

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

DISSERTAÇÃO

**Influência dos Fungos *Dark Septate* sobre Absorção
de Nutrientes e Crescimento de Plantas de Arroz e
Tomate**

Carlos Vergara Torres Júnior

2014



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

**INFLUÊNCIA DOS FUNGOS DARK SEPTATE SOBRE ABSORÇÃO DE
NUTRIENTES E CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ARROZ E
TOMATE**

CARLOS VERGARA TORRES JÚNIOR

Sob a Orientação do Pesquisador
Gustavo Ribeiro Xavier

e Co-orientação do Pesquisador
Jerri Édson Zilli

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

Seropédica, R J
Fevereiro de 2014

631.89
T693i
T

Torres Júnior, Carlos Vergara, 1984-
Influência dos fungos dark septate sobre absorção
de nutrientes e crescimento de plantas de arroz e
tomate / Carlos Vergara Torres Júnior. – 2014.
xiii, 76f.: il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Agronomia – Ciência do Solo.
Bibliografia: f.61-70.

1. Crescimento (Plantas) - Teses. 2. Tomate –
Crescimento - Teses. 3. Arroz – crescimento –
Teses. 4. Fungos micorrízicos - Teses. I. Xavier,
Gustavo Ribeiro, 1973- 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**

CARLOS VERGARA TORRES JÚNIOR

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/02/2014

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Dedico esta defesa a todas as pessoas que me fizeram chegar até aqui, em especial aos meus pais Carlos Vergara Torres e Anabela Francisco Nhamuhe, pelo imenso amor, por ter aprendido com eles a dedicação e a perseverança, aos meus irmãos Sansão, Belinha, Amélia, Modesto, Julieta, Lina, Milo e Boneca pela força, carinho e amizade e finalmente aos meus segundos pais Tio Enrique, Padre José Maria e irmã Quitéria pelo amor, carinho e por possibilitarem meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Adeus.

À Tio Enrique, pela dedicação, apoio, amizade e carinho prestados a mim.

Aos meus pais Carlos Vergara Torres e Anabela Francisco Nhamuhe, pelo bom exemplo, dedicação, amor e carinho.

Aos meus segundos pais Padre José Maria e Irmã Quitéria pelo imenso amor, dedicação e carinho.

Aos meus irmãos Sansão, Belinha, Amélia, Modesto, Julieta, Lina, Milo e Boneca pela força, carinho e amizade.

Aos meus tios, primos e sobrinhos pelo amor, amizade, confiança e apoio.

À Karla Emanuelle Campos Araújo, grande companheira, pela amizade, dedicação e compressão.

À todos os meus amigos, em especial à Horácio e Casimiro, que apesar da distância sempre mantiveram a amizade e o carinho por mim.

Ao Professor Jorge Jacob Neto, pela orientação, exemplo de vida e profissional.

À Drs. Jerri Édson Zilli e Gustavo Ribeiro Xavier pelo incentivo e por me permitirem desenvolver o treinamento científico sob sua orientação.

Aos companheiros do Laboratório de Ecologia Microbiana pela convivência e apoio nos trabalhos braçais e intelectuais.

À Embrapa Agrobiologia e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela capacitação e formação.

À FAPERJ, Embrapa Agrobiologia e ao Capes por possibilitarem a realização do trabalho.

BIOGRAFIA

Carlos Vergara Torres Júnior nasceu na cidade de Maputo, Moçambique, em 07 de Agosto de 1984. Em 2006 recebeu o diploma de Técnico em Agropecuária pela Escola Agroctécnica Federal de Muzambinho em Muzambinho – MG. Chegou à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2007, diplomando-se em Engenharia Agrônômica em 2012, mesmo ano em que ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo, em 2014, concluindo, na presente data, a dissertação, sob a orientação dos Drs. Gustavo Ribeiro Xavier e Jerri Édson Zilli.

RESUMO GERAL

TORRES-JÚNIOR, Carlos Vergara. **Influência dos fungos *dark septate* sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz e tomate.** 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Os fungos *dark septate* podem ser utilizados como promotores do crescimento vegetal. Contudo, a forma como estes fungos estabelecem associação com o seu hospedeiro ainda não é totalmente compreendida. Este trabalho teve por objetivo caracterizar fungos *dark septate* e avaliar absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz e tomate inoculadas com estes fungos. Utilizando-se delineamento de blocos casualizados, isolados de FEDS, obtidos de *Oryza glumaepatula*, foram caracterizados quanto a capacidade para alterar pH do meio ágar-batata-dextrose (BDA) com azul de bromotimol, quanto ao crescimento em diferentes pHs (4, 5, 7 e 8), quanto a capacidade para solubilizar fosfato de cálcio e utilizar fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes. Outros ensaios foram conduzidos em condições de câmara de crescimento e os tratamentos consistiram de plantas de arroz (variedade Piauí) e tomate (cultivar Santa Clara I-5300), com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate* (ERR 01, ERR 16, ERR 26 e ERR 42). Nesses ensaios foram determinados os parâmetros cinéticos, $V_{máx}$ e K_M , da absorção de NO_3^- , teores de $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, N-amino livre, açúcares solúveis e macronutrientes. Os resultados mostraram que os fungos ERR 02 e ERR 04 alcalinizaram o meio e os demais o acidificaram. No teste com os diferentes pHs foi possível observar que apenas o crescimento dos fungos ERR 02 e ERR 46 não foi influenciado pelas faixas de pH testadas. Nenhum dos isolados testado foi capaz de solubilizar o fosfato de cálcio. Foi possível observar ainda que o isolado ERR 04 desenvolveu-se melhor na presença de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes, comparativamente aos demais isolados. Os resultados do experimento com arroz mostraram que as plantas inoculadas com os fungos ERR 16 e ERR 01 apresentaram um K_M menor da absorção de NO_3^- , comparativamente ao controle. Além disso, nas plantas inoculadas com o fungo ERR 16 foram observados, incrementos no conteúdo de N-amino, açúcares solúveis, nos conteúdos de N, P, K, Mg e S, na massa fresca e seca de raiz e parte aérea, na altura e no número de perfilhos por planta, comparativamente ao controle. Os resultados do experimento com tomate mostraram que as plantas inoculadas com os fungos ERR 01 e ERR 42 apresentaram incrementos significativos nos conteúdos açúcares solúveis, P, K, Mg e S, na massa de raiz, caule, folha e parte aérea seca, quando comparado ao controle. Além disso, no tratamento inoculado com ERR 42 se observou maior $V_{máx}$ da absorção de NO_3^- . O estudo mostra que os isolados ERR 02 e ERR 46 não são influenciados pelos diferentes pHs testados e que o isolado ERR 04 é promissor para testes de avaliação da transferência de nutrientes da matéria orgânica para seu hospedeiro. Além disso, o fungo ERR 16 apresenta potencial para a promoção do crescimento vegetal do arroz e os fungos ERR 01 e ERR 42 para tomate.

Palavras chave: *Oryza sativa* L. FEDS. *Solanum lycopersicum*. pH.

GENERAL ABSTRACT

TORRES-JÚNIOR, Carlos Vergara. **Influence of dark septate endophyte fungi on nutrient uptake and growth of rice and tomato plants.** 2014. 76p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The dark septate endophytes (DSE) fungi can be used as plant growth promoter. However, how these fungi establish association with its host is still not fully understood. This study aimed to characterize dark septate endophytes fungi and evaluate nutrient uptake and growth of rice and tomato plants inoculated with these fungi. Using a randomized block design, DSE isolates obtained from *Oryza glumaepatula* were characterized for their ability to change pH of the potato-dextrose-agar (PDA) medium with bromothymol blue, as growth at different pHs (4, 5, 7 and 8), for ability to solubilize calcium phosphate and using organic and/or inorganic nutrient sources. Other assays were conducted in a growth chamber conditions and treatments consisted of rice (variety Piau) and tomato (variety Santa Clara I- 5300) plants with and without inoculation with different DSE isolates (ERR 01, ERR 16, ERR 26 and ERR 42). In these trials were determined kinetic parameters, V_{max} and K_M , of NO_3^- uptake, $NO_3^- - N$, $NH_4^+ - N$, free amino-N, soluble sugars and macronutrients contents. The results showed that the ERR 02 and ERR 04 isolates alkalized the middle and other acidified. In the test with different pHs was observed that only the growth of ERR 46 and ERR 02 fungi was not influenced by the pH ranges tested. None of the tested isolates was able to solubilize the calcium phosphate. It was also possible to observe that the ERR 04 fungi developed better in the presence of organic and/or inorganic nutrients sources, when compared to other isolates. The results of the experiment with rice showed that plants inoculated with the ERR 16 and ERR 01 fungi had a lower K_M when compared to control. Moreover, in plants inoculated with the ERR 16 fungus, increases in amino-N, soluble sugars, N, P, K, Mg and S contents, fresh and dry weight of roots and shoots, height and number of tillers per plant, compared to the control. The results of the experiment with tomato showed that plants inoculated with the ERR 01 and ERR 42 fungi showed significant increases in soluble sugar, P, K, Mg and S content, dry weight of root, stem, leaf and shoot when compared to control. Furthermore, in the treatment inoculated with ERR 42 greater V_{max} was observed. The study shows that the ERR 02 and ERR 46 fungi alone are not influenced by different pHs and ERR 04 fungus is promising for the tests of evaluation transfer of nutrients from the organic material to its host. Furthermore, the ERR 16 fungus shows potential to promote plant growth in rice and ERR 01 and ERR 42 fungi to tomato.

Key words: *Oryza sativa* L. DSE fungi. *Solanum lycopersicum*. pH.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Teores de nutrientes presentes na solução de Hoagland modificada com metade da força iônica e no extrato de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) (feijão de porco) agarizado.	10
Tabela 2. Alteração do pH do meio BDA com azul de bromotimol por fungos <i>dark septate</i> . 11	11
Tabela 3. Diâmetro micelial (mm) de fungos <i>dark septate</i> em diferentes pHs.	12
Tabela 4. Resposta de fungos <i>dark septate</i> á solubilização de fosfato de cálcio.	13
Tabela 5. Massa fresca da colônia fúngica (mg), diâmetro micelial (mm) e velocidade de crescimento (mm dia ⁻¹) de isolados de fungos endofíticos <i>dark septate</i> (FEDS), crescidos em meios de cultura a base de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes até aos 12 dias após a inoculação.	15
Tabela 6. Parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$ da absorção de NO_3^- determinados aos 35 DAG na variedade de arroz Piauí com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	30
Tabela 7. Conteúdo de macronutrientes (mg vaso ⁻¹) na parte aérea da variedade de arroz Piauí, com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	35
Tabela 8. Altura da parte aérea, profundidade do sistema radicular e número de perfilhos de plantas de arroz (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	36
Tabela 9. Massa fresca e seca de raízes, bainhas e folhas de plantas de arroz, (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	37
Tabela 10. Parâmetros cinéticos, K_M e $V_{máx}$, da absorção de NO_3^- determinados aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	50
Tabela 11. Conteúdo de macronutrientes (mg vaso ⁻¹) determinado aos 38 DAG na parte aérea de plantas de tomate (cultivar Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	55
Tabela 12. Altura da parte aérea e profundidade do sistema radicular de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	56
Tabela 13. Massa fresca e seca de raízes, caule, pecíolos e folhas, e razão raiz:parte aérea de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Alteração de pH do meio para alcalino e ácido pelos fungos ERR 04 e ERR 45.... 11
- Figura 2.** Crescimento micelial do isolado ERR 46 no meio BDA e meio com apenas extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) (EV1%)..... 16
- Figura 3.** Vaso utilizado para estudo da cinética de absorção de $N-NO_3^-$ em plantas de arroz (var. Piauí) inoculadas com fungos *dark septate*, submetidas a 0,5 mM de $N-NO_3^-$ depois de 72 horas de privação deste nutriente. 26
- Figura 4.** Plantas de arroz (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*..... 28
- Figura 5.** Colonização de raízes de arroz (var. Piauí) por diferentes isolados de fungos *dark septate* observada aos 35 DAG e o controle. Hifas melanizadas septadas (H). 28
- Figura 6.** Depleção de $N-NO_3^-$ na solução nutritiva por plantas de arroz (var. Piauí) inoculadas por fungos *dark septate*, submetidas a 0,5 mM de $N-NO_3^-$ depois de 72 horas de privação deste nutriente..... 29
- Figura 7.** Influxo de NO_3^- em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação por diferentes isolados de fungos *dark septate* em resposta ao aumento da concentração de NO_3^- na solução nutritiva dentro de uma faixa correspondente a atuação do sistema de absorção de alta afinidade (0-500 μmol). 31
- Figura 8.** Conteúdo de N-amino livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, bainha e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas..... 32
- Figura 9.** Conteúdo de $N-NH_4^+$ livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, bainha e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas..... 33
- Figura 10.** Conteúdo de açúcares solúveis (mg vaso^{-1}) determinado aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, bainha e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas..... 34
- Figura 11.** Plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. 47
- Figura 12.** Colonização de raízes de tomate (cult. Santa Clara I-5300) por diferentes isolados de fungos *dark septate* observada aos 38 DAG e o controle. Microescleródios (M) e hifas melanizadas septadas (H)..... 47
- Figura 13.** Depleção de $N-NO_3^-$ na solução nutritiva por plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate* e o controle, submetidas a 0,5 mM de $N-NO_3^-$ depois de 72 horas de privação deste nutriente. 48
- Figura 14.** Variação de pH na solução nutritiva causada por plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate* e o controle, submetidas a 0,5 mM de $N-NO_3^-$ depois de 72 horas de privação deste nutriente. 49
- Figura 15.** Influxo de NO_3^- em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação por diferentes isolados de fungos *dark septate* em resposta ao aumento da concentração de NO_3^- na solução nutritiva dentro de uma faixa correspondente a

atuação do sistema de absorção de alta afinidade (0-600 μmol).	50
Figura 16. Conteúdo de N-NO_3^- ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i> . Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.	51
Figura 17. Conteúdo de N-amino livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i> . Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.	52
Figura 18. Conteúdo de N-NH_4^+ livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i> . Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). Valores sem letra não foram significativos ao teste F a 5 % de probabilidade.* Cada vaso continha quatro plantas.	53
Figura 19. Conteúdo de açúcares solúveis (mg vaso^{-1}) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos <i>dark septate</i> . Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE FUNGOS DARK SEPTATE.....	3
2.1.	RESUMO	4
2.2.	ABSTRACT	5
2.3.	INTRODUÇÃO.....	6
2.4.	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.5.1	Crescimento de fungos <i>dark septate</i> em diferentes faixas de pH e alteração do pH do meio de cultivo	9
2.5.2	Teste solubilização de fosfato de cálcio	9
2.5.3	Avaliação do uso de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes por fungos <i>dark septate</i>	9
2.6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
2.6.1	Crescimento de fungos <i>dark septate</i> em diferentes faixas de pH e alteração de pH do meio de cultivo	11
2.6.2	Solubilização de fosfato de cálcio	12
2.6.3	Uso de fontes orgânicas e/ou inorgânica de nutrientes por fungos <i>dark septate</i> ..	13
2.7.	CONCLUSÕES	17
3	CAPÍTULO II: INFLUÊNCIA DOS FUNGOS DARK SEPTATE SOBRE ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ARROZ	18
3.1.	RESUMO	19
3.2.	ABSTRACT	20
3.3.	INTRODUÇÃO.....	21
3.4.	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.4.1	Promoção de crescimento vegetal	22
3.4.2	Interação planta – fungos endofíticos <i>dark septate</i>	23
3.4.3	Sistemas de absorção do nitrato e parâmetros cinéticos em plantas.....	23
3.4.4	Absorção micelial e transferência de nutriente fungo – planta	24
3.5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.6.1	Cinética de absorção de N-NO ₃ ⁻	28
3.6.2	Fração solúvel e acúmulo de nutrientes em plantas de arroz	31
3.6.3	Biomassa e crescimento do arroz	36
3.7.	CONCLUSÕES	39
4	CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DOS FUNGOS DARK SEPTATE SOBRE ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE	40
4.1.	RESUMO	41
4.2.	ABSTRACT	42
4.3.	INTRODUÇÃO.....	43
4.4.	REVISÃO DE LITERATURA	44
4.5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

4.6.1	Cinética de absorção de N-NO ₃ ⁻	47
4.6.2	Fração solúvel e acúmulo de nutrientes no tomateiro	51
4.6.3	Biomassa e crescimento do tomateiro	55
4.7.	CONCLUSÕES	58
5	CONCLUSÕES GERAIS	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8	ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, as mudanças climáticas globais e a qualidade de vida têm sido alvo de muitas discussões mundialmente. De certa forma, o uso de fertilizantes na agricultura, sobretudo os nitrogenados estabelece uma relação com esses dois temas. O uso de fertilizantes nitrogenados contribui para as mudanças climáticas globais através de uma significativa emissão de gases de efeito estufa (IPCC, 2007), como óxido nitroso (N_2O), que apresenta o potencial de aquecimento global 298 vezes superior ao do CO_2 (CERRI et al., 2007). Por outro lado, pelo fato do NO_3^- encontrar-se no solo principalmente adsorvido na dupla camada iônica difusa, principalmente em solos mal manejados, encontrando-se na solução do solo, apresenta, portanto alta mobilidade no solo (SPOSITO, 2008). Desta forma, a lixiviação do NO_3^- acarreta em problemas de contaminação ambiental e subsequentemente em problemas de saúde pública na medida em que a água contaminada for consumida por nós e levar a formação de nitrosaminas, que são substâncias cancerígenas (JANETE ALABURDA & LINDA NISHIHARA, 1998). Diante desse paradigma, o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal ganha destaque na ciência, embora ainda com pouco uso prático.

Um dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal de grande importância nos agrossistemas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Contudo, a contribuição de outros mecanismos na promoção de crescimento vegetal realizados por microrganismos que não são bactérias diazotróficas, tem despertado atenção pelo seu potencial, como é o caso dos fungos endofíticos *dark septate* (FEDS) (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; ZHANG et al., 2012; RIBEIRO, 2011, ANDRADE-LINARES, 2011; CHEN et al., 2010; YUAN et al., 2010; JUMPPONEN et al 1998; HASELWANDTER & READ 1982). Os fungos *dark septate* foram primeiramente descritos por Melin (1923 apud REININGER, 2012), e o termo DSE foi eventualmente introduzido por Stoyke & Currah (1991). Os FEDS são ascomicetos, caracterizados por apresentarem pigmentação escura, hifas septadas e microescleródios (NEWSHAM, 2011; UPSON & NEWSHAM, 2009, NEWSHAM, 2001; JUMPPONEN & TRAPPE, 1998). Os gêneros *Phialophora* e *Phialocephala* parecem constituir o principal subgrupo de FEDS e as espécies do gênero *Phialophora* são encontradas vivendo normalmente em raízes de plantas herbáceas, particularmente em gramíneas, enquanto o gênero *Phialocephala* é encontrado colonizando espécies vegetais pertencentes a diversas famílias (SIEBER, 2002, apud YUAN et al., 2010).

Os fungos *dark septate* habitam frequentemente solos oligotróficos e normalmente colonizam raízes de diversas espécies de plantas em ambientes temperados e tropicais (SHARMA & JHA, 2012). Em geral, os FEDS não são biotróficos obrigatórios, sendo facilmente cultivados e multiplicados em meio de cultura, o que lhes conferem grande vantagem sobre os outros fungos como os micorrízicos (JUMPPONEN & TRAPPE, 1998; YUAN et al., 2011; PEREIRA et al., 2011). Este fato confere agilidade e rapidez para isolamento e estudos do potencial destes fungos como promotores de crescimento vegetal (RIBEIRO, 2011).

Dentre as plantas herbáceas, o arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal mais cultivado e consumido no mundo (SILVA et al., 2007) e, o cultivo de tomate tem aumentado mundialmente devido ao desenvolvimento de cultivares que se adaptam as condições mais adversas (ANDRADE-LINARES, et al., 2011) e devido as propriedades do seu fruto comestível que é uma importante fonte de flavonóides, carotenóides, vitaminas e minerais (GUIL-GUERRERO & REBOLLOSO-FUENTES, 2009). O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz e tomate com uma produção em torno de 11,5 e 4,0 milhões de toneladas respectivamente (CONAB, 2012, IBGE, 2011).

A literatura vem mostrando que os fungos *dark septate* atuam principalmente na promoção de crescimento vegetal de forma indireta e direta. Indiretamente atuam principalmente protegendo a planta contra estresses bióticos e abióticos que podem ser causados pela seca, salinidade, calor, altas concentrações de metais pesados entre outros e, diretamente supõe-se facilitação para absorção de nutrientes a partir de fontes orgânicas e inorgânicas quando estabelecida interação mutualística com o hospedeiro (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; REININGER, 2012; TELLENBACH & SIEBER, 2012; SHARMA & JHA, 2012 YUAN et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; ANDRADE-LINARES et al., 2011; USUKI & NARISAWA, 2007). A tolerância aos estresses abióticos e bióticos se tornou importante atualmente, devido principalmente ao aquecimento global e ao aumento da população mundial, no sentido em que apresenta uma alternativa para melhorar a produção em regiões com condições limitantes para a atividade agrícola.

A eficiência de absorção e utilização de nitrogênio (N) nas plantas pode ser otimizada quando estas estiverem em associação com fungos *dark septate*, em semelhança ao que ocorre com os FMAs, que aumentam o volume do solo explorado pelas raízes, utilizando sua rede micelial (CAMEL et al., 1991) e por outro lado, por modificações fisiológicas da planta ainda pouco estudadas (BERBARA et al., 1995). Neste sentido a seleção adequada de fungos *dark septate*, com potencial para promoção do crescimento vegetal pode representar uma estratégia agrônômica de pouco uso de fertilizantes, caminhando-se para agricultura sustentável que depende de uso mínimo de insumos.

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência dos fungos *dark septate* sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz e tomate, e como específicos:

- a) Caracterizar morfofisiologicamente isolados de fungos *dark septate*;
- b) Avaliar a influência de fungos *dark septate* na absorção de nutrientes em plantas de arroz e tomate e;
- c) Investigar a influência de fungos *dark septate* no crescimento de plantas de arroz e tomate.

Os dados obtidos neste estudo foram organizados em três capítulos. O capítulo I consistiu de ensaios *in vitro* de alteração de pH do meio BDA (ágar-batata-dextrose), crescimento dos isolados em diferentes pHs, solubilização de fosfato de cálcio e uso de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes por fungos *dark septate*. O capítulo II consistiu de experimentos conduzidos em câmara de crescimento com plantas de arroz (var. Piauí) inoculadas com isolados ERR 01, ERR 16, ERR 26 e ERR 42. O capítulo III consistiu de experimentos conduzidos também em câmara de crescimento cultivando-se plantas de tomate (cult. Santa Clara I – 5300) inoculadas com os mesmos isolados mencionados anteriormente.

2 CAPÍTULO I:

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE FUNGOS DARK SEPTATE

2.1. RESUMO

Os fungos *dark septate* atuam na promoção do crescimento vegetal, contudo as funções ecológicas destes fungos ainda permanecem obscuras. Este trabalho teve por objetivo caracterizar morfofisiologicamente isolados de fungos *dark septate*. Utilizando-se um delineamento de blocos casualizados, isolados de FEDS, obtidos de *Oryza glumaepatula*, foram caracterizados quanto a capacidade para alterar pH do meio BDA com azul de bromotimol, quanto ao crescimento em diferentes pHs (4, 5, 7 e 8), quanto a capacidade para solubilizar fosfato de cálcio e utilizar fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes. Os resultados mostraram que os fungos ERR 02 e ERR 04 alcalinizaram o meio e os demais o acidificaram. No teste com os diferentes pHs foi possível observar que o crescimento da maioria dos isolados foi influenciado pelas faixas de pH testadas, contudo o mesmo efeito não foi observado nos fungos ERR 02 e ERR 46. Com relação ao teste de solubilização de fosfato de cálcio, foi observado que nenhum dos isolados testado foi capaz de produzir o halo de solubilização ao redor da colônia fúngica. Foi possível observar ainda que o isolado ERR 04 desenvolveu-se melhor na presença de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes e que o isolado ERR 02 utilizou melhor o meio SHA (solução de Hoagland a ½ força iônica com 1% dextrose, agarizado com 1,5% de ágar) acrescido de nitrato de amônio ou de glicina, comparativamente aos demais isolados. O estudo mostra que a maioria dos isolados acidificam o meio e que apenas dois alcalinizam o meio e que os isolados ERR 02 e ERR 46 não são influenciados pelos diferentes pHs testados. Os resultados mostram ainda, que o extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) pode ser utilizado como fonte de nutrientes em meio de cultura para os FEDS e que o isolado ERR 04 é promissor para testes de avaliação da transferência de nutrientes da matéria orgânica para seu hospedeiro.

2.2. ABSTRACT

The DSE fungi act in promoting plant growth, however the ecological functions of these fungi remain obscure. This study aimed to morphological and physiological characterizes DSE isolates. Using a randomized block design, DSE isolates obtained from *Oryza glumaepatula* were characterized for their ability to change pH of the potato-dextrose-agar (PDA) medium with bromothymol blue, as growth at different pHs (4, 5, 7 and 8), for ability to solubilize calcium phosphate and using organic and /or inorganic nutrient sources. The results showed that the ERR 02 and ERR 04 fungi alkaline the medium and the other acidified. In the test with different pHs was possible observe that the growth of most strains was influenced by the pH ranges tested, however the same effect was not observed in the ERR 02 and ERR 46 fungi. With regard to calcium phosphate solubility test, it was observed that none of the tested strains was capable of producing the solubilization halo around the fungal colony. It was also possible to observe that the isolated ERR 04 developed better in the presence of organic and/or inorganic nutrients sources and isolate ERR 02 best used SHA medium plus ammonium nitrate or glycine compared to other. The study shows that most of the isolates acidify the medium and only two alkalize the middle and only the ERR 02 and ERR 46 isolates are not influenced by different pHs tested. The results also show that the extract of *Canavalia ensiformis* (L.) could be used as a source of nutrients in the culture medium for the DSE fungi and ERR 04 isolate is promising for testing the transfer of nutrients from organic matter to its host.

2.3. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse pela agricultura orgânica tem aumentado no mundo. Contudo apenas 0,9% das terras adotam o cultivo orgânico (WILLER et al., 2013). A reposição de nutrientes em campos orgânicos geralmente depende de adubação orgânica, como o emprego do esterco, adubação verde e restos culturais (REEVE et al., 2008). Os fungos endofíticos *dark septate* podem acessar e liberar nutrientes presentes nesses substratos, uma vez que são reconhecidos como promotores de crescimento de várias espécies vegetais (UPSON & NEWSHAM, 2009), em especial, por facilitarem absorção de nitrogênio em fontes orgânicas (DIENE et al., 2013; MAHMOUD & NARISAWA, 2013; NEWSHAM, 2011; USUKI & NARISAWA, 2007). Alguns trabalhos sugerem que os FDS sejam capazes de acessar compostos complexos de carbono, nitrogênio e fósforo (MANDYAN & JUMPPONEN, 2005) e transferirem nutrientes ao seu hospedeiro (MANDYAN, 2008), possivelmente pela produção de enzimas hidrolíticas que promovem a liberação dos nutrientes ou mesmo pela absorção de compostos orgânicos como aminoácidos e pequenos peptídeos (JUMPPONEN & TRAPPE, 1998).

