

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**EFEITO DA COLONIZAÇÃO POR *Serendipita indica* SOB A
RESPOSTA DO CRESCIMENTO VEGETAL DE PLANTAS DE CANA-
DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

BRENA GOMES DE SOUZA

VILA VELHA – ES
MARÇO - 2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**EFEITO DA COLONIZAÇÃO POR *Serendipita indica* SOB A
RESPOSTA DO CRESCIMENTO VEGETAL DE PLANTAS DE CANA-
DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do grau de Mestra em Biotecnologia Vegetal.

BRENA GOMES DE SOUZA

VILA VELHA – ES
MARÇO - 2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S725e

Souza, Brena Gomes.

Efeito da colonização por *Serendipita* indica sob a resposta do crescimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino / Brena Gomes Souza. – 2022.

50 f. : il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal)

Universidade Vila Velha, 2022.

Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia Vegetal. 2. Estresse oxidativo. 3. Plantas.
4. Cana-de-açúcar. I. Ramos Alessandro Coutinho.
II. Universidade Vila Velha. III. Título.

BRENA GOMES DE SOUZA

**EFEITO DA COLONIZAÇÃO POR *Serendipita indica* SOB A
RESPOSTA DO CRESCIMENTO VEGETAL DE PLANTAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

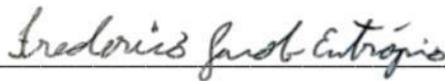
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pos-Graduação em
Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 28 de março de 2022,

Banca Examinadora:



Dra. Amanda Azevedo Bertolazi (UVV)



Dr. Frederico Jacob Eutrópio (UVV)



Dr. Leonardo Barros Dobbss (UFVJM)



Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos (UVV)

Orientador

Dedico este trabalho à minha mãe
Maria Souza, meu pai Geraldo
Souza, Meu tio Salvim e aos meus
Rafael e Júnia Poliana e aos meus
amigos.

*Resiliência é muito mais que superação.
É não desistir e não desanimar quando
todas as circunstâncias levem a isso.
Sem capacidade de resiliência na vida
profissional, não há vitória.”*

— Andrew Amaurick

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre estar comigo, me concedendo força, paciência e muita persistência para finalizar essa etapa da minha vida.

Também devo agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos, pela orientação e, acima de tudo, pelas oportunidades concedidas, pelos ensinamentos diários e pelas palavras de conforto e incentivo.

Os meus agradecimentos para toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LMAB/UVV, em especial à coorientadora Dra. Amanda Bertolazi, que esteve comigo em todos momentos nessa caminhada, colaborando e compartilhando todo seu conhecimento.

A minha companheira de laboratório Mrs. Bianca Do Carmo, que se tornou uma grande amiga durante esse tempo, dividindo comigo todos os seus aprendizados e me confortando nos momentos mais difíceis desse ciclo.

À minha família pelo apoio, compreensão e amor;

Aos meus pais, Maria Gomes de Souza e Geraldo Vicente de Souza, que sempre me apoiaram me dando força e muito amor.

Aos meus irmãos Junia Poliana Gomes de Souza e Rafael Rodrigo Gomes de Souza pelo carinho e pela compreensão da minha ausência nas suas vidas.

Ao professor Dr. Vanildo Silveira, pela gentileza de conceder as plantas de cana-de-açúcar e por ter permitido a realização de algumas análises em seu laboratório.

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

Agradeço à FAPES pelo suporte financeiro, pois sem esse apoio a execução deste projeto não seria possível. Muito obrigada!

Agradeço à Universidade de Vila Velha e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e ao do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – LMAB/UVV, pela oportunidade de realização deste curso.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 Cana-de-açúcar.....	3
3.2 Estresse salino e seus efeitos sob plantas.....	4
3.3 Mecanismo de tolerância ao estresse Salino.....	5
3.4 Microorganismos Promotores do Crescimento Vegetal (MPCV).....	8
3.5 Fungos endofíticos.....	8
3.6 <i>Serendipita indica</i> e seus benefícios com seu hospedeiro.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Seleção da espécie vegetal e dos fungos.....	11
4.2 Localização e Delineamento experimental.....	11
4.3 Material Vegetal.....	11
4.4 Obtenção do fungo <i>Serendipita Indica</i>	12
4.6 Parâmetros de crescimento das plantas de cana-de-açúcar.....	14
4.7 Coloração das raízes e determinação da taxa de colonização endofítica.....	14
4.8 Acumulação de macro e micronutrientes da parte aérea e raiz.....	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Respostas no crescimento das plantas de cana-de-açúcar.....	16
5.2 Porcentagem da colonização do fungo <i>S. indica</i>	18
5.3 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea.....	19
6. DISCUSSÃO	24
8. CONCLUSÃO	31
9. REFERÊNCIAS.....	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Clamidósporos do fungo endofítico *S. indica* em formato de pêra (A), adaptado de Varma, 2012. (B) Formação intracelular de clamidósporos. Formação de clamidósporos em placas de petri(C). Adaptado de Kost e Rexer (2013) (Figura 1: A, B e C). As barras representam 5 μ M (A), 30 μ M (B) e 30 μ M (C)..... 11
- Figura 2. Mudras de cana-de-açúcar cultivadas em meio de cultura MS (A). Estufas de aclimação das mudras de cana-de-açúcar (B). Fotos:Souza,Brena (2021) 12
- Figura 3. Multiplicação do fungo *S. indica* em plantas contendo em meio de cultura de KM. Fonte: Souza, Brena (2021)..... 13
- Figura 4. Inoculação das mudras de cana-de-açúcar aplicando a técnica “sanduíche”, utilizando discos contendo o *S. indica*. Fonte: Bertolazi, Amanda (2021)..... 14
- Figura 5. Avaliação da Altura (A), diâmetro do caule (B), volume de raiz (C) em plantas de cana-de-açúcar não inoculadas e inoculadas com *S. indica* submetidas ao estresse salino com NaCl, 110 dias após a inoculação. Os dados foram analisados por two-way ANOVA e as médias comparadas com teste de Tukey. As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos não inoculados e inoculados, sob a mesma concentração de NaCl; e as letras minúsculas entre as diferentes concentrações de NaCl e sob mesma inoculação, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,005$). As colunas representam os valores médios de oito repetições e as barras representam o desvio padrão 16
- Figura 6. Avaliação da matéria fresca da parte aérea (D), matéria seca da raiz (E), matéria fresca da parte aérea (F), matéria seca da raiz (G) em plantas de cana-de-açúcar não inoculadas e inoculadas com *S. Indica* submetidas ao estresse salino com NaCl, 110 dias após a inoculação. Os dados foram analisados por two-way ANOVA e as médias comparadas com teste de Tukey. As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos não inoculados e inoculados, sob a mesma concentração de NaCl; e as letras minúsculas entre as diferentes concentrações de NaCl e sob mesma inoculação, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($P < 0,005$). As colunas representam os valores médios de oito repetições e as barras representam o desvio

açúcar padrão.....17

Figura 7. Micrografia representativa da colonização fúngica em raízes de cana-de-açúcar não inoculadas sem o estresse salino (A), raízes de cana-de-açúcar não inoculadas e submetidas a [100mM] de NaCl (B), raízes de cana-de-açúcar não inoculadas submetidas a [200mM] de NaCl (C), raízes inoculada com *S. indica* sem o estresse salino (D), raízes de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas a [100mM] de NaCl (E), raízes de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas a [200mM] de NaCl. As raízes colonizadas mostram a presença de esporos de *S. indica* (setas pretas). As barras representam 40 μ M (A,B e C) e 20 μ M (D,E,F). As raízes foram coradas com azul de tripano 0,02%. As setas mostram a presença do fungo 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas de colonização endofítica nas raízes das plantas de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculadas com *S. indica*, nas diferentes concentrações de NaCl, após 90 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=8$), em relação ao estresse salino e a condição de inoculação, respectivamente..... 19

Tabela 2 . Conteúdo de macronutrientes [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S) e Carbono (C) e o conteúdo de micronutrientes [Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Chumbo (Pb) e Cromo (Cr)] na parte aérea das plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas, inoculadas com *S. indica* nas diferentes concentrações de NaCl, após 110 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=8$), em relação ao estresse salino e a condição de inoculação, respectivamente 21

Tabela 3. Conteúdo de macronutrientes [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S) e Carbono (C) e o conteúdo de micronutrientes [Nitrogênio (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Chumbo (Pb) e Cromo (Cr)] das raízes de plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas, inoculadas com *S. indica* nas diferentes concentrações de NaCl, após 110 dias de inoculação. Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=8$), em relação ao estresse salino e a condição de inoculação, respectivamente 24

RESUMO

SOUZA, BRENA GOMES, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2022. **Efeito da colonização por *Serendipita indica* sob a resposta do crescimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas do Brasil, é uma fonte importante de bioenergia e alimentação para diversas regiões do país. Atualmente, seu cultivo vem se estendendo para várias regiões do Brasil, as quais apresentam solos propensos a salinização. E uma importante estratégia no aumento da tolerância de plantas à estresses abióticos é a utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal, como os fungos endofíticos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas de cana-de-açúcar, inoculadas ou não com o fungo *Serendipita indica*, em resposta ao estresse salino. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 6 tratamentos e 8 repetições. Para tal, foram usadas mudas de cana-de-açúcar proveniente de cultivo *in vitro*. As mesmas foram enraizadas, aclimatadas em casa de vegetação por 10 dias e depois foram inoculadas com discos contendo fungo *Serendipita indica*. Após a inoculação, as plantas foram regadas com diferentes concentrações de NaCl (0mM, 100mM e 200mM) a cada 2 dias durante 20 dias. Após os 110 dias de inoculação foram avaliados os seguintes parâmetros: Altura; diâmetro do caule; massa fresca da parte aérea (MFPA); massa seca da parte aérea (MSPA); massa fresca da raiz (MFR) e massa seca da raiz (MSR). Os resultados demonstraram que as plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *S. indica* e submetidas ao estresse salino em diferentes concentrações de NaCl, não apresentaram diferenças significativas na altura e no diâmetro do caule, em relação as plantas não inoculadas. Com relação ao volume de raiz, as plantas inoculadas com o fungo *S. indica* apresentaram valores significativamente maiores se comparados com as plantas não inoculadas em todas as concentrações de NaCl. Quanto aos parâmetros de MFPA e MSPA, não houve diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas com o fungo *S. indica* submetidos as diferentes concentrações NaCl. Já em relação a MFR e MSR das plantas inoculadas obtiveram uma maior significância comparada com as plantas não inoculadas. Houve uma redução significativa na MFPA, MSPA, MFR e MSR com o aumento das concentrações de NaCl nas plantas inoculadas. A simbiose do *S. indica* aumentou o conteúdo de macronutrientes na parte aérea das plantas submetidas ao estresse salino. Em ambas as partições (parte aérea e raiz) as plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *S. indica* na concentração 100mM foram as mais tolerantes ao estresse salino.

Palavras-chaves: *Serendipita indica*; salinidade; crescimento vegetal; tolerância salina

ABSTRACT

SOUZA, BRENA GOMES, M.Sc, Vila Velha University – ES, march 2022.

Ecophysiology and analysis of regulatory pathways in sugarcane inoculated with *Serendipita indica* under salt stress. Advisor: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the main crops in Brazil, it is an important source of bioenergy and food for several regions of the country. Currently, its cultivation has been spreading to several regions of Brazil, which have soils tolerant to salinization. And an important strategy to increase plant tolerance to abiotic stresses is the use of microorganisms that promote plant growth, such as endophytic fungi. Thus, this work aimed to evaluate the morphological and nutritional parameters of sugarcane plants, inoculated or not with the fungus *Serendipita indica*, in response to saline stress. The experimental design was completely randomized, consisting of 6 treatments and 8 replications. For this purpose, sugarcane seedlings from in vitro cultivation were used. They were rooted, acclimatized in a greenhouse for 10 days and then inoculated with disks containing the fungus *Serendipita indica*. After inoculation, the plants were watered with different concentrations of NaCl (0mM, 100mM and 200mM) every 2 days for 20 days. After 110 days of inoculation, the following parameters were evaluated: Height; stem diameter; shoot fresh mass (MFPA); shoot dry mass (MSPA); root fresh mass (MFR) and root dry mass (MSR). The pathogenic results that sugarcane plants inoculated with *S. indica* and maintained under saline stress at different NaCl concentrations, did not experience differences in height and stem diameter, in relation to non-inoculated plants. With regard to root volume, plants inoculated with the fungus *S. indica* showed significantly higher values compared to non-inoculated plants at all NaCl concentrations. As for MFPA and MSPA parameters, there was no significant difference between inoculated and non-inoculated plants with the fungus *S. indica* manifested as different NaCl concentrations. In relation to the MFR and MSR of the inoculated plants, they obtained a greater significance detected with the non-inoculated plants. There was a significant reduction in MFPA, MSPA, MFR and MSR with increasing NaCl concentrations in the inoculated plants. *S. symbiosis* indicates an increase in macronutrient content in the aerial part of plants maintained under saline stress. in both partitions (shoot and root), sugarcane plants inoculated with *S. indica* at a concentration of 100mM were the most tolerant to saline stress.

