

DOUGLAS MOREIRA DE OLIVEIRA

INOCULAÇÃO COM RIZOBACTÉRIA PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE  
PLANTAS EM *Myracrodruon urundeuva* (ALLEMÃO) CONFERE MAIOR TOLERÂNCIA  
AO ESTRESSE HÍDRICO

Serra Talhada-PE

2017

**O  
L  
I  
V  
E  
I  
R  
A**

**D  
M**

**I  
N  
O  
C  
U  
L  
A  
Ç  
Ã  
O**

**C  
O  
M**

**R  
I  
Z  
O  
B  
A  
C  
T**

**·  
·  
2  
0  
1  
7**

DOUGLAS MOREIRA DE OLIVEIRA

INOCULAÇÃO COM RIZOBACTÉRIA PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE  
PLANTAS EM *Myracrodruon urundeuva* (ALLEMÃO) CONFERE MAIOR TOLERÂNCIA  
AO ESTRESSE HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. DSc. Adriano do Nascimento Simões

Co-orientador: Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

Serra Talhada-PE

2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

- O48i Oliveira, Douglas Moreira de  
Inoculação com rizobactéria promotora do crescimento de plantas em Myracrodruon Urundeuva (Allemão) confere maior tolerância ao estresse hídrico / Douglas Moreira de Oliveira.  
89 f. : il.
- Orientador: Adriano do Nascimento Simões.  
Coorientador: André Luiz Alves de Lima e Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Serra Talhada, PE, 2017.  
Inclui referências, anexos e apêndices.
1. Plantas nativas 2. Aroeira do Sertão 3. Estresse hídrico I. Simões, Adriano do Nascimento, orient. II. Lima, André Luiz Alves de, coorient. III. Santos, Carolina Etienne de Rosália e Silva, coorient. IV. Título.

CDD

DOUGLAS MOREIRA DE OLIVEIRA

INOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIA PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS  
EM *Myracrodruon urundeuva* (ALLEMÃO) CONFERE MAIOR TOLERÂNCIA AO  
ESTRESSE HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADO em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

Banca Examinadora

---

Prof. DSc. Adriano do Nascimento Simões – UAST/UFRPE  
Orientador

---

Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira Da Silva – UAST/UFRPE  
Examinador Interno

---

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva – UAST/UFRPE  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima – UAST/UFRPE  
Suplente Interno

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Cynthia Maria Carneiro Costa – UAST/UFRPE  
Suplente Externa

Aos meus pais, Maria de Cássia Moreira Silva e José Carlos Martins de Oliveira, que estiveram sempre ao meu lado incondicionalmente em todas as minhas decisões, e pelos verdadeiros valores transmitidos.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre ter me dado forças para evoluir independentemente dos obstáculos.

Aos meus pais, Maria de Cássia Moreira Silva e José Carlos Martins de Oliveira, pelo amor e apoio durante toda minha vida.

À Virgínia Medeiro de Siqueira pelo amor, companheirismo e apoio durante todos os momentos desde que nos conhecemos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade da formação acadêmica a nível de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o curso.

Ao Prof.º D. Sc. Adriano do Nascimento Simões pela orientação neste trabalho, conhecimento transmitido, pela paciência e pela amizade.

Ao Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima pela co-orientação, ensinamentos acerca da verdadeira essência da pesquisa científica e pela amizade.

Prof.ª Dr. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos pela co-orientação e por todos ensinamentos.

Ao Prof.º Dr. Sergio Luiz Ferreira da Silva pelos ensinamentos e por me ajudar sanar minhas dúvidas durante os trabalhos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e da Unidade Acadêmica de Serra Talhada que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Estudos em Fisiologia e Pós-colheita de Frutas e Hortaliças (NEFP), em especial a Nathália Bandeira Diniz pela ajuda nos trabalhos de bancada.

Aos amigos do grupo de estudos em Botânica da Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

Aos amigos do mestrado Aline de Oliveira, Aurielle Medeiros, Bruna Tuane, Carlos Alberto Souza, Debora da Silva, Edson, Jessica Costa, Leandro Calixto, Maria da Penha, Pedro Mouzinho, Rúbia Maia, Taciana Silva, Ygor Leal.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

(Albert Einstein)



## RESUMO

Atualmente existe uma grande preocupação com a recuperação de áreas degradadas, principalmente pela ameaça de extinção de espécies vegetais nativas, como por exemplo a aroeira do sertão (*Myracrodouon urundeuva*), nativa da Caatinga. A inoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) tem sido uma alternativa para minimizar os efeitos adversos do estresse hídrico em plantas cultivadas. Entretanto, não se conhece sobre os efeitos das RPCPs em plantas da Caatinga. Portanto, acredita-se que a inoculação da RPCP, *Azospirillum lipoferum*, em plantas de *M. urundeuva* pode conferir maior tolerância ao estresse hídrico. Neste sentido, o presente estudo avaliou a influência dos efeitos da *A. lipoferum* no crescimento de *M. urundeuva*, sob estresse hídrico. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Em fatorial 2 x 4 (com e sem inóculo x quatro lâminas de irrigação), a ANOVA foi realizada no software R e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste LSD ( $P < 0,05$ ). Inicialmente, sementes de *M. urundeuva* foram sanitizadas e parte foi inoculada e outra não (controle). Dez dias após a germinação, as plântulas foram submetidas a quatro lâminas de irrigação: 180 mm (controle), 135 e 90 mm (estresse moderado), e 45 mm (estresse severo). As plantas cresceram sob condições de fotoperíodo de 12 horas a 28 °C e 12 horas no escuro a 26 °C, com umidade relativa de 50% e intensidade luminosa de 450  $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Após 81 dias foram realizadas medidas biom\u00e9tricas da parte a\u00e9rea e das ra\u00edzes das plantas, e nos fol\u00edolos foi quantificado o potencial h\u00eddrico foliar ( $\Psi_{\text{HF}}$ ), al\u00e9m do extravasamento de eletr\u00f3litos, teor de clorofilas, teor de prote\u00edna, conte\u00fado de prolina, atividade da super\u00f3xido dismutase (SOD) e avalia\u00e7\u00e3o da apar\u00eancia geral das plantas, bem como a porcentagem de fol\u00edolos ca\u00eddos. A inocula\u00e7\u00e3o foi confirmada pela mudan\u00e7a de colora\u00e7\u00e3o do meio de cultura azul de bromotimol isento de nitrog\u00eanio (NFB) semiss\u00f3lido, de verde amarelado para azul. Nas plantas inoculadas, os efeitos adversos do estresse h\u00eddrico moderado foram minimizados, ao passo em que houve menor queda de fol\u00edolos e maior tonalidade de verde, confirmado pela manuten\u00e7\u00e3o dos mais altos teores de clorofila *a*, *b* e total. A associa\u00e7\u00e3o da RPCP com as ra\u00edzes das plantas proporcionou aumentos de 30% no comprimento da raiz, de 50% na massa seca da raiz, de 34% na massa seca da parte a\u00e9rea e de 10% no conte\u00fado de prote\u00ednas sol\u00faveis, em rela\u00e7\u00e3o \u00e0s plantas controle. As plantas inoculadas ainda mantiveram o potencial h\u00eddrico foliar 5% maior em rela\u00e7\u00e3o \u00e0s n\u00e3o inoculadas, e apresentou menor dano de membrana no estresse h\u00eddrico moderado. Por outro lado, a atividade da SOD foi menor nas plantas inoculadas,

possivelmente devido a indução de um caráter protetivo não enzimático. Além disso, as plantas inoculadas apresentaram características morfofisiológicas superiores às não inoculadas. Dessa forma, a inoculação de RPCP em *M. urundeuva* pode ser uma alternativa viável para produção de plantas mais tolerantes ao estresse hídrico. Ademais, essa técnica possui um forte potencial de uso em planos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas em regiões de florestas tropicais secas (FTS). Contudo, são necessários mais estudos sobre os mecanismos bioquímicos e fisiológicos que conferem essas tolerâncias, assim como, o estudo desses mesmos mecanismos em outras plantas nativas.

