

ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
ARROZ (AVP10X) INOCULADAS COM *Piriformospora indica*

VÍVIAN RIBEIRO PIMENTEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2018

ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
ARROZ (AVP10X) INOCULADAS COM *Piriformospora indica*

VÍVIAN RIBEIRO PIMENTEL

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Alessandro Coutinho Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P644

Pimentel, Vívian Ribeiro.

ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE ARROZ (AVP1OX) INOCULADAS COM *Piriformospora indica* / Vívian Ribeiro Pimentel. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

73 f. : il.

Bibliografia: 47 - 58.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

1. *Piriformospora indica*. 2. AVP1OX. 3. Associação simbiótica. 4. Arroz transgênico. 5. Interação planta-microorganismo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ECOFISIOLOGIA E NUTRIÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE
ARROZ (AVP10X) INOCULADAS COM *Piriformospora indica*

VÍVIAN RIBEIRO PIMENTEL

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Comissão Examinadora

Prof. Inga Gonçalves de Azevedo (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – SEEDUC

Prof. Frederico Jacob Eutrópio (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) – ICCA

Prof. Cesar Abel Krohling (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) - INCAPER

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha mãe, Roseli Ribeiro, meu padrasto Ronaldo dos Santos, meu amado irmão Guilherme Ribeiro, meu namorado Jefferson Pontichelli, aos meus amigos e ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, perseverança e paciência aplicadas durante o mestrado, pois somente através d'Ele pude superar os momentos difíceis vividos no dia a dia dos últimos anos;

Ao professor Alessandro Coutinho Ramos, pela orientação e, acima de tudo, pela amizade, pelas oportunidades, ensinamentos diários e aprendizados que me proporcionou;

Aos companheiros do grupo de pesquisa Winny Silva Trugilho, Isabelle Faria e Carlos Moacir Colodete, pela amizade e o ótimo convívio de laboratório. Em especial à Winny, que se tornou uma grande amiga nesse tempo corrido, dividindo comigo os sucessos e frustrações;

Ao Colodete pela oportunidade e confiança em me envolver com sua pesquisa. Trabalhar com você foi um dos momentos mais ricos do mestrado;

Ao Sávio Bastos e Amanda Azevedo, agradeço o conhecimento, a paciência, parceria e comprometimento de vocês em me ajudar nessa caminhada;

À minha família pelo apoio, compreensão e amor;

Aos meus pais, Roseli Ribeiro, Luis Claudio Dias Pimentel e Ronaldo Freitas dos Santos, pelo apoio e amor que sempre me foram dados e força. À minha mãe, por nunca estabelecer limites ao meu conhecimento e por me dar asas para voar. Ao meu falecido pai, pelos ensinamentos que me proporcionou em vida e, mesmo depois de falecido. Ao meu padrasto por manter meu foco nos estudos;

Ao meu amado irmão, Guilherme Ribeiro dos Santos, que mesmo tão novo me dá sábios conselhos e, acima de tudo, me dá seu amor de irmão e o perdão por eu não ser tão presente em sua vida;

Ao meu namorado, Jefferson Ribeiro Pontichelli, pela compreensão, amizade, apoio, paciência e amor, pois sempre foi minha rocha. Você foi incondicional em todo momento que precisei de ti;

Às queridas amigas, Katherine, Tamires, Doralice, Dinha, Alicia e minha amada sogra Sonia, que fizeram de Campos meu lar, me acolhendo em suas casas, junto aos seus amigos e familiares;

Ao professor Dr. Ajit Varma, pela gentileza ao ceder o inóculo de *P. indica* para a montagem do experimento;

Ao professor Dr. Gaxiola, pela gentileza ao ceder as sementes de arroz selvagem e transgênico, utilizadas no experimento;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pelo aprendizado;

Aos colegas do mestrado passando experiências boas e ruins durante esses dois anos;

Agradeço aos professores, Dra. Amanda Azevedo Bertolazi, Dr. Carlos Eduardo Tadokoro e Dr. Frederico Eutrópio, por aceitarem o convite para participarem da banca de defesa do meu projeto, contribuindo de forma muito importante com meu crescimento no meio científico;

Novamente agradeço aos professores, Dra Inga Gonçalves, Dr. Frederico Eutrópio e Dr. Cesar Abel Krohling por terem aceitado o meu convite para participarem da banca de defesa da dissertação;

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro, pois sem esse apoio a execução deste projeto não seria possível. Obrigada!

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, pela oportunidade de realização deste curso.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Oryza sativa</i> L.	3
2.2. Superexpressão do AVP1	4
2.3. Microrganismos endofíticos	5
2.3.1. <i>Piriformospora indica</i>	6
2.3.1.1. Interação com <i>Piriformospora indica</i>	8
2.3.1.2. Benefícios para o hospedeiro	11
3. HIPÓTESE	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo Geral	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1. Material fúngico de <i>Piriformospora indica</i> e preparo do inóculo	17
5.2. Materiais vegetais e condições experimentais	19
5.3. Trocas gasosas (A , g_s e E)	19
5.4. Fluorescência da clorofila a	20
5.5. Conteúdo de clorofila	20
5.6. Determinação da taxa de colonização micorrízica	20

5.7. Acumulação de Macronutrientes na Parte Aérea.....	21
5.8. Análise Estatística dos Dados.....	21
6. RESULTADOS.....	23
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICE.....	59

RESUMO

PIMENTEL, Vívian Ribeiro, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2018. Ecofisiologia e nutrição do arroz transgênico *AVP10X* associado ao fungo endofítico *Piriformospora indica*. Orientador: Prof. Alessandro Coutinho Ramos.

O uso de plantas geneticamente modificadas é consolidado como uma alternativa viável para o aumento da produtividade. Uma outra estratégia em estudo é a utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal, onde a associação simbiótica entre fungos do solo e raízes das plantas, também se apresenta como uma alternativa promissora para uma agricultura moderna e sustentável. O fungo *P. indica*, um novo modelo de simbiote, confere ao hospedeiro aumento no crescimento e na tolerância a estresses bióticos e abióticos, aumento da absorção de nutrientes e dos parâmetros fotossintéticos. A combinação entre essas estratégias pode ocasionar um efeito sinérgico afetando o desenvolvimento inicial das plantas. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar as respostas nutricionais, fotossintéticas e de crescimento quanto à inoculação do fungo endofítico *P. indica* em cultivares transgênicas de arroz que super-expressa a H⁺-PPase vacuolar. Os resultados mostram que a inoculação do fungo endofítico *Piriformospora indica* incrementou a altura, massa seca e o teor de água nos genótipos de *Oryza sativa* L. transgênica (*AVP10X*) e selvagem (Wild-type). O mesmo comportamento foi observado para os parâmetros fotossintéticos de assimilação de carbono (*A*), condutância estomática (*g_s*) e a taxa de transpiração (*E*). Exceto na transpiração, onde relatou-se uma redução

significativa nas plantas *AVP1OX*, a resposta dos genótipos foi a mesma. Os teores dos macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e enxofre foram maiores em plantas inoculadas com o fungo *P. indica*, entretanto, ocorreu maior acúmulo em plantas selvagens inoculadas. Mostrando que, de fato, as plantas selvagens respondem muito mais à inoculação com *P. indica* do que plantas *AVP1OX*. Assim, os resultados sugerem que as plantas transgênicas não apresentam vantagem em relação ao genótipo Wild-type nas taxas de crescimento e no conteúdo de macronutrientes em condições boas de crescimento.

ABSTRACT

PIMENTEL, Vívian Ribeiro, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February, 2018. Ecophysiology and nutrition transgenic rice *AVP1OX* associated with endophytic fungus *Piriformospora indica*. Advisor: Prof. Alessandro Coutinho Ramos.

The use of genetically modified plants is consolidated as a viable alternative to increase productivity. Another strategy under study is a use of plant growth promoting microorganisms, where a symbiotic association between soil fungi and plant roots, as well as presenting as a promising alternative for a modern and sustainable agriculture. The fungus *P. indica*, a new symbiont model, gives the host increased growth and tolerance to biotic and abiotic stresses, increased nutrient uptake and photosynthetic parameters. A combination of activities may be caused by a synergistic effect affecting the early development of plants. Thus, the present study aimed to characterize as nutritional, photosynthetic and growth responses regarding the inoculation of the endophytic fungus *P. indica* in transgenic rice cultivars that overexpress the H⁺-P vacuole pathol. The results show that the inoculation of the endophytic fungus *Piriformospora indica* increased height, dry mass and water content in the genotypes of *Oryza sativa* L. transgenic (*AVP1OX*) and wild (Wild-type) genotypes. (A), stomatal conductance (g_s) and transpiration rate (E). Except in the transpiration, where a significant reduction in the *AVP1OX* plants is related, a response of the genes for the same person. Nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium and sulfur macronutrients were higher in plants inoculated with the fungus *P. indica*, however, a higher

accumulation occurred in inoculated wild plants. Showing, that in fact, as wild plants respond much more to inoculation with *P. indica* than plants *AVP10X*. Thus, the results suggest that as transgenic plants were not improved in relation to the wild-type genotype in growth rates and no macronutrient content under good growth conditions.

1. INTRODUÇÃO

O aumento na demanda de alimentos para atender o crescimento populacional destaca a importância dos avanços na biotecnologia para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (JOHNSON; ALEX; OELMÜLLER, 2014).

Contudo, atualmente, garantir o aumento da produtividade deve-se à aplicação intensiva e extensiva de insumos químicos (BASHAN et al., 2014), como fertilizantes (Wu et al., 2015) e defensivos agrícolas, que elevam o custo de produção, afetam a qualidade do solo e, conseqüentemente, dos alimentos (DEFRIES et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Neste cenário, intensificar a produção agrícola será um desafio, pois requer o uso de tecnologias que reduzam o impacto ambiental (PHILIPPOT et al., 2013), o custo de produção e aumentem a produtividade, mantendo a área plantada (ISAAA, 2016).

Como uma das três maiores culturas alimentares, a produção de arroz desperta os interesses científicos e econômicos (Ziska et al., 2015), já que o seu cultivo representa 31% da produção global de cereais (Zhang et al., 2017). Devido ao plantio em diversas condições agroclimáticas de terras altas às planícies, e em uma variação de latitude de 35°S à 53°N, aos recursos limitados e à redução nas terras agriculturáveis disponíveis, o melhoramento genético das culturas é mantido como uma forte estratégia na intensificação da produção (Jena e Nissila, 2017) e, sem dúvida, possui um grande impacto na produção global de alimentos.

A superexpressão do gene AVP1 de *Arabidopsis thaliana* é uma das estratégias que podem ser utilizadas no aumento da produtividade (GAXIOLA et al., 2001). O gene AVP1 codifica uma H⁺-Pirofosfatase vacuolar que cataliza uma reação acoplada de hidrólise de pirofosfato inorgânico (PPi) e transporte ativo de prótons no tonoplasto (Schilling et al., 2016). Além da resistência à seca e salinidade (Gaxiola et al., 2007), recentemente, a superexpressão do AVP1 foi relacionada à maior produção de sementes, regulação estomática nas folhas, acumulação de biomassa e eficiência no uso de nutrientes (Arif et al., 2012, Li et al., 2013; Yang et al., 2014; Pizzio et al., 2015).

No entanto, além do cultivo de plantas geneticamente modificadas, o uso de microrganismos promotores do crescimento vegetal, como os fungos endofíticos, torna-se uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável (Oelmüller et al., 2009; Varma et al., 2001; Waller et al., 2005). O fungo endofítico *Piriformospora indica* é utilizado como modelo nos estudos de associação simbióticas com plantas (Gahlot et al., 2015; Yadav et al., 2010), porém a baixa especificidade de hospedeiros e o fácil cultivo em meios axênicos (Varma et al., 2001) demonstram um grande potencial de comercialização como bioinoculante (DESHMUKH et al., 2006; VARMA et al., 2012).

A inoculação com *P. indica* confere ao hospedeiro aumento no crescimento e na tolerância a estresses bióticos e abióticos (GILL et al., 2016; VARMA et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que a inoculação com *P. indica* aumentou a absorção de nutrientes e os parâmetros fotossintéticos das plantas hospedeiras (JOGAWAT et al., 2013; VAHABI et al., 2016), principalmente, em doses baixas de fósforo (P) em abacaxi (Moreira et al., 2015), soja (Waller et al., 2005) e repolho (Sun et al., 2010). Deste modo, a inoculação de plantas de interesse econômico com *P. indica* pode apresentar uma alternativa promissora para aumentar a produtividade de forma sustentável.

Apesar da associação de plantas geneticamente modificadas com microrganismos do solo ainda não ser bem compreendida, propõe-se que a inoculação de plantas transgênicas AVP1OX com fungo o *Piriformospora indica* pode resultar em uma maior performance fotossintética, acumulação de macronutrientes e, conseqüentemente, maior crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Oryza sativa* L.

O arroz é uma monocotiledônea da família das Poaceae que alimenta mais da metade da população humana do mundo (Bakhshandeh et al., 2017). O arroz é cultivado e consumido no mundo todo (Mir et al., 2016) e desempenha um papel estratégico tanto em nível econômico quanto social para os povos das nações mais populosas da Ásia, África e América Latina. Esse cereal é rico em carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais (Abbas et al., 2011), representando um alimento básico para quase metade da população mundial e contribui com 21% da aquisição calórica diária e 15% do consumo de proteínas per capita (Oil et al., 2014).

Sendo a terceira maior cultura cerealífera cultivada, apenas ultrapassada pelo milho e trigo, alcançou em 2016 uma área cultivada de 158,8 milhões de hectares, com campos que cobrem mais de 9% da área agricultável (Oil et al., 2014). Segundo a FAO (2017), houve uma maior participação sazonal na produção de arroz na Ásia, elevando as estimativas da produção a 753,0 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 13,7 milhões de toneladas em relação ao desfecho ruim de 2015.

Entretanto, a produtividade do arroz é muito dependente de mudanças no clima, de fato, no hemisfério Sul, a produtividade foi 2% menor, mesmo o cultivo persistindo à influência do fenômeno El Niño (FAO, 2017). As estimativas indicam

que o rendimento do arroz deve ser aumentado cerca de 65% no mundo até o ano 2020 e para suprir essa demanda o rendimento do arroz deve aumentar 1% ao ano (Huang et al., 2017). Nos últimos dez anos houve pouco acréscimo no aumento do rendimento de algumas culturas como o arroz. Esse ritmo lento se contextualiza com o aumento da população mundial, a perda de terras para urbanização e solos degradados, menor disponibilidade hídrica e uma necessidade crescente de diminuir a utilização de insumos químicos nas culturas (Zhu et al., 2010). Assim, o plantio de cultivares com maior potencial de produção são essenciais para aumentar a produtividade (Peng et al., 2008) e reduzir os impactos ambientais adversos.

O melhoramento genético tem sido fundamental na garantia da produção atual de alimentos. Segundo a ISAAA (2016), a área plantada de culturas biotecnológicas aumentou de 179,7 milhões de hectares (ha) em 2015 para 185,1 milhões de ha, um aumento de 3%. Até o ano de 2013, a modificação de culturas produziu 138 milhões de toneladas de soja, 274 milhões de toneladas de milho, 21,7 milhões de toneladas de algodão e 8 milhões de toneladas de canola (Zhang et al., 2016).

O cultivo de variedades melhoradas de arroz tem aumentado o rendimento sem expandir a área cultivada e mais que dobrou o abastecimento mundial de arroz (FAO, 2017). A transferência de genes desejáveis afeta principalmente a resistência a herbicidas, insetos e a tolerância à seca (Birla 2015), entretanto pouco se sabe como podem afetar outros aspectos das plantas. Ainda assim, a necessidade de alternativas para atender a demanda global aumenta a importância da aplicação de tecnologias de DNA recombinantes para o avanço da produção arroseira (Lilge et al., 2003).

2.2. Superexpressão do AVP1

As H⁺-pirofosfatases (H⁺-PPases) são proteínas transportadoras ativas que geram um gradiente eletroquímico de prótons, derivado da hidrólise de pirofosfato inorgânico (PPi) a ortofosfato (Pi) (Lin et al., 2012; Li et al., 2013; Schilling et al., 2016), no tonoplasto e membrana plasmática de células vegetais (Gaxiola et al., 2016). As H⁺-PPases vacuolares utilizam um substrato de baixo custo energético gerado por vários processos biossintéticos de macromoléculas,

como a acetilação da coenzima A na síntese de ácidos graxos, a aminoacilação do tRNA na síntese de polipéptidos e a ativação de açúcares na síntese de polissacarídeos (Maeshima, 2000).

A V-PPase compreende um único polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 80 kDa (Maeshima, 2000) e ponto isoelétrico de 4,95 MW (Arif et al., 2012) e tem como principal função a acidificação do vacúolo (Santos, 2006). O requerimento energético dessas enzimas (Li et al., 2013) demonstram uma plasticidade para a manutenção da homeostase celular (Gaxiola et al., 2001) em condições ambientais adversas, além de permitir a conservação do ATP (Schilling et al., 2016).