Outras funções dos fungos *dark septate* tem sido relatadas, como a habilidade de proteger o hospedeiro contra danos causados por elevados níveis de acidez (POSTMA et al., 2007, DIENE et al., 2013). Solos ácidos são considerados bastante limitantes ao crescimento das plantas e podem comprometer a produção das culturas em até 70% nas terras agrícolas mundiais (FERNANDO et al., 1996; HAUG, 1983). Para melhorar estas condições dos solos ácidos, a calagem é frequentemente utilizada, mas não é uma prática sustentável (DIENE et al., 2013), além de comprometer a colonização dos fungos *dark septate* no hospedeiro (RUOTSALAINEN & ESKELINEN, 2011), por serem sensíveis aos aumentos de pH (SHARMA & JHA, 2012; RUOTSALAINEN & ESKELINEN, 2011; POSTMA, 2007). Contudo nos solos ácidos os problemas de fixação de fósforo são ocasionados pelas reações de adsorção específicas e precipitação do fósforo com alumínio, ferro e cálcio principalmente (SPOSITO, 2008).

Neste sentido, é possível hipotetizar, que para os agrossistemas tropicais seria de grande valia a constatação da capacidade de solubilização de fosfatos por fungos *dark septate*. Este capítulo teve como objetivo caracterizar morfofisiologicamente os isolados de fungos *dark septate*.

2.4. REVISÃO DE LITERATURA

Os fungos endofíticos *dark septate* constituem um grupo fúngico parafilético (YUAN et al., 2011) com ampla distribuição geográfica e, são frequentemente encontrado em ambientes estressantes, como solos oligotróficos e inclui espécies comuns do solo como saprofíticos e simbióticos (JUMPPONEN & TRAPPE 2005; BARROW & AALTONEN, 2001). A presença dos FEDS pode ser observada em plantas oriundas dos mais variados ecossistemas como habitats árticos, antárticos, temperados, boreais e tropicais (SRAJ-KRZIC et al., 2006). Os FEDS são relatados como colonizadores de aproximadamente 600 espécies de plantas, tendo sido isolados de plantas não colonizadas por fungos micorrízicos e de plantas que formam simbiose micorrízica, do tipo arbuscular, ericóide, orquidóide e associações ectomicorrízicas (JUMPPONEN et al., 1998; ADDY et al., 2000). Apesar da sua ampla ocorrência, pouco se sabe sobre a diversidade taxonômica dos FEDS (USUKI & NARISAWA, 2007). Em áreas úmidas, com diferenças de pH e disponibilidade de fósforo, Fuchs & Haselwandter (2004) avaliaram a colonização de raízes de plantas das famílias de *Asteraceae*, *Droseraceae*, *Lamiaceae* e *Lycopodiaceae* por fungos formadores de micorrizas e fungos endofíticos *dark septate*. Estes autores observaram que as espécies *Serratula tinctoria* (*Asteraceae*) e *Betonica officinalis* (*Lamiaceae*) foram colonizadas regularmente por FEDS, tendo observado colonização em *Lycopodiella inundata* (*Lycopodiaceae*), embora tenha sido rara, sendo que nenhuma colonização foi constatada em *Drosera intermedia* (*Droseraceae*). A presença de espécies de FEDS como *Phialocephala* spp., *P. dimorphospora* e *P. scopiformis* tem sido observada tanto em partes vivas quanto em partes mortas de plantas de *Betula pendula* e *Pinus sylvestris* (MENKIS et al., 2004). Foi observado que a aplicação de esterco de animais sobre pastagens favorecem a redução da colonização por FMA, mais aumenta significativamente a colonização por FEDS (CHRISTIE & KILPATRICK, 1992).

A coexistência de FEDS e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem sido relatada em espécies de plantas medicinais, macrófitas aquáticas e espécies de plantas nativas do cerrado de Minas Gerais (MARINS, et al., 2009). A colonização de raízes de plantas por FEDS pode ser tão alta quanto à colonização por FMA e pode variar durante o período de crescimento de plantas ao longo dos meses, sendo que em alguns meses a colonização por FEDS pode até ser maior que a dos FMA (MANDYAM & JUMPPONEN, 2008). Em trabalho realizado em três pântanos em Nova York, Weishampel & Bedford (2006), avaliaram a presença de FEDS e FMA em comunidades de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas típicas dessas regiões. A colonização micorrízica arbuscular foi maior em dicotiledôneas do que em monocotiledôneas, sendo o percentual de colonização de 60% e 15%, respectivamente, enquanto a colonização por FEDS foi de 25% em monocotiledônea e de 10% em plantas dicotiledôneas. A determinação da porcentagem de colonização por FMA e FEDS também foi realizada em plantas hidrófitas de córregos e lagos no sudoeste da China (KAI & ZHIWEI, 2006).

Muitos aspectos das funções ecológicas dos fungos *dark septate* ainda permanecem obscuras, contudo, estudos indicam que a promoção do crescimento pode se dar tanto de forma indireta, através da proteção da planta a estresses abióticos, quanto direta pela facilitação de absorção de nutrientes, principalmente a partir de fontes orgânicas (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; REININGER, 2012; TELLENBACH & SIEBER, 2012; SHARMA & JHA, 2012; WAGG et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; ANDRADE-LINARES et al., 2011; YUAN et al., 2010; USUKI & NARISAWA, 2007). Em experimentos realizados em ambientes controlados, os FEDS apresentaram efeitos positivos quando inoculados nas plantas, favorecendo o crescimento das mesmas (NEWSHAM, 2011).

Contudo, apresentaram diferenças entre o tratamento com e sem inoculação quando a maioria de N foi suplementada a partir de fontes orgânicas, não havendo diferenças quando se utilizou fontes inorgânicas de N (NEWSHAM, 2011). Em estudo realizado *in vitro* no Japão, foram avaliadas sete fontes de N, nomeadamente glutamina, glicina, leucina, fenilalanina, valina, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na espécie de FEDS, *Heteroconium chaetospira* em meio ágar basal e observou-se aumento significativo na massa seca do fungo nos meios modificados com fontes orgânicas de N, comparativamente ao meio suplementado com nitrato de amônio ou sem N (USUKI & NARISAWA, 2007). Em seguida os autores, inocularam o fungo em plantas de repolho chinês suplementadas com as mesmas fontes de N e observaram que a inoculação promoveu a utilização de todos os aminoácidos e de nitrato de sódio (NaNO_3), com efeitos significativos no crescimento da planta.

Dentre os estresses abióticos, a literatura tem relatada a habilidade de FEDS em proteger seu hospedeiro contra elevados níveis de acidez (DIENE et al., 2013; POSTMA et al., 2007). Recentemente, um estudo sobre a tolerância de plantas de repolho chinês inoculadas por FEDS a baixos níveis de pH foi relatado (DIENE et al., 2013). Nele foi mostrado que no pH 3, classificado como ultra-ácido, as plantas inoculadas com *Pseudosigmoidea ibarakiensis* apresentaram incremento de 92% na biomassa, comparativamente ao tratamento controle não inoculado.

Nos agrossistemas tropicais, onde predominam solos ácidos, naturalmente ocorrem problemas de fixação de fósforo e, é neste contexto que os microrganismos solubilizadores de fosfatos ganham destaque na ciência. Grande diversidade de microrganismos pode solubilizar fosfatos insolúveis presentes no solo. Contudo os estudos com as bactérias estão mais avançados. Na literatura, há relatos de bactérias solubilizadoras de fosfatos pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* (MARRA et al., 2011) e *Rhizobium* (TORRES-JUNIOR et al., 2014), apesar de apresentarem baixa eficiência de solubilização. O mecanismo que melhor explica a solubilização de fosfatos é a exsudação de ácidos orgânicos (MARRA et al., 2012). As bactérias da espécie *Pseudomonas fluorescens* são outro grupo de solubilizadores de fosfatos insolúveis (DIAS et al., 2013). Com o propósito de selecionar isolados do gênero *Pseudomonas* para serem utilizadas como promotores de crescimento na couve, Dias et al. (2013) avaliaram a capacidade de solubilização de CaPO_4 por 78 isolados e observaram que 59 bactérias foram capazes de solubilizar CaPO_4 . No entanto, a capacidade de promoção de crescimento destas bactérias em casa de vegetação não esteve associada à maior capacidade de solubilizar o CaPO_4 . Os estudos de solubilização de fosfatos insolúveis envolvendo os FEDS são escassos na literatura. Contudo isolados fúngicos dos gêneros *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus*, pertencentes a outros grupos fúngicos têm sido apontados como solubilizadores de fosfato de cálcio, mas não como solubilizadores de fosfato de ferro (SILVA FILHO & VIDOR 2000).

A elucidação de funções ecológicas de FEDS pode ser dependente de estudos básicos, como os da caracterização destes fungos em condições *in vitro*, em semelhança ao que foi feito para os rizóbios (TORRES-JUNIOR et al., 2014, MARTINS et al., 1997, LEITE et al., 2009), uma vez que a literatura dispõe de poucas informações sobre os FEDS. Neste sentido, a pré-seleção de um FEDS com potencial biotecnológico, pode depender da avaliação do crescimento micelial e massa deste fungo em meios de cultivo com diferentes pHs, em meios com fontes orgânicas e inorgânicas de nutrientes, assim como, da avaliação da capacidade de alterar o pH do meio BDA e de solubilizar fosfatos insolúveis.

2.5. MATERIAL E MÉTODOS

2.5.1 Crescimento de fungos *dark septate* em diferentes faixas de pH e alteração do pH do meio de cultivo

Treze isolados de FEDS obtidos *Oryza glumaepatula*, da coleção de culturas de microrganismos multifuncionais da Embrapa Roraima foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em diferentes pHs (4;5;7 e 8) e quanto à alteração de pH do meio de cultivo causado pelos fungos. O ajuste de pH foi feito utilizando KOH e HCl. Discos de micélios (aproximadamente 6 mm de diâmetro) de fungos previamente crescidos por sete dias no meio ágar-batata-dextrose (BDA), foram retirados e transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio BDA com diferentes pHs ou para o meio BDA com azul de bromotimol. Os ensaios foram avaliados em delineamento de blocos casualizados com três repetições. Para observar alteração de pH do meio do cultivo, o azul de bromotimol foi adicionado ao meio BDA e ajustou-se o pH para 6,8. As placas de Petri foram incubadas por até doze dias. A avaliação do crescimento dos fungos em diferentes faixas de pH, foi feita aos 6 dias após a inoculação dos fungos, medindo-se o diâmetro das colônias fúngicas usando um paquímetro digital. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2003). A característica de alteração do pH foi observada através da mudança de coloração do meio de cultivo, sendo que a coloração amarela e azul identificaram fungos que alteraram o pH do meio para pH ácido e alcalino, respectivamente. Foi utilizado o sinal positivo (+) para representar a alteração do pH neutro para ácido ou alcalino.

2.5.2 Teste solubilização de fosfato de cálcio

Os mesmos isolados avaliados no item anterior (2.5.1) foram avaliados quanto à capacidade para solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*. Os fungos foram previamente crescidos em placas de Petri contendo o meio BDA a 28 °C por sete dias. Em seguida, discos de micélios (aproximadamente 6 mm de diâmetro) de cada isolado, foram retirados e transferidos para o centro de placas de Petri contendo 20 ml de meio GL e incubadas a 28° C por até 12 dias. O meio GL foi preparado através da adição de 10g de glicose, 2 g extrato de levedura e 18g de ágar por litro de meio e o pH ajustado para 6,5 (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Após a esterilização e com temperatura de aproximadamente 50°C, foi adicionado, a 850 ml do meio, 50 ml de K₂HPO₄ (10%) e 100 ml de CaCl₂ (10%) para formação de precipitado insolúvel de CaHPO₄. Cada placa constituiu uma unidade experimental e foi avaliada em delineamento de blocos casualizados com três repetições. A presença de halo translúcido ao redor da colônia fúngica foi o critério utilizado para avaliar a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio. As observações foram feitas aos 3, 6, 9 e 12 dias. O crescimento dos fungos foi representado pelo sinal positivo (+) e ausência do halo de solubilização foi identificada pelo sinal negativo (-).

2.5.3 Avaliação do uso de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes por fungos *dark septate*

Um ensaio foi conduzido em delineamento de blocos casualizados em condições *in vitro* para avaliar a capacidade de uso de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes por doze isolados de FEDS obtidos de plantas de *Oryza glumaepatula* (RIBEIRO, 2011). Os isolados foram previamente crescidos em placas de Petri contendo o meio BDA a 28 °C por sete dias. Em seguida discos de micélios (aproximadamente 6 mm de diâmetro) foram retirados e transferidos para o centro de placas de Petri contendo os seguintes meios: 1) meio

SHA, contendo solução de Hoagland a ½ força iônica, agarizada com 1,5% de ágar e acrescido de 1% de dextrose; 2) meio SHA + aa, contendo meio SHA acrescido de fonte orgânica de N; 3) meio SHA + NI, composto de meio SHA acrescido de fonte inorgânica de N; 4) meio EV1%, contendo 1% de extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) agarizado com 1,5% de ágar; 5) meio EV1% + aa, composto de meio EV1% acrescido de fonte orgânico de N e; 6) meio EV1% + NI, composto de meio EV1% acrescido de fonte inorgânica de N. A glicina (aa) e o nitrato de amônio (NI) foram utilizadas como fontes orgânica e inorgânica de N. Nos meios que foram compostos basicamente por solução de Hoagland, a dextrose foi acrescida para servir de fonte de carbono. A glicina foi adicionada aos diferentes meios, quando os mesmos estavam com temperatura de 35-40 °C, tendo sido filtrada em membrana de Millipore. A proporção de N utilizada foi de 0,3% p/v. Os teores de nutrientes presentes no extrato vegetal e na solução de Hoagland estão representados na Tabela 1. Essas placas foram incubadas a 28 °C por até 12 dias. As plantas de *Canavalia ensiformis* foram cultivadas para fins de adubação verde e coletadas com aproximadamente 60-70 dias após germinação, na época de floração. O extrato vegetal que possui de 3-4% de N na sua constituição foi obtido pela moagem e pulverização da parte aérea seca das plantas (por 72h; 65 °C) e esterilização através de irradiação com raios gama (dose de 25 kgy). Foram realizadas observações aos 12 dias após a inoculação dos fungos. Mediu-se o diâmetro das colônias fúngicas usando um paquímetro digital e determinou-se a velocidade de crescimento micelial por meio da razão entre o diâmetro micelial e os respectivos dias de crescimentos (12 dias), retirando-se o diâmetro (6 mm) do disco utilizado para inoculação. Foi removida a colônia do meio de cultura utilizando-se uma espátula e a mesma foi colocada em recipiente de peso conhecido para a determinação do peso fresco da colônia fúngica. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2003).

Tabela 1. Teores de nutrientes presentes na solução de Hoagland modificada com metade da força iônica e no extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) (feijão de porco) agarizado.

Fonte	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Zn	Mn	B	C
	g.L ⁻¹						mg.L ⁻¹					%
Extrato vegetal	23,80	2,00	5,80	12,30	3,25	1,90	10,00	792,00	39,00	50,00	27,00	38,20
Solução de Hoagland 1/2 FI	0,23	0,03	0,06	0,02	0,02	0,02	0,01	0,06	0,03	0,32	0,26	1,00

FI: Força iônica.

2.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.6.1 Crescimento de fungos *dark septate* em diferentes faixas de pH e alteração de pH do meio de cultivo

Analisando a reação de pH do meio de cultivo dois fungos (ERR 02 e ERR 04) apresentaram a capacidade de alcalinizar o meio de cultivo e os demais acidificaram o meio BDA (Tabela 2, Figura 1).

Tabela 2. Alteração do pH do meio BDA com azul de bromotimol por fungos *dark septate*.

Fungos <i>dark septate</i>	pH do meio de cultivo aos 12 dias após a inoculação		
	Ácido	Neutro	Alcalino
ERR 01	+		
ERR 02			+
ERR 04			+
ERR 16	+		
ERR 26	+		
ERR 31	+		
ERR 32	+		
ERR 33	+		
ERR 42	+		
ERR 43	+		
ERR 44	+		
ERR 45	+		
ERR 46	+		

(+) Alteração de pH do meio para ácido ou alcalino.

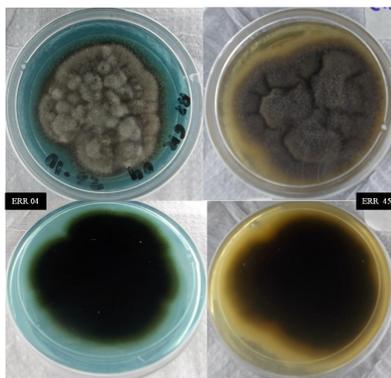


Figura 1. Alteração de pH do meio para alcalino e ácido pelos fungos ERR 04 e ERR 45.

Em geral, todos os isolados de FEDS testados cresceram no meio BDA sob todas as faixas de pHs (Tabela 3). As colônias fúngicas foram, de maneira geral, maiores no pH 7. Os fungos ERR 02 e ERR 46 não foram influenciados pelos diferentes pHs, o que é um indício de que estes fungos possuem mecanismos para se adaptarem a diferentes faixas de pHs. Cinco isolados (ERR 16, ERR 32, ERR 33, ERR 42 e ERR 43) mostraram seu melhor crescimento, somente quando o pH do meio BDA foi ajustado para 7. O fungo ERR 04 com capacidade para alcalinizar o meio e o fungo ERR 45 com capacidade para acidificar (Tabela 2) apresentaram o seu melhor crescimento no meio com pH ajustado para 8 (Tabela 3). O fungo ERR 26 cresceu melhor nos valores de pH acima de 5 e o fungo ERR 01 apresentou melhor crescimento com os pHs 4 e 7 (Tabela 3). Estes resultados mostram, que a maioria dos

isolados testados tiveram seu crescimento micelial afetado pelo pH. Os Fungos ERR 01, ERR 02 e ERR46, que na presença de acidez apresentaram maior crescimento micelial (Tabela 3), podem ser considerados como mais tolerantes à acidez. Estes resultados mostram, de maneira geral, uma vantagem ecológica dos fungos *dark septate* para adaptarem-se em ambientes com diferentes pHs.

Esta habilidade de crescimento dos FEDS em diferentes pHs em condições *in vitro*, abre a possibilidade de testes de avaliação da tolerância das interações plantas – FEDS a diferentes pHs. Recentemente, foi mostrado que no pH 3, classificado como ultra-ácido, as plantas de repolho chinês inoculadas com *Pseudosigmaidea ibarakiensis* sp. nov. apresentaram incremento de 92% na biomassa, comparativamente ao tratamento controle não inoculado (DIENTE et al., 2013). Numa condição de estresse abiótico mais acentuado, as interações planta – FEDS aparentemente aumentam (READ & HASELWANDTER, 1981).

Tabela 3. Diâmetro micelial (mm) de fungos *dark septate* em diferentes pHs.

Fungos endofíticos <i>dark septate</i>											
Ph	ERR 01	ERR 02	ERR 04	ERR 16	ERR 26	ERR 32	ERR 33	ERR 42	ERR 43	ERR45	ERR 46
6 Dias											
4,0	58,2A	38,6A	25,9B	39,7C	28,6B	46,6B	37,5B	45,9B	46,3B	42,6C	43,7 ^a
5,0	55,0B	39,3A	27,9B	44,5B	33,8A	47,4B	36,9B	50,2B	46,8B	41,6C	41,3 ^a
7,0	57,7A	41,7A	27,7B	48,7 ^a	38,2A	51,4A	42,5 ^a	54,1 ^a	52,7A	46,1B	40,7 ^a
8,0	54,2B	40,8A	32,0A	44,0B	36,0A	48,7B	35,7B	48,9B	49,2B	50,5A	40,4 ^a
CV(%)	4,8										

Letras iguais maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

2.6.2 Solubilização de fosfato de cálcio

Quanto à capacidade para solubilizar fosfato de cálcio, os treze isolados fúngicos testados cresceram, no entanto, nenhum produziu halo de solubilização no meio GL (Tabela 4). Neste estudo, apenas a glicose foi utilizada como fonte de carbono. Assim, a incapacidade para solubilizar fosfato de cálcio, pode ser atribuída à falta de atividade solubilizadora nos fungos testados ou ao fato de a glicose ser uma fonte inadequada para a expressão desta característica. Contudo, isolados fúngicos dos gêneros *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus*, pertencentes a outros grupos fúngicos têm sido apontados como solubilizadores de fosfato de cálcio, mas não como solubilizadores de fosfato de ferro (SILVA FILHO & VIDOR 2000). Na literatura, tem sido relatado que a fonte de carbono utilizada nos testes de solubilização de fosfatos *in vitro*, influencia a atividade solubilizadora em algumas bactérias e fungos (TORRES-JÚNIOR et al., 2014; LEITE, 2011; OLIVEIRA, 2009; SILVA FILHO & VIDOR 2000). Em estudo *in vitro*, determinaram-se as concentrações de glicose, frutose, manitol e trealose na hifa de *Heteroconium chaetospora*, espécie de FEDS suplementada com glicose e foram encontrados maiores acúmulos de manitol e trealose na hifa (USUKI & NARISAWA 2007).

Tabela 4. Resposta de fungos *dark septate* á solubilização de fosfato de cálcio.

Fungos <i>dark septate</i>	Teste de solubilização de fosfato de cálcio				Halo
	Dias de crescimento				
	3	6	9	12	
ERR 01	+	+	+	+	-
ERR 02	+	+	+	+	-
ERR 04	+	+	+	+	-
ERR 16	+	+	+	+	-
ERR 26	+	+	+	+	-
ERR 31	+	+	+	+	-
ERR 32	+	+	+	+	-
ERR 33	+	+	+	+	-
ERR 42	+	+	+	+	-
ERR 43	+	+	+	+	-
ERR 44	+	+	+	+	-
ERR 45	+	+	+	+	-
ERR 46	+	+	+	+	-

(+) Foi observado o crescimento da colônia fúngica. (-) Ausência do halo translúcido ao redor da colônia.

2.6.3 Uso de fontes orgânicas e/ou inorgânica de nutrientes por fungos *dark septate*

Na interação meio *versus* isolado, houve diferenças significativas para a velocidade de crescimento micelial, diâmetro micelial e massa da colônia fúngica (Anexo A). Todos os isolados fúngicos testados, apresentaram crescimento micelial em todos os meios utilizados (Tabela 5 e Figura 2). A massa da colônia fúngica do fungo ERR 02, aumentou significativamente nos meios SHA+NI e SHA+aa, enquanto que a do ERR 44 aumentou apenas no SHA+NI, comparativamente a massa da colônia observada nos demais meios (Tabela 5). Entre os meios testados, o fungo ERR 04 apresentou maior massa fresca da colônia no meio EV1%+NI. A massa da colônia fresca do fungo ERR 46, aumentou significativamente nos meios SHA+NI, SHA+aa, EV1%+NI e EV1%+aa, comparativamente aos meios SHA e EV1%, ambos sem suplementação com glicina ou nitrato de amônio. No meio SHA+NI, os isolados ERR 02 e ERR 44 apresentaram maior massa da colônia comparativamente aos demais, mas diferiram no diâmetro micelial e velocidade de crescimento, uma vez que o isolado ERR 02 apresentou valores menores que os observados no ERR 44. No meio SHA+aa, os isolados ERR 02 e ERR 04 apresentaram maior massa da colônia comparativamente aos demais, contudo diferiram no diâmetro micelial e velocidade de crescimento micelial, uma vez que o fungo ERR 02 apresentou valores maiores que os observados no ERR 04. O fungo ERR 04 destacou-se ainda, nos meios SHA, EV1%, EV1%+NI e EV1%+aa, pois apresentou maior massa da colônia, menor diâmetro micelial e velocidade de crescimento micelial que os demais isolados. A presença de qualquer das fontes de N parece não trazer benefícios no crescimento dos demais isolados, uma vez que apresentaram menor massa da colônia fúngica quando comparados aos isolados ERR 02, ERR 04 e ERR 44. Os resultados mostram a ocorrência de diferentes perfis de isolados quanto à habilidade para utilizar diferentes fontes de nutrientes.

Um estudo realizado *in vitro* avaliou a utilização de sete fontes de N, nomeadamente glutamina, glicina, leucina, fenilalanina, valina, NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄ na espécie de FDS, *Heteroconium chaetospora* em meio ágar basal (USUKI & NARISAWA, 2007). Os autores observaram aumento significativo na massa seca do fungo nos meios modificados com fontes orgânicas de N, comparativamente ao meio suplementado com nitrato de amônio ou sem N.

Neste estudo, o fungo ERR 04 utilizou melhor todos os meios com extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) e SHA acrescido de glicina, enquanto os isolados ERR 02 e ERR 44 utilizaram melhor o meio SHA acrescido de nitrato de amônio, sendo que o fungo ERR 02 ainda foi capaz de usar o meio SHA com glicina, comparativamente aos demais isolados.

O diâmetro micelial da colônia variou, de maneira geral, de três a seis centímetros (Tabela 5). Este diâmetro da colônia é similar àquele observado durante a identificação uma nova espécie de fungos *dark septate* (*Harpophora oryzae*), na China, que foi de 4,5 cm no meio BDA ou no meio ágar malte quando o fungo foi crescido durante sete dias sob uma temperatura de 25°C (YUAN et al., 2010).

A capacidade de crescimento dos FEDS em meio de cultura composto unicamente por material vegetal indica que os mesmos são capazes de utilizar fontes orgânicas de nutrientes, possivelmente pela produção de enzimas hidrolíticas para liberação dos nutrientes ou mesmo pela absorção de compostos orgânicos como aminoácidos (JUMPPONEN & TRAPPE, 1998). O fato dos FEDS produzirem uma variedade de enzimas extracelulares indica que estes apresentam potencial para acessar e transferir ao seu hospedeiro nutrientes essenciais, como nitrogênio (N) e fósforo (P) (MANDYAN, 2008). A espécie de FEDS, *Heteroconium chaetospira*, utilizou aminoácidos como sua fonte de carbono e N e quando foi inoculado nas plantas de repolho chinês facilitou absorção dessas fontes de N (USUKI & NARISAWA, 2007).

Os mecanismos para essa transferência de nutrientes podem ser semelhantes aos observados nas interações micorrízicas, onde hifas fúngicas absorvem N orgânico, como aminoácidos e pequenos peptídeos, bem como N inorgânico do solo e transferem às plantas através da interface fungo-planta (BERBARA et al., 2006).

Esta habilidade de crescimento em extrato vegetal dos FEDS abre a possibilidade de testes de avaliação da transferência de nutrientes diretamente da matéria orgânica para os vegetais mediada pelos fungos. Além disso, estes resultados mostram que os FEDS possuem potencial para serem utilizados como decompositores de matéria orgânica, uma vez que são conhecidos como saprofíticos, e podem atuar na absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos (MANDYAN & JUMPPONEN, 2005).

