013.

DING, Y.-C.; CHANG, C.-R.; LUO, W.; WU, Y.-S.; REN, X.-L.; WANG, P.; XU, G.-H. High Potassium Aggravates the Oxidative Stress Induced by Magnesium Deficiency in Rice Leaves1 |Project supported by the Dead Sea Works Ltd., Israel. **Pedosphere**, v. 18, n. 3, p. 316-327, 2008/06/01/ 2008.

DONI, F.; ISAHAK, A.; CHE MOHD ZAIN, C. R.; WAN YUSOFF, W. M. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. **AMB Express**, v. 4, p. 45-45, 05/29 2014.

DOOLOTKELDIEVA, T.; BOBUSHEVA, S. Screening of wild-type fungal isolates for cellulolytic activity. **Microbiology Insights**, v. 4, p. 1-10, 2011.

DRECHSLER, N.; COURTY, P. E.; BRULE, D.; KUNZE, R. Identification of arbuscular mycorrhiza-inducible Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family (NPF) genes in rice. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 1, p. 93-100, Jan 2017.

DUBY, G.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. **Pflugers Arch**, v. 457, n. 3, p. 645-55, Jan 2009.

EBERHARD, S.; FINAZZI, G.; WOLLMAN, F.-A. The dynamics of photosynthesis. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 463-515, 2008.

ERMLER, U.; GRABARSE, W.; SHIMA, S.; GOUBEAUD, M.; THAUER, R. K. Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. **Current opinion in structural biology**, v. 8, n. 6, p. 749-758, 1998.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possible all higher plants. **Science**, v. 222, n. 4624, p. 621-624, 1983.

FACANHA, A. R.; DE MEIS, L. Inhibition of Maize Root H<sup>+</sup>-ATPase by Fluoride and Fluoroaluminate Complexes. **Plant Physiol**, v. 108, n. 1, p. 241-246, May 1995.

FALHOF, J.; PEDERSEN, JESPER T.; FUGLSANG, ANJA T.; PALMGREN, M. Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. **Molecular Plant**, v. 9, n. 3, p. 323-337, 2016.

FAO. **Food and Agriculture Organization of United Nations** 2016.

FAURE, S.; CLIQUET, J.-B.; THEPHANY, G.; BOUCAUD, J. Nitrogen assimilation in *Lolium perenne* colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **The New Phytologist**, v. 138, n. 3, p. 411-417, 1998.

FELLBAUM, C. R.; GACHOMO, E. W.; BEESETTY, Y.; CHOUDHARI, S.; STRAHAN, G. D.; PFEFFER, P. E.; KIERS, E. T.; BÜCKING, H. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2666-2671, February 14, 2012 2012.

FELLBAUM, C. R.; MENSAH, J. A.; CLOOS, A. J.; STRAHAN, G. E.; PFEFFER, P. E.; KIERS, E. T.; BÜCKING, H. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. **New Phytologist**, v. 203, n. 2, p. 646-656, 2014.

FELLE, H. H.; WALLER, F.; MOLITOR, A.; KOGEL, K. H. The mycorrhiza fungus *Piriformospora indica* induces fast root-surface pH signaling and primes systemic alkalization of the leaf apoplast upon powdery mildew infection. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, n. 9, p. 1179-85, Sep 2009.

FERNANDO, A. A.; CURRAH, R. S. A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 7, p. 1071-1078, 1996.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental designs package. R package version 1.1. 2.** 2013.

FERROL, N.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Current genetics**, v. 37, n. 2, p. 112-118, 2000.

FINLAY, R.; SÖDERSTRÖM, B. Mycorrhiza and carbon flow to the soil. In: (Ed.). **Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process**. Chapman and Hall, New York, 1992. p.134-160. ISBN 0412018918.

FIORILLI, V.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P. The expression of GintPT, the phosphate transporter of *Rhizophagus irregularis*, depends on the symbiotic status and phosphate availability. **Plant**, v. 237, n. 5, p. 1267-1277, 2013/05/01 2013.

FITZGERALD, M. A.; MCCOUCH, S. R.; HALL, R. D. Not just a grain of rice: the quest for quality. **Trends in plant science**, v. 14, n. 3, p. 133-139, 2009.

FOOLAD, M. Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 2, p. 101-119, 2004.

FREIRE, L.; BALIEIRO, F. D. C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. D.; PEREIRA, M.; LIMA, E.; GUERRA, J.; FERREIRA, M.; LEAL, M. D. A.; CAMPOS, D. D. **Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro**. Seropédica, RJ: Universidade Rural do Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural, 2013. 430

FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. **Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas**. Campinas 1988.

GACHOMO, E.; ALLEN, J. W.; PFEFFER, P. E.; GOVINDARAJULU, M.; DOUDS, D. D.; JIN, H.; NAGAHASHI, G.; LAMMERS, P. J.; SHACHAR-HILL, Y.; BÜCKING, H. Germinating spores of *Glomus intraradices* can use internal and exogenous nitrogen sources for de novo biosynthesis of amino acids. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 399-411, 2009.

GARDES, M.; DAHLBERG, A. Mycorrhizal diversity in arctic and alpine tundra: an open question. **New Phytologist**, v. 133, n. 1, p. 147-157, 1996.

GAXIOLA, R. A.; PALMGREN, M. G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2204-2214, 2007.

GENRE, A.; CHABAUD, M.; BALZERGUE, C.; PUECH-PAGÈS, V.; NOVERO, M.; REY, T.; FOURNIER, J.; ROCHANGE, S.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; BARKER, D. G. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 190-202, 2013.

GEORGE, E.; MARSCHNER, H.; JAKOBSEN, I. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 15, n. 3-4, p. 257-270, 1995.

GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 109-126, 1997.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; ARNOULD, C.; OUFATTOLE, M.; ARANGO, M.; GIANINAZZI, S. Differential activation of  $\text{H}^+$ -ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. **Planta**, v. 211, n. 5, p. 609-613, 2000.

GIANINAZZI- PEARSON, V.; SMITH, S.; GIANINAZZI, S.; SMITH, F. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular—arbuscular mycorrhizas. **New phytologist**, v. 117, n. 1, p. 61-74, 1991.