Keywords: *Serendipita indica*; salinity; plant growth; salt tolerance

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das culturas mais importantes para a economia mundial, sendo responsável por fornecer matéria-prima para a produção de açúcar e etanol. Ela é considerada a principal fonte de biomassa para produção de biocombustíveis, devido a sua alta disponibilidade de sacarose e custo reduzido (Trombeta *et al.*, 2017).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção estimada em cerca de 585,2 milhões de toneladas para a safra de 2021/2022. Os estados de São Paulo e Minas Gerais destacam-se na produção nacional, sendo responsáveis por cerca de 61,9% da produção, seguido pelos estados do Paraná, Pernambuco, Alagoas, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, conforme dados publicados pelo Ministério da Agricultura.

Para manter a alta produção da cana-de-açúcar, seu cultivo tem se expandido para ambientes menos propícios, portanto, nos últimos anos foi observado um aumento de estudos voltados para amenizar os efeitos negativos causados por estes ambientes adversos. Esta cultura pode ser afetada por estresses bióticos e abióticos, como, a seca e principalmente pelo estresse salino (Dias *et al.*, 2016).

A salinização é um fator limitante para o desenvolvimento e produtividade das plantas e vêm causando grandes prejuízos à agricultura (Munns *et al.*, 2008). Ela pode ocorrer de forma natural, onde há ocorrência de poucas chuvas, elevada evaporação e acumulação de sais por longos períodos nos solos ou nas águas subterrâneas; ou por meio de um evento antrópico, como a irrigação com água salobra advinda de manejo inadequado, por abertura de barras de areia de lagoas costeiras e também pelo uso excessivo e indiscriminado de fertilizantes (Athar e Ashraf, 2019).

Nas plantas, a salinidade pode causar alteração do potencial osmótico, toxicidade iônica e desequilíbrio na absorção dos nutrientes, consequentemente, danificando importantes processos fisiológicos como síntese de proteínas e metabolismo de lipídeos, os quais são responsáveis pelo seu crescimento e desenvolvimento culturas (Dias *et al.*, 2016). Já no solo, os efeitos negativos da salinização são desestruturação, aumento da densidade aparente e da retenção de água do solo, e redução da infiltração de água do solo e de íons sódicos

(Siripornadulsil *et al.*, 2015).

Além disso, trabalhos tem demonstrado que esse fungo pode proporcionar melhorias no crescimento e rendimento das culturas (Su *et al.*, 2017), resistência a doenças (Fakhro *et al.*, 2010; Unnikumar *et al.*, 2013), tolerância a metais pesados (Hui *et al.*, 2015), tolerância a estresse hídrico e salino (Li *et al.*, 2017; Saddique *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017).

Neste contexto, este fungo tem sido considerado um poderoso simbiote, candidato a aumentar a produtividade de culturas de interesse econômico, como a cana-de-açúcar, em ambientes acometidos pelo estresse salino. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar as características morfológicas (altura, espessura do caule, peso fresco e peso seco da parte aérea e raiz), análise nutricional (parte aérea e raiz) e os efeitos da colonização do endofítico *S. indica* em plantas de canas-de-açúcar, não inoculadas ou inoculadas, submetidas a estresse salino, visando contribuir para a elucidação das vias de sinalização do mecanismo de tolerância de plantas sob estresse salino.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da inoculação do fungo *Serendipita indica* nos parâmetros morfológicos e nutricionais de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar sob estresse salino.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o efeito da inoculação do fungo *Serendipita indica* nos parâmetros morfológicos como altura, matéria fresca e seca da raiz e da parte aérea, diâmetro do colo e volume da raiz das plantas de cana-de-açúcar crescidas em diferentes concentrações de NaCl estresse salino;

Quantificar microscopicamente a colonização radicular pelo fungo *S. indica*, evidenciando as alterações celulares e estruturais nas raízes das plantas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes concentrações (0,100 e 200mM) de NaCl.

Verificar o efeito do fungo *S. indica* no conteúdo dos macronutrientes e micronutrientes da parte aérea e radicular das plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob estresse salino.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, de nome científico *Saccharum officinarum*, é originária do Sudeste Asiático, especificamente da Região da Nova Guiné e Indonésia. Ela é pertencente ao gênero *Saccharum L.*, da família Poaceae, fazendo parte de um conjunto de espécies de gramíneas perenes altas (Junqueira, 2016).

No Brasil seu cultivo é proveniente de um híbrido das espécies *Saccharum officinarum*, *Saccharum barberi*, *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis* e *Saccharum edule*. A espécie *Saccharum officinarum* é utilizada como base para o melhoramento genético no país, devido à sua capacidade de acumular altos níveis de sacarose no colmo; entretanto, possui baixa resistência a doenças. Já a *Saccharum spontaneum* possui genes de resistência, vigor, perfilhamento e capacidade de rebrota (Scarpari e Beauclair, 2008).

A cana-de-açúcar desenvolve-se em forma de touceira (moita), com formação de perfilho. Sendo composta por uma parte subterrânea a qual é representada por raízes e rizomas e uma parte aérea composta por caules constituídos de nós e entrenós. Suas folhas se apresentam de forma alternadas ao longo do caule com bainha e colar, e sua inflorescência é do tipo panícula, onde se encontram as flores que são hermafroditas (Lima, 1984). Comercialmente a sua reprodução é feita por via de propagação assexuada ocorrendo por meio das gemas laterais que estão presente no colmo, chamado de tolete ou por micropropagação através da cultura de meristemas apicais (Hendre *et al.*, 1983).

Para o mercado econômico, é de suma importância, pois além da produção de açúcar, etanol e aguardente, os subprodutos da cana são de grande importância socioeconômica na geração de energia, ração animal, aglomerados, alimentos, etc. (Trombeta *et al.*, 2017). Ela é cultivada em mais de 100 países, desde o nível do mar até climas mais temperados.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Fao) no ano de 2020, foram produzidas mais de 1,91 bilhões de toneladas no mundo (White *et al.*, 2020), convertendo-a em uma “commodity” de alta importância. O Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção de

585,5 milhões de toneladas na safra 2021/2022 (Camargo *et al.*, 2021). Além disso, ele também se destaca em primeiro lugar na produção de açúcar, sendo responsável pela produção de 41,8 milhões de toneladas na última safra (Usda, 2021).

Então, diante a sua importância socioeconômica, a cana-de-açúcar tem sido muito estudada quanto aos seus aspectos produtivos, fisiológicos, metabólicos e genéticos. Os principais fatores que limitam o rendimento dessa cultura atualmente são as doenças acometidas por pragas, a carência de nutrientes e principalmente a alta concentração de sal nos solos. Com isso, o uso de bioinoculante a base de microrganismos endofíticos se torna um grande potencial na solução dessas problemáticas, pois os mesmos tem como função aumentar o crescimento vegetal e a tolerância ao estresse salino nas plantas.

3.2 Estresse salino e seus efeitos sob plantas

A salinidade dos solos é um fator ambiental que restringe a produção das culturas agrícolas em diversas partes do mundo, particularmente nas regiões áridas e semiáridas, onde afeta severamente a produtividade vegetal (Fageria *et al.*, 2011). Atualmente, estima-se que cerca de 20 % das áreas cultivadas e 33% das áreas irrigadas do planeta são afetadas em alguma 14 intensidade por sais (Ashraf e Harris, 2014). E a projeção estimada é de que as áreas salinas cresçam 10 % anualmente. (Shrivastava *et al.*, 2015).

O estresse salino pode ocorrer de duas formas distintas. A primária, que ocorre de forma natural, onde há ocorrência de poucas chuvas, elevada evaporação e acumulação gradual de íons oriundos do intemperismo. E a secundária, que envolve práticas inapropriadas de irrigação, que causam um declínio na fertilidade do solo, deixando-o mais ácido/salino (Gill *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2016).

Nas plantas o estresse salino ocorre quando há um acúmulo excessivo de sais dissolvidos no solo, principalmente o NaCl, que pode afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento da planta. Altas concentrações de sais no solo, impedem a absorção de água e nutrientes pelas plantas, causando alterações do potencial osmótico, toxicidade iônica e desequilíbrio na absorção dos nutrientes, o que resulta na redução do crescimento e, conseqüentemente, na diminuição da produção e rendimento das culturas (Dias *et al.*, 2016).

O estresse salino pode afetar a célula vegetal de várias maneiras. Quando há

um aumento na concentração de sais no solo, a água tende a se mover do ambiente da planta para o solo devido ao gradiente de concentração da água. Isso leva a diminuição na disponibilidade de água na célula, o que pode causar desidratação e danos à membrana celular. Além disso, o excesso de sais pode levar a um desequilíbrio iônico dentro da célula, que pode ser tóxico para a planta (Zhao et al., 2021).

O sódio pode entrar na célula vegetal através de canais de íons transportadores de membrana e através de sistemas de transporte de K/Na. Quando a concentração de sódio na célula aumenta, isso pode levar a uma inibição do transporte de outros íons, como K, que é essencial para muitas funções celulares, incluindo o equilíbrio osmótico, a fotossíntese e a síntese de proteínas (Zhao et al., 2021). Além disso, o excesso desse íon, pode causar um aumento no estresse oxidativo, pois, pode interagir com moléculas de oxigênio para produzir espécies reativas de oxigênio que podem danificar proteínas, membranas celulares e ácidos nucleicos. Isso pode levar a redução na atividade enzimática, danos no DNA e alterações no metabolismo da planta (Zhao et al., 2021).

A salinidade pode causar diversos danos bioquímico, fisiológicos e moleculares nas plantas. No entanto, as plantas possuem alguns mecanismos de ação para ajudar a mitigar os efeitos negativos que esse estresse causa no desenvolvimento (Zhao et al., 2021).

3.3 Mecanismo de tolerância ao estresse Salino

A tolerância ao estresse salino é determinada por uma série de mecanismos bioquímicos e moleculares que permitem que as plantas respondam e se adaptem a condições de altas concentrações de sais no solo (Flowers *et al.*, 2018). Esses mecanismos são importantes para manter a integridade e o funcionamento celular sob condições adversas, pois envolvem a regulação de processos fisiológicos, como o controle do balanço hídrico, o controle do fluxo iônico, a produção de moléculas antioxidantes e a regulação da expressão de genes específicos (Shabala, 2017)

Os osmoprotetores são compostos orgânicos, produzidos de forma natural pelas plantas e que ajudam a manter o equilíbrio osmótico das células. Dentre eles, podemos destacar a prolina, glicina betaína, pinitol e manitol. Barros *et al.*, 2019, investigaram o papel da prolina no estresse Salino em mudas de cana de açúcar e

descobriram que a prolina aumentou significativamente a tolerância das mudas ao estresse salino, reduzindo o acúmulo de íons de sódio e cloreto nas folhas e melhorando a fotossíntese. Em um outro estudo, feito por Oliveira *et al.*, 2016, relataram que a prolina aumentou a expressão de vários genes que ajuda a proteger as plantas de cana-de-açúcar do estresse salino, incluindo genes relacionado à síntese de antioxidantes e à regulação do transporte de íons.

Uma outra estratégia que as plantas usam para evitar os danos causados pela salinização, é o movimento do íon Na através das proteínas antiporte Na/H, que utilizam as bombas de H⁺ para regular a expressão e atividade dos transportadores de K e Na (Zhao *et al.*, 2021). Elas são encontradas nas membranas plasmáticas e nas membranas de organelas, como o cloroplasto e a mitocôndria (Zhou *et al.* (2019)). Em um estudo realizado por Zhang *et al.* (2019), mostraram que a proteína SINHX3 (antiporte H/Na) reduziu a acumulação de Na nas folhas de tomate sob estresse salino, bem como manteve o equilíbrio iônico e protegeu as células contra o estresse oxidativo. Já Zhou *et al.* (2019), mostraram que a expressão da proteína ScNHX1 melhorou significativamente a tolerância da cana-de-açúcar ao estresse salino.

Além disso, o excesso de íons tóxicos nas plantas pode ser regulado através das glândulas salinas, que são encontradas nas folhas. Elas permitem a excreção de íons salinos em excesso nas células e nos tecidos vegetais. Esse processo também pode ocorrer através das raízes. Em um estudo realizado com plantas de *Suaeda corniculata* sob diferentes concentrações salinas, os autores mostraram que as glândulas salinas nessas plantas foram capazes de excretar grandes quantidades de íons salinos, incluindo Na e Cl (Zhang *et al.*, 2018).

De acordo Zhang *et al.*, 2018 as plantas também conseguem se proteger contra o danos do estresse salino através do mecanismo de exclusão iônica, uma vez que, as plantas evitam a entrada de íons prejudiciais, como Na em suas raízes.