Os resultados sugerem ainda, que os FEDS estudados além de apresentarem caráter endofítico também possuem habilidade saprofítica (BARROW & AALTONEN, 2001; MANDYAN & JUMPPONEN, 2005), pois todos apresentaram crescimento quando o extrato de *Canavalia ensiformis* era a única fonte de nutrientes. Isso indica eventualmente, que estes microrganismos podem ter a habilidade de absorver os nutrientes da matéria orgânica e transferi-los para os vegetais.

O trabalho sugere ainda, a avaliação de diâmetro, velocidade e massa da colônia de isolados de FEDS para a melhor interpretação da capacidade do uso de nutrientes presentes num determinado meio de cultura, apesar da dificuldade de separação da colônia do meio de cultura para a determinação da sua massa.

Tabela 5. Massa fresca da colônia fúngica (mg), diâmetro micelial (mm) e velocidade de crescimento (mm dia⁻¹) de isolados de fungos endofíticos *dark septate* (FEDS), crescidos em meios de cultura a base de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes até aos 12 dias após a inoculação.

Meio de cultura	Fungos endofíticos <i>dark septate</i>											
	ERR 02	ERR 04	ERR 16	ERR 26	ERR 31	ERR 32	ERR 33	ERR 42	ERR 43	ERR 44	ERR 45	ERR 46
	Massa fresca da colônia fúngica (mg)											
SHA	60 Cb	950 Ca	40 Ab	100 Ab	90 Ab	40 Ab	90 Ab	50 Ab	60 Ab	50 Bb	40 Ab	50 Cb
SHA+NI	1270 Aa	860 Cb	90 Ac	160 Ac	230 Ac	110 Ac	180 Ac	130 Ac	150 Ac	1330 Aa	120 Ac	840 Ab
SHA +aa	1400 Aa	1140 Ba	110 Ac	180 Ac	190 Ac	180 Ac	210 Ac	90 Ac	170 Ac	40 Bc	110 Ac	710 Ab
EV1%	290 Cb	1470 Ba	90 Ab	90 Ab	210 Ab	50 Ab	90 Ab	110 Ab	80 Ab	230 Bb	90 Ab	460 Bb
EV1% + NI	530 Cc	1690 Aa	80 Ac	100 Ac	110 Ac	50 Ac	100 Ac	60 Ac	50 Ac	170 Bc	120 Ac	1040 Ab
EV1% + aa	350 Cc	1210 Ba	270 Ac	220 Ac	250 Ac	100 Ac	340 Ac	270 Ac	60 Ac	40 Bc	110 Ac	820 Ab
CV(%)	40,07											
	Diâmetro micelial (mm)											
SHA	52,4Ab	36,6Ac	60,8Aa	54,0Bb	60,8Aa							
SHA+NI	50,6Ab	26,9Bc	53,1Bb	60,8Aa	60,8Aa	54,3Bb	60,8Aa	60,8Aa	52,0Bb	60,8Aa	52,9Bb	60,8Aa
SHA +aa	53,3Ab	39,2Bc	55,6Bb	60,8Aa	60,8Aa	55,8Bb	60,8Aa	60,8Aa	55,1Bb	60,8Aa	53,2Bb	60,8Aa
EV1%	43,7Bb	38,8Bc	60,8Aa	60,8Aa	41,8Cb	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa
EV1%+NI	45,2Bb	39,6Bc	60,8Aa	60,8Aa	46,8Bb	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	48,9Bb	60,8Aa	60,8Aa
EV1%+aa	41,5Bc	34,7Bd	60,8Aa	60,8Aa	41,8Cc	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	60,8Aa	50,7Bb	51,9Bb	53,8Bb
CV (%)	4,42											
	Velocidade de crescimento (mm dia⁻¹)											
SHA	3,9Ab	2,6Ac	4,6Aa	4,0Bb	4,6Aa							
SHA+NI	3,7Ab	1,7Bc	3,9Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,0Bb	4,6Aa	4,6Aa	3,8Bb	4,6Aa	3,9Bb	4,6Aa
SHA +aa	3,9Ab	2,8Ac	4,1Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,2Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,1Bb	4,6Aa	3,9Bb	4,6Aa
EV1%	3,1Bb	2,7Ac	4,6Aa	4,6Aa	3,0Cb	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa
EV1%+NI	3,3Bb	2,8Ac	4,6Aa	4,6Aa	3,4Bb	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	3,6Bb	4,6Aa	4,6Aa
EV1%+aa	3,0Bc	2,4Ad	4,6Aa	4,6Aa	3,0Cc	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	4,6Aa	3,7Bb	3,8Bb	4,0Bb
CV (%)	4,97											

Letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. SHA: solução de Hoagland agarizada com 1,5% de ágar + 1% de dextrose; SHA+ NI: solução de Hoagland agarizada com 1,5% de ágar + 1% de dextrose + 0,3 % de N na forma de nitrato de amônio; SHA + aa: solução de Hoagland agarizada com 1,5% ágar + 1% de dextrose + 0,3 % de N na forma da glicina; EV1%: 1,5% de ágar + 1% de extrato vegetal de *Canavalia ensiformis* (L.) (feijão de porco); EV1% + NI: 1,5% de ágar + 1% de extrato vegetal de feijão de porco + 0,3 % de N na forma de nitrato de amônio; EV1% + aa: 1,5% de ágar + 1% de extrato vegetal de feijão de porco + 0,3 % de N na forma da glicina.

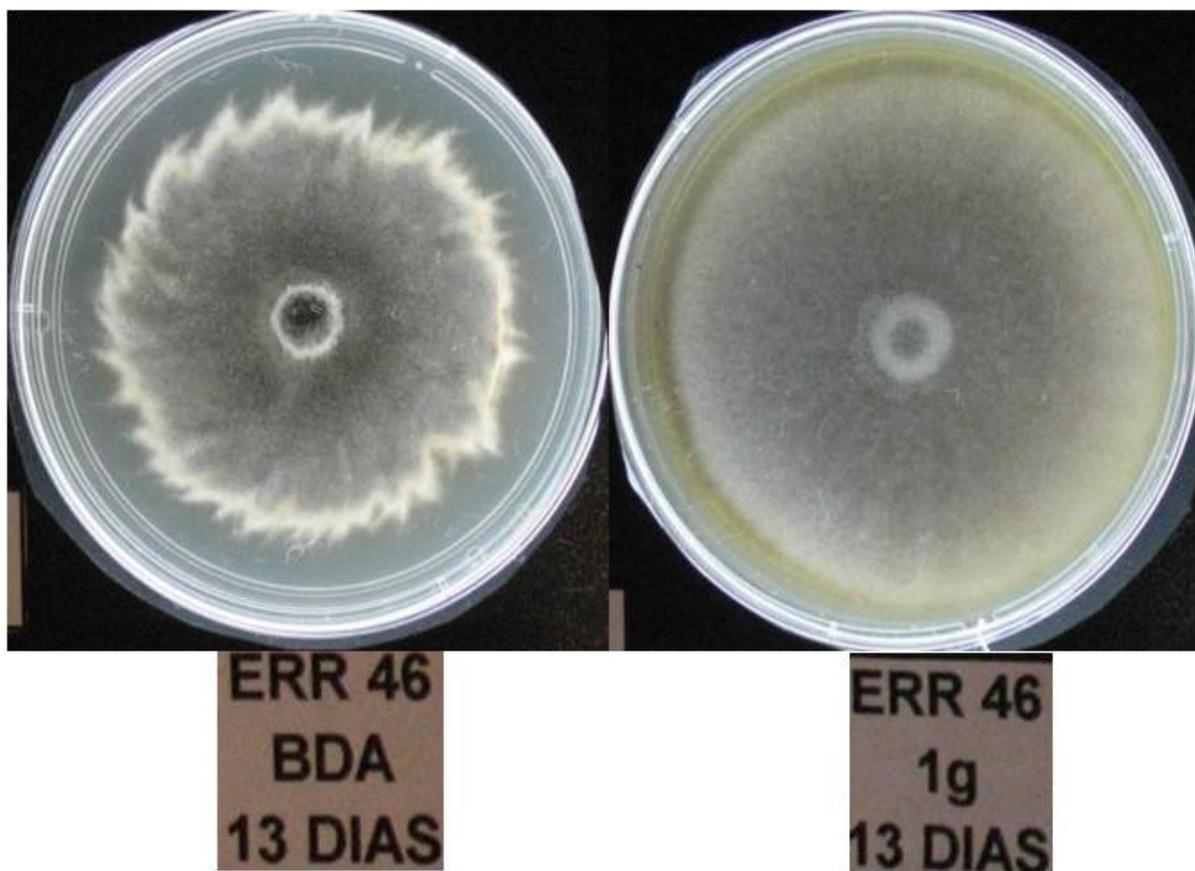


Figura 2. Crescimento micelial do isolado ERR 46 no meio BDA e meio com apenas extrato de *Canavalia ensiformis* (L.) (EV1%).

2.7. CONCLUSÕES

Todos os isolados cresceram nas faixas de pHs testadas. Os isolados ERR 02 e ERR 04 alcalinizam e os demais acidificam o meio BDA com azul de bromotimol. Nenhum isolado solubiliza fosfato de cálcio.

A utilização do extrato de *Canavalia ensiformis* pelos fungos *dark septate* indica que os mesmos possuem habilidade saprofítica.

O fungo ERR 04 utiliza melhor fontes orgânicas e inorgânicas de nutrientes e mostra-se promissor para testes de avaliação da transferência de nutrientes diretamente da matéria orgânica para o seu hospedeiro. O fungo ERR 02 utiliza melhor o meio SHA acrescido tanto de N inorgânico (nitrato de amônio) quanto de orgânico (glicina). O fungo ERR 44 utiliza melhor o meio SHA acrescido de nitrato de amônio.

3 CAPÍTULO II:

INFLUÊNCIA DOS FUNGOS DARK SEPTATE SOBRE ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ARROZ

3.1. RESUMO

O uso dos fungos *dark septate* como promotores de crescimento vegetal pode impulsionar a agricultura familiar e ser potente aliado na busca por uma agricultura sustentável. Este trabalho objetivou investigar a influência dos fungos *dark septate* sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz. Quatro isolados de FEDS (ERR 01; ERR 16; ERR 26 e ERR 42) obtidos de *Oryza Glumaepatula* foram inoculados em sementes de arroz (var. Piauí). As plantas foram crescidas em condições de câmara de crescimento por 35 dias. As plantas não inoculadas constituíram o tratamento controle. Foram obtidos os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_M , a partir do conteúdo de nitrato da solução nutritiva. Para viabilizar o estudo da cinética de absorção, um vaso foi adaptado, utilizando-se placas de Petri descartáveis e garrafa de vidro. Amostras de um grama de raiz, bainha e folha foram coletadas para a determinação dos teores de $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, N-amino livre e açúcares solúveis. Com o material restante da parte aérea, foi determinado o teor dos macronutrientes. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias, utilizando o teste de t ($p < 0.05$). As plantas inoculadas com os fungos ERR 16 e ERR 01 apresentaram um K_M menor, mostrando aumento da afinidade para a absorção de $N-NO_3^-$. Nas plantas inoculadas com o fungo ERR 16 foram observados ainda, incrementos no conteúdo de N-amino, açúcares solúveis, nos conteúdos de N, P, K, Mg e S, na massa fresca e seca de raiz e parte aérea, na altura e no número de perfilhos por planta, comparativamente ao controle. O isolado ERR 16 seguramente apresenta potencial para a promoção do crescimento vegetal do arroz.

3.2. ABSTRACT

The use of dark septate endophytes fungi as plant growth promoters can drive the family farm and being powerful ally in the quest for sustainable agriculture. This study aimed to investigate the influence of DSE on nutrient uptake and growth of rice plants. Four isolates of DSE (ERR 01; ERR 16; ERR26 e ERR42) obtained from *Oryza glumaepatula* were inoculated in rice seeds (var. Piauí). The plants were grown under growth chamber conditions for 35 days. Non-inoculated plants constituted the control treatment. Kinetic parameters, V_{max} and K_M were obtained from the nitrate content in the nutrient solution. To facilitate the study of the absorption kinetics, one vessel was adapted, using disposable Petri dishes and glass bottles. Samples of one gram of root, leaf and sheath were collected to determine the levels of NO_3^- -N, NH_4^+ - N, free amino-N and soluble sugars. With the remaining material from the shoot, we determined the content of macronutrients. Data were subjected to analysis of variance and mean comparison test using the t ($p < 0.05$). Plants inoculated with ERR 01 and ERR 16 fungi had a lower K_M , showing increased affinity for the absorption of NO_3^- -N. In plants inoculated with the fungus ERR 16 were still observed, increases in free amino-N, soluble sugars, N, P, K, Mg and S contents, fresh and dry weight of roots and shoots, height and the number of tillers per plant, when compared to control. The isolated ERR 16 certainly has the potential to promote plant growth in rice.

3.3. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence ao gênero *Oryza* e a família Poaceae, (ROSA et al., 2006) tem com o centro de origem na Ásia, ocorrendo, entretanto outras espécies deste gênero em outros continentes (GRIST, 1975). O arroz é um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo (SILVA et al., 2007), sendo o Brasil nono maior produtor mundial com uma produção em torno de 11.500 mil toneladas (CONAB, 2012). As principais regiões produtoras de arroz no Brasil estão no Centro-Sul.

O arroz pode estabelecer associações com microrganismos endofíticos, como aqueles conhecidos por fungos endofíticos *dark septate* (FEDS) que podem auxiliar o desenvolvimento dessa cultura (PEREIRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011, RIBEIRO 2011; YUAN et al., 2010).

Os fungos *dark septate* foram primeiramente descritos por Melin (1923 apud REININGER, 2012) e o termo *dark septate endophytes* (DSE) foi eventualmente introduzido por Stoyke & Currah (1991). Os FEDS são caracterizados por apresentarem pigmentação escura, hifas septadas e microescleródios que crescem inter e intracelularmente às células do córtex do vegetal, sem causar sintomas de doenças (NEWSHAM, 2011; UPSON & NEWSHAM, 2009; JUMPPONEN, 2001).

Em geral, os FEDS não são biotróficos obrigatórios, sendo facilmente cultivados e multiplicados em meio de cultura, o que lhes conferem grande vantagem sobre outros fungos como os micorrízicos (YUAN et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; JUMPONEM & TRAPPE, 1998). Este fato confere facilidade e rapidez para isolamento e estudos do potencial destes fungos como promotores de crescimento vegetal (RIBEIRO, 2011).

Os fungos *dark septate* habitam freqüentemente solos oligotróficos e normalmente colonizam raízes de diversas espécies de plantas em ambientes temperados e tropicais (SHARMA & JHA, 2012). A literatura vem mostrando que os fungos *dark septate* podem colonizar o sistema radicular de espécies arbóreas, (REININGER, 2012; TELLENBACH & SIEBER, 2012) de plantas medicinais e aromáticas (SHARMA & JHA, 2012) e culturas altamente demandas pela população como arroz, tomate (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; PEREIRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; RIBEIRO, 2011; ANDRADE-LINARES et al., 2011; YUAN et al., 2010). Nesses estudos têm se mostrado que os fungos *dark septate* atuam na promoção de crescimento vegetal principalmente por facilitarem a absorção de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio.

Dentre os elementos minerais essenciais para as plantas, o nitrogênio ocupa posição de destaque (REIS et al., 2006), sendo encontrado no solo em diversas formas, entre elas o NO_3^- principal forma de N em solos aerados (VON WIRÉN et al., 1978). Por ser requerido em maiores quantidades e ter alta mobilidade no solo, esse nutriente deve ser repostado em maiores quantidades na maioria das culturas para se alcançar produtividade desejada (CANTARELLA et al., 2008; SOUZA & FERNANDES, 2006; WILLIAMS & MILLER, 2001).

A eficiência de absorção e utilização de N nas plantas pode ser otimizada quando estas estiverem em associação com fungos *dark septate*, em semelhança ao que ocorre com os FMAs, que aumentam o volume do solo explorado pelas raízes, utilizando sua rede micelial (CAMEL et al., 1991) e por outro lado, por modificações fisiológicas da planta ainda pouco estudadas (BERBARA et al., 1995). Neste sentido, a seleção adequada de fungos *dark septate*, com potencial para o aumento da produção da planta pode representar uma prática agrícola com uso controlado de fertilizantes, buscando uma agricultura sustentável que pouco dependente de insumos. Propõe-se nesse estudo investigar a influência dos fungos *dark septate* sobre absorção de nutrientes e crescimento das plantas de arroz.

3.4. REVISÃO DE LITERATURA

3.4.1 Promoção de crescimento vegetal

Na rizosfera existe uma ampla diversidade de microrganismos que podem acarretar benefícios à planta, de forma direta ou indireta, resultando na promoção do crescimento do vegetal. As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) são parte desse grupo de microrganismos. A maioria dos pesquisadores vem propondo como mecanismos de ação das RPCPs, a produção de fitormônios, o controle biológico de fitopatógenos e a fixação assimbiótica ou a interferência na Fixação biológica do nitrogênio (FBN) (FREITAS et al., 2008).

Os fitormônios melhoram o desenvolvimento da planta de forma direta. O *Azospirillum ssp*, além de ser reconhecido pela capacidade de fixação de nitrogênio, secreta fitormônios, como as auxinas, citocininas e giberelina (STEENHOUDT, 2000).

O controle biológico de fitopatógenos por rizobactérias fundamenta-se em diferentes mecanismos como, a competição por nutrientes, exclusão de nicho, a indução de resistência sistêmica e a produção de antibióticos (FREITAS et al., 2008). A maioria das estirpes que vêm sendo identificadas como agentes de biocontrole de fitopatógenos são pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* (STOHL, 1999), *Streptomyces* e *Bacillus* (BANGERA & THOMASHOW, 1999). A indisponibilização de nutriente a fitopatógenos, através da produção de sideróforos, molécula quelante do íon férrico, cuja complexação ocorre em condições de deficiência de ferro, é um dos mecanismos atribuídos a bactérias do grupo *Pseudomonas* (KLOEPPER et al., 1980) principalmente àquelas do grupo fluorescentes. O principal mecanismo que explica o biocontrole de fitopatógenos por bactérias do gênero *Bacillus*, é a produção de antiobióticos (FREITAS et al., 2008).

Outro mecanismo de promoção de crescimento vegetal de grande importância nos nossos agrossistemas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo este, que foi muito bem sucedido na cultura da soja. A bioprospecção de isolados de rizóbios com capacidade para suprir a demanda por nitrogênio de diversas culturas como a do amendoimzeiro (TORRES-JÚNIOR et al., 2014; LYRA et al., 2013; BORGES et al., 2007; SANTOS et al., 2005), de mucuna (LIMA et al., 2012), feijão-caupi (LEITE et al., 2009), guandu (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012) jacatupé (FREITAS et al., 2007) tem sido, por exemplo, realizados no Brasil, contribuindo-se assim para a promoção do crescimento vegetal. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o mecanismo de promoção do crescimento vegetal mais bem estudado e utilizado mundialmente, contudo outros mecanismos realizados por microrganismos que não são bactérias diazotróficas têm despertado atenção pelo seu potencial.

Os fungos *dark septate* têm sido identificados como promotores do crescimento de várias espécies vegetais (UPSON & NEWSHAM, 2009). Alguns autores têm mostrado que os FEDS são capazes de estabelecer associações mutualísticas com seu hospedeiro, semelhante aos fungos micorrízicos; atuando como promotores do crescimento vegetal, principalmente por facilitarem a absorção de nutrientes como o nitrogênio (CHEN et al., 2010; USUKI & NARISAWA, 2007) ou pela produção de enzimas extracelulares capazes de hidrolisar compostos complexos de carbono, nitrogênio e fósforo (MANDYAM & JUMPPONEN, 2005). Os estudos sobre as micorrizas estão bastante avançados quando comparados àquelas da associação entre os FEDS e o seu hospedeiro. Na simbiose micorriza, o fungo recebe da planta, mais de 10% dos fotossintatos (CAVALCANTE et al., 2009) que são necessários para seu o crescimento e a reprodução (SOUZA et al., 2008). Por outro lado, o fungo promove uma melhoria no estado nutricional da planta, principalmente através do

micélio extra-radicular, que absorve nutrientes, em particular o fósforo, que se encontram nas áreas além da zona de depleção e são translocados e disponibilizados nas células do córtex de raízes do hospedeiro (MIYASAKA & HABTE, 2001; SMITH & READ, 1997). O estabelecimento da simbiose micorrizica, favorece aumento da resistência da planta a estresses bióticos e abióticos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; JEFFRIES et al., 2003). No solo, essa simbiose contribui para formação e estabilidade dos agregados através da ação física do micélio fúngico e da glomalina, uma glicoproteína produzida por estes fungos (RILLIG & MUMMEY, 2006; WRIGHT & UPADHYAYA, 1998, 1996). Adicionalmente colabora na mitigação do efeito estufa através do seqüestro e acumulação do CO₂ (SOUZA et al., 2008).

3.4.2 Interação planta – fungos endofíticos *dark septate*

A capacidade de FEDS em promover o crescimento vegetal vem chamando a atenção pelo seu potencial para diversos vegetais, como coníferas, gramíneas, crucíferas, solanáceas, entre outras (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; ZHANG et al., 2012; RIBEIRO, 2011, ANDRADE-LINARES, 2011; CHEN et al., 2010; YUAN et al., 2010; JUMPPONEN et al 1998; HASELWANDTER & READ 1982). No Brasil, estudos recentes mostram ocorrência de fungos *dark septate* em raízes saudáveis de *Oryza glumaepatula*, que apresentam também capacidade para colonizar *Oryza sativa* L. sem causar sintomas de doenças, inclusive, contribuindo para maior desenvolvimento do sistema radicular (PEREIRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011, RIBEIRO, 2011). Na China, foi identificada uma nova espécie de fungos *dark septate* (*Harpophora oryzae*) em raízes saudáveis de *Oryza granulata*, que promoveu o crescimento e formação de biomassa de *Oryza sativa* L., sem desencadear sintomas de doenças (YUAN et al., 2010). NEWSHAM (2011) realizou uma meta-análise com 18 estudos realizados independentemente avaliando a inoculação de FEDS em diferentes culturas, concluindo que a inoculação elevou os conteúdos de N, P e biomassa vegetal de 26 a 103%.

3.4.3 Sistemas de absorção do nitrato e parâmetros cinéticos em plantas

As plantas têm dois sistemas para absorção NO₃⁻ de acordo com a afinidade dos seus transportadores: o sistema de transporte de baixa afinidade (LATS) que opera em concentrações do meio externo acima de 1mM e que é codificado pelos genes da família NRT1; e o sistema de transporte de alta afinidade (HATS) que atua em concentrações do meio externo abaixo de 1mM e que é codificado pelos genes da família dos NRT2 (SANTOS et al., 2011). Nas raízes das plantas, a absorção de NO₃⁻, ocorre através de um processo ativo via simporte com dois prótons (NO₃⁻/2H⁺) (THIBAUD & GRIGNON, 1981). A força protomotriz usada em simporte com NO₃⁻ é gerada pela H⁺-ATPase da plasmalema (PM H⁺-ATPase) (SONDERGAARD, et al., 2004; VONWIRÉN et al., 2000). A PM-H⁺-ATPase é uma bomba eletrogênica que hidrolisa o ATP para gerar o movimento do H⁺ em direção ao apoplasto (SPERANDIO et al., 2011). A extrusão do H⁺ pela H⁺-ATPase resulta em um gradiente de H⁺ e gera a força protomotriz, que energiza a absorção de ânions, tais como o NO₃⁻ (GAXIOLA et al., 2007).

Para avaliar-se a absorção de nutrientes em plantas são utilizados os seguintes parâmetros cinéticos: V_{máx}, K_M e C_{min} (COMETTI et al., 2006). V_{máx} (µmol de nutriente g⁻¹ de raiz h⁻¹) é quando todos os sítios de transporte estão ocupados, o que representa o máximo possível transporte do nutriente. K_M (µmol L⁻¹) é a concentração do nutriente, na qual o transportador atinge a metade da sua V_{máx}. O K_M é utilizado para determinar a afinidade do transportador pelo nutriente (SANTOS et al., 2011). Portanto, para menores valores do K_M, maior é afinidade do sistema do transporte (EPSTEIN & BLOOM, 2004). O C_{min} é a concentração do nutriente na solução do solo, na qual o influxo e efluxo líquido são iguais a

zero (SANTOS et al., 2011).

3.4.4 Absorção micelial e transferência de nutriente fungo – planta

A absorção de nutrientes no solo depende de vários fatores, entre eles, a mobilidade do íon no solo e a habilidade de absorção do sistema radicular (SILVEIRA & CARDOSO, 2004). A habilidade de absorção do sistema radicular é em parte, função da morfologia e fisiologia do sistema radicular, aspectos que são diretamente influenciados pelos microrganismos presentes na rizosfera, os quais podem manter um contato superficial ou viver dentro dos tecidos do hospedeiro (SILVEIRA & CARDOSO, 2004). Do ponto de vista nutricional, a importância dos fungos promotores de crescimento vegetal (fungos formadores de micorrizas e FEDS) está associada com absorção de nutrientes de baixa mobilidade no solo como Cu, Zn e P em particular (BERBARA et al., 2006; SILVEIRA & CARDOSO, 2004). Efeitos expressivos na promoção de crescimento vegetal acarretado pela simbiose micorrizica são mais evidentes em condições de baixa disponibilidade de fósforo, condições estas, que são comuns em solos tropicais (BERBARA et al., 2006; SILVEIRA & CARDOSO, 2004). Isto não significa que esses fungos não absorvam outros nutrientes como o N, por exemplo (BERBARA et al., 2006). Contudo, a planta é mais depende do fungo para a absorção do P que é limitante nos solos intemperizados, que para absorção de N, uma vez que este nutriente apresenta alta mobilidade no solo (BERBARA et al., 2006; GAMPER et al., 2004).

Nos fungos micorrízicos arbusculares, os mecanismos envolvidos na eficiência de absorção de nutrientes, estão associados com transposição da zona de depleção presente entre o solo e a raiz, que é gerada pela alta taxa de absorção e transporte de P através do sistema radicular; com o menor diâmetro dos seus micélios, permitindo que os fungos explorem locais no solo, inatingíveis pelas raízes (BERBARA et al., 2006). Adicionalmente, a literatura relata que a maior eficiência de absorção dos FMA é consequência de maiores sítios de transporte de P (maior $V_{máx}$) (SILVEIRA & CARDOSO, 2004; FAQUIN et al., 1990; KARUNARATNE et al., 1986) e que em baixas concentrações de nutrientes, essa eficiência é devido a maior afinidade dos transportadores do fungo e/ou daqueles transportadores da planta colonizados pelo fungo (menor K_M) (SILVEIRA & CARDOSO, 2004; CRESS et al. 1979).

