

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

Potencial de Fungos Endofíticos Negros (*Dark septate endophytes*) em Colonizar e Reduzir Efeitos de Estresse Hídrico em Plantas de Arroz

Silvana Gomes dos Santos

2014



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

**POTENCIAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NEGROS (*DARK SEPTATE
ENDOPHYTES*) EM COLONIZAR E REDUZIR EFEITOS DE
ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE ARROZ**

SILVANA GOMES DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Luis Louro Berbara

e Co-orientação do Pesquisador
Jerri Édson Zilli

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

UFRRJ / Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

633.18

S237p

T

Santos, Silvana Gomes dos, 1987-

Potencial de fungos endofíticos negros (*Dark septate endophytes*) em colonizar e reduzir efeitos de estresse hídrico em plantas de arroz / Silvana Gomes dos Santos – 2014.

58 f. : il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 32-39.

1. Arroz – Cultivo – Teses. 2. Fungos endofíticos – Teses. 3. Arroz – Atividade da água – Teses. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

SILVANA GOMES DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2014

Ricardo Luis Louro Berbara. Ph. D. UFRRJ
(Orientador)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

À minha família por ser o meu porto seguro.
Ao meu noivo Carlos Prestes pelo amor e compreensão.
Aos amigos, sempre presentes.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu senhor, que controla minhas decisões me sustenta nas dificuldades e nunca me deixa sozinha.

Aos meus pais, Antônio Batista e Maria Gomes, que venceram todas as dificuldades para me proporcionar uma formação de qualidade, meus exemplos de amor, sinceridade, confiança e dignidade.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo amor, carinho e pelo voto de confiança, minha inspiração de força e determinação.

Ao meu noivo Carlos Prestes pelo amor, carinho, paciência, compreensão, confiança e todo incentivo.

Ao meu sogro Raimundo, minha sogra Esmerlinda e minhas cunhadas pelo carinho.

Aos meus Orientadores, Ricardo Luiz Louro Berbara e Jerri Édson Zilli, pela confiança, exemplo profissional e pessoal.

Aos meus amigos, Ronaldo, Valfredo, Esdras e Murilo sempre presentes e de uma forma carinhosa fizeram parte do meu dia-a-dia.

Aos moradores antigos e novos do Alojamento da Embrapa Agrobiologia com quem dividi de uma forma intensa todos os momentos durante estes últimos dois anos.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI): Anelise, Beatriz, Brauly, Carlos, Elson, Fernanda, Gustavo, Gleyson, Jackson, Jéssica, Samuel, Tatiane e Taís.

Aos pesquisadores e técnicos do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI), Márcia, Luc, Gustavo, Norma, e de uma forma especial ao técnico João Luiz e a analista Karine pelo apoio na execução dos experimentos.

Aos amigos do curso, em especial, Andrea e Leilson pela amizade sincera durante todo esse tempo e pelos momentos de descontração.

A Paula Renata pelo auxílio nas análises e por sua amizade e apoio sempre.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela educação gratuita e de qualidade.

À Embrapa Agrobiologia, pela capacitação e infraestrutura.

A Capes pela bolsa de estudo.

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do solo pela formação.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Silvana Gomes dos Santos, filha de Antônio Batista dos Santos Sobrinho e Maria Gomes dos Santos, nasceu em 7 de janeiro de 1987, na cidade de Tucuruí, estado do Pará. Em 2002 concluiu o ensino fundamental na Escola Municipal de Ensino Fundamental Professora Raimunda Tavares e ingressou na antiga Escola Agrotécnica Federal de Castanhal atual (IFPA) para concluir o ensino médio e Técnico em Agropecuária em 2004, durante o curso foi bolsista do Instituto Internacional de Educação no Brasil atuando em projetos de Desenvolvimento e divulgação de técnicas agroecológicas na referida Instituição. No ano 2007 iniciou o curso de Especialização em Manejo Florestal na mesma Instituição deixando-o incompleto para adentrar-se a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2007 graduando-se em Agronomia em 2011. No início de sua graduação dedicou-se a estudar Fertilidade de solo, estagiando no Laboratório de análises químicas do solo da UFRRJ, depois então entrou na Embrapa Agrobiologia, sendo bolsista Iniciação Científica, atuando diretamente no projeto de pesquisa, Inoculante Múltiplo de Pseudomonas: Uma estratégia Biotecnológica para incrementar a produção de hortaliças (2008 a 2011). Ingressou no curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo da UFRRJ em março de 2012, como bolsista da CAPES, desenvolvendo sua dissertação “Potencial de fungos endofíticos negros (*Dark septate endophytes*) em colonizar e reduzir efeitos de estresse hídrico em plantas de arroz,” junto aos laboratórios de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia e Biologia do solo - UFRRJ concluindo-a na presente data.

RESUMO

SANTOS, Silvana Gomes. **Potencial de fungos endofíticos negros (*Dark septate endophytes*) em colonizar e reduzir efeitos de estresse hídrico em plantas de arroz.** 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2014.

O estresse por restrição hídrica é uma das mais importantes limitações ao desenvolvimento dos vegetais. Fungos endofíticos negros septados - DSE são relatados como capazes de induzir tolerância ao estresse hídrico em plantas. Objetivou-se através deste trabalho avaliar a capacidade de quatro isolados de DSE em colonizar as variedades de arroz Nipponbare e Piauí e promover o crescimento destas variedades em condição de estresse hídrico, além da avaliação do crescimento destes isolados *in vitro* em condições de estresse hídrico e salino. O experimento de colonização consistiu na inoculação das sementes com micélio fúngico e crescimento das plantas em tubos contendo 50 ml de meio Phytigel (5g L⁻¹) dissolvido em solução de Hoagland. Para avaliar o crescimento dos DSE em condições de estresse *in vitro* depositou-se discos de micélio fúngico em placas de Petri contendo meio BDA adicionado de cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações e em meio Phytigel adicionado de polietilenoglicol 6000 (PEG). O efeito dos DSE em reduzir o estresse por deficiência hídrica em arroz foi avaliado pela condução de 2 experimentos. O primeiro para avaliar as variáveis relacionadas a promoção de crescimento (massa fresca e seca da raiz e parte aérea e altura das plantas) e o segundo, realizado a partir da pré-seleção dos fungos e das doses de PEG definidas no primeiro ensaio. No segundo experimento foram avaliados os teores de proteínas totais em folhas e atividade das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidases (APX). As plantas foram cultivadas em meio Phytigel (2,5 L) com solução de Hoagland completa e acrescidas de doses crescentes de PEG, e permaneceram durante 30 dias em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. Observou-se que todos os isolados avaliados colonizaram as raízes de ambas as variedades de arroz pela presença de hifas septadas e escuras. Os DSE apresentaram diferentes níveis de tolerância à salinidade e ao estresse hídrico *in vitro*. O isolado Err 04 não teve seu crescimento afetado pela adição de NaCl e foi favorecido com o aumento da restrição hídrica do meio de cultura e o isolado Err 01 mostrou-se o mais sensível a ambos os estresses submetidos. Quando inoculado o isolado Err 46 na ausência do PEG apresentou maiores incrementos na altura e massas frescas e secas das plantas quando inoculado na variedade Nipponbare. No entanto, na presença da restrição hídrica -0,1 Mpa o isolado Err 01 apresentou-se estatisticamente superior em todos os parâmetros avaliados e em ambas às variedades. Respostas significativas à inoculação com exceção da MSR, só foram observadas até a resistência hídrica de -0,2 Mpa. A inoculação do isolado Err 01 reduziu o efeito do estresse oxidativo nas plantas evidenciado pela redução na atividade das enzimas antioxidantes em quase todos os tratamentos. Fungos DSE mostraram capazes de aumentar a tolerância de plantas de arroz ao estresse por deficiência hídrica.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L. DSE. Tolerância a estresse.

ABSTRACT

SANTOS, Silvana Gomes. **Potential of dark septate endophytes fungi to colonize and to reduce the effects of water stress in rice plants.** 2014. 58p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, 2014.

The stress of water restriction is a major constraint to the development of plants. Dark septate endophytes fungi - DSE are reported as capable of inducing tolerance to drought stress in plants. The objective of this work was to evaluate the ability of four isolates of DSE to colonize Nipponbare and Piauí's varieties of rice and promote the growth of these varieties in conditions of drought stress, in addition the evaluation of the growth of these isolates under conditions of drought stress and saline stress. The colonization's experiment consisted of the inoculation of seeds with fungal mycelia and plants growth in tubes containing 50 ml of medium Phytigel (5g L⁻¹) dissolved in Hoagland's solution. To evaluate the growth of DSE in stress conditions in vitro, discs of fungal mycelium were placed in petri dishes containing BDA medium added sodium chloride (NaCl) at different concentrations and means Phytigel added polyethylene glycol 6000 (PEG). The reducing effect of DSE in stress by deficit of water in rice was evaluated by conducting two experiments. The first to evaluate the variables related to the promotion of growth (fresh and dry weight of roots and shoots and plant height) and the second, held from the pre - selection of fungi and doses of PG defined in the first trial. In the second experiment, the antioxidant enzymes related to oxidative stress were evaluated in plant catalase (CAT), ascorbate peroxidases (APX) and total protein content in leaves. The plants were grown in Phytigel (2.5 L) with Hoagland nutrient solution and plus increasing doses of PEG, and remained for 30 days under controlled temperature, humidity and photoperiod. It was observed that all isolates colonize the roots of both varieties of rice and the presence of dark septate hyphae. DSE exhibited different levels of tolerance to salinity and drought stress in vitro. The isolated Err 04 had not affected by addition of NaCl and growth was favored with the increase of water restriction in the culture medium and isolated Err 01 proved to be the most sensitive to both stresses submitted. The isolated Err 46, when in the absence of PEG, had the highest increase in height and fresh and dry weight of plants when inoculated in the variety Nipponbare. However, in the presence of -0.1 MPa water restriction the isolated Err 01 was statistically superior in all parameters and for both varieties. Significant responses, with the exception of MSR, were observed only up to the -0.2 Mpa water resistance. Inoculation of the isolated Err 01 reduced the effect of oxidative stress in plants, as evidenced by the reduction in the activity of antioxidant enzymes in almost all treatments. DSE fungi proved to be able to increase the tolerance of rice plants to drought stress.

Keywords: *Oryza sativa* L. DSE. Stress tolerance.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Colonização de raízes de plantas de arroz por isolados fúngicos DSE (C) e um tratamento controle não inoculado (B) cultivadas em tubos de ensaio (A) contendo 50 mL de meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força iônica estéril em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. Oitavo dia após a inoculação. 14
- Figura 2.** Colonização de plantas de arroz variedade Nipponbare pelo isolado Err 01 de DSE aos 30 dias após a inoculação. Presença de hifas septadas (A) e microescleródios (B). Visualização em microscópio óptico (aumento de 1000X)..... 15
- Figura 3.** Crescimento da colônia fúngica dos isolados de “dark septate” aos 9 dias após a adição de disco de micélio fúngico de 7 mm de diâmetro em meio BDA (39g L⁻¹) contendo concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl). 16
- Figura 4.** Crescimento da colônia fúngica dos isolados de “dark septate” aos 9 dias após a adição de disco de micélio fúngico de 7 mm de diâmetro em meio Phytigel (5g L⁻¹) em condições de restrição hídrica pela adição de Polietilenoglicol (PEG 6000). 18
- Figura 5.** Massa seca total (raiz + parte aérea) de plantas de arroz não inoculadas, variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) aos 30 dias de crescimento em meio Phytigel e submetidas a diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). **Significativo a 5% de propabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições. 20
- Figura 6.** Massa fresca de parte aérea de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos “dark septate”. **Significativo a 5% de propabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições..... 20
- Figura 7.** Massa fresca de raiz de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos “dark septate”. **Significativo a 5% de propabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições..... 21
- Figura 8.** Altura de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos “dark septate”. **Significativo a 5% de propabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições. 21
- Figura 9.** Massa seca de parte aérea de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos DSE. **Significativo a 5% de propabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições..... 22

- Figura 10.** Massa seca de raiz de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos DSE. **Significativo a 5% de probabilidade. R^2 = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições. 24
- Figura 11.** Teores de proteínas em massa fresca de folhas (MF) de plantas de arroz variedade Nipponbare (A) e Piauí (B) inoculadas com isolado DSE Err 01 em comparação ao tratamento controle sob diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). A barra significa o erro padrão da média (n=4). Letras iguais minúscula dentro de cada dose de PEG 6000 e maiúscula entre as doses não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade. 26
- Figura 12.** Atividade de catalases (CAT) em folhas de plantas de arroz variedade Nipponbare (A) e Piauí (B) inoculadas com isolado DSE Err 01 em comparação ao tratamento controle sob diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). A barra significa o erro padrão da média (n=4). Letras iguais maiúsculas entre cada dose de PEG 6000 e minúscula dentro das doses não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. 26
- Figura 13.** Atividade de ascorbato peroxidases (APX) em folhas de plantas de arroz variedade Nipponbare (A) e Piauí (B) inoculadas com isolado DSE Err 01 em comparação ao tratamento controle sob diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). A barra significa o erro padrão da média (n=4). Letras iguais maiúsculas entre cada dose de PEG 6000 e minúscula dentro das doses não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. 27

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentrações de polietilenoglicol (PEG-6000) adicionado ao meio de cultura e valores de resistência hídrica correspondente para a temperatura média de 26 °C segundo Villela et al. (1991)..... 10
- Tabela 2.** Médias de comprimento de raiz (Craiz), massa seca de parte aérea (Mspa) e altura de oito plantas de arroz aos 20 dias após inoculação dos isolados de DSE e um tratamento testemunha (sem inoculação) em solução de Hoagland geleificada com phytigel..... 13
- Tabela 3.** Diâmetro de colônia fúngica dos isolados de “dark septate” após 9 dias de crescimento em meio BDA acrescido de cloreto de sódio (NaCl). Médias de três repetições. 17
- Tabela 4.** Diâmetro de colônia fúngica dos isolados de “dark septate” aos 9 dias após o crescimento em meio Phytigel acrescido de Polietilenoglicol (PEG). Médias de três repetições. 18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Fungos Endofíticos	3
2.2 Fungos Endofíticos do Tipo “Dark Septate”	3
2.3 Associação entre Arroz e Fungos DSE.....	5
2.4 Fungos DSE como Indutor de Tolerância a Estresse por Deficiência Hídrica.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Avaliação da Colonização das Variedades de Arroz por DSE.....	9
3.2 Avaliação do Crescimento <i>in vitro</i> de DSE em Condições de Estresse	9
3.3 Efeito de DSE na Redução do Estresse por Deficiência Hídrica em Arroz	11
3.3.1 Desinfestação das sementes.....	11
3.3.2 Inoculação.....	11
3.3.3 Indução do estresse hídrico.....	11
3.3.4 Condução do experimento	11
3.3.5 Avaliações	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 Avaliação da Colonização	13
4.2 Crescimento <i>in vitro</i> de DSE em Condições de Estresse	15
4.3 Avaliação do Efeito de DSE na Redução do Estresse Hídrico em Arroz	19
4.3.1 Promoção de crescimento (experimento I).....	19
4.3.2 Proteínas e atividade de enzimas antioxidantes em folhas de plantas de arroz (experimento II).....	25
5 CONCLUSÕES	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
8 APÊNDICE	40

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são microrganismos capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças. São importantes produtores de compostos bioativos empregados na indústria farmacêutica e na agricultura, principalmente no controle biológico de pragas (GUO et al., 2008).

Os fungos endofíticos são reconhecidos pela capacidade de colonizarem uma grande diversidade de plantas e serem frequentemente relacionados à proteção do hospedeiro e a promoção do crescimento vegetal, por aumentar a absorção de água e nutrientes, além de produzirem compostos reguladores de crescimento vegetal. São bastante diversos e estão compreendidos em sua maioria no filo *Ascomycota*, existindo representantes nos filos *Zigomycota*, *Chytridiomycota*, *Basidiomycota* e *Glomeromycota* (SCHULZ et al., 1999).

Os fungos endofíticos negros (*Dark septate endophytes* - DSE) são endófitos não biotróficos obrigatórios associados a um grande número de plantas e encontrados em todo o mundo, que compreendem um grupo de fungos endofíticos colonizadores de raízes e estão presentes em algumas ordens do filo *Ascomycota* (JUPPONEN & TRAPE, 1998; KNAPP et al., 2012).

DSE aparentemente executam diversas funções relevantes nos solos, similares aos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) por produzirem hifas e enzimas extras-radulares e extracelulares que podem melhorar a exploração do solo pelos vegetais (REDMAN et al., 2002; VEGA-FRUTIS et al., 2012).

Dentre as possíveis funções desempenhadas pelos DSE se destacam a capacidade de promover maior absorção de nutrientes de fontes orgânicas e inorgânicas e de promover maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos às plantas (MANDYAM & JUMPPONEN, 2005)

Fungos DSE têm sido isolados de diversos ecossistemas e de uma grande diversidade de espécies vegetais, sendo que, as gramíneas, como o arroz, têm sido as mais relatadas (PORRAS-ALFARO et al., 2008)

O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo e apresenta duas espécies cultiváveis, a espécie *Oryza glaberrima* e *Oryza sativaa*. A primeira é cultivada em alguns dos países da África Ocidental, ao passo que a segunda é a mais plantada no mundo (WATANABE, 1997). O cultivo do arroz se baseia no plantio de sequeiro e o irrigado, sendo que o irrigado é responsável pela maior parte da produção mundial, uma vez que o de sequeiro, por ser dependente da precipitação anual, pode ser afetado por escassez de água ao longo do seu ciclo. Dessa maneira, sua produtividade é reduzida, no entanto, nas condições atuais em que a preocupação com o uso da água encontra-se intensificada, pesquisas de seleção de variedades e mecanismos de adaptação das plantas às condições de deficiência hídrica são prioritárias.

A deficiência hídrica é um dos mais importantes fatores ambientais que provoca estresse em plantas e que poderá comprometer a produção mundial de alimentos. O estresse hídrico pode gerar danos oxidativos celulares irreversíveis nos organismos em decorrência da intensidade do estresse e/ou do tempo de exposição a ele (SANTOS & CARLESSO, 1998).

Uma vez que nestas condições o sistema antioxidante enzimático presente não é suficiente para manter as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas a partir de subprodutos do metabolismo aeróbico e fotossintético a níveis não tóxicos. Desta forma, EROs são acumuladas (MHAMDI et al., 2010).

O acúmulo de EROs pode acarretar danos as organelas celulares, oxidar moléculas biológicas importantes como, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, além de comprometer a integridade da membrana celular e reduzir a fotossíntese (MILLER et al., 2010).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma das principais EROs produzidas em folhas de plantas em condições de restrição hídrica (SILVEIRA et al., 2010). Catalases (CAT), e peroxidases do ascorbato (APX) são as principais enzimas responsáveis pela manutenção dos níveis não tóxicos de H_2O_2 em diversos compartimentos celulares (CAVALCANTI et al., 2007).

Na presença de estresse intenso e prolongado em que o sistema antioxidante não consegue evitar os danos celulares provocados pelo processo oxidativo, outros mecanismos adotados pelos organismos são de suma importância para sobrevivência e desenvolvimento dos mesmos. Em condições de estresse a associação de plantas com microrganismos benéficos, como os DSE, pode ser uma estratégia de sobrevivência dos vegetais e efeitos positivos dessa interação podem ser observados (PEREZ-NARANJO, 2009; Li et al., 2011)

Fungos DSE têm sido evidenciados colonizando plantas em diversos ambientes em condições de estresse, como deficiência hídrica, presença de metais pesados e solos oligotróficos, apresentando taxas de colonização superiores aos FMA nesses ambientes (REDMAM, 2002; MANDYAM, 2008).