Quando a planta é exposta a altos níveis de salinidade, ocorre mudanças significativas na expressão gênica, fazendo com que a mesma expresse genes específicos em resposta ao estresse salino levando a produção de proteínas que ajudam a proteger as células contra os efeitos negativos do estresse. Zhang *et al.*, (2017), avaliaram duas linhagens de milho (*Zea mays*), uma tolerante (linhagem 818) e uma sensível ao sal (linhagem 863), e através da análise de expressão gênica via RNA-seq, os mesmos identificaram um total de 1183 genes expressos nas 2 linhagens em resposta ao estresse salino. Visto que, 648 genes foram identificados como

específico da linhagem tolerante ao sal. E 320 genes foram identificados como específico da linhagem sensível ao sal. Esses genes expressos estavam envolvidos em vários processos biológicos, incluindo respostas ao estresse, metabolismo secundário e sinalização hormonal.

As plantas possuem um sistema antioxidante (enzimáticos e não enzimáticos) (Abbas *et al.*, 2017), altamente eficiente que pode ajuda a minimizar os efeitos do estresse salino. Esse sistema é composto por um conjunto de enzimas e moléculas que trabalham juntas para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e para eliminar essas moléculas danosas antes que possam causar danos as células vegetais (Gill *et al.*, 2017). As principais enzimas antioxidantes envolvidas nesse processo são: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPX). Essas enzimas trabalham juntas para neutralizar as EROs produzidas durante o estresse Salino (Mittler, 2017). Além dessas enzimas, as plantas também possuem outros compostos antioxidante, como a glutatona, carotenóides, vitamina C e E que ajudam a neutralizar as EROs (Bowler *et al.*, 1992).

Em um estudo realizado em 2017, os autores mostraram que a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD aumentou significativamente em plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições de estresse salino. Sugerindo que as enzimas antioxidantes estão envolvidas na resposta da planta ao estresse salino (Kumar, 2017). Furtado *et al.*, (2014) também apontaram que a atividade da enzima SOD aumentou em plantas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino, enquanto a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) diminuiu. No entanto, o tratamento das plantas com o antioxidante exógeno ácido ascórbico (vitamina C) aumentou a atividade da APX e reduziu os efeitos do estresse salino na planta.

Diversos hormônios, como o ácido abscísico (ABA), o etileno e o ácido jasmônico (JA) desempenham um papel importante na regulação da resposta das plantas ao estresse salino (Jia *et al.*, 2012). O ABA é o hormônio mais importante na regulação das respostas ao estresse, pois ele funciona como uma molécula de sinalização secundária para ativar uma cascata de quinase e mediar a expressão gênica durante a resposta ao estresse salino (Verma *et al.*, 2016). Sabe-se que em condições salinas a absorção de água é limitada, levando à desidratação celular e alterações no turgor celular, gerando estresses osmóticos, causando assim, um aumento nos níveis endógenos de ABA, que conseqüentemente, irá provocar o

fechamento dos estômatos, diminuindo a perda de água pelas folhas, ajudando a conservar água nas raízes e reduzindo a transpiração permitindo que elas sobrevivem em condições de salinidade elevada. Assim, a osmorregulação é uma função importante da resposta ao estresse salino da planta mediada por ABA (Verma *et al.*, 2016).

Além disso, outros hormônios como o ácido salicílico (AS) ajuda ácido indolacético (AIA) podem ajudar as plantas a tolerar o estresse Salino. O AS ajuda a induzir a resistência sistêmica adquirida nas plantas, fornecendo seu sistema de defesa contra patógenos, estresses abióticos, incluindo o estresse salino. Já o AIA ajuda a promover o crescimento das raízes e aumentar a absorção de água e nutriente pelas plantas (Verma *et al.*, 2016).

3.4 Microorganismos Promotores do Crescimento Vegetal (MPCV)

Os MPCV são organismos benéficos que vivem associado às plantas e auxiliam seu crescimento e desenvolvimento. Esse microorganismos incluem, bactérias e fungos que podem colonizar as raízes ou partes aéreas das plantas (Li *et al.*, 2017). Eles podem ser encontrados em uma variedade de ambientes, incluindo solos, água e até mesmo em plantas selvagens. São amplamente utilizados na agricultura como alternativa aos fertilizantes químicos e pesticidas, uma vez que são menos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (Mishra *et al.*, 2017). A interação desse microorganismos é benéfica para as plantas, pois além de promover o crescimento vegetal, eles também melhora a absorção de nutrientes, ajuda na proteção contra efeitos biótico e abióticos (Bakhshandeh *et al.*, 2019). E os fungos endofíticos são considerados como um tipo de MCPV.

3.5 Fungos endofíticos

O solo é composto por uma microflora muito diversificada em que as plantas estão susceptíveis à serem colonizadas por diversos microorganismos, dentre eles os endofíticos. Os endofíticos, podem ser fungos e ou bactérias, que se encontram no interior das plantas durante, todo ou pelo menos uma parte do seu ciclo de vida sem causar danos aparentes (Li *et al.*, 2017). Eles pertencem principalmente aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e distribuem-se por diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro (Hardoim *et al.*, 2017).

Existe uma associação simbiótica entre a planta hospedeira e o microrganismo endofítico, na qual a planta protege e nutre o microrganismo e este por sua vez induz a síntese ou produz metabólitos bioativos que auxiliam a proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos. E dentre esses microrganismos endofíticos existentes podemos destacar o *Serendipita Indica* (Hardoim *et al.*, 2017).

3.6 *Serendipita indica* e seus benefícios com seu hospedeiro

O *Serendipita Indica*, anteriormente chamado *Piriformospora indica*, é um fungo endofítico de raiz facultativa pertencente ao filo Basidiomycota, ordem Sebaciales e família Serendipitaceae (Weib *et al.*, 2016). Esse fungo foi isolado pela primeira vez das raízes de *Prosopis juliflora* e *Zizyphus mummularia* no deserto de Thar, Índia (Verma *et al.*, 1998).

O seu crescimento ocorre de forma inter e intracelular, produzindo clamidósporos que possuem formato de pêra no córtex das raízes colonizadas e na zona da rizosfera, porém ele não atinge a endoderme e as partes aéreas das plantas (Varma *et al.*, 2012) (Figura 1. A e B). Além disso, seu estilo de vida é considerado bifásico (Zuccaro *et al.*, 2011)

Morfologicamente, as suas células apresentam paredes finas, hialinas, sem pigmentos e com diâmetro que podem variar entre 0,7 e 3,7 μm , sendo dependente das condições de cultura (Prasad *et al.*, 2013). Geralmente suas hifas apresentam-se de forma separadas, mas enroladas em várias camadas, podendo formar conexões laterais, denominadas anastomoses, para passagem de água, nutrientes e organelas (Costa, 2014).

A colonização do fungo *S. indica* com o seu hospedeiro está totalmente associada a supressão do sistema imunológico da raiz. Essa supressão é mediada por meio de alterações na produção de fitohormônios e elevação de cálcio intracelular na planta colonizada, funcionando como sinalizadores durante o reconhecimento microrganismo benéfico-planta (Gill *et al.*, 2016). Assim, os efeitos benéficos que o fungo promove para as plantas são dependentes dos processos de reconhecimento e sinalização que serão ativados na planta em resposta a colonização do fungo *S. indica* (Oelmüller *et al.*, 2009). À medida que a colonização prossegue, as raízes são densamente cobertas com hifas extracelulares e abrigam através de redes inter e intracelulares (Gill, 2016).

Além, disso da simbiose micorrízica, ocorrem modificações na expressão de genes da planta e do fungo, acompanhadas pelas mudanças morfológicas e fisiológicas necessárias para a transferência bidirecional de nutrientes entre os simbiossantes (Requena et al., 2003).

Uma das principais características desse microorganismo é a sua alta capacidade de colonizar raízes de uma gama de espécies vegetais. E essa simbiose pode influenciar no aumento da aquisição de nutrientes e na tolerância aos estresses salino, térmico e hídrico (Gill *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2016; e Varma *et al.* 2012).

Além disso, o *S.indica* pode atribuir resistência a pragas, organismos patogênicos, toxinas, íons de metais pesados, estimular a floração precoce e pode aumentar a produção de biomassa (Das *et al.*, 2015). Diante a esses benefícios que a colonização do *S.indica* pode promover no seu hospedeiro, ele vem se destacando de forma significativa na agricultura, sendo usado como biofertilizante

Em um experimento feito por Waller *et al.*, (2015), a inoculação do *S. indica* induziu a resistência da cevada contra patógenos radiculares e foliares, incluindo *F. culmorum* e *B. graminis*. Além disso, Su *et al.* (2017) observaram que as plantas de canola (*Brassica napus L.*) inoculadas com o fungo *S. indica* apresentaram um aumento significativo na biomassa vegetal, resistência ao acamamento e rendimento e qualidade do óleo.

O fungo *S. 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 (Xu *et al.*, 2017). Segundo Saddique *et al.* (2018), a inoculação de *S. indica* em plantas de arroz submetidas ao estresse osmótico, promoveu uma melhora significativa na biomassa vegetal e no comprimento da raiz e da parte aérea das plantas de arroz inoculadas. Em 2017 estudo feitos por Zhang e colaboradores, mostraram que a colonização desse fungo em plantas submetidas ao estresse salino ocasionou um maior acúmulo de prolina e a indução da expressão de genes relacionada à seca.

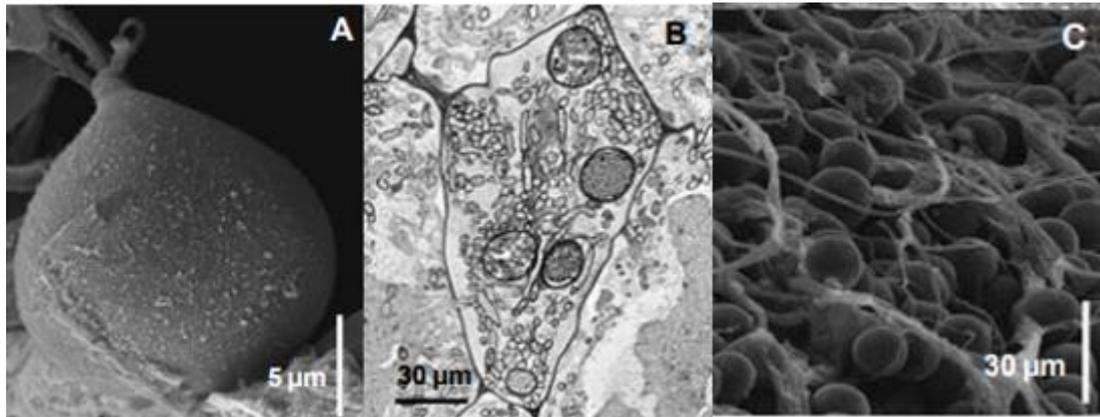


Figura 1. Clamidósporos do fungo endofítico *S. indica* em formato de pêra (A), adaptado de Varma 2012. Formação intracelular de clamidósporos(B). Formação de clamidósporos em placas de petri(C). Adaptado de Kost e Rexer (2013) (Figura 1: A, B e C). As barras representam 5 µM (A), 30 µM (B) e 30 µM (C).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da espécie vegetal e dos fungos

A seleção da espécie vegetal e do fungo *S. indica* foi baseada em estudos presentes na literatura, levando em consideração a importância da espécie vegetal e a eficiência do fungo na promoção do crescimento, biomassa vegetal e capacidade em fornecer tolerância ao estresse salino para as plantas hospedeiras.

4.2 Localização e Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Campus Biopráticas da Universidade Vila Velha-ES (Latitude de 20°21'03" S; Longitude de 40°18'08" W;Altitude de 10m), sob condições de luminosidade e temperatura ambiente.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), constituído por 3 concentrações de NaCl (0,100,200 mM) e duas condições microbiológicas (não inoculado e inoculado com *S. indica*), totalizando 6 tratamentos com 8 repetições cada, tendo um total de 48 plantas de cana-de-açúcar. A unidade experimental foi composta por um vaso de plástico com capacidade de 2L, com uma planta por vaso.

4.3 Material Vegetal

As mudas de cana-de-açúcar usadas no experimento são da cultivar

SP803280. Foram oriundas de cultivo *in vitro* e doadas pelo Laboratório de Biotecnologia (LBT) do Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As plantas cultivadas em potes de vidro herméticos contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), phytigel (2 g L⁻¹) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (10 µM), com o pH ajustado para 5.8. Para o enraizamento, as mudas foram transferidas para novos potes contendo um novo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), AIB (ácido indol butírico) (1 g L⁻¹) e phytigel (2 g L⁻¹) com pH ajustado para 5.8 onde permaneceram por 20 dias (Figura 2. A).

Após o enraizamento, as mudas micropropagadas foram retiradas dos potes e foram transplantadas individualmente para uma sementeira, contendo areia previamente autoclavada por duas vezes. Em seguida as mudas de cana-de-açúcar foram aclimatadas em estufas por 15 dias em sala de cultivo em fotoperíodo de 16he com temperatura controlada de 25 °C para adaptação das mudas (Figura 2. B). Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde ocorreu a inoculação com o fungo *S. indica*.



Figura 2. Mudanças de cana-de-açúcar cultivadas em meio de cultura MS (A). Estufas de aclimação das mudas de cana-de-açúcar (B).