Como a H⁺-PPases é uma enzima de subunidade única altamente conservada entre as espécies de plantas, é uma forte candidata para melhorar a expressão em uma enorme variedade de culturas. O primeiro gene de H⁺-PPase vacuolar clonado em plantas foi o AVP1 de *Arabidopsis thaliana* (At1g15690, também referido como AtAVP1, AtVHP1 e VHP1) (Gaxiola et al., 2016).

Segundo Schilling et al. (2016), o fenótipo da superexpressão do gene AVP1 não reflete necessariamente sua função nativa e possui muitos papéis entrelaçados que precisam ser estudados e que resultam no crescimento da planta. Na última década, a transferência do gene AVP1 para culturas como arroz, algodão e tomate apresentou benefícios para as plantas em condições normais e sob estresse (Park et al., 2005, Yang et al., 2007, Zhao et al., 2006). Nos últimos anos, estudos demonstraram que o gene AVP1 melhora o crescimento das plantas sob privação de fosfato e nitrogênio (Li et al., 2013) e são capazes de aumentar a produção (Pasapula et al., 2011), mesmo sob deficiência de fósforo (Yang et al., 2014). Além disso, o OsVP1 que codifica as H⁺-PPase de arroz é induzido durante o estresse por frio (Zhang et al., 2011) e, recentemente, Pizzio et al. (2015) e Regmi et al. (2015) sugeriram um importante papel da H⁺-PPase de membrana plasmática no carregamento de sacarose no floema.

2.3. Microrganismos endofíticos

O solo possui uma microflora ativa muito diversa em que as plantas estão susceptíveis à colonização por vários microrganismos endofíticos. As plantas estão expostas a condições desfavoráveis, como a deficiência de nutrientes, a

seca, salinidade e ataques de patógenos (Gill et al., 2016), e a microbiota do solo pode ter efeitos profundos no crescimento, nutrição e saúde das plantas (Philippot et al., 2013; Almario et al., 2017). O uso de endófitos aumentou o rendimento e a produção das culturas, proporcionando um novo caminho para tornar a agricultura sustentável (Li et al., 2017).

Nos últimos anos, documentou-se que os microrganismos endofíticos (bactérias, fungos, actinomicetos) vivem dentro dos tecidos da planta hospedeira, formando associações que permeiam entre simbiótica e patogênica (Rai et al., 2014). Esses microrganismos compõem uma rica fonte de diversidade genética, pouco conhecida e explorada (Khan et al., 2013; Dovana et al., 2015). Atualmente, há um grande interesse na prospecção desses microrganismos como fonte de produtos bioativos (Rai et al., 2014; Waqas et al., 2013), principalmente como bioinoculantes (Souza et al., 2017; Karthik et al., 2017), no biocontrole e na promoção do crescimento vegetal (Durán et al., 2014) que resultam no aprimoramento e melhoria do crescimento das plantas, juntamente com o desenvolvimento de uma forte capacidade de tolerância ao estresse (Kumar et al., 2017). No atual cenário do sistema agrícola, o uso indiscriminado e extensivo de insumos químicos leva ao declínio da produtividade de culturas e fertilidade do solo (Kumar et al., 2017), o que aumenta o interesse em alternativas ecológicas e leva à inoculação de microrganismos endofíticos benéficos na direção de uma solução eco-amigável e econômica (Pal et al., 2015; Gill et al., 2016).

Os fungos endofíticos vivem dentro das raízes de muitas espécies de plantas sem afetá-las adversamente. Alguns fungos como *Fusarium fusarioides* e *Trichoderma pseudokoningii*, apresentaram propriedades de promoção do crescimento, portanto, sua formulação poderia ser um potencial biofertilizante na agricultura sustentável (Chadha et al., 2015). O fungo *Porostereum spadiceum* (AGH786) em mudas de soja mostrou habilidades de promoção do crescimento em diferentes níveis de estresse salino (NaCl) devido à modulação dos fitormônios e isoflavonas pelo fungo (Hamayun et al., 2017). Ainda são relatados aumentando a produção de sementes e potencializando a tolerância a estresses bióticos e abióticos (Oelmüller et al., 2009; Varma et al., 2001; Waller et al., 2005).

2.3.1. *Piriformospora indica*

Piriformospora indica é classificado como um basidiomiceto endofítico, pertencendo à nova ordem Sebaciales, de acordo com a análise da sequência do RNA ribossômico 18S (Weiss et al., 2004). Esse fungo foi isolado das raízes de *Prosopis juliflora* e *Zizyphus mummularia* no deserto de Thar, Índia (Verma et al., 1998) e desde o primeiro relato, tem sido extensivamente investigado.

Morfológicamente, suas células apresentam paredes finas, hialinas e ausência de pigmentos com diâmetro variando entre 0,7 e 3,7 µm em função das condições de cultura, tornando-se longas e finas sob restrição de nutrientes (Prasad et al., 2013). As hifas geralmente encontram-se separadas, mas enroladas em várias camadas, podendo formar conexões laterais, denominadas anastomoses, para passagem de água, nutrientes e organelas. Os septos consistem em dolipores dentro dos parentossomos contínuos. Os parentossomos são sempre retos e têm o mesmo diâmetro que o dolipore correspondente (Costa, 2014) (Figura 1).

O micélio na maturidade produz clamidósporos característicos em formato de pera, que aparecem sozinhos ou em grupos de 16 a 45 µm de comprimento e 10 a 17 µm de largura. Na maturidade, esses esporos têm paredes até 1,5 µm de espessura. O citoplasma do clamidósporo é densamente embalado com material granular e geralmente contém 8-25 núcleos. Nem conexões de fixação ou estruturas sexuais são observados (Prasad et al., 2013).

Análises moleculares revelaram uma estreita associação entre a bactéria endofúngica *Rhizobium radiobacter* e *Piriformospora indica* (Sharma et al., 2008), rastreada até o isolado original depositado na Alemanha (Desisa, 2017), essa bactéria mutualística de fungos forma uma simbiose tripartida com diversas plantas (Glaeser et al., 2016). Recentemente, as tentativas de eliminação geraram fungos com baixas quantidades de endobactérias, mas demonstraram redução no desempenho do fungo na promoção do crescimento vegetal, esses resultados induzem ao pressuposto de que a endobactéria melhora a aptidão de *P. indica* e, assim, contribui para o sucesso da simbiose tripartida (Guo et al., 2017).

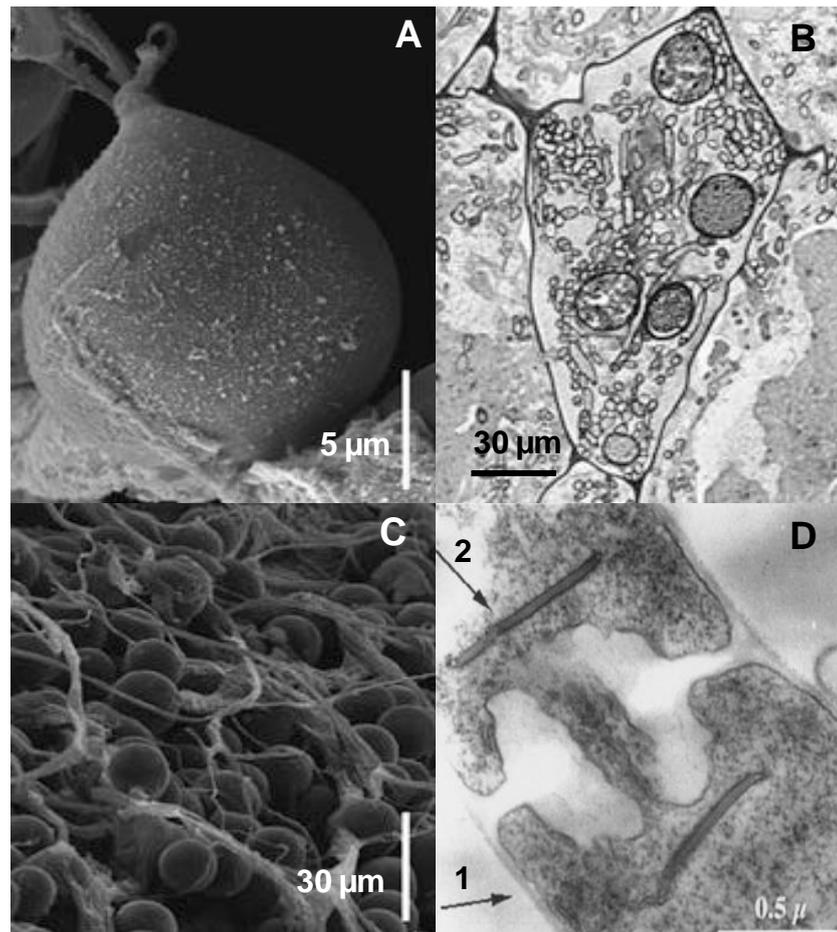


Figura 1. Clamidósporos do fungo endofítico *P. indica* (A), adaptado de Varma 2012. (B) Formação intracelular de clamidósporos. (C) Formação de clamidósporos em placas de petri. (D) Seção de hifa de *P. indica*, observada pela microscopia eletrônica de transmissão. Em (D) é possível visualizar um septo com o dolipore, parede celular (seta 1) e os parentossomos (seta 2). Adaptado de Varma et al., (1998) (Figura 1D) e Kost e Rexer (2013) (Figura 1: A, B e C).

2.3.1.1. Interação com *Piriformospora indica*

Uma das características específicas do fungo endofítico *P. indica* é sua capacidade de interação com as raízes de muitas espécies de plantas de diferentes taxos e, usar como hospedeiro todas as espécies que formam diferentes associações micorrízicas (Kost e Rexer, 2013). A diversidade de hospedeiros mostra que esse fungo possui uma refinada estratégia de colonização, e alguns estudos já desvendaram seu estilo de vida e os mecanismos referentes à colonização (Gill et al., 2016).

P. indica forma uma simbiose mutualista com o hospedeiro colonizando a raiz da planta. A germinação dos clamidósporos permite que hifas iniciais cresçam e formem uma rede (Kost e Rexer, 2013) que segue a topografia da raiz, iniciando simultaneamente a penetração anticlinal que dá acesso à região subepidérmica de tecidos diferenciados (DESHMUKH et al., 2006; JACOBS et al., 2011). Contudo, o fungo nunca invade os tecidos vasculares (Gill et al., 2016). Essa colonização inicial ocorre devido à eficiência do fungo em suprimir a imunidade inata do hospedeiro, evitando que a planta reconheça os padrões moleculares associados (JACOBS et al., 2011).

O comportamento de colonização das células segue um estilo de vida biotrófico, com as hifas extracitosólicas formando invaginações na membrana plasmática de células vivas (Jacobs et al., 2011). Após esse período começam a aparecer mudanças ultraestruturais nas células vegetais, dependendo do grau de maturação do tecido. Em tecidos jovens diferenciados, a colonização intracelular pode levar a ramificação da hifa a ocupar completamente o espaço citoplasmático de cada célula, antes de colonizar células adjacentes. E em tecidos diferenciados mais velhos, as hifas se ramificam no espaço entre a parede e a membrana plasmática, envolvendo e submetendo o protoplasto ao encolhimento, neste espaço se desenvolvem clamidósporos a partir de terminações das hifas (DESHMUKH et al., 2006).

Apesar da colonização fúngica de raízes começar com uma fase de crescimento biotrófica, em seguida ocorre uma fase dependente da morte celular, que pode não apresentar sintomas nas raízes (Qiang et al., 2011). Como a morte programada celular é uma resposta natural às restrições fisiológicas de estímulos internos ou externos (Hückelhoven, 2004; Lam, 2005), durante a infecção patogênica ela age como resposta local e sistêmica protegendo o tecido (Heath, 2000; Hoeberichts e Woltering, 2003). A redução da expressão da proteína HvBI-1 (suprime a morte celular programada) em raízes colonizadas por *P. Indica* sustenta a ideia de que este fungo interage com o mecanismo de morte da célula do hospedeiro para um desenvolvimento bem sucedido (DESHMUKH et al., 2006).

Os padrões de colonização das regiões radicais sofrem alterações quantitativas e qualitativas, aumentando com a maturação do tecido, onde o desenvolvimento maciço do fungo ocorre em células hospedeiras mortas (Gill et

al., 2016). A maior biomassa fúngica está presente na zona de diferenciação radicular, principalmente onde se desenvolvem os pelos radiculares (Deshmukh et al., 2006). A densa colonização extracelular se concentra na região meristemática, destacando a diferença da colonização por *P. indica* das micorrizas arbusculares que se desenvolvem preferencialmente em tecidos jovens (Schäfer e Kogel, 2009).

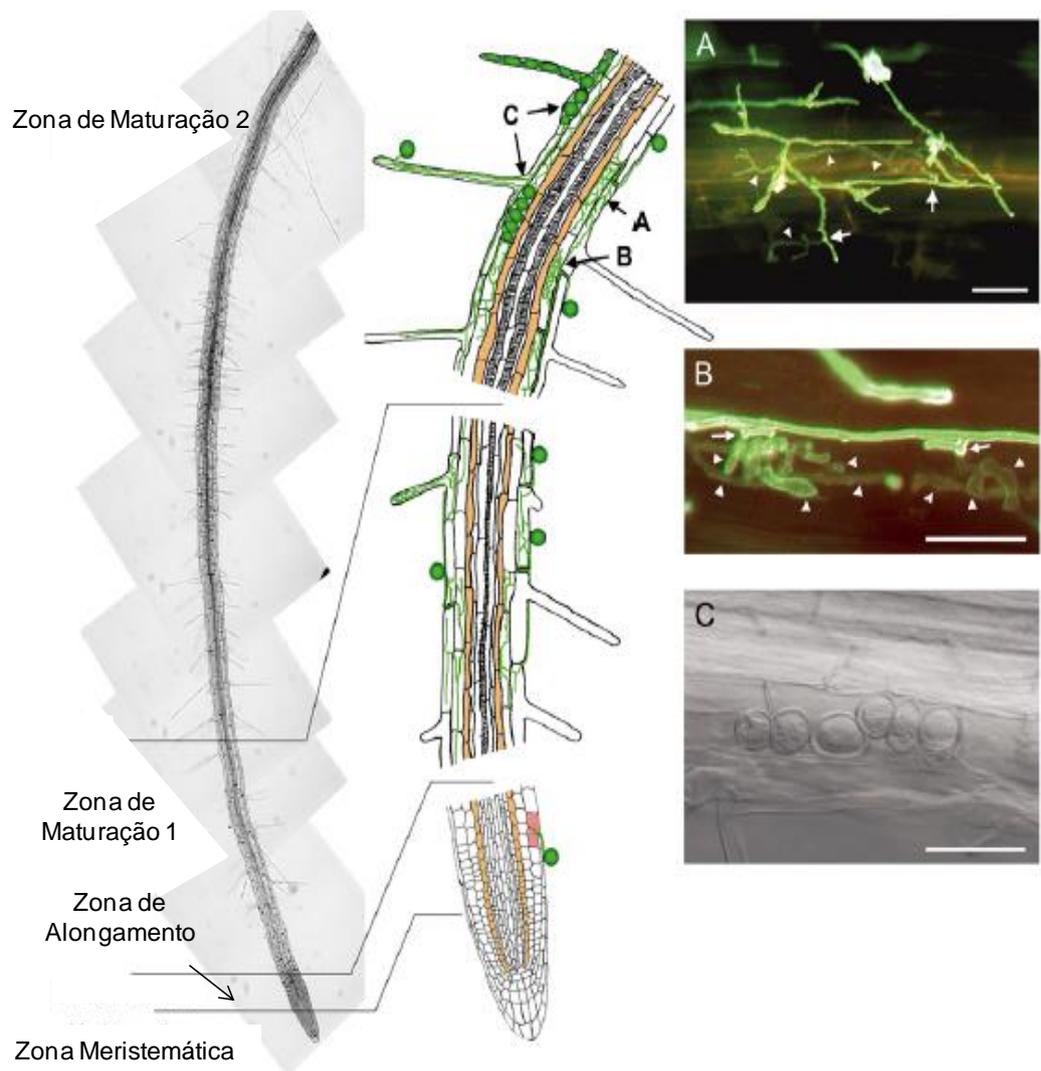


Figura 2. Representação da raiz de *Arabidopsis thaliana* colonizada por *P. indica* com detalhes do comportamento do fungo ao longo da topografia da raiz. A colonização é restrita às células rizodérmicas e corticais, sem colonizar o sistema vascular e a porcentagem varia ao longo da topografia da raiz. As setas e letras apontam regiões de interação e correspondem às imagens de A a C. A imagem de epifluorescência das células epidérmicas da raiz não demonstram órgãos especializados para penetração (A). Em (B) as imagens de epifluorescência das hifas intracelulares mostram estruturas globulares (ponta da seta) e regiões de

penetração (setas). (C) imagem de campo brilhante demonstrando a formação de clamidósporos intracelulares 14 dias após a inoculação (Jacobs et al., 2011).