Uma das hipóteses apresentada na literatura é a presença da melanina nas hifas e micloescleródios desse endófito que pode atuar como agente antioxidante complexando radicais livres e protegendo as células dos danos oxidativo durante o estresse (BARROW, 2003). Sendo assim, DSE podem contribuir ao desenvolvimento dos vegetais nessas condições.

Desta forma, este trabalho objetivou-se identificar fungos DSE capazes de tornar plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) mais tolerantes a estresse hídrico e determinar mecanismos envolvidos neste processo, através da avaliação da promoção de crescimento e da atividade de enzimas antioxidantes na presença de restrição hídrica induzida pelo uso de Polietilenoglicol-6000.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos Endofíticos

A definição de fungos endofíticos é bastante discutida na literatura, no entanto, de uma forma geral podem ser referidos como sendo microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro distinguindo os mesmos dos patogênicos que causam doenças em plantas e dos epifíticos que habitam superficialmente os vegetais (CARROL, 1991).

Estudos com organismos endofíticos são relatados desde o início da década de 80 e vem despertando interesse crescente nas pesquisas, principalmente devido a sua importância econômica e diferentes aplicações biotecnológicas. Dentre os grupos destes organismos os fungos endofíticos se destacam por apresentar uma grande diversidade e produzirem metabólitos secundários de importância na agricultura e na indústria farmacêutica, como esteroides, antibióticos e outras inúmeras moléculas bioativas (MUELLER et al., 2004; GUO et al., 2008).

A interação de fungos endofíticos com os vegetais apresenta elevada complexidade o que dificulta o entendimento dos mecanismos e benefícios dessa interação, entretanto, evidências são constantemente apresentadas, relacionando a capacidade desses fungos em promover proteção às plantas hospedeiras, seja pelo controle de fitopatógenos ou pela indução de resistência sistêmica (BAYAT et al., 2009).

Além disso, endófitos estão relacionados ao maior crescimento do hospedeiro por aumentar a absorção de água e nutrientes, além de produzirem compostos reguladores de crescimento vegetal (CHEN et al., 2010).

A associação com fungos endofíticos pode ainda desencadear uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas podendo resultar em indução de tolerância a estresse causado por uma condição de déficit hídrico, salinidade, metais pesados no solo, herbicidas ou herbívoros (GUNDEL et al., 2010)

Barrow et al. (2001) apresentaram estudos sobre a influência de fungos endofíticos no metabolismo dos vegetais e observaram que estes fungos podem aumentar a expressão de genes relacionados a produção de biomoléculas de comunicação e transdução de sinais.

Os fungos endofíticos são considerados ubíquos uma vez que são encontrados em diferentes partes da planta, como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais por meio de algum tipo de associação em todas as espécies vegetais avaliadas até o momento (ARNOLD, 2007).

Diversas formas de colonização desses fungos podem ser observadas nas diferentes espécies de plantas nativas ou cultivadas, podendo ser encontrada colonização do tipo intracelular, limitada a uma simples célula, intercelular e localizada ou sistêmica inter e intracelular. A forma localizada ocorre frequentemente nas estruturas aéreas enquanto a sistêmica predomina nas raízes dos vegetais (SHULZ & BOYLE, 2005).

Os principais grupos descritos de fungos endofíticos são representados pelos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Glomerulomycota* (SCHULZ et al., 1999; HUANG et al., 2001).

2.2 Fungos Endofíticos do Tipo “Dark Septate”

Os fungos endofíticos negros (*Dark septate endophyte* – DSE) apresentam como características básicas a pigmentação escura intensa, formação de hifas septadas e

microescleródios que podem colonizar inter e intracelularmente às células do córtex dos vegetais. Não são biotróficos obrigatórios, além de serem colonizadores de diversos tipos de plantas relacionando-se principalmente às condições abióticas. DSE são representados principalmente pelo filo *Ascomycota*, especificamente pelos subgrupos *Phialophora* sp. e *Phialocephalaos* sp. (BARROW & AALTONEN, 2001; YUAN et al., 2010).

Resultados da associação com fungos DSE para as plantas hospedeiras ainda não são totalmente conhecidos, apesar de estudos terem demonstrado que eles podem apresentar uma associação mutualística similar à dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) por produzirem hifas extras-radulares e enzimas extracelulares que podem melhorar a aquisição de nutrientes e água pelos vegetais e assim promover o crescimento vegetal (LINGFEI et al., 2005).

Mandyam & Jumpponen (2005), em uma revisão de literatura comparando a distribuição de DSE e FMA nos ecossistemas, observaram que os fungos DSE podem ser tão abundantes quanto os FMA ou até mais, possuindo uma grande distribuição geográfica e uma maior expressão em ambientes estressantes, como os solos oligotróficos e com restrição hídrica, relacionados à proteção vegetal nesses ambientes.

Neste mesmo sentido, Detmann et al. (2008), analisando a taxa de colonização de FMA e DSE em 13 diferentes espécies de plantas arbóreas e herbáceas no cerrado brasileiro, evidenciaram a presença de FMA em todas as espécies avaliadas, enquanto os fungos DSE não foram observados a partir da metodologia utilizada em apenas uma das espécies, o que relaciona em termos de colonização, similaridade destes dois tipos de fungos.

Já Zubek et al. (2009) avaliando associações de fungos FMA e DSE em plantas medicinais observaram que, do total de plantas avaliadas, 94% apresentaram associação com FMA e 36% foram colonizadas por DSE, sendo que a taxa de colonização das raízes por este fungo foi considerada baixa.

Estudando a ocorrência FMA e DSE em raízes de plantas invasoras no Brasil Massensini et al. (2014) verificaram que dentre 50 espécies avaliadas 41 faziam associação com FMA e 29 com DSE e em algumas espécies foi observada a presença simultânea de ambos simbiossiontes. Os autores relacionaram a associação de plantas com DSE a funções similares a dos FMA, na melhoria da absorção de água e nutrientes e tolerância dessas espécies vegetais a estresse.

Apesar dos efeitos dos DSE sobre seu hospedeiro ainda não estarem bem esclarecidos, podem ser encontrados na literatura resultados da inoculação de DSE em diversas espécies vegetais e em diferentes ecossistemas apresentando repostas do tipo negativa, neutra ou positiva (MANDYAM & JUMPPONEN, 2005).

Em uma meta-análise avaliando as repostas de plantas a inoculação com DSE a partir de 18 artigos relacionados, Newsham (2011) mostrou incrementos em biomassa total de parte aérea e raiz de plantas na ordem de 79%, 45% e 71% respectivamente, além de aumento nos valores de N total da parte aérea e de P na ordem de 26-103% das plantas inoculadas em relação ao tratamento controle. Dados expressando efeitos negativos não foram registrados pelo autor.

Respostas negativas foram encontradas por Ribeiro et al. (2011) no Brasil quando avaliaram a associação de DSE com a espécie selvagem de arroz *Oryza glumaepatula* em áreas amazônicas. Do total de fungos isolados das raízes desta espécie vegetal, aproximadamente 50% foram caracterizados como DSE e quando inoculados *in vitro* no mesmo hospedeiro, dos 5 fungos inoculados 4 apresentaram característica patogênica às plantas. Já Yuan et al. (2010), avaliando a inoculação deste mesmo tipo de fungo, isolado de arroz selvagem, verificaram que promoveu o crescimento de plantas de arroz (*Oryza Sativa* L.) na China.

Repostas positivas também foram encontradas por Andrade-Linares et al. (2011) quando avaliaram a inoculação de DSE no desempenho de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e observaram que houve um aumento entre 10% a 20% na biomassa da parte aérea das plantas jovens e um aumento de 17% no teor de glicose dos frutos. No entanto, esses resultados ocorreram apenas no início do estágio vegetativo, indicando que pode haver uma influência do estágio fisiológico da planta na resposta de inoculação de DSE. Assim, Pereira et al. (2011) verificaram que a colonização de DSE na espécie de arroz silvestre *O. glumaepatula* foi maior no estágio reprodutivo do que no juvenil, podendo ter sido influenciada pelo estágio fisiológico da planta de acordo com Schulz & Boyle, (2005).

Estudos realizados no nordeste da Índia mostraram alta diversidade de DSE em raízes de plantas de bambu e mostraram também uma correlação positiva entre o número de vesículas e hifas nas raízes com o teor de P e N na biomassa das plantas. Isso pode estar relacionado com a presença das hifas extra-radulares e a produção de enzimas extracelulares por este tipo de fungo, o que facilita a absorção e transferência desses nutrientes ao hospedeiro (DAS & KAYANG, 2010).

DSE ainda podem estar envolvidos em processos de ciclagem e restauração de solo e água contaminados por elementos tóxicos e ainda conferir resistência à seca aos vegetais, apresentando funções ecológicas importante em ambiente estressantes como as regiões áridas e semiáridas (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Portanto, fungos DSE podem desempenhar diversas funções nos ecossistemas associados a uma grande diversidade de espécies vegetais como, arroz (YUAN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011;) milho (LI et al., 2011) espécies florestais (DETMANN et al., 2008), aquáticas (MARINS et al., 2009), e medicinais (ZHANG et al., 2010), sendo que, as espécies da família Poaceae têm sido as mais relatadas (PORRAS-ALFARO et al., 2008).

2.3 Associação entre Arroz e Fungos DSE

O arroz pertence ao gênero *Oryza* e apresenta duas espécies cultivadas *Oryza glaberrima*, cultivada em alguns dos países da África Ocidental e *Oryza sativa* cultivada no mundo todo, além de apresentar uma grande diversidade de espécies silvestres (MORISHIMA, 1994). A espécie *Oryza sativa* é uma monocotiledônea da família Poaceae caracterizada por possuir caules ocos, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados ou cariopses, como frutos (WATANABE, 1997).

De acordo com dados da FAO (2006) o arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo devido a seus valores nutritivos, constituído de 20% de energia e 15% de proteína, além de um conjunto de vitaminas, sais minerais, Fe, Ca e fósforo. Além disso, representa uma fonte de proteína barata e juntamente com o feijão, constitui a base da alimentação das populações de baixa renda no Brasil e do mundo.

O arroz cultivado se restringe basicamente a duas subespécies, *Indica* e *Japonica*. A subespécie Japonica no Brasil predomina em cultivos de arroz de sequeiro enquanto a Indica em sistemas irrigados (KHUSH, 1997). Apesar das características morfológicas e fisiológicas serem distintas, segundo Chang & Bardenas, (1965) não existe critérios estabelecidos que distingam os grupos *Indica* e *Japonica* em relação aos ecossistemas que são adaptados, o cultivo de arroz de sequeiro é uma evolução do arroz irrigado devido principalmente à pressão de seleção exercida pelo homem.

No Brasil são considerados dois grandes agroecossistema de produção de arroz, o de várzeas, que pode ser em sistema irrigado por inundação controlada ou sem irrigação (várzeas úmidas) e o de terras altas, irrigado por aspersão ou sem irrigação (sequeiro) (GUIMARÃES et al., 2006).

O sistema de sequeiro é caracterizado por apresentar baixa produtividade de aproximadamente 3000 kg ha⁻¹, enquanto o sistema de várzea pode apresentar produtividades até 2,5 vezes superiores (CONAB, 2012). Um dos principais fatores responsáveis pela produtividade bastante inferior do sistema de sequeiro em comparação ao sistema de várzea é a dependência das precipitações do primeiro.

Este sistema depende da água da chuva para suprir a necessidade hídrica da cultura ao longo do seu ciclo. Além disso, a falta de variedades tolerantes à restrição hídrica representa outro importante fator (CRUSCIOL et al., 1999). Mesmo assim, no Brasil a predominância do ecossistema de cultivo de arroz é de terras altas em torno de 65% da área cultivada e o sistema de cultivo de maior representatividade é o de sequeiro (SILVA, 2012).

O cultivo de arroz de sequeiro ainda é mais expressivo em áreas pequenas e na agricultura não tecnificada ou de baixa tecnificação. No entanto, este sistema vem ganhando maior importância nos últimos anos principalmente pela preocupação mundial em relação à utilização de água na agricultura, sendo que, as atividades agrícolas são responsáveis por 70% do consumo de água doce disponível (CHAVES & OLIVEIRA, 2004).

Dentre as culturas de maior importância comercial, o arroz é a que consome maiores quantidades de água durante o seu ciclo, chegando a atingir valores aproximados de 19,862 m³ de água ha ano⁻¹, enquanto outras gramíneas consomem 3.640 a 6.057 m³ de água ha ano⁻¹ trigo e milho respectivamente (LIMA et al., 1999).

O elevado consumo de água pela cultura de arroz faz com que o ecossistema de cultivo em várzeas irrigado por inundação apresente maior produtividade em relação aos demais mencionados, devido principalmente à água estar facilmente disponível ao longo de todo o ciclo da cultura. Estima-se que para se produzir 1 kg de arroz em casca no sistema de várzea irrigado por inundação necessita-se de 2000 litros de água, o que torna essa cultura nesse sistema a mais exigente em recursos hídricos (EMBRAPA, 2005).

Além disso, o sistema de irrigação por superfície utilizado nesse tipo de cultivo é considerado de baixa eficiência, apresenta em torno de 40 e 70 % de eficiência de irrigação, estes valores são dependentes de diversos fatores, como a textura e características físicas do solo, de qualquer forma se observa perdas de água de 30% a 60 % pela ineficiência do sistema (LIMA et al., 1999).

Com as mudanças climáticas em decorrência do aquecimento global estima-se redução de 20% da água em todas as regiões do mundo incluindo as zonas áridas, semi-áridas, tropicais e subtropicais (CORTEZ, 2004). Dessa forma, as culturas, como o arroz, que apresentam maior consumo de água e por consequência maior dependência de sistemas de irrigação podem apresentar redução de suas produtividades. Variedades de arroz mais adaptadas a restrição hídrica e sistemas menos dependentes de irrigação como o de sequeiro devem ser mais estudados.

A tolerância e desenvolvimento de mecanismos de adaptação às condições de estresse, principalmente a escassez de água é uma das características mais relevante na escolha da variedade a ser cultivada no sistema de sequeiro (BALBINOT, 2003). Um dos principais mecanismos utilizados pelas plantas em condições adversas são associações com microrganismos benéficos, principalmente bactérias e fungos.

Associações entre arroz e fungos endofíticos são frequentemente relatados, entretanto, trabalhos relacionados à associação com DSE ainda são poucos na literatura. Na China YUAN et al. (2010) observaram a associação entre *Oryza sativa* L. e fungos DSE e a promoção de crescimento da planta hospedeira em experimento de inoculação.

No Brasil, fungos DSE foram isolados da espécie de arroz silvestre *O. glumaepatula* em áreas de mata e de savana na Amazônia por Ribeiro et al., 2011 e em experimento *in vitro* em condições estéreis foram avaliados a taxa de colonização deste isolados na espécie hospedeira e em arroz comercial. Neste ensaio os autores verificaram que os DSE foram

capazes de colonizar as duas espécies de arroz e a taxa de colonização foi maior nas raízes da espécie comercial, *Oryza sativa* L.

2.4 Fungos DSE como Indutor de Tolerância a Estresse por Deficiência Hídrica

O estresse em plantas é um dos conceitos bastante discutidos na literatura, no entanto, de maneira geral pode ser definido como um conjunto de fatores bióticos e abióticos aos quais as plantas estão sujeitas, como, deficiência nutricional, temperaturas (altas e baixas), ataque de insetos-pragas, doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, competição, exposição a substâncias xenobióticas em quantidades fitotóxicas, e deficiência hídrica (LICHTENTHALER, 1996).

O estresse por deficiência hídrica é a maior restrição no desenvolvimento dos vegetais em várias regiões do mundo. Estudos indicam que a tolerância à seca será uma das principais características desejadas na agricultura, uma vez que esse é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas e um dos principais fatores que poderá limitar a produção mundial de alimentos nos próximos anos (PENNISI, 2008).

A deficiência hídrica pode afetar a taxa de crescimento das plantas pela redução da transpiração e da produção de massa seca, além de outras características fisiológicas como, taxa fotossintética, abertura estomática e em condições mais intensa a senescência das folhas (TAIZ e ZEIGER, 2002). As plantas podem reduzir consideravelmente seu desenvolvimento e produtividade em regiões em que predomina períodos de deficiência hídrica ao longo do ciclo (KHUSH, 1997).

A intensidade do efeito do estresse hídrico no desenvolvimento dos vegetais depende de vários fatores, dos quais pode se destacar o genótipo, a severidade do estresse e o estágio fenológico da planta (SANTOS & CARLESSO, 1998). Segundo Taiz & Zeiger (2004), em condições de estresse, estratégias como o fechamento dos estômatos para prevenir a perda de água por transpiração pode ser desenvolvidas pelas plantas, assim como, mecanismos que reduzam o efeito oxidativo celular.

Dano oxidativo ocorre em plantas em condições de estresse, uma vez que a produção de EROs ocorre além da capacidade oxidante da cadeia respiratória acumulando no conteúdo celular. As EROs podem acarretar processos metabólicos importantes, responsáveis por desintegrar estruturas celulares, como, proteínas e ácidos nucleicos, além disso, reduzir a fotossíntese e comprometer a integridade da membrana celular (LICHTENTHALER, 1996; CAVALCANTI et al., 2007)

As principais formas das EROs são: Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (O^1_2) e o seus efeitos nas células vegetais depende diretamente da eficiência do sistema antioxidante não enzimático e enzimático presente. O sistema enzimático é composto principalmente pelas enzimas dismutase do superóxido (SOD) catalase (CAT), peroxidases do ascorbato (APXs) e peroxidases dos fenóis (POXs) (MOLLER, 2001; MILLER et al., 2010).

Essas enzimas são responsáveis pelo processo de detoxificação das EROs até a formação de H_2O e O_2 atuando em diferentes compartimentos celulares e podendo apresentar diferentes isoformas (YANIK & DONALDSON, 2005; CAVALCANTI et al., 2007).

A SOD é a primeira enzima a atuar na remoção das EROs dismutando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 . Nos vegetais esta enzima pode está presente em todos os compartimentos capazes de produzir EROs principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (SILVEIRA et al., 2010). Um dos principais sítios de produção de H_2O_2 é os peroxissomos durante a conversão do glicolato a glioxilato durante a fotorespiração (MITTLER et al., 2004).

O H_2O_2 apresenta alto potencial de dano celular devido apresentar meia vida longa e permeabilidade as membranas, podendo ocasionar danos oxidativo no local de sua produção, assim como em outros sítios celulares (SILVEIRA et al., 2010). Entretanto, estudos tem mostrados que o H_2O_2 assim como outras EROs são importantes sinalizadores moleculares envolvidos na mediação de respostas a infecção de patógenos, estresse ambiental e estímulos ao desenvolvimento vegetal (MITTLER et al., 2004; TORRES & DANGL, 2005; MILLER et al., 2010).

A CAT e APX são as principais enzimas responsáveis pela redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água nos sítios de produção desta ERO. A catalase está presente nos peroxissomos, glioxissomos, citosol e mitocôndrias, porém é encontrada em forma mais abundante nos peroxissomos atuando na eliminação direta do H_2O_2 oriundo da fotorespiração (ASADA, 2006; MHAMDI et al., 2010). Já as enzimas APX apresentam-se localizadas em diversos compartimentos celulares (CAVALCANTI et al., 2007; MILLER et al., 2010).

O sistema antioxidante enzimático é eficiente na manutenção dos níveis não tóxicos de EROs nas células em condições normais. Porém, à medida que o estresse é intensificado ou duradouro este não consegue cumprir totalmente sua função e os organismos passam a expressar características morfológicas e fisiológicas específicas decorrentes do processo oxidativo (CAVALCANTI et al., 2007). Nessas circunstâncias nota-se a importância de outros mecanismos auxiliares na proteção dos organismos aos fatores danosos que possam provocar efeitos negativos ao seu desenvolvimento.