Fonte: Brena Souza (2021).

4.4 Obtenção do fungo *Serendipita Indica*

O endofítico *Serendipita indica* foi obtido da coleção da Profa. Dra. Cristina Cruz do Centro de Ecologia, Evolução e Mudanças Ambientais, na Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal e atualmente é mantido na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB) da Universidade Vila Velha (UVV), Brasil.

A propagação das culturas estoque foi realizada de acordo com VARMA *et al.* (1999). Para o crescimento do fungo em meio sólido, 1 disco de ágar (1 cm diâmetro) foi removido das colônias fúngica em crescimento e inoculado em placa de Petri (10 x 11 mm), com 25 mL de meio Kaefer (KM) contendo: 2 g L⁻¹ de peptona, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de glicose, 50 mL L⁻¹ de solução de macronutrientes (12 g L⁻¹ NaNO³, 10,4 g L⁻¹ KCl, 10,4 g L⁻¹ MgSO⁴.7H₂O e 30,4 g L⁻¹ KHPO⁴), 10 mL de solução de micronutrientes (13,3 µM H₂BO³, 7 µM MnCl².4H₂O, 2 µM ZnSO⁴.7H₂O, 0,5 µM CuSO⁴.5 H₂O, 0,086 µM (NH₄)₆Mo₇O₄.4H₂O), 1 mL L⁻¹ de Fe-EDTA, 1 mL L⁻¹ de solução de vitaminas, 20 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,5-5,6 antes da esterilização a 121 °C por 40 min. As placas foram mantidas na ausência de luz, à temperatura de 28±1 °C em incubadora BOD (DAS *et al.* 2012). E aos 15 dias de crescimento certificou-se nas placas a produção de clamidósporos.

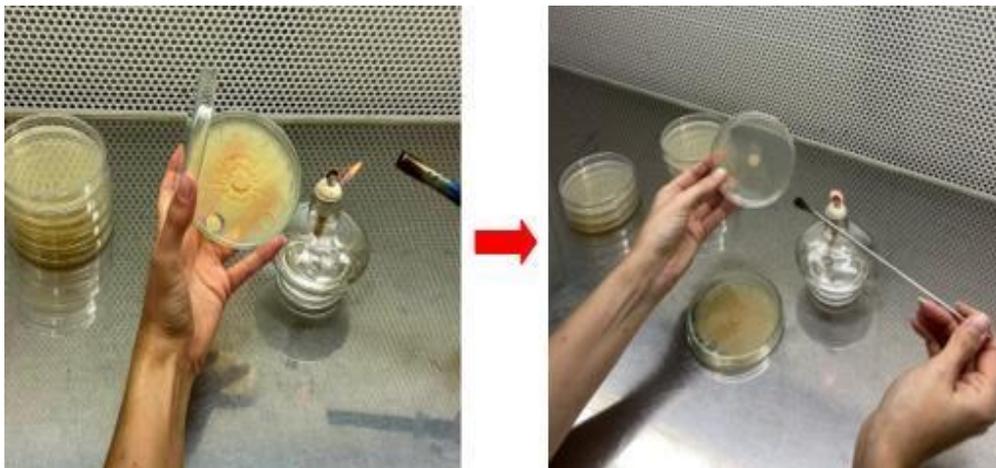


Figura 3: Multiplicação do *fungo S. indica* em placas contendo meio de cultura KM. Fonte: SOUZA, Brena (2021).

4.5 Inoculação das plantas de cana-de-açúcar e indução do estresse salino

Na casa de vegetação, as plantas foram transplantadas para vasos de plástico de 2 L contendo o substrato estéril composto por areia:terra vegetal (2:1). Em seguida a mudas foram inoculadas de acordo com a técnica nomeada de “sanduíche” (Figura .4), onde 4 discos de ágar (11 mm) contendo clamidósporos do *S.indica* foram colocados em contato direto com as raízes das plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 90 dias e foram regadas três vezes por semana, com solução de Clark modificada (¼ força), pH 5,5-5,6 (CLARK, 1975).



Figura 4: Inoculação das mudas de cana-de-açúcar aplicando a técnica “sanduíche”, utilizando discos contendo o *S. indica*.

Fonte: Amanda Bertolazi

Aos 90 dias de inoculação, as plantas foram submetidas ao estresse salino através da aplicação de diferentes concentrações de NaCl (0 mM, 100 mM, 200 mM). Elas foram irrigadas a cada dois dias, no período de 20 dias com 100 mL de solução contendo as diferentes concentrações de NaCl. Após esse período, foi feita a avaliação dos parâmetros morfológicos e nutricionais, além disso, também foi avaliada a capacidade de colonização e efetividade fúngica das raízes da cana-de-açúcar.

4.6 Parâmetros de crescimento das plantas de cana-de-açúcar

O experimento ocorreu em um total de 110 dias, este tempo foi pré-estabelecido para que ocorresse a simbiose entre o fungo endofítico e a planta. Logo, aos 110 dias após a inoculação foram avaliados os seguintes parâmetros: altura das plantas (cm), sendo medidas da base do caule ao ápice foliar; o diâmetro do caule (mm) utilizando um paquímetro digital (Digital Caliper, USA); a massa fresca da parte aérea (MFPA); massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR) e massa seca da raiz (MSR) por meio de pesagem em balança analítica de precisão, a taxa de colonização micorrízica via microscopia óptica e o conteúdo de macro e micronutrientes.

4.7 Coloração das raízes e determinação da taxa de colonização endofítica

A avaliação da colonização endofítica do *S. Indica* nos diferentes tratamentos

foi realizada conforme a metodologia descrita por Phillips e Hayman, (1970) com modificações, 60 dias após a inoculação. As amostras das raízes foram coletadas e lavadas em água corrente. Em seguida, foram colocadas em tubos Falcon contendo KOH 10 % e submetidas à aquecimento em banho maria a 60 °C por 60 minutos para clarificar. Depois de clarificadas, as mesmas foram transferidas para novos tubos Falcon, onde foram lavadas com água deionizada e coradas em azul de tripano 0,02 % por 20 min. E por fim, foram descoradas com lactofenol 50 % por 1-2 h.

Após o processo de coloração, 20 segmentos de raízes de cada tratamento, medindo aproximadamente 1cm de comprimento, foram escolhidos aleatoriamente, colocados em lâminas e levados para visualização em microscópio óptico. A distribuição dos esporos (*S. indica*) dentro do córtex radicular foi utilizada como índice de colonização. O percentual de colonização foi determinado utilizando a seguinte fórmula: Colonização de Raiz (%) = [(número de segmentos colonizados / número total de segmentos analisados) x 100] (Bertolazi *et al.*, 2019 e Begum *et al.*, 2019).

4.8 Acumulação de macro e micronutrientes da parte aérea e raíz

As amostras da parte aérea e da raiz das plantas dos respectivos tratamentos foram lavadas em água corrente e água deionizada, e em seguida foram secadas em estufa de circulação forçada de ar a 60-70 °C, por um período de 72 h, depois desse período foram pesadas. Após secagem as amostras foram moídas e o material resultante foi acondicionado em recipientes de plástico hermético visando um melhor acondicionamento do mesmo, para as posteriores análises químicas. Os macro e micronutrientes foram quantificados por ICP-OES (Peters, 2005).

5.9 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram analisados estatisticamente por two-way ANOVA. Quando verificado que houve diferença significativa entre os tratamentos, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.0, com um nível de significância de 5 % para testar as hipóteses.

5. RESULTADOS

5.1 Respostas no crescimento das plantas de cana-de-açúcar

As plantas não inoculadas com o fungo *S. indica* apresentaram um aumento significativo da altura apenas nas plantas submetidas a concentração 100mM de NaCl quando comparadas com as plantas controle (Figura 5A). Porém, nesta mesma concentração as plantas inoculadas apresentaram um decréscimo significativo de 12,11% ($p < 0,0001$). Quanto ao diâmetro do colo das plantas, não houve nenhuma diferença significativa entre os tratamentos não inoculados e inoculados com o fungo *P. indica* expostos as diferentes concentrações de NaCl (Figura 5B).

Com relação ao volume de raiz, as plantas inoculadas com o fungo *S. indica* apresentaram valores significativamente maiores se comparados com as plantas não inoculadas, sendo 25,3% ($p < 0,0001$), 69,03% ($p < 0,0001$) e 54,77 % ($p < 0,0001$) nas respectivas concentrações de 0 ,100, 200mM de NaCl (Figura 5C). No entanto, não houve significância no volume de raiz quando se compara as plantas inoculadas com o *S.indica* sob as diferentes concentrações salina (0, 100 e 200mM).

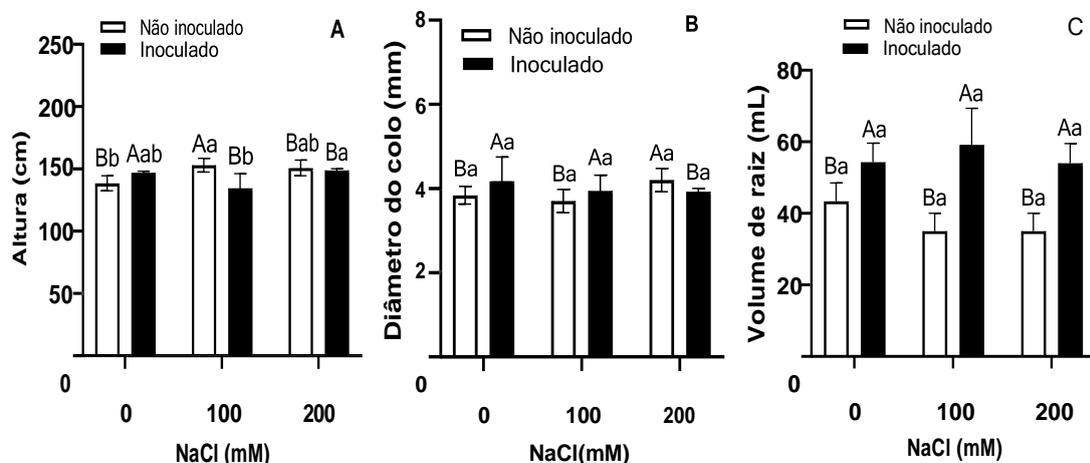


Figura 5. Avaliação da Altura (A), diâmetro do caule (B), volume de raiz (C) em plantas de cana-de-açúcar não inoculadas e inoculadas com *S. Indica* submetidas ao estresse salino com NaCl, 110 dias após a inoculação. Os dados foram analisados por two-way ANOVA e as médias comparadas com teste de Tukey. As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos não inoculados e inoculados, sob a mesma concentração de NaCl; e as letras minúsculas entre as diferentes concentrações de NaCl e sob mesma inoculação, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($p < 0,005$). As colunas representam os valores médios de oito repetições e as barras representam o desvio padrão.

De acordo com a Figura.6D e F não houve diferenças significativas da MFPA

e MSPA entre as plantas inoculadas e não inoculadas com o microorganismos, exceto, no tratamento controle, onde as plantas inoculadas sem estresse salino apresentaram um aumento significativo de 43,61% ($p < 0,0001$) (MFPA) e 34,10% ($p < 0,0001$) (MSPA) se comparadas com as plantas controle não inoculadas.

Notou-se um aumento significativo na massa fresca e seca das raízes das plantas inoculadas comparado com as plantas não inoculadas submetidas as diferentes concentrações de NaCl, com excessão da massa seca de raiz no tratamento de 200mM de NaCl (Figura 6E e G).

Houve também uma redução significativa na MFPA, MSPA, MFR e MSR com o aumento das concentrações de NaCl nas plantas inoculadas e expostas a 200mM de NaCl (Figura 6D,E,F,G).