**Palavras-chave:** Aroeira do Sertão, Semiárido, Estresse hídrico.

## ABSTRACT

Nowadays there is a great concern about the recovery of degraded areas, mainly due to the threat of extinction of native plant species, such as the aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) native of the Caatinga biome. In line with this, inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) has been an alternative to minimize the adverse effects caused by drought stress in cultivated plants. However, little is known about the effects of RPCPs in native plant species of Caatinga. Therefore, it's believed that the inoculation of a PGPR, *Azospirillum lipoferum*, in *M. urundeuva* plants might confer greater tolerance to drought stress. In this context, the present study evaluated the influence of *A. lipoferum* on the growth of *M. urundeuva* under drought stress. The experiment was conducted in a completely randomized design (DIC). In factorial 2 x 4 (with and without inoculum x four irrigation levels), ANOVA performed in software R and the means of treatments were compared by the LSD test ( $P < 0.05$ ). Firstly, seeds of *M. urundeuva* were sanitized, and then part was inoculated with *A. lipoferum*, and another was not inoculated (control). Ten days after germination, the seedlings were submitted to four irrigation levels: 180 mm (control), 135 and 90 mm (moderate stress), and 45 mm (severe stress). The plants grew under photoperiod conditions of 12 hours at 28 ° C and 12 hours in the dark at 26 ° C, with relative humidity of 50% and light intensity of  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . After 81 days biometric measures of the shoot and roots of the plants, and in the leaflet was quantified the leaf water potential ( $\Psi_{\text{WL}}$ ), electrolyte leakage, chlorophyll content, soluble protein content, proline content, superoxide dismutase (SOD) activity and general appearance of the plants, as well as the percentage of fallen leaflets were evaluated. The inoculation was confirmed by the change of the colour of the semi-solid nitrogen-free bromothymol blue (NFB) culture medium from yellowish green to blue. In the inoculated plants, the adverse effects of moderate drought stress were minimized, while there was less leaflet drop and greater green tint, this was confirmed by the maintenance of the highest levels of chlorophyll *a*, *b* and total. The association of PGPR with the roots of the plants provided increases of 30% root length, 50% root dry weight, 34% root shoot dry weight and 10% soluble protein content. The inoculated plants still maintained 5% higher leaf water potential than those not inoculated, as well as presented lower membrane damage in moderate drought stress. On the other hand, SOD activity was significantly lower in the inoculated plants, possibly due to the induction of a non-enzymatic protective feature. In addition, the inoculated plants shown better morphological and physiological

characteristics than those not inoculated. In this way, the inoculation of PGPR in *M. urundeuva* can be an alternative for the production of plants that are more tolerant to drought stress. In addition, this technique has a strong potential for use in reforestation and recovery plans of degraded areas in tropical dry forests (TDF). Nevertheless, further studies on the biochemical and physiological mechanisms that confer these tolerances are needed, as well as studies about these same mechanisms in other native plants.

**Keywords:** Aroeira do Sertão tree, Semiarid, Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição global da floresta tropical seca no ano 2000, exibida como células de 10 km contendo esse tipo de floresta (incluindo plantações em áreas de floresta seca tropical) (Adaptado de MILES *et al.*, 2006)..... 23
- Figura 2.** Perda de cobertura arbórea por unidade de amostragem (km<sup>2</sup>), em dois períodos de avaliados: (a) 1990 a 2000 e (b) 2000 a 2010 (Adaptado de BEUCHLE *et al.*, 2015).25
- Figura 3.** Aspectos morfológicos das fases de desenvolvimento de *Myracrodruon urundeuva* – 1<sup>a</sup> fase de desenvolvimento - germinação (A), 2<sup>a</sup> fase - plântula (B), 3<sup>a</sup> fase - planta jovem (C). Hipocótilo (hi), drupa (dr), cotilédone (c), gema apical (g), colo (co), pelos (pe), raiz (r), radícula (rd), raiz secundária (rs) e gema axial (ga) (Adaptado de FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008). ..... 27
- Figura 4.** Principais sítios e fontes de síntese de EROs na célula vegetal (Adaptado de HOSSAIN *et al.*, 2011). ..... 29
- Figura 5.** Rotas biosintéticas do metabolismo de prolina em plantas superiores (Adaptado de BURRITT, 2012)..... 31
- Figura 6.** Proteína intacta promovida pela proteção da prolina ao envoltório de moléculas de água (Adaptado de BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001)..... 32
- Figura 7.** Tolerância Sistêmica Induzida (TSI) por RPCPs contra a seca, a salinidade e baixa fertilidade. (Adaptado de YANG; KLOEPPER; RYU 2009). ..... 39
- Figura 8.** Curva do tempo de estabilização do extravasamento de eletrólitos, pela condutividade elétrica (C1) do meio líquido, de tecidos foliares de *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) A.C. Serra Talhada, PE, UFRPE-UAST, 2017..... 44
- Figura 9.** Absorbância a 595 nm em função da concentração de BSA (Bovine Serum Albumin) para a curva de calibração. Serra Talhada, PE, UFRPE-UAST, 2017..... 46
- Figura 10.** Absorbância a 520 nm em função da concentração de L-Prolina para a curva de calibração. Serra Talhada, PE, UFRPE-UAST, 2017..... 48
- Figura 11.** Meio de cultura NFB semisólido com adição de alíquotas de água destilada esterilizada, utilizadas na lavagem do substrato rizosférico de plantas de *Myracrodruon urundeuva*, aos 81 dias, sem e com inóculo (*Azospirillum lipoferum*), sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). \*mm: milímetro. .... 50
- Figura 12.** Plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* sem e com inóculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm), cultivadas em