Associação de espécies vegetais com microrganismos benéficos, como os fungos DSE em ambientes estressantes é comumente relatado como um dos mecanismos importantes para adaptação de espécies vegetais no processo de colonização desses ambientes (MANDYAM & JUMPPONEN, 2005; BARROW et al., 2011).

Estudos de abundância de DSE associados às raízes de plantas em regiões onde a água é um fator limitante, como as regiões áridas e semiáridas da China e dos EUA, Zhang et al. (2010) e Barrow, (2003) relataram que estes sejam capazes de promover o crescimento do hospedeiro por meio da maior absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos e promover maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos.

A melanina é um pigmento que proporciona a coloração escura frequentemente encontrada em todas as estruturas de alguns fungos, como, micélios, estruturas esporuladoras e esporos (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006). A presença deste pigmento está relacionada à maior proteção à radiação ultravioleta, maior dissipação de calor e retenção de metais pelos organismos (REDMAM, 2002; MANDYAN & JUMPPNEM, 2005; ZHANG et al., 2010).

A melanina também pode está relacionada à proteção de EROs liberadas pelos vegetais principalmente no processo de infecção, no caso de fungos fitopatogênicos, atuando como um agente antioxidante (HENSON et al., 1999).

Outros mecanismos relatados referem-se à produção de lipídios e mucilagens pelas hifas que pode ser uma estratégia para acumulação de carbono por estes organismos nas épocas de maior disponibilidade de água para utilização em épocas de seca (BARROW, 2003). A produção de uma extensa rede fúngica extracelular produzida por DSE também pode auxiliar na absorção de nutrientes e água pelas plantas por permitir maior absorção de água e nutrientes do solo (MANDYAM, 2008).

Esses mecanismos são apontados na literatura, entretanto, o estudo mais detalhado do desenvolvimento dos vegetais em condições de estresse auxiliará no maior entendimento da interação planta-fungo sob essas condições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos com intuito de avaliar a capacidade de quatro fungos DSE isolados de arroz silvestre da espécie *Oryza glumaepatula* na região amazônica (RIBEIRO et al., 2011) em promover o crescimento e reduzir o efeito do estresse por deficiência hídrica em duas variedades de arroz. No entanto, antes disso, os isolados foram avaliados em experimentos preliminares quanto à capacidade de colonizar as variedades de arroz a serem utilizadas a variedade melhorada, Nipponbare, e Piauí, variedade tradicional do estado do Maranhão. Além da capacidade de crescimento *in vitro* dos DSE em meio de cultura sob condições de estresse pela adição de cloreto de sódio (salinidade), NaCl, e Polietilenoglicol (restrição hídrica), PEG, ao meio.

Todos os experimentos foram desenvolvidos na Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica (RJ). Os dados obtidos em cada experimento foram analisados com auxílio do software ASSISTAT versão 7.6 beta para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados pelos testes de Lilliefors, Cochran e Bartlett respectivamente. Foi utilizado o software SISVAR 4.3 para a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey ou Skott-Knott a 5% de probabilidade e para verificar o efeito das doses de PEG 6000 no crescimento dos isolados de DSE e/ou das plantas de arroz foi realizada análises de regressão.

3.1 Avaliação da Colonização das Variedades de Arroz por DSE

O Experimento foi desenvolvido em condições controladas, temperaturas médias de 28/24 °C (dia / noite), 70% de umidade e fotoperíodo de 12/12 h (luz / escuro). Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial (5X2): quatro isolados (ERR 04, ERR 16, ERR 46, ERR 01) e uma testemunha não inoculada, duas variedades de arroz (Nipponbare e Piauí) com quatro repetições.

Foi avaliada a técnica de inoculação pelo uso de discos de micélios fúngico e a taxa de colonização de DSE nas duas variedades de arroz por meio da inoculação das sementes com micélio fúngico crescido em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e crescimento em solução de Hoagland (HOAGLAND et al., 1950) ½ força iônica geleificada com phytigel (5g L⁻¹) adicionada de MgSO₄ (0,3g L⁻¹).

As plantas foram coletadas aos 20 dias após o plantio e realizado às medidas de altura da parte aérea a partir do colo e dividida em parte aérea e raiz, sendo a parte aérea seca em estufa para obtenção da massa seca e as raízes destinadas à análise de colonização. Para observação das estruturas fúngicas dos DSE, as raízes foram fragmentadas em tamanhos de 1 cm e logo após clareadas com hidróxido de potássio (KOH 2,5%) e neutralizadas em ácido clorídrico (HCl 1%). Posteriormente as raízes foram coradas com corante azul de metila conforme Phylips e Hayman, (1970) e modificado por Koske e Gemma, (1989) e Grace e Stryble, (1991). As estruturas fúngicas (hifas septadas e microescleródios) foram observadas com auxílio de microscópio óptico aumento de 1000X.

3.2 Avaliação do Crescimento *in vitro* de DSE em Condições de Estresse

A capacidade dos isolados de DSE crescerem em condições de estresse foi avaliada em dois experimentos desenvolvidos em laboratório utilizando meio de crescimento adicionado de cloreto sódio (NaCl) e polietilenoglicol (PEG 6000) para indução de estresse salino e hídrico respectivamente.

Para avaliação do crescimento fúngico em condições de estresse salino, foi adicionado NaCl ao meio BDA até a obtenção de diferentes potenciais osmóticos (Tabela 1) segundo a equação de Van't Hoff citada por Salisbury & Ross (1992): $\psi_{os} = -RTC$, em que:

ψ_{os} = potencial osmótico (atm);

R= constante geral dos gases perfeitos ($0,082 \text{ atm} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$);

T= temperatura ($^{\circ}\text{K}$); e

C= concentração (mol L^{-1})

Discos de micélio fúngico de 7 mm de diâmetro crescidos a duas semanas em meio BDA foram depositados no centro placas de petri em três replicatas contendo o meio BDA comercial (39 g L^{-1}) adicionado de NaCl nas concentrações (0; $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; $0,4 \text{ mol L}^{-1}$; $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1}).

Tabela 1. Concentrações de Cloreto de sódio (NaCl) adicionado ao meio de cultura e valores de potenciais osmóticos correspondente para a temperatura média de 26°C segundo Van't Hoff, citada por Salisbury e Ross (1992)

NaCl (mol L^{-1})	Potencial osmótico (-Mpa)
0	0
0,2	-0,49
0,4	-0,99
0,7	-1,73
1	-2,48

Discos de mesmo diâmetro também foram adicionados em placas de petri contendo solução de Hoagland geleificada com phytigel ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) adicionado de polietilenoglicol (PEG 6000) em diferentes concentrações, segundo Villela et al. (1991) até a obtenção das resistências hídricas de -0,1; -0,2; -0,4; -0,8 Mpa e um controle (sem adição de PEG) conforme Tabela 2.

Ambos os experimentos foram avaliados o crescimento radial da colônia fúngica aos 9 dias após a incubação das placas de petri em estufa a 26°C no escuro. A medida foi feita com uso de paquímetro e os diâmetros das colônias fúngicas dados em mm.

Tabela 2. Concentrações de polietilenoglicol (PEG-6000) adicionado ao meio de cultura e valores de resistência hídrica correspondente para a temperatura média de 26°C segundo Villela et al. (1991).

PEG-6000 (g L^{-1})	Resistência hídrica (-Mpa)
0	0
79,791	-0,1
121,139	-0,2
180,231	-0,4
264,246	-0,8

3.3 Efeito de DSE na Redução do Estresse por Deficiência Hídrica em Arroz

Foram conduzidos 2 experimentos, o primeiro (I) para avaliar as variáveis relacionadas a promoção de crescimento (massa fresca e seca da raiz e parte aérea e altura das plantas) e o segundo (II), realizado a partir da pré-seleção dos fungos e das doses de PEG definidas no primeiro ensaio a partir dos dados de promoção de crescimento das plantas. No segundo experimento foram avaliados os teores de proteínas totais em folhas e as enzimas antioxidantes relacionadas à redução do estresse oxidativo nas plantas, catalases (CAT) e peroxidases do ascorbato (APX).

No primeiro experimento adotou-se o delineamento em blocos ao caso (DBC) em arranjo fatorial (5X5X2): quatro isolados (Err 04, Err 16, Err 46, Err 01) e uma testemunha não inoculada, cinco concentrações de PEG adicionado ao meio Phytigel ($2,5\text{g L}^{-1}$) até atingir o potencial hídrico de -0,1 Mpa, -0,2 Mpa, -0,4 Mpa, -0,8 Mpa e um controle sem adição de PEG para temperatura média de $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ de acordo com a Tabela 1 e duas variedades de arroz (Nipponbare e Piauí) com quatro repetições.

O segundo experimento seguiu também o delineamento DBC em arranjo fatorial (3X2X2): Três doses de PEG (0; 35; 79 g L^{-1}), o isolado DSE Err 01 e uma testemunha não inoculada com as duas variedades e mesmo número de repetições que o experimento I.

3.3.1 Desinfestação das sementes

As sementes foram desinfestadas superficialmente através da lavagem com detergente comum e água destilada estéril e imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% e álcool etílico 70% por 3 minutos cada e lavadas em seguida com água estéril por 5 vezes.

3.3.2 Inoculação

Sementes foram inoculadas com micélio fúngico crescidos por 2 semanas em meio batata comercial (BDA) e pré-germinadas por 5 dias em placas de petri contendo solução de Hoagland agarizada (1%). Discos de micélio fúngico de 7 mm de diâmetro foram depositados sobre a superfície dos vasos próximos às plântulas. O tratamento controle consistiu em sementes não inoculadas e sem discos de micélio fúngico adicionados ao meio de crescimento.

3.3.3 Indução do estresse hídrico

O estresse hídrico foi induzido por meio da adição de polietilenoglicol (PEG 6000), Sigma de acordo com a Tabela 1 ao meio phytigel ($2,5\text{g L}^{-1}$) acrescentado de MgSO_4 ($0,3\text{g L}^{-1}$) e dissolvidos em solução de Hoagland $\frac{1}{2}$ força iônica (HOAGLAND et al., 1950) corrigida para nitrogênio com aplicação de Sulfato de Amônio (Sigma) 105 mg L^{-1} de N (SILVA et al., 2010).

3.3.4 Condução do experimento

Após a pré-germinação das sementes as plântulas foram transferidas para vasos contendo meio phytigel ($2,5\text{g L}^{-1}$) adicionado de MgSO_4 ($0,3\text{g L}^{-1}$) e solução de Hoagland $\frac{1}{2}$ força iônica estéril (HOAGLAND et al., 1950) corrigida para nitrogênio pela adição de 105 mg L^{-1} de N. Os vasos foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade, fotoperíodo e radiação fotossinteticamente ativa, ciclo de luz de 12/12 h (luz / escuro), um influxo de fótons fotossintéticos de $380\text{ }\mu\text{M mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, umidade relativa do ar média de 70% e temperaturas de 28/24 $^{\circ}\text{C}$ (dia / noite).

3.3.5 Avaliações

No primeiro experimento as plantas foram colhidas aos 30 dias após inoculação e obtido a altura da haste principal com uso de régua graduada pela medição a partir do colo até o ápice da folha de maior desenvolvimento. Logo após, as plantas foram divididas em parte aéreas e raízes para determinação da massa fresca e seca. A massa seca foi obtida após secagem do material vegetal em estufa a 65 °C, seguida de pesagem.

No segundo experimento as plantas também foram colhidas aos 30 dias, no entanto, as folhas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C para avaliação dos teores de proteínas totais em folhas e a atividade das enzimas CAT e APX.

a) Extração enzimática e determinação do teor de proteína

A extração das enzimas foi feita pela maceração de 200 mg de folha em nitrogênio líquido, adicionando-se 1,5 mL do tampão de extração constituído de: Tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,8 mM PMSF, 1% de PVPP e 1 mM de ácido ascórbico (ASC). O extrato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C no período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises de todas as enzimas. A atividade das enzimas catalases e peroxidases foi expressa em μM de H_2O_2 e μM de ascorbato (AsA) por miligramas (mg) de proteínas respectivamente. Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovina (BSA) de acordo com o Apêndice 1.

b) Determinação da atividade de CAT

Foi determinada segundo HAVIR & MCHALE, (1987) pelo consumo de H_2O_2 a 240 nm por 1 minuto. A reação foi incubada a 28 °C e foi constituída de 20 μL de extrato enzimático e 0,980 mL do meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H_2O_2 20 mM. A absorvidade molar a 240 nm adotada foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

c) Determinação da atividade de APX

Foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm por 1 minuto. A reação foi constituída de 35 μL de extrato enzimático e 0,965 mL do meio reacional contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), H_2O_2 1 mM, L-ácido ascórbico 0,8 mM e água destilada. A absorvidade molar em 290 nm adotada foi $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (NAKANO & ASADA, 1981).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Colonização

A observação da colonização dos DSE nas raízes das plantas de arroz em meio phytigel foi possível nas duas variedades avaliadas, Nipponbare e Piauí. Todos os fungos e as duas variedades de arroz apresentaram crescimento vigoroso no meio de cultivo, além disso, as plantas apresentaram-se saudáveis, tanto a parte aérea quanto as raízes, até o final do experimento.

Verificou-se que o phytigel permitiu uma visualização nítida da colonização ao longo das raízes, pelos fungos (Figura 1) como também apresentou ser uma boa ferramenta para visualização das estruturas fúngicas.

Foram observadas estruturas típicas de DSE, hifas septadas e microescleródios em ambas as variedades com auxílio de microscópio óptico (aumento de 1000X). A inoculação dos fungos DSE por meio da inoculação das sementes e adição de disco de micélio fúngico 7 mm ao meio mostrou-se suficiente para garantir a colonização do fungo nas raízes das plantas de arroz conforme Figura 1 e 2. No entanto, a colonização concentrou-se próximo ao colo o que não possibilitou a quantificação da porcentagem da raiz colonizada.

Os quatro isolados inoculados foram capazes de colonizar as duas variedades de arroz avaliadas, além disso, o isolado DSE Err 01 foi capaz de promover o crescimento das plantas (Tabela 3) através do estímulo ao maior crescimento da raiz principal quando comparadas a testemunha (sem inoculação), apresentando um incremento de 3,45 cm no crescimento das raízes das plantas inoculadas. Nas demais variáveis não foi observado diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tuckey com 5% de significância.

Tabela 3. Médias de comprimento de raiz (Craiz), massa seca de parte aérea (Mspa) e altura de oito plantas de arroz aos 20 dias após inoculação dos isolados de DSE e um tratamento testemunha (sem inoculação) em solução de Hoagland geleificada com phytigel

Isolados	Craiz (cm)	Mspa (g)	Altura (cm)
Err 01	15,65 A	0,057 A	23,83 A
Err 16	15,01 AB	0,065 A	24,46 A
Err 46	13,91 ABC	0,052 A	22,47 A
Err 04	12,82 BC	0,061 A	22,93 A
Testemunha	12,40 C	0,060 A	22,93 A
CV %	11,2	16,78	11,6

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Neste estudo, a colonização de DSE observada de forma concentrada próximo à região do colo das plantas inoculadas pode estar relacionada à duração do experimento em apenas 20 dias, pois como demonstrado por Pereira et al. (2011) em experimentos realizados com DSE na região amazônica, o estágio fenológico da planta é um dos fatores que pode influenciar a taxa de colonização por DSE, de tal forma que maiores taxas de colonização por estes endófitos isolados de arroz silvestre coletadas diretamente do ambiente, nesta região, foram obtidas de raízes de plantas em estágio reprodutivo.

Já Vega-Frutis e Kytoviita, (2012) analisando a influência da sexualidade e do estágio de desenvolvimento sobre a taxa de colonização da planta *Antennaria dioica* (Asteraceae) por

FMA e DSE, verificaram que a colonização por FMA foi maior durante a floração do que após a produção de sementes enquanto que maiores taxas de DSE foram encontradas nas plantas em fase não reprodutiva, além disso, verificaram ainda que a taxa de colonização pode diferir entre plantas masculinas e femininas e das características do solo, como a fertilidade.

Estes estudos, assim como outros comuns na literatura mostram que a taxa de colonização de fungos endofíticos no interior de seu hospedeiro é naturalmente bastante variável, uma vez que pode ser influenciada por diversos fatores relacionados à condição fisiológica, estratégia de sobrevivência, estádios de desenvolvimento e evolução do endófito e do hospedeiro (SCHULZ & BOYLE, 2005).

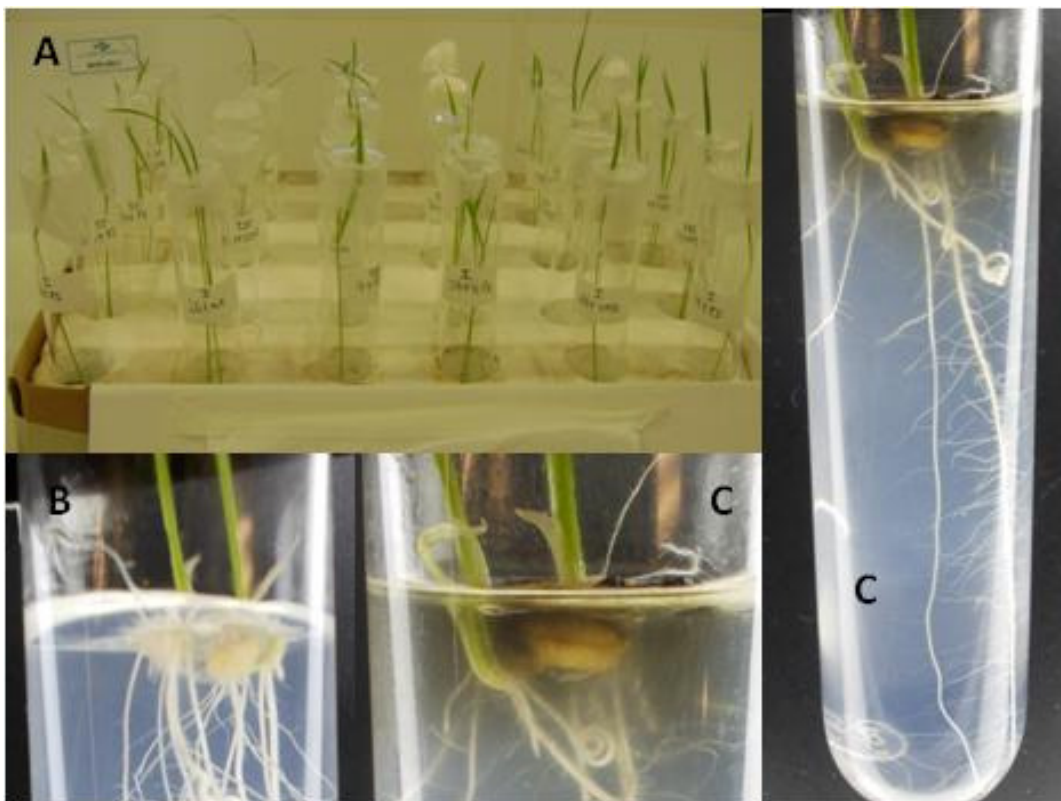


Figura 1. Colonização de raízes de plantas de arroz por isolados fúngicos DSE (C) e um tratamento controle não inoculado (B) cultivadas em tubos de ensaio (A) contendo 50 mL de meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland $\frac{1}{2}$ força iônica estéril em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. Oitavo dia após a inoculação.