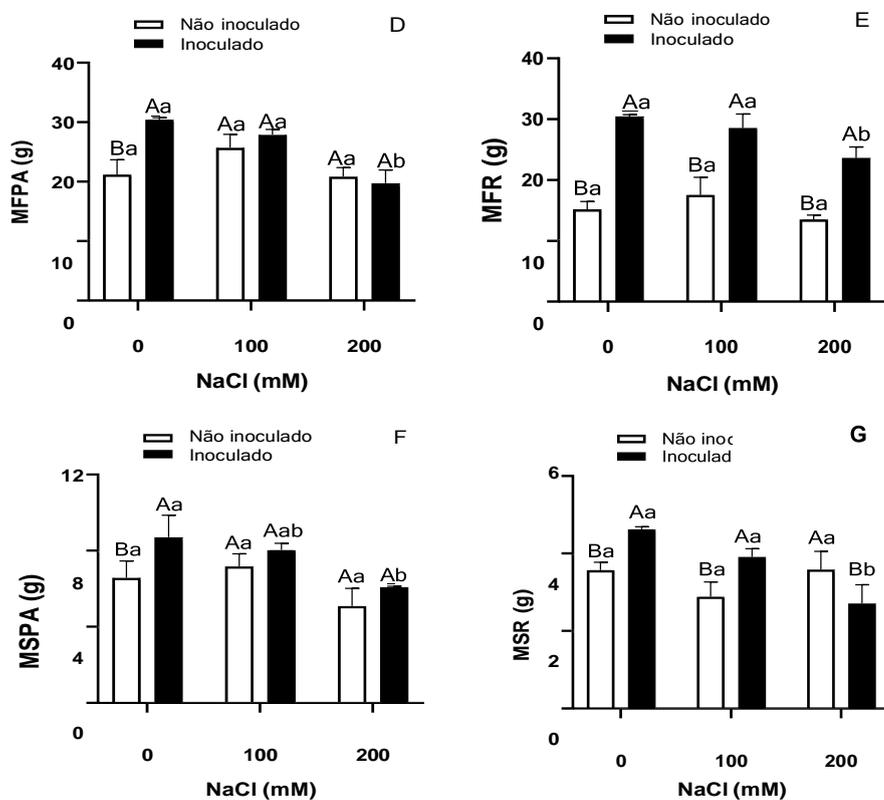


Figura 6. Avaliação da matéria fresca da parte aérea (D), matéria seca da raiz (E), matéria fresca da parte aérea (F), matéria seca da raiz (G) em plantas de cana-de-açúcar não inoculadas e inoculadas com *S. Indica* submetidas ao estresse salino com NaCl, 110 dias após a inoculação. Os dados foram analisados por two-way ANOVA e as médias comparadas com teste de Tukey. As letras maiúsculas diferentes entre os tratamentos não inoculados e inoculados, sob a mesma concentração de NaCl; e as letras minúsculas entre as diferentes concentrações de NaCl e sob mesma inoculação, indicam diferenças significativas do teste de Tukey ($p < 0,005$). As colunas representam os valores médios de oito repetições e as barras representam o desvio padrão.

5.2 Porcentagem da colonização do fungo *S. indica*

Nos seguimentos de raízes analisados por microscopia óptica de todos os tratamentos não inoculados não foi visualizado a presença de nenhum clamidósporo (Figura 6A,B e C). Já nos tratamentos inoculados submetidos ou não ao estresse salino pode-se observar numerosos clamidósporos nas células corticais das raízes de cana-de-açúcar (Figura 6D,E e F).

Morfológicamente os esporos do fungo *S. indica* possuem formato arredondado (Figura 6D). Contudo, pode-se notar que nas plantas que foram submetidas a maior concentração de sal [200mM] o formato dos mesmos passaram a ser retangulares (Figura 6F).

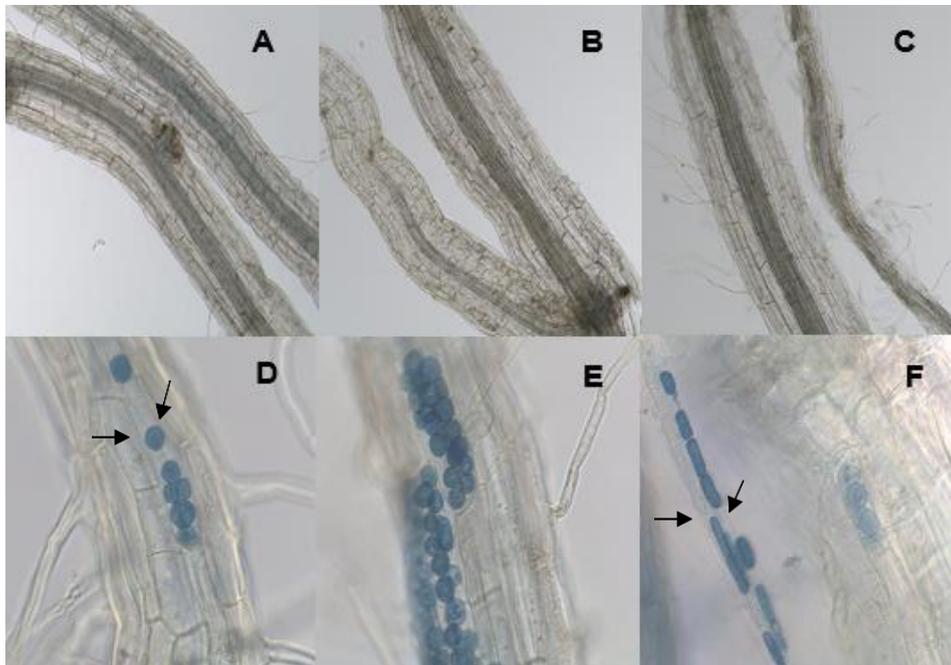


Figura 6. Micrografia representativa da colonização fúngica em raízes de cana-de-açúcar não inoculadas sem o estresse salino (A), raízes de cana-de-açúcar não inoculadas e submetidas a [100mM] de NaCl (B), raízes de cana-de-açúcar não inoculadas submetidas a [200mM] de NaCl (C), raízes inoculada com *S. indica* sem o estresse salino (D), raízes de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas a [100mM] de NaCl (E), raízes de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas a [200mM] de NaCl. As raízes colonizadas mostram a presença de esporos de *S. indica* (setas pretas). As barras representam 40 μ M (A,B e C) e 20 μ M (D,E,F). As raízes foram coradas com azul de tripano 0,02%. As setas mostram a presença do fungo.

Como podemos observar na Tabela.1, a taxa de colonização radicular dos tratamentos inoculados e submetido as diferentes concentrações de NaCl foi superior a 85,00 %. No entanto, nas concentrações de 100 e 200mM de NaCl a taxa foi

superior as plantas controle, atingindo 100% de colonização.

Tabela 1. Taxas de colonização endofítica nas raízes das plantas de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculadas com *S. indica*, nas diferentes concentrações de NaCl, após 90 dias de inoculação.

Tratamentos	Não inoculado	Inoculado	[100] NaCl + <i>S. indica</i>	[200] NaCl + <i>S. indica</i>
Colonização (%)	–	85,20 ± 5,7 A	100 ± 0 A	100 ± 0 A

Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=8$), em relação ao estresse salino e a condição de inoculação, respectivamente.

5.3 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea

Foram analisados nesse experimento o conteúdo de macronutrientes e micronutrientes, sendo estes, Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Carbono (C), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Chumbo (Pb) e Cobre (Cr), da parte aérea e nas raízes das plantas de cana-de-açúcar (Tabela 3 e 4).

A colonização do *S.indica* proporcionou um aumento significativo do conteúdo de N (30,49 % ; $p < 0,0001$), K (15,82 %; $p < 0,0001$), Ca (21,78%; $p < 0,0001$), Mg (31,84 %; $p < 0,0001$), e S (24,87 %; $p < 0,0001$), na parte aérea das plantas controle. Já nas plantas inoculadas sob as diferentes concentrações de NaCl houve um aumento significativo do acúmulo de N 50,29%, 49,54% e 46,50%, P (4,30%, 76,10 % e 28,10%), Ca (21,78%, 36,72 e 14,53; $p < 0,0001$), Mg 30,48%, 39,26% e 28,10 % ($p < 0,0001$), S (24,26%, 13,29% e 7,15%; $p < 0,0001$), se comparada com as plantas não inoculadas, como mostrado na Tabela.3. No entanto, as plantas inoculadas e expostas a 0 e 200mM de NaCl apresentaram uma redução no conteúdo de K (22,10%; $p < 0,0001$) e Ca (10,6%; $p < 0,0001$).

No conteúdo de Na, as plantas inoculadas e expostas as diferentes concentrações (0, 100 e 200 mM) de NaCl, apresentaram um incremento significativo de 15,97% ($p < 0,0001$), 53,72 % ($p < 0,0001$) e 15,12 % ($p < 0,0001$), respectivamente. Já as plantas inoculadas com *S. indica* submetidas a 100 e 200 mM apresentaram maior conteúdo de Na, sendo este crescente 382,32% ($p < 0,0001$) e 977,60% ($p < 0,0001$).

Já nos micronutrientes da parte aérea das plantas controle inoculadas e nas

plantas inoculadas sob a concentração de 200mM de NaCl houve uma redução do conteúdo de Ni em 48,74% ($p < 0,0001$) e 39,12 % ($p < 0,0001$), respectivamente (Tabela 3). O conteúdo de Cu apresentou um aumento de 120,51% ($p < 0,0001$) no tratamento de plantas inoculadas e submetidas ao estresse salino de 100mM de NaCl comparada ao tratamento de 100mM de NaCl sem o microorganismo. O estresse salino não influenciou o conteúdo de Cu nas plantas inoculadas.

Observou-se, que acúmulo de Zn nas plantas inoculadas aumentaram significativamente 66,00 % ($p < 0,0001$), 42,73 ($p < 0,0001$) e 23,42% ($p < 0,0001$) em relação as plantas não inoculadas nas diferentes concentrações (0,100,200 mM) de NaCl (Tabela 3). No tratamento de 200mM de NaCl as plantas inoculadas apresentou um decréscimo significativo de 11,71% ($p < 0,0001$) em relação ao controle inoculado.

Houve uma redução significativa de 35,30% ($p < 0,0001$) no conteúdo de Fe nas plantas controle inoculadas (Tabela 3). Em contrapartida, nas plantas inoculadas sob 100mM de NaCl apresentaram um aumento de 59,18% ($p < 0,0001$) no conteúdo de Fe em relação a essa mesma concentração sem o inoculação. Se tratando das plantas inoculadas nas diferentes concentrações, o tratamento com 100mM de NaCl obteve um maior acúmulo de Fe(100,86%; $p < 0,0001$).

O conteúdo de Mn diminuiu 34,74% ($p < 0,0001$) na concentração de 200mM de NaCl das plantas inoculadas em relação a essa mesma concentração sem o microorganismo. Nas concentrações de 100 e 200mM de NaCl com e sem o fungo, as plantas apresentaram maior acúmulo de conteúdo de Mn em relação as plantas controle inoculadas e não inoculadas, respectivamente.

Se tratando do metais, o conteúdo de Al apresentou um aumento significativo de 84,11% ($p < 0,0015$) na parte aérea inoculada e submetida a concentração de 100 de NaCl comparadas com a parte aérea sem inoculação. No entanto, houve um aumento não significativo do conteúdo de Al na parte aérea das plantas de cana-de-açúcar submetidas a 200mM de NaCl.

Observou-se um aumento significativo de 362,12 % ($p < 0,0001$) no conteúdo de Pb das plantas inoculadas submetidas a 200mM de NaCl comparada as plantas não inoculadas da mesma concentração de sal (Tabela 3). Essas mesmas plantas quando comparadas as plantas inoculadas sem o estresses salino apresentou uma diferença significativa de 205,00% ($p < 0,0001$). Entretanto, teve um decréscimo de 80,65% ($p < 0,0001$) nas plantas colonizadas e submetidas a [100mM] de NaCl comparadas as plantas sem o fungo submetidas a essa mesma concentração de sal.

Na concentração de 200mM de NaCl o endofítico provocou decréscimo significativo de 43,43% ($p < 0,0001$) na absorção do conteúdo de Cr da parte aérea das plantas inoculadas comparada com a parte aérea das não inoculadas do respectivo tratamento. Já a parte aérea submetida a [100mM] de NaCl apresentou umacréscimo significativo de 111,10% ($p < 0,0001$) e 54,90% ($p < 0,0017$) no conteúdo de Cr comparadas com a parte aérea das plantas controle inoculada sem e com 200mMde NaCl,

Tabela 2. Conteúdo de macronutrientes [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S) e Carbono(C)] e o conteúdo de micronutrientes [Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Chumbo (Pb) e Cromo (Cr)] na parte aérea das plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas, inoculadas com *S. indica* nas diferentes concentrações de NaCl, após 110 dias de inoculação.

Nutrientes	Tratamentos						
	0 mM	0 mM + Si	100 mM	100 mM + Si	200 mM	200 mM +Si	
	<i>g kg⁻¹</i>						
Macronutrientes	N	5,05 Bb	7,59 Ac	5,39 Bb	8,06 Ab	7,08 Ba	10,37 Aa
	P	2385,18 Ba	2487,62 Ac	1628,85Bb	2867,83 Ab	1624,14 Bb	2080,36 Aa
	K	67396,8 Bb	78059,7 Aa	71565,4 Bb	78422,9 Aa	64307,8 Ab	60846,7 Bb
	Na	815,27 Bc	945,53 Ac	2966,80Bb	4560,45Ab	8850,60Ba	10189,10 Aa
	Ca	28913,9 Bb	35212,1 Ab	34214,6 Ba	46780,9 Aa	27519,7 Bb	31518,9 Ab
	Mg	7366,89 Ba	9712,52 Ab	8053,24 Ba	11215,10 Aa	6332,97 Bb	8110,39 Ac
	S	6849,83 Ba	8512,10 Aa	7354,32 Ba	8332,07 Aa	6474,26 Ba	6937,18 Ab
	C	408,16 Aa	406,32 Aa	407,84 Aa	405,80 Aa	398,35 Aa	403,35 Aa
	<i>mg kg⁻¹</i>						
Micronutrientes	Ni	49,92 Aa	25,59 Ba	27,34 Aa	21,72 Aa	26,15 Aa	15,92 Bb
	Cu	17,32 Aa	19,22 Aab	11,75 Bb	21,64 Aa	16,34 Aa	16,71 Ab
	Zn	145,43 Bb	241,41 Aa	177,20 Ba	252,91 Aa	172,76 Ba	213,15Ab
	Fe	1178,55 Aa	762,72 Bb	980,49 Bb	1531,29 Aa	891,68 Ab	889,14 Ab
	Mn	1543,68 Ab	1621,63 Ab	2200,17 Aa	2132,97 Aa	2029,10 Aa	1324,11 Bc
	Al	1832,80 Aa	669,98 Bb	692,39 Bb	1274,76 Aa	756,94 Ab	1021,84 Aab
	Pb	1,46 Bb	2,00 Ab	19,02 Aa	3,68 Bb	1,32 Bb	6,10 Aa
	Cr	19,87 Aa	7,09 Bb	9,69 Ba	15,01 Aa	9,51 Aa	5,38 Bb

Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=8$), em relação ao estresse salino e a condição de inoculação, respectivamente.