GOMEZ, S. K.; JAVOT, H.; DEEWATTHANAWONG, P.; TORRES-JEREZ, I.; TANG, Y.; BLANCAFLOR, E. B.; UDVARDI, M. K.; HARRISON, M. J. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **BMC Plant Biol**, v. 9, p. 10, Jan 22 2009.

GOVINDARAJULU, M.; PFEFFER, P. E.; JIN, H.; ABUBAKER, J.; DOUDS, D. D.; ALLEN, J. W.; BUCKING, H.; LAMMERS, P. J.; SHACHAR-HILL, Y. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 819-823, 06/09/print 2005.

GRACE, C.; STRIBLEY, D. P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 95, n. 10, p. 1160-1162, 1991/10/01/ 1991.

GUESCINI, M.; ZEPPA, S.; PIERLEONI, R.; SISTI, D.; STOCCHI, L.; STOCCHI, V. The expression profile of the *Tuber borchii* nitrite reductase suggests its positive contribution to host plant nitrogen nutrition. **Current genetics**, v. 51, n. 1, p. 31-41, 2007.

GUETHER, M.; NEUHÄUSER, B.; BALESTRINI, R.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U.; BONFANTE, P. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 73-83, 2009.

GUTIERREZ-NAJERA, N.; MUNOZ-CLARES, R. A.; PALACIOS-BAHENA, S.; RAMIREZ, J.; SANCHEZ-NIETO, S.; PLASENCIA, J.; GAVILANES-RUIZ, M. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Planta**, v. 221, n. 4, p. 589-96, Jun 2005.

HAGER, A. Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. **J Plant Res**, v. 116, n. 6, p. 483-505, Dec 2003.

HAJONG, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Comparative study of key phosphorus and nitrogen metabolizing enzymes in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2311-2322, 2013/07/01 2013.

HAMMER, E. C.; PALLON, J.; WALLANDER, H.; OLSSON, P. A. Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 76, n. 2, p. 236-44, May 2011.

HANSON, J. B. The functions of calcium in plant nutrition. In: TINKER, P. B. e LAUCHLI, A. (Ed.). **Advances in plant nutrition**. New York: Praeger Publishers, v.1, 1984. p.149–208. ISBN 0743-8931.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 647-649, 2011.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 43, 01/01/online 2004.

HARRISON, M. J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 59, p. 19-42, 2005.

- HARRISON, M. J. Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 6, p. 691-698, 2012/12/01/ 2012.
- HARRISON, M. J.; DEWBRE, G. R.; LIU, J. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **The Plant Cell**, v. 14, n. 10, p. 2413-2429, 2002.
- HARRISON, M. J.; VAN BUUREN, M. L. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, v. 378, n. 6557, p. 626-629, 1995.
- HARUTA, M.; BURCH, H. L.; NELSON, R. B.; BARRETT-WILT, G.; KLINE, K. G.; MOHSIN, S. B.; YOUNG, J. C.; OTEGUI, M. S.; SUSSMAN, M. R. Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17918-29, Jun 4 2010.
- HARUTA, M.; GRAY, W. M.; SUSSMAN, M. R. Regulation of the plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) by phosphorylation. **Curr Opin Plant Biol**, v. 28, p. 68-75, Dec 2015.
- HARUTA, M.; SUSSMAN, M. R. The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v. 158, n. 3, p. 1158-71, Mar 2012.
- HASELWANDTER, K. Mycorrhizal fungi: colonisation pattern of alpine plants and ecological significance of siderophore release. **Aspects of Applied Biology**, n. 98, p. 105-108, 2009.
- HAWKINS, H.-J.; GEORGE, E. Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake. **Physiologia Plantarum**, v. 105, n. 4, p. 694-700, 1999.
- HAYASHI, Y.; TAKAHASHI, K.; INOUE, S.; KINOSHITA, T. Abscisic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, v. 55, n. 4, p. 845-53, Apr 2014.
- HE, X.; NARA, K. Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 8, p. 331-333, 2007.
- HEPLER, P. K. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. **The Plant Cell**, v. 17, n. 8, p. 2142-2155, 2005.
- HEPLER, P. K.; WINSHIP, L. J. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. **J Integr Plant Biol**, v. 52, n. 2, p. 147-60, Feb 2010.
- HERMANS, C.; VUYLSTEKE, M.; COPPENS, F.; CRISTESCU, S. M.; HARREN, F. J.; INZE, D.; VERBRUGGEN, N. Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytol**, v. 187, n. 1, p. 132-44, Jul 2010.

HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Physiologia Plantarum**, v. 115, n. 1, p. 125-136, 2002.

HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Physiol Plant**, v. 115, n. 1, p. 125-136, May 2002.

HIRSCHI, K. D. The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. **Plant Physiol**, v. 136, n. 1, p. 2438-42, Sep 2004.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Stn. Bull**, v. 347, p. 1-32, 1950.

HODGE, A.; CAMPBELL, C. D.; FITTER, A. H. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. **Nature**, v. 413, n. 6853, p. 297-299, 2001.

HODGE, A.; FITTER, A. H. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13754-13759, 2010.

HOGBERG, P. Root symbioses of trees in savannas. In: PROCTOR, J. (Ed.). **Mineral nutrients in tropical forest and savanna ecosystems**. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publishing House, 1989. p.121-136.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Soil Research**, v. 35, n. 2, p. 227-240, 1997.

HONG-BO, S.; LI-YE, C.; MING-AN, S.; SHI-QING, L.; JI-CHENG, Y. Bioengineering plant resistance to abiotic stresses by the global calcium signal system. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 6, p. 503-10, Nov-Dec 2008.

HOWITT, S. M.; UDVARDI, M. K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1465, n. 1, p. 152-170, 2000/05/01/ 2000.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 345, n. 2, p. 646-51, Jun 30 2006.

JAKOBSEN, I.; ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. **New Phytologist**, v. 120, n. 3, p. 371-380, 1992.

JANICKA-RUSSAK, M. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: (Ed.). **Abiotic stress response in plants-physiological, biochemical and genetic perspectives**: InTech, 2011.

JAVELLE, A.; CHALOT, M.; SÖDERSTRÖM, B.; BOTTON, B. Ammonium and methylamine transport by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and ectomycorrhizas. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 4, p. 355-366, 1999.