Ainda são poucos os estudos que descrevem sobre colonização de DSE em plantas de arroz na literatura, no entanto, Sathiyadash & Muthukumar (2010) em estudos na Índia mostraram que a taxa de colonização de DSE em raízes de 50 espécies de gramíneas variou entre 1 a 46%.

No Brasil, experimentos realizados na região amazônica por Ribeiro et al. (2011) mostraram que a taxa de colonização de isolados de DSE obtidos de arroz silvestre (*Oryza glumaepatula*) na região amazônica variou entre 20 a 60% quando reinoculado na espécie hospedeira e inoculado em arroz comercial (*Oryza sativa* L) respectivamente, sendo de forma geral maior para espécie comercial (*O. sativa*).

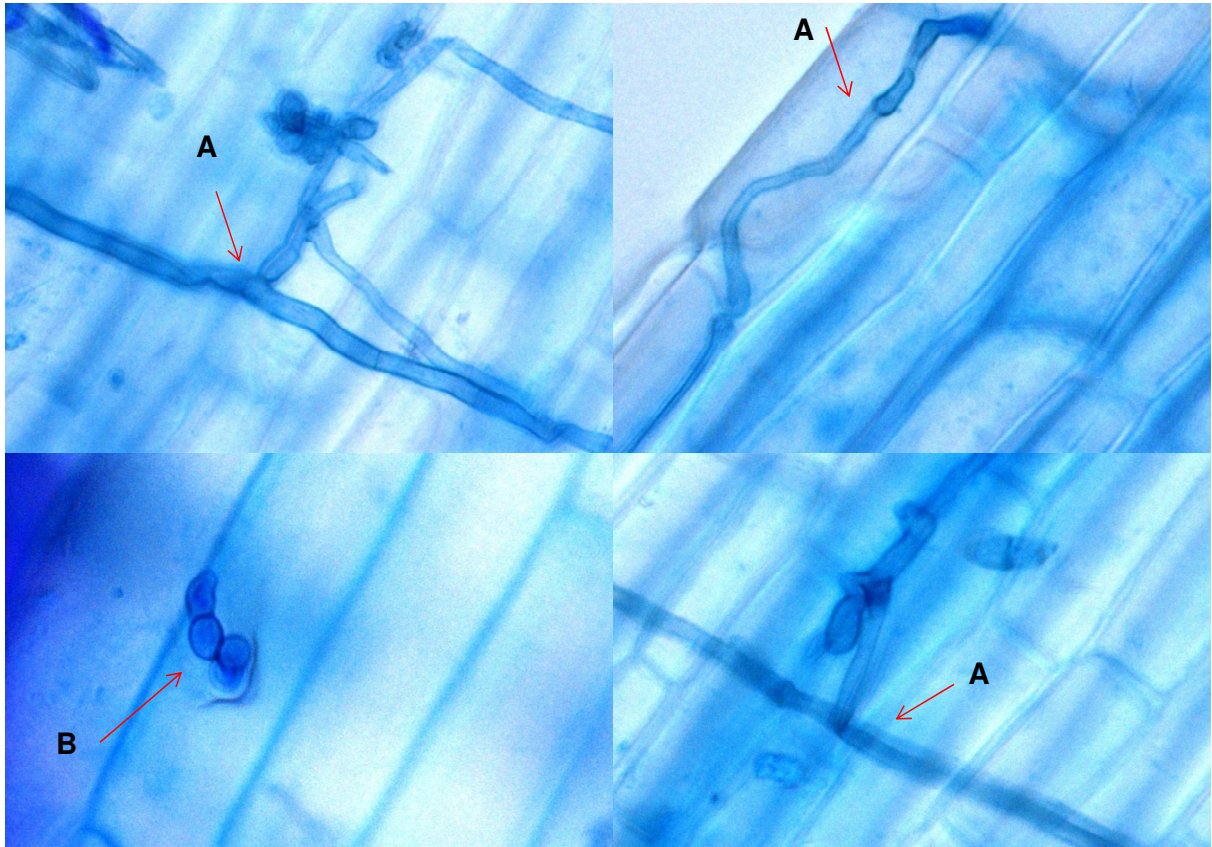


Figura 2. Colonização de plantas de arroz variedade Nipponbare pelo isolado Err 01 de DSE aos 30 dias após a inoculação. Presença de hifas septadas (A) e microescleródios (B). Visualização em microscópio óptico (aumento de 1000X).

4.2 Crescimento *in vitro* de DSE em Condições de Estresse

A tolerância dos isolados às condições de estresse foi avaliada em dois experimentos *in vitro* pelo acompanhamento do crescimento radial dos discos de micélio fúngico adicionado à placa de petri contendo meio phytigel adicionado de polietilenoglicol (PEG-6000) para avaliação do estresse por restrição hídrica e meio Batata-dextrose-agar (BDA) contendo cloreto de sódio (NaCl) para avaliação da tolerância ao estresse salino. Ambos os estresses estão relacionados à restrição hídrica do meio de cultivo (Figuras 3 e 4).

Os estresses imposto pela adição do sal NaCl e pelo polímero PEG-6000 afetaram o crescimento dos DSE. Observou-se tolerância diferenciada entre os isolados de DSE a ambos os estresses submetidos. De forma geral, os isolados foram mais sensíveis a restrição hídrica imposta pela adição de NaCl ao meio de crescimento que ao uso do PEG-6000.

O PEG é um polímero bastante utilizado para simular o efeito do déficit hídrico em estudos envolvendo organismos, principalmente por não ser tóxico, não penetrar na célula e não ser degradado, por apresentar alto peso molecular (VILLELA et al., 1991; PEREGRINI et al., 2013). Já o uso de NaCl nesses estudos tem demonstrados que além do efeito do estresse por deficiência hídrica ocasionado pela alteração osmótica do meio pode ser observado também o efeito tóxico dos íons Na^+ e Cl^- por ser possível de absorção e acumulação pelos organismos (TOBE et al., 2000).

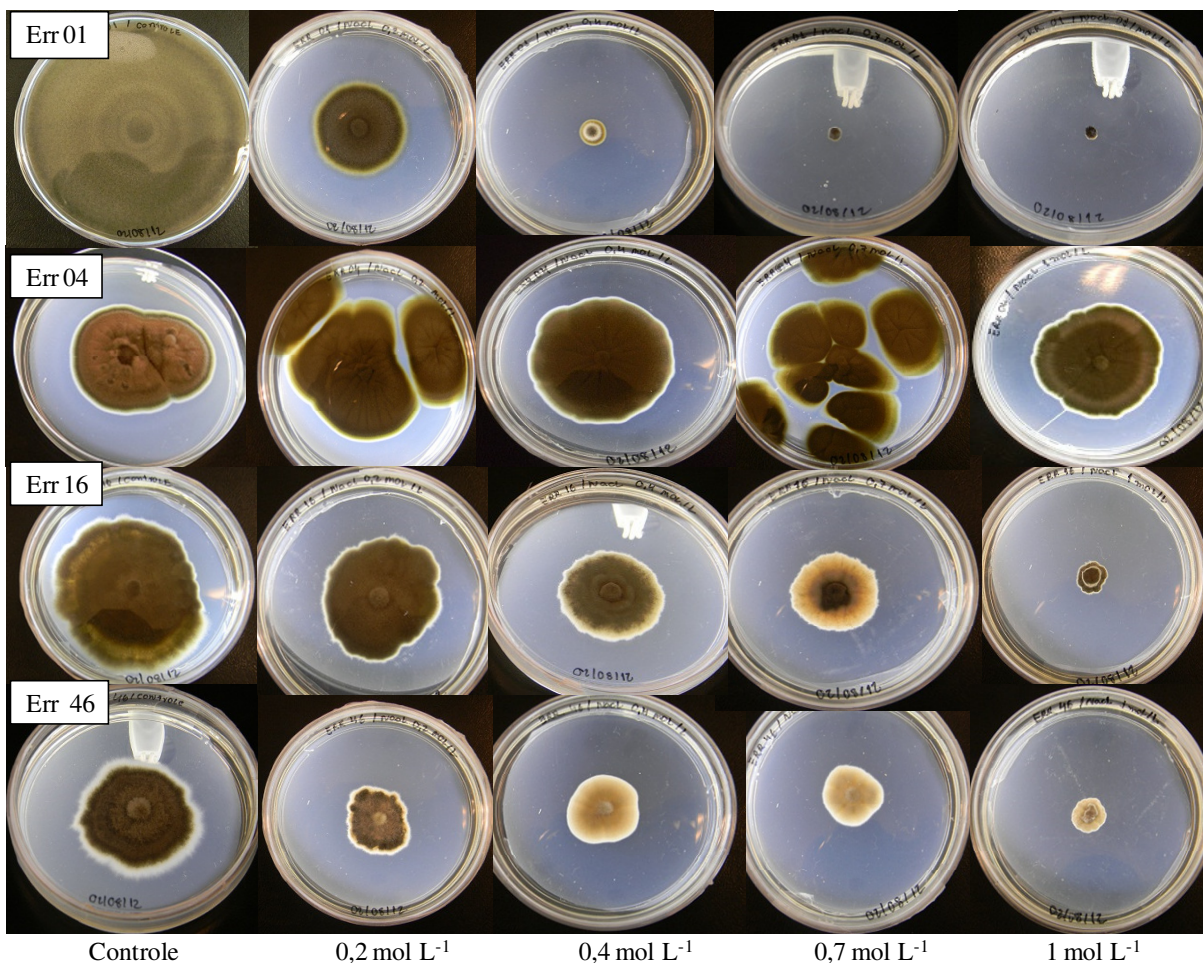


Figura 3. Crescimento da colônia fúngica dos isolados de “dark septate” aos 9 dias após a adição de disco de micélio fúngico de 7 mm de diâmetro em meio BDA (39g L⁻¹) contendo concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl).

Verificaram-se níveis de tolerância à salinidade diferenciada entre os isolados, sendo que, apenas o isolado Err 04 não apresentou diferença estatística entre as diferentes quantidades de NaCl adicionada ao meio de cultura.

O isolado Err 04 apresentou maior tolerância à salinidade, sendo que a adição de NaCl ao meio de cultura não afetou seu crescimento, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. Quando se comparou à adição de maior quantidade de NaCl ao meio (1mol L⁻¹) com o tratamento controle (sem adição de NaCl) a redução do crescimento da colônia desse isolado foi apenas de 10%. O isolado Err 01 apresentou menor tolerância à salinidade, não crescendo nas concentrações 0,7 e 1 mol L⁻¹ de NaCl adicionado ao meio de cultura e reduziu seu crescimento em aproximadamente 63% quando adicionado apenas 0,2 mol L⁻¹ de NaCl ao meio quando comparado ao tratamento controle conforme Tabela 4.

Em relação ao crescimento dos isolados em condições de estresse hídrico pela adição do PEG-6000 o isolado Err 04 assim como no estresse salino apresentou-se como sendo o mais tolerante e o Err 01 o mais sensível, enquanto Err 16 e Err 46 apresentaram crescimentos semelhantes.

Tabela 4. Diâmetro de colônia fúngica (DC) dos isolados de “dark septate” após 9 dias de crescimento em meio BDA acrescido de cloreto de sódio (NaCl). Médias de três repetições

Isolados	NaCl (mol L ⁻¹)				
	0	0,2	0,4	0,7	1
	DC (mm)				
Err 01	85,75 Aa	32,28 Cb	10,96 Dc	7,00 Cd	7,00 Cd
Err 16	59,81 Ba	39,31 Bb	31,29 Bb	23,96 Bc	10,91 BCd
Err 04	49,76 Ca	48,09 Aa	41, 33 Aa	43,78 Aa	44,54 Aa
Err 46	36,87 Da	26,91 Db	24,85 Cb	20,26 Bb	12,02 Bc
CV %	5,87				

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

O aumento da resistência hídrica do meio de cultura favoreceu o crescimento do isolado Err 04 que apresentou diferença estatística entre as diferentes doses de PEG adicionada, sendo que o crescimento da colônia fúngica respondeu positivamente à adição de maiores quantidades de PEG ao meio de crescimento. Observou-se para o isolado Err 04 um aumento da colônia fúngica em aproximadamente 50% na presença da restrição hídrica no meio de cultura pela adição de 264,25g L⁻¹ de PEG quando comparado ao tratamento controle sem adição do polímero, já o isolado Err 01 reduziu em mais de 50% seu crescimento nessas mesmas condições de acordo com a Tabela 5.

Características associadas à adaptação de DSE em ambientes estressantes têm sido relatadas, umas das mais enfatizadas é a presença da melanina nas hifas e nos microescleródios destes endófitos que pode funcionar como agente antioxidante complexando radicais livres em condições de estresse.

Em experimentos avaliando a tolerância e o acúmulo de metais pesados em hifas de DSE Zhang et al. (2008) verificaram que o isolado DSE H93 obtido de solo contaminado na China pode sobreviver a presença de Pb²⁺ em concentrações superior a 2 mg ml⁻¹ de meio de cultura, a 3 mg ml⁻¹ de Zn²⁺, e Cd²⁺ na concentração de 0,5 mg ml⁻¹, essas mesmas concentrações de metais foram letal para muitas outras espécies. Observaram ainda que houve um acúmulo dos metais Pb e Cd na biomassa seca dos micélios na ordem de 20% e 5% respectivamente. Um dos mecanismos citados pelos autores é a presença da melanina na parede celular das hifas e micélios dos isolado que foi aumentada de acordo com o aumento na concentração dos metais no meio e que pode ter funcionado como agente antioxidante.

A deficiência hídrica no ambiente de crescimento aumenta consideravelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos organismos devido a intensificação da fotoinibição.

Uma das estratégias de proteção aos danos causados pelas EROs adotadas pelos organismos é a ativação do sistema de defesa antioxidante. Porém, o funcionamento desse sistema é limitado em função da duração e intensidade do estresse. À medida que se aumenta a produção dessas espécies reativas sob tais condições, podem-se ocasionar danos celulares e oxidação de proteínas e DNA (FOYER et al., 1994; HEGEDŰS et al., 2001). Desta forma, a inativação de componentes celulares a partir do processo oxidativo pode ocasionar a morte celular em organismos sob essas condições de estresse (BUCKNER et al., 2000).

Microrganismos que possuam características de tolerância a estresse, como a melanina presente nos DSE e/ou a capacidade de acumulação de íons e metais pesados que possam conferir adaptação a estresse, são importantes no processo de colonização dos

vegetais em ambientes estressantes (MANDYAM & JUMPPONEN, 2005; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006).

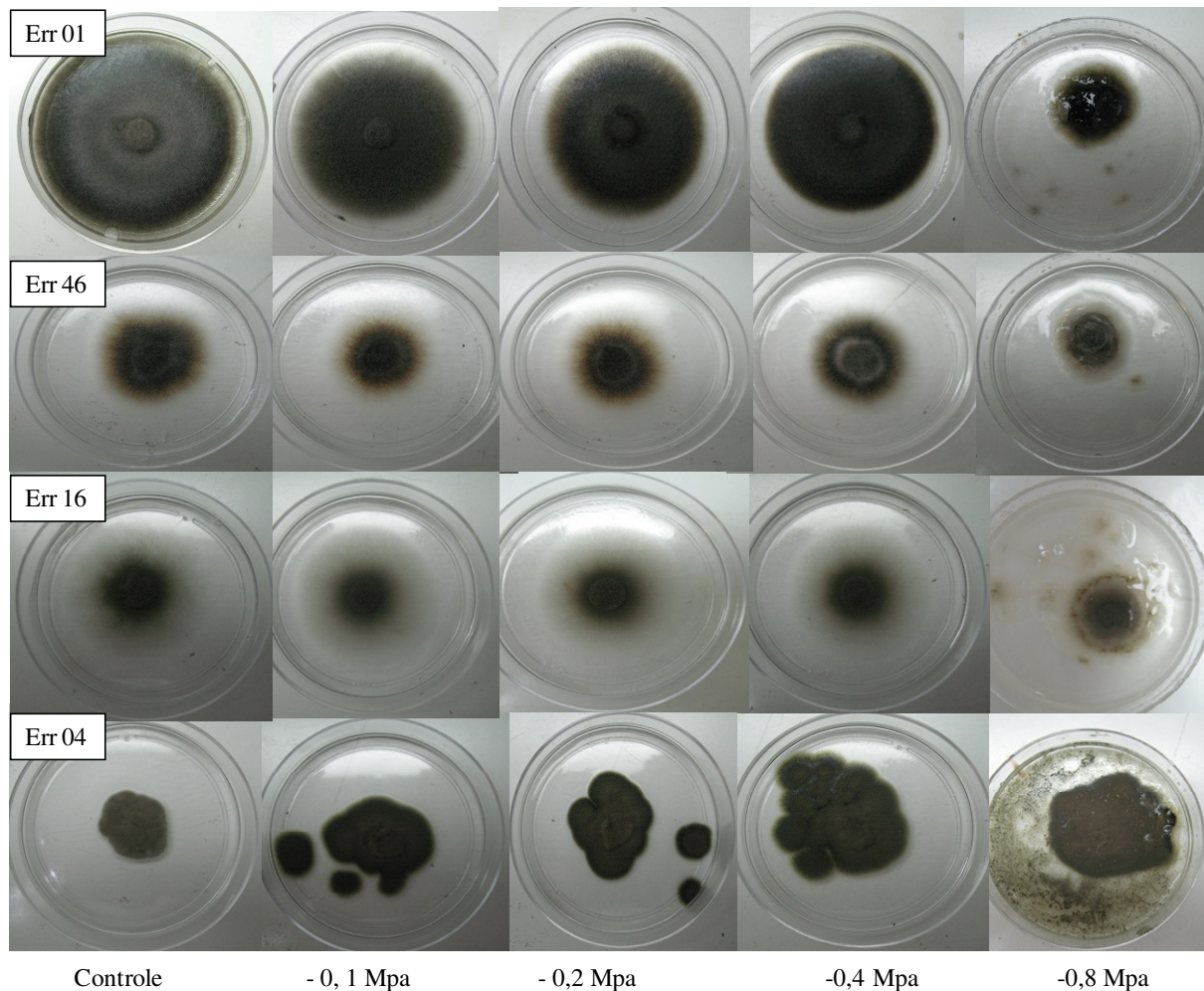


Figura 4. Crescimento da colônia fúngica dos isolados de “dark septate” aos 9 dias após a adição de disco de micélio fúngico de 7 mm de diâmetro em solução de Hoagland geleificada com phytigel (5g L^{-1}) em condições de restrição hídrica pela adição de Polietilenoglicol (PEG 6000).

Tabela 5. Diâmetro de colônia fúngica (DC) dos isolados de “dark septate” aos 9 dias após o crescimento em solução de Hoagland geleificada com phytigel e acrescida de polietilenoglicol (PEG). Médias de três repetições

Isolados	PEG (g L^{-1})				
	0	79,72	121,14	180,23	264,25
	DC (mm)				
Err 01	57,66 Aa	47,84 Ab	44,11Ab	30,27 Ac	24,55 Bc
Err 16	32,55 Bab	34,93 Ba	34,60 Aa	34,59 Aa	24,74 Bb
Err 04	22,85 Cc	28,28 Cb	30,54 Bb	31,74 Ab	48,30 Aa
Err 46	39,22 Ba	40,21 Aa	38,34 Aab	36,90 Aab	26,83 Bb
CV %	16,82				

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

4.3 Avaliação do Efeito de DSE na Redução do Estresse Hídrico em Arroz

4.3.1 Promoção de crescimento (experimento I)

O uso do polímero polietilenoglicol-6000 (PEG) ao meio de cultura induziu estresse nas duas variedades de arroz, evidenciado pela redução da massa seca total das plantas em decorrência do aumento da concentração de PEG no meio de cultura (Figura 5). Observou-se um decréscimo de aproximadamente 73% na massa seca total da variedade Piauí quando adicionado a maior concentração de PEG 264,246 g L⁻¹ ao meio de crescimento em relação tratamento controle (sem adição de PEG-6000), enquanto que a variedade Nipponbare reduziu em torno de 63%.