Avaliando os macronutrientes presentes na parte radicular das plantas de controle, observou-se através da Tabela.2, que colonização do *S.indica* proporcionou

um aumento significativo do conteúdo de N (67,39 %; $p < 0,0001$), P (68,44 %; $p < 0,0001$), K (108,55 %; $p < 0,0001$), Na (277,62 %; $p < 0,0001$), Ca (172,43 %; $p < 0,0001$), Mg (170,83 %; $p < 0,0001$) e S (85,08 %; $p < 0,0064$).

No tratamento sob 100mM de NaCl a inoculação também estimulou um incremento significativo no conteúdo de P (76,10; $p < 0,0001$), Na (32,73%; $p < 0,0001$), K (53,72%; $p < 0,0001$), Ca (39,26%; $p < 0,0001$), Mg (13,30; $p < 0,0001$) e S (118,26%; $p < 0,0064$), respectivamente, com exceção no conteúdo de N. Já nas raízes das plantas expostas à 200mM de NaCl, houve um aumento significativo no conteúdo de N (19,74%; $p < 0,0221$) e C (105,38%; $p < 0,0001$). Porém, houve uma redução significativa na absorção de Mg (26,63%; $p < 0,0001$).

O Fungo *S.indica* proporcionou um maior acúmulo no conteúdo de P (28,00%; $p < 0,0001$), K (23,50 %; $p < 0,0001$) e Ca (50,22%; $p < 0,0001$) nas raízes das plantas controle inoculadas comparada ao conteúdo das plantas sob 100 e 200mM de NaCl. Ao adicionar o sal nos tratamentos inoculados, houve um aumento significativo no conteúdo de K (21,17%; $p < 0,0001$ e 17,27%; $p < 0,0001$) e Ca (33,43%; $p < 0,0001$ e 22,65%; $p < 0,0001$) no tratamento de maior concentração de NaCl (200mM), exceto o P (Tabela 3).

A colonização aumentou a absorção do conteúdo de Mg nas plantas controle colonizadas. Porém, essa absorção sofreu uma redução significativa de 16,50% ($p < 0,0001$) no tratamento colonizado sob a concentração de 200mM de NaCl (Tabela 3). Já o tratamento controle inoculado apresentou um acréscimo significativo de 78,00% e 70,82% ($p < 0,0001$) no conteúdo de Mg, quando comparado com os tratamentos inoculados expostos a 100 e 200mM de NaCl.

De acordo com a Tabela.3, houve um acúmulo significativo de 105,35% ($p < 0,0001$) no conteúdo de C do tratamento inoculado sob 200mM de NaCl comparado ao tratamento não inoculado exposto a 200mM de NaCl (Tabela 3).

Em relação aos micronutrientes mencionados na Tabela.3, notou-se que as plantas controle colonizadas tiveram um aumento significativo no conteúdo de Ni (78,80%; $p < 0,0001$), Cu (86,10%; $p < 0,0001$), Fe (183,37%; $p < 0,0001$), Mn (235,15%; $p < 0,0001$), Al (101,11%; $p < 0,0001$), Pb (46,05%; $p < 0,0001$), exceto o Zn e Al, quando comparado as plantas controle não inoculadas. As plantas colonizadas sob 100mM de NaCl, todos os micronutrientes apresentaram um acúmulo significativo Ni (277,10%; $p < 0,0001$), Cu (222,75% ; $p < 0,0001$), Zn (206,00; $p < 0,0001$), Fe (206,00%; $p < 0,0001$), Al (28,88%; $p < 0,0001$), Pb (201,29%; $p < 0,0001$) e Cr (87,00% ; $p < 0,0001$),

exceto o Mn que teve um decréscimo, respectivamente.

Nas plantas inoculadas e submetidas a concentração de 100 e 200mM de NaCl apresentaram uma redução significativa de 14,84 % ($p < 0,0001$) e 60,10 ($p < 0,0001$) no conteúdo Ni, em relação as plantas controle inoculadas (Tabela 3). Porém, no geral o fungo não favoreceu a absorção do Ni.

De acordo com a Tabela.3, o fungo *S. indica* aumentou a absorção do conteúdo de Cu, Fe e Mn nas plantas controle colonizadas. Porém, o conteúdo desses nutrientes sofreram um redução significativa de 16,13% ($p < 0,0001$), 27,40% ($p < 0,0001$) e 40,54% ($p < 0,0001$) no tratamento colonizado sob a concetração de 200mMde NaCl.

Observou-se que houve um decréscimo significativo de 31,80% nas plantas colonizadas e submetidas a concentração de 200M de Nacl em relação as plantas controle colonizadas. Já plantas colonizadas e submetidas a concentração de 100mM, não apresentaram diferença significativa plantas controle colonizadas. Porém, elas apresentam uma redução significante de 27,65% ($p < 0,0001$) quando comparada as plantas colonizadas e submetidas a maior concetração de sal (200mM) (Tabela.3).

Se tratando do metais, a simbiose com o fungo favoreceu absorção de Al nas plantas controle colonizadas, respectivamente. Porém, nas plantas colonizadas e expostas a 100mM de NaCl essa absorção diminuiu significativamente 46,24% ($p < 0,0001$) comparada as plantas controle inoculadas. No entanto, quando as plantas inoculadas foram sumetidas a 200mM de NaCl a absorção do conteúdo de Al aumentou 54,13% ($p < 0,0001$). Comparando as plantas inoculadas sob 200mM de Nacl com as plantas controle inoculadas, observou-se uma redução significativa de 17,13 % 46,24% ($p < 0,0001$).

As plantas inoculadas com *S.indica* e expostas a contração de 200mM, apresentaram um aumento significativo de 420,72 % ($p < 0,0001$) e 23,76 ($p < 0,0001$) no conteúdo de Pb e em relação as plantas controle inoculadas e plantas inoculadas sob a concetração de 100mM de NaCl.

Se tratando do metal Cr o fungo favoreceu a absorção do conteúdo nas plantas inoculadas dos respectivos tratamentos. Porém, observou-se que ao adicionar o Nacl nas plantas colonizadas, a absorção desse nutriente diminui. Nas plantas colonizadas e submetidas a 200mM de NaCl houve uma redução significativa de 66,47 % ($p < 0,0001$), e as plantas inoculadas sob a concetração de 100mM apresentaram uma redução de 32,12 % ($p < 0,0001$).

Tabela 3. Conteúdo de macronutrientes [Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S) e Carbono(C)] e o conteúdo de micronutrientes [Nitrogênio (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Chumbo (Pb) e Cromo (Cr)] nas raízes de plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas, inoculadas com com *S. indica* nas diferentes concentrações de NaCl, após 110 dias de inoculação.

Nutrientes	Tratamentos						
	0 mM	0 mM + Si	100 mM	100 mM + Si	200 mM	200 mM + Si	
<i>g kg⁻¹</i>							
Macronutrientes	N	2,30 Bb	3,20 Ac	2,93Ba	3,95Ab	2,28 Bb	4,50 Aa
	P	423,84 Bb	713,92 Aa	375,77Bc	562,77Ac	563,75 Aa	590,84Ab
	K	2214,07 Ba	4617,49Aa	1336,19 Bb	1937,9 Ac	2176,69 Ba	2665,53 Ab
	Na	651,10Bc	2458,66Ac	3603,58Bb	6621,63Ab	7729,10Aa	8584,57Aa
	Ca	2084,2 Bc	5678,07Aa	2782,17 Bb	3779,72 Ac	4275,93 Aa	4391,62 Ab
	Mg	1695,71 Bc	4592,48 Aa	1718,02 Ab	2579,81 Ab	3664,24 Aa	2688,61 Bb
	S	1122,91 Bb	2078,32 Aa	831,77 Bc	1815,48 Ab	1881,34 Aa	1671,53 Ac
	C	348,49 Ba	375,71Aab	336,79 Ba	344,25 Ab	203,88 Bb	418,678 Aa
<i>mg kg⁻¹</i>							
Micronutrientes	Ni	89,87 Bb	160,69 Aa	36,25 Bc	136,83Ab	157,84 Aa	64,16 Bc
	Cu	13,09 Ba	24,36 Aa	6,33 Bb	20,43 Ab	14,93 Aa	18,14 Ab
	Zn	109,23 Aa	83,94 Ba	38,20 Bc	79,06 Aa	91,27 Ab	57,25 Bb
	Fe	3735,6 Bc	10585,3 Aa	4363,25 Bb	7685,80 Ab	7095,34 Aa	8448,54 Ab
	Mn	144,19 Bc	483,28 Aa	315,31 Ab	287,37 Ab	580,65 Aa	296,947 Bb
	Al	16499,9 Bb	33183,5 Aa	13842,3 Ab	17840,2 Ac	25184,10Aa	27497,7 Ab
	Pb	0,76 Bc	1,11 Ac	1,55 Bb	4,67 Ab	4,43 Ba	5,78 Aa
	Cr	53,33 Bb	107,33 Aa	38,87 Bb	72,86 Ab	201,50 Aa	35,99 Bc

Os dados foram analisados através de two-way ANOVA combinados com teste de Tukey. As letras maiúsculas e minúsculas distintas destacam que há diferenças significativas pelo teste de Tukey em $p < 0,05$ ($n=8$), em relação ao estresse salino e a condição de inoculação, respectivamente

6. DISCUSSÃO

A simbiose com fungo *S. indica* trouxe melhorias na taxa de colonização das raízes das plantas de cana-de-açúcar sem e com o estresse provocado pela adição do sal. Esse fato pode estar relacionado diretamente com a capacidade que o fungo tem em superar as condições salinas e os mecanismos de subversão das defesas da planta, como a pressão seletiva exercida pelos exsudados radiculares para estabelecer interações estáveis, que ocorrem após as primeiras 24 h e, posteriormente, de forma progressiva. Além disso, ele também pode causar modificações no metabolismo da planta e prevenir os danos oxidativos resultantes do estresse salino, mantendo alta atividade das enzimas antioxidantes de forma a

eliminar espécies reativas de oxigênio (EROs) Johnson *et al.* (2014).

Embora, seja comprovado que o estresse salino é um fator limitante no desenvolvimento das plantas afetando principalmente o crescimento vegetal (Kahlaoui *et al.* 2018), e que o fungo *S. indica* seja considerado um promotor do crescimento vegetal, neste presente estudo, os resultados apresentados não corroboraram, pois a submissão das plantas ao estresse salino não comprometeu a altura e nem diâmetro do caule das plantas sob condições salina. Esse fato pode estar relacionado ao baixo tempo de exposição das plantas (20 dias) nas diferentes concentrações de NaCl, sendo assim, insuficiente para compromete-los. Porém, a simbiose com o fungo provocou um efeito atenuante no estresse, além de beneficiar alguns parâmetros de crescimento avaliados.

O *S. indica*, dentre os seus diversos benefícios, tem capacidade de modular o crescimento radicular (Basu *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020). O aumento no volume de raiz nas plantas de cana-de-açúcar pode ser atribuído pela melhoria na nutrição da planta ou por alterações fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas induzidas pelos microorganismos promotores de crescimento. Esse fungo pode secretar, e até mesmo estimular a produção de fitormônios nas plantas, destacando-se as auxinas, que estão diretamente relacionadas ao crescimento da raízes laterais. Su *et al.* (2017), observaram que a inoculação com *S. indica* está diretamente associada ao desenvolvimento de plantas de colza (*Brassica napus* L.), aumentando o comprimento e o volume de raízes laterais, além de ter ativado a biossíntese de auxina, uma vez que o crescimento radicular é controlado por esse hormônio.

Um outro fator a ser considerado quanto a esse aumento radicular, é a concentração do inóculo adicionado nas plantas. Pois, para que a simbiose seja bem sucedida entre *S. indica* e seu hospedeiro, a planta deve receber uma quantidade certa de inóculo (Abin *et. Al.*, 2021). Estudos apresentados por Rokni *et al.*, (2021) mostram que a otimização da concentração do inóculo de *S. indica* teve impacto no desenvolvimento de pimentão (*Capsicum annuum*). O crescimento radicular planta foi melhorado por uma concentração de 1-3% *p / p*.