vasos de 1,2 kg aos 81 dias após germinação, submetidas às seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas à 28 °C e 12 horas no escuro à 26 °C; Umidade Relativa constante de 50%; intensidade luminosa 450 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . mm*: milímetro. ....	51
<b>Figura 13.</b> Folíolos de <i>Myracroduon urundeuva</i> sem e com inóculo ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Coleta realizada aos 81 dias nas seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas à 28 °C e 12 horas no escuro à 26 °C; Umidade Relativa constante de 50%; intensidade luminosa 450 $\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . mm*: milímetro. ....	52
<b>Figura 14.</b> Clorofila <i>a</i> (A), <i>b</i> (B), total (C) e razão clorofila <i>a/b</i> (D) de plantas de <i>Myracroduon urundeuva</i> , com e sem inoculação ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em $P \leq 0.05$ . ....	53
<b>Figura 15.</b> (A) Comprimento da raiz, (B) diâmetro de coleto, (C) área foliar e (D) altura da parte aérea de plantas de <i>Myracroduon urundeuva</i> , com e sem inóculo ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro níveis de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em $P \leq 0.05$ . ....	55
<b>Figura 16.</b> Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (B) de plantas de <i>Myracroduon urundeuva</i> , com e sem inóculo ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em $P \leq 0.05$ . ....	56
<b>Figura 17.</b> Teor proteína solúvel (A e B) e de prolina (C) em plantas de <i>Myracroduon urundeuva</i> , com e sem inóculo ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em $P \leq 0.05$ . ....	57
<b>Figura 18.</b> Potencial hídrico foliar (A e B), dano de membrana (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) de plantas de <i>Myracroduon urundeuva</i> , com e sem inoculação ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em $P \leq 0.05$ . ....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos da inoculação de <i>Azospirillum lipoferum</i> em diferentes espécies de plantas. .....	36
<b>Tabela 2.</b> Solução padrão de Bovine Serum Albumin, Água destilada, volume final e concentração final para a confecção curva de calibração, Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2017.....	45
<b>Tabela 3.</b> Solução padrão de L-Prolina, solução estoque, água destilada, volume final e concentração final para a confecção curva de calibração, Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2017.....	47
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de folíolos caídos de plantas de <i>Myracroduton urundeuva</i> com e sem inoculo ( <i>Azospirillum lipoferum</i> ) sob quatro níveis de irrigação (45, 90, 135 e 180 mm).....	54
<b>Tabela 5.</b> ANAVA – Comprimento de Raiz de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	80
<b>Tabela 6.</b> ANAVA – Diâmetro do coleto de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	80
<b>Tabela 7.</b> ANAVA – Altura Parte Aérea de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	81
<b>Tabela 8.</b> ANAVA – Área foliar de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação. ....	81
<b>Tabela 9.</b> ANAVA – Massa seca da raiz de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	82
<b>Tabela 10.</b> ANAVA – Massa seca da parte aérea de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	82
<b>Tabela 11.</b> ANAVA – Conteúdo de proteína de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	83
<b>Tabela 12.</b> Teste de Tukey – Conteúdo de proteína de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	83
<b>Tabela 13.</b> ANAVA – Potencial hídrico foliar de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	83
<b>Tabela 14.</b> Teste de Tukey – Potencial hídrico foliar de <i>Myracroduton urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	84

<b>Tabela 15.</b> ANAVA – Dano de membrana de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	84
<b>Tabela 16.</b> ANAVA – Clorofila <i>a</i> de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação. ....	84
<b>Tabela 17.</b> ANAVA – Clorofila <i>b</i> de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação. ....	85
<b>Tabela 18.</b> ANAVA – Clorofilas totais de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	85
<b>Tabela 19.</b> ANAVA – Razão clorofila <i>a/b</i> de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	86
<b>Tabela 20.</b> ANAVA – Atividade da SOD de Plântulas de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	86
<b>Tabela 21.</b> ANAVA da regressão – Atividade da SOD em <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	86
<b>Tabela 22.</b> ANAVA – Conteúdo de prolina de <i>Myracroduon urundeuva</i> inoculadas com <i>Azospirillum lipoferum</i> sob quatro níveis de irrigação.....	87



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
<b>2.1 Florestas tropicais secas (FTS)</b> .....	22
<b>2.2 Caatinga</b> .....	24
<b>2.3 <i>Myracrodouon urundeuva</i> (ALLEMÃO)</b> .....	25
<b>2.4 Efeitos do estresse hídrico em plantas</b> .....	28
<b>2.4.1 Potencial hídrico (<math>\Psi_H</math>)</b> .....	33
<b>2.4.2 Mudanças na pigmentação em plantas sob estresse hídrico</b> .....	35
<b>2.5 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)</b> .....	35
<b>2.6 Mecanismos de ação de RPCPs</b> .....	38
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>3.1 Coleta de sementes</b> .....	41
<b>3.2 Preparo de semente e do substrato</b> .....	41
<b>3.3 Preparo e inoculação com <i>Azospirillum lipoferum</i> (BR-11080)</b> .....	41
<b>3.4 Semeadura e crescimento de <i>Myracrodouon urundeuva</i></b> .....	42
<b>3.5 Confirmação da inoculação com <i>Azospirillum lipoferum</i> (BR-11080)</b> .....	43
<b>3.6 Análise biométricas</b> .....	43
<b>3.7 Análises físico-químicas</b> .....	43
<b>3.7.1 Potencial hídrico foliar (<math>\Psi_{HF}</math>)</b> .....	43
<b>3.7.2 Extravasamento de eletrólitos</b> .....	44
<b>3.8 Análise bioquímicas</b> .....	45
<b>3.8.1 Teor de proteína solúveis totais</b> .....	45
<b>3.8.3 Conteúdo de prolina</b> .....	47
<b>3.8.4 Teor de clorofilas</b> .....	48
<b>3.9 Análise estatística</b> .....	49
<b>4. RESULTADOS</b> .....	50
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>APÊNDICE</b> .....	79
<b>ANEXO</b> .....	88



## 1. INTRODUÇÃO

As florestas tropicais secas (FTS) estão distribuídas em regiões sazonalmente secas caracterizadas por climas áridos e semiáridos, as quais representam 40% das florestas tropicais (BEUCHLE *et al.*, 2015). Durante décadas, as áreas que incidem sob as FTS têm se tornado cada vez mais populosas, chegando a abrigar um terço da população mundial (MILES *et al.*, 2006). As diversas atividades antrópicas desenvolvidas nessas regiões têm provocado muitas pressões ambientais, como a supressão de vegetação nativa, seja para a comercialização de madeira, como também a conversão de FTS em áreas de produção agrícola e/ou atividade pecuária (MILES *et al.*, 2006). Além disso, as mudanças climáticas globais têm intensificado as características climáticas das FTS, acarretando em precipitações pluviométricas mais concentradas e intensas durante curto período do ano, e estações de seca mais prolongadas, assim diminuindo a disponibilidade hídrica para as plantas dessas regiões (BEUCHLE *et al.*, 2015).

Dentre as FST, destaca-se a Caatinga, típica do semiárido do Nordeste do Brasil, caracterizada por elevadas temperaturas, com média anual em torno de 25 °C, e baixa pluviosidade anual, aproximadamente 450 mm (MOURA *et al.*, 2007). Nesse bioma, ainda existe uma elevada biodiversidade, contudo, ao longo dos anos a intensa atividade antrópica tem resultado em grande degradação deste ambiente, levando inclusive à diminuição da diversidade vegetal (BEUCHLE *et al.*, 2015).

O Ministério do Meio Ambiente (2008) enfatiza o risco de perda de diversidade vegetal, na Caatinga, visto que cerca de 48 espécies de plantas estão ameaçadas de extinção, incluindo a *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) (Anacardiaceae), conhecida popularmente como aroeira do sertão. Essa planta possui grande importância econômica, medicinal e ecológica, à medida que sua madeira é apreciada comercialmente (LORENZI, 2014), apresenta elevada concentração de tanino (MONTEIRO *et al.*, 2006) e provavelmente interage com uma grande diversidade de microrganismos ainda desconhecidos. Desta forma, sua extinção poderá representar prejuízos imensuráveis.

As plantas da caatinga frequentemente enfrentam obstáculos para perpetuarem no seu habitat, este problema tem sido acentuado com o desmatamento e o prolongamento das estações de seca, representando assim uma intensificação do estresse hídrico para as plantas (VIEIRA *et al.*, 2015). Esses fatores representam uma limitação para o crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais nativas, principalmente na fase de plântula

(DEMIDCHIK, 2015). O estresse hídrico é o fator que mais restringe o crescimento das plantas (ZINGARETTI *et al.*, 2013).