A variedade Piauí, cultivada em sistema de sequeiro no estado do Maranhão, reduziu em aproximadamente 33%, enquanto a variedade Nipponbare em 28%, após a adição das demais doses de PEG observou-se uma redução gradativa dessa variável em ambas as variedades.

Efeitos similares do estresse hídrico em arroz foram encontrados por Mauad et al. (2011) quando avaliaram a produção de massa seca e nutrição de cultivares de arroz de terras altas sob condição de déficit hídrico e adubação silicatada e observaram que o aumento na restrição hídrica de -0,050 Mpa no solo ocasionou perda de massa seca de plantas de arroz em aproximadamente 16%. Os autores relacionam esses resultados à importância da água no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, uma vez que a mesma está envolvida em vários processos na planta, dentre eles o crescimento celular, através da turgescência celular, sendo assim, a redução da disponibilidade de água para as plantas, devido ao aumento da tensão de água no solo, reduziu o crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz, refletindo desta forma no acúmulo de massa seca.

O efeito da restrição hídrica no desenvolvimento das duas variedades estudadas foi observado. A variedade Nipponbare apresentou menor redução da massa seca em função da restrição hídrica presente que a variedade Piauí. Possivelmente esse resultado pode estar relacionado às características da variedade Nipponbare. Por ser melhorada, a mesma apresenta certa tolerância a determinados fatores adversos como presença de alumínio (Al) (PEDRON & ARENHART, 2008), ferro (Fe) (FADANELLI et al., 2006), ácido butírico (CH₃(CH₂)₂COOH) (KOPP et al., 2010) estresse oxidativo pela aplicação de herbicidas, podendo ser tolerante também a estresse hídrico (LIU et al., 2010). Desta forma, mesmo a variedade Piauí sendo naturalmente cultivado em região com restrição hídrica presente ao longo do ano, a mesma demonstrou maior sensibilidade ao estresse hídrico imposto pela adição do PEG que a variedade Nipponbare.

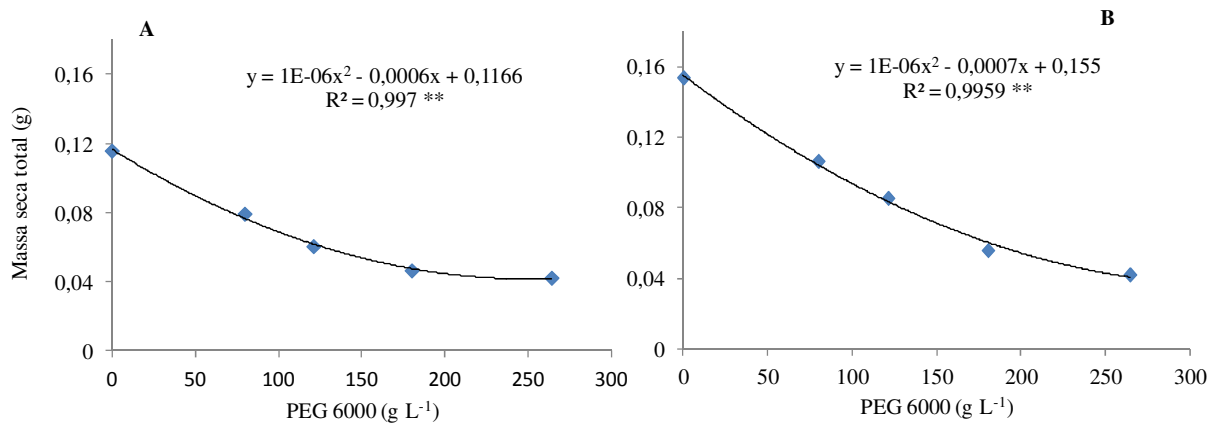


Figura 5. Massa seca total (raiz + parte aérea) de plantas de arroz não inoculadas, variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) aos 30 dias de crescimento em solução de Hoagland geleificada com phytigel e submetidas a diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). **Significativo a 5% de probabilidade. R^2 = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições.

Efeitos dos DSE sobre a promoção do crescimento das plantas de arroz em condições de estresse hídrico foram observados conforme Apêndice 2 e 3. A massa fresca da parte aérea (MFPA) e das raízes (MFR) das variedades Nipponbare e Piauí foi influenciada pela inoculação de DSE nas condições de restrição hídrica condicionada pelo PEG-6000, principalmente na concentração 79,791 g L⁻¹ (Figura 6 e 7). Na ausência do PEG-6000 o isolado Err 46 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos apresentando respostas positivas na MFPA e MFR em torno de 50% em relação à testemunha, isso quando inoculado na variedade Nipponbare (Apêndice 4 e 5).

Quando não adicionado o polímero ao meio de crescimento, todos os isolados foram superiores ao tratamento controle na variedade Nipponbare em relação à altura de plantas conforme a Figura 8. Sendo que o isolado Err 46 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Quando inoculados na variedade Piauí os isolados Err 01 e Err 04 apresentaram-se superiores conforme Apêndice 6.

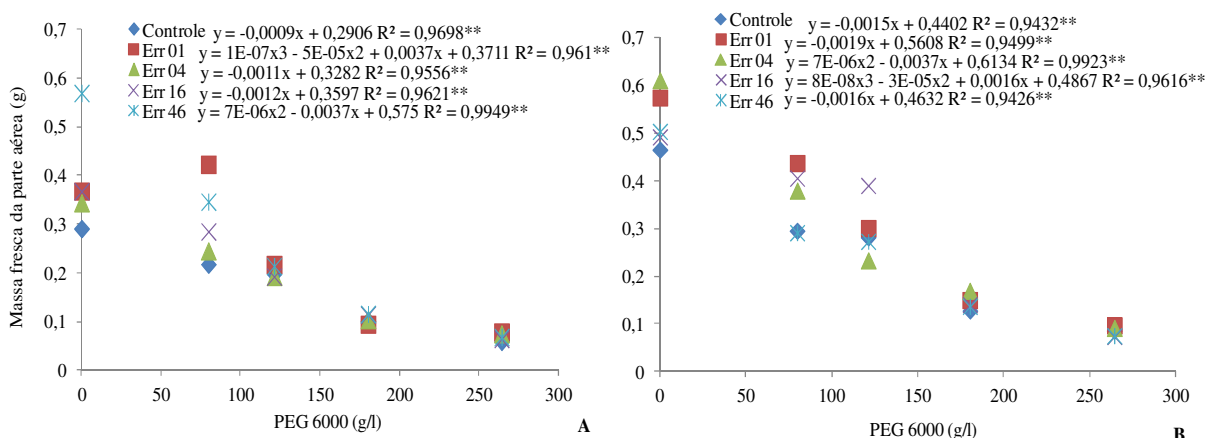


Figura 6. Massa fresca de parte aérea de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos “dark septate”. **Significativo a 5% de probabilidade. R^2 = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições.

Na presença de restrição hídrica foi observada diferença estatística na MSPA apenas na restrição -0,1 Mpa correspondente à dose de PEG-6000 79,791g L⁻¹ e para variedade Nipponbare, sendo que o isolado Err 01 e o Err 16 foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Na presença dessa restrição hídrica (-0,1 Mpa) observou-se uma redução de 43% da MSPA em relação ao tratamento controle, enquanto que a redução observada para o tratamento inoculado com o isolado Err 01 foi de aproximadamente 23%.

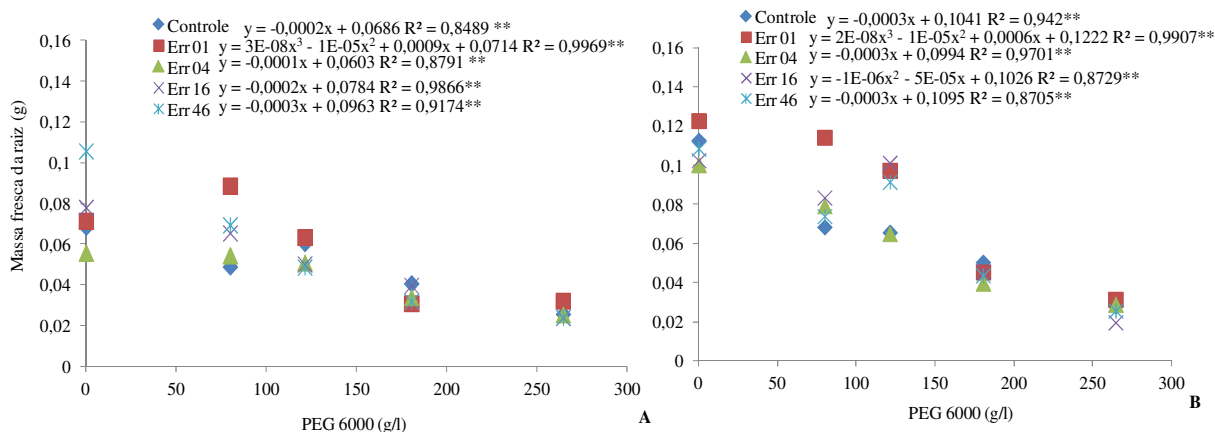


Figura 7. Massa fresca de raiz de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos “dark septate”. **Significativo a 5% de probabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições.

Os isolados Err 46, Err 01 e Err 16 diferiram estatisticamente do isolado Err 04 e do tratamento controle no parâmetro massa seca de parte aérea (MSPA) em resposta a inoculação na variedade Nipponbare em meio de cultura sem a adição de PEG-6000 de acordo com a Tabela 8. Os isolados Err 01 e Err 04 apresentaram maiores incrementos estatisticamente significativos em relação a este mesmo parâmetro e nas mesmas condições, no entanto, quando inoculados na variedade Piauí segundo a Apêndice 7 e Figura 9.

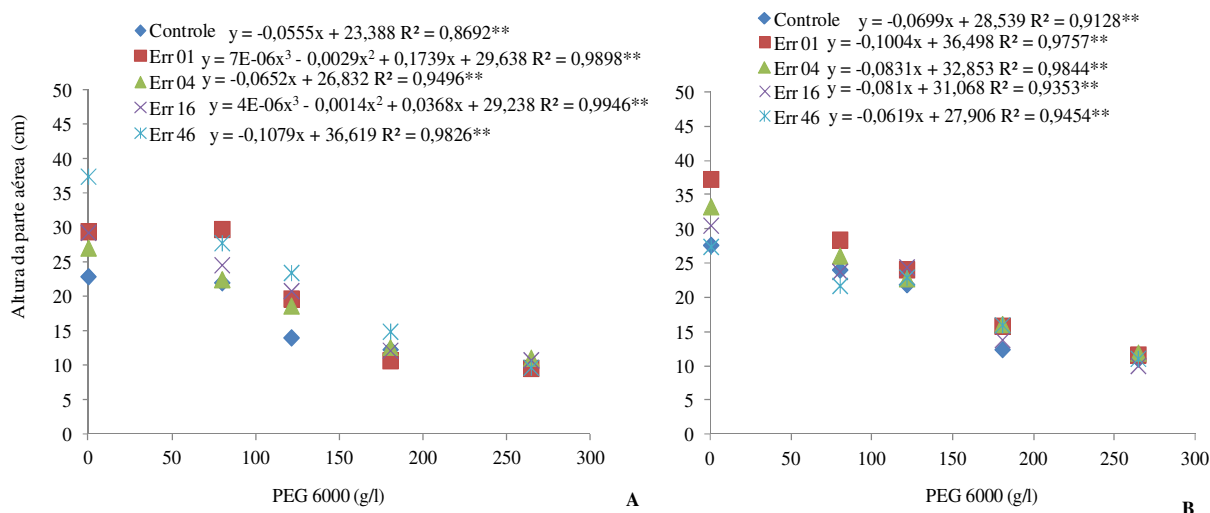


Figura 8. Altura de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG-6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos “dark septate”. **Significativo a 5% de probabilidade. R² = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições.

De acordo com Redman et al. (2001) um mesmo isolado fúngico de um local geográfico específico pode apresentar efeitos patogênicos, mutualístico e comensal, dependendo da fisiologia da planta hospedeira e diferenças genéticas entre as cultivares, o que pode alterar o resultado da simbiose.

Experimentos em substrato estéril nas condições de casa de vegetação mostraram resultados positivos a reinoculação do isolado DSE LBF-2 em mudas da planta medicinal *Lycium barbarum*, através do incremento da biomassa total das plantas inoculadas em 39,2% e da concentração de clorofila total de 22,8% e da clorofila (a) em 21,3%, em relação ao controle não inoculado (ZHANG et al., 2012).

Perez-Naranjo (2009) quando avaliou a promoção de crescimento das gramíneas *Psathyrostachys juncea*, *Agropyron cristatum* e *Bouteloua gracillis* inoculadas com DSE em condições de estresse hídrico observou que a inoculação foi positiva nas espécies *A. cristatum* e *P. juncea* e negativa em *B. gracillis*. O autor relacionou estas diferentes respostas à adaptação da espécie *B. gracillis* por ser uma planta C4, enquanto *A. cristatum* e *P. juncea* C3. Plantas C4 são mais adaptadas a ambientes secos, pois conseguem manter o aparato fotossintético eficaz quando ocorre o aumento da resistência estomática durante longos períodos de seca evitando a perda de água em condições quentes e de escassez de água.

Na variedade Nipponbare observou-se um incremento da MSPA em aproximadamente 40% e 80% na ausência e na presença da restrição hídrica – 0,1 Mpa respectivamente, inoculadas com o isolado Err 01 em comparação ao tratamento sem inoculação. Isso demonstra que a mitigação do estresse hídrico por parte do fungo representa um dos mecanismos de promoção de crescimento, porém também mostra que outros mecanismos estão presentes, pois mesmo com disponibilidade de água houve promoção do crescimento das plantas.

Incremento no peso seco de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) também foram observados por Yuan et al. (2010) na ordem de 57 % em inoculação do DSE *Harpophora oryzae* sp quando comparados aos tratamentos não inoculados em experimentos *in vitro* na China.

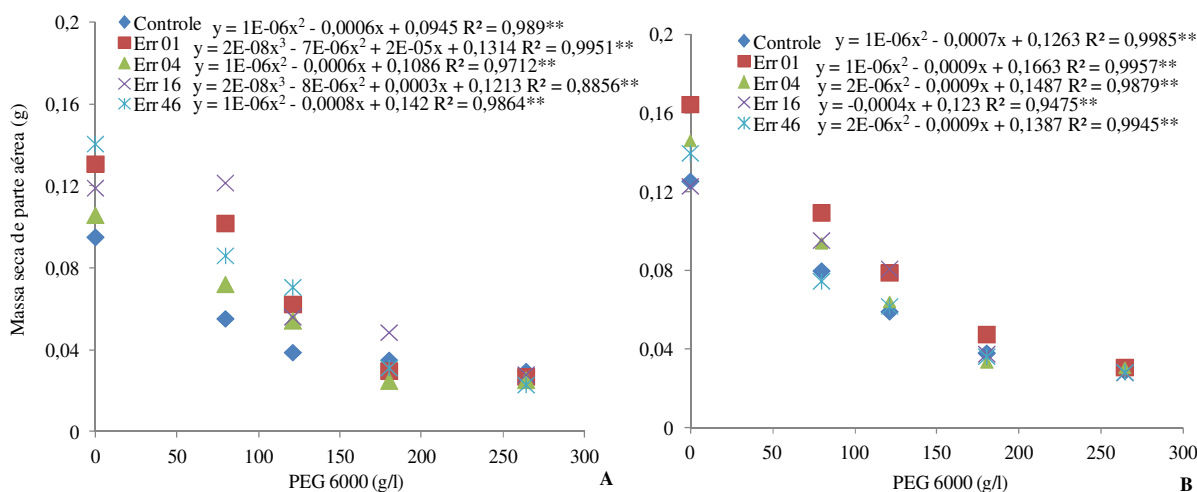


Figura 9. Massa seca de parte aérea de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos DSE. **Significativo a 5% de probabilidade. R^2 = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições.

Na ausência do PEG-6000, a massa seca das raízes da variedade Nipponbare não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, no entanto, a variedade Piauí respondeu

positivamente a inoculação dos DSE, sendo que, o isolado Err 01 e Err 04 foram superiores aos isolados Err 46 e Err 16 e todos os isolados foram estatisticamente superiores ao tratamento controle de acordo com a Figura 10 e Apêndice 8.

A MSR foi influenciada pelos tratamentos até a concentração de 180,213 g L⁻¹ de PEG adicionado ao meio de crescimento, correspondente a restrição hídrica de -0,4 Mpa. Quando se adicionou 79,791 de PEG não foi observada diferença estatística entre os tratamentos inoculados na variedade Piauí, entretanto, a variedade Nipponbare respondeu de forma positiva à inoculação dos isolados Err 01 e Err 46, já na restrição hídrica -0,2 Mpa (121,139 g L⁻¹ de PEG) os isolados Err 01, Err 46 e Err 16 foram superiores estatisticamente ao Err 04 e a testemunha quando inoculados na variedade Piauí, sendo que na variedade Nipponbare este parâmetro não foi influenciado pelos tratamentos. Na presença da restrição hídrica -0,4 Mpa (180,213 g L⁻¹ de PEG-6000) respostas aos tratamentos foram observadas apenas na variedade Nipponbare, os isolados Err 46, Err 16 e Err 04 foram superiores aos demais tratamentos. Ao adicionar (264,246 g L⁻¹ de PEG) equivalente a restrição hídrica -0,8 Mpa não foram observados resposta a inoculação de DSE em ambas as variedades.

Respostas encontradas apenas na MSR na restrição hídrica mais elevada (-0,4 Mpa) possivelmente está relacionada ao maior investimento no desenvolvimento do sistema radicular pelas plantas quando expostas a essas condições a fim de aumentar absorção de água.

Segundo Santos & Carlesso, (1998) uns dos fatores essenciais à absorção de água do solo pelas plantas é o contato íntimo entre a superfície das raízes e o solo. A emissão dos pelos radiculares, com conseqüente aumento na área superficial aumenta a capacidade de absorção de água pelos vegetais. Além disso, o déficit hídrico estimula a expansão do sistema radicular para zonas mais profundas e úmidas do perfil do solo.

As raízes por estarem em contado direto com o meio de crescimento tornam-se mais sensíveis à variação na composição do mesmo e pode ser mais facilmente influenciada pela presença de fatores externos. A presença dos fungos DSE envolvendo inter e intracelularmente às células das raízes possivelmente relaciona-se a maior proteção dos danos oxidativo decorrente do estresse provocado pela restrição hídrica -0,4 Mpa e os efeitos observados apenas na variável MSR nesse nível de estresse.

Observa-se na literatura efeitos de DSE na promoção de crescimento de plantas pelo aumento de biomassa de parte aérea e raiz, entretanto, maiores incrementos são encontrados na biomassa das raízes em relação à biomassa da parte aérea. De acordo com Newsham, (2011) em uma revisão de literatura a partir de dados de 18 trabalhos que avaliaram a resposta da inoculação de DSE em plantas em substratos estéreis, o incremento da biomassa das raízes foi aproximadamente 30% superior ao incremento da parte aérea.

A inoculação de DSE sem resposta em ambas às variedades para os parâmetros avaliados com exceção da MSR em condições de restrição hídrica mais intensa pela adição de PEG nas concentrações 180,213 e 264,246 g L⁻¹ (-0,4 e -0,8 Mpa respectivamente) pode está relacionado ao menor crescimento do fungo nestas condições que deve ter ocasionado uma menor taxa de colonização das raízes das plantas de arroz. Com exceção do isolado Err 04 o crescimento dos demais DSE foi significativamente reduzidos nesses níveis de restrição hídrica do meio de cultura como mostra a Figura 4.