2.3.1.2. Benefícios para o hospedeiro

A inoculação de *P. indica* com hospedeiros de diversas famílias, em condições de estufa e de campo (Rebiery et al., 2017), é capaz de promover o crescimento e ainda estimular a tolerância a estresses abióticos e a resistência a doenças (Gill et al., 2016). *P. indica* exibe a maioria das características benéficas das micorrizas arbusculares (Kumar et al., 2011, Chadha et al., 2015) e, segundo seus papéis multifuncionais, é um candidato potencial como biofertilizante (Adaya et al., 2013).

O fungo endofítico *P. indica* está ganhando interesse comercial e científico. O aumento da produção de metabólitos secundários é essencial, principalmente em plantas medicinais (Prasad et al., 2008, 2013; Bajaj et al., 2014), assim como, em algumas espécies a parte aérea é uma importante fonte de metabólitos para aplicação medicinal. A inoculação de *P. indica* aumentou a biomassa da parte aérea, induziu a floração precoce e alterou os metabólitos secundários em *Curcuma longa* (Bajaj et al., 2014), *Coleus forskohlii* (Das et al., 2012) e *Brassica campestris* ssp. *chinensis* L. (Khalid et al., 2017) e ainda aumentou o rendimento e qualidade do óleo em *Brassica napus* L. (Su et al., 2017). Recentemente, Kim et al. (2017) demonstraram que a floração precoce está relacionada ao aumento no nível de giberelina e ao fotoperíodo (Pan et al., 2017), os resultados demonstraram que o fungo induz a expressão dos genes reguladores da floração, biossíntese de giberelina e dos genes relacionados ao fotoperíodo, além de suprimir do gene supressor da floração. A associação de *Artemisia annua* L. com a coinoculação de *P. indica* e *Azotobacter chroococcum* aumentou a expressão de genes de biossíntese e a concentração de artemisinina, composto usado no tratamento de malária (Bandyopadhyay et al., 2017). Em raízes de hortelã-pimenta *P. indica* estimula a síntese de compostos fenólicos e óleos essenciais (khalvandi et al., 2017).

Nos últimos anos, estudos ressaltam que *P. indica* auxilia os hospedeiros a lidar com estresses bióticos e abióticos (Varma et al., 2012). A colonização do

tomateiro por *P. indica* limitou em 30% a gravidade da doença causada pelo fungo *Verticillium dahlia* e reduziu a incidência do vírus do mosaico do pepino, na parte aérea do tomate em cultivo hidropônico (Fakharo et al., 2010). Wang et al. (2015) inferiram que a associação desse fungo com plantas susceptíveis ao vírus do enrolamento amarelo do tomate (TYLCV) induziu resistência à doença, aumentou o rendimento em 12,8% e ainda melhorou o sabor da fruta. Além disso, *P. indica* induziu a resistência da cevada contra patógenos radiculares e foliares, incluindo *F. culmorum* e *B. graminis* (Waller et al., 2005). A expressão de genes de defesa como PR1b, LOX, NPR1 e WRKY85 aumentou em raízes de *Oryza sativa* L. inoculadas com *P. indica* antes da infecção por *Magnaporthe oryzae* (Mousavi et al., 2014). No trigo, a aplicação de *P. indica* reduziu a incidência das doenças causadas por *Fusarium sp.* (Rebiey e Shaw, 2015) devido à diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) (Nassimi e Taheri, 2017).

P. indica também confere tolerância ao estresse abiótico, especialmente estresse por seca e salinidade que pode resultar de uma maior atividade enzimática antioxidante, acumulação de prolina, expressão de genes relacionados à seca e menor comprometimento da membrana (Xu et al., 2017). Experimentos conduzidos avaliando o efeito da aplicação de *P. indica* em plantas sob estresse salino demonstraram a acumulação de prolina, um osmoprotetor e a indução da expressão gênica relacionada à defesa (Li et al., 2017) com um aumento de 464 (sem estresse) para 2037 genes relacionados à seca em um período de 12 horas (Zhang et al., 2017), entre eles os genes DREB2A, CBL1, ANAC072 e RD29A (Xu et al., 2017). A avaliação dos efeitos da seca sobre a associação das plantas com esse fungo resultou em maior conteúdo de clorofila e volume de raiz (Hosseini et al., 2017), maior potencial hídrico, maior condutância estomática (Hussin et al., 2017), assim como, aumentou o peso fresco e seco da raiz, a área foliar, o conteúdo de clorofila e o número da folha nas plantas colonizadas por *P. indica* (Xu et al., 2017). As atividades antioxidativas de catalases (Zhang et al., 2017) e superóxido dismutases foram reguladas positivamente nas folhas das plantas colonizadas por *P. indica* (Xu et al., 2017). Além disso, após o tratamento com a seca, o acúmulo de malondialdeído (MDA), indicador de danos à membrana, diminuiu (Xu et al., 2017).

Estudos de interação de *P. indica* com diferentes modelos de plantas e mutantes demonstram claramente que a promoção do crescimento é alcançada pela intensificação na absorção de nutrientes e sua translocação, maior eficiência fotossintética e na modulação de fitormônios envolvidos no crescimento e desenvolvimento (Oelmüller et al., 2009; Johnson et al., 2014). Esta interação benéfica endofítica resulta da modulação da expressão gênica que alteram os níveis de proteínas e metabólitos, no endossimbionte e no hospedeiro, auxiliando na manutenção da interação simbiótica (Johnson et al., 2011, Franken, 2012; Qiang et al., 2012; Oelmüller et al., 2009).

A simbiose com fungos benéficos é conhecida por ser vital para a aquisição de nutrientes pelos sistemas radiculares das plantas (Gill et al., 2016), transferindo nutrientes que limitam o crescimento, do solo para as plantas (Varma et al., 2012). *P. indica* foi capaz de extrair, mobilizar e transportar N, P, K (Das et al., 2014), disponibilizando mais nutrientes para o desenvolvimento da parte aérea de arroz aeróbico (Kumar et al., 2013). *P. indica* é um solubilizador de P ativo que produz enzimas fosfatases (Malla et al., 2005) e diferentes ácidos orgânicos que, por sua vez, solubilizam os polifosfatos insolúveis. A absorção e assimilação de N são reforçadas por *P. indica* após a colonização da raiz em diferentes plantas hospedeiras, ocorrendo aumento na expressão da nitrato redutase, a β -glucosidase - PYK10, e enzimas de degradação de amido SEX1 (Sherameti et al., 2005; 2008). Em contraste com fungos micorrízicos arbusculares onde N é preferencialmente absorvido como amônio, *P. indica* medeia a absorção de nitrato do solo. Estudos semelhantes também mostraram que o fungo estimulou vários genes localizados em plastídios envolvidos no metabolismo do enxofre em *A. thaliana* e os estudos sobre a perda de função desses genes confirmaram, ainda, a exigência do efeito benéfico nas plantas (Oelmüller et al., 2009).

3. HIPÓTESE

- A inoculação de plantas transgênicas AVP com fungo *Piriformospora indica* resulta em um maior desempenho fotossintético, acumulação de macronutrientes e, conseqüentemente, maior crescimento.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- Investigar as alterações na fisiologia, acumulação de biomassa e teor de macronutrientes em plantas de *Oryza Sativa* transgênicas que superexpressam a H⁺-PPase vacuolar (*AVP1OX*) quando colonizadas pelo fungo *Piriformospora indica*.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e biomassa em plantas selvagens e transgênicas de *Oryza Sativa AVP1OX* inoculadas com o fungo *Piriformospora indica*;

- Analisar as alterações nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas selvagens e transgênicas de *Oryza Sativa AVP1OX* inoculadas com o fungo *Piriformospora indica*;

- Determinar a acumulação dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) na parte aérea de plantas selvagens e transgênicas de *Oryza Sativa AVP1OX* inoculadas com o fungo *Piriformospora indica*;

- Realizar análise multivariada dos dados obtidos para discriminar o conjunto de variáveis que mais explicam as variações obtidas em função da transgenia e da inoculação com o fungo *Piriformospora indica*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material fúngico de *Piriformospora indica* e preparo do inóculo

O fungo endofítico *P. indica* foi obtido da coleção do Dr. Ajit Varma da Universidade Amity University, Uttar Pradesh, Índia. A manutenção da cultura de *P. indica* foi realizada em meio sólido, com remoção de um disco de ágar (1,0 cm diâmetro) da borda de colônias fúngicas crescidas em meio Kaefer modificado (Tabela 1) (Sherameti et al., 2008) e inoculadas em placas de petri contendo o meio sintético de Ágar Batata Dextrose (Acumedia) em pH 6,5. Aos quinze dias de crescimento constata-se a produção de clamidósporos em placas.

Aos 15 dias após o plantio colocou-se o fungo para crescer, através da germinação dos esporos. Filtraram-se 2,0 ml de água MilliQ autoclavada e filtrada diretamente na placa de Ágar Batata Dextrose contendo o fungo e raspou-se a superfície do micélio com a ponteira estéril acoplada ao pipetador. O líquido foi então transferido para eppendorfs autoclavados.

Um mL de solução com esporos foi inoculado em 24 frascos Erlenmeyer (250 ml) com 50 mL (1/5 do volume) de meio Kaefer (Tabela 1) a um pH 6,5 ajustado com NaOH 1,0 M, vedados (buchons; papel e barbante) e já esterilizado a 121 °C durante 20 minutos. Foram mantidos em incubadora shaker, a 28 °C e 125 rpm por um período de 15 dias.

Tabela 1. Meio Kaefer modificado utilizado no cultivo do fungo *P. indica*.

Meio Kaefer	
Reagentes (1)	Quantidade 1L ⁻¹
Glucose	2 g
Peptona	2 g
Extrato de Levedura	1 g
Caseína Hidrolizada	1 g
Solução de Macronutrientes (2)	50 ml
Solução de Micronutrientes (3)	10 ml
Ferro EDTA (4)	1 ml
Solução de Vitaminas (5)	1 ml
Ágar	20 g
2. Solução de Macronutrientes*	
NaNO ₃	12 g
KCl	10.4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10.4 g
KH ₂ PO ₄	30.4 g
3. Solução de Micronutrientes*	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.2 g
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Ácido Bórico	1.1 g
CoCl ₂ .5H ₂ O	160 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	160 mg
Molibdato de Amônio	110 mg
4. Solução de Ferro EDTA**	
FeSO ₄ .7H ₂ O	556 mg em 50 ml de H ₂ O
EDTA	744 mg em 50 ml de H ₂ O
5. Solução de Vitaminas*	
Tiamina	100 mg
Glicina	40 mg
Piridoxina	10 mg
Ácido Nicotínico	10 mg

*Solução Estoque de 1L⁻¹.

**Solução Estoque de 100 ml; preparar separadas, aquecer cada uma a 60°C e depois misturar.

5.2. Materiais vegetais e condições experimentais

As sementes de arroz (*Oryza sativa* L.), transgênicos (AVP1OX) e silvestres (Wild-type) foram concedidas gentilmente pelo Dr. Roberto Gaxiola da Universidade do Arizona, Estados Unidos.

As sementes AVP1OX e Wild-type foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por três minutos e, posteriormente, em hipoclorito 2% por cinco minutos, lavadas em água destilada. Após a esterilização, as sementes foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia estéril. Para a esterilização da areia foram feitas duas autoclavagens de uma hora, com intervalo de 24 horas entre uma e outra. O experimento foi montado em casa de vegetação da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Após 30 dias da semeadura, 30 plantas foram transplantadas para três vasos plásticos de 3L e distribuíram-se 10 plantas para cada vaso. Os vasos continham um substrato composto de areia (quartzo 12/20) e solo argiloso (Latosolo Vermelho-Amarelo Distrófico), na proporção 2:1 (v/v). Depois de preparada, a mistura foi esterilizada, através de dois ciclos de autoclavagem de 1h, com intervalo de 24, a 121°C e armazenada em temperatura ambiente.

Os tratamentos foram definidos como: *Wild-Type* (não inoculado), *Wild-Type* Inoculado, AVP1OX (não inoculado) e AVP1OX Inoculado. A inoculação das plantas com o fungo *Piriformospora indica* foram realizadas durante o transplante dividindo-se igualmente a massa fúngica obtida e o meio líquido entre as 10 plantas com dois erlenmeyer por vaso. Os tratamentos não inoculados receberam a mesma medida, mas de água estéril como substituição aos inóculos, previamente autoclavada por 20 min a 121 °C. Duas vezes na semana, as plantas foram suplementadas com solução de Clarck (Clarck, 1975) ½ da força e nos demais dias, molhadas com água destilada. Aos 30 dias após a inoculação (d.a.i) foram avaliados os parâmetros de crescimento.

5.3. Trocas gasosas (A , g_s e E)

Aos 30 dias após a inoculação (d.a.i.), foram realizadas avaliações individuais nas folhas das plantas de arroz Wild-type e AVP1OX, para avaliação das trocas gasosas.

Para as medidas de trocas gasosas foi utilizado um analisador de gás infravermelho portátil (IRGA), de circuito aberto, modelo Li-6400 (LI-COR, Lincoln, Norfolk, UK). Através desse sistema foram analisadas a taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

5.4. Fluorescência da clorofila *a*

O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) foi analisado com o auxílio do fluorímetro não-modulado Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk). Para tanto, foram utilizadas pinças especiais (*leafclips*) em parte da folha amostrada para adaptação do tecido foliar ao escuro por 30 minutos, para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos” (Q_a oxidada) e a perda de calor fosse mínima (Strasser et al., 2000). Por meio do fluorímetro não-modulado, foi possível obter as medidas de fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e fluorescência variável (F_v). A partir dos valores de F_v e F_m , foi possível obter a relação F_v/F_m (rendimento quântico máximo do fotossistema II) (Bolhar-Nordenkamp et al., 1989). A indução da fluorescência foi feita por um único pulso forte de luz vermelha ($3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) com duração de 1 s^{-1} , aplicado com a ajuda de três diodos emissores de luz a um comprimento de onda de 650 nm.

5.5. Conteúdo de clorofila

A estimativa do conteúdo de clorofila foi realizada 30 d.a.i nas mesmas folhas onde foram realizadas as medições da taxa fotossintética e de emissão da fluorescência da clorofila *a*. Os valores dos índices de SPAD foram determinados por média de três medições nessas folhas, por meio do medidor portátil de clorofila (MPC), SPAD-502 (Minolta, Japão).

5.6. Determinação da taxa de colonização micorrízica

Aos 30 d.a.i, avaliaram-se as taxas de colonização micorrízica em raízes de *Wild-type* e *AVP1OX*, conforme método de Koske & Gemma (1995) e Grace & Stribley (1991). A porcentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada como descrito por Giovanetti & Mosse (1980), após coloração com azul de tripano, conforme técnica descrita por Phillips e Hayman (1970).

5.7. Acumulação de macronutrientes na Parte Aérea

Aos 30 dias após a inoculação foi realizada a coleta da parte aérea de três plantas de arroz *Wild-type* e *AVP1OX*, para avaliação dos teores nutricionais. Inicialmente a parte aérea das plantas foram pesadas e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C, por um período de 72 h, e pesadas secas novamente, em seguida foram moídas em moinho do tipo Willey e então acondicionado em frascos hermeticamente fechados e identificados.

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, no qual o nitrogênio foi determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Os outros nutrientes P, K, Ca, Mg e S foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta. Condições do ICP: gás plasma 8,0 L min⁻¹, gás a auxiliar 0,70 L min⁻¹ e gás carreador 0,55 L min⁻¹ (Peters, 2005).

5.8. Análise Estatística dos Dados

Os experimentos foram realizados no delineamento experimental de blocos casualizados no fatorial 2x2, constando de dois genótipos (*Wild-Type* e *AVP1OX*) e dois tratamentos (não inoculado e inoculado). Ao todo, o experimento conteve quatro tratamentos: (*Wild-Type* não inoculado), *Wild-Type* Inoculado, *AVP1OX* (não inoculado) e *AVP1OX* Inoculado) com 3 repetições cada (3 vasos com 10 unidades experimentais). Os dados de colonização foram avaliados por teste *t-student*. Os dados de todos os demais parâmetros foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida de comparação de médias pelo teste Tukey. A comparação das médias foi baseada a um nível de 5% de significância, utilizando o *software GraphPad Prism 7*. A análise de componente

principal (PCA) foi utilizada para correlacionar os parâmetros de crescimento, parâmetros ecofisiológicos e a acumulação de macronutrientes na parte aérea, através do programa FITOPAC 2.1.2.85.