A literatura relata que a transferência dos nutrientes entre os simbioses ocorre via apoplasto (RAUSCH et al., 2001), uma vez que não existe conexão simplástica entre a planta e o fungo (BERBARA et al., 2006). Assim, o fungo absorveria ativamente os nutrientes como o fosfato e nitrato através das hifas extra-radulares, podendo tanto acumulá-los (BERBARA et al., 2006; VIERECK et al., 2004; JOLICOEUR et al., 2002) como transferi-los através da plasmalema fúngica, ao apoplasto matricial (que separa a membrana dos dois simbioses), provavelmente de forma passiva (BERBARA et al., 2006). A passagem desses nutrientes da matriz fúngica ao apoplasto ocorreria através de canais ou transportadores iônicos (BERBARA et al., 2006). Finalmente, tais nutrientes seriam absorvidos ativamente pelas células corticais (contra o gradiente eletroquímico), graças a ação das bombas H^+ -ATPase, se efetivando a transferência de nutrientes ao hospedeiro (BERBARA et al., 2006). Em troca, a raiz exsudaria diversos carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos) que seriam hidrolizados pelas invertases presentes no apoplasto, em compostos que possam ser absorvidos pelos fungos como as hexoses (BERBARA et al., 2006). A infecção micorrizica aumenta a expressão das bombas H^+ -ATPase, uma vez que as invertases são pH dependentes (BLEE & ANDERSON, 2002). A transferência dos carboidratos através da plasmalema do hospedeiro ocorreria provavelmente de forma passiva ao apoplasto matricial (BERBARA et al., 2006). É provável que a absorção dos nutrientes no fungo seja estimulada pela exsudação dos carboidratos na raiz (BUCKING, 2004). Um estudo bastante interessante comprovou a transferência de carbono de plantas de repolho chinês para os fungos *dark septate*,

heteroconium chaestospira, mas não encontrou nenhuma evidência de como ocorre à transferência de nutrientes do fungo para a planta (USUKI & NARISAWA). Estes autores forneceram $^{13}\text{CO}_2$ às plantas em condições *in vitro* e determinaram por HLPC sacarose e manitol e observaram redução de sacarose associada ao acúmulo de manitol nas raízes colonizadas, enquanto no controle não inoculado, nenhum pico de manitol foi observado. Portanto, sugeriram que os fotossintatos, como a sacarose poderiam estar sendo transportados da folhagem da planta para o sistema radicular, onde seriam transferidos às células fúngicas, onde ocorreria a conversão da sacarose em manitol para ser estocada.

As pesquisas com os fungos *dark septate* foram mais expressivos na última década e mostraram, de maneira geral, que os FEDS podem contribuir no crescimento das plantas através da absorção e transferência de nutrientes como nitrogênio, principalmente a partir de fontes orgânicas, quando estabelecida a interação mutualística (USUKI & NARISAWA et al., 2007). Além disso, outras pesquisas, apontam para a contribuição deste grupo de fungos na proteção de plantas contra estresses abióticos e bióticos, (LI et al., 2011; ANDRADE-LINARES et al., 2011) bem como, para aumento do teor de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II nas plantas (ZHANG et al., 2012), indicando que estes fungos podem melhorar a eficiência da atividade fotossintética do seu hospedeiro. E conseqüentemente, no presente trabalho, foi lançada a hipótese de que os fungos *dark septate* influenciam a absorção de nutrientes e crescimento de plantas de arroz. E, na busca por essa resposta e também para melhorar o entendimento das funções dos FEDS, frações nitrogenadas (N-NO_3^- , N-NH_4^+ , N-amino), açúcares solúveis, crescimento e parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M) da absorção de NO_3^- a partir de baixas concentrações deste ânion no meio externo, foram determinadas em plantas de arroz inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate* obtidos de plantas de *Oryza glumaepatula* (RIBEIRO, 2011).

3.5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os tratamentos foram constituídos por plantas de arroz cultivadas com e sem inoculação (controle) de isolados de fungos endofíticos *dark septate* em quatro repetições. Foram utilizadas sementes da variedade local de arroz Piauí, oriunda de cultivo com baixo uso de insumos no estado do Maranhão, Brasil, da coleção mantida no Laboratório de Nutrição de Plantas da UFRRJ. Foram utilizados os isolados fúngicos ERR 01, ERR 16, ERR 26 e ERR 42, obtidos de plantas de *Oryza glumaepatula* (RIBEIRO, 2011). Esses isolados fazem parte da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Roraima e foram selecionados a partir das sequências das regiões intergênicas, ITS1-5.8S-ITS2 (RIBEIRO, 2011). O experimento foi submetido a um fotoperíodo de 13h/11h (luz/escuro) com luminosidade de $384 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossinteticamente ativos), umidade relativa do ar de 50-60% e temperatura de 28°C/24°C.

O cultivo das sementes de arroz foi realizado sobre agar-água (concentração de 1%) contido em placas de Petri descartáveis esterilizadas adaptadas para viabilizar o crescimento micelial do fungo fora da solução nutritiva. Cada placa e sua respectiva tampa receberam quatro perfurações (cerca de 8 mm de diâmetro) equidistantes, sendo os furos da parte inferior vedados com fita adesiva para receber o agar-água previamente autoclavado (Figura 3). Para dar sustentação à placa de Petri que receberia as sementes, duas placas denominadas de tampa, também com quatro furos, foram dispostas por cima da primeira. O conjunto de placas foi vedado com fita adesiva de alta resistência (Figura 3). Esse conjunto foi exposto por 20 minutos sob o banho de luz ultravioleta em fluxo laminar a fim de eliminar possíveis contaminantes.

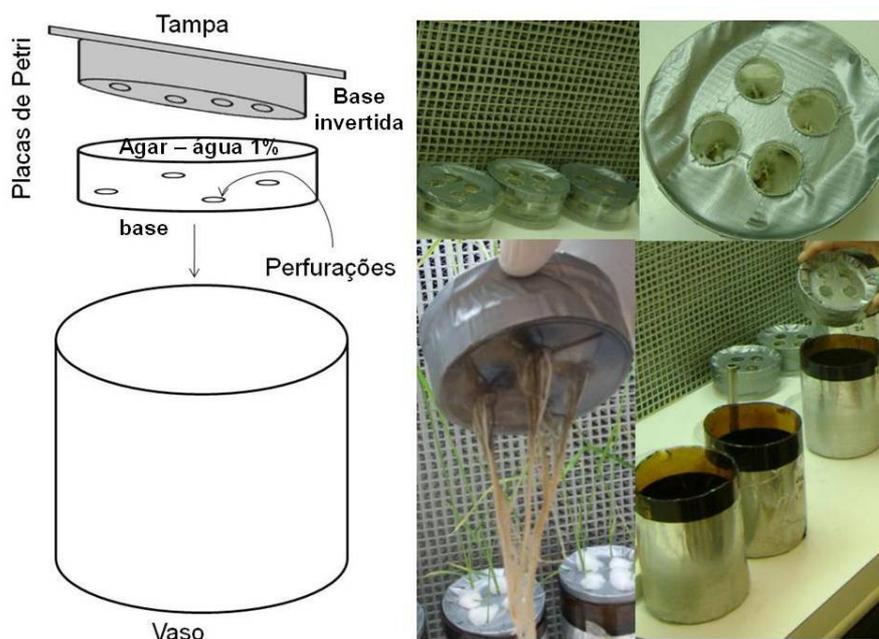


Figura 3. Vaso utilizado para estudo da cinética de absorção de N-NO_3^- em plantas de arroz (var. Piauí) inoculadas com fungos *dark septate*, submetidas a 0,5 mM de N-NO_3^- depois de 72 horas de privação deste nutriente.

Os isolados fúngicos foram previamente crescidos no meio BDA por sete dias à 28°C. No dia da semeadura, as sementes do arroz foram lavadas com álcool 70% por cinco minutos, desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos e em seguida lavadas dez vezes com água destilada autoclavada. As sementes foram microbiorizadas com o micélio fúngico (envolvidas por pequenos fragmentos de hifas, através da fricção da semente sobre micélio) e dispostas sobre o ágar-água nos locais perfurados da placa com a posição do embrião projetado para os furos da tampa. Adicionalmente, um disco de aproximadamente 8 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo foi disposto ao lado de cada semente para garantir o suprimento de inóculo. Após a semeadura as placas foram incubadas por três dias a 28 °C objetivando favorecer a germinação das plantas e o estabelecimento do fungo.

Decorrido este período, foram selecionadas quatro placas com plântulas uniformes, as quais foram acomodadas nos vasos de vidro contendo apenas água destilada autoclavada, os quais haviam sido previamente autoclavados por duas vezes (120 °C por 1 h com um intervalo de 24 h). Decorridos cinco dias, a água contida nos vasos foi substituída pela solução nutritiva modificada (HOAGLAND & ARNON, 1950) com um quarto da força iônica e com 1,5 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ utilizando KNO₃. Após três dias, substituiu-se essa solução por outra com meia força iônica, com 2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e 0,5 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺, utilizando Ca(NO₃)₂ e (NH₄)₂SO₄, respectivamente. Tal estratégia foi adotada, para se evitar o estresse salino às plântulas de arroz (FURLANI & FURLANI, 1988). Depois desse procedimento, a troca da solução com meia força iônica foi realizada a cada três dias.

Trinta e dois dias após a germinação (DAG), as plantas foram privadas de N-NO₃⁻ na solução nutritiva por um período de 72 horas para aumentar a capacidade de as raízes absorverem o elemento (LEE & RUDGE, 1986), e a partir de então foi aplicada uma solução nutritiva com 0,5 mmol L⁻¹ de NO₃⁻, utilizando-se KNO₃. Durante um período de 11 horas, foram feitas coletas a cada 30 minutos, retirando-se alíquotas de 0,5 mL de solução nutritiva de cada vaso com o objetivo de obter as curvas de depleção e os parâmetros cinéticos, V_{máx} e K_M (SANTOS et al., 2011; BAPTISTA et al., 2000). As amostras coletadas foram acondicionadas em microtubos e o conteúdo de NO₃⁻ determinado pelo método modificado de Miranda et al. (2008). O método foi modificado por Leilson, 2014. Os valores de V_{máx} e K_M foram determinados utilizando um método gráfico matemático proposto por COMETTI et al. (2006) com o programa CINETICWIN 1.0 (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Com esses valores estimou-se a taxa de influxo de nitrato utilizando a equação de Michaelis-Menten. Após as amostragens da solução nutritiva, as plantas foram coletadas e medido a altura da planta, comprimento das raízes e número de perfilhos. Foi determinada a massa fresca e seca de raízes e parte aérea. Amostras frescas de um grama de raiz, bainha e folha, foram homogeneizadas separadamente em etanol 80%, e após a partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984), a fração solúvel obtida, foi utilizada para a determinação dos teores de N-NO₃⁻ (MIRANDA et al., 2001, modificado), N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977), e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957). Com o material restante da parte aérea, foi determinado o teor dos macronutrientes (TEDESCO et al., 1983). Foi realizada a análise de variância e o teste de comparação de médias, utilizando o teste t (p < 0,05) por meio do software Sisvar (FERREIRA, 2003).

3.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Cinética de absorção de N-NO_3^-

Durante todo o período de condução do experimento não foram observados sintomas de doenças nas plantas de arroz (Figura 4), mesmo tendo-se observado a presença de estruturas de fungos *dark septate* no córtex de suas raízes (Figura 5), o que indicou compatibilidade da associação, sendo o resultado semelhante ao anteriormente observado para estes fungos por Ribeiro (2011).



Figura 4. Plantas de arroz (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

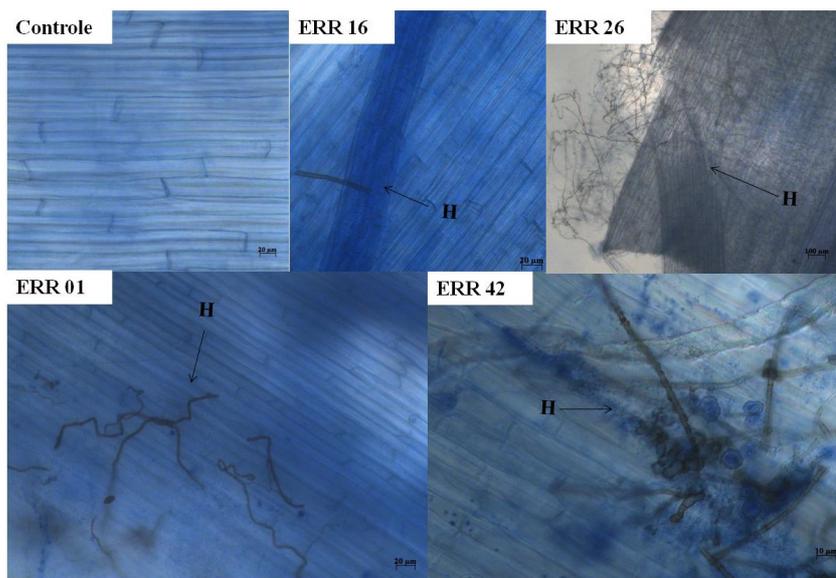


Figura 5. Colonização de raízes de arroz (var. Piauí) por diferentes isolados de fungos *dark septate* observada aos 35 DAG e o controle. Hifas melanizadas septadas (H).

A velocidade de esgotamento de nitrato obtida a partir da solução nutritiva mostra que a inoculação dos diferentes isolados de FEDS alterou a absorção de N-NO_3^- nas raízes das plantas de arroz (Figura 6).

No tratamento controle, até duas horas após o suprimento com 0,5 mM de N-NO_3^- , praticamente não houve absorção deste ânion na solução nutritiva (Figura 6). Efeito semelhante já foi observado na variedade Piauí e foi atribuído ao tempo necessário para indução dos transportadores de alta afinidade (SANTOS et al, 2011).

Com relação à capacidade de esgotar o nitrato da solução nutritiva, as plantas inoculadas com os isolados ERR 26 e ERR 42 apresentaram comportamento semelhante ao do tratamento controle (Figura 6). Por outro lado, na inoculação com ERR 01, houve aumento do consumo do nitrato, três horas após a reposição da solução nutritiva com 0,5 mmol L^{-1} desse ânion, enquanto na inoculação com ERR 16 o consumo foi mais rápido sete horas após a reposição da solução, comparativamente ao tratamento controle. Às 11 horas, o conteúdo de nitrato fornecido as plantas de arroz inoculadas com o isolado ERR 16, na dose de 0,5 mmol L^{-1} de N-NO_3^- , chegou à zero, enquanto as plantas não inoculadas aparentemente não conseguiram esgotar totalmente o conteúdo de nitrato na solução nutritiva (Figura 6).

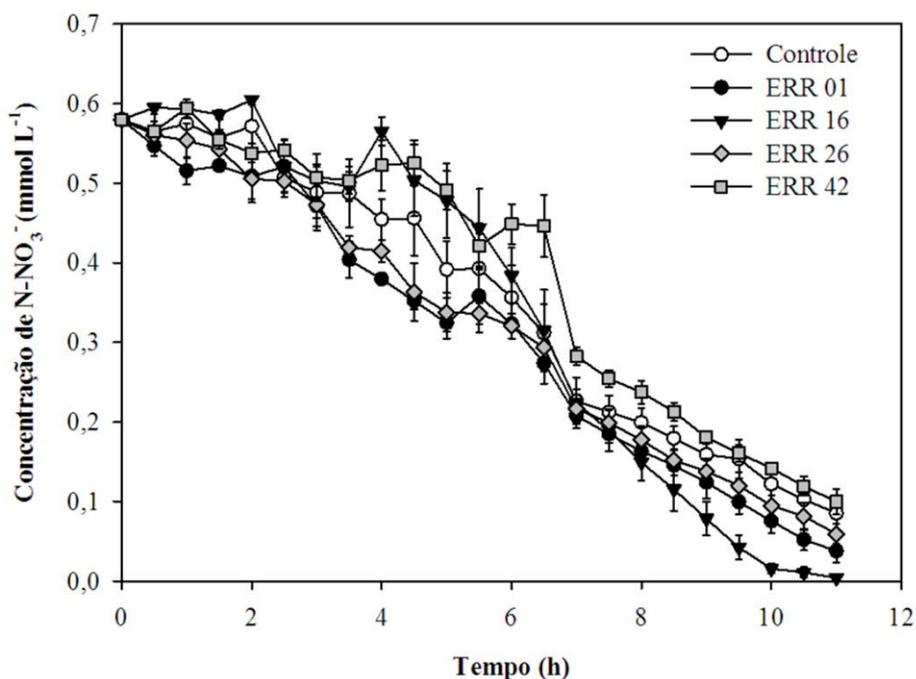


Figura 6. Depleção de N-NO_3^- na solução nutritiva por plantas de arroz (var. Piauí) inoculadas por fungos *dark septate*, submetidas a 0,5 mM de N-NO_3^- depois de 72 horas de privação deste nutriente.

Entre os parâmetros cinéticos de absorção de N-NO_3^- avaliados, apenas o K_M foi influenciado pela inoculação das plantas de arroz com diferentes isolados de FEDS (Tabela 6, Anexo B). As plantas inoculadas com os isolados ERR 01 e ERR 16 apresentaram valores de K_M menores quando comparadas ao controle, mas não diferiram entre si, enquanto os tratamentos de inoculação com ERR 26 e ERR 42 não diferiram significativamente entre si nem com relação ao controle.

Os menores valores de K_M estimados para os tratamentos com os fungos ERR 01 e ERR 16, cujos valores foram respectivamente 44% e 75% mais baixos quando comparados ao controle, indicam uma maior afinidade dos transportadores do fungo e/ou daqueles transportadores da planta colonizados pelo fungo para transportar o N-NO_3^- nas plantas de

arroz inoculadas com estes fungos, comparativamente ao controle e aos demais tratamentos. Esse comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 7, onde o influxo de N-NO_3^- , em concentrações mais baixas, é maior nas plantas inoculadas com os fungos ERR 01 e ERR 16 do que no controle e nos demais tratamentos de inoculação (não mostrado). A eficiência de absorção de fósforo em plantas colonizadas com FMA comparativamente ao controle não inoculado tem sido atribuída aos menores valores de K_M (SILVEIRA & CARDOSO, 2004; RAUSCH et al., 2001; CRESS et al., 1979).

A variação dos parâmetros cinéticos de absorção (K_M , $V_{\text{máx}}$ e C_{mim}), entre as espécies vegetais, esta relacionada à morfologia, fisiologia e ao desenvolvimento do sistema radicular, o que representa diferenças genótípicas para adaptação das plantas aos diferentes ecossistemas (BAPTISTA et al., 2000). Adicionalmente, a morfologia e fisiologia podem ser influenciadas pelos microrganismos presentes na rizosfera (SILVEIRA & CARDOSO, 2004), como por exemplo, os FEDS. Assim, pode-se supor, que a maior eficiência de absorção de nitrato, observada nas plantas colonizadas pelo fungo ERR 16, seja explicada pelos menores valores de K_M ocasionados pela presença deste fungo durante todo período de condução do experimento. A maior eficiência de aquisição de NO_3^- a partir de baixas concentrações no meio externo pode ser um indício da adaptação das plantas a condições de estresse nutricional, devido ao fluxo sazonal de NO_3^- em regiões tropicais (SANTOS et al., 2011).

A contribuição de fungos *dark septate*, *Heteroconium chaetospora*, na absorção de NO_3^- (NaNO_3^-), em plantas de repolho chinês colonizadas já foi documentada, utilizando-se membrana hidrofóbica a base de politetrafluoretileno (PTFE), que restringia a difusão e fluxo de massa de íons, o que ocasionou a morte da planta não inoculada e crescimento da planta com fungo, pelo fato de o sistema permitir apenas o contato íon-hifa (USUKI & NARISAWA, 2007).

Tabela 6. Parâmetros cinéticos K_M e $V_{\text{máx}}$ da absorção de NO_3^- determinados aos 35 DAG na variedade de arroz Piauí com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Controle	56,50	88,60 a
ERR 01	55,07	49,69 bc
ERR 16	46,84	21,96 c
ERR 26	60,64	76,37 ab
ERR 42	48,35	96,12 a
CV (%)	25,81	26,21

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t, $p < 0,05$). A variável com valores sem letra não foi significativa ao teste F a 5 % de probabilidade. DAG (dias após a germinação).

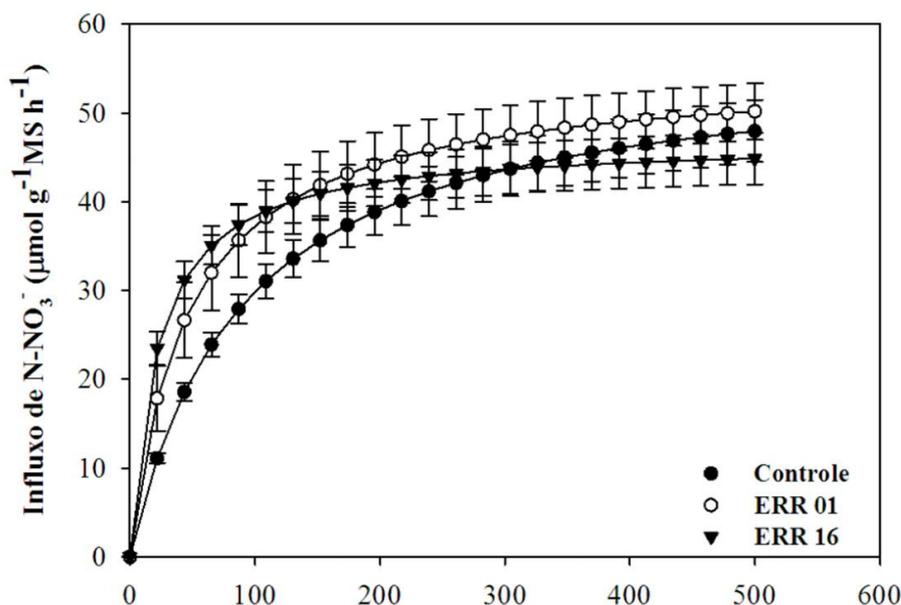


Figura 7. Influxo de NO_3^- em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação por diferentes isolados de fungos *dark septate* em resposta ao aumento da concentração de NO_3^- na solução nutritiva dentro de uma faixa correspondente a atuação do sistema de absorção de alta afinidade (0-500 μmol).

3.6.2 Fração solúvel e acúmulo de nutrientes em plantas de arroz

Os resultados de análise de variância mostraram que para o conteúdo de nitrato na raiz, bainha, folha e parte aérea como um todo, não houve efeito significativo entre os tratamentos (Anexo C e Anexo D), o que indica que aquela característica da variedade Piauí de acumular nitrato na bainha (SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2005) não foi afetada pela colonização do fungo.

Em geral, o conteúdo de N-amino livre foi maior nas folhas que nas raízes e bainha (Figura 8). Acúmulos de N-amino preferencialmente na folha da variedade Piauí têm sido relatados (SANTOS et al., 2011; BUCHER, 2011; SPERANDIO, 2011; BUCHER, 2007), portanto o controle mostrou-se de acordo com o esperado na literatura. As raízes das plantas inoculadas com os isolados ERR 16 e ERR 42 apresentaram conteúdo de N-amino livre maior que o observado nas plantas não inoculadas (Figura 8). Por outro lado, o conteúdo de N-amino livre das plantas inoculadas com os isolados ERR 01 e ERR 26 foi igual ao tratamento controle. O isolado ERR 16 se destacou comparativamente aos demais, uma vez que a bainha, folha e parte aérea de todas as plantas inoculadas com apenas este isolado, apresentou conteúdo de N-amino livre maior que o tratamento controle (Figura 8). Por outro lado, as folhas e parte aérea das plantas do tratamento de inoculação com os isolados ERR 26 e ERR 42 apresentaram conteúdo de N-amino livre menor que o das plantas não inoculadas. As plantas inoculadas com o isolado ERR 16 revelaram um incremento de 23% no seu conteúdo de N-amino livre, enquanto no tratamento de inoculação com os isolados ERR 26 e ERR 42 observou-se uma redução de 18% e 24% respectivamente.

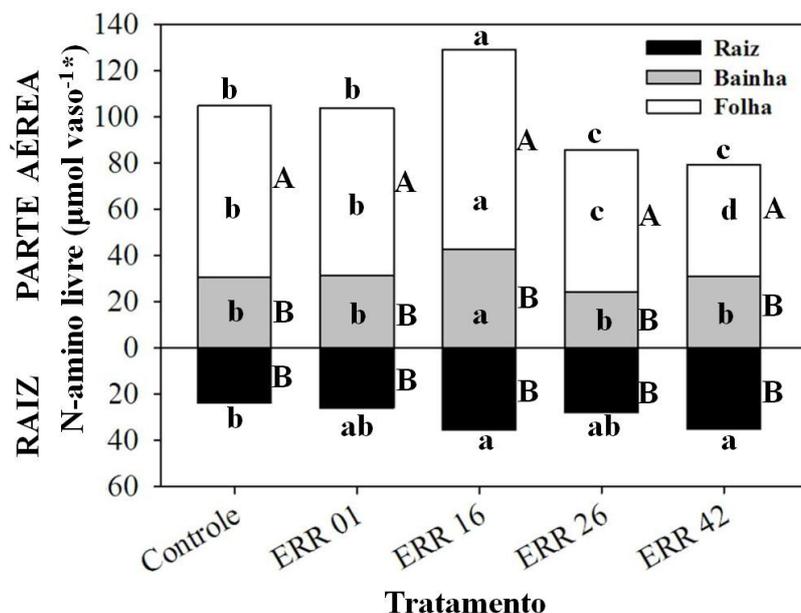


Figura 8. Conteúdo de N-amino livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, bainha e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.

A redução de N-amino observada pode estar relacionada com o transporte dos aminoácidos da parte aérea para o sistema radicular, para suprir a demanda metabólica dos fungos ERR 26 e ERR 42, havendo, portanto diminuição do N-amino na parte aérea, uma vez que a espécie *Heteroconium chaetospora*, pertencente aos FEDS, usa glutamina, fenilalanina, leucina e valina como sua única fonte de carbono e nitrogênio, podendo liberar o NH_4^+ para planta numa condição de baixo suprimento de carbono (USUKI & NARISAWA, 2007). A influência de outro grupo de fungos (FMA) associado a raízes transgênicas de cenoura (*Daucus carota* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) na redução do teor de N-amino livre já foi demonstrada (SOUZA, 1998), fato esse, que foi relacionado à habilidade desses fungos utilizarem aminoácidos livres como fonte de N (ABUZINADAH & REID, 1986). Em ectomicorrizas, já foi demonstrado que desenvolvimento e a atividade metabólica dos simbiontes podem causar consideráveis mudanças no metabolismo de N (MARTIN & BOTTON, 1993; MARTIN et al., 1992), o que pode ser influenciado tanto pela espécie do fungo quanto pela espécie da planta hospedeira (SOUZA, 1998).

Em geral, o conteúdo de N-NH_4^+ foi maior nas folhas que nas raízes e bainha (Figura 9). O controle mostrou-se de acordo com o esperado na literatura, uma vez que os acúmulos de N-NH_4^+ ocorreram preferencialmente nas folhas. Resultado semelhante tem sido observado nesta variedade (BUCHER, 2011; SPERANDIO, 2011; BUCHER, 2007; SANTOS, 2006). As raízes das plantas inoculadas apresentaram conteúdo de N-NH_4^+ igual aos observados no tratamento controle e efeito semelhante ocorreu na bainha das plantas (Figura 9). Ao contrário, nas folhas do arroz houve menor acúmulo de N-NH_4^+ nos tratamentos com os fungos ERR 26 e ERR 42, comparativamente ao controle (Figura 9). Na parte aérea, exceção do tratamento inoculado com o isolado ERR 42, que apresentou menor conteúdo N-NH_4^+ , em todos os tratamentos de inoculação, foram observados conteúdos de N-NH_4^+ iguais ao do tratamento controle. Neste estudo, houve uma redução de 30% do conteúdo de N-NH_4^+ no tratamento de inoculação com o isolado ERR 42, quando comparado com o tratamento

controle. Existem dados na literatura indicando redução de $N-NH_4^+$ em raízes transgênicas de cenoura inoculadas com FMA (*Glomus clarum*) (SOUZA, 1998). Aparentemente, a atividade fúngica aumenta a eficiência de absorção e assimilação de $N-NH_4^+$ inclusive, resultando em maior crescimento da planta hospedeira (BELLEI & CARVALHO, 1992; MARSCHNER, 1995; AMES et al., 1983).