O efeito da inoculação de microrganismos endofíticos como DSE em plantas pode ser positivo, negativo ou neutro, isto depende entre outros fatores da especificidade entre os simbiontes, da capacidade associativa do microrganismo e da interação entre o endófito e o hospedeiro desde a sinalização molecular no processo de colonização até o surgimento de uma resposta fisiológica na planta hospedeira (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

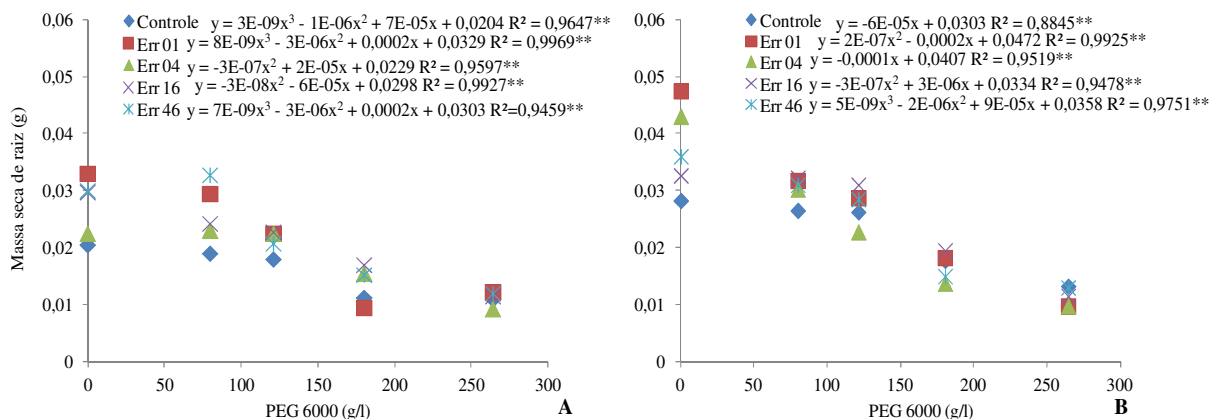


Figura 10. Massa seca de raiz de plantas de arroz das variedades Nipponbare (A) e Piauí (B) sob aplicação de diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000) aos 30 dias após a inoculação de fungos DSE. **Significativo a 5% de probabilidade. R^2 = Coeficiente de regressão. Médias de quatro repetições.

A inoculação de DSE em condições de restrição hídrica na variedade Piauí apresentou menores respostas nos parâmetros MSPA e MSR. Este menor nível de resposta pode ser explicado pela adaptação desta variedade tradicional do estado do Maranhão às condições limitantes às quais a mesma é cultivada e foi selecionada. Já a variedade Nipponbare, por ser melhorada, torna-se mais responsiva, podendo ter sido mais favorecida com a inoculação. Possivelmente, pelo menor dano oxidativo das células devido aos DSE apresentarem hifas e microescleródios melanizados capazes de complexar compostos tóxicos as células vegetais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e que são produzidos durante o estresse.

Desta forma, Li et al. (2011) verificaram que o isolado H93 DSE promoveu o crescimento de milho (*Zea mays* L.) quando exposto as condições de estresse pela presença de metais pesados. Os autores relacionaram este efeito à presença de hifas melanizadas, que pode ser uma estratégia de sobrevivência destes tipos de fungos nesses ambientes por complexar compostos produzidos nessas condições, como os radicais livres.

Foi observado um menor crescimento e maior escurecimento das hifas fúngicas na presença da restrição hídrica aplicada ao meio de cultura pela adição de PEG em relação ao tratamento controle conforme Figura 4 e Apêndice 9, indicando que em situações de estresse mais elevado os DSE podem reduzir o crescimento e aumentar a concentração do pigmento (melanina) nas suas estruturas como um mecanismo de adaptação a essas condições.

Resultados similares foram encontrados por Zhang et al. (2011) estudando o DSE *Exophiala pisciphila* isolado de solo poluído da China quando observaram que os teores de melanina nas hifas e micélios aumentaram consideravelmente após a submissão deste endófito a meio de cultura contendo Cd(II). Entretanto, o crescimento das colônias fúngicas foi reduzido nessas condições. Relataram ainda que melanina produzida por DSE possui alto poder antioxidante e de complexar metais e pode ser de grande relevância na sobrevivência dos vegetais em ambientes estressados.

Assim como observado por Zhang et al. (2011) a melanina presente nos DSE no presente estudo pode ter contribuído para uma maior proteção celular ao estresse oxidativo e consequentemente ao maior desenvolvimento das plantas inoculadas nas condições de restrição hídrica estudada.

Em estudos realizados no sudoeste dos EUA utilizando a coloração com azul de tripano para observação das estruturas fúngicas e Sudam IV para observações de lipídios, Barrow, (2003) verificou uma colonização interna intensa de DSE nas raízes da gramínea *Bouteloua sp* nativa do semi-árido. Observou ainda uma rede fúngica abundante que se

estendia por 300 mm a partir da matriz da raiz associada a um complexo mucilaginoso e uma associação específica deste fungo no interior dos elementos crivados. O autor relacionou estas características à absorção de nutrientes e água pelos vegetais e maiores adaptações as condições de seca.

A produção de uma rede fúngica que vai além da zona de alcance das raízes assim como observado por Barrow, (2003) e que se conecta ao hospedeiro pode ser também um dos mecanismos utilizados pelos DSE nesse estudo e ter contribuído para o maior crescimento das plantas inoculadas nas condições de estresse hídrico, pela maior absorção de água e nutrientes (MANDYAN & JUMPPONEM, 2005).

Microrganismos endofíticos, assim como os DSE são capazes de promover o crescimento da planta hospedeira por vários outros mecanismos. Os mais comumente relatados é a via hormonal, que pode ser de forma direta, pela produção de substâncias auxínicas, ou indiretamente, pela modulação da transdução de sinal e expressão de genes reguladores de hormônios vegetais (VINALE et al., 2008; SCHÄFER et al. 2009), além da solubilização e transferências de nutrientes ao hospedeiro (JUMPPONEM & TRAPPE, 1998; NEWSHAM, 1999; GREEN et al., 2008).

4.3.2 Proteínas e atividade de enzimas antioxidantes em folhas de plantas de arroz (experimento II)

Estresses bióticos e abióticos podem influenciar a expressão de proteínas em plantas de forma a inibir ou intensificar a biossíntese de constituintes proteicos específicos (DOS SANTOS SOARES & MACHADO, 2007).

Microrganismos endofíticos ao interagir com seu hospedeiro são capazes de alterar a síntese proteica e aumentar a tolerância das plantas a estresse (AZEVEDO et al., 2002).

Neste trabalho os teores de proteínas totais em folhas das plantas não inoculadas (controle) apresentaram-se mais elevados na presença da dose de PEG 79 g L⁻¹ e na ausência do PEG em comparação a dose 35g L⁻¹, isso para variedade Nipponbare, sendo estas diferenças significativas estatisticamente. Já na variedade Piauí, os teores de proteínas foram superiores em mais de 50% na presença da dose 79 g L⁻¹ de PEG em relação às demais doses.

Quando inoculadas com DSE Err 01 ambas as variedades reduziram os teores de proteínas com a indução do estresse hídrico pela adição de PEG. Na variedade Nipponbare houve uma redução de aproximadamente 50% nos teores de proteínas entre o tratamento sem adição de PEG em comparação aos que foram adicionados o polímero nas concentrações 35 e 79g L⁻¹. Nesta variedade o tratamento sem adição de PEG foi estatisticamente superior aos demais.

Na variedade Piauí a redução nos teores de proteínas das plantas inoculadas foi de aproximadamente 25 % e 20% para as doses de PEG 35 e 79g L⁻¹ respectivamente em comparação ao tratamento sem adição do polímero. Não houve diferença estatística entre as doses de PEG 0 e 35 g L⁻¹ apenas entre essas e a dose 79g L⁻¹ conforme a Figura 11. As plantas inoculadas em ambas as variedades apresentaram teores de proteínas superiores às plantas controle na presença das doses de PEG 0 e 35 g L⁻¹ e foram estatisticamente inferiores na concentração de PEG 79g L⁻¹

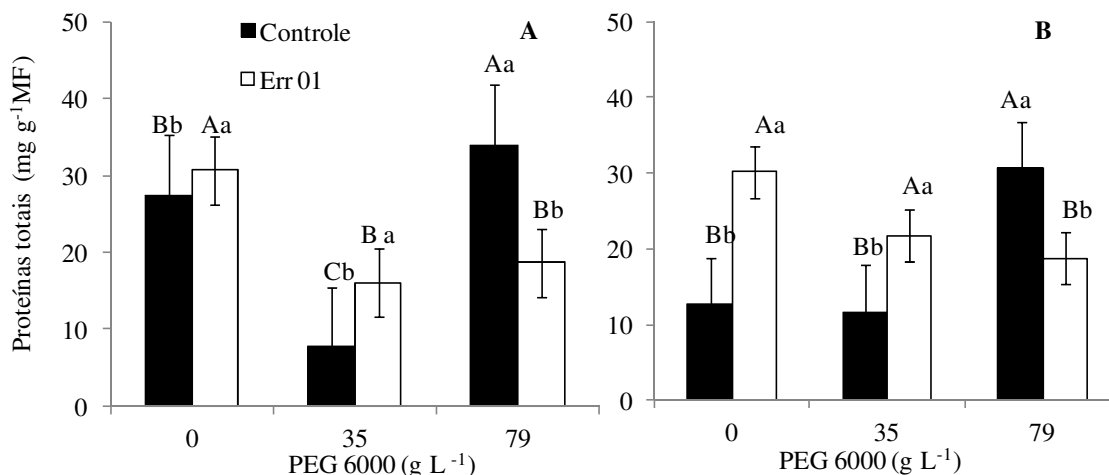


Figura 11. Teores de proteínas em massa fresca de folhas (MF) de plantas de arroz variedade Nipponbare (A) e Piauí (B) inoculadas com isolado DSE Err 01 em comparação ao tratamento controle sob diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). A barra significa o erro padrão da média (n=4). Letras iguais minúscula dentro de cada dose de PEG 6000 e maiúscula entre as doses não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade.

No presente estudo a atividade das enzimas catalases (CAT) e ascorbato peroxidases (APX) foi modulada diferencialmente pela presença da restrição hídrica e inoculação de DSE (Figura 12 e 13).

A enzima CAT no tratamento controle (plantas não inoculadas) reduziu sua atividade na presença da dose de PEG 79g L⁻¹ e mostrou diferença estatística (p<0,05) em relação às concentrações 0 e 35g L⁻¹ em ambas as variedades. Já após a inoculação do DSE a atividade desta enzima foi estatisticamente superior na concentração PEG 79g L⁻¹ na variedade Nipponbare e na concentração 35g L⁻¹ na variedade Piauí em comparação as demais doses.

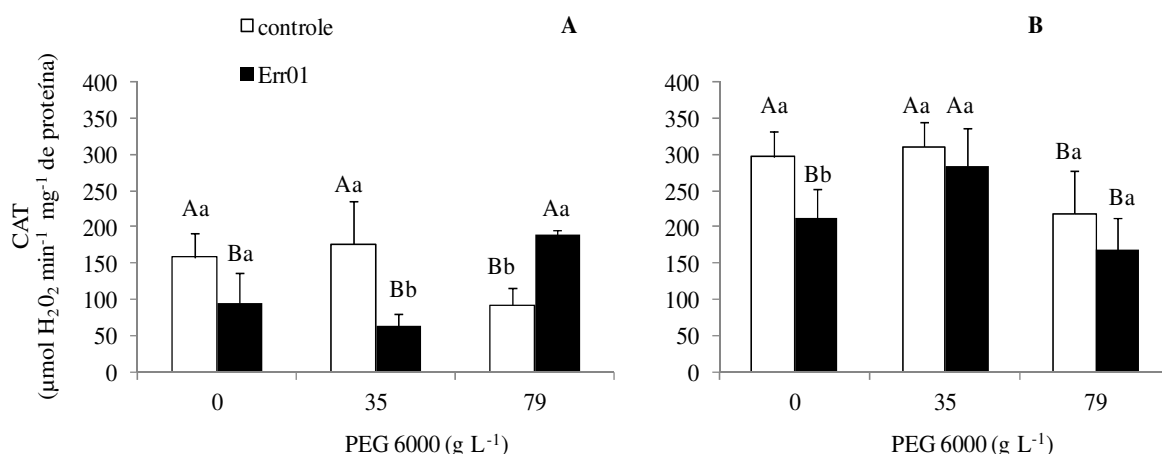


Figura 12. Atividade de catalases (CAT) em folhas de plantas de arroz variedade Nipponbare (A) e Piauí (B) inoculadas com isolado DSE Err 01 em comparação ao tratamento controle sob diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). A barra significa o erro padrão da média (n=4). Letras iguais maiúsculas entre cada dose de PEG 6000 e minúscula dentro das doses não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A inoculação de DSE reduziu a atividade da enzima CAT em aproximadamente 60% na presença da restrição hídrica pela adição do PEG (35g L⁻¹) e foi estatisticamente superior na concentração de PEG (79g L⁻¹) na variedade Nipponbare, aumentando à atividade desta enzima em torno de 100% em comparação as plantas não inoculadas. Na variedade Piauí a inoculação reduziu a atividade da CAT em todos os tratamentos em 28,66%, 8,36% e 22,34 nas concentrações de PEG 0, 35 e 79g L⁻¹ respectivamente sendo que, diferença estatística foi observada apenas na primeira.

A atividade da enzima APX foi influenciada pela restrição hídrica do meio de cultivo pela adição de PEG. A inoculação de DSE reduziu à atividade desta enzima em comparação as plantas controle nas duas variedades de arroz estudadas (Figura 11).

A atividade da enzima APX nas plantas da variedade Nipponbare não inoculadas (controle) foi maior ($p < 0,05$) na presença do PEG na concentração 35g L⁻¹ em relação às demais doses adicionadas, enquanto que na variedade Piauí a atividade desta enzima foi superior tanto na ausência do PEG como na presença da dose 35g L⁻¹ em relação à dose 79g L⁻¹. As plantas inoculadas da variedade Nipponbare apresentaram o mesmo comportamento que as plantas controle, sendo a maior atividade desta enzima observada na presença da dose de PEG 35 g L⁻¹. Na variedade Piauí verificou-se que a atividade desta enzima não foi influenciada pela adição de PEG quando as plantas foram inoculadas.

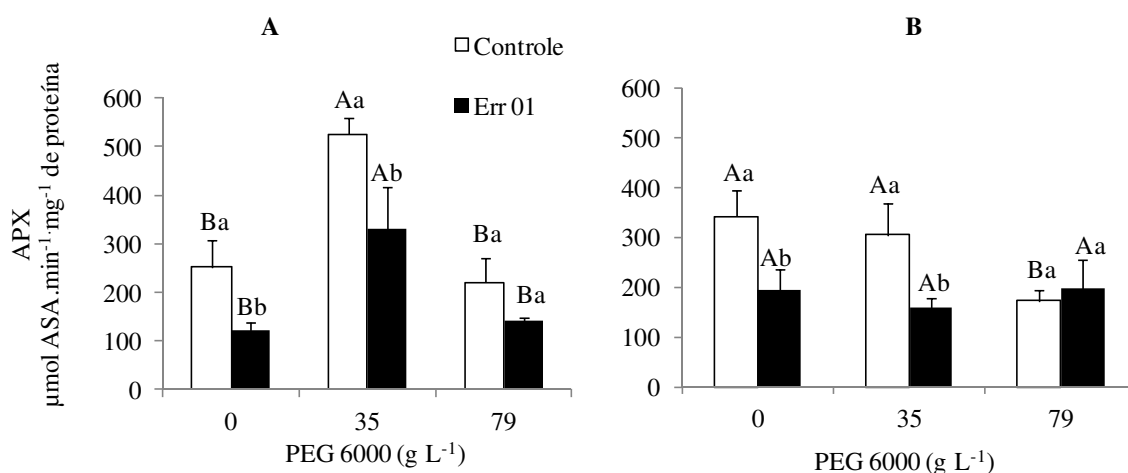


Figura 13. Atividade de ascorbato peroxidases (APX) em folhas de plantas de arroz variedade Nipponbare (A) e Piauí (B) inoculadas com isolado DSE Err 01 em comparação ao tratamento controle sob diferentes doses de polietilenoglicol (PEG 6000). A barra significa o erro padrão da média (n=4). Letras iguais maiúsculas entre cada dose de PEG 6000 e minúscula dentro das doses não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A expressão de muitas proteínas conhecidas pode ser regulada por estresses bióticos e abióticos, controladas por mecanismos complexos, relacionados à expressão gênica em resposta a pressões ambientais. Vários genes e proteínas podem responder ao estresse causado por diferentes estímulos ambientais como, salinidade, frio e seca (DE SOUSA FILHO et al., 2003).

Proteínas envolvidas no processo de proteção celular, como as enzimas antioxidantes, ATPases e proteínas transportadoras podem ser super-expressadas em condições de estresse para manutenção da homeostase iônica intracelular (XIONG & ZHU, 2002; XIONG et al., 2002).

Experimento de inoculação com estirpe de *Pseudomonas putida* termotolerante em plantas de trigo sobre condições de estresse térmico realizado por Ali et al. 2014 mostraram um aumento de aproximadamente 20% nos teores de proteínas totais das plantas inoculadas em relação ao controle. Os autores relacionaram este maior acúmulo de proteínas assim como hidratos de carbono, aminoácidos e ácidos à proteção da integridade da membrana celular.

Assim como observado por Ali et al. (2014) os teores de proteínas superiores nas plantas de arroz inoculadas com DSE Err 01 na presença de PEG na dose 35 g L⁻¹ pode está relacionado a proteção celular ao estresse oxidativo pelo endófito nesse nível de estresse. Além disso, pode se relacionar a maior absorção de N do meio de cultivo pela presença das hifas extra-radulares dos DSE.

Já foi relatado em vários trabalhos que os DSE produzem uma extensa rede fúngica extra-radicular que atinge além das zonas das raízes e uma variedade de enzimas extracelular, apresentando potencial para acessar e transferir nutrientes essenciais como nitrogênio (N) carbono (C), e fósforo (P) ao seu hospedeiro (JUPPONEN & TRAPPE, 1998; BARROW, 2003; USUKI & NARISAWA, 2007; MANDYAN, 2008; DAS & KAYANG, 2010).

Em condições normais ou até mesmo de estresse moderado, as plantas conseguem manter os níveis de danos celulares decorrente do estresse oxidativo, pelo funcionamento do sistema antioxidante enzimático presente, à medida que o estresse é intensificado este sistema não consegue manter os níveis não tóxicos de EROs formada. Nestas condições os efeitos do estresse oxidativo passam a ser evidentes, como, degradação de proteínas, e danos a níveis de membrana celular (DEUNER, 2007).

Alterações nos teores de proteínas em plantas sobre estresse hídrico são observadas na literatura. Essas alterações podem ser evidenciadas em função do processo de ajustamento osmótico e ação de enzimas proteolíticas que ocorre nos vegetais sobre estas condições. Este efeito é influenciado principalmente por fatores genéticos relacionados à tolerância da planta hospedeira e as características do estresse, como intensidade e duração (HEING et al., 2004; DEBOUBA et al., 2006).