6. RESULTADOS

A inoculação do fungo endofítico *Piriformospora indica* incrementou de forma significativa a altura de *Oryza sativa* L. *AVP1OX* ($p < 0,0001$) e *Wild-type* ($p < 0,0001$), onde a colonização induziu um aumento de 40,18% e 42,28%, respectivamente, em comparação com os tratamentos não inoculados. Todavia, entre os genótipos, o selvagem teve maior aumento na altura das plantas controle ($p = 0,0044$) e inoculadas ($p = 0,0492$) (Figura 3A).

Observando os dados de massa seca da parte aérea vimos que a aplicação do fungo demonstrou um aumento significativo nos dois genótipos ($p < 0,0001$), mas não encontramos diferença entre os tratamentos não inoculados ($p = 0,8374$) e inoculados ($p = 0,0747$). Esse fungo estimulou o acúmulo de biomassa em 79,78% nas plantas selvagens e 90,26% nas plantas *AVP1OX* em comparação com seus tratamentos não inoculados.

Avaliando a diferença entre os pesos frescos e secos das plantas de arroz inoculadas ou não com o fungo, pode-se obter a informação sobre o teor de água nos tecidos da planta. Assim, a porcentagem do teor de água (Figura 4) obtida para os tratamentos indica que o fungo *P. indica* aumenta a retenção de água nas plantas e, ainda, mostra- que a inoculação de plantas selvagens com *P. indica* induziu um aumento de 31,46% no teor de água das plantas de arroz. As plantas transgênicas não apresentaram diferença das plantas selvagens e apresentaram um aumento no teor de água no tratamento inoculado de 26,03%.

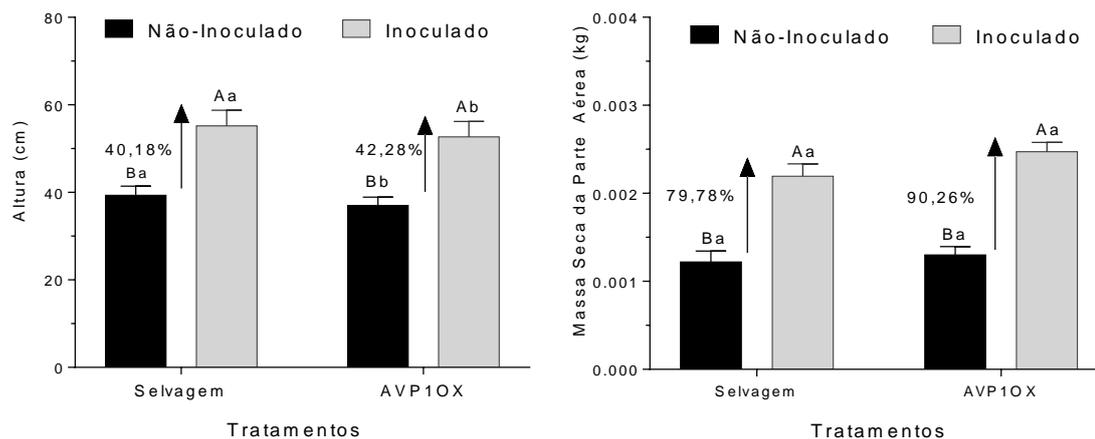


Figura 3. Avaliação da Altura (A) e Massa Seca da Parte Aérea (B) em plantas transgênicas de arroz *AVP10X* e selvagens (*Wild-Type*) não inoculadas ou inoculadas com *Piriformospora indica*, 30 dias após a inoculação. Os dados foram analisados por *two-way ANOVA* e as médias comparadas com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

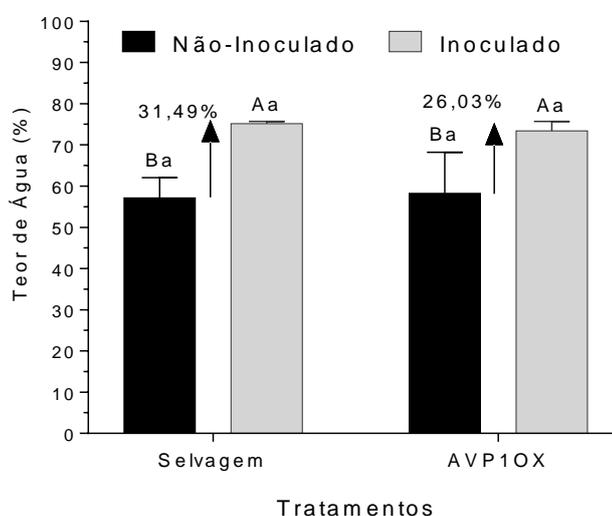


Figura 4. Porcentagem do teor de água em arroz transgênico (*AVP10X*) e selvagem (*Wild-Type*) inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way ANOVA* e as médias comparadas com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

Raízes de plantas *Wild-type* e *AVP10X* sem inoculação de *Piriformospora indica* não apresentaram valores de colonização micorrízica consideráveis (Figura 5), portanto, não são representadas no gráfico. A comparação entre as médias de colonização pelo teste t mostrou uma colonização micorrízica significativamente maior ($p=0,006$) em plantas *Wild-type* (Figura 5A), representando uma magnitude de 260% mais raízes colonizadas em relação às plantas *AVP10X*.

Na avaliação do desempenho ecofisiológico (Figura 6A, B e C) analisaram-se os parâmetros de Assimilação de Carbono (A), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E). Os dados de transpiração mostram que plantas *Wild-type* e *AVP10X* apresentaram valores médios similares e não significativos nos tratamentos não inoculados. E a inoculação do arroz selvagem demonstrou uma maior transpiração (103,76%) com diferença significativa em comparação à inoculação do arroz *AVP10X* ($p=0,0336$), com uma indução promovida pelo fungo de apenas 62,85%.

Entretanto, os valores médios de assimilação de Carbono (A) e condutância estomática (g_s) também foram maiores perante a inoculação de *P. indica*. A assimilação de Carbono (A) (Figura 6A) apresentou diferença significativa quanto à inoculação em plantas selvagens ($p=0,0004$) e transgênicas ($p=0,0125$), mas não na comparação entre os controles ($p=0,9680$) ou entre as plantas inoculadas ($p=0,0977$) dos diferentes genótipos. A média dos valores de condutância estomática (g_s) e assimilação de Carbono (A) (Figura 6A e B) demonstram que a colonização por *P. indica* induziu um aumento de 234,71% e 236,84% nessas taxas para as plantas selvagens e de 117,12% e 198,75%, em plantas transgênicas. Esses parâmetros apresentam base para fortalecer os dados apresentados para os parâmetros de crescimento, abordando que o desempenho fotossintético pode estar contribuindo para a maior massa seca e, conseqüentemente, maior crescimento das plantas inoculadas.

A transpiração (E) foi relativamente maior nas plantas de arroz em que o fungo foi aplicado, respectivamente, ($p=0,0004$) nas plantas selvagens e ($p=0,0119$) em plantas transgênicas (Figura 6C). Analisando o efeito dos genótipos em plantas inoculadas, o arroz selvagem apresentou uma diferença maior em comparação com o arroz *AVP10X* (0,0336).

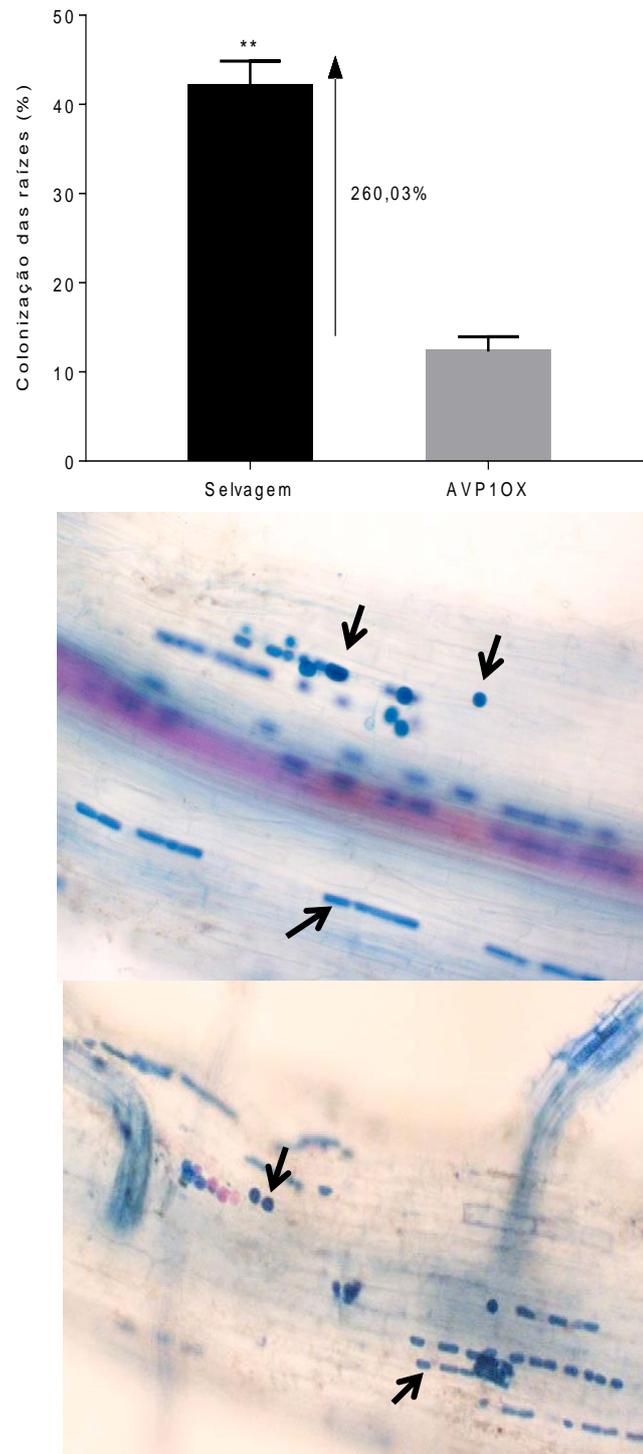


Figura 5. Colonização micorrízica expressa em porcentagem de raízes de plantas de arroz *Wild-Type* e super-expressando o gene de H^+ -PPases vacuolares, inoculadas com *P. indica* 30 d.a.i. (A). Imagens de fragmentos de raiz de plantas *Wild-type* (B) e *AVP10X* (C) colonizadas pelo fungo endofítico benéfico. As setas indicam clamidósporos na rizoderme e córtex, mas não há indícios da formação de clamidósporos na região vascular.

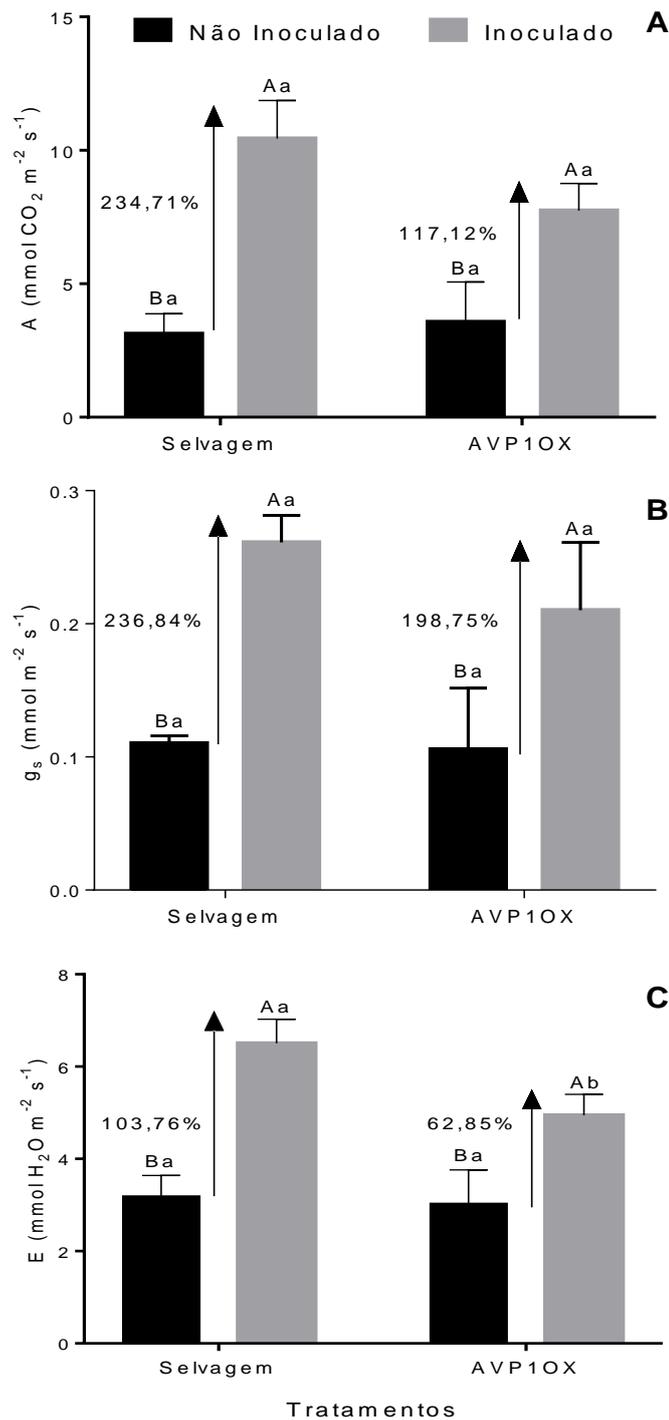


Figura 6. Assimilação de Carbono (A) (A); Condutância Estomática (g_s) (B); transpiração (E) (C) de folhas de *Oriza sativa japonica*, *Wild-Type* e AVP10X, não inoculadas ou inoculadas com *Piriformospora indica*, 30 dias após a inoculação. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0.05$.

A eficiência do fotossistema II denominada rendimento quântico máximo do PSII é estimada pela relação F_v/F_m das folhas de plantas de arroz *Wild-Type* e *AVP10X* (Figura 7). A inoculação do fungo mostrou diferença para o genótipo selvagem ($p=0,0214$) e transgênico ($p=0,0001$), mas o aumento em comparação com o tratamento não inoculado foi de 1,67% e 1,06%, respectivamente. A comparação entre as plantas de arroz selvagem e arroz transgênico não houve diferença ($p=0,1291$). Os valores médios próximos aos valores de 0,83 indicam que as plantas não foram expostas a estresses durante a condução do experimento e que os dados foram obtidos sobre condições normais.

O conteúdo de clorofila estimado pelo índice SPAD que mede indiretamente o teor de verde das folhas (Figura 8) também foi aferida, mas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,2053$) e genótipos ($p=0,1282$).

Os dados de eficiência do fotossistema II podem indicar que o aumento na assimilação de carbono realizada em plantas colonizadas pode não estar relacionado à melhora na transferência de elétrons, assim como o conteúdo de clorofila demonstra que a indução das mudanças fisiológicas relacionadas à fotossíntese pode não depender do aumento da produção de clorofila. Entretanto, outras análises são necessárias para estabelecer melhor a relação entre esses parâmetros.

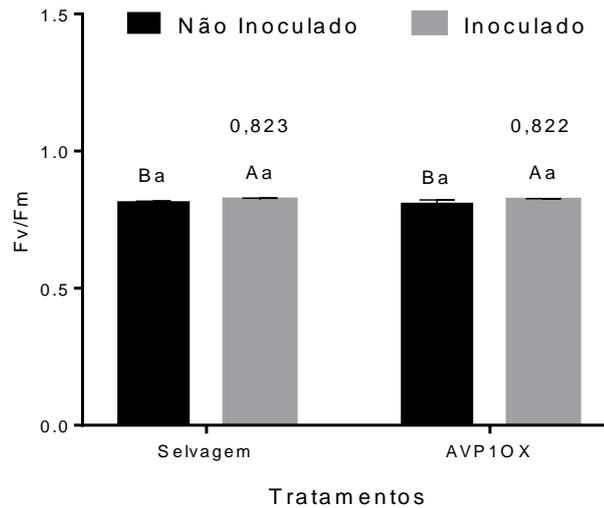


Figura 7. Rendimento quântico máximo do PSII (Fotossistema II) estimado pela relação F_v/F_m das folhas de plantas de arroz *Wild-Type* e *AVP1OX*, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

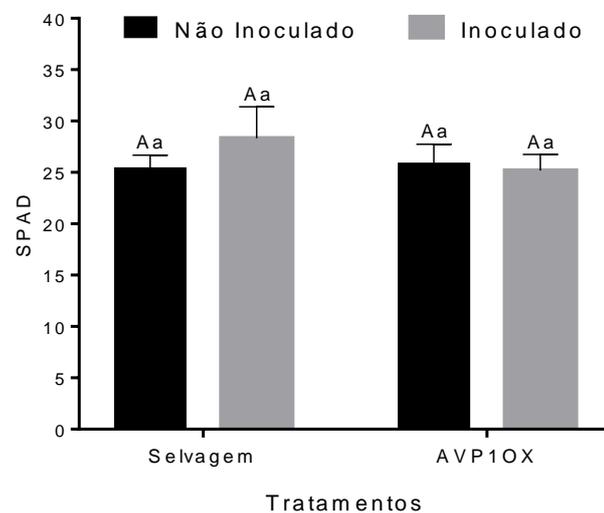


Figura 8. Intensidade do teor de verde pelo SPAD das folhas de plantas de arroz *Wild-Type* e *AVP1OX*, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

O efeito da inoculação de *P. indica* na parte aérea de plantas de arroz foi positivo para o acúmulo de N ($p < 0,0001$; Figura 9), P ($p < 0,0001$; Figura 10), Mg ($p < 0,0001$; Figura 13) e S. ($p < 0,0001$; Figura 14) em plantas de arroz *Wild-type*. Apesar do teor de K ser significativamente maior em plantas inoculadas com o fungo ($p < 0,0001$; Figura 11), não houve diferença estatística entre os genótipos *Wild-Type* e *AVP10X* ($p = 0,3387$).