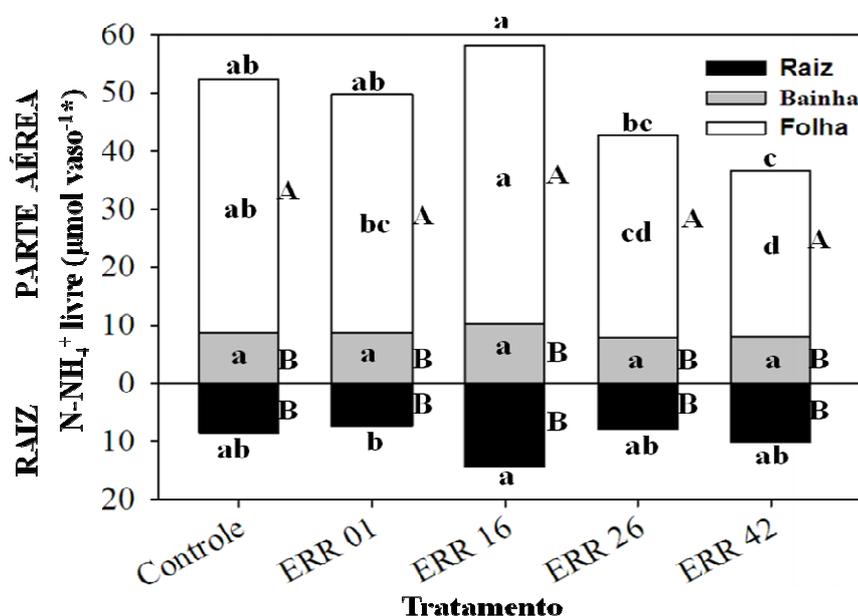


Figura 9. Conteúdo de $N-NH_4^+$ livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, bainha e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.

Em geral, o conteúdo de açúcares solúveis nas raízes foi menor que o observado na bainha e este menor que o das folhas (Figura 10). Isto pode ser devido ao fato de os carboidratos presentes nas raízes e bainha serem oriundos principalmente da fotossíntese das folhas (FU-QIANG et al., 2012). Resultado semelhante já foi obtido nesta mesma variedade (SANTOS et al., 2011). O conteúdo de açúcares solúveis nas raízes não foi influenciado pela presença dos fungos (Figura 10). Ao contrário, na bainha, nas folhas e também na parte aérea como um todo, houve diferença entre os tratamentos, sendo que as plantas inoculadas com o isolado ERR 16 apresentaram o conteúdo de açúcares maior que os observados no tratamento controle e de inoculação com os demais fungos, o que representou um incremento de 46% comparativamente ao tratamento controle. Este incremento de açúcares solúveis observado pode ser atribuído à maior eficiência fotossintética das plantas inoculadas com isolado ERR 16, uma vez que plantas associadas aos FEDS podem apresentar incrementos no teor de clorofila e a eficiência quântica do fotossistema II (Y (II)) (ZHANG et al., 2012). Adicionalmente, os mesmos autores sugerem que esses parâmetros são indicativos de aumento da eficiência fotoquímica do fotossistema II. O estabelecimento da associação entre a planta hospedeira e os FEDS pode ser semelhante ao que ocorre na formação de micorrizas, que resulta em alterações na fisiologia da planta hospedeira, tais como incremento nos teores de clorofila nas folhas (LI et al., 2011), que resulta em mais fotoassimilados e mais carboidratos (FU-QIANG et al., 2012). Altos teores de açúcares solúveis foram observados nas folhas das plantas de *Amorpha fruticosa* inoculadas com fungos micorrízicos

arbusculares (FU-QIANG et al., 2012). Altas concentrações da piruvato cinase em relação aos observados no tratamento controle têm sido observadas em plantas de *Allium fistulosum* inoculadas com fungos formadores de micorrizas arbuscular, utilizando-se as espécies *Glomus etunicatum* e *Glomus vesiforme* (SHEN et al., 2011).

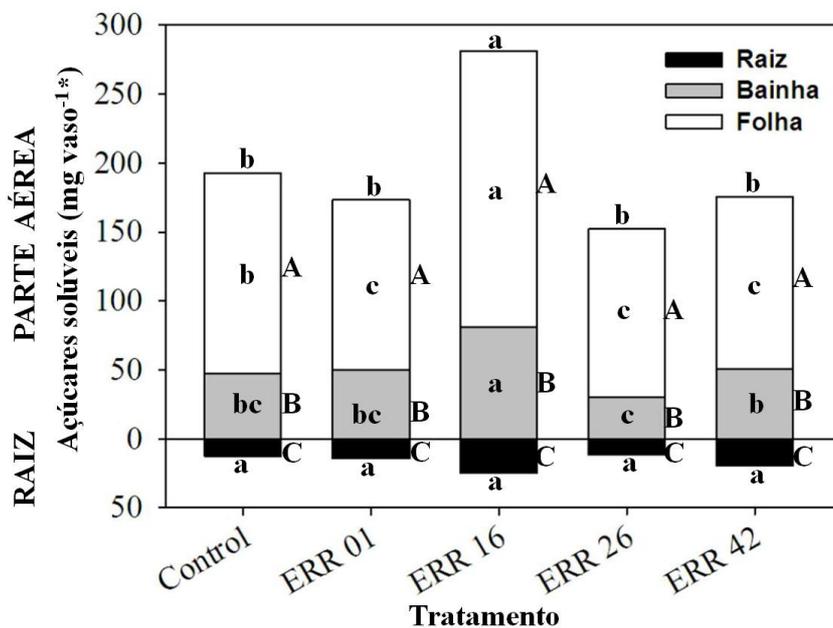


Figura 10. Conteúdo de açúcares solúveis (mg vaso^{-1}) determinado aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, bainha e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.

Os conteúdos de macronutrientes na parte aérea estão representados na Tabela 7. Os resultados da análise de variância mostraram que houve diferenças significativas entre os tratamentos para todos os conteúdos de macronutrientes (Anexo E). O conteúdo de N, Mg e S na parte aérea das plantas inoculadas com o isolado ERR 16 foi maior, com ERR 26 menor e com os demais tratamentos de inoculação (ERR 01 e ERR 42) igual quando comparado ao tratamento controle (Tabela 7). O tratamento de inoculação com ERR 16 revelou um incremento de 29%, 19% e 30% comparativamente ao controle no conteúdo de N, Mg e S, respectivamente. Por outro lado, a inoculação das plantas com o isolado ERR 26 revelou uma redução de 24%, 30% e 24% em comparação ao controle no conteúdo de N, Mg e S respectivamente. O conteúdo de P e K na parte das plantas inoculadas com os isolados ERR 16 e ERR 42 foi maior e com os demais tratamentos de inoculação (ERR 01 e ERR 26) igual quando comparado ao tratamento controle. O tratamento de inoculação com o isolado ERR 16 revelou incremento de 48% e 32% e com isolado ERR 42 de 18% e 10% comparativamente ao controle, no conteúdo de P e K respectivamente. O conteúdo de Ca de todos os tratamentos de inoculação foi igual quando comparado ao tratamento controle. Apesar de se observar incrementos de 23% e 22% nos tratamentos de inoculação com ERR 16 e ERR 42.

Tabela 7. Conteúdo de macronutrientes (mg vaso⁻¹) na parte aérea da variedade de arroz Piauí, com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
	mg vaso ⁻¹ *					
Controle	56,34 b	13,1 cd	49,18 bc	7,88 ab	7,96 b	11,41 b
ERR 01	53,19 b	13,65 c	40,48 c	6,44 b	8,03 b	10,26 b
ERR 16	72,75 a	19,37 a	64,97 a	9,73 a	9,49 a	14,88 a
ERR 26	42,74 c	11,58 d	43,83 c	6,76 b	5,58 c	8,63 c
ERR 42	53,91 b	15,57 b	54,56 ab	9,58 a	7,18 b	11,41 b
CV (%)	9,22	7,47	13,94	18,41	7,44	8,73

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste t (LSD), $p < 0,05$). DAG (dias após a germinação). * Cada vaso continha quatro plantas.

De forma geral, em plantas inoculadas com FEDS não se tem observado alterações no conteúdo de N da parte aérea, comparativamente ao controle, quando a fonte de N suplementa é inorgânica (NEWSHAM, 2011; UPSON et al., 2009). Contudo quando foi fornecido N orgânico, os mesmos autores relataram que aumentos no conteúdo de N na parte aérea foram observados. Notadamente, os locais de origem dos FEDS que facilitaram absorção de fontes orgânicas de N são ambientes que naturalmente desfavorecem a decomposição da matéria orgânica, devido à ocorrência de baixas temperaturas predominantemente, havendo, portanto predomínio natural fontes orgânicas de N no solo (DIENE et al., 2013; ROBERTS et al., 2009; NEWSHAM, 2009; GARDES & DAHLBERG, 1996), o que potencializaria o desenvolvimento dos mecanismos de mineralização destas fontes nos FEDS. Contudo em ambientes tropicais, o processo de decomposição da matéria orgânica ocorre mais intensamente, havendo principalmente em solos bem aerados uma rápida conversão de NH_4^+ a NO_3^- , o qual pode ser perdido por lixiviação (SPOSITO, 2008). E assim, é possível hipotetizar que em ambientes tropicais existam tanto espécies que facilitam a absorção de fontes orgânicas de N quando aquelas eficientes na absorção de fontes inorgânicas de N, como o caso do fungo ERR 16, sendo necessário mais estudo com outros fungos para elucidar este fato. Neste estudo o tratamento de inoculação com o isolado ERR 16 revelou incremento de 29% no conteúdo de N na parte aérea, o que mostra aumento na eficiência de uso deste nutriente. Incrementos na concentração de P da parte aérea das plantas inoculadas com isolados de FEDS têm sido observados quando suplementas com N inorgânico (NEWSHAM, 2011; UPSON et al., 2009; NEWSHAM, 1999). Neste estudo, os tratamentos de inoculação com os isolados ERR 16 e ERR 42 revelaram incremento no conteúdo de P de 48% e 18% respectivamente, quando comparado ao controle.

Os incrementos de N, P, K, Mg e S, observados nas plantas inoculadas com o isolado ERR 16, não por acaso, podem estar contribuindo para uma maior eficiência da atividade fotossintética, pois sabe-se que são constituintes de moléculas envolvidas nesse processo: N é constituinte de proteínas, clorofilas, entre outras moléculas; S é constituinte de alguns aminoácidos, inclusive da ferredoxina, que atua em reações de oxi-redução da fotossíntese; K contribui por exemplo, na manutenção do gradiente osmótico que favorece o deslocamento de açúcares da fonte para o dreno; Mg é constituinte da clorofila e; o P esta envolvido na transferência de energia tendo uma participação relevante na fotossíntese. Sendo assim, os maiores conteúdo de macronutrientes observados podem estar relacionados com os altos conteúdos de açúcares.

3.6.3 Biomassa e crescimento do arroz

Os resultados de análise de variância mostraram que houve diferenças significativas entre os tratamentos para a altura da parte aérea, profundidade do sistema radicular e número de perfilhos (Anexo F). A altura da parte aérea das plantas inoculadas com o isolado ERR 16 foi maior, com ERR 26 menor e com ERR 01 e ERR 42 iguais quando comparado ao tratamento controle (Tabela 8). A profundidade do sistema radicular observada nas plantas inoculadas com isolado ERR 16 foi igual ao tratamento de inoculação com ERR 01 e menor quando comparado ao controle. Este resultado indica à contribuição desses fungos na absorção de nutrientes, pois o *status* de nitrogênio regula de forma negativa o crescimento da raiz (SPERANDIO, 2011), o que está de acordo com os maiores acúmulos de N-amino observados, em parte, nas plantas inoculadas com o fungo ERR 16 (Figura 8). Em todos os tratamentos de inoculação foi possível observar maior número de perfilhos, que o controle, se destacando as plantas inoculadas com o isolado ERR 16 com quatro perfilhos, 100% a mais que o controle (Tabela 8).

Tabela 8. Altura da parte aérea, profundidade do sistema radicular e número de perfilhos de plantas de arroz (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	Altura da parte aérea (cm)	Profundidade do sistema radicular (cm)	Número de perfilhos (un. vaso ^{-1*})
Testemunha	67,13 b	26,25 ab	2,00 c
ERR 01	67,63 b	23,25 bc	3,13 b
ERR 16	72,38 a	22,25 c	4,06 a
ERR 26	62,88 c	26,38 a	3,25 b
ERR 42	67,75 b	26,13 ab	3,44 b
CV (%)	3,90	8,22	10,85

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste de t (LSD), $p < 0,05$). DAG (dias após a germinação). * Cada vaso continha quatro plantas.

A massa fresca e seca de raiz, bainha, folha e parte aérea está sumarizada na Tabela 9. Houve diferenças significativas entre os tratamentos para todas as variáveis avaliadas (Anexo G). Entre os tratamentos de inoculação, as plantas inoculadas com o fungo ERR 16, apresentaram maior massa fresca de raiz, bainha, folha e parte aérea como um todo, o que representou incremento de 47%, 38%, 20% e 30%, respectivamente quando comparado ao tratamento controle (Tabela 9). Ao contrário, as plantas inoculadas com o fungo ERR 26 apresentaram uma redução de 28%, 22% e 26% na bainha, folha e parte aérea fresca. Os demais tratamentos de inoculação não mostraram nenhum efeito.

Os resultados da massa seca estão de acordo com a massa fresca, uma vez que as plantas inoculadas com o fungo ERR 16 se destacaram novamente, apresentando maior massa seca de raiz, bainha, folha e parte aérea comparativamente ao controle e aos demais tratamentos de inoculação, o que representou um incremento de 44%, 43%, 25% e 32% respectivamente quando comparado ao controle (Tabela 9). De modo semelhante ao que ocorreu na massa fresca, as plantas inoculadas com o fungo ERR 26, mostraram redução de 24%, 11% e 22% na massa seca da bainha, folha e parte aérea, respectivamente. Os resultados indicam a contribuição do fungo ERR 16 no crescimento da variedade Piauí. A menor profundidade e maior massa do sistema radicular observada nas plantas inoculadas com o fungo ERR 16 (Tabela 8 e Tabela 9), indica a presença de mais raízes laterais, o que é uma

característica de raiz morfológicamente adaptada para maior eficiência de aquisição de nutrientes em geral e fósforo em especial. Essa característica é desejável principalmente para o cultivo sob baixas condições de fertilidade natural (BAPTISTA et al., 2000) representando uma adaptação a condições de estresse (CLARK, 1977). Adicionalmente, em solos das regiões tropicais, que normalmente apresentam baixas concentrações de N, a maior densidade do sistema radicular pode ser um atributo importante para absorção de N (SCHENK & BARBER, 1979).

Tabela 9. Massa fresca e seca de raízes, bainhas, folhas e parte aérea de plantas de arroz, (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	Massa fresca (g vaso ^{-1*})			
	Raiz	Bainha	Folha	Parte aérea
Controle	7,48 bc	6,04 b	5,18 b	11,22 b
ERR 01	7,29 bc	5,51 b	4,54 cd	10,05 b
ERR 16	10,98 a	8,31 a	6,23 a	14,55 a
ERR 26	6,96 c	4,29 c	4,02 d	8,31 c
ERR 42	8,45 b	6,00 b	4,96 bc	10,96 b
CV (%)	10,20	9,36	7,43	7,87
Tratamento	Massa seca (g vaso ^{-1*})			
	Raiz	Bainha	Folha	Parte aérea
Controle	0,62 b	0,75 b	1,26 b	2,01 b
ERR 01	0,59 b	0,73 b	1,15 bc	1,88 b
ERR 16	0,89 a	1,07 a	1,58 a	2,66 a
ERR 26	0,55 b	0,55 c	1,01 c	1,56 c
ERR 42	0,66 b	0,77 b	1,26 b	2,03 b
CV (%)	11,40	12,54	7,09	8,53

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste de t (LSD), p<0,05). DAG (dias após a germinação). * Cada vaso continha quatro plantas.

O incremento na massa de raiz, bainha, folha, parte aérea, altura da planta e maior perfilhamento observado neste estudo (Tabela 8 e Tabela 9), sobretudo nas plantas inoculadas com fungo ERR 16 pode ser atribuído ao melhor estado nutricional dessas plantas, em função da maior eficiência fotossintética que foi evidenciado pelos maiores acúmulos de açúcares solúveis (Figura 10) e maior eficiência de absorção de nutrientes, evidenciado pelo menor K_M (Tabela 6) e maior massa do sistema radicular (Tabela 9).

Incrementos na altura da planta, massa da parte aérea e de raiz seca comparado ao tratamento não inoculado têm sido observados em plantas de *Dendrobium nobile* inoculadas com isolado de FEDS (DEF-17) e crescidas no meio Murashige-Skoog (HOU & GUO, 2009) e em plantas de *Saussurea involucrata*, espécie de planta medicinal, inoculadas com o isolado EF-M de FEDS e crescidas em frasco com vermiculita e serapilheira, (WU & GUO, 2008).

Parte dos resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos da resposta de *Deschampsia Antarctica* a seis isolados de FEDS registrados por Upson et al. (2009) que observaram que na presença de N inorgânico (sulfato de amônio), a massa de raiz ou da parte aérea seca das plantas inoculadas com alguns isolados de FEDS (I9 e H4) foi significativamente reduzida ou não foi afetada quando comparada ao tratamento não inoculado. Os mesmos autores relatam, entretanto, que ao crescerem as plantas inoculadas com isolado I9 na presença de N orgânico (caseína hidrolisada), incrementos significativos na massa seca de raiz e da parte aérea comparativamente ao controle foram observados. Em

outros trabalhos conduzidos no Japão com plantas repolho chinês e tomate, suplementadas com N inorgânica (NaNO_3) não foram encontradas diferenças significativas entre as plantas inoculadas com isolados de fungos *dark septate* e o controle para massa seca. Mas quando suplementadas com fontes orgânicas de N, os tratamentos de inoculação mostraram também incrementos significados, comparativamente ao controle (DIENE et al., 2013; MAMOUD & NARISAWA.,2013; USUKI & NARISAWA, 2007). Apesar desse sucesso no uso de fontes orgânicas de N, recentemente, foi registrada uma redução de 44% na massa seca de plantas de pepino inoculadas com fungos *dark septate*, *Pseudosigmoidea ibarakiensis* sp. nov., suplementadas com apenas leucina (DIENE et al., 2013). No presente trabalho, a variedade Piauí suplementada com N-NO_3^- (nitrato de potássio e de Cálcio) e N-NH_4^+ (sulfato de amônio) associadas, respondeu de forma positiva, negativa ou não apresentou resposta á inoculação com isolados de FEDS.

Os FEDS contribuem para o desenvolvimento das plantas podendo os ganhos de biomassa vegetal atingirem a 100% quando comparado ao controle (NEWSHAM, 2011). Entretanto, a variabilidade de respostas na massa da planta quando inoculada com isolados de FEDS tem sido observada em *Oryza Sativa* L. (RIBEIRO, 2011) e em outras espécies, como *Allium porrum* L. (MANDYAM, 2008) e *Lycopersicon esculentum* L. (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; ANDRADE-LINARES et al., 2011).

O perfilhamento é uma característica dependente do genótipo e, portanto, também influenciado pelo tipo de cultivar (FREITAS, 2011). O estado nutricional da planta e o suplemento de carboidratos são fatores determinantes para o perfilhamento do arroz (YOSHIDA, 1981). Assim a deficiência de fósforo e nitrogênio prejudica um alto perfilhamento (YOSHIDA, 1981). Por outro lado, o fornecimento N em altas concentrações pode estimular o perfilhamento (MATTJE et al., 2013). Outros fatores como o aumento da densidade de plantas daninhas também prejudicam o perfilhamento (CERQUEIRA, 2009). Assim, o maior perfilhamento observado neste estudo, em particular para as plantas inoculadas com o isolado ERR 16, que apresentaram incremento de 100% (Tabela 8), pode, portanto ser associado ao maior conteúdo de açúcares solúveis (Figura 10), de N, P, K, Mg e S (Tabela 7) e ao menor K_M (Tabela 6) observado na cinética de absorção de N-NO_3^- nessas plantas, pois o desenvolvimento de perfilhos no arroz depende de vários fatores, entre eles, estado nutricional da planta e o suplemento de carboidratos (YOSHIDA, 1981).

A maior eficiência fotossintética das plantas inoculadas com o fungo ERR 16, explicaria os maiores acúmulos de matéria seca tanto na parte aérea e quanto na raiz, uma vez que 44% do carbono fixado pela fotossíntese são destinados ao desenvolvimento do sistema radicular (PIMENTEL, 1998). O sistema radicular bem desenvolvido e com maior área radicular melhora a eficiência de uso de nutrientes, assim como a eficiência no uso da água (PIMENTEL, 1998), o que permitiria aumentos de produtividades nos agrossistemas tropicais com mínimo uso de insumos.

3.7. CONCLUSÕES

Entre os fungos *dark septate* avaliados, ao menos o ERR 16 seguramente apresenta potencial para a promoção de crescimento vegetal de arroz. De acordo com os resultados obtidos, este isolado é capaz de propiciar aumento do perfilhamento das plantas, aumento da absorção de nutrientes, em especial o N (determinado nas formas N-NO_3^- , N-NH_4^+ e N-amino e aumento da afinidade de absorção de N-NO_3^-) e P; maior acúmulo de açúcares na parte aérea e maior produção de biomassa do vegetal. Além disso, pode-se concluir que entre os fungos estudados existem preponderantes diferenças na associação que é estabelecida com as plantas de arroz, indo desde benefícios a promoção do crescimento do vegetal até a inocuidade da associação.

4 CAPÍTULO III:

INFLUÊNCIA DOS FUNGOS DARK SEPTATE SOBRE ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE

4.1. RESUMO

Os FEDS podem estabelecer associações mutualísticas com seu hospedeiro, similares às micorrizas, atuando como promotores do crescimento vegetal. No entanto, ainda são poucos os estudos envolvendo este grupo de fungos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos fungos *dark septate* sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de tomate. Quatro isolados de FEDS obtidos de *Oryza glumaepatula* foram inoculados em sementes de tomate (cultivar Santa Clara I-5300). As plantas foram crescidas em condições de câmara de crescimento por 35 dias. As plantas não inoculadas constituíram o tratamento controle. Foram obtidos os parâmetros cinéticos, V_{\max} e K_M , a partir do conteúdo de nitrato da solução nutritiva. Amostras de um grama de raiz, caule, pecíolo e folha foram coletadas para a determinação dos teores de $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, N-amino livre e açúcares solúveis. Com o material restante da parte aérea, foi determinado o teor dos macronutrientes. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias, utilizando o teste de t ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que nos tratamentos de inoculação com os isolados ERR 16 e ERR 42 houve maior V_{\max} associada a maiores acúmulos de $N-NO_3^-$ na parte aérea, comparativamente ao controle. As plantas inoculadas com os isolados ERR 01 e ERR 42 apresentaram incrementos significativos nos conteúdos açúcares solúveis, P, K, Mg e S, na massa de raiz, caule, folha e parte aérea seca, quando comparado ao controle. Entre os fungos *dark septate* avaliados, ao menos os fungos ERR 01 e ERR 42 seguramente apresentam potencial para a promoção do crescimento do tomateiro.

4.2. ABSTRACT

The DSE fungi can establish mutualistic associations with their host, similar to mycorrhizae, acting as promoters of plant growth. However there are few studies involving this group of fungi. The aim of this study was to evaluate the influence of dark septate endophyte fungi on nutrient uptake and growth of tomato. Four isolates of DSE obtained from *Oryza glumaepatula* were inoculated in tomato seeds (var. Santa Clara I-5300). The plants were grown in a growth chamber conditions for 35 days. The non-inoculated plants formed the control treatment. We obtained the kinetic parameters, $V_{\text{máx}}$ and K_M , from the nitrate content in the nutrient solution. Samples of one gram of root, stem, petiole and leaf were collected to determine the levels of NO_3^- -N, NH_4^+ -N, free amino-N and soluble sugars. With the remaining material from the shoot, we determined the macronutrients. Data were submitted to analysis of variance and mean comparison using the t test ($p < 0.05$). The results showed that the inoculation treatments with ERR 16 and ERR 42 isolates showed higher $V_{\text{máx}}$ associated with higher accumulation of NO_3^- -N in shoots when compared to the control. Plants inoculated with the ERR 01 and ERR 42 isolates showed significant increases in soluble sugar, P, K, Mg and S contents, dry weight of root, stem, leaf and shoot when compared to control. Between the dark septate endophytes fungi evaluated, at least the ERR 01 and ERR 42 fungi certainly have potential for promoting growth of tomato.

4.3. INTRODUÇÃO

O cultivo de tomateiro foi aumentando no mundo inteiro por causa do desenvolvimento daquelas cultivares com melhor crescimento sobre condições mais adversas (ANDRADE-LINARES et al., 2011) e devido às propriedades do seu fruto comestível que é uma importante fonte de carotenóides, flavonóides, vitaminas e minerais (GUIL-GUERRERO & REBOLLOSO-FUENTES, 2009).

O debate sobre o impacto dos adubos químicos, em especial nas questões de saúde pública e de contaminação ambiental vem culminando na crescente demanda dos consumidores por alimentos oriundos de cultivo com usos mínimos e adequados de agrotóxicos e adubos químicos. Neste sentido, o uso de microrganismos promotores de crescimento ganha destaque na ciência, embora ainda com pouco uso prático.

A exploração da associação entre tomate e fungos endofíticos *dark septate* pode representar uma alternativa para o uso eficiente dos nutrientes e a proteção de plantas contra o ataque de patógenos. Os fungos *dark septate* são frequentemente encontrados em solos oligotróficos e são capazes de colonizar raízes de diversas espécies de plantas em habitats temperados e tropical (SHARMA & JHA, 2012).

Nos últimos anos, a prospecção de FEDS que facilitam a absorção de nutrientes e melhoram o crescimento do vegetal tem sido feita de forma sistemática para o tomate (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; ANDRADE-LINARES et al., 2011), assim como para outras plantas herbáceas importantes, como arroz (PEREIRA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; RIBEIRO, 2011; YUAN et al., 2010) pepino (DIENE et al., 2013) e repolho chinês (USUKI & NARISAWA, 2007).