As plantas sob estresse hídrico alteram seu metabolismo para minimizar os efeitos adversos da seca (AHMAD *et al.*, 2014). Em condições de estresse hídrico, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio – EROs (superóxido de oxigênio, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila), é perturbado, prevalecendo maiores níveis de EROs nas células vegetais (DAS *et al.*, 2015). Isso pode representar uma toxicidade para as plantas, pois as EROs podem oxidar distintas macromoléculas que compõem as membranas plasmáticas celulares e alterarem a conformação de proteínas, lipídeos e do ácido desoxirribonucleico (DNA) (DAS *et al.*, 2015). Contudo, a planta produz metabólitos e enzimas antioxidantes que eliminam o excesso dessas EROs (DEMIDCHIK, 2015). Alguns exemplos dessas enzimas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e o ascorbato peroxidase (APX) (DEMIDCHIK, 2015).

O aumento dos níveis de prolina também pode minimizar os efeitos adversos da seca, ao passo que esse aminoácido pode atuar como ativador de rotas de desintoxicação e como ajustador osmótico (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; HAYAT *et al.*, 2012). A difusão de água da planta para atmosfera também é ajustada via estômatos. Assim, plantas sob estresse hídrico aumentam rapidamente a produção de hormônios como ácido abscísico (ABA) e o etileno, os quais estão envolvidos com o fechamento estomático, desta forma minimizando a perda de água (ACHARD *et al.*, 2003; BARNA *et al.*, 2012; OSKABE *et al.*, 2014). O etileno ainda tem importante papel na morte celular programada e está fortemente relacionado com abscisão foliar (SAKAMOTO *et al.*, 2008). Deste modo, a queda de folhas provocadas pelo etileno representa uma das estratégias das plantas para tolerarem o estresse hídrico (SAKAMOTO *et al.*, 2008).

Adicionalmente, pesquisas apontam que a presença de Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP), as quais constituem um grupo de bactérias presentes na rizosfera, minimiza o estresse hídrico, por meio da indução de produção de enzimas antioxidantes, além de outros hormônios e metabólitos que desempenham papéis importantes na redução dos danos provocados pela seca (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; KOHLER *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, diversos estudos conduziram experimentos utilizando espécies de RPCPs, a fim de minimizar o estresse oxidativo e/ou aumentar os níveis de produtividade de plantas cultivadas, como *Zea mays* (BRANDÃO, 1989; WALKER *et al.*, 2011),

*Lycopersicon esculentum* (MAYAK *et al.*, 2004), *Lactuca sativa* (SOTTERO *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2007), *Phaseolus coccineus* (STEFAN *et al.*, 2013), *Cicer arietinum* (KARNWAL; KUMAR, 2012; YADAV *et al.*, 2014), *Oryza sativa* (LUCAS *et al.*, 2014) e *Glycine max* (KANG *et al.*, 2014). Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos do estresse hídrico em espécies arbóreas nativas de ambientes áridos e/ou semiáridos e inoculadas com RPCP. Além disso, os estudos que avaliaram a interação de RPCPs com plantas nativas de FTS ainda são poucos representativos em relação a distribuição geográfica dessas FTS, como do Mediterrâneo (*Pinus halepensis*; *Quercus coccifera*) (RINCÓN, 2008) e da China (*Platycladus orientalis*) (LIU *et al.*, 2013).

Os estudos citados acima não abordaram os danos oxidativos nas plantas, embora apresentaram resultados que sugerem a minimização dos efeitos do estresse hídrico. Assim, no presente estudo, espera-se que a inoculação com *Azospirillum liporefum* (RPCP), produza plantas de *M. urundeuva* mais tolerantes ao estresse hídrico no estágio inicial de crescimento. Além disso, os resultados obtidos neste estudo são de grande relevância, uma vez que poderão gerar conhecimento sobre a tolerância de espécies nativas que possa nortear a elaboração de planos de manejo e de recuperação de áreas degradadas.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a influência da inoculação da *Azospirillum lipoferum* no crescimento de plantas de *M. urundeuva* submetidas ao estresse hídrico, por meio de medidas biométricas. Além disso, buscou-se entender respostas fisiológicas para a tolerância ao estresse hídrico, por meio de medidas de prolina, dano de membrana, *status* hídrico e atividade da SOD.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Florestas tropicais secas (FTS)

O conjunto de vegetação presente em regiões tropicais, de climas áridos e semiáridos, caracterizadas por sazonalidade de chuvas com longos períodos de seca, são consideradas Florestas Tropicais Secas – FTS (WAROUX; LAMBIN, 2012). Essas FTS estão distribuídas ao longo do planeta, sendo que mais da metade (54,2 %) está localizada na América do Sul, o restante encontra-se distribuída quase igualmente entre América do Norte e Central, África e Eurásia (Fig. 1) (MILES *et al.*, 2006).

Cerca de um terço da população mundial vivem em regiões tropicais sazonalmente secas (MILES *et al.*, 2006), e grande parte dessa população depende dos recursos naturais das FTS para sua sobrevivência. As FTS fornecem uma ampla variedade de produtos que são coletados e vendidos pela população local (DJOUDI *et al.*, 2015). Tais produtos contribuem para dietas locais, como frutas silvestres, legumes, tubérculos, mel, insetos comestíveis, carne de caça e plantas medicinais (SUNDERLAND *et al.*, 2015).

As FTS fornecem amplos serviços ecossistêmicos para os habitantes locais, como o recurso hídrico, utilizado para a dessedentação animal, a polinização e a ciclagem de nutrientes no solo que contribuem significativamente para a melhoria da agricultura (FOLI *et al.*, 2014). Assim, os serviços de regulação das FTS também reduzem a sensibilidade da agricultura à seca (PRAMOVA *et al.*, 2012).

A madeira é o principal produto proveniente das FTS que é utilizado para atender demanda energética local, ao passo que aproximadamente 2,4 milhões de pessoas (cerca de 40 % da população) de países subdesenvolvidos têm como base energética a madeira (SUNDERLAND *et al.*, 2015). Contudo, a madeira retirada das FTS também é fonte de renda para as comunidades locais, embora a grande maioria dos processos de produção de carvão vegetal nessas regiões sejam informais (SUNDERLAND *et al.*, 2015).

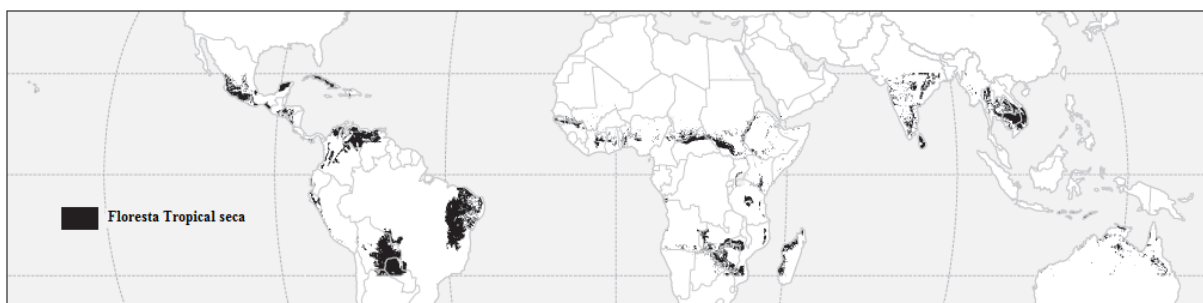
Outro papel fundamental das FTS é a mitigação dos processos associados às mudanças climáticas, por meio do processo de fixação do carbono, representando grande estoque de carbono principalmente nos caules dos vegetais (BECKNELL *et al.*, 2012). Porém, ainda não se conhece a real capacidade de fixação de carbono pelas FTS (SUNDERLAND *et al.*, 2015). Contudo, Portillo-Quintero *et al.* (2014) revelam que longos períodos de monitoramento das FTS permitirá o conhecimento sobre a quantidade de carbono que pode ser fixado por essas

florestas, adicionalmente afirmam que a regeneração de grandes extensões de FTS nas Américas contribuiriam significativamente para o sequestro de carbono atmosférico.