Santos et al. (2010) estudando a adaptação de genótipos de feijão-caupi a condições de seca na pré-floração observaram para alguns genótipos o aumento nos teores de proteínas totais em até 30% em plantas estressadas quando comparadas ao controle, sendo que outros genótipos mantiveram seus teores de proteínas inalterados. Os autores relacionam esses resultados as diferença na capacidade dos vegetais em tolerar estresse, que segundo Santos & Carlesso, (1998) a resposta da planta a um determinado fator abiótico depende diretamente das características genética e morfofisiológica do genótipo além da severidade do estresse e o estágio fenológico da planta.

Os vegetais para atingir a homeostase iônica frente a uma condição de estresse utilizam de vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos dentre eles o acúmulo de osmólitos compatíveis como a prolina em consequência do aumento da síntese de proteases.

Os osmólitos possuem a função de auxiliar no ajustamento osmótico e proteger estruturas subcelulares e reduzir os danos oxidativo. Além disso, durante o estresse, pode ocorrer o aumento ou diminuição na síntese de proteínas transportadoras e canais de membranas (expressão gênica) no sentido de compatibilizar um balanço favorável ao metabolismo celular (SILVEIRA et al., 2010).

Os teores de proteínas podem ser bastante variáveis em plantas, devido ser uma característica influenciada por diversos fatores, tais como, o aumento da intensidade e/ou tempo do estresse as quais as plantas são submetidas ou estão sujeitas. Sob estas condições, pode ocorrer uma maior atividade das enzimas proteases responsáveis pela quebra das proteínas de reserva e aumento nos teores de aminoácidos livres como a prolina e outros solutos compatíveis para que ocorra o ajuste osmótico e consequentemente adaptação ao estresse (KERBAUY, 2004).

A modulação da atividade das enzimas antioxidantes pela restrição hídrica imposta e pela inoculação de DSE foi observada neste estudo.

As enzimas APX e CAT possuem funções similares na eliminação de EROs, pois ambas atuam reduzindo o H_2O_2 em O_2 e H_2O , entretanto, a APX utiliza o ascorbato como agente redutor (SILVEIRA et al., 2010) e possui maior afinidade pelo substrato que a CAT (MHAMDI et al., 2010). Portanto, condições de baixas concentrações de H_2O_2 já são suficientes para indução da atividade da APX no processo de detoxificação celular. Esta maior afinidade da APX pelo substrato possivelmente se relaciona a semelhança na atividade desta enzima nas duas variedades estudadas.

Exemplos de alteração na atividade de enzimas antioxidantes pela inoculação de fungos endofíticos em condições de estresse como apresentado neste trabalho são poucos na literatura (ZHANG et al., 2010; BU et al., 2012).

Efeito de fungo endofítico tolerante a estresse sobre a atividade de enzimas antioxidantes foram observados por Li et al. (2012) quando avaliaram a inoculação do endófito fúngico tolerante a chumbo (Pb) em plantas de arroz sobre estresse pela presença do metal. Este autores verificaram uma redução da atividade da enzima CAT nas plantas não inoculadas em função do aumento da dose de Pb adicionada (0 a $200\mu M$). Observaram também que a inoculação promoveu um aumento da atividade enzimática na dose $50\mu M$ e uma redução nas demais. Além disso, a presença do endófito promoveu maior atividade da CAT na presença de todas as concentrações de Pb adicionada em comparação ao controle. Em relação à atividade das peroxidases perceberam que houve uma redução na atividade desta enzima conforme as concentrações de Pb aumentaram em ambos os tratamentos inoculados ou não.

A hipótese que DSE pode conferir proteção ao estresse oxidativo pode ser corroborado pelos estudos realizados por Zhang et al. (2008) que verificaram aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes incluindo as CAT e APX nos micélios e hifas do isolado H93 de DSE a medida que se acrescentou doses crescentes de Pb^{2+} e Cd^{2+} ao meio de crescimento *in vitro*. Este aumento na atividade enzimática foi relacionado também com o aumento da melanina nas hifas e micélios do endófito. Os autores relacionaram estes resultados com a atividade antioxidante da melanina que pode ter contribuído para proteção do isolado ao estresse oxidativo pela presença dos metais.

Neste estudo, a redução da atividade enzimática das plantas inoculadas com DSE Err 01 na presença da restrição hídrica imposta pela adição do PEG, possivelmente se relaciona ao poder antioxidante da melanina presente nas estruturas fúngicas deste endófito. E ao estabelecer a simbiose com as plantas de arroz, pela colonização do interior das raízes pode ter conferido maior proteção ao estresse oxidativo a planta hospedeira (HENSON et al., 1999; REDMAM, 2002)

A melanina presente nas hifas e micélios dos DSE pode ter funcionado como agente antioxidante protegendo as células de danos celulares ocasionado pelo estresse oxidativo, contribuindo para o maior crescimento das plantas sobre essas condições (BARROW, 2003; LOGUERCIO-LEITE et al., 2006; ZHANG et al., 2010).

5 CONCLUSÕES

Todos os isolados DSE foram capazes de colonizar as raízes de ambas as variedades de arroz avaliadas e também capazes de promover o crescimento das plantas.

O isolado Err 04 foi o mais tolerante ao estresse hídrico e salino quando avaliado isoladamente em placa de petri.

Respostas à inoculação de DSE em ambas as variedades foram observadas até a restrição hídrica -0,2 Mpa, com exceção da variável massa seca das raízes que foi influenciada positivamente pelos DSE até a restrição -0,4 Mpa.

O isolado Err 46 na ausência de PEG promoveu maiores incrementos na MFPA, MFR APA, MSPA das plantas inoculadas da variedade Nipponbare.

Na presença da restrição hídrica -0,1 Mpa o isolado Err 01 apresentou superioridade em todos os parâmetros e nas duas variedades de arroz estudadas.

Os teores de proteínas em folhas foram superiores nas plantas inoculadas com isolado Err 01 na ausência do PEG 6000 e na presença da dose 35g L⁻¹ e inferiores na dose 79g L⁻¹.

Houve redução na atividade das enzimas CAT e APX quando as plantas foram inoculadas com DSE Err 01 em quase todos os tratamentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que os DSE foram capazes de proteger as plantas de arroz do estresse oxidativo e promover o crescimento vegetal em condições de restrição hídrica pela adição do polímero polietilenoglicol em meio de cultivo estéril, sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. No entanto, outros estudos envolvendo estes mesmo isolados em condições de casa de vegetação e campo (condições não estéreis) são necessários para avaliação da capacidade competitiva dos mesmos, frente à comunidade microbiana residente, uma vez que esta característica é de suma importância na seleção de microrganismos para fins de inoculação em plantas.

Para obtenção de mais conhecimento sobre o envolvimento e efeito de DSE em condições de estresse por deficiência hídrica em arroz ou em outras espécies vegetais, mais variedades devem ser avaliadas, sabendo que as características da planta hospedeira é um dos principais fatores que influencia a simbiose.

De fato os DSE assim como sugerido possuem uma relação com a proteção de plantas em condições de restrição hídrica, evidenciado pela maior produção de massa fresca e seca, assim como a alteração significativa das enzimas antioxidantes nas plantas inoculadas.

A presença da melanina e sua função antioxidante têm sido relatadas como principal mecanismo de proteção das plantas por DSE em condições de estresse, entretanto, espera-se com os próximos estudos melhores esclarecimentos sobre este mecanismo e outros que possam se relacionar a estes resultados apresentados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-LINARES, D.R; GROSCH, R.; RESTREPO, S.; KRUMBIN, A.; FRANKEN, P. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. **Mycorrhiza**, v. 21, p.413–422, 2011.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 391-396, 2006.

AZEVEDO, J. L; MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria , SERAFINI, L. A; de BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433P

BALBINOT, J.R.; FLECK, N. G.; BARBOSA NETO, J. F.; RIZZARDI, M. A. Características de plantas de arroz e a habilidade competitiva com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.165-174, 2003.

BAYAT, F.; MIRLOHI, A.; KHODAMBASHI, M. Effects of Endophytic Fungi on Some Drought Tolerance Mechanisms of Tall Fescue in a Hydroponics Culture. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, n. 4, p. 510-516, 2009.

BARROW, J.R.; AALTONEN, R.E. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by Dark septate fungi and the influence of hostphysiological 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. 239-247, 2003.

BATE, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v.39, p.205-207,1973.

BRADFORD, M. Rapid and quantative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 284-252, 1976.

BU, N.; LI, X.; LI, Y.; MA, C.; MA, L.; ZHANG, C. Effects of Na₂CO₃ stress on photosynthesis and antioxidative enzymes in endophyte infected and non-infected rice. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.78, p. 35-40, 2012.

CAVALCANTI, F.R.; LIMA, J.P.M.S.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology** v.164, p.591-600, 2007.

CARROL, G. C. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems. In: **Microbial mediation of plant-herbivore interactions**. New York, p. 253-271, 1991.

CHANG, T.T. AND BARDENAS, E.A. **The morphology and varietal characteristics of the rice plant**. IRRZ Technical Bulletin, p. 4- 40 , 1965.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to waterdeficits: prospects for water-saving agriculture, **Journal of Experimental Botany**,v.55, p. 2365-2384, 2004.

CHEN, X. M.; DONG, H. L.; HU, K. X.; SUN, Z. R.; CHEN, J. A.; GUO, S. X. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.29, n.3, p.328-337, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2011/2012**. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2012 - Brasília : Conab, 2012.

CORTEZ, H. Série: **Consciência e Meio Ambiente**, Tema: Aquecimento Global e Água. 2004, 95p.

CRUSCIOL, C. A. C.; MACHADO, J. R.; ARF, O.; RODRIGUES, R. A. F. Componentes de produção e produtividade de grãos de arroz de sequeiro em função do espaçamento e da densidade de semeadura, **Scientia Agricola**, v.56, n.1, 1999.

DAS, P.; KAYANG, H. Arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophyte colonization in bamboo from Northeast India. **Frontiers of Agriculture in China**, v.4 n.3, p. 375–382, 2010.

DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; SUZUKI, A.; GHORBEL, M.H. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato “*Lycopersicon esculentum*” seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.1247–1258, 2006.

DEUNER, S. **Sistema Antioxidante em Mudanças de Cafeeiro sob Condições de Déficit Hídrico**. Minas Gerais. 65f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2007.

DETMANN, K. S. C.; DELGADO, M. N.; REBELLO, V. P. A.; LEITE, T. S.; AZEVEDO, A. A.; KASUYA M. C. M.; ALMEIDA, A. M. Comparação de métodos para a observação de fungos micorrízicos arbusculares e endofíticos do tipo *dark septate* em espécies nativas de cerrado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.32, p. 1883-1890, 2008.

DE SOUZA FILHO, G. A.; FERREIRA, B. S.; DIAS, J. M.; QUEIROZ, K. S.; BRANCO, A. T.; BRESSAN-SMITH, R. E.; GARCIA, A. B. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. **Plant Science**, v.164 n.4, p. 623-628, 2003.

DOS SANTOS SOARES, A. M., & MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p. 10, 2007.

EMBRAPA, **Manejo da água em arroz irrigado, cultivo do arroz irrigado no Brasil, Sistemas de Produção 3**, 2005, ISSN 1806-9207, Versão Eletrônica, Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/cap10.htm>. Acesso em: 07/08/2013.

FADANELLI, C.; DUARTE, G. L.; SPOHR, M. G.; LIMA, J. C. D. **Caracterização da cultivar Nipponbare de arroz (*Oryza Sativa*) quanto a tolerância ao excesso de ferro**. Salão de Iniciação Científica. Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Capturado em 20 nov. 2013. Online. Disponível na Internet: <http://www.fao.org>.

FOYER, C.H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell and Environment**, v. 17, p. 507-523, 1994.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309 – 314, 1977.

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

GREEN, L. E.; PORRAS-ALFARO, A.; SINSABAUGH, R. L. Translocation of nitrogen and carbon integrates biotic crust and grass production in desert grassland. **Journal of Ecology**, v.98, p.1076-1085, 2008.

GUIMARÃES, C. M.; SANTOS, A. B dos.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. de.; STONE, L. F. Sistemas de Cultivo. In: SANTOS, A. B dos.; VIEIRA, N. R. de A. **A cultura do Arroz no Brasil – 2. Ed. Ver. Ampl.** Santo Antônio de Goiás: Editora Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 44, No. 2, p. 136–142, 2008.

GUNDEL, P.E.; MARTÍNEZ-GHERSAL, M.A.; BATISTA, W.B.; GHERSA, C.M. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed. **Annals of Applied Biology**, v. 3, p. 199-209, 2010.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology, Rockville**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HIENG B.; KRISTINA U.; JELKA S.V; MARJETKA K. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.519–530, 2004.

HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, v. 160, p. 1085-1093, 2001.

- HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review Phytopatology**, v.37, p. 447-471, 1999.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, USA : University of California Press, 1950.31p.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.
- KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p.25-34, 1997.
- JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. M. Dark septate root endophytes: a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis. **New Phytologist**, v.140, n.2, p.295-310, 1998.
- KOPP, M. M., LUZ, V. K. D., MAIA, L. C. D., COIMBRA, J. L. M., SOUSA, R. O. D., CARVALHO, F. I. F. D., & OLIVEIRA, A. C. D. Rice genotype evaluation under butyric acid effect. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24 n.2, p. 578-584, 2010.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA Mycorrhizas. **Mycology Research**, v. 92, p. 486-505, 1989.
- LICHTENTHALER, H. K.. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. **Journal of plant physiology**, v.148 n.1, p. 4-14, 1996.
- LI, T., LIU, M.J., ZHANG, X.T., ZHANG, H.B., SHA, T., AND ZHAO, Z.W. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. **Science Total Environmental**, v. 409, p. 1069–1074, 2011.
- LIMA, J. E. F. W.; FERREIRA.; CHRISTOFIDIS, D. **O uso da irrigação no Brasil. O estado das águas no Brasil**. Agência Nacional de Energia Elétrica. CD-ROM, 1999.
- LIN, J.; WANG G. Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive genótipos than in tolerant genótipos in spring wheat. **Plant Science**, v. 163, p. 627–637, 2002.
- LINGFEI, L.; ANNA, Y.; ZHIWEI, Z. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China. **Microbiology Ecology**, v.54, n.3, p.367-373, 2005.
- LIU, F.; XU, W.; WEI, Q.; ZHANG, Z.; XING, Z.; TAN, L.; SU, Z. Gene expression profiles deciphering rice phenotypic variation between Nipponbare (Japonica) and 93-11 (Indica) during oxidative stress. **PLoS One**, v. 5, n.1, p.8632, 2010.
- LOGUERCIO-LEITE, C; GROPOSO, C; DRESCHLER-SANTOS; E. R., GODINHO, P. D. S; ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo—I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v.19 n.2, p.17-27, 2006.
- MAUAD, M.; CRUSCIOL, C.A.C.; GRASSI FILHO, H. Produção de massa seca e nutrição de cultivares de arroz de terras altas sob condição de déficit hídrico e adubação silicatada. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32 n.3, p. 939-948, 2011.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n.15, p. 4197-4220, 2010.

MANDYAM, K. AND JUMPPONEN, A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. **Study Mycology**, v.53, p. 173–189, 2005.

MANDYAM, K. **Dark septate fungal endophytes from a tallgrass prairie and their continuum of interactions with host plants**. Manhattan. 115f. Dissertation (Doctor of philosophy) - Division of Biology, College of Arts and Sciences, Kansas State University, 2008.

MARINS, J.F; CARRENHO, R.; THOMAZ, S.M. Occurrence and coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate fungi in aquatic macrophytes in a tropical river–floodplain system. **Aquatic Botany**, v.91, p.13-19, 2009.

MASSENSINI, A.M.; BONDUKI, V.H.A.; TÓTOLA, M.R., FERREIRA, F.A.; COSTA, M.D. "Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants." **Mycorrhiza**, v. 24, n.2 p.153-159, 2014.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p.453- 467, 2010.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual review of plant biology**, v.52 n.1, p.561-591, 2001.

MITTLER R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490–498, 2004.

MORISHIMA, H. Background information about *Oryza* species in tropical America. In: MORISHIMA, H.; MARTINS, P.S. (Eds.) **Investigations of plant genetic resources in the amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza***: Report of 1992/93 Amazon Project. Mishima, Japan: The Monbusho International Scientific Research Program, p.4-5, 1994.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods. In: STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.F.J. *Endofitic Fungi*. Elsevier Academic Press, p. 241-270, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 626p

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981

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

PEDRON, M.; ARENHART, R. **Caracterização funcional do gene asr6 em arroz (oryza sativa)**. Salão de Iniciação Científica: Porto Alegre, RS. Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2008.

PENNISI, E. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. **Science** 320: 21-39, 2008.

PEREIRA, G. M. D; RIBEIRO, K. G., JÚNIOR, P. I. F., 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, p. 331-334. 2011.

PEREZ-NARANJO, J.,C. **Dark septate and arbuscular mycorrhizal fungal endophytes in roots of prairie grasses**. 117f. Dissertation (Doctor of philosophy) - Department of Soil Science, University of Saskatchewan Saskatoon 2009.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p.157-160, 1970.

PORRAS-ALFARO, A.; HERRERA, J.; SINSABAUGH, R. L.; ODENBACH, K. J.; LOWREY, T.; NATVIG, D. O. A novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. **Applied and Environmental Microbiology**, n.3, v.74, p. 2805–2813, 2008.

REDMAN, R.; SHEELHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermo tolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v.298, n.5598, p.1581, nov., 2002.

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

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Plant physiology. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.

SATHIYADASH, K.; MUTHUKUMAR, T.E. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungal associations in South Indian grasses. **Symbiosis**, v.52, n.1, p.21-32, 2010.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SANTOS, C. F.; LIMA, G. P. P.; & MORGADO, L. B. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. **Naturalia**, Rio Claro, v.33, p. 34-44, 2010.

SCHÄFER, P.; PFIFFI, S.; VOLL, L.M.; ZAJIC, D.; CHANDLER, P.M.; WALLER, F.; SCHOLZ, U.; PONS-KUHNEMANN, J.; SONNEWALD, S.; SONNEWALD, U.; KOGEL, K.H; Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. **Plant Journal**, v. 59 p. 461–474, 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.K.; DAMMANN, U.; AUST, H.J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycology Research**, v. 10, p.1275-1283, 1999.

SILVA, A.C.L. **Alterações bioquímicas, morfofisiológicas e produtivas em genótipos de arroz em dois regimes hídricos**. 105f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. 2012.

SILVA, E. N.; FERREIRA-SILVA, S. L.; FONTENELE, A. D. V.; RIBEIRO, R. V., VIÉGAS, R. A., SILVEIRA, J. A. G.. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, v.167, n.14, p. 1157-1164, 2010.

SILVA, P.C.C.; DO COUTO, J.L.; DOS SANTOS, A. R. Absorção dos íons amônio e nitrato e seus efeitos no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v,10,p 97-104, 2010.

SILVEIRA, J.A.; SILVA, S.L.; SILVA, E.N.; VIÉGAS, R. A. (2010). Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. GHEYI, HR; DIAS, NS; LACERDA, CF **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, p, 472.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre, Artmed, 2004. 719p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 690p

TORRES, M.A.; DANGL, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8 p. 397-403, 2005.

TOBE, K.; LI.X.; OMASA, K. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium capsicum* (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, v. 85, n. 3, p. 391-396, 2000.

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, dez., 2007.

VEGA-FRUTIS, R.; VARGA, S.; KYTÖVIITA, M. M. Sex-specific interaction between arbuscular mycorrhizal and dark septate fungi in the dioecious plant *Antennaria dioica* (Asteraceae). **Plant Biology**, 2012.

VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.14, p. 1957-1968, 1991.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; BARBETTI, M.J.; LI H.; WOO, S.L.; LORITO, M.; A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites

in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 80-86, 2008.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell Online**, v. 14, n. suppl 1, p. 165-183, 2002.