A redução do massa fresca e seca na parte aérea e raiz das plantas colonizadas, pode estar diretamente relacionado ao estresse ocasionado pela adição de NaCl no solo das plantas. O excesso de sais na solução do solo pode causar estresse osmótico nas plantas, pela redução do potencial hídrico do solo e toxicidade

iônica específica, em função do acúmulo excessivo de íons salinos (Na e Cl) no tecido vegetal. Para Sharma *et al.* (2016), dependendo grau de salinidade, em vez de absorver, a planta perde a água que se encontra em suas células e tecidos.

O endofítico beneficiou a massa fresca e seca das plantas atenuando o efeito salino, devido a capacidade do fungo possuir mecanismos de adaptação ao estresse osmótico, possivelmente relacionados ao acúmulo intracelular de solutos orgânicos, denominados osmólitos, os quais são responsáveis por aumentar a pressão osmótica citoplasmática, evitando a perda de água para o meio e também com ação na estabilização de proteínas e membranas.

Já o aumento da massa fresca e seca da raiz nas plantas colonizadas com o fungo *S. indica* pode ser atribuído a produção de raízes laterais ocasionado pela inoculação fungica, uma vez que, um maior volume radicular pode proporcionar uma maior absorção de água e nutrientes, compartimentalização dos íons tóxicos e produção de osmólitos que atenuam os efeitos da salinidade (Borcioni *et al.*, 2016; Singhal *et al.*, 2017).

As plantas têm aperfeiçoado seus mecanismos para tolerar altas concentrações de salinidade, seja em alterações no acúmulo e transporte de íons Na⁺ ou na produção de proteínas de proteção e osmólitos. Além disso, Abdelaziz *et al.* (2017) afirma que *S. indica* tem capacidade de modificar a expressão destes metabólitos, proporcionando o aumento da atividade de proteínas antioxidantes e pigmentos fotossintéticos em plantas como cevada, milho e arroz (Singhal *et al.*, 2017).

No geral, a simbiose beneficiou a absorção dos macronutrientes e micronutrientes das plantas submetidas ao estresse salino, isso pode ser atribuído pela capacidade que esse microorganismo possui em absorver e acumular os nutrientes em seus tecidos, e posteriormente liberá-los para a planta. De acordo com Begum *et al.* (2019), neste processo os nutrientes mais absorvidos pelo fungo endofítico são especialmente o N, P, K e Ca.

Em relação aos aspectos nutricionais, as plantas colonizadas sob a presença do sal foram beneficiadas pela interação microorganismo-planta, e isso atribui a alta capacidade que o fungo tem de absorver e acumular os nutrientes em seus tecidos, e posteriormente liberá-los para a planta. De acordo com Begum *et al.* (2019) neste processo, os nutrientes mais absorvidos pelo fungo endofítico são especialmente o N, P, K e Ca.

O fungo *S. indica* possui uma série de mecanismos os quais ajudam a planta a absorver um maior conteúdo de N em solos salinos. Dentre eles, podemos citar a produção de enzimas, como as nitrogenase, que convertem o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas, como o nitrato e o amônio. Em condições salinas essas enzimas são produzidas em grandes quantidades, o que ajuda a aumentar a disponibilidade de N para a planta. Sherameti *et al.* (2015) relatam que o co-cultivo de tabaco e *Arabidopsis* com *S. indica* é acompanhada de uma enorme transferência de N para a parte aérea das plantas.

O P é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Taiz e Zeiger, 2018), ele é transportado na solução do solo preferencialmente por difusão numa taxa muito lenta para atender às necessidades das plantas (Jorhi *et al.*, 2015). O aumento do conteúdo de P na parte aérea e raiz das plantas colonizadas sob a presença do sal também foi beneficiado pela interação com o fungo, pois as hifas desse microorganismo aumenta o volume de solo explorado pelas raízes, tornando disponíveis fosfatos que estejam em locais inacessíveis às raízes, aliviando assim as consequências negativas do estresse salino (Jansa *et al.*, 2019). Shahollari *et al.*, (2015) relatam um aumento da absorção de P por *S. indica* em *Arabidopsis*.

A translocação do P do xilema para a célula das partes aéreas da planta é realizada por meio de processos ativos de transporte de membrana envolvendo proteínas transportadoras específica (Zou *et al.*, 2019). De acordo com Kaiser *et al.*, (2015) o fungo *S. indica* ajuda na síntese dessas proteínas, que conseqüentemente aumenta a velocidade de transporte de P das raízes para as partes aéreas da planta, fazendo com que esse conteúdo aloque mais na parte aérea das plantas. Nesse contexto, esse fato corrobora com os resultados obtidos nesse trabalho, pois a absorção de P foi maior na parte aérea do que na parte da raiz das plantas colonizadas sob o estresse salino.

O aumento do conteúdo de K na parte aérea e da raiz das plantas pode estar relacionada aos mecanismos que a planta possui para ajudar a manter a homeostase iônica nas células das plantas, equilibrando os íons de Na para tentar proteger as plantas contra os danos causados pelo excesso de sal (Yun *et al.*, 2018). A interação do *S. indica* também pode contribuir na absorção desse nutriente, através de suas hifas. Abdelaziz *et al.* (2017), mostraram que a inoculação de *S. indica* em *Arabidopsis thaliana* aumentou o teor de K sob estresse salino.

Além disso, o K é um elemento essencial nos processos metabólicos

celulares, incluindo síntese de proteínas, regulação osmótica, atividade de várias enzimas e fotossíntese (Wang e Wu, 2015). Assim, *S. indica* pode melhorar a tolerância de plantas de cana-de-açúcar submetidas a salinidade, aumentando o acúmulo de K e a manutenção da homeostasia de K / Na. Uma vez que, a exposição ao NaCl, as plantas necessitam modular a homeostase de Na /K por meio da manutenção de uma alta relação K /Na , visto que o excesso de sódio tende a levar à deficiência de K (Van et al., 2020).

Corroborando com a literatura, acúmulo de Na nas plantas expostas ao sal com e sem o fungo aumentaram. Em excesso, esse íon pode causar um desequilíbrio na osmose da célula vegetal, afetando a sua capacidade de absorver água e nutrientes essenciais, causando assim o estresse hídrico (Evellin *et al.*, 2013). Além disso, pode causar danos oxidativos, como a produção de espécies reativas de oxigênio que podem prejudicar alguns processos metabólicos essenciais. Porém, mesmo as plantas absorvendo alta concentração de sódio, via fungo, esse aumento de Na não foi suficiente para comprometer o seu crescimento e desenvolvimento. Isso pode estar relacionado ao fato de que o Na pode ser mantido dentro dos vacúolos das células das raízes, em vesículas ou hifas fúngicas intrarradiculares para impedir a alocação de Na (Ruiz-Lozano *et al.*, 2012).

O conteúdo de Ca foi elevado na parte aérea e raiz de todas as plantas colonizadas e expostas ao NaCl. Esse íon é um importante sinalizador celular. Quando as raízes das plantas percebem a presença do endófito elas iniciam uma cascata de sinalização que envolve a entrada de íons Ca nas células das raízes. Então, esse aumento na concentração de cálcio desencadeia eventos bioquímicos que levam à formação da simbiose entre o fungo e a planta. Além disso, o cálcio está envolvido em alguns processos biológicos, como a regulação do crescimento e desenvolvimento da planta. É a regulação do fluxo de nutrientes nas plantas. Porém, uma alta concentração de sal pode provocar uma redução na atividade do Ca e do K, pois o Na utiliza os mesmos transportadores desses nutrientes, gerando uma competição, uma vez que, essa competição inibe a translocação e a distribuição do qual se na planta. Comprometendo o seu desenvolvimento como um todo.

Estudos demonstraram que, a inoculação com *S. indica* em semente de trigo (Singh *et al.*, 2016), no feijão (Yadav *et al.*, 2022) e nas folhas de pepino (Khan *et al.*, 2018) aumentou o conteúdo de Ca nas raízes e nas folhas em comparação com as plantas não inoculadas sob estresse salino. Khan *et al.* (2018), observaram um

aumento significativo no teor de Ca nas folhas de plantas de pepino inoculadas com *S. indica* sob estresse salino. Além disso, a inoculação também melhorou o crescimento das plantas, a atividade das enzimas antioxidantes e a absorção de nutrientes.

O Mg é um elemento essencial para o crescimento das plantas, desempenhando um papel importante como molécula central de clorofila e como co-fator em quase todas as enzimas do metabolismo energético (Taiz & Zeiger, 2018). No geral, o fungo *S. indica* promoveu o aumento do conteúdo de Mg e S em todas as plantas. Este comportamento pode estar relacionado à capacidade que o fungo possui em captar nutrientes, dentre eles o Mg, através de suas hifas extrarradiculares, já que o diâmetro delas permite o acesso aos microporos do solo, favorecendo a absorção. No entanto, a competição (Na e Mg) pelos sítios de absorção nas raízes decorrente da salinidade pode ter contribuído com a redução do conteúdo de Mg na parte aérea e raiz das plantas com 200 mM (Taiz & Zeiger, 2018).

O aumento do conteúdo de C nas raízes das plantas ocorreu devido à colonização do *S. indica*, uma vez que, o fungo pode aumentar a taxa de fotossíntese e, assim, aumentar a quantidade de carbono produzido pelas plantas (Nongkhlaw, 2018).

O incremento do conteúdo de S na parte aérea e raiz das plantas pode ser atribuído à simbiose do microorganismo, visto que, estudos apontam que o *S. indica* aumenta a absorção de S pelas plantas. Além disso, o fungo pode produzir enzimas que ajudam a solubilizar compostos de enxofre presentes no solo, tornando-os mais disponíveis para as plantas (Sharma *et al.*, 2017).

No geral, a simbiose do fungo *S. indica* beneficiou a absorção de todos os micronutrientes da parte aérea e radicular das plantas. Esse fato pode ser atribuído aos diversos benefícios que esse microorganismo fornece para ao seu hospedeiro, visto que, além de promover o crescimento vegetal, ele é capaz de aumentar a capacidade antioxidante das plantas, o que pode ajudar a proteger as células vegetais contra o estresse oxidativo causado pela deficiência de micronutrientes e também pelos danos causados pelo estresse salino.

Além disso, as hifas desse fungo podem se estender para além da zona de raiz da planta, permitindo que ela tenha acesso a nutrientes que estão localizados em áreas mais distantes (Hardoim *et al.*, 2017). Esses filamentos também secretam uma variedade de ácidos orgânicos, incluindo o ácido cítrico, málico e oxálico, que vão

solubilizar nutrientes presentes no solo, tornando-os mais disponíveis para as plantas (Qiang, 2012)

O fungo *S. indica* também pode aumentar a absorção de vários micronutrientes pelas plantas, como Zn, Fe, Cu e Mn. De acordo com Vafaeiyan *et al.*, 2019, o fungo *S. indica* aumentou de forma significativa a absorção de zinco pelas plantas de trigo em condições de deficiência desse nutriente. Sunitha *et al.*, (2019), demonstraram que o *S. indica* aumentou a absorção de ferro pelas plantas de arroz, melhorando a sua capacidade de tolerar condições de baixa disponibilidade de ferro.

Um outro fator que comprova o envolvimento desse microorganismo no aumento de absorção de nutrientes para as plantas, é que ele também secreta enzimas, como as fosfatases, celulasas e quitinases, que ajudam na solubilização de nutrientes como P, K, Ca, Mg, Fe, Mn e Zn. Além do mais, ele tem capacidade de secretar diversas proteínas que podem ajudar a melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas, incluindo proteínas transportadoras de nutrientes e proteínas envolvidas no controle de crescimento e desenvolvimento das plantas.

A diminuição do acúmulo dos micronutrientes essenciais (Ni, Cu, Zn, Fe e Mn) na parte aérea e raiz das plantas colonizadas foi provocada pela exposição do sal (NaCl). Uma explicação para esse comportamento, é que o excesso de sais no solo pode aumentar a competição iônica pelos mesmos canais de transportes utilizados pelos micronutrientes, reduzindo assim, a absorção dos e mesmos pelas plantas (Farias *et al.*, 2009).

8. CONCLUSÃO

- O estresse salino não comprometeu o desenvolvimento das plantas, visto que a simbiose com o microrganismo teve efeito atenuante no estresse;
- A colonização do *S. indica* proporcionou uma interação positiva, de forma que as plantas não apresentaram reduções significativas nos parâmetro de crescimento que compromettesse seu desenvolvimento;
- A simbiose do fungo aumentou o volume radicular, proporcionando uma melhor absorção dos nutrientes do solo;
- O aumento radicular em plantas inoculadas, promoveu um maior conteúdo de de macro e micronutrientes nas parte aérea das plantas;
- O *S. indica* não conseguiu fornecer a tolerância ao estresse salino, porém ele as beneficiou de forma com que as plantas não sofressem danos proporcionado pela adição sal.