O teor de N em plantas selvagens inoculadas com *P. indica* foi 2,89 vezes maior em relação às plantas *AVP10X* inoculadas. O fungo *P. Indica* induz intensivamente a absorção de P do solo. Para o teor de P na parte aérea das plantas de arroz inoculadas ou não com o fungo, o endofítico demonstrou induzir a absorção desse nutriente em 417,15% no genótipo selvagem e 426,39% em plantas transgênicas em relação aos seus respectivos tratamentos não inoculados. Mas, comparando os tratamentos inoculados, observamos que as plantas selvagens se sobressaem significativamente às plantas transgênicas. O teor de K em plantas de *Oryza sativa L.* respondeu à inoculação, sendo efetivamente maior (46,2%) em plantas selvagens, com uma indução que corresponde a quase o dobro da indução vista nas plantas transgênicas (27,3%).

Para o teor de Ca na parte aérea do arroz não houve diferença significativa entre os genótipos no grupo não inoculado ($p = 0,2934$; Figura 12) e inoculado ($p = 0,4033$), mas houve uma redução significativa no acúmulo de Ca das plantas *AVP10X* inoculadas em comparação com as plantas não inoculadas ($p = 0,0269$).

Surpreendentemente, o teor de magnésio não foi aumentado em plantas de arroz *AVP10X* inoculadas. Entretanto, nas plantas selvagens, o fungo *P. indica* demonstrou a capacidade de induzir o acúmulo de K na parte aérea e aumentar o teor em 202% em relação às plantas selvagens não inoculadas. O teor de enxofre também demonstrou o mesmo padrão da maioria dos macronutrientes, aumentando nas plantas de arroz inoculadas com *P. indica*. Entretanto, o fungo induziu um maior incremento no teor de S das plantas selvagens inoculadas (134,77%), chegando a mais que o dobro do teor encontrado em plantas *AVP10X* (62,45%).

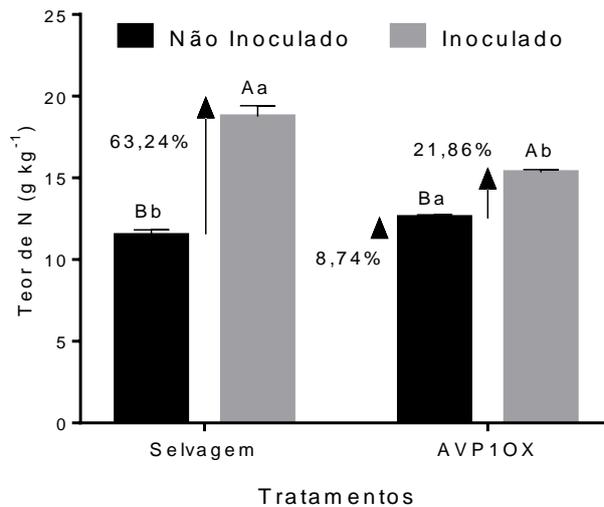


Figura 9. Teor de nitrogênio (N) na parte aérea de plantas de arroz *Wild-Type* e AVP1OX, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

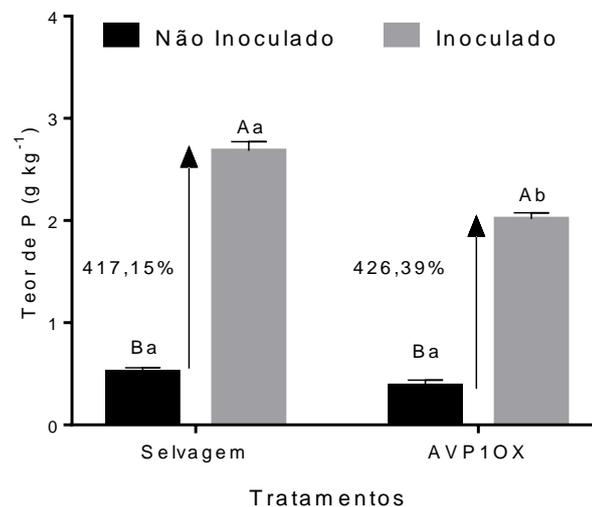


Figura 10. Teor de fósforo (P) na parte aérea de plantas de arroz *Wild-Type* e AVP1OX, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0,05$.

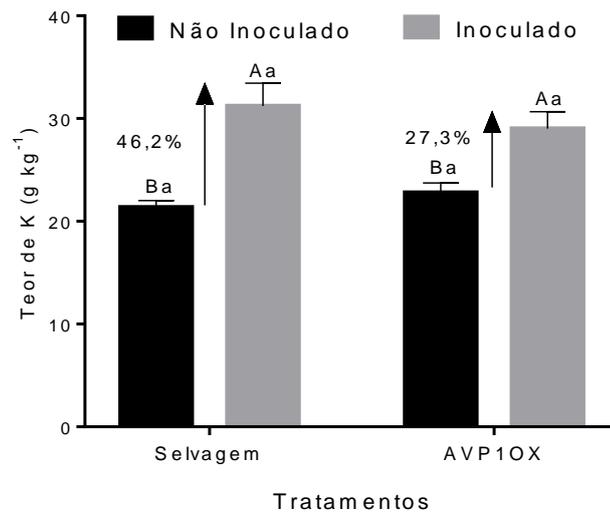


Figura 11. Teor de potássio (K) na parte aérea de plantas de arroz *Wild-Type* e AVP1OX, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0.05$.

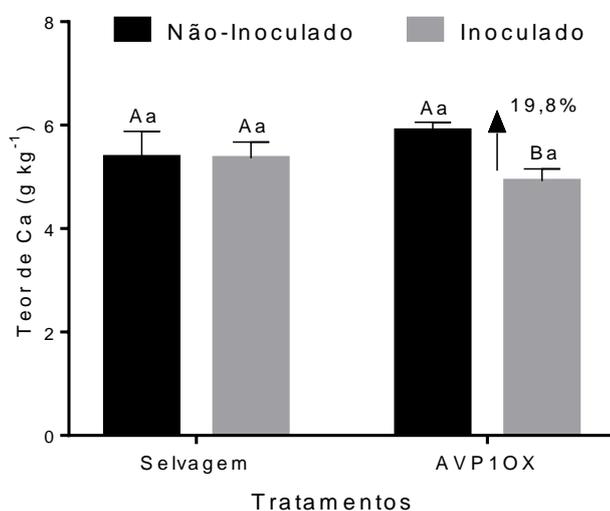


Figura 12. Teor de cálcio (Ca) na parte aérea de plantas de arroz *Wild-Type* e AVP1OX, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0.05$.

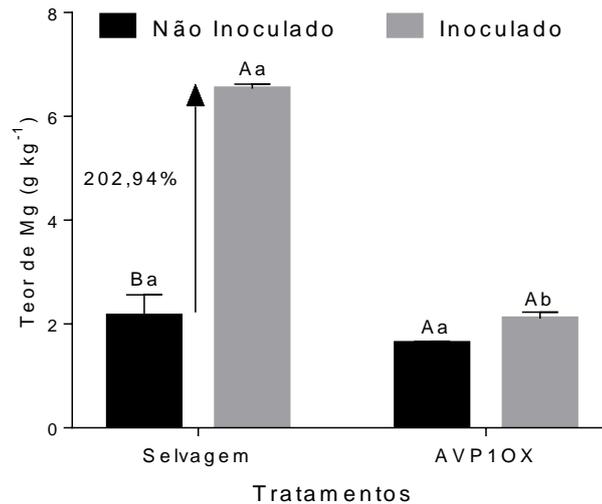


Figura 13. Teor de magnésio (Mg) na parte aérea de plantas de arroz *Wild-Type* e AVP10X, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0.05$.

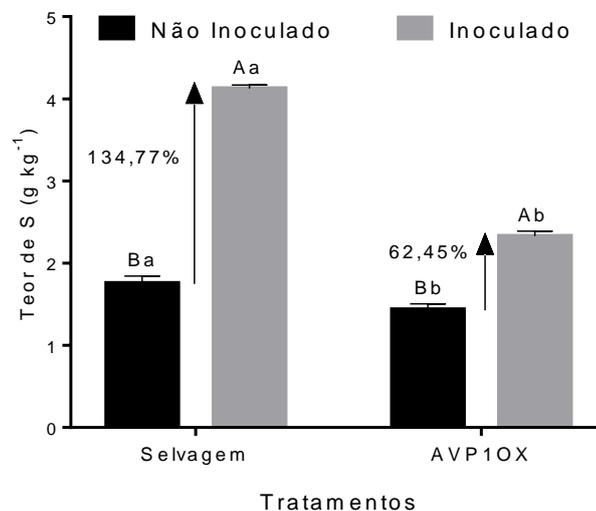


Figura 14. Teor de enxofre (S) na parte aérea de plantas de arroz *Wild-Type* e AVP10X, inoculadas ou não com *Piriformospora indica*, 30 d.a.i. Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA combinada com teste de Tukey. Para cada genótipo, as barras seguidas pela mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Para cada tratamento (não inoculado e inoculado), as barras seguidas pela mesma letra minúscula, entre os genótipos, não são significativamente diferentes em $p \leq 0.05$.

A análise dos componentes principais (PCA) (Figura 15) foi realizada para descobrir as possíveis relações entre a fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) nos diferentes tratamentos. A análise multivariada demonstra uma divisão horizontal clara entre os tratamentos não inoculados e inoculados e mostra que em relação aos parâmetros ecofisiológicos, o fungo *P. indica* influencia a assimilação de carbono, a condutância estomática e a transpiração, mas que a eficiência máxima do fotossistema II não é afetada pelo fungo, demonstrando que o fungo parece não mexer com a transferência de elétrons na cadeia transportadora.

Assim como, a colonização por *P. indica* induz a absorção de macronutrientes, exceto de cálcio, o que pode estar relacionado com as mudanças fisiológicas que ocorrem nas plantas inoculadas por fornecer mais substrato para o funcionamento dos processos fotossintéticos, a análise multivariada da relação entre o conteúdo dos macronutrientes e os tratamentos demonstrou que as plantas selvagens (WT) inoculadas influenciaram mais o conteúdo de Mg, S e N, mas, de modo geral, a inoculação também influenciou os conteúdos de K e P.

Então, a análise multivariada de todos e os parâmetros analisados demonstrou que altura, massa seca da parte aérea, assimilação de carbono, condutância estomática, transpiração e no aumento dos teores de N, P, K, Mg e S foram parâmetros influenciados pela colonização das plantas selvagens pelo fungo *P. indica*.

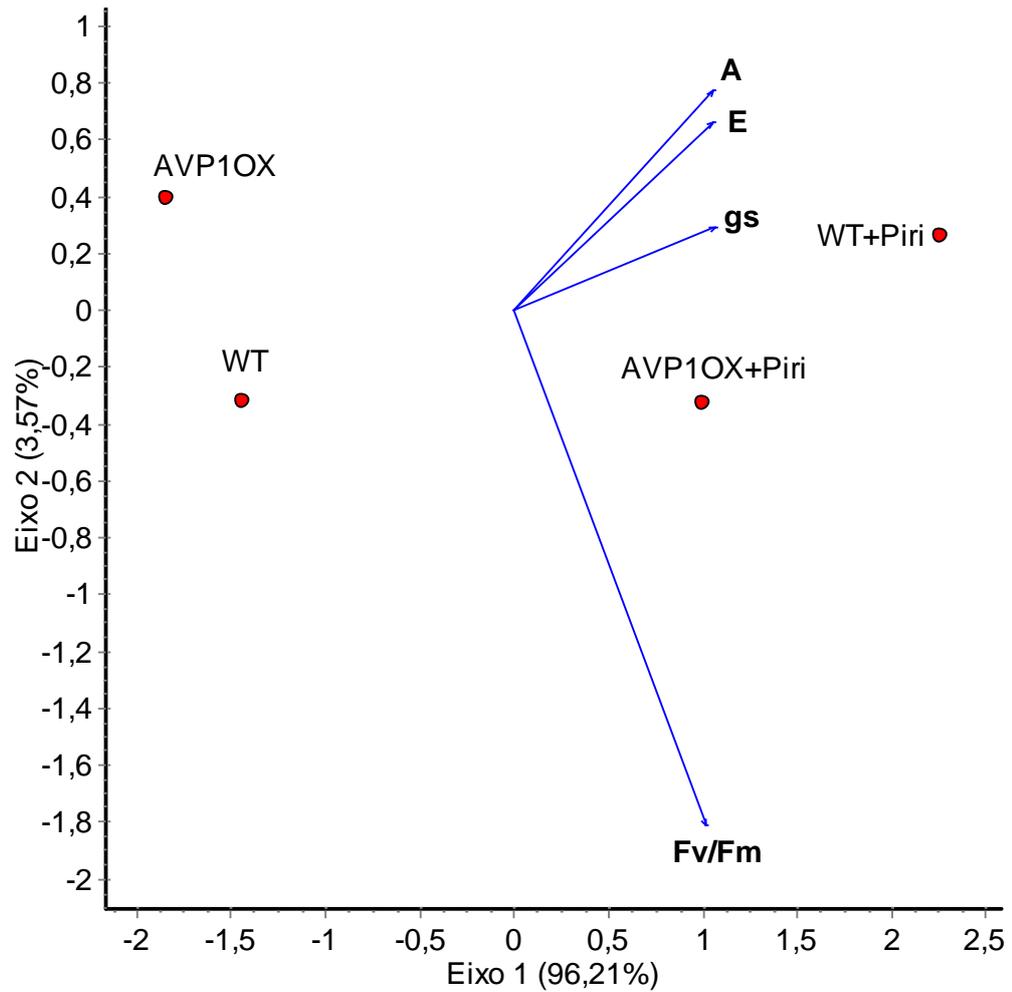


Figura 15. Análise dos componentes principais dos parâmetros fisiológicos de plantas de arroz, super-expressando (AVP1OX) ou não (*Wild-type*) a V-PPase, aos 30 dias após a inoculação de *Piriformospora indica*.

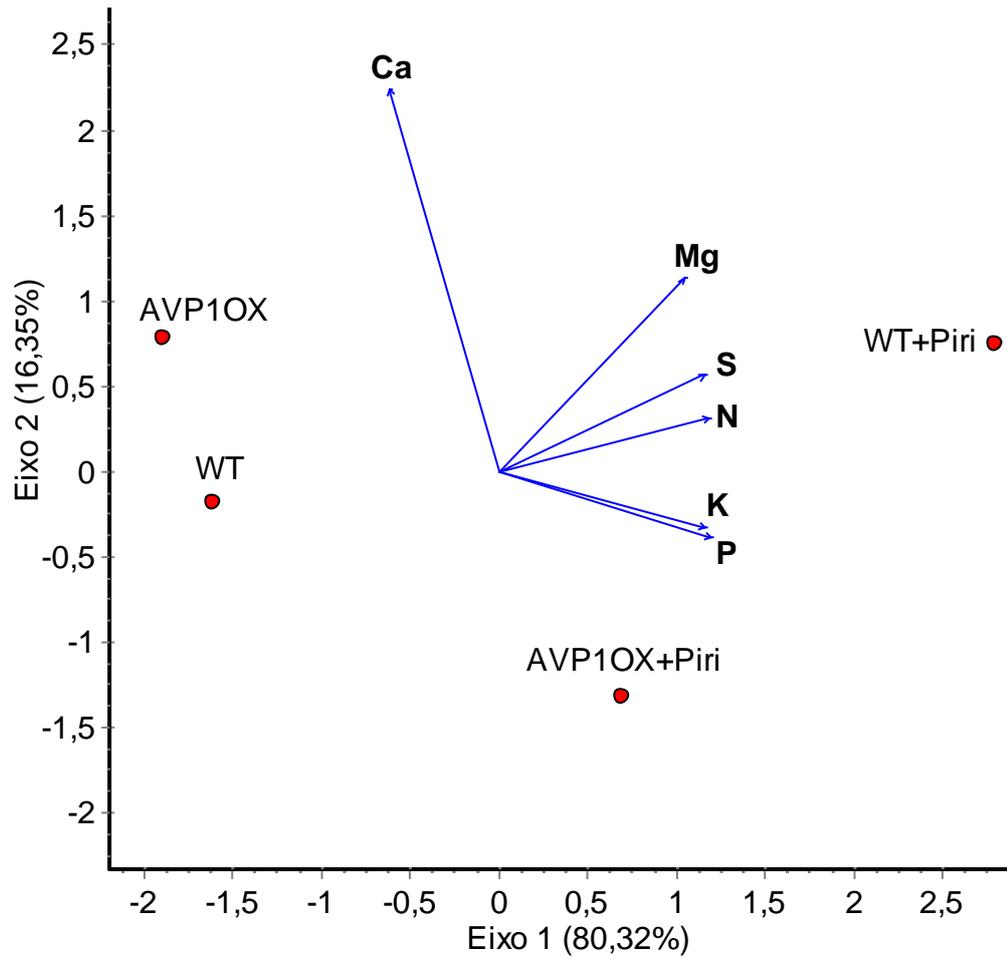


Figura 16. Análise dos componentes principais do acúmulo de macronutrientes da parte aérea de plantas de arroz, super-expressando (AVP1OX) ou não (*Wild-type*) a V-PPase, aos 30 dias após a inoculação de *Piriformospora indica*.