Contudo, na literatura, ainda há carência de estudos envolvendo a associação entre FEDS e tomate, em especial, aqueles que têm como base o uso de baixas concentrações de adubos químicos nos seus experimentos. Assim, a pré-seleção das interações plantas – FEDS eficiente na absorção de N em baixas concentrações, podem fornecer subsídios para a implementação de novos programas de ensaios em condições de campo, visando a obtenção de inoculantes que poderiam contribuir para a redução de custo de produção e de problemas ambientais acarretados por uso de fertilizantes nitrogenados.

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos fungos *dark septate* sobre absorção de nutrientes e crescimento de plantas de tomate.

4.4. REVISÃO DE LITERATURA

O tomate cultivado, *Solanum lycopersicum* (Tubiflorae: Solanaceae), é uma espécie cosmopolita e descendente da espécie selvagem, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* que produz frutos do tipo cereja (LUCINI, 2013). A América do Sul é tida como centro de origem primário do tomateiro, mais especificamente na região andina da Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e parte do Chile (LUCINI, 2013). No entanto, sua domesticação ocorreu no México, sendo este país conhecido como centro de origem secundário do tomate (FILGUEIRA, 2008; NAIKA et al., 2006; ALVARENGA, 2004). No continente Europeu, o tomate foi introduzido pelos espanhóis em meados do século XVI, sendo difundido para outros países.

O tomate pode estabelecer associações com microrganismos endofíticos, como fungos *dark septate* que podem auxiliar no crescimento e desenvolvimento dessa cultura (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; DIENE et al., 2013; ANDRADE-LINARES, et al., 2011). Fungos endofíticos *dark septate* são um grupo de fungos endofíticos filogeneticamente diversos e pertencem à classe Ascomycetes, se encontram distribuídos pelo mundo inteiro associado a uma ampla faixa de hospedeiro, que incluem cerca de 600 espécies de plantas pertencentes a 320 gêneros e a 114 famílias, tais como as Poaceae e Solanaceae (ADDY et al., 2005; JUMPPONEN & TRAPPE, 1998). *Phialophora* sp. e *Phialocephala* sp. parecem constituir o principal subgrupo de FEDS. As espécies do gênero *Phialophora* são encontradas vivendo normalmente em raízes de plantas herbáceas, enquanto o gênero *Phialocephala* sp. é encontrado colonizando espécies vegetais pertencentes aos gêneros *Betula*, *Pinus*, *Picea*, *Carex*, *Abies*, dentre outros (SIEBER, 2002 apud YUAN et al., 2010). Contudo, outras espécies de FEDS pertencentes a outros gêneros têm sido descritas, como: *Cadophora finlandica*, *Cryptosporiopsis rhizophila*, *Exophiala* sp, *Heteroconium chaetospira*, *Leptodontidium orchidicola*, *Oidiodendron maius*, *Phialocephala dimorphospora*, *Phialocephala sphaeroides*, *Phialophora graminicola*, (anamorfo de *Scytalidium vaccinii*), *Trichocladium opacum* e *Chloridium paucisporum* (ADDY et al., 2005). A classificação deste grupo de fungos vem sendo aprimorada à medida que novas espécies vão sendo descritas, porém muitos isolados ainda não possuem posicionamento taxonômico adequado (Yuan et al., 2010; Pereira et al., 2009).

Os FEDS são capazes de formar associações mutualísticas funcionais semelhantes aos fungos formadores de micorrizas, sendo que pelo menos sob algumas condições a simbiose pode ser considerada micorrizica (JUMPPONEN, 2001). Os FEDS são dominantes em muitas herbáceas e espécies arbustivas em ecossistemas nativos e são mais adaptados que os fungos formadores de micorrizas por serem encontrados em ecossistemas perturbados, condições estas, em que os fungos formadores de micorrizas nem sempre se adaptam (BARROW, 2003). O mesmo autor relata que os FEDS protegem os órgãos e as células do hospedeiro do estresse e que a sua colonização sistêmica melhora o desempenho das células da planta. Recentemente, foi realizado um estudo no Japão utilizando-se tomate e a repolho chinês como plantas-isca, na tentativa de capturar fungos *dark septate* (MAHMOUD & NARISAWA, 2013). Nesta pesquisa, identificaram-se as espécies, *Scolecobasidium humicola*, *Leptodontidium orchidicola* e *Phialocephala fortinii*, em solos dos sistemas agrícolas e florestais, colonizando estas espécies vegetais e relatou-se que *Scolecobasidium humicola* melhora o desenvolvimento do tomate, especialmente quando as plantas foram supridas com fontes orgânicas de N no meio de cultivo. Em trabalho prévio, já se havia relatado que a *Leptodontidium orchidicola* é capaz de promover incrementos na biomassa da parte aérea de plantas de tomate, assim como na biomassa e no conteúdo de glicose dos seus frutos (ANDRADE-LINARES et al., 2011). Uma nova espécie de fungos *dark septates*

(*Pseudosigmoidea ibarakiensis* sp. nov.) contribuiu para o crescimento de pepino suplementado com fontes orgânicas de N e estabeleceu-se com sucesso em outras plantas da família de Brassicaceae, Poaceae, Solanaceae, Fabaceae, Asparagaceae e Amaryllidaceae (DIENE et al., 2013).

Os trabalhos de inoculação de FEDS em plantas herbáceas mostraram, de maneira geral, que este grupo de fungos, pode contribuir para crescimento das plantas através da absorção e transferência de nutrientes como nitrogênio, principalmente a partir de fontes orgânicas, quando a interação mutualística é estabelecida (MAHMOUD & NARISAWA, 2013; USUKI & NARISAWA, 2007). Além disso, outras pesquisas, mostram a contribuição destes fungos na proteção de plantas contra estresses bióticos, (ANDRADE-LINARES et al., 2011) bem como, para aumento do teor de clorofila, eficiência quântica do fotossistema II em plantas medicinais (ZHANG et al., 2012) e conteúdo de glicose de frutos de tomate (ANDRADE-LINARES et al., 2011), indicando que estes fungos podem melhorar a eficiência da atividade fotossintética do seu hospedeiro. E conseqüentemente, no presente trabalho, foi lançada a hipótese de que os fungos *dark septate* influenciam a absorção de nutrientes e crescimento de plantas de tomate. E, na busca por essa resposta, frações nitrogenadas (N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, N-amino), açúcares solúveis, crescimento e parâmetros cinéticos (V_{máx} e K_M) da absorção de NO₃⁻ a partir de baixas concentrações deste ânion no meio externo, foram determinadas em plantas de tomate inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate* obtidos de plantas de *Oryza glumaepatula* (RIBEIRO, 2011).

4.5. MATERIAL E MÉTODOS

A condução do experimento com tomate foi feita conforme descrito no item 3.5 do capítulo 2. O conjunto de placas descrito no item 3.5 foi incubado a 50°C por três dias a fim de eliminar possíveis contaminantes. No dia da semeadura, as sementes do tomate foram desinfestadas através da lavagem com detergente por dois minutos, álcool 70% por três minutos, hipoclorito de sódio 2,5% por três minutos, seguindo-se dez lavagens sucessivas com água destilada autoclavada.

A cultivar de tomate utilizada foi a Santa Clara I-5300. Trinta e cinco dias após a germinação (DAG), as plantas foram privadas de N-NO_3^- na solução nutritiva por um período de 72 horas. Durante um período de 10 horas, foram feitas coletas a cada 30 minutos, retirando-se alíquotas de 0,5 mL de solução nutritiva de cada vaso (SANTOS et al., 2011; BAPTISTA et al., 2000).

Neste experimento coletou-se um grama de raiz, pecíolo, caule e folha aos 38 DAG para determinação de N-NO_3^- , N-NH_4^+ , N-amino e açúcares solúveis.

4.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.1 Cinética de absorção de $N-NO_3^-$

Durante todo período de condução do experimento as plantas não apresentaram sintomas de doenças, estando sempre visualmente saudáveis (Figura 11), mesmo tendo-se observado a presença de estruturas de fungos *dark septate* no córtex de suas raízes (Figura 12), indicando que a inoculação com os fungos FEDS não apresentou efeitos deletérios aparentes.



Figura 11. Plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

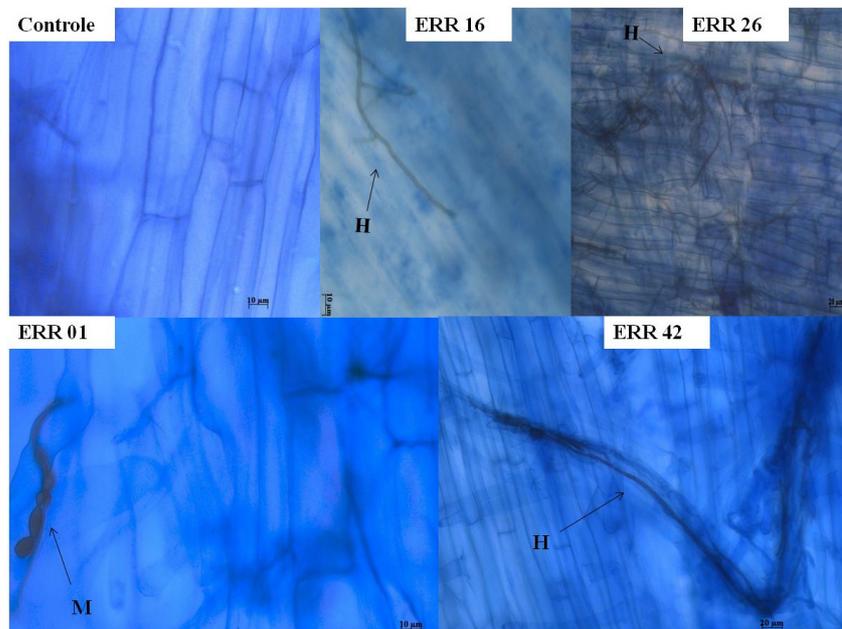


Figura 12. Colonização de raízes de tomate (cult. Santa Clara I-5300) por diferentes isolados de fungos *dark septate* observada aos 38 DAG e o controle. Microescleródios (M) e hifas melanizadas septadas (H).

A velocidade de esgotamento de nitrato medida a partir da solução nutritiva (Figura 13) mostra que a inoculação dos diferentes isolados de FEDS, com exceção do ERR 01 afetou a absorção de N-NO_3^- nas raízes do tomateiro.

No tratamento controle, até três horas após o suprimento com 0,5 mM de N-NO_3^- , praticamente não houve absorção deste ânion na solução nutritiva (Figura 13), o que mostra que o controle está aparentemente de acordo com a literatura, uma vez que efeito semelhante foi observado na variedade Piauí neste estudo e em outro trabalho (SANTOS et al., 2011), no entanto, com duração de duas horas e, este fenômeno tem sido atribuído ao tempo necessário para indução dos transportadores de alta afinidade (SANTOS et al, 2011).

Com relação à capacidade de esgotar o nitrato da solução nutritiva, as plantas inoculadas com os isolados ERR 01 mostraram um comportamento praticamente semelhante ao tratamento controle. Por outro lado, na solução nutritiva daquelas plantas inoculadas com os isolados ERR 16, ERR 26 e ERR 42 foi observado maior efluxo N-NO_3^- de cerca de 0,1 mmol L^{-1} , praticamente nas duas primeiras horas após a reposição da solução nutritiva na dose de 0,5 mmol L^{-1} de N-NO_3^- . A partir desse período, o conteúdo de nitrato na solução nutritiva começou a ser consumido. Às dez horas, nenhum tratamento aparentemente esgotou o conteúdo de nitrato na solução nutritiva (Figura 13).

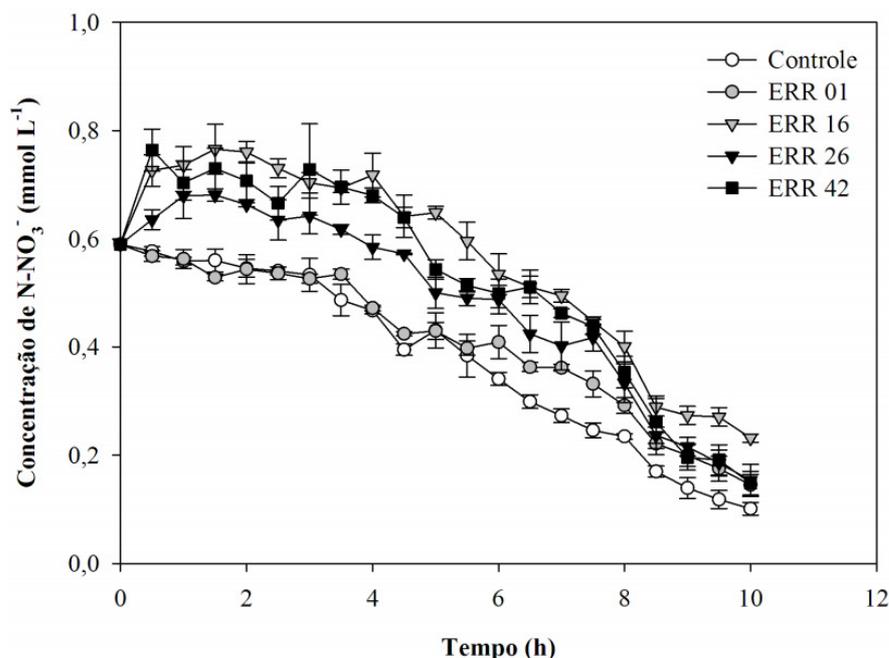


Figura 13. Depleção de N-NO_3^- na solução nutritiva por plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate* e o controle, submetidas a 0,5 mM de N-NO_3^- depois de 72 horas de privação deste nutriente.

O menor influxo inicial do nitrato observado nos tratamento de inoculação com os fungos ERR 16, ERR 26 e ERR 42, pode ter sido provocado, provavelmente, pelo maior acúmulo de N-NH_4^+ e N-amino nos fungos e nas plantas, uma vez que a presença de nitrato na região da rizosfera induz a sua absorção e um sistema *feedback* negativo causado pelos produtos de assimilação do nitrato (amônio e glutamina principalmente) inibem a absorção deste ânion do meio externo (GIRIM, et al., 2007). A regulação da expressão dos transportadores de nitrato (NRTs) é influenciada pelos metabólitos gerados na redução do nitrato (NAZOA et al., 2003).

Após adição de 0,5 mmol L^{-1} de N-NO_3^- na solução nutritiva, houve queda do pH em

todos os tratamentos. Os tratamentos de inoculação com os fungos ERR 01, ERR 16 e ERR 42, promoveram maior acidificação da solução nutritiva que o tratamento controle (Figura 14). A acidificação observada, sobretudo no controle, tem sido atribuída à ativação das PM-H⁺-ATPases, logo depois à adição do nitrato (SANTOS et al., 2011; SANTI et al., 1995). As PM-H⁺-ATPases dirigem os prótons do citosol em direção ao apoplasto com gasto de ATP (SPERANDIO et al., 2011) para formar um gradiente de prótons e a força protomotriz que energiza a absorção de ânions, tais como o NO₃⁻ (GAXIOLA et al., 2007).

Em todos os tratamentos se observou uma elevação do pH a partir das 3,5 h. A elevação do pH que foi observada na solução nutritiva, é devido ao fato de a absorção de nitrato ocorrer por simporte com dois prótons (NO₃⁻/2H⁺), o que acarreta um consumo de prótons (SANTOS et al., 2011).

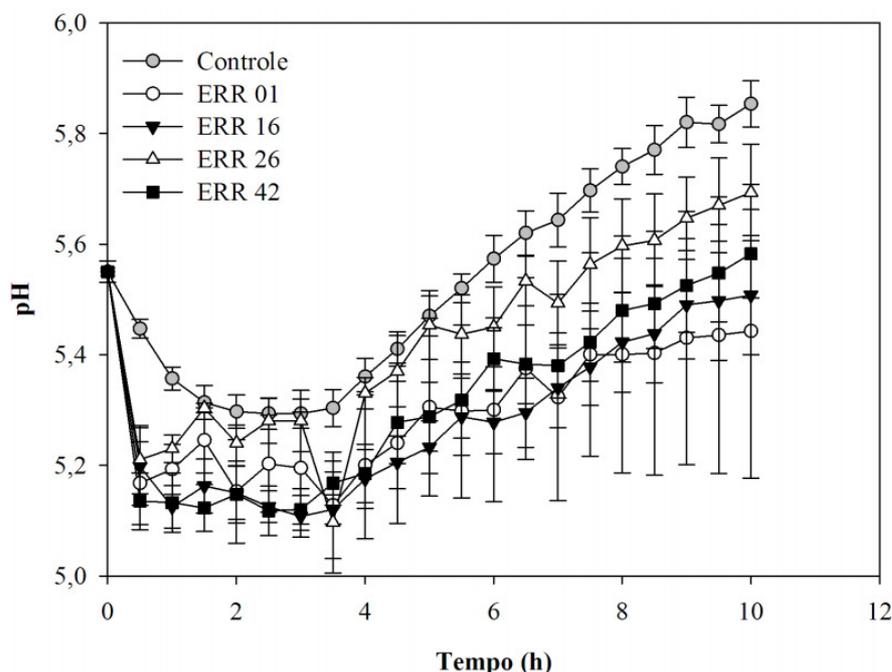


Figura 14. Variação de pH na solução nutritiva causada por plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate* e o controle, submetidas a 0,5 mM de N-NO₃⁻ depois de 72 horas de privação deste nutriente.

Os parâmetros cinéticos de absorção de N-NO₃⁻ foram influenciados pela inoculação das plantas de tomate com diferentes isolados de FEDS (Tabela 10 e Anexo H). As plantas inoculadas com os isolados ERR 16 e ERR 42 revelaram maior V_{máx} e os demais tratamentos de inoculação (com ERR 01 e ERR 26) igual, quando comparado ao tratamento controle (Tabela 10). Todos os tratamentos de inoculação apresentaram K_M igual ao do tratamento controle, com exceção das plantas inoculadas com o isolado ERR 16, nas quais foi observado K_M maior (Tabela 10). A maior V_{máx} observada nas plantas de tomate inoculadas com o fungo ERR 16 e ERR 42 indica maior taxa de absorção de N-NO₃⁻ na faixa de concentração dos HATS. Esse comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 15, onde em concentrações menores do que 100 μmol, o influxo de N-NO₃⁻ nas plantas inoculadas com os fungos ERR 16 e ERR 42 é igual ao do tratamento controle e a medida que aumenta-se a concentração de NO₃⁻, esses tratamentos de inoculação passam a apresentar um maior influxo que o controle. Existem dados na literatura que atribuem a maior eficiência de absorção de nutrientes em plantas colonizadas por FMA a maiores sítios de transporte de P (maior V_{máx}) (SILVEIRA & CARDOSO, 2004; HARRISON & DEWBRE, 2002; FAQUIN et al., 1990;

KARUNARATNE et al., 1986).

Conforme discutido anteriormente (Item 3.6.1 do Capítulo II), a maior aquisição de nitrato em baixas concentrações por plantas associadas aos FEDS, pode ser um indício de maior estabilidade do vegetal frente ao estresse nutricional, que normalmente ocorre em ambientes tropicais. O envolvimento de FEDS na aquisição de nutrientes do meio externo para hospedeiro tem sido relatado (CHEN et al., 2010; USUKI & NARISAWA, 2007; JUMPPONEN et al., 1998; HASELWANTER & READ, 1982).

Tabela 10. Parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} , da absorção de NO_3^- determinados aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	V_{max} ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Controle	3,07 cd	111,32 b
ERR 01	2,56 d	87,21 b
ERR 16	4,51 a	166,01 a
ERR 26	3,29 bc	92,71 b
ERR 42	3,65 b	106,78 b
CV (%)	20,11	23,55

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste de t (LSD), $p < 0,05$). DAG (dias após a germinação).

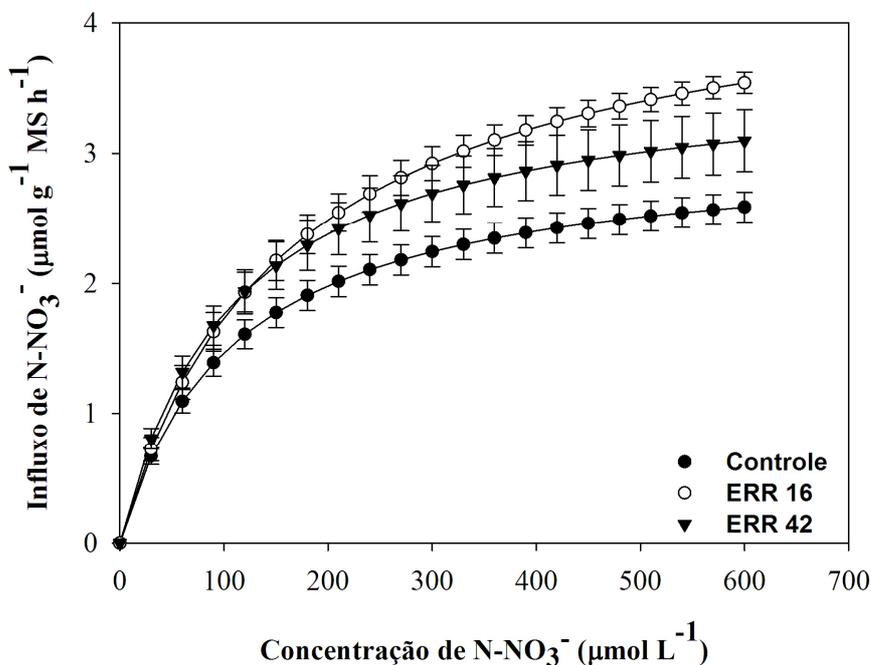


Figura 15. Influxo de NO_3^- em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação por diferentes isolados de fungos *dark septate* em resposta ao aumento da concentração de NO_3^- na solução nutritiva dentro de uma faixa correspondente a atuação do sistema de absorção de alta afinidade (0-600 μmol).

4.6.2 Fração solúvel e acúmulo de nutrientes no tomateiro

Dentre as frações solúveis ($N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, N-amino livre e açúcares solúveis) determinadas, apenas para o conteúdo de $N-NH_4^+$ na parte aérea não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo I e Anexo J). De forma geral, o conteúdo de nitrato foi maior no caule que nas outras partes da planta de tomate analisadas, sendo assim, pode-se inferir que o controle mostrou-se de acordo com o esperado na literatura, uma vez que outras plantas como o arroz, apresentam um acúmulo preferencial de nitrato na bainha (Figura 16). Em estudos com arroz, este maior acúmulo de nitrato nesta parte do vegetal (caule) já foi observado anteriormente (SANTOS et al., 2011; SPERANDIO, 2011; BUCHER, 2011; SANTOS et al., 2009; SANTOS 2006; SANTOS et al., 2005). A raiz e caule do tratamento de inoculação com o fungo ERR 42 mostraram maior acúmulo de $N-NO_3^-$ comparativamente ao controle (Figura 16). Por outro lado, o tratamento de inoculação com fungo ERR 16 mostrou maior acúmulo $N-NO_3^-$ no pecíolo, quando comparado ao controle. Entre os tratamentos de inoculação, na presença de ERR 16 se observou conteúdo de $N-NO_3^-$ na parte aérea igual ao do tratamento com ERR 42 e maior comparativamente ao controle (Figura 16). Ao contrário, o conteúdo de $N-NO_3^-$ das plantas inoculadas com isolado ERR 01 foi menor. Os maiores conteúdos de $N-NO_3^-$ observados na parte aérea das plantas inoculadas com os fungos ERR 16 e ERR 42 estão de acordo com a maior $V_{máx}$ observada nestas plantas (Tabela 10).

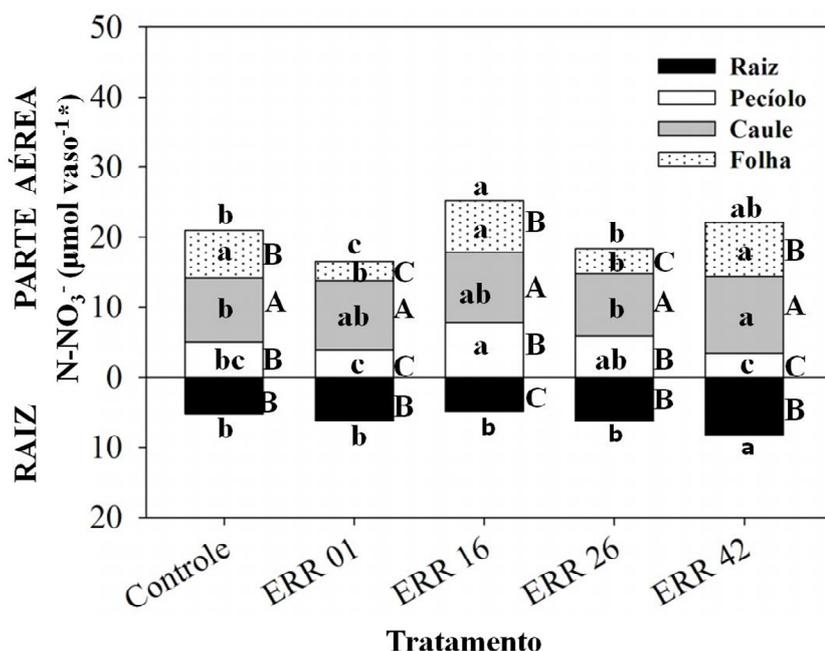


Figura 16. Conteúdo de $N-NO_3^-$ ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.

Os elevados conteúdos $N-NO_3^-$ observados nas plantas inoculadas com os fungos *dark septate* podem ter ocorrido devido a otimização de absorção de N, através do aumento da área de superfície de contato e a capacidade destes, em detectar baixas concentrações de $N-NO_3^-$. Teores elevados de $N-NO_3^-$ têm sido observados em raízes transgênicas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) colonizadas por fungos formadores de micorrizas (*Glomus clarum*), que os observados nas raízes não colonizadas crescidas *in vitro*

(LIMA, 2008). Neste estudo, os maiores conteúdos de $N-NO_3^-$ observados nas plantas inoculadas com os isolados ERR 16 e ERR 42, podem estar relacionados com a maior absorção de N que foi evidenciado pela maior $V_{máx}$ (maiores sítios de transporte) (Figura 16), o que poderia ocasionar excesso de nitrato na planta. O excesso de nitrato absorvido pelas plantas é transportado e acumulado nos vacúolos (ANGELI et al., 2006). Esta estratégia de estocar o N é interessante e de grande valia para as demandas metabólicas futuras, principalmente aquelas causadas pela falta de nitrato, como normalmente acontece nos solos dos trópicos por ser um nutriente bastante móvel no solo (SOUZA et al., 1998). Adicionalmente, se este nitrato for remobilizado por ocasião do enchimento de grão, pode resultar em alto teor de proteína bruta (SANTOS, 2006; BUCHER, 2007).

Em geral, o maior acúmulo de N-amino ocorreu no caule e nas folhas (Figura 17). O conteúdo de N-amino na raiz, pecíolo e folha não foi influenciado pela presença dos fungos (Figura 17). Ao contrário, no caule e também na parte aérea, houve diferenças entre os tratamentos, sendo o conteúdo de N-amino das plantas inoculadas com o isolado ERR 01 maior, que o observado no tratamento controle, o que representou um incremento de 14 % comparativamente ao controle. Por outro lado, as plantas inoculadas com o fungo ERR 26 apresentaram menor conteúdo de N-amino no caule, comparativamente ao controle, o que representou uma redução de 10% comparativamente ao tratamento não inoculado. As plantas inoculadas com o fungo ERR 16 apresentaram conteúdo de N-amino no caule e na parte aérea igual ao do tratamento controle.