JAVELLE, A.; MOREL, M.; RODRÍGUEZ-PASTRANA, B.-R.; BOTTON, B.; ANDRÉ, B.; MARINI, A.-M.; BRUN, A.; CHALOT, M. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 411-430, 2003.

JAVELLE, A.; RODRÍGUEZ-PASTRANA, B.-R.; JACOB, C.; BOTTON, B.; BRUN, A.; ANDRÉ, B.; MARINI, A.-M.; CHALOT, M. Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEBS Letters**, v. 505, n. 3, p. 393-398, 2001.

JAVOT, H.; PENMETSA, R. V.; BREUILLIN, F.; BHATTARAI, K. K.; NOAR, R. D.; GOMEZ, S. K.; ZHANG, Q.; COOK, D. R.; HARRISON, M. J. *Medicago truncatula* mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **The Plant Journal**, v. 68, n. 6, p. 954-965, 2011.

JAVOT, H.; PENMETSA, R. V.; TERZAGHI, N.; COOK, D. R.; HARRISON, M. J. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1720-1725, January 30, 2007 2007.

JENNINGS, D. H. **The physiology of fungal nutrition**. Cambridge University Press, 1995. ISBN 0521355249.

JIN, H.; PFEFFER, P.; DOUDS, D.; PIOTROWSKI, E.; LAMMERS, P.; SHACHAR- HILL, Y. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 168, n. 3, p. 687-696, 2005.

JOHANSSON, F.; SOMMARIN, M.; LARSSON, C. Fusicoccin Activates the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by a Mechanism Involving the C-Terminal Inhibitory Domain. **The Plant Cell**, v. 5, n. 3, p. 321-327, 1993.

JONGBLOED, R. H.; CLEMENT, J. M. A. M.; BORST-PAUWELS, G. W. F. H. Kinetics of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake by ectomycorrhizal fungi. Effect of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on K<sup>+</sup> uptake. **Physiologia Plantarum**, v. 83, n. 3, p. 427-432, 1991.

JULIANO, B. O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: JULIANO, B. O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. 2. Saint Paul, Minnesota: American association of cereal chemists, 1985. p.59-174.

JULIANO, B. O. **Rice in human nutrition**. Rome, Italy: Int. Rice Res. Inst., 1993. ISBN 9251031495.

JUMPPONEN, A. Dark-septate root endophytes : a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis. **New Phytol**, v. 140, p. 295-310, 1998 1998.

- JUMPPONEN, A. Dark septate endophytes-are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, v. 11, n. 4, p. 207-211, 2001.
- JUMPPONEN, A.; MATTSON, K. G.; TRAPPE, J. M. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. **Mycorrhiza**, v. 7, n. 5, p. 261-265, 1998.
- JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **New Phytologist**, v. 140, n. 2, p. 295-310, 1998.
- KALDORF, M.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of Maize and Fungal Nitrate Reductase Genes in Arbuscular Mycorrhiza. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 6, p. 439-448, 1998/06/01 1998.
- KANCZEWSKA, J.; MARCO, S.; VANDERMEEREN, C.; MAUDOUX, O.; RIGAUD, J. L.; BOUTRY, M. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 33, p. 11675-80, Aug 16 2005.
- KARANDASHOV, V.; BUCHER, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 22-29, 2005/01/01/ 2005.
- KERSTEN, M. A. S. H.; ARNINKHOF, M. J. C.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; VAN DER DRIFT, C. Transport of amino acids and ammonium in mycelium of *Agaricus bisporus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1428, n. 2, p. 260-272, 1999/08/05/ 1999.
- KIERS, E. T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J. A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E.; FELLBAUM, C. R.; KOWALCHUK, G. A.; HART, M. M.; BAGO, A.; PALMER, T. M.; WEST, S. A.; VANDENKOORNHUYSE, P.; JANSA, J.; BÜCKING, H. Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. **Science**, v. 333, n. 6044, p. 880-882, 2011.
- KNAPP, D. G.; KOVÁCS, G. M.; ZAJTA, E.; GROENEWALD, J.; CROUS, P. W. Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 87-100 2015.
- KOBAE, Y.; TAMURA, Y.; TAKAI, S.; BANBA, M.; HATA, S. Localized Expression of Arbuscular Mycorrhiza-Inducible Ammonium Transporters in Soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 9, p. 1411-1415, 2010.
- KOEGEL, S.; AIT LAHMIDI, N.; ARNOULD, C.; CHATAGNIER, O.; WALDER, F.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIPF, D.; WIEMKEN, A.; COURTY, P. E. The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol**, v. 198, n. 3, p. 853-65, May 2013.
- KOEGEL, S.; BRULÉ, D.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; COURTY, P.-E. The effect of different nitrogen sources on the symbiotic interaction between *Sorghum bicolor* and *Glomus*

*intraradices*: Expression of plant and fungal genes involved in nitrogen assimilation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 86, n. Supplement C, p. 159-163, 2015/07/01/ 2015.

KORTHOUT, H. A.; DE BOER, A. H. A fusicoccin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. **The Plant Cell**, v. 6, n. 11, p. 1681-1692, 1994.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 92, n. 4, p. 486-488, 1989/06/01/ 1989.

KRAJINSKI, F.; COURTY, P.-E.; SIEH, D.; FRANKEN, P.; ZHANG, H.; BUCHER, M.; GERLACH, N.; KRYVORUCHKO, I.; ZOELLER, D.; UDVARDI, M.; HAUSE, B. The H<sup>+</sup>-ATPase HA1 of *Medicago truncatula* Is Essential for Phosphate Transport and Plant Growth during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **The Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1808-1817, 2014.

KRANNER, I.; COLVILLE, L. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 1, p. 93-105, 2011.

KREBS, M.; BEYHL, D.; GORLICH, E.; AL-RASHEID, K. A.; MARTEN, I.; STIERHOF, Y. D.; HEDRICH, R.; SCHUMACHER, K. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 7, p. 3251-6, Feb 16 2010.

KUDLA, J.; BATISTIČ, O.; HASHIMOTO, K. Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. **The Plant Cell**, v. 22, n. 3, p. 541-563, 03/30 2010.

KUMARI, R.; KISHAN, H.; BHOON, Y.; VARMA, A. Colonization of cruciferous plants by *Piriformospora indica*. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1672-1674, 2003.