As mudanças climáticas refletem principalmente no amplo decréscimo na precipitação, o que representa uma grande barreira para o estabelecimento natural das plantas, assim como para o sucesso de reflorestamento. A América do Sul apresenta uma das maiores porcentagens de riscos (37 %) de sofrer com as mudanças climáticas (MILES *et al.*, 2006).

As FTS detêm um alto valor de biodiversidade, entretanto essa biodiversidade tem reduzido drasticamente, ao passo que 97% dessas FTS sofrem múltiplas pressões ambientais (MILES *et al.*, 2006). A principal causa dessa redução são as intensas atividades humanas, frequentemente simultâneas, como: a fragmentação de habitats, incêndios, conversão em terras para agricultura e/ou pecuária, e exploração madeireira indiscriminada (MILES *et al.*, 2006). Adicionalmente, segundo Portillo-Quintero e Sánchez-Azofeifa (2010), cerca de 66 % dos ecossistemas de FTS das Américas tiveram sua área convertida para outros usos.

Por meio de informações biogeográficas e distribuição de flora (OLSON *et al.*, 2001; HANSEN *et al.*, 2003), Miles e colaboradores (2006) estimaram a área remanescente de FTS distribuídas ao longo da superfície terrestre, no ano de 2000, em aproximadamente 1.048.700 km<sup>2</sup> (Fig. 1).



**Figura 1.** Distribuição global da floresta tropical seca no ano 2000, exibida como células de 10 km contendo esse tipo de floresta (incluindo plantações em áreas de floresta seca tropical) (Adaptado de MILES *et al.*, 2006).

Diante da importância das FTS para grande parte da população mundial e as pressões ambientais que essas florestas sofrem, torna-se urgente a adoção de medidas que visem a recomposição dos serviços ecossistêmicos. Cada país tem o dever de preservar as FTS dentro de sua unidade territorial por meio da criação de unidades de conservação, implementação de programas e planos de recuperação de áreas degradadas. Além disso, para conservação dessas florestas é fundamental o constante monitoramento, a elaboração de políticas sustentáveis

para utilização dos recursos naturais, bem como a regularização de práticas agrícolas, pecuária e de extração madeireira.

## 2.2 Caatinga

Dentre as FTS no Brasil, a Caatinga é considerada um bioma que apresenta uma ampla extensão territorial. De acordo com IBGE (2010), ela incide sobre 844 mil km<sup>2</sup> do território brasileiro e engloba partes dos territórios pertencentes aos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais (IBGE, 2010). Segundo Viera e colaboradores (2015) sua área corresponde a 54% da Região Nordeste e a 11% do território brasileiro, constituindo o chamado “Polígono das Secas”.

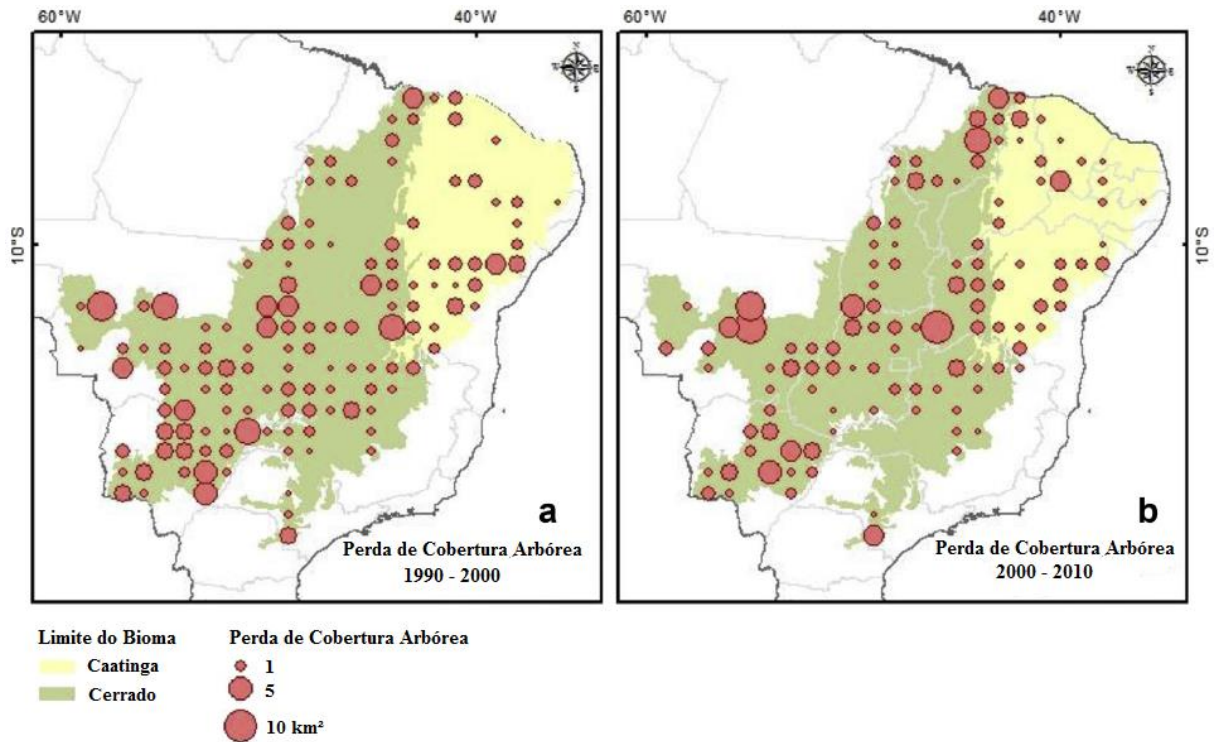
O clima incidente sobre essa região é o semiárido, que apresenta baixa pluviosidade, além de ser irregular, com médias anuais de 450 mm, e altas temperaturas durante todo ano, variando em torno de 25°C (TROVÃO *et al.*, 2007). As condições edafoclimáticas dessa região influenciam diretamente no tipo de vegetação. Contudo, a Caatinga apresenta uma grande heterogeneidade vegetal, como foi exposto por Velloso e colaboradores (2002), quando classificou oito ecorregiões: Depressão Sertaneja Meridional, Depressão Sertaneja Setentrional, Dunas do São Francisco, Complexo Ibiapaba-Araripe, Complexo Chapada Diamantina, Planalto da Borborema, Raso da Catarina e Complexo de Campo Maior.

Por meio do levantamento realizado por Giulietti e colaboradores (2006) do número de espécies vegetais presentes na Caatinga foi possível revelar quais são as famílias de plantas mais representativas desse bioma, assim distribuídas: 278 espécies (Fabaceae), 103 espécies (Convolvulaceae), 73 espécies (Euphorbiaceae), 71 espécies (Malpighiaceae), 66 espécies (Poaceae) e 57 espécies (Cactaceae). A vegetação da região semiárida está naturalmente condicionada ao déficit hídrico, por conta das características climáticas e da baixa capacidade de retenção de água do solo (TROVÃO *et al.*, 2007).

Dentre os biomas brasileiros a Caatinga tem sido indicada como o menos conhecido e o mais negligenciado (MMA 2011; SANTOS *et al.*, 2011). Além disso, esse bioma tem sofrido diversas pressões ambientais que resultam na degradação ecossistêmica, evidenciado pela perda de cobertura vegetal natural. Beuchle *et al* (2015) verificaram a perda de 46.021 e 43.636 Km<sup>2</sup> de vegetação nativa entre os períodos de 1990 a 2000 e de 2000 a 2010, respectivamente (Fig. 2). Totalizando 89.656 km<sup>2</sup> de perda de cobertura vegetal, e tal perda representa aproximadamente 10% da área da Caatinga. Contudo, os dados de cobertura



vegetal remanescente desse ambiente apresentam algumas variações. Segundo MMA-IBAMA (2010), a vegetação remanescente da Caatinga em 2002 foi de 55,7%, e reduziu para 53,4% em 2009. Enquanto para Beuchle e colaboradores (2015) o bioma Caatinga ainda apresenta 63 % de cobertura vegetal remanesce.