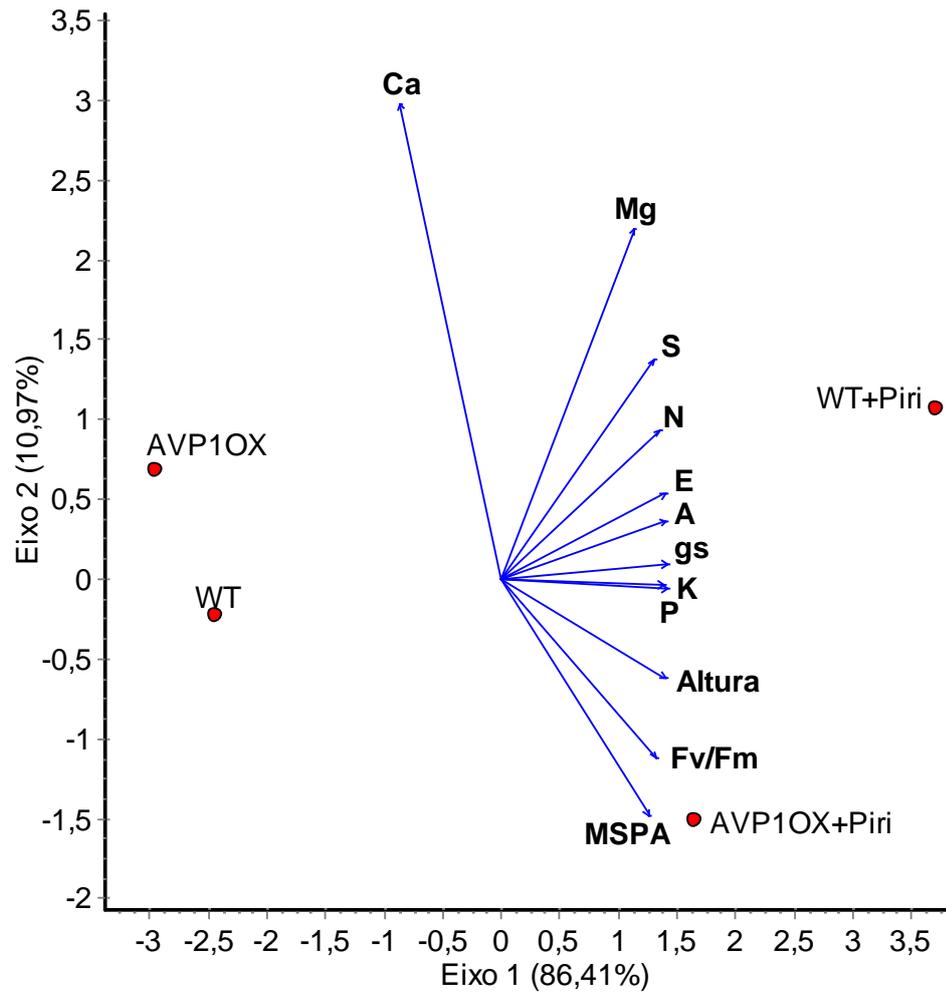


Figura 17. Análise dos componentes principais dos parâmetros de crescimento, fisiológicos e de acumulação de macronutrientes de plantas de arroz, super-expressando (AVP1OX) ou não (*Wild-type*) a V-PPase, aos 30 dias após a inoculação de *Piriformospora indica*.

7. DISCUSSÃO

Piriformospora indica é um fungo endofítico com o perfil simbiote bem definido. Em virtude dos seus papéis benéficos na associação com o hospedeiro, está sendo explorado para aplicações biotecnológicas nas áreas de agricultura, arboricultura e floricultura, bem como no cultivo hidropônico de espécies vegetais e plantas medicinais.

Os dados quantitativos de altura, massa seca da parte aérea de *Oryza sativa* L, mostraram aumento considerável com a inoculação de *P. indica*. Achados semelhantes que representam as características de aumento do crescimento pela inoculação de *P. indica* foram documentados anteriormente (Bajaj et al., 2014; Varma et al., 2012). Durante o co-cultivo de *P. indica* com *Brassica napus*, o fungo mostrou efeitos notáveis na promoção do crescimento, além de estimular o desenvolvimento das raízes, induzir a floração e aumentar o rendimento das sementes (Su et al., 2017). Da mesma forma, plantas de *Coleus forskohlii* inoculadas com o fungo também resultaram em aumento substancial da biomassa, incluindo crescimento aéreo, área foliar e comprimento médio dos ramos (Das et al., 2012), o que pode estar relacionado com a maior expressão de genes relacionados com o desenvolvimento (Waller et al., 2005).

Plantas transgênicas que superexpressam a V-PPase foram relatadas promovendo o crescimento e o rendimento dos vegetais, incluindo em arroz, cevada e algodão, por aumentar o transporte primário de prótons e influenciar no

transporte secundário, do mesmo modo, são eficientes em aumentar a absorção de água e nutrientes nas raízes, mesmo em condições de estresse por seca e salinidade (Pasapula et al., 2011; Kim et al., 2013; Schilling et al., 2014; Schilling et al., 2016). Park et al. (2005) avaliando a superexpressão das H⁺-PPases confirmaram a expressão funcional e atividade dessas proteínas até 53% superior ao controle em condições normais. Todavia, nossos experimentos em condições ótimas de crescimento não demonstraram maior promoção do crescimento nas plantas *AVP1OX*, indicando que as plantas transgênicas se comportaram de maneira similar às plantas selvagem.

O fungo *P. indica* pode promover o crescimento estimulando o desenvolvimento da raiz, principalmente dos pêlos radiculares, através de uma colonização eficiente (Su et al., 2017). Esses autores associaram as alterações na morfologia da raiz com uma melhor absorção de água e nutrientes. Como relatado, *P. indica* também se confirmou como promotor do crescimento vegetal em *B. campestris* (repolho chinês), por aumentar a concentração de auxina após a inoculação, sabe-se que esse hormônio está ligado ao desenvolvimento da raiz e o estudo nos permite especular que o fungo talvez interaja com a homeostase hormonal da planta (Vadassery et al., 2008; Lee et al., 2011; Dong et al., 2013). A regulação do BCTIR1 e dos genes envolvidos na ubiquitinação de repressores de auxina confirma aumento da sinalização de auxina (Dong et al., 2013). A estimulação de um gene responsivo à auxina de *B. campestris* sugere que a promoção do crescimento induzido por *P. indica* está associado com a acidificação da parede celular. O que se encontra de acordo com a teoria do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992), a auxina ativa as ATPases, como as do tipo P e V, para diminuir o pH extracelular para afrouxamento da parede celular (Maeshima et al., 1996).

Algumas outras evidências nos permitem conjecturar que o fungo pode aumentar a absorção de nutrientes pelo aumento da atividade de H⁺-ATPases. O estudo de Costa (2014) relatou que o fungo *Piriformospora indica* diminui o pH do meio para 4,69 quando ocorreu maior disponibilidade de glicose no meio. Ngwene et al. (2015), analisando a utilização do fósforo pelo fungo, também observaram a acidificação do meio, além disso viu que o fungo não tem preferência por uma fonte de P, mas que prefere o elemento na forma inorgânica. O pH extracelular pode ser considerado como medida indireta de crescimento e atividade

metabólica celular total (Costa, 2014) e está relacionado ao transporte de prótons por proteínas de membrana responsáveis pela manutenção do gradiente eletroquímico (Ramos et al., 2008). Em estudos anteriores observou-se que o fungo endofítico *Piriformospora indica* apresenta atividade de P-ATPases quando se eleva a disponibilidade de glicose no meio de cultura (dados não publicados).

Então, pode-se pressupor que *P. indica* pode influenciar o metabolismo primário nas raízes, fornecendo mais nutrientes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Johri et al., (2015) abordam que as micorrizas são uma forma indireta das plantas obterem o fósforo. Vários transportadores, particularmente transportadores de fosfato acoplados a prótons, foram identificados, tanto na planta quanto nas membranas de fungos e contribuem para a entrega de fosfato de fungos para plantas. Wang et al. (2014) demonstraram que a superexpressão da H⁺-ATPase *Os-HA1* aumentou a absorção de fosfato e o potencial da membrana plasmática, sugerindo que esta H⁺-ATPase desempenha um papel fundamental na energização da membrana periarbuscular, facilitando, assim, a troca de nutrientes em células de plantas enquanto o fungo se beneficia do carbono fixado pela planta.

Em *P. indica* já foi identificado um transportador de fósforo inorgânico (Pi) de alta afinidade (*PIPT*) (Yadav et al., 2010; Pedersen et al., 2013) envolvido na melhoria dos níveis de nutrição de Pi na planta hospedeira, sob condições de limitação de P. Shahollari et al. (2007) demonstraram que a promoção de crescimento mediada por *P. indica* em *Arabidopsis* está associada a uma absorção maciça de P radio marcado. A estimulação do transporte de P também ocorre nas raízes colonizadas de milho (Yadav et al., 2010). Além disso, Rani et al. (2016) identificaram transportadores de hexose de alta afinidade em *P. indica* o *PiHXT5*, que funcionam com o co-transporte de prótons e estão associados ao mecanismo de transporte dos fotossintatos. Esses dados, junto dos que obtivemos (Figura 3, A e B) sobre os parâmetros de crescimento, permitem pressupor que o fungo *P. indica* pode participar ativamente no desenvolvimento inicial das plântulas e aumentar a taxa de transplântio (Li et al., 2013).

Aparentemente, o aumento do crescimento e dos parâmetros ecofisiológicos de plantas colonizadas por *P. indica* poderia ser associado a uma melhor absorção de nutrientes (especialmente de fósforo e nitrogênio) do solo, conforme observado para associações micorrízicas. A colonização das raízes das

plantas foi monitorada através de um microscópio e, somente hifas e clamidósporos foram registrados (Figura 4B, C). O método de coloração confirmou assim a colonização das raízes pelo fungo endofítico benéfico nas amostras inoculadas. Resultados comparáveis foram observados em raízes de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa* e *Brassica campestris* (Kumar et al., 2011, Bajaj et al., 2014, Jacobs et al., 2011, Su et al., 2017, Khalid et al., 2017). Um dos vários fatores que podem ter contribuído para o crescimento das plantas são as hifas fúngicas que podem penetrar mais profundamente no solo do que as raízes e são mais eficientes na absorção de água e nutrientes do que as raízes das plantas (Costa, 2014).

A taxa de colonização (Figura 4A) mostra que as plantas transgênicas inoculadas com o fungo *P. indica* foram menores em 260,03%, quando comparadas com as plantas selvagens, e pode estar relacionada com o menor desenvolvimento da parte aérea dessas plantas. Comparando os dois genótipos, selvagem e AVP1OX, não inoculados, observou-se que não são diferentes significativamente, o que indica que o aumento na altura e massa seca está relacionado aos 40% e 11% de colonização, respectivamente. Dados obtidos por Colodete, 2013 com o co-cultivo de tomateiro superexpressando as H⁺-PPases vacuolares e *Glomus intraradices* apresentaram aumento de 17% da colonização em comparação com plantas selvagens, contrariando os nossos resultados.

Estudos realizados por Liu et al. (2016) sobre a colonização micorrízica arbuscular descrevem uma relação inversa entre a disponibilidade de P e a colonização micorrízica de plantas de milho. Baird et al. (2010) e Galvez et al. (2001) descobriram que o potencial de colonização era maior em solos onde a concentração de P era menor, assim as plantas cultivadas em solo com alto teor de P geralmente apresentam níveis mais baixos de colonização pelo FMA (Mosse et al., 1981). Curiosamente, Kumar et al., 2011, avaliando a transferência de P no desenvolvimento de milho inoculado com *P. indica* observou que o acúmulo de biomassa foi 2,5 vezes maior em baixa disponibilidade do P e que a expressão dos transportadores de fosfato *PiPT* é maior sobre a privação de fósforo, indicando que o fungo promove mais o crescimento da planta sobre baixa disponibilidade desse nutriente, entretanto, esses autores não encontraram diferença na colonização.

Em troca do seu efeito benéfico sobre a absorção de nutrientes, a planta hospedeira transfere entre 4 e 20% do seu carbono fixado fotossinteticamente para o fungo micorrízico (Esposito e Azevedo, 2010). Os parâmetros ecofisiológicos também estão relacionados com o melhor desenvolvimento da parte aérea. No presente estudo utilizaram-se plantas de arroz para demonstrar que a inoculação do fungo *Piriformospora indica* aumentou os parâmetros fotossintéticos de assimilação do carbono (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E). Assim como o rendimento quântico máximo do fotossistema II medido pela fluorescência da clorofila a , mas não houve diferença para o índice do SPAD que estima a quantidade de clorofila nas folhas.

Os teores de Chl, Chl a , Chl b e carotenoides também foram medidos em plantas de arroz (Jogawat et al., 2013, Das 2014), onde, principalmente, o conteúdo de clorofila a aumentou nas plantas inoculadas divergindo dos nossos resultados. Em *Arabidopsis*, a colonização por *P. indica* resultou em uma transferência eficiente para fluxo de elétrons em PSII e aumento do nível de remoção fotoquímica e não fotoquímica (Johnson et al., 2014).

O aumento dos parâmetros fotossintéticos está indiretamente relacionado à maior absorção de nutrientes e, além disso, ao transporte eficiente já que a maioria dos macronutrientes está associado ao aparato fotossintético e é acumulado através de fotoassimilação pelas plantas. Assim, observo-se maior conteúdo dos elementos, N, P, K, Mg e S, nas folhas de arroz inoculadas com *P. indica* confirmou que o fungo estimulou a absorção de nutrientes. A simbiose com fungos benéficos é conhecida por ser vital para a aquisição de nutrientes pelos sistemas radiculares das plantas (Gill et al., 2016), transferindo nutrientes que limitam o crescimento, do solo para as plantas em troca dos produtos da fotossíntese (Varma et al., 2013).

Os caracteres agrônômicos e de produção também foram positivos na *Brassica napus* colonizada pelo fungo e são correlacionados com o aumento da acumulação de N, P, K, S, Ca, Mg, B, Fe e Zn (Su et al., 2017). *P. indica* foi capaz de extrair, mobilizar e transportar N, P, K (Das et al., 2014) disponibilizando mais nutrientes para o desenvolvimento da parte aérea de arroz aeróbico (Kumar et al., 2013). Das et al. (2014) não encontraram um incremento no acúmulo de N, P e K na parte aérea de arroz aeróbico. As plantas de feijão colonizadas com fungos

tinham quantidade significativamente maior de N, P e K comparados para as plantas não colonizadas (Kumar et al., 2012).

A produtividade de arroz de sequeiro é limitada pela quantidade de fósforo disponível. Crusciol et al. (2013) observaram que o aumento do fósforo disponível depende de aumentar o fornecimento de fósforo no solo. Esses autores também demonstraram que o aumento da dose de fósforo culminou no aumento dos teores dos outros nutrientes. Como este trabalho não abordou a adubação fosfatada com adição de fósforo no solo pode-se inferir que o fungo *P. indica* aumentou a solubilização do fósforo imobilizado do solo. O mecanismo de solubilização do fosfato ocorre por meio de vários processos (i) produção de ácidos orgânicos, (ii) extrusão de prótons e (iii) enzimas fosfatases (Khan et al., 2009). Lucas e Davis (1961) falam que a disponibilidade dos nutrientes é influenciada pelo pH e que N, P, K, S, Ca e Mg estão mais disponíveis em um pH entre 5,5 e 6,5. Khang et al (2002) observaram no fungo *Fomitopsis sp.* que a redução no pH era correlato ao aumento do fosfato solúvel. Swetha e Padmavathi (2016) relataram que tanto os ácidos orgânicos quanto as fosfatases ácidas foram mecanismos utilizados por *P. indica* para aumentar a solubilização de fosfato.