KÜPPER, H.; KRONECK, P. M. Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H. e SIGEL, R. K. O. (Ed.). **Nickel and Its Surprising Impact in Nature**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, v.2, 2007. p.31-62.

LAMBERS, H.; HAYES, P. E.; LALIBERTÉ, E.; OLIVEIRA, R. S.; TURNER, B. L. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 2, p. 83-90, 2015.

LAMOUREUX, G.; JAVELLE, A.; BADAY, S.; WANG, S.; BERNECHE, S. Transport mechanisms in the ammonium transporter family. **Transfus Clin Biol**, v. 17, n. 3, p. 168-75, Sep 2010.

LASSALETTA, L.; BILLEN, G.; GRIZZETTI, B.; ANGLADE, J.; GARNIER, J. 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. **Environmental Research Letters**, v. 9, n. 10, p. 105011, 2014.

LAYER, G.; REICHELDT, J.; JAHN, D.; HEINZ, D. W. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. **Protein Science**, v. 19, n. 6, p. 1137-1161, 2010.

LEE, R. B.; RUDGE, R. A. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. **Annals of Botany**, v. 57, p. 471-486, 1986.

LI, J.; YANG, H.; PEER, W. A.; RICHTER, G.; BLAKESLEE, J.; BANDYOPADHYAY, A.; TITAPIWANTAKUN, B.; UNDURRAGA, S.; KHODAKOVSKAYA, M.; RICHARDS, E. L.; KRIZEK, B.; MURPHY, A. S.; GILROY, S.; GAXIOLA, R. *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. **Science**, v. 310, n. 5745, p. 121-5, Oct 7 2005.

LI, X.; GUO, C.; GU, J.; DUAN, W.; ZHAO, M.; MA, C.; DU, X.; LU, W.; XIAO, K. Overexpression of VP, a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene in wheat (*Triticum aestivum* L.), improves tobacco plant growth under Pi and N deprivation, high salinity, and drought. **J Exp Bot**, v. 65, n. 2, p. 683-96, Feb 2014.

LIU, J.; LIU, J.; CHEN, A.; JI, M.; CHEN, J.; YANG, X.; GU, M.; QU, H.; XU, G. Analysis of tomato plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family suggests a mycorrhiza-mediated regulatory mechanism conserved in diverse plant species. **Mycorrhiza**, v. 26, n. 7, p. 645-56, Oct 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOPEZ-CORIA, M.; HERNANDEZ-MENDOZA, J. L.; SANCHEZ-NIETO, S. *Trichoderma asperellum* Induces Maize Seedling Growth by Activating the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 29, n. 10, p. 797-806, Oct 2016.

LÓPEZ-PEDROSA, A.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; VALDERAS, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 2, p. 102-110, 2006/02/01/ 2006.

LUPINI, A.; ARANITI, F.; MAUCERI, A.; PRINCI, M. P.; SORGONA, A.; SUNSERI, F.; VARANINI, Z.; ABENAVOLI, M. R. Coumarin enhances nitrate uptake in maize roots through modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. **Plant Biol (Stuttg)**, Nov 27 2017.

MACEBO, J. R. D.; GOUVEIA, R. F. D.; BHERING, S. B.; FREIRE, L. R.; LIMA, E.; ZONTA, E.; MANHÃES, M.; PORTZ, A.; SOUZA, J. N. D. Recomendações de adubos, corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas do Estado do Rio de Janeiro. In: FREIRE, L. R.; BALIEIRO, F. D. C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C. D.; PEREIRA, M. G.; LIMA, E. e ET AL (Ed.). **Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro**. 1. Brasília, DF: Editora Universidade Rural, 2013. p.430-430. ISBN 978-85-7035-182-1.

MAHMOUD, R. S.; NARISAWA, K. A New Fungal Endophyte, *Scolecobasidium humicola*, Promotes Tomato Growth under Organic Nitrogen Conditions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e78746-e78746, 2013.

MAILLET, F.; POINSOT, V.; ANDRE, O.; PUECH-PAGES, V.; HAOUY, A.; GUEUNIER, M.; CROMER, L.; GIRAUDET, D.; FORMEY, D.; NIEBEL, A.; MARTINEZ, E. A.; DRIGUEZ, H.; BECARD, G.; DENARIE, J. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. **Nature**, v. 469, n. 7328, p. 58-63, 01/06/print 2011.

MALDONADO-MENDOZA, I. E.; DEWBRE, G. R.; HARRISON, M. J. A Phosphate Transporter Gene from the Extra-Radical Mycelium of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* Is Regulated in Response to Phosphate in the Environment. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 10, p. 1140-1148, 2001/10/01 2001.

MANDYAM, K. **Dark septate fungal endophytes from a tallgrass prairie and their continuum of interactions with host plants**. 2008. Kansas State University

MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Abundance and possible functions of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. **Studies in Mycology**, v. 53, p. 173-190, 2005.

MANDYAM, K.; JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. **Studies in Mycology**, v. 53, n. Supplement C, p. 173-189, 2005/01/01/ 2005.

MANDYAM, K.; LOUGHIN, T.; JUMPPONEN, A. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 813-821, 2010.

MANDYAM, K. G.; ROE, J.; JUMPPONEN, A. *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. **Fungal Biol**, v. 117, n. 4, p. 250-60, Apr 2013.

MANSFELDT, T. Redox potential of bulk soil and soil solution concentration of nitrate, manganese, iron, and sulfate in two Gleysols. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 167, n. 1, p. 7-16, 2004.

MARINI, A. M.; SOUSSI-BOUDEKOU, S.; VISSERS, S.; ANDRE, B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 8, p. 4282-93, August 1, 1997 1997.

MARINI, A. M.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Embo journal**, v. 13, n. 15, p. 3456-63, Aug 1 1994.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **San Diego**, v. Academic P, n. 1, p. 889-889, 1995.

MARZLUF, G. A. Regulation of Nitrogen Metabolism in Mycelial Fungi. In: BRAMBL, R. e MARZLUF, G. A. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. p.357-368. ISBN 978-3-662-10367-8.

MCHARGUE, J. The role of manganese in plants<sup>1</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 44, n. 7, p. 1592-1598, 1922.