**Figura 2.** Perda de cobertura arbórea por unidade de amostragem (km<sup>2</sup>), em dois períodos de avaliados: (a) 1990 a 2000 e (b) 2000 a 2010 (Adaptado de BEUCHLE *et al.*, 2015).

De acordo com MMA (2008) a Caatinga abriga cerca de 1512 espécies vegetais sendo 318 endêmicas e 48 ameaçadas de extinção, dentre essas encontra-se a *Myracrodruon urundeuva*. Ainda segundo MMA (2008) diante das espécies ameaçadas de extinção, tal bioma deve receber atenção especial na expansão e na gestão do Sistema Nacional de Unidades de Conservação, assim como nos planos de manejo das Unidades de Conservação.

### 2.3 *Myracrodruon urundeuva* (ALLEMÃO)

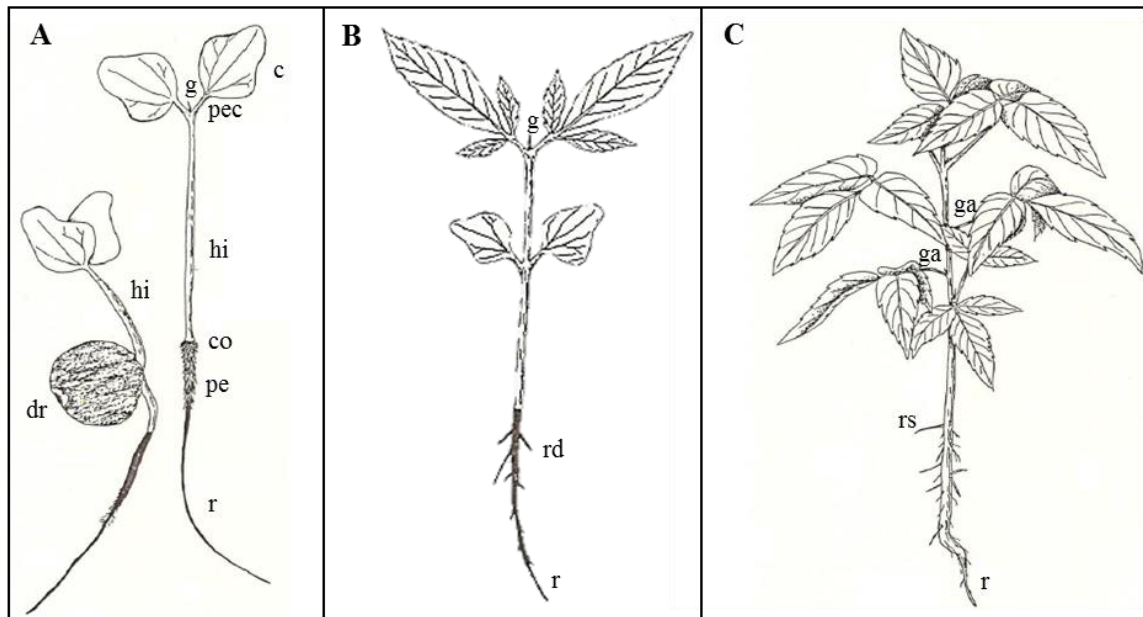
De acordo com Lorenzi (2014) a *M. urundeuva* (família Anacardiaceae) é uma espécie arbórea que naturalmente ocorre na Caatinga. Essa espécie é encontrada em terrenos secos e rochosos, em formações abertas e muito secas (caatinga) e em formações muito úmidas e fechadas (florestas pluviais com 2 000 mm de precipitação anual), sendo

encontrados registros no Paraná, no Mato Grosso do Sul, no oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo (LORENZI, 2014) e ainda segundo Santin e Leitão Filho (1991), Gurgel-Garrido e colaboradores (1997), Carmello-Guerreiro e Paoli (1999) na Bolívia, no Paraguai e na Argentina.

A *M. urundeuva* é popularmente conhecida por: urundeúva, aroeira, aroeira do sertão, aroeira do campo e aroeira preta (LORENZI, 2014). Sua altura na caatinga ou no cerrado varia de 6-14 m, enquanto em solos mais férteis da floresta latifoliada semidecídua pode atingir de 20-25 m, com troncos de 50-80 cm de diâmetro, além disso, apresenta madeira muito pesada (densidade 1,19 g/cm<sup>3</sup>), de grande resistência mecânica e praticamente imputrescível (LORENZI, 2014).

A florescência ocorre nos meses de junho e julho, geralmente nessa época a planta perde toda sua folhagem, devido sua característica decídua, e a maturação dos frutos ocorre entre o final do mês de setembro até o final do mês de outubro (LORENZI, 2014). A unidade de semeio é o fruto-semente, que apresenta formato ovóide e um cálice persistente, com diâmetro de aproximadamente 3 mm (FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008). Segundo Silva *et al.* (2002) a germinação ótima ocorre na faixa de temperatura de 20 à 30 °C, Feliciano; Marangon; Holanda (2008) utilizando a temperatura constante de 25 °C obtiveram 80% de sementes germinadas em relação a quantidade semeada.

Na primeira fase de desenvolvimento ocorre a germinação com a presença da drupa, e a formação do hipocótilo, do cotilédone, da gema apical, do colo, dos pêlos e da raiz (Fig. 3 A) (FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008). A segunda fase, plântula, inicia-se com a formação dos protófilos opostos, a raiz apresenta-se fina, sinuosa, com pelos finos e poucas raízes secundárias (Fig. 3 B) (FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008). A terceira fase, planta jovem, é iniciada com o aparecimento de pronomofilo, com raiz axial levemente tuberosas e raízes secundárias pouco desenvolvidas, castanho-claro, e em relação a parte aérea a plântula apresenta os dois primeiros protófilos opostos e os cinco posteriores são alternados e trifoliolados (Fig. 3 C) (FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008).



**Figura 3.** Aspectos morfológicos das fases de desenvolvimento de *Myracrodouon urundeuva* – 1ª fase de desenvolvimento - germinação (A), 2ª fase - plântula (B), 3ª fase - planta jovem (C). Hipocótilo (hi), drupa (dr), cotilédone (c), gema apical (g), colo (co), pelos (pe), raiz (r), radícula (rd), raiz secundária (rs) e gema axial (ga) (Adaptado de FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008).

Feliciano, Marangon e Holanda (2008) sugerem que a formação da raiz tuberosa, que contém reserva de nutrientes, seja possivelmente resultado de processos bioquímicos e fisiológicos para minimizar às condições ambientais adversas de seu habitat. Contudo, a caatinga habitat natural da *M. urundeuva* tem sofrido diversas pressões ambientais que intensificam o estresse hídrico para plantas. Assim, dificultando o estabelecimento das plantas, principalmente, em seu estágio inicial de crescimento, além de retardar o crescimento das mesmas.

Figueirôa, Barbosa e Simabukuro (2004) verificaram a diminuição de parâmetros biométricos, de plântulas de *M. urundeuva*, com a redução dos regimes hídricos. Neste sentido, Kratka e Correa (2015) testaram diferentes substratos no crescimento inicial de *M. Urundeuva*, e concluíram que a adição de 25% de matéria orgânica melhorava significativamente os atributos das plântulas.