Mesmo em altas concentrações de P descreveram *P. indica* consumindo o nitrogênio mais eficientemente que a micorriza arbuscular *Glomus intraradices* (Cruz et al., 2013). O nitrogênio é um dos nutrientes mais requisitados pelas plantas servindo como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, como nas moléculas de clorofila. Neste trabalho, uma maior transferência de N mediada pelo fungo em plantas de arroz. As plantas selvagens mostraram um aumento no teor desse nutriente de mais de 63% em comparação com plantas não inoculadas. Sherameti et al. (2005) relatam que o co-cultivo de tabaco e *Arabidopsis* com *P. indica* é acompanhada de uma enorme transferência de N para a parte aérea das mudas. O mecanismo pelo qual o fungo age parece ativa as nitrato redutases, associadas à degradação de nitrato, ao mesmo tempo que ativa a expressão do gene para a enzima de degradação de amido.

Recentemente, a capacidade de promoção do crescimento de plantas de *P. indica* tornou-se evidente com base na absorção de N, P e K significativamente aumentada em tecido de plantas de grão de bico (Nautiyal et al., 2010). Sugere-se que i) o fungo estimulou a absorção de nutrição e melhorou a nutrição estado da planta hospedeira; ii) a absorção de elementos nutritivos aprimorados

pode contribuir para os efeitos benéficos para *B. napus*, como induzir a atividade fotossintética e o crescimento das plantas.

8. CONCLUSÃO

- A inoculação de *P. indica* em plantas AVP10X não apresentou efeito sinérgico no crescimento das plantas;

- A inoculação de *P. indica* aumentou os parâmetros de crescimento, os parâmetros fotossintéticos e a acumulação de macronutrientes em plantas de arroz;

- Quando se compararam as plantas não inoculadas selvagens e AVP10X verificou-se que não há diferença entre os genótipos, indicando que o efeito benéfico do transgênico não foi notado. Então a melhora nos parâmetros do AVP10X inoculado pode ser atribuída à aplicação do fungo;

- Indica que pelo menos em condições normais, sem estresses, a aplicação desse fungo endofítico por si só é mais vantajosa do que inoculando em plantas AVP10X;

- Futuramente seria adequado avaliar se ocorre o sinergismo entre a inoculação do fungo em plantas AVP10X sob estresse, antes de afirmar que não é vantajoso trabalhar as duas estratégias em conjunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaya, A.K., Gautam, A., Zhang, L., Varma, A. (2013) Characterization of *Piriformospora indica* Culture Filtrate. In: Varma, A., Kost, G., Oelmüller, R. (Eds.). *Piriformospora indica*; Sebaciales and their biotechnological applications. *Soil Biology*, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 33: pp 345-375.
- Almario, J., Jeena, G., Wunder, J., Langen, G., Zuccaro, A., Coupland, G., Bucher, M. (2017) Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis thaliana* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *PNAS*, E9403–E9412.
- Arif, A., Zafar, Y., Arif, M., Blumwald, E. (2012) Improved Growth, Drought Tolerance, and Ultrastructural Evidence of Increased Turgidity in Tobacco Plants Overexpressing Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase (AVP1). *Mol. Biotechnol.* , 54:379–392.
- Baird, J.M., Walley, F.L., Schirf, S.J. (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi colonization and phosphorus nutrition in organic field pea and lentil. *Mycorrhiza*, (2010) 20:541–549.
- Bajaj, R., Agarwal, A., Rajpal, K., Asthana, S., Prasad, R., Kharkwal, A.C., Kumar, R., Sherameti, I., Oelmüller, R., Varma, A. (2014) Co-cultivation of *Curcuma longa* with *Piriformospora indica* Enhances the Yield and Active Ingredients. *American Journal of Current Microbiology*, 2:1-12.
- Bajaj, R., Hu, W., Huang, Y., Chen, S., Prasad, R., Varma, A., Bushley, K.E. (2015) The beneficial root endophyte *Piriformospora indica* reduces egg density of the soybean cyst nematode. *Biological Control*, 90:193-199.

- Bakhshandeh, E., Pirdashti, H., Gilani, Z. (2017) Application of mathematical models to describe rice growth and nutrients uptake in the presence of plant growth promoting microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 1-14.
- Bandyopadhyay, P., Arora, M., Abdin, M.Z., Varma, A. (2017) Cocultivation of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* for production of Artemisinin. In: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (Ed), *Mycorrhiza – Eco-Physiology Secondary Metabolites, Nanomaterials*. Cham: Springer.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, R., Hernandez, J.-P. (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378:1–33.
- Behie, S.W., Bidochka, M.J. (2014) Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. *Trends in Plant Science*, 19:734–740.
- Chadha, N., Prasad, R., Varma, A. (2015) Plant promoting activities of fungal endophytes associated with tomato roots from central himalaya, india and their interaction with *Piriformospora indica*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6: 333 – 343.
- Costa, A.R.T. (2014) Microbes made visible through plants: the functionality of *Piriformospora indica* in the rhizosphere. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Lisboa – Portugal, Universidade de Lisboa – ULisboa, 55p.
- Crusciol, C.A.C., Nascente, A.S., Mauad, M., Silva, A.C.L. (2013) Root and shoot development, nutrition and uptake efficiency of macronutrients and zinc by upland rice cultivars as affected by phosphorus fertilization. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 34: 2061-2076.
- Cruz, C., Feggh,i Z., Martins-Loução, M.A., Varma, A. (2013) Plant Nitrogen Use Efficiency May Be Improved Through Symbiosis with *Piriformospora indica*. In: Varma A., Kost G., Oelmüller R. (eds) *Piriformospora indica*. Soil Biology,. Springer, Berlin, Heidelberg, vol 33.
- Das, A., Kamal, S., Shakil, N.A., Sherameti, I., Oelmüller, R., Dua, M., Tuteja, N., Johri, A.K., Varma, A. (2012) The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signaling & Behavior*, 7:1–10.
- Das, J., Ramesh, k.V., Maithri, U., Mutangana, D., Sresh, C.K. (2014) Response of aerobic Rice to *Piriformospora indica*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52:237-251.
- DeFries, R., Fanzo, J., Remans, R., Palm, C., Wood, S., Anderman, T.L. (2015) Instructions That Macrophages. *Science*, 349:238–240.
- Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K.-H. (2006) The root endophytic fungus *Piriformospora*

indica requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 18450–18457.

- Desisa, B. (2017) Endophytic fungus *Piriformospora indica* and its mechanism of plant growth promotion. *World Scientific News*, 87:99-113.
- Dong, S.Q., Tian, Z.H., Chen, P.J., Kumar, R.S., Shen, C.H., Cai, D.G., Oelmüller, R., Yeh, K.W., (2013) The maturation zone is an important target of *Piriformospora indica* in Chinese cabbage roots. *Journal of Experimental Botany*, 64: 4529-4540.
- Dovana, F., Mucciarelli, M., Mascarello, M., Fusconi, A. (2015) In vitro morphogenesis of *Arabidopsis* to search for novel endophytic fungi modulating plant growth. *PLoS ONE*, 10:1–18.
- Durán, P., Acuña, J.J., Jorquera, M.A., Azcón, R., Paredes, C., Rengel, Z., Mora, M.M. (2014) Endophytic bacteria from selenium-supplemented wheat plants could be useful for plant-growth promotion, biofortification and *Gaeumannomyces graminis* biocontrol in wheat production. *Biol Fertil Soils*, 50:1-8.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) Rice Market Monitor (RMM): <http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/> em 21/02/2018 página mantida pela FAO.
- Fakhro, A., Andrade-Linares, D.R., Von Bargen, S., Bandte, M., Buttner, C., Grosch, R., Schwarz, D., Franken, P. (2010) Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza* 20:191-200.
- Franken, P. (2012) The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Appl Microbiol Biotechnol*, 96:1455–1464.
- Gahlot, S., Joshi, A., Singh, P., Tuteja, R., Dua, M., Jogawat, A., Kumar, M., Raj, S., Dayaman, V., Johri, A.K., Tuteja, N. (2015) Isolation of genes conferring salt tolerance from *Piriformospora indica* by random overexpression in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31:1195–1209.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:11444–11449.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581:2204–2214.

- Gaxiola, R.A., Regmi, K., Hirschi, K.D. (2016) Moving OnUp: H⁺-PPase Mediated Crop Improvement. *Trends in Biotechnology*, 1337:1-3.
- Gill, S.S., Gill, R., Trivedi, D.K., Anjum, N.A., Sharma, K.K., Ansari, M.W., Ansari, A.A., Johri, A.K., Prasad, R., Pereira, E., Varma, A., Tuteja, N. (2016) *Piriformospora indica*: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology*, v. 7:1–20.
- Giovannetti M, Mosse B (1980) Na evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 84:489-500.
- Glaeser, S.P., Imani, J., Alabid, I., Guo, H., Kumar, N., Kämpfer, P., Hardt, M., Blom, J., Goesmann, A., Rothballers, M., Hartmann, A., Kogel, K.-H (2016) Non-pathogenic Rhizobium radiobacter F4 deploys plant beneficial activity independent of its host Piriformospora indica. *The ISME Journal*, 10:871–884.
- Guo, U., Glaeser, S.P., Alabid, I., Imani, J., Haghighi, H., Kämpfer, P., Kogel, K.-H. (2017) The Abundance of Endofungal Bacterium Rhizobium radiobacter (syn. Agrobacterium tumefaciens) Increases in Its Fungal Host Piriformospora indica during the Tripartite Sebacinalean Symbiosis with Higher Plants. *Frontiers in Microbiology*, 8:1-13.
- Hamayun, M., Hussain, A., Khan, S., Kim, H.-Y., Khan, A.L., Waqas, M., Irshad, M., Iqbal, A., Rehman, G., Jan, S., Lee, I.-J. (2017) gibberellins producing endophytic fungus Porostereum spadiceum AGH786 rescues growth of salt affected soybean. *Frontiers in Microbiology*, 8:1-13.
- Heath, M.C.(2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol.Biol.* 44:312–334.
- Hoerberichts, F.A. e Woltering, E.J. (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25:47–57.
- Hosseini, F., Mosaddeghi, M.R., Dexter, A.R. (2017) Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses, *Plant Physiology et Biochemistry*, 1-55.
- Huang, M., Jiang, P., Shan, S., Gao, W., Ma, G., Zou, Y., Uphoff, N., Yuan, L. (2017) Higher yields of hybrid rice do not depend on nitrogen fertilization under moderate to high soil fertility conditions. *Springer*, 10:43.
- Hussin, S., Khalifa, W., Geissler, N., Koyro, H.-W. (2017) Influence of the root endophyte *Piriformospora indica* on the plant water relations, gas exchange and growth of *Chenopodium quinoa* at limited water availability. *Journal of a crop and agronomy science*, 1-12.

- Hückelhoven, R. (2004) BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis*, 9:299–307.
- ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Brief 52*. ed. New York: ISAAA, p. 1-126.
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Lipka, V., Kogel, K.-H., Schäfer, P. (2011) Broad-Spectrum Suppression of Innate Immunity Is Required for Colonization of Arabidopsis Roots by the Fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology*, 156:726–740.
- Jena K.K., Nissila E.A.J. (2017) Genetic Improvement of Rice (*Oryza sativa* L.). In: Campos, H., Caligari, P.D.S. (eds.) *Genetic Improvement of Tropical Crops*. 1. ed. Berlin: Springer, p.111-127.
- Johnson, J.M., Sherameti, I., Ludwig, A., Nongbri, P., Sun, C., Lou, B., Varma, A., Oelmüller, R. (2011) Protocols for Arabidopsis thaliana and Piriformospora indica co-cultivation – A model system to study plant beneficial traits. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 101-113.
- Johnson, J.M., Alex, T., Oelmüller, R. (2014) *Piriformospora indica*: The versatile and multifunctional root endophytic fungus for enhanced yield and tolerance to biotic and abiotic stress in crop plants. *Journal of Tropical Agriculture*, 52:103-122.
- Johri, A.K., Oelmüller, R., Dua, M., Yadav, V., Kumar, M., Tuteja, N., Varma, A., Bonfante, P., Persson, B.L., Stroud, R.M. (2015) Fungal association and utilization of phosphate by plants: success, limitations, and future prospects. *Front. Microbiol*, 6:1-13.
- Karthik, M., Pushpakanth, P., Krishnamoorthy, R., Senthilkumar, M. (2017) Endophytic bacteria associated with banana cultivars and their inoculation effect on plant growth. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1-10.
- Khalid, M., Hassani, D., Bilal, M., Liao, J., Huang, D. (2017) Elevation of secondary metabolites synthesis in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* L. via exogenous inoculation of *Piriformospora indica* with appropriate fertilizer. *PLoS ONE*, 12:1-18.
- Khalvandi, M., Amerian, M., Pirdashti, H., Baradaran, M., Gholami, A. (2017) Effects of Piriformospora indica fungi symbiotic on the quantity of essential oil and some physiological parameters of peppermint in saline conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 9:1-20.
- Khan, A.L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Lee, I.-J. (2013) Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35:1–13.

- Khan. A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M. (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* 1(1): 48–58.
- Kim, D., Abdelaziz, M.E., Ntui, V.O., Guo, X., Al-Babili, S. (2017) Colonization by the endophyte *Piriformospora indica* leads to early flowering in *Arabidopsis thaliana* likely by triggering gibberellin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490: 1162-1167.
- Kost, G., Rexer, K.-H. (2013) Morphology and Ultrastructure of *Piriformospora indica*. In: Varma, A., Kost, G., Oelmüller, R. (eds.), *Piriformospora indica – Sebaciniales and their Biotechnological Applications*. Verlag Berlin Heidelberg: Soil Biology, p. 25-36.
- Kumar, M., Yadav, V., Kumar, H., Sharma, R., Singh, A., Tuteja, N., Johri, A.K. (2011) *Piriformospora indica* enhances plant growth by transferring phosphate. *Plant Signaling & Behavior*, 6:723-725.
- Kumar, M., Kumar, H., Sharma, R., Sungh, A., Tuteja, N., Johri, A.K. (2011) *Piriformospora indica* enhances plant growth by transferring phosphate. *Plant Signaling & Behavior*, 6:723-725.
- Kumar, V., Sahai, V., Bisaria, V.S. (2013). Effect of *Piriformospora indica* on enhanced biosynthesis of anticancer drug, podophyllotoxin in plant cell cultures of *Linum album*. In: Varma, A., Kost, G., Oelmüller, R. (Eds.) *Sebaciniales-Forms, Functions and Biotechnological Applications*, Soil Biology, Berlin:Springer-Verlag, 33:119–137.
- Kumar, M., Saxena, R., Tomar, R.S. (2017) Endophytic microorganisms: promising candidate as biofertilizer. In: Panpatte D., Jhala Y., Vyas R., Shelat H. (eds) *Microorganisms for Green Revolution*, Microorganisms for Sustainability, 6. ed. Singapore: Springer, p. 77-85.
- Jogawat, A., Saha, S., Bakshi, M., Dayaman, V., Kumar, M., Dua, M., Varma, A., Oelmüller, R., Tuteja, N., Johri, A.K. (2013) *Piriformospora indica* rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress. *Plant signaling & behavior*, 8: e26891: 1-6.
- Johnson, J.M., Alex, T., Oelmüller, R. (2014) *Piriformospora indica*: The versatile and multifunctional root endophytic fungus for enhanced yield and tolerance to biotic and abiotic stress in crop plants. *Journal of Tropical Agriculture*, 52:103–122.
- Lam, E.(2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.* 5:305–315.
- Li, X., Guo, C., Gu, J., Duan, W., Zhao, M., Ma, C., Du, X., Lu, W., Xiao, K. (2013) Overexpression of *VP*, a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene in wheat (*Triticum aestivum* L.), improves tobacco plant growth under Pi and N deprivation, high salinity, and drought. *Journal of Experimental Botany*, 65:683–696.