MEIRI, A.; SILK, W. K.; LÄUCHLI, A. Growth and Deposition of Inorganic Nutrient Elements in Developing Leaves of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v. 99, n. 3, p. 972-978, 1992.

MELIN, E. On the mycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. and *Picea abies* Karst. A preliminary note. **Journal of Ecology**, n. 9, p. 254-257, 1922.

MENKIS, A.; ALLMER, J.; VASILIAUSKAS, R.; LYGIS, V.; STENLID, J.; FINLAY, R. Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. **Mycological Research**, v. 108, n. 8, p. 965-973, 2004.

MENSAH, J. A.; KOCH, A. M.; ANTUNES, P. M.; KIERS, E. T.; HART, M.; BÜCKING, H. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. **Mycorrhiza**, v. 25, n. 7, p. 533-546, 2015.

MEURER, E. J. Potássio. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. 1. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.282-295.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297-2306, 2007.

MILLER, A. J.; SMITH, S. J. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 7, p. 843-854, 1996.

MONTANINI, B.; MORETTO, N.; SORAGNI, E.; PERCUDANI, R.; OTTONELLO, S. A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, n. 1, p. 22-34, 2002/06/01/ 2002.

MORALES-CEDILLO, F.; GONZALEZ-SOLIS, A.; GUTIERREZ-ANGO, L.; CANO-RAMIREZ, D. L.; GAVILANES-RUIZ, M. Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Plant Cell Rep**, v. 34, n. 4, p. 617-29, Apr 2015.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1465, n. 1-2, p. 1-16, May 1 2000.

MORTH, J. P.; PEDERSEN, B. P.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; ANDERSEN, J. P.; VILSEN, B.; PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 60-70, Jan 2011.

MURPHY, P. J.; LANGRIDGE, P.; SMITH, S. E. Cloning plant genes differentially during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v. 135, n. 2, p. 291-301, 1997.

NAVARRO, F. J.; MACHÍN, F.; MARTÍN, Y.; SIVERIO, J. M. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13268-13274, 2006.

NETO, D. C.; MONTEIRO, F. A.; DECHEN, A. R. Características produtivas do capim-tanzânia cultivado com combinações de potássio e de magnésio. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2007.

NEWSHAM, K. K. *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. **New Phytologist**, v. 144, n. 3, p. 517-524, 1999.

\_\_\_\_\_. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, v. 190, n. 3, p. 783-793, 2011.

NIEMINEN, T. M.; UKONMAANAHO, L.; RAUSCH, N.; SHOTYK, W. Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. In: SIGEL, A.; SIGEL, H. e SIGEL, R. K. O. (Ed.). **Nickel and Its Surprising Impact in Nature**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, v.2, 2007. p.1-30.

NOURI, E.; BREUILLIN-SESSOMS, F.; FELLER, U.; REINHARDT, D. Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90841, 2014.

OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y.; SIDDIQI, M. Y.; CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. **Plant Physiol**, v. 140, n. 3, p. 1036-46, Mar 2006.

OKUMURA, M.; INOUE, S.; TAKAHASHI, K.; ISHIZAKI, K.; KOHCHI, T.; KINOSHITA, T. Characterization of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. **Plant Physiol**, v. 159, n. 2, p. 826-34, Jun 2012.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. v. 11, p. 252, 03/15/online 2013.

PAEZ-VALENCIA, J.; SANCHEZ-LARES, J.; MARSH, E.; DORNELES, L. T.; SANTOS, M. P.; SANCHEZ, D.; WINTER, A.; MURPHY, S.; COX, J.; TRZASKA, M.; METLER, J.; KOZIC, A.; FACANHA, A. R.; SCHACHTMAN, D.; SANCHEZ, C. A.; GAXIOLA, R. A. Enhanced Proton Translocating Pyrophosphatase Activity Improves Nitrogen Use Efficiency in Romaine Lettuce. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 1557, 2013.

PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 52, p. 817-845, Jun 2001.

PARK, S.; LI, J.; PITTMAN, J. K.; BERKOWITZ, G. A.; YANG, H.; UNDURRAGA, S.; MORRIS, J.; HIRSCHI, K. D.; GAXIOLA, R. A. Up-regulation of a H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 52, p. 18830-5, Dec 27 2005.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. v. 6, p. 763, 10/01/online 2008.

PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C.; BRIGGS, S. P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal

symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 20, p. 13324-13329, October 1, 2002 2002.

PEREIRA, G. M. D.; RIBEIRO, K. G.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; VITAL, M. J. S.; KASUYA, M. C. M.; ZILLI, J. É. Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 331-334, 2011.

PEREZ-TIENDA, J.; CORREA, A.; AZCON-AGUILAR, C.; FERROL, N. Transcriptional regulation of host  $\text{NH}_4^+$  transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots. **Plant Physiol Biochem**, v. 75, p. 1-8, Feb 2014.

PÉREZ-TIENDA, J.; TESTILLANO, P. S.; BALESTRINI, R.; FIORILLI, V.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1044-1055, 11// 2011.

PÉREZ-TIENDA, J.; VALDERAS, A.; CAMAÑES, G.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; FERROL, N. Kinetics of  $\text{NH}_4^+$  uptake by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 6, p. 485-491, August 01 2012.

PÉREZ-TORRES, C.-A.; LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; IBARRA-LACLETTE, E.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate Availability Alters Lateral Root Development in *Arabidopsis* by Modulating Auxin Sensitivity via a Mechanism Involving the TIR1 Auxin Receptor. **The Plant Cell**, v. 20, n. 12, p. 3258-3272, 2008.

PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; TEIXEIRA, M. G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 791-796, 2003.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **T Brit Mycol Soc**, v. 55, n. 1, p. 157-160, 1970.

PUMPLIN, N.; HARRISON, M. J. Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in *Medicago truncatula* Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 809-819, 2009.

QIN, Y.; PAN, X.; KUBICEK, C.; DRUZHININA, I.; CHENTHAMARA, K.; LABBE, J.; YUAN, Z. Diverse Plant-Associated Pleosporalean Fungi from Saline Areas: Ecological Tolerance and Nitrogen-Status Dependent Effects on Plant Growth. **Front Microbiol**, v. 8, p. 158, 2017.

R Development Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available online at: <https://www.R-project.org/>

RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 5, p. 563-569, 2000.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean Fungi from the Ordovician. **Science**, v. 289, n. 5486, p. 1920-1921, 2000.