## 2.4 Efeitos do estresse hídrico em plantas

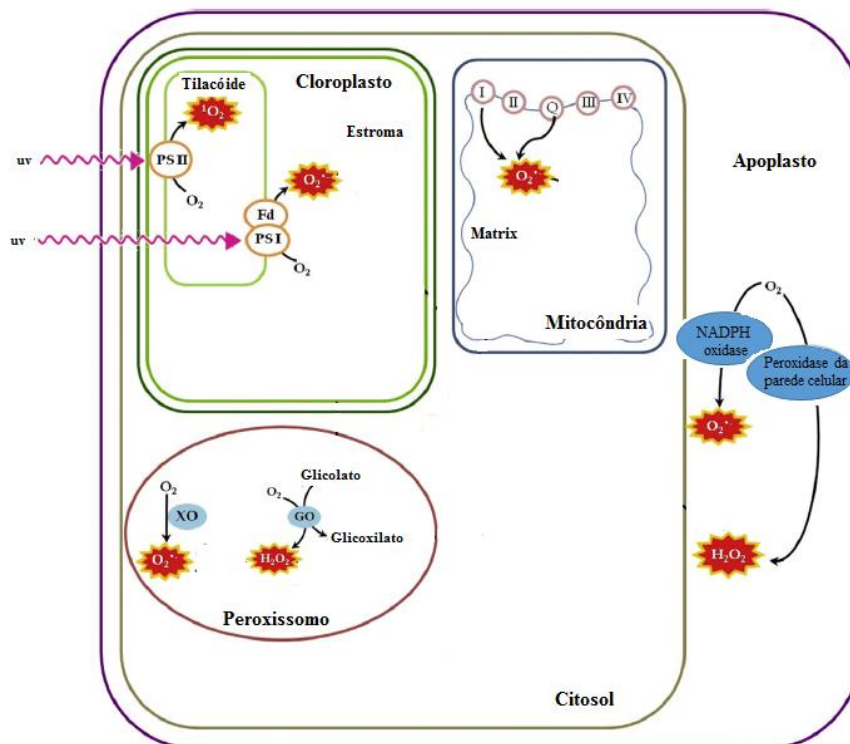
A disponibilidade hídrica para as plantas depende da interação do sistema solo-planta-atmosfera, desta forma, o movimento de água do solo para a atmosfera é intermediado pela planta, que por sua vez, depende das características físicas do solo (SANTOS; CARLESSO, 1998). O suprimento hídrico que as plantas têm disponível para seus processos metabólicos está relacionado com a habilidade da cultura em utilizar a água armazenada no solo, enquanto a demanda atmosférica está condicionada a fatores meteorológicos combinados com o dossel vegetativo (CARLESSO, 1995).

A textura do solo está diretamente relacionada com sua capacidade de retenção de água, desta forma, solos argilosos retêm mais água quando comparado com solos arenosos, pois o solo argiloso apresenta uma maior área superficial e menor quantidade de poros entre as partículas que o constituem (TAIZ; ZEIGER, 2006). O solo quando está seco apresenta uma maior força de retenção, dificultando a captação de água pelas plantas (BERGAMASCHI, 1992), além de limitar o crescimento radicular (LUDLOW; MUCHOW, 1990), assim, apenas uma parcela da água armazenada no solo é disponível para a captação das plantas (CARLESSO, 1995). Consequentemente, o déficit hídrico pode representar um fator limitante tanto no desenvolvimento quanto no crescimento de diversas espécies vegetais (LECOEUR; SINCLAIR, 1996).

A falta de água para a planta pode acarretar uma espécie de conflito interno entre a conservação da água e a taxa de assimilação do CO<sub>2</sub> para produção de carboidratos (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Além disso, pode provocar prejuízos morfofisiológicos nas plantas, como relatado por Das e colaboradores (2015) como o decréscimo da produção da área foliar, o fechamento dos estômatos, aceleração da senescência e a abscisão das folhas. Outros efeitos foram observados nas plantas em decorrência deste déficit, como a redução na atividade fotossintética, através da redução na assimilação de CO<sub>2</sub> e da senescência das folhas (FAVER *et al.*, 1996). Devido a necessidade das plantas em desenvolverem “mecanismos adaptativos e de resistência”, ocorrem alterações na utilização dos carboidratos que passam a ser utilizados no desenvolvimento de novas partes das plantas (CRAFTS-BRANDNER; PONELEIT, 1992).

As plantas são organismos aeróbicos obrigatórios, e exigem oxigênio para a produção de energia mitocondrial. Assim, como resultado natural da fotossíntese e da respiração, as plantas constantemente produzem Espécies Reativas de Oxidativas – EROs (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). As EROs são produzidas nas partes verdes das plantas, na

presença de luz, principalmente nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e nas membranas plasmáticas (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Nos cloroplastos são produzidos o oxigênio molecular ( $O_2$ ), mais especificamente no fotossistema II (PSII) e o superóxido ( $O_2^-$ ) no fotossistema I (PSI), ambos com subprodutos (DAS *et al.*, 2015) (Fig. 4). Nas mitocôndrias são produzidos  $O_2^-$  no complexo I e na ubiquinona (Q), também como subprodutos (DAS *et al.*, 2015) (Fig. 4). Nos peroxissomos são produzidos  $O_2^-$  em diversas reações metabólicas, principalmente pela ação da xantina oxidase (XO) e  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) pela ação do glicolato (DAS *et al.*, 2015) (Fig. 4). Nas membranas plasmáticas enzimas como NADPH oxidase e peroxidases de parede celular oxidam o  $O_2$  em  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , respectivamente, tais EROs participam de diversos processos fisiológicos (DAS *et al.*, 2015) (Fig. 4).



**Figura 4.** Principais sítios e fontes de síntese de EROs na célula vegetal (Adaptado de HOSSAIN *et al.*, 2011).

Sob condições normais, sem estresse oxidativo, há um equilíbrio entre a geração e eliminação de EROs. Entretanto, sob condições ambientais adversas, tal como o estresse hídrico, este equilíbrio é perturbado, prevalecendo o aumento dos níveis de EROs nas células vegetais (OSAKABE *et al.*, 2014). Apesar de altas concentrações dessas EROs provocarem