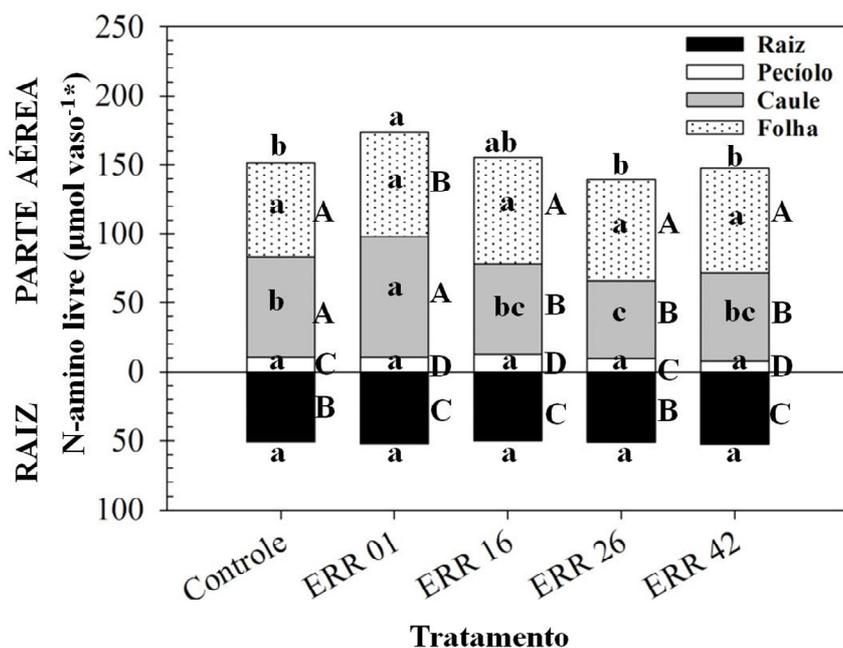


Figura 17. Conteúdo de N-amino livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.

No tratamento de inoculação com ERR 26, foram observados menores conteúdos de N-amino no caule, os quais foram iguais aos observados no tratamento de inoculação com ERR 42, que podem ser atribuídos a uma provável habilidade desses fungos em utilizar os aminoácidos livres como fonte de N e C, conforme discutido anteriormente (Item 3.6.2 do Capítulo II).

Semelhante ao que ocorreu no arroz (capítulo II), as folhas das plantas de tomate apresentaram, de maneira geral, maior conteúdo de N-NH_4^+ , do que a raiz, pecíolo e caule (Figura 18). Efeito semelhante tem sido observado em plantas de arroz (BUCHER, 2011; SPERANDIO, 2011; BUCHER, 2007; SANTOS, 2006). É possível observar, que não houve influência dos fungos sobre o acúmulo de N-NH_4^+ na raiz, pecíolo e nem parte aérea (Figura 18). Ao contrário, na presença do fungo ERR 16 se observou maior acúmulo de N-NH_4^+ na folha, comparativamente ao controle. Todos os tratamentos de inoculação apresentaram conteúdo de N-NH_4^+ igual ao tratamento controle no caule.

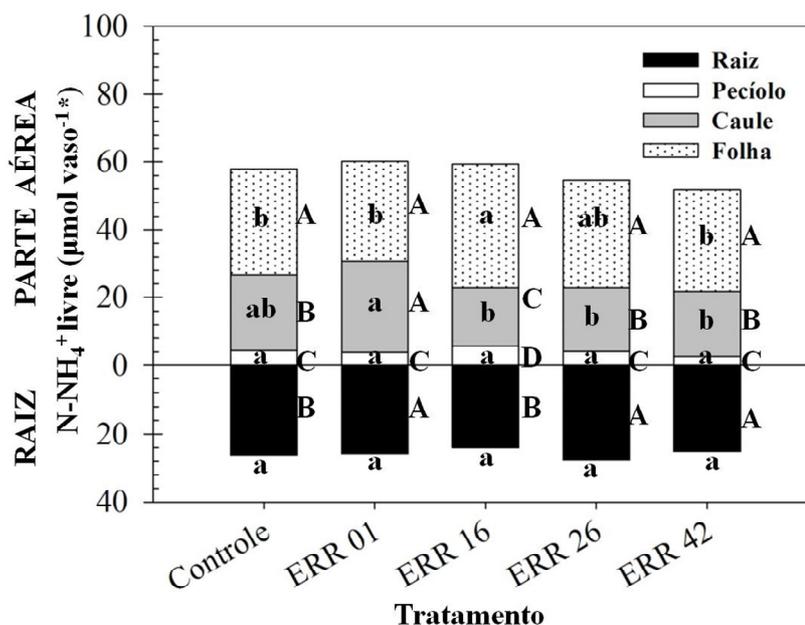


Figura 18. Conteúdo de N-NH_4^+ livre ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). Valores sem letra não foram significativos ao teste F a 5 % de probabilidade.* Cada vaso continha quatro plantas.

De uma forma geral, os açúcares solúveis se acumularam preferencialmente no caule que nas outras partes da planta (Figura 19), havendo fungos contribuindo de forma significativa para este aumento. Ao contrário, os açúcares solúveis na raiz e pecíolo não foram influenciados pela presença dos fungos (Figura 19). Entre os tratamentos de inoculação, na presença dos fungos ERR 01 e ERR 42, se observaram maiores conteúdos de açúcares solúveis no caule e parte aérea comparativamente ao controle (Figura 19). A folha das plantas inoculadas com o fungo ERR 42 apresentou maiores conteúdos de açúcares solúveis quando comparado ao controle (Figura 19). Ao contrário, na presença de ERR 16, foram observados menores conteúdos de açúcares solúveis no caule, pecíolo e parte aérea, comparativamente ao controle e aos demais tratamentos de inoculação. O conteúdo de açúcares solúveis das plantas inoculadas com o fungo ERR 26 foi igual àquele observado no tratamento controle. As plantas inoculadas com os fungos ERR 01 e ERR 42 revelaram incrementos de 36% e 46% respectivamente, no seu conteúdo de açúcares solúveis, enquanto no tratamento de inoculação com fungo ERR 16 observou-se uma redução de 39%.

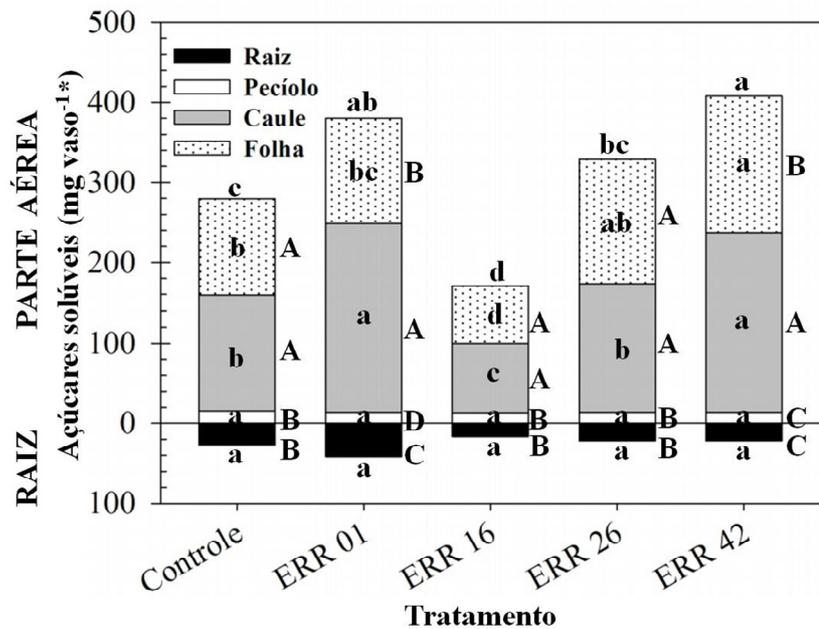


Figura 19. Conteúdo de açúcares solúveis (mg vaso^{-1}) determinado aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*. Letras iguais maiúsculas entre raiz, pecíolo, caule e folha e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente entre si (Teste t (LSD), $p < 0,05$). * Cada vaso continha quatro plantas.

Os altos incrementos observados no conteúdo de açúcares podem ser atribuídos a maior eficiência da atividade fotossintética das plantas inoculadas com os fungos ERR 01 e ERR 42, uma vez que um estudo recente demonstrou que a inoculação com isolados de FEDS pode incrementar o teor de clorofila e a eficiência quântica do fotossistema II (ZHANG et al., 2012). Por outro lado, a redução do conteúdo de açúcares solúveis observado nas plantas inoculadas com o fungo ERR 16, pode ser resultado de uma limitação fotossintética, provavelmente ocasionada por alguma regulação genética distinta no processo da interação fungo e planta, em semelhança ao ocorre na simbiose micorrízica, o que comprometeria a observação de efeitos benéficos do fungo (SON & SMITH, 1988). A mais provável explicação para estas diferentes respostas observadas nas plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) inoculadas com diferente isolados de fungos *dark septate* é a possibilidade se estar inoculando diferentes espécies de FEDS no mesmo hospedeiro (JUMPPONEN, 2001), uma vez que diferentes espécies de fungos e plantas hospedeiras apresentam características biológicas e respostas distintas (ZHANG et al., 2012). Outros trabalhos têm relatado aumentos de açúcares na planta de tomate. Andrade-Linares et al. (2011) relataram incrementos no conteúdo de glicose nos frutos de plantas de tomate colonizadas por *Leptodontidium orchidicola*, os quais foram 17% maiores que os do tratamento controle.

Com relação ao acúmulo de macronutrientes, nenhum dos tratamentos de inoculação influenciou o conteúdo de N e do Ca na parte aérea (Tabela 11 e Anexo K). Apesar de o conteúdo de N apresentar tendências de incrementos de 27%, 20% e 31% nos tratamentos de inoculação com ERR 01, ERR 26 e ERR 42, respectivamente (Tabela 11). O conteúdo de P na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados ERR 01, ERR 26 e ERR 42 foi maior quando comparado ao tratamento controle e de inoculação com ERR 16, que não apresentaram diferenças entre si (Tabela 11). Comparativamente ao controle, esses fungos mostraram incrementos de 26%, 20% e 34%, respectivamente. O conteúdo de K e Mg na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados ERR 01 e ERR 42 foi maior e com os

demais tratamentos de inoculação (ERR 16 e ERR 26) igual quando comparado ao tratamento controle. O tratamento de inoculação com o isolado ERR 01 revelou incremento de 26% e 27% e com isolado ERR 42 de 36% e 27% comparativamente ao controle, no conteúdo de Mg e K respectivamente. O conteúdo de S na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados ERR 01, ERR 26 e ERR 42 foi maior e com ERR 16 igual quando comparado ao tratamento controle. Comparado ao controle, os tratamentos de inoculação com os isolados ERR 01, ERR 26 e ERR 42 revelaram incrementos de 44%, 32% e 34%, respectivamente, no conteúdo de S. Estes resultados indicam que os fungos *dark septate* podem otimizar a eficiência de absorção e de utilização de nutrientes nas plantas associadas a estes fungos.

De forma geral, em plantas inoculadas com FEDS não se tem observado alterações no conteúdo de N da parte aérea, comparativamente ao controle, quando a fonte de N suplementada é a inorgânico, contudo quando é fornecido N orgânico, aumentos significativos no conteúdo de N na parte aérea são observados (NEWSHAM, 2011; UPSON et al., 2009). Neste trabalho, não foram observados incrementos significativos no conteúdo de N de todos os tratamentos de inoculação quando comparados ao tratamento controle.

Os tratamentos de inoculação com os isolados ERR 01, ERR 26 e ERR 42 mostraram incremento no conteúdo de P de 26%, 20% e 34% respectivamente, quando comparado ao controle. Incrementos na concentração de P da parte aérea das plantas inoculadas com isolados de FEDS têm sido observados quando suplementadas com N inorgânico (NEWSHAM, 2011; UPSON et al., 2009; NEWSHAM, 1999). Os incrementos no conteúdo de P, K, Mg e S observados nas plantas inoculadas com os isolados ERR 01 e ERR 42 podem ser atribuídos ao aumento da área de superfície de contato promovido por estes fungos.

Tabela 11. Conteúdo de macronutrientes (mg vaso⁻¹) determinado aos 38 DAG na parte aérea de plantas de tomate (cultivar Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S
	mg vaso ⁻¹ *					
Controle	77,8	16,8 c	86,6 cd	51,5	11,7 b	14,2 d
ERR 01	74,9	21,2 a	108,8 ab	65,4	14,9 a	20,4 a
ERR 16	76,7	18,0 bc	81,3 d	62,2	12,7 ab	15,1 cd
ERR 26	80,0	20,2 a	98,0 bc	61,8	14,1 ab	17,3 bc
ERR 42	88,5	22,5 a	117,5 a	67,3	15,1 a	19,0 ab
CV (%)	11,24	10,69	10,75	14,35	11,95	10,81

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste de t (LSD), p<0,05). Médias sem letra não foram significativas pelo teste F a 5% de probabilidade. DAG (dias após a germinação). * Cada vaso continha quatro plantas.

4.6.3 Biomassa e crescimento do tomateiro

Os resultados de análise de variância mostraram que houve diferenças significativas entre os tratamentos para a altura da parte aérea (Anexo L). Ao contrário, para profundidade do sistema radicular, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. As plantas inoculadas com o isolado ERR 01 mostraram maior altura da parte aérea e com os demais tratamentos de inoculação igual quando comparado ao tratamento controle (Tabela 12).

Tabela 12. Altura da parte aérea e profundidade do sistema radicular de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	Altura da parte aérea (cm)	Profundidade do sistema radicular (cm)
Controle	42,66 b	19,38
ERR 01	49,41 a	18,63
ERR 16	40,5 b	20,88
ERR 26	44,32 b	20,75
ERR 42	45,2 ab	20,25
CV (%)	7,20	13,44

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste de t (LSD), $p < 0,05$). Médias sem letra não foram significativas pelo teste F a 5% de probabilidade. DAG (dias após a germinação).

A massa seca e fresca de raiz, pecíolo, caule, folha e parte aérea da cultivar de tomate Santa Clara I-5300 está sumarizada na Tabela 13. A massa fresca de raiz e a razão raiz: parte aérea baseada tanto na massa fresca quanto na seca não respondeu a nenhum dos tratamentos (Anexo M).

Entre os tratamentos de inoculação, na presença do isolado ERR 01, de forma diferente ao controle, se observou maior massa fresca de pecíolos e caule, o que contribuiu para maior massa fresca da parte aérea (Tabela 13). No tratamento de inoculação com ERR 42 foi observado maior massa de folhas frescas. A massa fresca de pecíolo, caule, folha e parte aérea das plantas inoculadas com os isolados ERR 16 e ERR 26 foi igual ao tratamento controle.

Com relação à massa seca, diferente do observado na massa fresca, todos os isolados, a exceção do ERR 16, apresentaram maior massa seca de raiz, quando comparado ao controle (Tabela 13). As plantas inoculadas com os isolados ERR 01 e ERR 42 mostraram maior massa seca de caule e folha, comparativamente ao controle, o que resultou em maior massa seca de parte aérea observada nestes tratamentos. A maior massa de folha observada nestas plantas está de acordo com os maiores acúmulos de açúcares solúveis (Figura 19) observados nestes tratamentos, o que reforça a idéia de que estes fungos contribuam para uma maior eficiência fotossintética do seu hospedeiro. O tratamento de inoculação com ERR 42 mostrou ainda maior massa seca de pecíolos. As plantas cultivadas na presença do ERR 26, de forma diferente ao controle, apresentaram maior massa seca pecíolo, folha e parte aérea. A massa seca de pecíolo, caule, folha e parte aérea das plantas inoculados com ERR 16 foi igual ao tratamento controle.

Comparado ao controle, os tratamentos de inoculação com os isolados ERR 01 e ERR 42 revelaram incrementos de 40 % e 38% na massa seca da parte aérea, respectivamente. Estes resultados indicam a contribuição dos fungos ERR 01 e ERR 42 no crescimento da cultivar de tomate Santa Clara I-5300. Conforme discutido anteriormente (Item 3.6.3 do Capítulo II), o maior crescimento do sistema radicular observado nas plantas inoculadas com os fungos ERR 01 e ERR 42 pode estar indicando uma maior eficiência de absorção de nutrientes, o que é uma característica desejável principalmente para o cultivo sobre baixas condições de fertilidade natural.

Tabela 13. Massa fresca e seca de raízes, caule, pecíolos e folhas, e razão raiz:parte aérea de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Tratamento	Massa fresca (g vaso ^{-1*})					Raiz: Parte aérea
	Raiz	Pecíolo	Caule	Folha	Parte aérea	
Controle	7,5	3,16 bc	11,47 bc	11,95 bc	26,58 bc	0,28
ERR 01	10,0	3,54 a	15,74 a	13,69 ab	32,97 a	0,3
ERR 16	7,5	3,26 ab	10,16 c	11,22 c	24,63 c	0,3
ERR 26	8,9	2,89 c	11,58 bc	12,87 abc	27,34 bc	0,33
ERR 42	9,1	3,05 bc	12,61 b	14,23 a	29,89 ab	0,31
CV (%)	15,65	6,12	10,86	10,06	8,36	9,44
Tratamento	Massa seca (g vaso ^{-1*})					Raiz: Parte aérea
	Raiz	Pecíolo	Caule	Folha	Parte aérea	
Controle	0,32 b	0,151 c	1,16 c	1,49 c	2,81 c	0,11
ERR 01	0,47 a	0,18 c	1,6 a	2,14 a	3,92 a	0,12
ERR 16	0,36 b	0,15 c	1,04 c	1,78 bc	2,98 bc	0,12
ERR 26	0,46 a	0,27 a	1,09 c	2,01 ab	3,38 b	0,13
ERR 42	0,51 a	0,22 b	1,38 b	2,29 a	3,89 a	0,13
CV (%)	14,19	12,35	10,29	11,72	9,37	11,12

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente (Teste de t (LSD), $p < 0,05$). Médias sem letra não foram significativas pelo teste F a 5% de probabilidade. DAG (dias após a germinação). * Cada vaso continha quatro plantas.

O incremento na massa de raiz, caule, folha, parte aérea e altura da planta observado neste estudo, sobretudo nas plantas inoculadas com os fungos ERR 01 e ERR 42 (Tabela 12 e Tabela 13), pode ser atribuído ao melhor estado nutricional destas plantas, em função da maior eficiência fotossintética que foi evidenciado pelos maiores acúmulos de açúcares solúveis (Figura 19) e maior eficiência de absorção de nutrientes, evidenciado pela maior massa do sistema radicular (Tabela 13) e em parte, pela maior $V_{máx}$ (Tabela 10) observada no tratamento de inoculação com ERR 42. Portanto, o menor acúmulo de $N-NO_3^-$ (Figura 16), que foi observado nas plantas inoculadas com ERR 01, pode ser atribuído a maior demanda da planta por este nutriente, uma vez que estas plantas apresentaram maior massa seca comparativamente ao controle (Tabela 13), contudo, apresentaram menor $V_{máx}$, diferente do aconteceu no tratamento de inoculação com ERR 42.

Incrementos na massa fresca e seca de plantas de tomate inoculadas com isolados de fungos *dark septate* têm sido relatados. Recentemente, um estudo que utilizou tomate e a repolho chinês como plantas-isca, na tentativa de capturar fungos *dark septate*, identificou as espécies, *Scolecobasidium humicola*, *Leptodontidium orchidicola* e *Phialocephala fortinii*, em solos dos sistemas agrícolas e florestais, colonizando estas espécies vegetais e observou maior massa seca nas plantas de tomate inoculadas com *Scolecobasidium humicola*, especialmente quando as plantas foram supridas com fontes orgânicas de N no meio de cultivo (MAHMOUD & NARISAWA, 2013). Em trabalho prévio, foi relatado que a *Leptodontidium orchidicola* é capaz de promover incrementos na biomassa da parte aérea de plantas de tomate, assim como na biomassa e conteúdo de glicose dos seus frutos (ANDRADE-LINARES et al., 2011).

4.7. CONCLUSÕES

Entre os fungos *dark septate* avaliados, ao menos os fungos ERR 01 e ERR 42 seguramente apresentam potencial para a promoção do crescimento vegetal do tomateiro. De acordo com os resultados obtidos, estes isolados são capazes de propiciar aumento da absorção de nutrientes, maior acúmulo de açúcares na parte aérea e maior produção de biomassa do vegetal. Além disso, a presença do fungo ERR 42 no tomateiro propicia aumento da $V_{\text{máx}}$ da absorção de N-NO_3^- associado ao maior acúmulo deste ânion na raiz e caule.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Todos os fungos testados são capazes de crescer nos diferentes pHs testados, sendo que o crescimento dos fungos ERR 02 e ERR 46 aparentemente não é afetado pelo valores de pH testados. Entre os fungos testados, dois fungos (ERR 02 e ERR 04) alcalinizam o meio BDA e os demais acidificam. Nenhum dos isolados fúngicos testados é capaz de solubilizar o fosfato de cálcio.

Todos os isolados são capazes de crescer no extrato de *Canavalia ensiformis*, sendo que o isolado ERR 04 utiliza melhor fontes orgânicas e inorgânicas de nutrientes para seu crescimento e mostra-se promissor para teste de transferência de nutrientes diretamente da matéria orgânica para o seu hospedeiro.

O fungo ERR 16 apresenta potencial para a promoção do crescimento vegetal do arroz e os fungos ERR 01 e ERR 42 para o tomate.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como a literatura dispõe de poucas informações sobre os fungos *dark septate*, devem ser realizados outros experimentos para caracterizar-se morfofisiologicamente outros isolados deste grupo de fungos, bem como, para empregar os melhores resultados obtidos neste estudo (Capítulo I), relacionando o comportamento dos fungos *in vitro* à resposta do hospedeiro inoculado. É possível que nos ensaios de solubilização de fosfato de cálcio, deva-se utilizar o manitol como fonte de carbono ao invés da glicose, pois, a espécie de FIEDS, *Heteroconium chaetospira*, acumulou mais manitol na hifa, do que trealose e glicose (USUKI & NARISAWA, 2007).

Faz-se necessária, a determinação das frações nitrogenadas (N-NO₃⁻; N-NH₄⁺ e N-amino livre), açúcares solúveis e parâmetros cinéticos da absorção de nutrientes (V_{máx}, K_M e C_{min}) para uma seleção mais consistente de isolados de fungos *dark septate* promotores do crescimento vegetal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUZINADAH, R. H.; REID, D. J. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 1986.
- ADDY H. D.; PIERCEY M. M.; CURRAH R. S. Microfungal endophytes in roots. **Can J Bot.**, 83:1-13, 2005.
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004, p. 391.
- AMES, R. N.; REID, C. P.; PORTER, L. K.; CAMBARDELLA C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae*, vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 95, p. 381-396, 1983.
- ANDRADE-LINARES, D. R.; GROSCH, R.; RESTREPO S.; KRUMBEIN, A. & FRANKEN, P. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. **Mycorrhiza**, v. 21 p.413-422. 2011.
- BANGERA, M. G.; THOMASHOW, L.S. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. **J Bacteriol**, 181:3155-3163, 1999.
- BAPTISTA, J. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz Agulha e Bico Ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. 7, p. 1325-1330, 2000.
- BELLEI, M. M.; CARVALHO, E. M. S. Ectomicorrizas In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. (Ed.) **Microbiologia do solo**. Campinas-SP, 1992. p.297-318,
- BERBARA, R. L. L.; MORRIS, B. M.; FONSECA, H. M. A. C.; REID, M.; GOW, N. A. R.; DAFT, M. J. Electrical currents associated with arbuscular mycorrhizal interactions. **New Phytologist**, Oxford, v. 129, p. 433-438, 1995.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A. & FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S (ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 53 – 88.
- BLEE K. A. & ANDERSON A. J. Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. **Plant Molecular Biology**, 50: 197-211, 2002.
- BOMBERG, M.; JURGENS, G.; SAANO, A.; SEN, R.; TIMONEN, S. Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizospheres developed in boreal forest humus microcosms. **Fems Microbiology Ecology**, 43: 163-171, 2003.
- BORGES, W. L.; SANTOS, C. E. R. S.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e fixação biológica do nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife 2:32-37, 2007.
- BUCHER, C. A. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz**. 2007. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,

Seropédica, RJ, 2007.

BUCHER, C. A. **Expressão de genes relacionados à absorção e metabolismos de nitrogênio em Arroz sob alto e baixo suprimento de nitrato**. 2011. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência de Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

BUCKING, H. Phosphate absorption and efflux of three ectomycorrhizal fungi as affected by external phosphate, cation and carbohydrate concentrations. **Mycological Research**, 108: 599-609, 2004.

CAMEL, S. B.; REYES-SOLIS, M. G.; FERRERA-CERRATO R.; FRANSON, R. L.; BROWN, M. S.; BETHLENFALVAY, G. J. Growth of VA mycorrhizal mycelium through bulk soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 55, p. 389-393, 1991.

CANTARELLA, H.; ANDRADE, C. A.; MATTOS Jr., D. Matéria orgânica do solo e disponibilidade de N para as plantas. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P. & CAMARGO, F. A. O. (Eds.). **Fundamentos da Matéria orgânica do solo**. 2. ed. Porto Alegre, 2008. v. 1. p. 581-595.

CAVALCANTE, D. M. T.; GOTO. B. T.; MAIA, L. C. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 5 e 6, p.180-208, 2008-2009.

CERQUEIRA, F. B. **Competição inicial entre cultivares de arroz de terras altas tolerantes à seca e *Spermacoce verticillata* sob condição de estresse hídrico**. 2009. 94p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, 2009.

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

CLARK, R. B. Effect of aluminum on growth and mineral elements of Al-tolerant and Al-intolerant corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.47, n.3, p. 653-662, 1977.

COMETTI, N. N.; FURLANI, P. R.; RUIZ, H. A.; FILHO, E. I. F. Soluções nutritivas: formulações e aplicações. In: FERNANDES M. S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. Vicosa, 2006. pp. 89-144.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: Acompanhamento brasileiro da safra de grãos 2011/2012: oitavo levantamento, Maio, 2012. Disponível em:< <http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 25/03/2012.

CRESS, W. A.; THRONEBERRY, G. O.; LINDSEY; D. L. Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and nonmycorrhizal tomato roots. **Plant Physiology**, v.64, p.484-487, 1979.

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

EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. **Mineral Nutrition of plants: Principles and Perspectives**. 2ª ed. Sunderland, MA: Sinauer.

FAQUIN, V.; MALAVOLTA, E.; MURAOKA, T. Cinética da absorção de fosfato em soja

sob influência de micorriza vesículo-arbuscular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.41-48, 1990.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49,1980, 1977.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; SILVA JUNIOR, E. B.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: Survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. **African Journal of Biotechnology**, 11: 2945-2951, 2012.

FERNANDES, M. S. N. Carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of Rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.

FERNANDO, A. A.; CURRAH, R. S.. A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. **Can. J. Bot.**, 74: 1071–1078, 1996.