REEVE, J. R.; SMITH, J. L.; CARPENTER-BOGGS, L.; REGANOLD, J. P. Soil-based cycling and differential uptake of amino acids by three species of strawberry (*Fragaria* spp.) plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 2547-2552, 2008.

REIS FILGUEIRA, F. A. **Novo manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2008.

REMANS, T.; NACRY, P.; PERVENT, M.; FILLEUR, S.; DIATLOFF, E.; MOUNIER, E.; TILLARD, P.; FORDE, B. G.; GOJON, A. The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 19206-19211, December 12, 2006 2006.

REQUENA, N.; BREUNINGER, M.; FRANKEN, P.; OCÓN, A. Symbiotic Status, Phosphate, and Sucrose Regulate the Expression of Two Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1540-1549, 2003.

RIBEIRO, K. G. **Fungos endofíticos dark septates em arroz silvestre *Oryza glumaepatula* Steund**. 2011. 68-68 Dissertation, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista,RO.

RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, G. M. D.; MOSQUEIRA, C. A.; BARAÚNA, A. C.; VITAL, M. J. S.; SILVA, K.; ZILLI, J. E. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos dark septate a partir de plantas de arroz. **Agro@ambiente**, v. 5, p. 97-105, 2011.

RUIZ, H. A.; MIRANDA, J.; CONCEIÇÃO, J. C. S. Contribuição dos mecanismos de fluxo de massa e de difusão para o suprimento de K, Ca e Mg a plantas de arroz. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, n. 4, p. 1015-1018, 1999.

RUSSELL, D. W. **Soil conditions and plant growth**. New York, NY, USA: Longman Group Ltd, 1973.

SAIA, S.; BENÍTEZ, E.; GARCÍA-GARRIDO, J.; SETTANNI, L.; AMATO, G.; GIAMBALVO, D. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on total plant nitrogen uptake and nitrogen recovery from soil organic material. **The Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 3, p. 370-378, 2014.

SAIA, S.; RAPPÀ, V.; RUISI, P.; ABENAVOLI, M. R.; SUNSERI, F.; GIAMBALVO, D.; FRENDÀ, A. S.; MARTINELLI, F. Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. **Front Plant Sci**, v. 6, p. 815, 2015.

SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R. D.; FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 549-564, 2009.

SANTOS, L. A.; SANTOS, W. A.; SPERANDIO, M. V. L.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R. D.; FERNANDES, M. S. Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters in two rice varieties grown in high and low nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v. 34, n. 7, p. 988-1002, 2011.

SANTOS, S. G.; SILVA, P. R.; GARCIA, A. C.; ZILLI, J. E.; BERBARA, R. L. Dark septate endophyte decreases stress on rice plants. **Braz J Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 333-341, Apr - Jun 2017.

SCHMIDT, S. B.; JENSEN, P. E.; HUSTED, S. Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. **Trends in plant science**, v. 21, n. 7, p. 622-632, 2016.

SHAO, J. F.; YAMAJI, N.; SHEN, R. F.; MA, J. F. The Key to Mn Homeostasis in Plants: Regulation of Mn Transporters. **Trends in plant science**, 2017.

SHARMA, B. B.; JHA, D. K. Arbuscular mycorrhiza and dark septate fungal associations in medicinal and aromatic plants of Guwahati. **2017**, v. 2, n. 1, p. 11, 2017-03-31 2017.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **Biometals**, v. 15, n. 3, p. 309-23, Sep 2002.

SHERAMETI, I.; SHAHOLLARI, B.; VENUS, Y.; ALTSCHMIED, L.; VARMA, A.; OELMÜLLER, R. The Endophytic Fungus *Piriformospora indica* Stimulates the Expression of Nitrate Reductase and the Starch-degrading Enzyme Glucan-water Dikinase in Tobacco and *Arabidopsis* Roots through a Homeodomain Transcription Factor That Binds to a Conserved Motif in Their Promoters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26241-26247, July 15, 2005 2005.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 21-43, 2010.

SMITH, J.; UM, M. H. Rapid procedures for preparing soil and KCl extracts for <sup>15</sup>N analysis. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, v. 21, n. 17-18, p. 2173-2179, 1990.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2008. 145-187

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 227-250, 2011.

\_\_\_\_\_. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 1-13, 2012/01/01 2012.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Plant Physiol**, v. 136, n. 1, p. 2475-82, Sep 2004.

- SOUZA, S. R. D.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, n. 21, p. 2049-2063, 1998.
- SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. D. Isoforms of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **Plant Science**, v. 180, p. 251-258, 2011.
- STOYKE, G.; CURRAH, R. S. Endophytic Fungi from the Mycorrhizae of Alpine Ericoid Plants. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, v. 69, n. 2, p. 347-352, 1991.
- STRUCK, C.; HAHN, M.; MENDGEN, K. Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activity in Spores, Germ Tubes, and Haustoria of the Rust Fungus *Uromyces viciae-fabae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, n. 1, p. 30-35, 1996/03/01/ 1996.
- SUBRAMANIAN, K. S.; CHAREST, C. Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. **Physiologia plantarum**, v. 102, n. 2, p. 285-296, 1998.
- SURONO; NARISAWA, K. The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. **Fungal Ecology**, v. 28, p. 1-10, 2017.
- SUTTON, M. A.; BLEEKER, A.; HOWARD, C.; BEKUNDA, M.; GRIZZETTI, B.; DE VRIES, W.; VAN GRINSVEN, H.; ABROL, Y.; ADHYA, T.; BILLEN, G. **Our Nutrient World: The challenge to produce more food and energy with less pollution**. Edinburgh: NERC/Centre for Ecology & Hydrology, 2013. ISBN 9781906698409.
- SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. Production of inoculum and inoculation with arbuscular Mycorrhizal fungi. In: ROBSON, A. D.; ABBOTT, L. K. e MALAJCZUK, N. (Ed.). **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Netherlands: Kluwer, 1994. p.231-238.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888-888
- TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; KAWASAKI, S.; NISHIZAWA, N. K.; MORI, S. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 466, 2001.
- TANAKA, Y.; YANO, K. Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 10, p. 1247-1254, 2005.
- TATSUMI, J.; KONO, Y. Root Growth of Rice Plants in Relation to Nitrogen Supply from Shoot. **Japanese journal of crop science**, v. 49, n. 1, p. 112-119, 1980.
- TEDESCO, M. J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca, e Mg em tecido de plantas por digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**. Porto Alegre, RS: UFRGS, 1982. 23-23

TEJADA, M.; GONZALEZ, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A.; PARRADO, J. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1758-1767, 2008.