WATANABE, Y. Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryza*. In: MATSUO, T.; FUTSUHARA, Y.; KIKUCHI, F.; YAMAGUCHI, H. **Science of the rice plant genetics**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, p.29-39, 1997.

YANIK, T.; DONALDSON, R.P. A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.435, p. 243-252, 2005.

YUAN, Z.L.; ZHANG, C.L.; LIN, F.C.; KUBICEK, C.P. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76, p.1642–1652, 2010.

ZHAN, F.; HE, Y.; ZU, Y.; LI, T.; ZHAO, Z. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, n 35, p. 728, 2011.

ZHANG, Y.; 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**, p. 91-96, 2012.

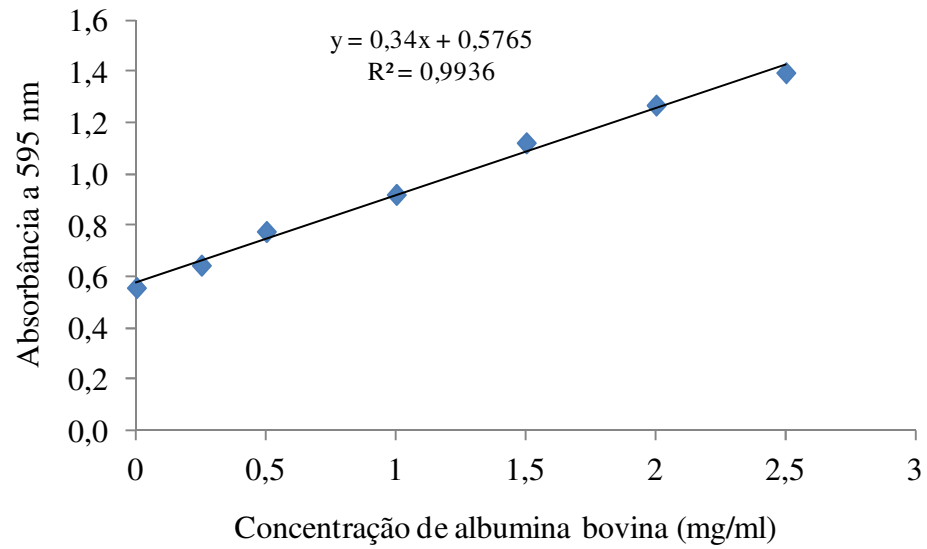
ZHANG, H.H.; TANG, M.; CHEN, H.; WANG, Y.J.; BAN, Y.H. Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes colonization status in medicinal plant *Lycium barbarum* L. in arid northwestern China. **Africa Journal Microbiology Research**, v. 18, p.1914–1920, 2010.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, M.; SHI, X.; ZHAO, Z. Dark Septate Endophyte (DSE). Fungi Isolated from Metal Polluted Soils: Their taxonomic position, Tolerance, and Accumulation of Heavy Metals *in vitro*. **The Journal of Microbiology**, v.8, p. 624-632, 2008.

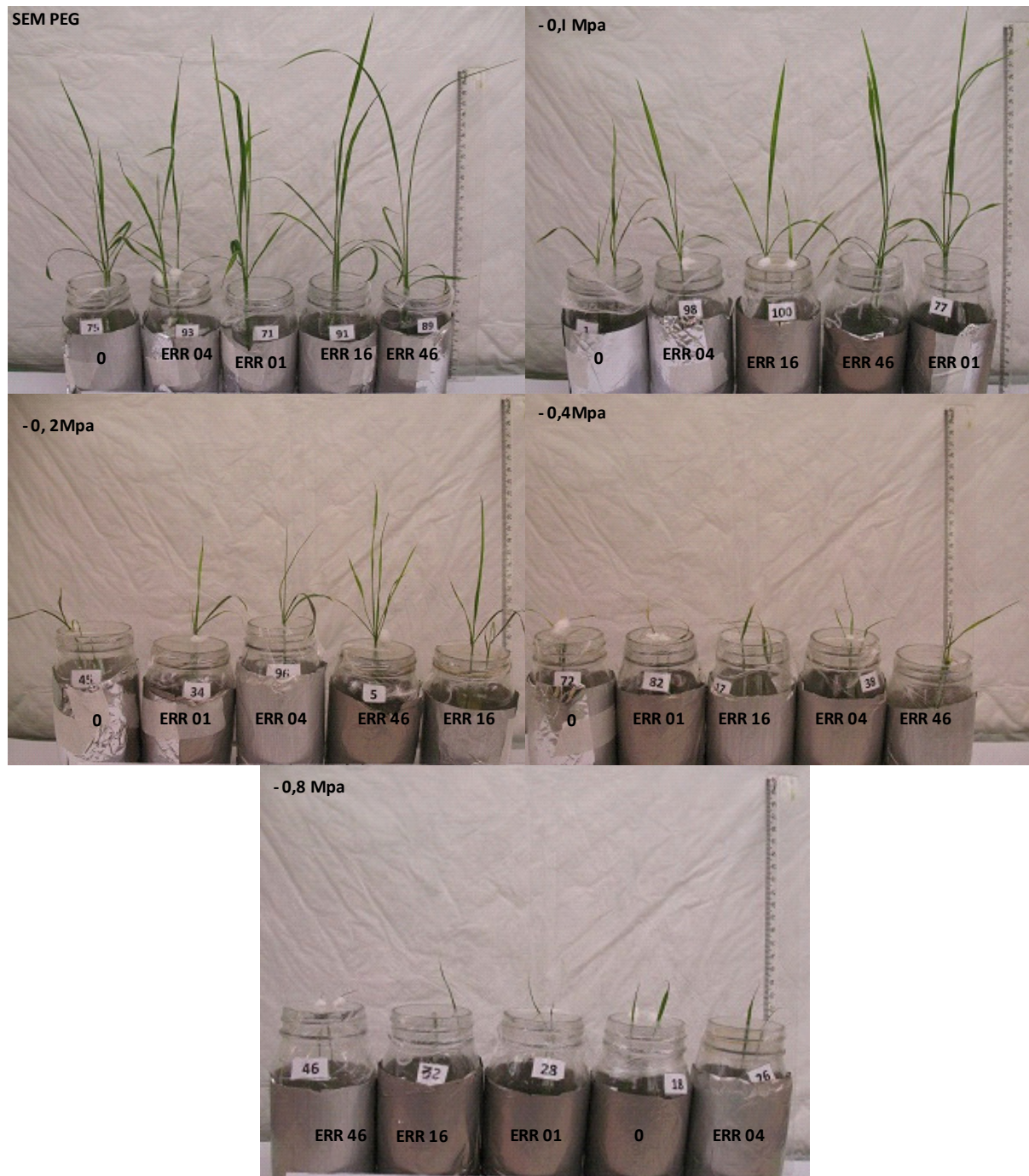
ZHANG, X.; LI, C.; NAN, Z. Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*. **Journal of hazardous materials**, v. 175, n.1, p. 703-709, 2010.

ZUBEK, S.; BŁASZKOWSKI, J.; MLECZKO, P. Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte associations of medicinal plants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 80 n.4, p. 285-292, 20

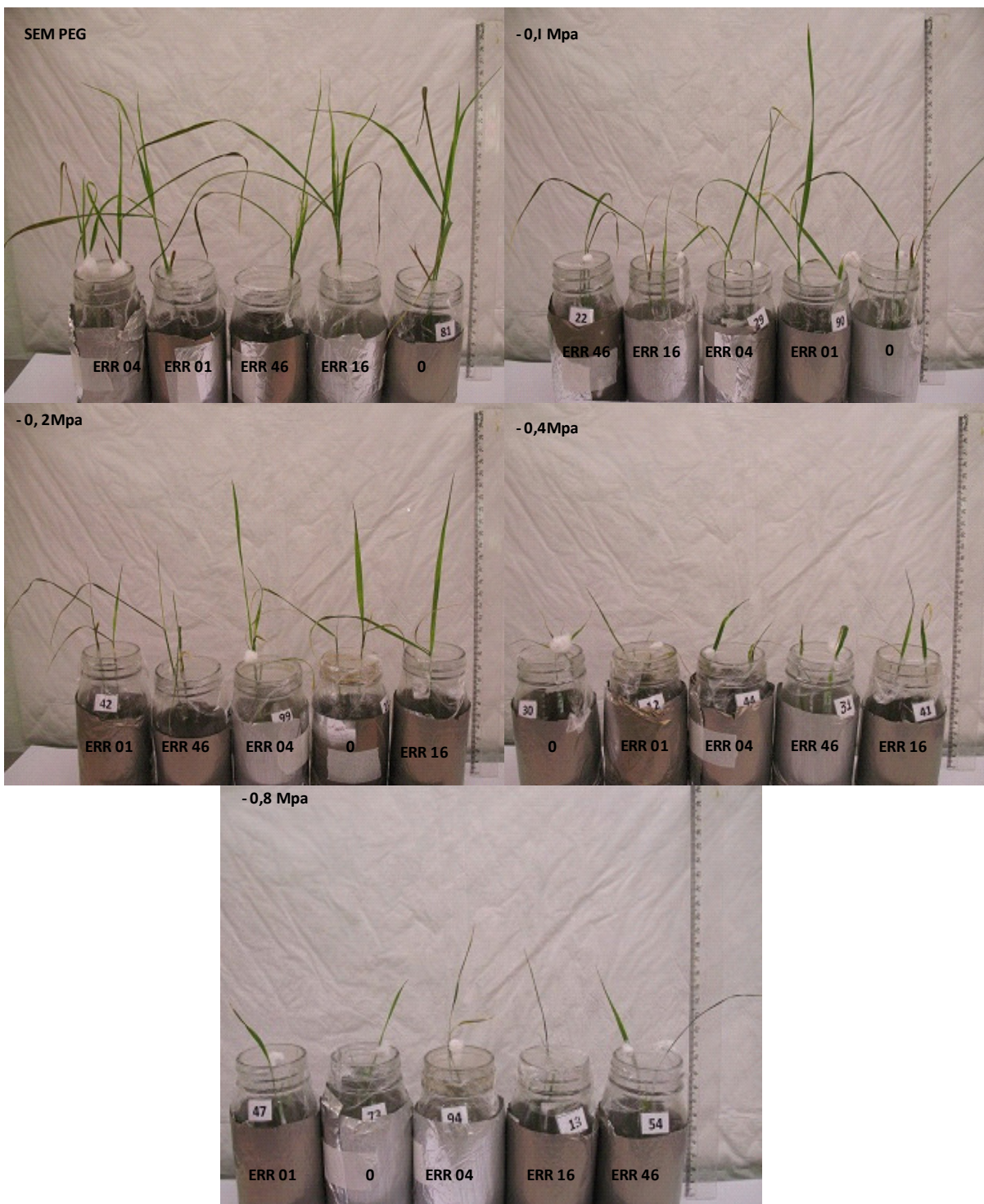
8 APÊNDICE



Apêndice 1. Curva padrão elaborada para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford.



Apêndice 2. Plantas de arroz variedade Nipponbare aos 22 dias de idade e inoculadas com os isolados de “dark septate” e um tratamento controle (0) em diferentes níveis de restrição hídrica: 0 (sem PEG), -0,1, -0,2, -0,4 e -0,8 Mpa por meio da adição de Polietilenoglicol (PEG 6000) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força completa.



Apêndice 3. Plantas de arroz, variedade Piauí aos 22 dias de idade e inoculadas com os isolados de “dark septate” e um tratamento controle (0) em diferentes níveis de restrição hídrica: 0 (sem peg), -0,1, -0,2, -0,4 e -0,8 Mpa por meio da adição de Polietilenoglicol (PEG 6000) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força completa.

Apêndice 4. Massa fresca de parte aérea (MFPA) das variedades de arroz Nipponbare (Nip) e Piauí aos 30 dias após inoculação de isolados fúngicos “dark septate” e um tratamento testemunha (sem inoculação) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força acrescidos de concentrações crescentes de polietilenoglicol (PEG). Valores médios de 4 repetições. CV= Coeficiente de variação

		MFPA (g)									
PEG (g L ⁻¹)		0		79,791		121,139		180,213		264,246	
Isolados	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	
Err 46	0,568 Aa	0,503 Ba	0,345 Aa	0,291 Bb	0,212 Aa	0,273 Ba	0,114 Aa	0,136 Aa	0,067 Aa	0,075 Aa	
Testemunha	0,289 Bb	0,465 Ba	0,216 Ba	0,295 Ba	0,197 Aa	0,281 Ba	0,100 Aa	0,128 Aa	0,058 Aa	0,086 Aa	
Err 04	0,342 Bb	0,610 Aa	0,244 Bb	0,379 Aa	0,191 Aa	0,233 Ba	0,103 Aa	0,169 Aa	0,073 Aa	0,092 Aa	
Err 16	0,366 Bb	0,491 Ba	0,283 Bb	0,405 Aa	0,191 Ab	0,390 Aa	0,113 Aa	0,140 Aa	0,063 Aa	0,074 Aa	
Err 01	0,366 Bb	0,574 Aa	0,421 Aa	0,437 Aa	0,216 Aa	0,301 Ba	0,093 Aa	0,150 Aa	0,077 Aa	0,097 Aa	
CV %	28,73										

* Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Apêndice 5. Massa fresca de raiz (MFR) das variedades de arroz Nipponbare (Nip) e Piauí aos 30 dias após inoculação de isolados fúngicos “dark septate” e um tratamento testemunha (sem inoculação) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força acrescidos de concentrações crescentes de polietilenoglicol (PEG). Valores médios de 4 repetições. CV= Coeficiente de variação

		MFR (g)									
PEG (g L ⁻¹)		0		79,791		121,139		180,213		264,246	
Isolados	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	
Err 46	0,105 Aa	0,108 Aa	0,069 Aa	0,074 Ba	0,048 Ab	0,091 Aa	0,031 Aa	0,043 Aa	0,023 Aa	0,015 Aa	
Testemunha	0,062 Bb	0,112 Aa	0,048 Aa	0,068 Ba	0,060 Aa	0,065 Ba	0,040 Aa	0,050 Aa	0,025 Aa	0,028 Aa	
Err 04	0,055 Bb	0,100 Aa	0,045 Aa	0,079 Ba	0,050 Aa	0,065 Ba	0,033 Aa	0,039 Aa	0,025 Aa	0,028 Aa	
Err 16	0,077 Ba	0,102 Aa	0,065 Aa	0,083 Ba	0,050 Ab	0,101 Aa	0,039 Aa	0,045 Aa	0,023 Aa	0,019 Aa	
Err 01	0,071 Bb	0,122 Aa	0,088 Aa	0,114 Aa	0,063 Ab	0,097 Aa	0,030 Aa	0,045 Aa	0,032 Aa	0,031 Aa	
CV %	33,26										

* Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Apêndice 6. Altura de plantas (AP) das variedades de arroz Nipponbare (Nip) e Piauí aos 30 dias após inoculação de isolados fúngicos “dark septate” e um tratamento testemunha (sem inoculação) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força acrescidos de concentrações crescentes de polietilenoglicol (PEG). Valores médios de 4 repetições. CV= Coeficiente de variação

PEG (g L ⁻¹)	AP (cm)									
	0		79,791		121,139		180,213		264,246	
Isolados	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui
Err 46	37,480 Aa	27,520 Bb	27,800 Aa	21,801 Bb	23,500 Aa	23,010 Aa	14,960 Aa	16,080 Aa	9,710 Aa	11,170 Aa
Err 01	29,400 Bb	37,370 Aa	29,800 Aa	28,500 Aa	19,720 Ab	24,160 Aa	10,720 Ab	15,920 Aa	9,620 Aa	11,730 Aa
Err 04	27,720 Bb	33,370 Aa	22,520 Ba	26,180 Aa	18,680 Aa	22,870 Aa	12,670 Aa	16,180 Aa	11,110Aa	12,020 Aa
Err 16	29,320 Ba	30,620 Ba	24,620 Ba	23,870 Ba	20,850 Aa	24,530 Aa	12,180 Aa	13,920 Aa	10,810Aa	10,130 Aa
Testemunha	22,960 Cb	27,750Ba	22,020 Ba	24,150 Ba	14,020 Bb	22,000 Aa	12,350 Aa	12,520 Aa	9,680 Aa	11,150 Aa
CV %	15,15									

* Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Apêndice 7. Massa seca da parte aérea (MSPA) das variedades de arroz Nipponbare (Nip) e Piauí aos 30 dias após inoculação de isolados fúngicos “dark septate” e um tratamento testemunha (sem inoculação) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força acrescidos de concentrações crescentes de polietilenoglicol (PEG). Valores médios de 4 repetições. CV= Coeficiente de variação

PEG (g L ⁻¹)	MSPA (g)									
	0		79,791		121,139		180,213		264,246	
Isolados	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui
Err 46	0,146 Aa	0,139 Ba	0,086 Ba	0,074 Aa	0,070 Aa	0,062 Aa	0,031 Aa	0,036 Aa	0,023 Aa	0,028 Aa
Err 01	0,131 Ab	0,164 Aa	0,102 Aa	0,109 Aa	0,062 Aa	0,079 Aa	0,030 Aa	0,047 Aa	0,027 Aa	0,031 Aa
Err 16	0,119 Aa	0,123 Ba	0,121 Aa	0,095 Ab	0,056 Aa	0,081 Aa	0,048 Aa	0,037 Aa	0,028 Aa	0,028 Aa
Testemunha	0,095 Bb	0,125 Ba	0,055 Ba	0,080 Aa	0,039 Aa	0,059 Aa	0,035 Aa	0,037 Aa	0,029 Aa	0,029 Aa
Err 04	0,106 Bb	0,146 Aa	0,072 Ba	0,094 Aa	0,054 Aa	0,064 Aa	0,025 Aa	0,033 Aa	0,025 Aa	0,030 Aa
CV %	26,54									

* Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Apêndice 8. Massa seca de raiz (MSR) das variedades de arroz Nipponbare (Nip) e Piauí aos 30 dias após inoculação de isolados fúngicos “dark septate” e um tratamento testemunha (sem inoculação) em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland ½ força acrescidos de concentrações crescentes de polietilenoglicol (PEG). Valores médios de 4 repetições. CV= Coeficiente de variação

PEG (g L ⁻¹)	MSR (g)									
	0		79,791		121,139		180,213		264,246	
Isolados	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui	Nip	Piaui
Err 46	0,030 Ab	0,036 Ba	0,032 Aa	0,031 Aa	0,020 Aa	0,028 Aa	0,015 Aa	0,015 Aa	0,012 Aa	0,013 Aa
Err 01	0,033 Ab	0,047 Aa	0,029 Aa	0,031 Aa	0,022 Ab	0,028 Aa	0,009 Bb	0,018 Aa	0,012 Aa	0,009 Aa
Err 16	0,029 Aa	0,032 Ba	0,024 Bb	0,032 Aa	0,022 Ab	0,031 Aa	0,017 Aa	0,019 Aa	0,011 Aa	0,011 Aa
Testemunha	0,020 Ab	0,028 Ca	0,023 Ba	0,026 Aa	0,021 Aa	0,026 Ba	0,011 Bb	0,017 Aa	0,012 Aa	0,013 Aa
Err 04	0,022 Ab	0,043 Aa	0,023 Ba	0,030 Aa	0,022 Aa	0,022 Ba	0,015 Aa	0,013 Aa	0,009 Aa	0,013 Aa
CV %	16,34									

* Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.



Apêndice 9. Colonização de raízes de arroz ao oitavo dia após a inoculação de fungos “dark septate” e cultivadas em meio Phytigel dissolvido em solução de Hoagland estéril adicionado (B) ou não (A) de 264,246 g L⁻¹ de Polietilenoglicol (PEG 6000). Presença de hifas (C) a partir de discos de 7 mm de diâmetro adicionado ao meio de cultura.