FERREIRA, D. F. **Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR)**. Versão 4.3. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2003.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed: Viçosa: UFV, 2008, p. 412.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, 66:497-504, 2007.

FREITAS, L. B. **Silício na tolerância ao alumínio por plantas de arroz**. Botucatu, 2011. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônomicas). Faculdade de Ciências Agrônomicas – Universidade estadual paulista “júlio de mesquita filho”, Botucatu, 2011.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. 2007. In: SILVEIRA, A. P. D. & FREITAS, S. S. (Eds.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. p. 312.

FU-QIANG, S.; XIANG-SHI, K.; YING, L.; DAN-DAN, Q. Influence Arbuscular Mycorrhizal Fungi Have over Soluble Sugar Contents and Endogenous Hormone Levels of *Amorpha fruticosa*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, pp.1525-1529, 2012.

FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. **Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas**. Campinas: Instituto Agronômico, 1988. (IAC. Boletim técnico, 121).

GAMPER H.; PETER, M.; JANSKA, J.; LUSCHER, A.; HARTWIG, U. A.; LEUCHTMANN, A. Arbuscular mycorrhizal fungi benefit from 7 years of free air CO₂ enrichment in well-fertilized grass and legume monocultures. **Global Change Biology**, 10: 189-199, 2004.

GARDES, M.; DAHLBERG, A. Mycorrhizal diversity in Arctic and alpine tundra: an open question. **New Phytologist**, 133: 147–157, 1996.

GAXIOLA, R. A.; PALMGREN, M. G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **FEBS Lett.**, 581:2204–2214, 2007.

GIRIM, T.; LEJAY, L.; WIRTH, J.; WIDIEZ, T.; PALENCHAR, P. M.; NAZOA, P.;

TOURAINÉ, B.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Identification of a 150 bp cis-activating element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status in the plant. **Plant, Cell and Environment**, 30:1366-1380, 2007.

GRIST, D. H. **Rice**. London: Longman, 1975, 601p

GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K. & BARBOSA FILHO, M. P. **Como a planta de arroz se desenvolve**. Encarte do informações agronômicas nº 99 – setembro/2002.

GUTJAHR, C.; PASZKOWSKI, U. Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. **Mol Plant-Microb Interact**, 22:763–772, 2009.

HARRISON, M. J.; DEWBRE G. R. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **The Plant Cell**, 14: 2413-2429, 2002.

HAUG, A. Molecular aspects of aluminum toxicity. **CRC Crit. Rev. Plant. Sci.**, 1:345–373,1983.

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

HOU, X. Q.; GUO, S. X. Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium sp.* and roots of *D. nobileseedlings*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.51, n.4, p.374-381, abr., 2009.

JEFFRIES, P.; GIANINAZZI, S.; PEROTTO, S.; TURNAU, K.; & BAREA, J. M. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biology & Fertility of Soils**, 37: 1-16, 2003.

JOLICOEUR, M.; BOUCHARD-MARCHANC, E.; BECARD, G.; PERRIER, M. Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a structured nutritional dual model. **Ecological Modelling**. 158: 121-142, 2002.

JUMPPONEN A. Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? **Mycorrhiza**, 11, 207–211, 2001.

JUMPPONEN, A. & TRAPPE, J. M. Dark septateroot endophytes: a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis. **New Phytologist**, v.140, n.2,p.295-310, 1998.

JUMPPONEN, A.; MATTSON, K.; TRAPPE, J. M. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier fore front soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. **Mycorrhiza**, v.7, n.5, p.261–265, 1998.

KARUNARATNE, R.S.; BARBER, J.H.; BARKER, M. Phosphorus uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v.9, p.1303-1313, 1986.

KLOEPPER, J. W . & SCHROTH, M. N . Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Int. conf. plant pahogenic bacteria, IV , 1978. **Proceedings**, 2. p. 879-882, 1978.

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

LEITE, J. **Caracterização de bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi**. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. **R. Bras. Ci. Solo**, 33:1215-1226, 2009.

ARRUDA, L. N. **Metilação diferencial do DNA e metabolismo do nitrogênio em variedades de arroz submetidas a alto e baixo suprimento de nitrato**. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2014.

LI, Y. H.; ZHENG, F.; NI, D. J.; YANG, J.F. & SHI, Y. T. Study on Physiological Characteristic of Tea Plant Inoculated by VA Mycorrhiza. **Journal of Tea Science**, v.3, p.504-512, 2011.

LI, T.; LIU, M. J.; ZHANG, X. T.; ZHANG, H. B.; SHA, T.; ZHAO, Z. W. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. **Science of the Total Environment**, 409 : 1069–1074, 2011.

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mucuna cinza e mucuna anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 36:337-348, 2012.

LIMA, W. L. **Metabolismo do nitrogênio e atividade de bombas de prótons em raízes transgênicas com ácido húmico e simbiose micorrízica arbuscular**. 2008. 136p. Tese (mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

LUCINI, T. **Mecanismos de resistência ao ácaro rajado em genótipos de tomateiro com altos teores de acil-açúcares**. 2013. 58p. Dissertação (mestrado em Produção vegetal) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, 2013.

LYRA, M. C. C. P.; FREITAS, A. D. S.; SILVA, T. A.; SANTOS, C. E. R. S. Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **African Journal Biotechnology**, 12: 2147-2156, 2013.

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

MANDYAM, K. **Dark septate fungal endophytes from tallgrass prairie and their continuum of interactions with host plants**. 2008. 136p. Ph. D dissertation. Division of Biology, Kansas state University, Manhattan, 2008

MARRA, L .M.; OLIVEIRA, S. M.; SOARES C. R. F. S.; MOREIRA, F. M. S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, 68:603-609, 2011.

MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, 357:289-307, 2012.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**. San Diego. 1995.

MARTIN, F.; BOTTON, B. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. **Advances in Plant Pathology**, 9:82-102, 1993.

- MARTIN, F.; CHALOT, M.; BRUN, A.; LORILLOU, S.; BOTTON, B.; DELL, B. Spatial distribution of nitrogen assimilation pathway in ectomycorrhizas. In: READ, D.; LEWIS, D.; FITTER, A.; ALEXANDER, I. (eds.). **Mycorrhizas In Ecosystems**. Wallingford, 1992.
- MARTINS, L. M. V; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 1005, 1997.
- MATTJE, V. M.; FIDELIS, R. R.; AGUIAR, R. W. S. BRANDÃO, D. R. SANTOS, M. M. Evaluation of rice cultivars contrasting in doses of nitrogen in soils of irrigated lowland. **J. Biotec. Biodivers.**, v. 4, n.2: pp. 126-133, 2013.
- MELIN E. Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.) Karst. In: FALCK R. ed. **Mykologische Untersuchungen und Berichte 2**. Kassel: Druck und Verlag G. Gottheilt. 1923. p 73–334.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G & WINK, D. A. A Rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, V. 5, N. 1, pp. 62–71, 2001.
- MIYASAKA, S. C. & HABTE, M. Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. **Communications in Soil Science & Plant Analysis**, 32, 1101-1147, 2001.
- MOREIRA, F. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia Bioquímica do Solo**. 2/Ed. Editora UFLA, Lavras, (2006).
- NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. V. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Agrodok 17, 2006, 104 p.
- NAZOA, P.; VIDMAR, J. J.; TRANBARGER, T. J.; MOULINE, K.; DAMINI, L.; TILLARD, P.; ZHO, D.; GLASS, A. D. M. & TOURAINÉ, B. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: response to nitrate, amino acids and development state. **Plant Molecular Biology**, 52: 689-703, 2003.
- NEWSHAM, K. K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, 190(3), 783-793, 2011.
- NEWSHAM, K. K. *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. **New Phytol**, 144:517–524, 1999.
- NEWSHAM, K. K.; UPSON, R.; READ, D. J. Mycorrhizas and dark septate endophytes in polar regions. **Fungal Ecology** 2: 10–20, 2009.
- OLIVEIRA, S.M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão-comum, caupi e sitrato**. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.
- PEREIRA, G. M. D. ; RIBEIRO, K. G.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; VITAL, M. J. S. ; KASUYA, M. C. M. ; ZILLI, J. E. Ocorrência de fungos endofíticos dark septate em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46: 331-334. 2011.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur, 1998. 159 p.

- POSTMA, J.; OLSSON, P. A.; FALKENGREN-GRERUP, U. Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. **Soil Biol. Biochem.**, 39:400–408, 2007.
- RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSKA, J.; LALOI, M.; LEGGEWIE G.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, 414: 462-466, 2001.
- RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSKA, J.; LALOI, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, 414:462-466, 2001.
- READ, D. J.; HASELWANDTER, K. Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. **New Phytol**, 88: 341–352, 1981.
- REEVE, J. R.; SMITH, J. L.; BOGGS, L. C.; REGANOLD, J. P. Soil-based cycling and differential uptake of amino acids by three species of strawberry (*Fragaria* spp.) plants. **Soil Biol Biochem**, 40: 2547–2552, 2008.
- REININGER, V. **Ecology of fungal root endophytes in a changing climate - a case study with taxa of the *Phialocephala fortinii* s.l. - *acephala* *applanata* species complex**. 2012. 121p. (Tese de doutorado) - ETH ZURICH, Zurich, 2012.
- REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; BUZZETTI, S. & ANDREOTTI, M. Diagnóstico da exigência em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. **Bragantia**, 65:163-171, 2006.
- RIBEIRO, K. G. **Fungos endofíticos dark septates em arroz silvestre *Oryza glumaepatula* Steud.** 2011. 68p. Dissertação (mestrado em Recursos Naturais)- Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR, 2011.
- RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, G. M. D.; MOSQUEIRA, C. A.; BARAÚNA, A. C.; VITAL, M. J. S.; SILVA K.; ZILLI, J. E. Isolamento, armazenamento e determinação da colonização por fungos dark septate a partir de plantas de arroz. **Agro@mbiente**, 5: 97-105, 2011.
- RILLIG, M. C. & MUMMEY, D. L. Mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, 171, 41-53, 2006.
- ROBERTS, P.; NEWSHAM, K. K.; BARDGETT, R. D.; FARRAR, J. F.; JONES, D. L. Vegetation cover regulates the quantity, quality and temporal dynamics of dissolved organic carbon and nitrogen in Antarctic soils. **Polar Biology**, 32: 999–1008, 2009.
- ROSA, M. S.; SANTOS, P. P.; VEASEY, E. A.. Caracterização agromorfológica interpopulacional em *Oryza glumaepatula*. **Bragantia**, n.65, v.1, p.1-10, 2006.
- RUOTSALAINEN, A. L.; ESKELINEN, A. Root fungal symbionts interact with mammalian herbivory, soil nutrient availability and specific habitat conditions. **Oecologia**, 166:807–817, 2011.
- SANTI, S., LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO S.; VARANINI Z. Plasma membrane H⁺ATPase in maize roots induced for NO₃⁻ uptake. **Plant Physiology**, 109: 1277–1283, 1995.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N.; SOUTO S. M. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região nordeste do Brasil, na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea*). **Acta Sci.**, 27: 305-312, 2005.
- SANTOS, L. A. **Absorção e Remobilização de NO₃⁻ em arroz (*Oryza sativa* L.): atividade**

das bombas de prótons e a dinâmica do processo. 2006. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

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

SANTOS, L. A.; BUCHER; C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Metabolismo de nitrogênio em arroz sob níveis decrescentes de nitrato. **Agronomia**, v.39, n°.1-2, p.28 - 33, 2005.

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

SCHENK, M. K.; BARBER, S. A. Root characteristics of corn genotypes as related to P uptake. **Agronomy Journal**, Madison, v.71, n.6, p.921-924, 1979.

SHARMA, B. B. & JHA, D. K. Arbuscular mycorrhiza and dark septate fungal associations in medicinal and aromatic plants of Guwahati. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, 2 (1):212-222, 2012.

SHEN, H.; YANG, H. & GUO, T. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and ammonium:nitrate ratios on growth and pungency of spring onion plants. **Journal of Plant Nutrition**, 34:743–752, 2011.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microorganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.311-319, 2000.

SILVEIRA, A. P. D. & CARDOSO, E. J. B. N. Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. **Sci. Agric.**, 61, 203–209, 2004.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2nd/Ed. Academic Press, London, UK, 1997.

SON C. L.; SMITH S. E. Mycorrhizal growth responses: interactions between photon irradiance and phosphorus nutrition. **New Phytologist**, 108: 305-314, 1988.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiol.**, 136: 2475–2482, 2004.

SOUZA, F. A.; SILVA, I. C. L.; BERBARA, R. L. L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. p. 482-536.

SOUZA, S. R. ; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, n. 21, p. 2049-2063, 1998.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; DE

SOUZA S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, 180:251–258, 2011.

SPERANDIO, M.V.L. **Expressão gênica de transportadores de nitrato e amônio, proteína reguladora de NAR e bombas de prótons em Arroz (*Oryza sativa* L.) e seus efeitos na eficiência de absorção de nitrogênio**. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência de Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. 2^a Ed. New York: Oxford University Press. 2008. 321p.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev**, 24:487-506, 2000.

STOHL, E. A.; MILNER, J. L.; HANDELSMAN, J. Zwittermicin a biosynthetic cluster. **Gene**, 237:403-411,1999.

STOYKE G, CURRAH RS. 1991. Endophytic Fungi from the Mycorrhizae of Alpine Ericoid Plants. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique**, 69(2): 347-352, 1991.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, 12:15-22, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. p. 449-484.

TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca, e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄. UFRGS. 1982.23p.

TELLENBACH, C. & SIEBER, T. N. Do colonization by dark septate endophytes and elevated temperature affect pathogenicity of oomycetes? **FEMS Microbiol Ecol**, 1–12, 2012.

THIBAUD, J. B. & GRIGNON, C. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. **Plant Sci.**, 22:279–289, 1981.

UPSON, R., READ, D., & NEWSHAM, K. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. **Mycorrhiza**, 20(1), 1-11, 2009.

USUKI, F.; NARISAWA, K. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Repolho chinês. **Mycologia**, 99(2), 175-184, 2007.

VIERECK, N.; HANSEN, P. E.; JAKOBSEN, I. Phosphate pool dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* studied by in vivo P-31 NMR spectroscopy. **New Phytologist**. 162: 783-794, 2004.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; FROMMER, W. B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.196, n.2, p.191-199, 1997.

VONWIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; GOJON, A.; FROMMER, W. B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 3: 254–261, 2000.

WILLER, H.; LERNOUD, J.; HOME, R. The World of Organic Agriculture – Statistics and

Emerging. Trends 2013. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), 2013.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous solutes. Annual Review In **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, CA-USA, v.52, p.659-688, 2001.

WRIGHT, S. F. & UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science**, 161, 575-586, 1996.

WU, L.; GUO, S. Interaction between an isolate of dark-septate fungi and its host plant *Saussurea involucreta*. **Mycorrhiza**, v.18, n.2, p.79–85, 2008.

YEMM, E. W. & COCKING, E.C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.

YEMM, E.W. & WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: IRRI, 1981. 269p.

YUAN, Z. L.; LLIN, F. C.; ZHANG, C. L.; KUBICEK, C. P. A new species of *Harpophora* (*Magnaporthaceae*) recovered from healthy wild rice (*Oryza granulata*) roots, representing a novel member of a beneficial dark septate endophyte. **FEMS Microbiology Letters**, v.307, n.5, p. 94–101, abr., 2010.

ZHANG, H.; TANG, M.; CHEN, H.; WANG, Y. Effects of a Dark-Septate Endophytic Isolate LBF-2 on the Medicinal Plant *Lycium barbarum* L. **The Journal of Microbiology**. V. 50. n. 1, p. 91–96, 2012.

8 ANEXOS

Anexo A. Resultados da análise de variância das variáveis investigadas aos 12 dias após a inoculação de isolados de FEDS em diferentes meios de cultura a base de fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nutrientes.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Velocidade de crescimento micelial (mm dia⁻¹)	Diâmetro micelial (mm isolado⁻¹)	Massa da colônia fúngica (mg isolado⁻¹)
Repetição	2	0,6856 ^{ns}	0,6856 ^{ns}	0,0012*
Isolado	11	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Meio	5	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Meio x Isolado	55	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Erro	178	-	-	-
CV		4,97	4,42	40,07

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente.

Anexo B. Resultados da análise de variância de parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da absorção de NO_3^- determinados aos 35 DAG em plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Repetição	3	0,3496 ^{ns}	0,7724 ^{ns}
Tratamento	4	0,7200 ^{ns}	0,0022*
Erro	12	-	-
CV(%)		25,81	26,21

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo C. Resultados da análise de variância do teor e conteúdo de N-NO₃⁻, N-amino livre, N-NH₄⁺ e açúcares solúveis determinados aos 35 DAG na raiz, bainha e folha de plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Teor (μmol g ⁻¹ massa fresca)			Teor (mg g ⁻¹ massa fresca)
		N-NO ₃ ⁻ livre	N-amino livre	N-NH ₄ ⁺ livre	Açúcares solúveis
Repetição	3	0,8677 ^{ns}	0,0610 ^{ns}	0,1762 ^{ns}	0,7836 ^{ns}
Fungo	4	0,0000*	0,0013*	0,0298*	0,0355*
Parte	2	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Fungo x Parte	8	0,0110*	0,0002*	0,0202*	0,0362*
Erro	42	-	-	-	-
CV(%)		22,37	16,74	26,61	16,54
		Conteúdo (μmol vaso ⁻¹)			Conteúdo (mg vaso ⁻¹)
Repetição	3	0,9587 ^{ns}	0,0555 ^{ns}	0,1959 ^{ns}	0,9602 ^{ns}
Fungo	4	0,0083*	0,0000*	0,0008*	0,0000*
Parte	2	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Fungo x Parte	8	0,4493 ^{ns}	0,0001*	0,0101*	0,0002*
Erro	42	-	-	-	-
CV(%)		22,28	16,41	25,12	19,46

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo D. Resultados da análise de variância de teor e conteúdo de N-NO₃⁻, N-amino livre, N-NH₄⁺ e açúcares solúveis determinados aos 35 DAG na parte aérea de plantas de arroz (var. Piauí) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Teor (μmol g ⁻¹ massa fresca)			Teor (mg g ⁻¹ massa fresca)
		N-NO ₃ ⁻ livre	N-amino livre	N-NH ₄ ⁺ livre	Açúcares solúveis
Repetição	3	0,8912 ^{ns}	0,0561 ^{ns}	0,1416 ^{ns}	0,7173 ^{ns}
Tratamento	4	0,0015*	0,0026*	0,0363*	0,0436*
Erro	12	-	-	-	-
CV(%)		14,94	10,67	16,78	9,31
		Conteúdo (μmol vaso ⁻¹)			Conteúdo (mg vaso ⁻¹)
Repetição	3	0,9587 ^{ns}	0,1395 ^{ns}	0,2103 ^{ns}	0,9911 ^{ns}
Tratamento	4	0,1114 ^{ns}	0,0001*	0,0121*	0,0000*
Erro	12	-	-	-	-
CV(%)		14,49	10,71	16,33	12,73

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo E. Resultados da análise de variância das variáveis investigadas para estudo de macronutrientes em plantas de arroz (var. Piauí) com 35 DAG com e sem inoculadas com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	N	P	K	Ca	Mg	S
		Teores (mg g ⁻¹)					
Repetição	3	0,3571 ^{ns}	0,1104 ^{ns}	0,3719 ^{ns}	0,4646 ^{ns}	0,6901 ^{ns}	0,8066 ^{ns}
Tratamento	4	0,6651 ^{ns}	0,0000*	0,0062*	0,0199*	0,0008*	0,6990 ^{ns}
Erro	12	-	-	-	-	-	-
CV(%)		6,29	2,07	8,68	12,77	5,85	3,84
		Conteúdo (mg vaso ⁻¹)					
Repetição	3	0,3796 ^{ns}	0,6052 ^{ns}	0,6266 ^{ns}	0,8370 ^{ns}	0,6784 ^{ns}	0,6068 ^{ns}
Tratamento	4	0,0000*	0,0000*	0,0016*	0,0165*	0,0000*	0,0000*
Erro	12	-	-	-	-	-	-
CV(%)		9,22	7,47	13,94	18,41	7,44	8,73

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo F. Resultados da análise de variância de altura da parte aérea, profundidade do sistema radicular e número de perfilhos de plantas de arroz (var. Piauí), com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate* e controle.

Fonte de Variação	Profundidade do sistema radicular (cm)	Altura Parte aérea (cm)	Perfilhos (un. vaso ⁻¹)
Repetição	0,6845 ^{ns}	0,6066 ^{ns}	0,6628 ^{ns}
Tratamento	0,0288*	0,0030*	0,0000*
Erro	-	-	-
CV(%)	8,22	3,90	10,85

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo G. Resultados da análise de variância da massa fresca e seca de raízes, bainhas, folhas e parte aérea, e razão raiz:parte aérea de plantas de arroz, (var. Piauí) com 35 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Massa Fresca (g vaso ⁻¹)			
		Raiz	Bainha	Folha	Parte aérea
Repetição	3	0,2634 ^{ns}	0,9184 ^{ns}	0,3747 ^{ns}	0,7033 ^{ns}
Tratamento	4	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Erro	12	-	-	-	-
CV(%)		10,20	9,36	7,43	7,87
		Massa seca (g vaso ⁻¹)			
Repetição	3	0,4950 ^{ns}	0,8093 ^{ns}	0,6484 ^{ns}	0,7168 ^{ns}
Tratamento	4	0,0001*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Erro	12	-	-	-	-
CV(%)		11,40	12,54	7,09	8,53

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo H. Resultados da análise de variância dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_M da absorção de N-NO_3^- determinados aos 38 DAG em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300) com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Repetição	3	0,0614 ^{ns}	0,0520 ^{ns}
Tratamento	4	0,0000*	0,0055*
Erro	12	-	-
CV(%)		20,11	23,55

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo I. Resultados da análise de variância do teor e conteúdo de N-NO_3^- , N-amino livre, N-NH_4^+ e açúcares solúveis da raiz, pecíolo, caule e folha de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Teor ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca)			Teor (mg g^{-1} massa fresca)
		N-NO_3^- livre	N-amino livre	N-NH_4^+ livre	Açúcares solúveis
Repetição	3	0,4065 ^{ns}	0,1856 ^{ns}	0,1395 ^{ns}	0,3803 ^{ns}
Fungo	4	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Parte	3	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Fungo x Parte	12	0,0000*	0,0036*	0,0000*	0,0000*
Erro	57	-	-	-	-
CV(%)		16,77	9,83	9,77	15,56
Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Conteúdo ($\mu\text{mol vaso}^{-1}$)			Conteúdo (mg vaso^{-1})
		N-NO_3^- livre	N-amino livre	N-NH_4^+ livre	Açúcares solúveis
Repetição	3	0,2733 ^{ns}	0,0543 ^{ns}	0,155 ^{ns}	0,1199 ^{ns}
Fungo	4	0,0002*	0,0359*	0,4610 ^{ns}	0,0000*
Parte	3	0,0000*	0,0000*	0,0000*	0,0000*
Fungo x Parte	12	0,0000*	0,0185*	0,0149*	0,0000*
Erro	40	-	-	-	-
CV(%)		19,67	15,21	17,44	22,92

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo J. Resultados da análise de variância do teor e conteúdo de N-NO₃⁻, N-amino livre, N-NH₄⁺ e açúcares solúveis na parte aérea de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Teor (µmol g ⁻¹ massa fresca)			Teor (mg g ⁻¹ massa fresca)
		N-NO ₃ ⁻ livre	N-amino livre	N-NH ₄ ⁺ livre	Açúcares solúveis
Repetição	3	0,4715ns	0,5169ns	0,3751ns	0,3826ns
Tratamento	4	0,0000*	0,0001*	0,0000*	0,0000*
Erro	12	-	-	-	-
CV(%)		10,74	6,37	5,20	8,23
		Conteúdo (µmol vaso ⁻¹)			Conteúdo (mg vaso ⁻¹)
Repetição	3	0,7796ns	0,0905ns	0,0605ns	0,0655ns
Tratamento	4	0,0030*	0,0392*	0,3152ns	0,0000*
Erro	12	-	-	-	-
CV(%)		12,77	9,12	10,94	14,21

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo K. Resultados da análise de variância das variáveis investigadas para estudo de macronutrientes em plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	N	P	K	Ca	Mg	S	
		Teores (mg g ⁻¹)						
Repetição	3	0,7386 ^{ns}	0,4730 ^{ns}	0,3814 ^{ns}	0,1222 ^{ns}	0,5815 ^{ns}	0,9391 ^{ns}	
Tratamento	4	0,0001*	0,0011*	0,3525 ^{ns}	0,0003*	0,1459 ^{ns}	0,2783 ^{ns}	
Erro	12	-	-	-	-	-	-	
CV(%)		7,64	3,17	9,40	9,37	6,98	3,61	
		Conteúdo (mg vaso ⁻¹)						
Repetição	3	0,7531 ^{ns}	0,1547 ^{ns}	0,2388 ^{ns}	0,3002 ^{ns}	0,2438 ^{ns}	0,2964 ^{ns}	
Tratamento	4	0,2780 ^{ns}	0,0104*	0,0011*	0,1617 ^{ns}	0,0475*	0,0012*	
Erro	12	-	-	-	-	-	-	
CV(%)		11,24	10,69	10,75	14,35	11,95	10,81	

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo L. Resultados da análise de variância de profundidade do sistema radicular e altura da parte aérea de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

FV	GL	Profundidade do sistema radicular (cm)	Altura da Parte aérea (cm)
REP	3	0,8522 ^{ns}	0,6240 ^{ns}
TRAT	4	0,6699 ^{ns}	0,0120*
Erro	12	-	-
CV(%)		12,40	6,91

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente. DAG (Dias após a germinação).

Anexo M. Resultados da análise de variância da massa fresca e seca de raízes, pecíolos, caules, folhas e parte aérea e, razão raiz:parte aérea de plantas de tomate (cult. Santa Clara I-5300), com 38 DAG, com e sem inoculação com diferentes isolados de fungos *dark septate*.

FV	GL	Massa fresca (g vaso⁻¹)					Raiz: Parte Aérea
		Raiz	Pecíolo	Caule	Folha	Parte aérea	
REP	3	0,1916 ^{ns}	0,2844 ^{ns}	0,3486 ^{ns}	0,0997 ^{ns}	0,1647 ^{ns}	0,1333 ^{ns}
TRAT	4	0,0715 ^{ns}	0,0037*	0,0004*	0,0286*	0,0016*	0,3775 ^{ns}
Erro	12	-	-	-	-	-	-
CV(%)		15,65	6,12	10,86	10,06	8,36	9,44
FV	GL	Massa Seca (g vaso⁻¹)					Raiz: Parte Aérea
		Raiz	Pecíolo	Caule	Folha	Parte aérea	
REP	3	0,5757 ^{ns}	0,8641 ^{ns}	0,1507 ^{ns}	0,3018 ^{ns}	0,1222 ^{ns}	0,9708 ^{ns}
TRAT	4	0,0030*	0,0000*	0,0001*	0,0015*	0,0003*	0,2279 ^{ns}
Erro	12	-	-	-	-	-	-
CV(%)		14,19	12,35	10,29	11,72	9,37	11,12

*, ns: significativo ao nível de 5% e não significativo, respectivamente.