TEMPLE, S. J.; VANCE, C. P.; STEPHEN GANTT, J. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 2, p. 51-56, 1998/02/01/ 1998.

THIBAUD, J. B.; GRIGNON, C. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. **Plant Science Letters**, v. 22, n. 3, p. 279-289, 1981/09/01/ 1981.

THOMSON, B.; CLARKSON, D.; BRAIN, P. Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, v. 116, n. 4, p. 647-653, 1990.

THORMANN, M. N.; CURRAH, R. S.; BAYLEY, S. E. The mycorrhizal status of the dominant vegetation along a peatland gradient in southern boreal Alberta, Canada. **Wetlands**, v. 19, n. 2, p. 438-450, 1999.

TIAN, C.; KASIBORSKI, B.; KOUL, R.; LAMMERS, P. J.; BÜCKING, H.; SHACHAR-HILL, Y. Regulation of the Nitrogen Transfer Pathway in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Gene Characterization and the Coordination of Expression with Nitrogen Flux. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 1175-1187, 2010.

TIAN, Z.; QIAN, Q.; LIU, Q.; YAN, M.; LIU, X.; YAN, C.; LIU, G.; GAO, Z.; TANG, S.; ZENG, D. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 51, p. 21760-21765, 2009.

TISSERANT, E.; KOHLER, A.; DOZOLME-SEDDAS, P.; BALESTRINI, R.; BENABDELLAH, K.; COLARD, A.; CROLL, D.; DA SILVA, C.; GOMEZ, S. K.; KOUL, R.; FERROL, N.; FIORILLI, V.; FORMEY, D.; FRANKEN, P.; HELBER, N.; HIJRI, M.; LANFRANCO, L.; LINDQUIST, E.; LIU, Y.; MALBREIL, M.; MORIN, E.; POULAIN, J.; SHAPIRO, H.; VAN TUINEN, D.; WASCHKE, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; HARRISON, M. J.; KÜSTER, H.; LAMMERS, P.; PASZKOWSKI, U.; REQUENA, N.; RENSING, S. A.; ROUX, C.; SANDERS, I. R.; SHACHAR-HILL, Y.; TUSKAN, G.; YOUNG, J. P. W.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTIN, F. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. **New Phytologist**, v. 193, n. 3, p. 755-769, 2012.

TISSERANT, E.; MALBREIL, M.; KUO, A.; KOHLER, A.; SYMEONIDI, A.; BALESTRINI, R.; CHARRON, P.; DUENSING, N.; FREI DIT FREY, N.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GILBERT, L. B.; HANDA, Y.; HERR, J. R.; HIJRI, M.; KOUL, R.; KAWAGUCHI, M.; KRAJINSKI, F.; LAMMERS, P. J.; MASCLAUX, F. G.; MURAT, C.; MORIN, E.; NDIKUMANA, S.; PAGNI, M.; PETITPIERRE, D.; REQUENA, N.; ROSIKIEWICZ, P.; RILEY, R.; SAITO, K.; SAN CLEMENTE, H.; SHAPIRO, H.; VAN TUINEN, D.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; PASZKOWSKI, U.; SHACHAR-HILL, Y. Y.; TUSKAN, G. A.; YOUNG, J. P. W.; SANDERS, I. R.; HENRISSAT, B.; RENSING, S. A.; GRIGORIEV, I. V.; CORRADI, N.; ROUX, C.; MARTIN, F. Genome of an arbuscular

mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 20117-20122, December 10, 2013 2013.

TORRES-JÚNIOR, C. V. **Influência dos fungos dark septate sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz e tomate**. 2014. 76

UPSON, R.; READ, D. J.; NEWSHAM, K. K. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2009.

USUKI, F.; NARISAWA, K. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, *Chinese cabbage*. **Mycologia**, v. 99, n. 2, p. 175-184, 2007/03/01 2007.

VANCE, C. P.; UHDE- STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New phytologist**, v. 157, n. 3, p. 423-447, 2003.

VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA; SAHAY, N.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2741-2744, June 1, 1999 1999.

VÁZQUEZ, M.; BAREA, J.; AZCÓN, R. Impact of soil nitrogen concentration on *Glomus* spp.-Sinorhizobium interactions as affecting growth, nitrate reductase activity and protein content of *Medicago sativa*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 1, p. 57-63, July 01 2001.

VERGARA, C.; ARAUJO, K. E. C.; ALVES, L. S.; DE SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A.; SANTA-CATARINA, C.; DA SILVA, K.; PEREIRA, G. M. D.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. É. Contribution of dark septate fungi to the nutrient uptake and growth of rice plants. **Braz J Microbiol**, p. in press, 2017.

VERGARA, C.; ARAUJO, K. E. C.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BALIEIRO, F. D. C.; MEDEIROS, P. S.; SANTOS, L. A.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E. Dark Septate Endophytic Fungi Help Tomato to Acquire Nutrients from Ground Plant Material. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2437, 2017-December-11 2017.

VERSAW, W. K. A phosphate-repressible, high-affinity phosphate permease is encoded by the *pho-5+* gene of *Neurospora crassa*. **Gene**, v. 153, n. 1, p. 135-139, 1995/02/03/ 1995.

VIUDA-MARTOS, M.; SANCHEZ-ZAPATA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; SENDRA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Tomato and Tomato Byproducts. Human Health Benefits of Lycopene and Its Application to Meat Products: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 8, p. 1032-1049, 2014.

VLAMIS, J.; WILLIAMS, D. Iron and manganese relations in rice and barley. **Plant and Soil**, v. 20, n. 2, p. 221-231, 1964.

VOLPE, V.; DELL'AGLIO, E.; BONFANTE, P. The *Lotus japonicus* MAMI gene links root development, arbuscular mycorrhizal symbiosis and phosphate availability. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 3, p. e23414, 2013/03/01 2013.