- Li, L., Li, L., Wang, X., Zhu, P., Wu, H., Qi, S. (2016) Plant growth-promoting endophyte *Piriformospora indica* alleviates salinity stress in *Medicago truncatula*, *Plant Physiology et Biochemistry*, 1-40.
- Lilge, C.G., Tillmann, M.A.A., Vilella, F.A., Dode, L.B. (2003) Identificação de sementes de arroz transformado geneticamente resistente ao herbicida glufosinato de amônio. *Revista Brasileira de Sementes*, 25:87-94.
- Lin, S.-M., Tsai, J.-Y., Hsiao, C.-D., Huang, Y.-T., Chiu, C.-L., Liu, M.-H., Tung, J.-Y., Liu, T.-H., Pan, R.-L., Sun, Y.-J. (2012) Crystal structure of a membrane-embedded H1-translocating pyrophosphatase. *Nature*, 484:399-404.
- Liu, W., Zhang, Y., Jiang, S., Deng, Y., Christie, P., Murray, P.J., Li, X., Zhang, J. (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi in soil and roots respond differently to phosphorus inputs in an intensively managed calcareous agricultural soil. *Scientific Reports*, 1:11.
- Lee, Y.C., Johnson, J.M., Chien, C.T., Sun, C., Cai, D.G., Lou, B.G., Oelmüller, R., Yeh, K.W. (2011) Growth promotion of Chinese cabbage and Arabidopsis by *Piriformospora indica* is not stimulated by mycelium-synthesized auxin. *MPMI*, 24:421-431.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H1-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:37–51.
- Malla, R., Prasad, R.K., Giang, P.H., Pokharel, U., Oelmüller, R., Varma, A. 2004 Phosphorus solubilizing symbiotic fungus: *Piriformospora indica*. *Endocytobiosis Cell Res*, 15(2): 579–600.
- Mir, S.A., Don Bosco, S.J., Shah, M.A., Mir, M.M. (2016) Effect of puffing on physical and antioxidant properties of brown rice. *Food Chem*, 191:139-146.
- Moreira, B.C., Mendes, F.C., Mendes, I.R., Paula, T.A., Junior, P.P., Salomão, L.C.C., Stürmer, S.L., Otoni, W.C., M. Garçon, A., Kasuya, M.C.M. (2015) The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. *Scientia Horticulturae*, 6059:1-10.
- Mousavi, S.H., Zad, V.B., Sharifnabi, B., Ghanbari, M.A.T., Massah, A., Alavi, S.M. (2014) Induction of blast disease resistance in rice plants by endophyte fungus *Piriformospora indica*. *Iran. J. Plant Path*, 50:127-129.
- Nassimi, Z., Taheri, P. (2017) Endophytic fungus *Piriformospora indica* induced systemic resistance against rice sheath blight via affecting hydrogen peroxide and antioxidants. *Biocontrol Science and Technology*, 10:1-32.

- Negwene, B., Boukail, S., Söllner, L., Franken, P., Andrade-Linhares, D.R. (2016) Phosphate utilization by the fungal root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Soil*, 405:231–241.
- Oelmüller, R., Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A. (2009) *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*, 49:1-17.
- Oli, P., Ward, R., Adhikarie, B., Torley, P. (2014) Parboiled rice: understanding from a materials science approach. *J. Food Eng*, 124:173-183.
- Pal, S., Singh, H.B., Farooqui, A., Rakshit, A. (2015) Fungal biofertilizers in Indian agriculture: perception, demand and promotion. *Journal of Eco-friendly Agriculture*, 10: 101-113.
- Pan, R., Xu, L., Wei, Q., Wu, C., Tang, W., Oelmüller, R., Zhang, W. (2017) *Piriformospora indica* promotes early flowering in *Arabidopsis* through regulation of the photoperiod and gibberellin pathways. *Plos One*, 12:e0189791.
- Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. (2005) Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *PNAS*, 102: 18830–18835.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R.A., Payton, P. (2011) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9:88–99.
- Peng, S., Khush, G.S., Virk, P., Tang, Q., Zou, Y. (2008) Progress in ideotype breeding to increase rice yield potential. *Field Crop Res*, 108:32–38
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Putten, W. H. (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11:789–799.
- Pizzio, G.A., Paez-Valencia, J., Khadilkar, A.S., Regmi, K., Patron-Soberanos, A., Zhang, S., Sanchez-Lares, J., Furstenau, T., Li, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Yadav, U.P., Ayre, B.G., Gaxiola, R.A. (2015) *Arabidopsis* Type I proton-pumping pyrophosphatase expresses strongly in phloem, where it is required for pyrophosphate metabolism and photosynthate partitioning. *Plant Physiology*, 167:1541–1553.
- Prasad, R. (2008) Studies on Interaction Between Symbiotic Fungus (*Piriformospora indica*), Rhizobacteria and Selected Plants. Ph.D. Tese, Merrut University, Meerut.

- Prasad, R., Kamal, S., Sharma, P. K., Oelmueller, R., Varma, A. (2013) Root endophyte *Piriformospora indica* DSM 11827 alters plants morphology, enhances biomass and antioxidant activity of medicinal plant *Bacopa monniera*. *J.Basic Microbiol*, 53:1016–1024.
- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K.-H., Schäfer, P. (2011) *Piriformospora indica*—a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular Plant Pathology*, 13:508-518.
- Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K.-H., Schäfer, P. (2012) *Piriformospora indica*—a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular Plant Pathology*, 13:508–518.
- Rabiey, M., Ullah, I., Shaw, L.J., Shaw, M.W. (2016) Potential ecological effects of *Piriformospora indica*, a possible biocontrol agent, in UK agricultural systems. *Biological Control*, 213: 367–372.
- Rabiey, M., Shaw, M.W. (2015) *Piriformospora indica* reduces fusarium head blight disease severity and mycotoxin DON contamination in wheat under UK weather conditions. *Plant Pathology*, 1:1-13.
- Rabiey, M., Ullah, I., Shaw, L.J., Shaw, M.W. (2016) Potential ecological effects of *Piriformospora indica*, a possible biocontrol agent, in UK agricultural systems. *Biological Control*, 1-41.
- Rai, M., Rathod, D., Agarkar, G., Dar, M., Brestic, M., Pastore, G.M., Junior, M.R.M. (2014) Fungal growth promoter endophytes: A pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. *Symbiosis*, 62:63–79.
- Ramos, A.C., Façanha, A.R., Feijó, J.A. (2008) Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178:177-188.
- Regmi, L.C., Zhang, S., Gaxiola, R.A. (2015) Apoplasmic loading in the rice phloem supported by the presence of sucrose synthase and plasma membrane-localized proton pyrophosphatase. *Annals of Botany*, 1-12.
- Santos, L.A. (2006) *Absorção e remobilização de NO₃⁻ em arroz (Oryza sativa L.): Atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo*. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRJ, 74p.
- Schilling, R.K., Marschner, P., Shavrukov, Y., Berger, B., Tester, M., Roy, S.J., Plett, D.C. (2014) Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 12:378–386.
- Schilling, R.K., Tester, M., Marschner, P., Plett, D.C., Roy, S.J. (2016) AVP1: One Protein, Many Roles. *Trends in Plant Science*, 1501:1-9.

- Schäfer, P., e Kogel, K.H. (2009) "The Sebacinoid fungus *Piriformospora indica*, an orchid mycorrhiza which may increase host plant reproduction and fitness". In: Deising, H. (Ed.). *Plant Relationships* Berlin, Verlag: Springer, 99–112.
- Sharma, M., Schmid, M., Rothballer, M., Hause, G., Zuccaro, A., Imani, J., Kämpfer, P., Domann, E., Schäfer, P., Hartmann, A., Kogel, K.-H. (2008) Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order *Sebacinales*. *Cellular Microbiology*, 10:2235–2246.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A., Oelmüller, R. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *J. Biol. Chem*, 280:26241– 26247.
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., Oelmüller, R. (2008) The root colonizing endophyte *Pirifomospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress related genes in leaves. *Mol. Plant Microbe Interact*, 21:799–807.
- Souza, G.L.O.D., Silva, D.F., Nietsche, S., Xavier, A.A., Pereira, M.C.T. (2016) Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39:1-10.
- Su, Z-z., Wang, T., Shrivastava, N., Chen, Y., Liu, X., Sun, C., Yin, Y., Gao Q.-k., Lou, B.-g. (2017) *Piriformospora indica* Promotes Growth, Seed Yield and Quality of *Brassica napus* L. *Microbiological Research*, 1-29.
- Su, Z.-Z., Ting, W., Neeraj, S., Youyuan, C., Xiaoxi, L., Chao, S., Yufeng, Y., Qi-Kang, G., Bing-gan, L., (2017) *Piriformospora indica* Promotes Growth, Seed Yield and Quality of *Brassica napus* L. *Microbiological Research*, 1-29.
- Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R., Lou, B. (2010) *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology*, 167:1009–1017.
- Swetha, S., Padmavathi, T. (2016) Study of Acid Phosphatase in Solubilization of Inorganic Phosphates by *Piriformospora indica*. *Polish Journal of Microbiology*, 65:4, 407–412.
- Vadassery, J., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, I., Varma, A., Shahollari, B., Novák, O., Strnad, M., Ludwig-Müller, J., Oelmüller, R., (2008) The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol. Plant Microbe*, 21:1371-1383.

- Vahabi, K., Dorcheh, S.K., Monajembashi, S., Westermann, M., Reichelt, M., Falkenberg, D., Hemmerich, P., Sherameti, I., Oelmüller, R. (2016) Stress promotes *Arabidopsis* - *Piriformospora indica* interaction. *Plant signaling & behavior*, 11:1-12.
- Varma, A., Singh, A., Sudha, Sahay, N.S., Sharma, J., Roy, A., Kumari, M., Rana, D., Thakran, S., Deka, D., Bharti, K., Hurek, T., Blechert, O., Rexer, K.-H., Kost, G., Hahn, A., Maier, W., Walter, M., Strack, D., Kranner, I. (2001) *Piriformospora indica*: An Axenically Culturable Mycorrhiza-Like Endosymbiotic Fungus. In: HOCK, B. (Ed.). *The Mycota IX (Fungal associations)*. 9. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 125–150.
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A., Oelmüller, R. (2012) *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agriculture Research*, 1:117–131.
- Varma, A., Kost, G., Oelmüller, R. (2013) (Eds.) *Piriformospora indica*; Sebaciales and their biotechnological applications. *Soil Biology*, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 33: pp 17.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütehorn, B., Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a New Root-Colonizing Fungus. *Mycologia*, 90:896-903.
- Xu, L., Wang, A., Wang, J., Wei, Q., Zhang, W. (2017) *Piriformospora indica* confers drought tolerance on *Zea mays* L. through enhancement of antioxidant activity and expression of drought-related genes. *The Crop Journal*, 5: 251 – 258.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.-H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:13386–13391.
- Waqas, M., Khan, A.L., Lee, I.-J. (2013) Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *Journal of Plant Interactions*, 9:478-487.
- Wu, W., Ma, B. (2015) Integrated nutrient management (INM) for sustaining crop productivity and reducing environmental impact: A review. *Science of the Total Environment*, 5012-5013:415-427.
- Yadav, V., Kumar, M., Deep, D.K., Kumar, H., Sharma, R., Tripathi, T., Tuteja, N., Saxena, A.K., Johri, A.K. (2010) A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *Journal of Biological Chemistry*, 285:26532–26544.

- Yang, H., Zhang, X., Gaxiola, R.A., Xu, G., Peer, W.A., Murphy, A.S. (2014) Over-expression of the *Arabidopsis* proton-pyrophosphatase *AVP1* enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. *Journal of Experimental Botany*, 65: 3045–3053.
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L.k., Murphy, A., Gaxiola, R.A. (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, 5:735–745.
- Zhang, J., Li, J., Wang, X., Chen, J. (2011) OVP1, a Vacuolar H_p-translocating inorganic pyrophosphatase (V-PPase), overexpression improved rice cold tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49:33-38.
- Zhang, C., Wohlhueter, R., Zhang, H. (2016) Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Science and Human Wellness*, 5: 116–123.
- Zhang, W., Wang, J., Xu, L., Wang, A., Huang, L., Du, H., Qiu, L., Oelmüller, R. (2017) Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. *Scientific reports*, 7:1-38.
- Zhao, F.-Y., Zhang, X.J., Li, P.-H., Zhao, Y.-X., Zhang, H. (2006) Co-expression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 and *Arabidopsis* AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. *Springer: Mol Breeding*, 1-13.
- Zhu, X.-G., Long, S.P., Ort, D.R. (2010) Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:235–261.
- Ziska, L.H., Gealy, D.R., Burgos, N., Caicedo, A.L., Gressel, J., Lawton-Rauh, A.L., Avila, L.A., Theisen, G., Norsworthy, J., Ferrero, A., Vidotto, F., Johnson, D.E., Ferreira, F.G., Marchesan, E., Menezes, V., Cohn, M.A., Linscombe, S., Carmona, L., Tang, R., Merotto, A. (2015) Weedy (red) rice: an emerging constraint to global rice production. *Advances in Agronomy*, Volume 129:1-48.

APÊNDICE

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP1OX) e da inoculação com microrganismos (Sh, Hs, Sh+Hs) nos parâmetros de crescimento e teor de água de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$ * $p \leq 0.05$. Grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
a) Altura				
Genótipo	1	117	117	17,22****
Inoculação	1	4952	4952	728,8****
Genótipo x Inoculação	1	0,1334	0,1334	0,01963
Resíduo	86	584,3	6,794	
b) Massa Seca da Parte Aérea				
Genótipo	1	9,72e ⁻⁰⁰⁸	9,72e ⁻⁰⁰⁸	7,035*
Inoculação	1	3,456e ⁻⁰⁰⁶	3,456e ⁻⁰⁰⁶	250,1****
Genótipo x Inoculação	1	3 ⁻⁰⁰⁸	3 ⁻⁰⁰⁸	2,171
Resíduo	8	1,105 ⁻⁰⁰⁷	1,382 ⁻⁰⁰⁸	
c) Teor de Água				
Genótipo	1	0,3307	0,3307	0,01025
Inoculação	1	824,7	824,7	25,56***
Genótipo x Inoculação	1	6,034	6,034	0,187
Resíduo	8	258,1	32,26	

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP10X) e da inoculação com o fungo endófito *Piriformospora indica* nos parâmetros fotossintéticos de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. **** $p \leq 0.0001$; *** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$. Grau de liberdade (GL), soma dos

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
a) Assimilação de Carbono (A)				
Genótipo	1	3,825	3,825	2,597
Inoculação	1	99,16	99,16	67,31****
Genótipo x Inoculação	1	7,432	7,432	5,045
Resíduo	8	11,79	1,473	
b) Condutância Estomática (g_s)				
Genótipo	1	0,002309	0,002309	1,792
Inoculação	1	0,04889	0,04889	37,95***
Genótipo x Inoculação	1	0,001619	0,001619	1,256
Resíduo	8	0,01031	0,001288	
c) Respiração (E)				
Genótipo	1	2,224	2,224	7,37*
Inoculação	1	20,44	20,44	67,74****
Genótipo x Inoculação	1	1,482	1,482	4,911
Resíduo	8	2,416	0,3018	
d) Fv/Fm				
Genótipo	1	0,0001146	0,0001146	2,395
Inoculação	1	0,001431	0,001431	29,92****
Genótipo x Inoculação	1	6,711e ⁻⁰⁰⁵	6,711e ⁻⁰⁰⁵	1,403
Resíduo	43	0,002057	4,783 e ⁻⁰⁰⁵	
e) SPAD				
Genótipo	1	10,67	10,67	0,1282
Inoculação	1	7,26	7,26	0,2053
Genótipo x Inoculação	1	19,44	19,44	4,59*
Resíduo	20	84,71	4,236	

quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP10X) e da inoculação com o fungo endófito *Piriformospora indica* nos macronutrientes da parte aérea de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. ****p ≤ 0.0001; ***p ≤ 0.001; * p ≤ 0.05. Grau de liberdade (GL), soma dos

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
a) Teor de N				
Genótipo	1	4,014	4,014	26,34***
Inoculação	1	75,2	75,2	493,5****
Genótipo x Inoculação	1	15,23	15,23	99,97****
Resíduo	8	1,219	0,1524	
b) Teor de P				
Genótipo	1	0,4816	0,4816	119****
Inoculação	1	10,81	10,81	2671****
Genótipo x Inoculação	1	0,2107	0,2107	52,04****
Resíduo	8	0,03239	0,004048	
c) Teor de K				
Genótipo	1	0,4362	0,4362	0,1947
Inoculação	1	194,1	194,1	86,64****
Genótipo x Inoculação	1	9,952	9,952	4,442
Resíduo	8	17,92	2,24	
d) Teor de Ca				
Genótipo	1	0,003675	0,003675	0,03428
Inoculação	1	0,742	0,742	6,922*
Genótipo x Inoculação	1	29,92	29,92	6,385*
Resíduo	8	0,8576	0,1072	
e) Teor de Mg				
Genótipo	1	18,45	18,45	393,7****
Inoculação	1	17,66	17,66	376,8****
Genótipo x Inoculação	1	11,43	11,43	243,9****
Resíduo	8	0,3749	0,04686	
f) Teor de S				
Genótipo	1	3,359	3,359	749,5****
Inoculação	1	7,992	7,992	1783****
Genótipo x Inoculação	1	1,624	1,624	362,4****
Resíduo	8	0,03585	0,004482	

quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).