9. REFERÊNCIAS

Abdelaziz, Mohamed E. et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* enhances *Arabidopsis thaliana* growth and modulates Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress conditions. **Plant Science**, v. 263, p. 107-115, 2017..

Abin, Nastaran et al. Quantification of endophyte *Serendipita indica* in *Brassica napus* roots by qPCR. **Crop and Pasture Science**, v. 72, n. 12, p. 985-993, 2021.

Azizi, Maryam; FARD, Ehsan Mohseni; GHABOOLI, Mehdi. *Piriformospora indica* affect drought tolerance by regulation of genes expression and some morphophysiological parameters in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 287, p. 110260, 2021..

Baltruschat, Helmut et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. **New Phytologist**, v. 180, n. 2, p. 501-510, 2008.

Barra, Patricio Javier et al. Phosphobacteria inoculation enhances the benefit of P-fertilization on *Lolium perenne* in soils contrasting in P-availability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 136, p. 107516, 2019.

Barros, T., Corrêa, F., Figueiredo, F., Santos, M., Rodriguez, M., & Ribeiro, D. (2019). Proline improves salt tolerance in sugarcane seedlings by preventing sodium and chloride accumulation and improving photosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 137, 178-187.

Begum, Naheeda et al. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1068, 2019.

Beltayef, Hayet et al. Potential *Piriformospora indica* effect on growth and mineral nutrition of *Phaseolus vulgaris* crop under low phosphorus intake. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 498-507, 2021.

Bertolazi, Amanda Azevedo et al. Inoculation with *Piriformospora indica* is more efficient in wild-type rice than in transgenic rice over-expressing the vacuolar H⁺-PPase. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1087, 2019.

Borcioni, Elis; MÓGOR, Átila Francisco; PINTO, Fernanda. Influence of the application of fulvic acid on seedling root growth and yield in lettuce. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, p. 509-515, 2016.

Bowler, Chris; MONTAGU, M. van; INZE, Dirk. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual review of plant biology**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB - Acompanhamento da safra brasileira, V.4 - SAFRA 2019/20 N.2 - Segundo levantamento.

Costa, Ana Raquel Teixeira da. **Microbes made visible through plants: the functionality of *Piriformospora indica* in the rhizosphere**. 2014. Tese de Doutorado.

Damerval, Catherine et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

Das, Aparajita et al. 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**, v. 7, n. 1, p. 103-112, 2012.

Dias, N. S. et al. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade (Salinity effects on plants and tolerance of crops to salinity). **Book Chapter**, p. 151-162, 2016.

Dias, Teresa et al. The free-living stage growth conditions of the endophytic fungus *Serendipita indica* may regulate its potential as plant growth promoting microbe. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 562238, 2020.

Elhindi, Khalid M.; EL-DIN, Ahmed Sharaf; ELGORBAN, Abdallah M. The impact of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating salt-induced adverse effects in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 1, p. 170-179, 2017.

Farias, Séfora Gil Gomes de et al. Estresse salino no crescimento inicial e nutrição mineral de gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud) em solução nutritiva (1). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1499-1505, 2009.

Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. **New Phytologist**, 179(4), 945-963.

Furtado, G. L., Teixeira, F. F., & Duarte, M. L. R. (2014). Antioxidant enzyme activities in sugarcane leaves under salinity and oxidative stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, 36(4), 1033-1040. doi: 10.1007/s11738-013-1463-3

Ghosh R, Barman S, Mukherjee S, Mondal TK. *Piriformospora indica* induced growth promotion of tea (*Camellia sinensis*) plants partially derives from enhanced sulfate uptake. *Tree Physiol.* 2016;36(2):131-144. doi:10.1093/treephys/tpv120

Gil, Sarvajeet S. et al. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 332, 2016.

Gill, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2017.

Gomathi, R. et al. Comparative lipid peroxidation, leaf membrane thermostability, and antioxidant system in four sugarcane genotypes differing in salt tolerance. **Int. J. Plant Physiol. Biochem**, v. 3, n. 4, p. 67-74, 2011.

Hardoim, Pablo R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

Hardoim, Pablo R.; VAN OVERBEEK, Leo S.; VAN ELSAS, Jan Dirk. Properties of

bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

Hendre, R. R. et al. **Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture**. 1983.

Hosseini, F.; Mosaddeghi, SENHOR; Dexter, AR; Sepehri M. Seperfeito de endofítico fungo Piriformospora indica e induzido por PEG água estresse sobre máximo raiz crescimento pressão e alongamento avaliar de milho. **Plantar Solo**, 435, 423-436, **2019**.

Ismail, Ahmed; TAKEDA, Shin; NICK, Peter. Life and death under salt stress: same players, different timing?. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 12, p. 2963-2979, 2014.

Jansa, Jan et al. Arbuscular mycorrhiza and soil organic nitrogen: network of players and interactions. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.

Jia, W.; Wang, Y.; Zhang, S.; Zhang, J. Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J. Exp. Bot.* **2002**, 53, 2201-2206.

Jogawat, Abhimanyu et al. Piriformospora indica rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 10, p. e26891, 2013.

Johri, Atul K. et al. Fungal association and utilization of phosphate by plants: success, limitations, and future prospects. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 984, 2015.

Junqueira, E. D. A cana-de-açúcar, origem e influência. *Jornal procana*, 17 de julho, P1, 2006.

Kaiser, Christina et al. Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation. **New Phytologist**, v. 205, n. 4, p. 1537-1551, 2015.

KALAJI, Hazem M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, p. 1-11, 2016.

Khan, M. I., Asghar, H. N., Jamil, M., & Hussain, M. A. The impact of Piriformospora indica on growth, physiology, and ion homeostasis of cucumber plants under saline stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 130, 634-644, 2018.

Kumar, V., Shriram, V., & Kavi Kishor, P. B.) Gene expression analysis of rice seedling under salt stress using microarray. **Indian Journal of Plant Physiology**, 22(1), 93-100, 2017.

Lima, G. A. *Cultura da cana-de-açúcar*. 1ª edição. Fortaleza, p. 15-35, 1984 .

Mittler, Ron. ROS are good. **Trends in plant science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

Munir, S., Khan, M., Hussain, S., & Malik, S. The exogenous application of salicylic

acid enhances salinity tolerance in maize (*Zea mays* L.) plants by up-regulating antioxidant defense system and osmolyte metabolism. *V. 26*,p. 19261-1927, 2019.

Nongkhlaw FM, Joshi SR. *Piriformospora indica* enhances photosynthesis and growth of economically important tea and coffee plants. ***Physiol Plant.***;162(1):135-147, 2018.

Oliveira, T., Souza, V., Silva Júnior, J., Melo, D., & Silva, E. Proline accumulation and its implications in the expression of genes related to salt stress in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves. ***Acta Physiologiae Plantarum***, 38(3), 69, 2016.

Oukarroum, A., Schansker, G., Strasser, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 137, 188-199, 2009.

Pal, Sumita et al. Fungal biofertilizers in Indian agriculture: perception, demand and promotion. ***Journal of Eco-friendly Agriculture***, v. 10, n. 2, p. 101-113, 2015.

Parmesan, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. , *Basingstoke*, v. 421, p. 37- 42, Jan. 2003.

Parque, HJ; Kim, W.-Y.; Yun, AD-J. Uma nova visão da sinalização de estresse salino na planta. *Mol. Cells* , 39 , 447-459. ***Nature: internacional journal of science***,2016. Phillips, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment ofinfection. ***Transactions of the British mycological Society***, v. 55, n. 1, p. 158-IN18,1970.

Prasad, Ram et al. Root endophyte *Piriformospora indica* DSM 11827 alters plant morphology, enhances biomass and antioxidant activity of medicinal plant *Bacopa monniera*. ***Journal of basic microbiology***, v. 53, n. 12, p. 1016-1024, 2013.

Qiang, X. et al. *Piriformospora indica*—a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. ***Molecular plant pathology***, v. 13, n. 5, p. 508-518, 2012.

QIANG, Xiaoyu et al. *Piriformospora indica*—a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. ***Molecular plant pathology***, v. 13, n. 5, p. 508-518, 2012.

Rizwan, Muhammad et al. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of drought and salt stress in plants: a review. ***Environmental Science and Pollution Research***, v. 22, n. 20, p. 15416- 15431, 2015.

Rocha, F., Fernandes, K., & Barbosa, M. Exogenous proline reduces the oxidative stress and improves growth and photosynthesis of sugarcane plants subjected to salt stress. ***Scientia Horticulturae***, 179, 242-248, 2014.

RUIZ-LOZANO, Juan Manuel et al. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. ***Journal of Experimental Botany***, v. 63, n. 11, p. 4033-4044, 2012.

Saath, Kleverton Clovis de Oliveira; FACHINELLO, Arlei Luiz. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil1. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, p. 195-212, 2018.

Sabra, M.; ABOULNASR, A.; FRANKEN, P.; PERRECA, E.; WRIGHT, L. P.; CAMEHL, I. Beneficial root endophytic fungi increase growth and quality parameters of sweet basil in heavy metal contaminated soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1726, 2018.

Saddique, Muhammad Abu Bakar et al. Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. **Rice**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.

Sharma M, Mishra V, Sharma S, Srivastava S, Shukla AK, Sharma YK. *Piriformospora indica* enhances growth, antioxidant enzyme activity and mitochondrial biogenesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) under salt stress. **Protoplasma**. 2017.

Singh, Rajnish Prakash; JHA, Prabhat Nath. The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). **PLoS one**, v. 11, n. 6, p. e0155026, 2016.

Singhal, Uma; PRASAD, Ram; VARMA, Ajit. *Piriformospora indica* (*Serendipita indica*): The novel symbiont. **Mycorrhiza-function, diversity, state of the art**, p. 349-364, 2017. SHABALA, Sergey. Signalling by potassium: another second messenger to add to the list?. **Journal of experimental botany**, v. 68, n. 15, p. 4003-4007, 2017.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U and Mohanty P (eds) *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, pp 445-483, 2000.

Sunitha, V., & Smitha, G. R. Role of *Piriformospora indica* on uptake of manganese and zinc in rice (*Oryza sativa* L.) plants under field conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, 26(35), 35404-35414, 2019.

Trombeta, Natalia C. et al. Energy potential of sugarcane biomass: an application of optimal location modeling. **Sugar Industry/Zuckerindustrie**, v. 142, n. 7, p. 407-415, 2017.

Vafaeiyan, M., Etesami, H., & Alikhani, H. A. The effect of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* on the uptake of zinc and phosphorus in wheat plants. **Journal of Plant Nutrition**, 42(13), 1525-1532, 2019.

Van zelm, Eva; ZHANG, Yanxia; TESTERINK, Christa. Salt tolerance mechanisms of plants. **Annual review of plant biology**, v. 71, p. 403-433, 2020.

Varma, Ajit et al. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2741-2744, 1999.

Varma, Ajit et al. *Piriformospora indica*: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. **Agricultural Research**, v. 1, p. 117-131, 2002.

Verma, Savita et al. Piriformospora indica, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. **Mycologia**, v. 90, n. 5, p. 896-903, 1998. MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008.

WALLER, Frank et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13386-13391, 2005.

Waller, Frank et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13386-13391, 2005.

YADAV, Vikas et al. Withdrawal: A phosphate transporter from the root endophytic fungus Piriformospora indica plays a role in phosphate transport to the host plant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2021.

Yang Y, Qin Y, Xie C, Zhao F, Zhao J, Liu D, Chen S, Fuglsang AT, Palmgren MG, Schumaker KS, Deng XW, Guo Y The Arabidopsis chaperone J3 regulates the plasma membrane H⁺ - ATPase through interaction with the PKS5 kinase. **Plant Cell** 22: 1313-1332, 2010.

Zhang, J., Li, Y., Li, J., Li, J., Chang, S., Li, L., & Yang, X. Over expression of SINHX3, a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, improves growth and mitigates salt stress in tomato plants. **Plant Cell Reports**, 38(1), 101-112 , 2019.

Zhang, J., Wang, L., Yang, X., Meng, F., Liu, C., & Ma, S. Salt glands play an important role in protecting Suaeda salsa and Suaeda corniculata against moderate and high salinity. **Plant. Physiology and Biochemistry**, 132, 38-47, 2018.

Zhang, Ming et al. A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize. **New Phytologist**, v. 217, n. 3, p. 1161-1176, 2018.

Zhang, Xiaojing et al. Genome-wide identification of gene expression in contrasting maize inbred lines under field drought conditions reveals the significance of transcription factors in drought tolerance. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0179477, 2017.

Zhou, L., Zeng, Y., Hu, Y., Yu, R., Cheng, X., Yao, Z., & Liu, G. ScNHX1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene from sugarcane, confers salt tolerance in transgenic Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, 10, 391, 2019.

ZHU, Jian-Kang. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313-324, 2016.

Zou, Y., Zhang, D., Liu, C., Wu, Q.,. Relationships between mycorrhizae and root hairs. **Pakistan Journal of Botany** 51 (2), 727-733, 2019.

Zhao, Shuangshuang et al. Regulation of plant responses to salt stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4609, 2021.