VOLPE, V.; GIOVANNETTI, M.; SUN, X.-G.; FIORILLI, V.; BONFANTE, P. The phosphate transporters LjPT4 and MtPT4 mediate early root responses to phosphate status in non mycorrhizal roots. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 3, p. 660-671, 2016.

WANG, E.; SCHORNACK, S.; MARSH, JOHN F.; GOBBATO, E.; SCHWESSINGER, B.; EASTMOND, P.; SCHULTZE, M.; KAMOUN, S.; OLDROYD, GILES E. D. A Common Signaling Process that Promotes Mycorrhizal and Oomycete Colonization of Plants. **Current Biology**, v. 22, n. 23, p. 2242-2246, 2012/12/04/ 2012.

WANG, E.; YU, N.; BANO, S. A.; LIU, C.; MILLER, A. J.; COUSINS, D.; ZHANG, X.; RATET, P.; TADEGE, M.; MYSORE, K. S.; DOWNIE, J. A.; MURRAY, J. D.; OLDROYD, G. E. D.; SCHULTZE, M. A H<sup>+</sup>-ATPase That Energizes Nutrient Uptake during Mycorrhizal Symbioses in Rice and *Medicago truncatula*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1818-1830, 2014.

WANG, Y.; WANG, M.; LI, Y.; WU, A.; HUANG, J. Enhancements of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nitrogen acquisition of *Chrysanthemum morifolium* under salt stress 2. **stress**, v. 35, p. 36, 2017.

WAQAS, M.; KHAN, A. L.; KAMRAN, M.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; LEE, I. J. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10754-73, Sep 7 2012.

WEI, Y.-F.; LI, T.; LI, L.-F.; WANG, J.-L.; CAO, G.-H.; ZHAO, Z.-W. Functional and transcript analysis of a novel metal transporter gene EpNramp from a dark septate endophyte (*Exophiala pisciphila*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, n. Supplement C, p. 363-368, 2016/02/01/ 2016.

WILCOX, H. E.; WANG, C. J. K. Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 17, n. 8, p. 884-899, 1987.

WILSON, B.; ADDY, H.; TSUNEDA, A.; HAMBLETON, S.; CURRAH, R. *Phialocephala sphaeroides* sp. nov., a new species among the dark septate endophytes from a boreal wetland in Canada. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 5, p. 607-617, 2004.

XIE, X.; HUANG, W.; LIU, F.; TANG, N.; LIU, Y.; LIN, H.; ZHAO, B. Functional analysis of the novel mycorrhiza-specific phosphate transporter AsPT1 and PHT1 family from *Astragalus sinicus* during the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 198, n. 3, p. 836-852, 2013.

XIE, X.; LIN, H.; PENG, X.; XU, C.; SUN, Z.; JIANG, K.; HUANG, A.; WU, X.; TANG, N.; SALVIOLI, A.; BONFANTE, P.; ZHAO, B. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Requires a Phosphate Transceptor in the *Gigaspora margarita* Fungal Symbiont. **Molecular Plant**, v. 9, n. 12, p. 1583-1608, 2016.

YADAVALLI, V.; JOLLEY, C. C.; MALLEDA, C.; THANGARAJ, B.; FROMME, P.; SUBRAMANYAM, R. Alteration of proteins and pigments influence the function of photosystem I under iron deficiency from *Chlamydomonas reinhardtii*. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35084, 2012.

YAN, F.; ZHU, Y.; MULLER, C.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiol**, v. 129, n. 1, p. 50-63, May 2002.

YANG, H.; ZHANG, X.; GAXIOLA, R. A.; XU, G.; PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Over-expression of the *Arabidopsis* proton-pyrophosphatase AVP1 enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. **J Exp Bot**, v. 65, n. 12, p. 3045-53, Jul 2014.

YONEYAMA, T.; FUJITA, K.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, T.; KAMBAYASHI, I.; YAZAKI, J. Variation in Natural Abundance of <sup>15</sup>N among Plant Parts and in <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N Fractionation during N<sub>2</sub> Fixation in the Legume-Rhizobia Symbiotic System. **Plant and Cell Physiology**, v. 27, n. 5, p. 791-799, 1986.

YONEYAMA, T.; ITO, O.; ENGELAAR, W. M. H. G. Uptake, metabolism and distribution of nitrogen in crop plants traced by enriched and natural <sup>15</sup>N: Progress over the last 30 years. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, n. 1, p. 121-132, 2003/01/01 2003.

YUAN, Q.; OUYANG, S.; WANG, A.; ZHU, W.; MAITI, R.; LIN, H.; HAMILTON, J.; HAAS, B.; SULTANA, R.; CHEUNG, F.; WORTMAN, J.; BUELL, C. R. The institute for genomic research *Osa1* rice genome annotation database. **Plant Physiol**, v. 138, n. 1, p. 18-26, May 2005.

YUAN, Z.-L.; SU, Z.-Z.; MAO, L.-J.; PENG, Y.-Q.; YANG, G.-M.; LIN, F.-C.; ZHANG, C.-L. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of Muscodor (*xylariaceae*). **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 15-23, 2011.

YUAN, Z. L.; LLIN, F. C.; ZHANG, C. L.; KUBICEK, C. P. A new species of Harpophora (*Magnaporthaceae*) recovered from healthy wild rice (*Oryza granulata*) roots, representing a novel member of a beneficial dark septate endophyte. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, p. 94-101, 2010.

ZHANG, H.-H.; TANG, M.; CHEN, H.; WANG, Y.-J. Effects of a dark-septate endophytic isolate LBF-2 on the medicinal plant *Lycium barbarum* L. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 91-96, 2012.

ZHANG, Q.; GONG, M.; YUAN, J.; HOU, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; HOU, X. Dark Septate Endophyte Improves Drought Tolerance in Sorghum. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 19, n. 01, p. 53-60, 2017.

ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. M. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 17, n. 5, p. 563-568, 1999.

ZIJLSTRA, J. D.; VAN'T HOF, P.; BAAR, J.; VERKLEY, G. J.; SUMMERBELL, R. C.; PARADI, I.; BRAAKHEKKE, W. G.; BERENDSE, F. Diversity of symbiotic root endophytes of the *Helotiales* in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. **Studies in Mycology**, v. 53, p. 147-162, 2005.