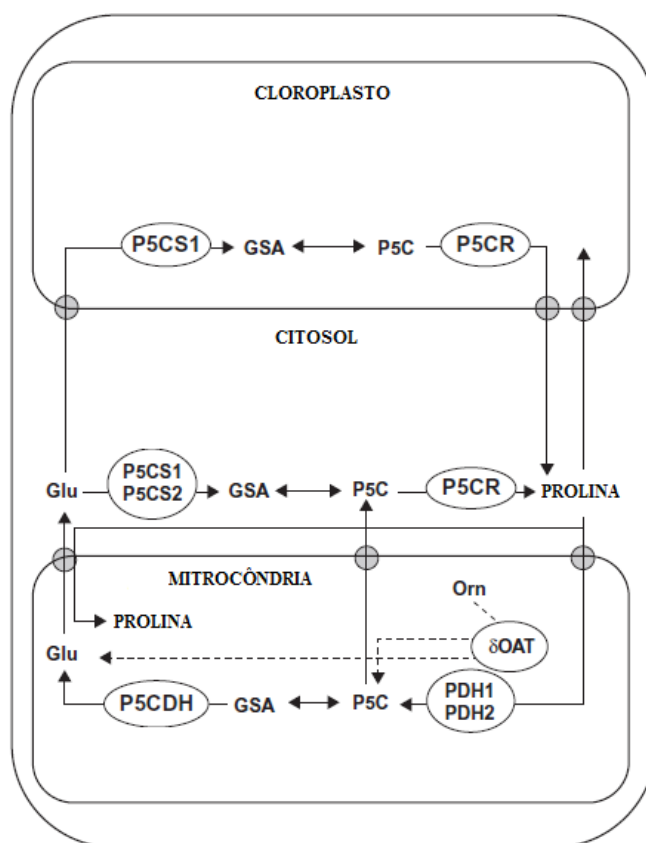
danos oxidativos em muitos componentes estruturais e celulares, por outro lado, concentrações específicas de EROs desempenham um papel vital na sinalização celular (MITTLER, 2002). A exposição continuada por EROs cria um ambiente oxidativo que afeta o equilíbrio redox da célula, provocando alterações intracelulares, que possui funções celulares importantes, como nas várias vias de sinalizações celulares que regulam a divisão celular e estresse nos sistemas de reações sensíveis à situação de redox (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Situações severas de alteração de estado redox, frequentemente podem levar desde a senescência foliar até a morte celular (DAS *et al.*, 2015). Contudo, as plantas empregam alguns mecanismos de defesa, como metabólitos e enzimas do sistema antioxidante que tem a função de prevenir o acúmulo excessivo de EROs, ou ainda eliminar o excesso provocado por estresses bióticos (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

As isoenzimas de superóxido dismutase (Fe-SOD; Mn-SOD e Cu-Zn-SOD) são as primeiras na linha de defesa da planta contra EROs, atuam principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e no citosol (HAJIBOLAND, 2014). A SOD converte  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , isto representa uma minimização dos danos causados à planta visto que o  $H_2O_2$  é menos tóxico (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). A catalase (CAT) atua principalmente na eliminação de  $H_2O_2$ , convertendo em  $H_2O$  e  $O_2$  no peroxissomos, durante a  $\beta$ -oxidação, na fotorrespiração e ainda no citosol das células (HAJIBOLAND, 2014). Enquanto nos cloroplastos e no citosol a ascorbato peroxidase (APX) também atua na eliminação  $H_2O_2$  utilizando o ascorbato como doador de hidrogênio, produzindo monodeidroascorbato (MDHA) (HAJIBOLAND, 2014). Outra enzima responsável pela eliminação do acúmulo excessivo  $H_2O_2$  é a peroxidase (POD) (HAJIBOLAND, 2014). Essa enzima é ativada rapidamente por vários fatores de estresse, devido ampla distribuição celular e isoformas, assim apresenta alta eficiência no metabolismo de  $H_2O_2$  (HAJIBOLAND, 2014).

Além das enzimas que atuam como antioxidantes, as plantas ainda podem adotar outros mecanismos fisiológicos que minimizam os efeitos adversos do estresse hídrico. Por exemplo, a síntese de grandes quantidades de compostos de baixo peso molecular, e não tóxicos em concentrações milimolar, os denominados osmolitos, tais como a prolina, glicina, betaína, entre outros (HAYAT *et al.*, 2012).

A biossíntese de prolina ocorre constantemente no citosol, e diante de situações de estresse sua síntese é aumentada nos cloroplastos (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Atualmente, são conhecidas duas rotas de biossíntese de prolina em plantas superiores, uma rota do glutamato (Glu) e outra da ornitina (Orn), sendo os dois compostos precursores da

síntese de prolina (Fig. 5) (HAYAT *et al.*, 2012). Na rota do Glu, a enzima  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) fosforila e reduz Glu em glutamato-semialdeído (GSA), o qual espontaneamente é convertido para  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) e conseqüentemente a enzima  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) converte o P5C para prolina (Fig. 5) (HAYAT *et al.*, 2012). Enquanto na rota da Orn, a biossíntese ocorre por meio das enzimas ornitina- $\delta$ -aminotransferase ( $\delta$ -OAT) (HAYAT *et al.*, 2012) (Fig. 5). Por outro lado, a degradação da prolina (oxidação da prolina para glutamato) ocorre na mitocôndria, por meio da ação de duas enzimas, prolina desidrogenase (PDH) e pirrolina carboxilato (P5C) e a enzima pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) modifica (P5C) para glutamato (Fig. 5) (HOSSAIN *et al.*, 2014).

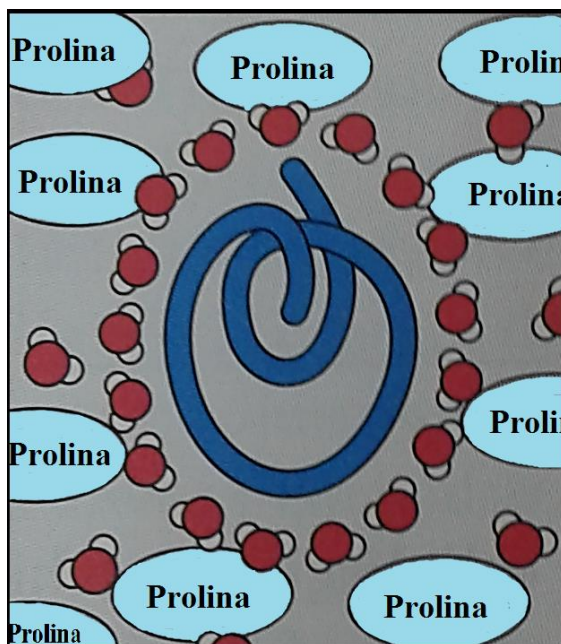


**Figura 5.** Rotas biosintéticas do metabolismo de prolina em plantas superiores (Adaptado de BURRITT, 2012).

As altas concentrações de prolina minimizam os efeitos adversos do estresse, principalmente, por meio do ajustamento osmótico celular e como ativador de rotas de desintoxicação (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; HAYAT *et al.*, 2012). Além disso, outra importante função da prolina é a proteção do envoltório de hidratação em torno de delicadas



proteínas, evitando assim sua desnaturação em situação de estresse (Fig. 6) (HOSSAIN *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Proteína intacta promovida pela proteção da prolina ao envoltório de moléculas de água (Adaptado de BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio chave para o desenvolvimento das plantas, como também, geralmente induzido nas plantas sob estresse hídrico (GOMES *et al.*, 2014). Durante alguns casos de estresse hídrico as raízes das plantas detectam a seca por meio de osmoprotetores, como a histidina cinase (ATHK1) que ativa a biossíntese do ABA (HARRISON, 2012). Esse hormônio é ligado a um transportador e levado até as folhas via xilema, nas folhas e é transferido para células guarda nos estômatos, onde ativa canais iônicos por meio de transcrições e expressões gênicas (HARRISON, 2012). Essa ativação envolve vários processos, tais como a fosforilação de proteínas, produção de EROs e comunicações entre hormônios (HARRISON, 2012).

Diante do estresse hídrico, os sistemas de transporte de íons e de água, por meio de funções das membranas plasmáticas, controlam as variações de pressão de turgor nas células guarda (OSKABE *et al.*, 2014). Então, durante a seca o ABA endógeno é rapidamente produzido, desencadeando diversas respostas fisiológicas, incluindo o fechamento estomático (OSKABE *et al.*, 2014). O fechamento estomático representa um benefício, a curto prazo, para as plantas frente aos efeitos adversos provocados pelo estresse hídrico, principalmente



por reduzir a perda de água. Porém, o fechamento estomático a longo prazo pode influenciar na absorção de CO<sub>2</sub>, assim reduzindo a fotossíntese e o crescimento da planta (OSKABE *et al.*, 2014).

O etileno é um hormônio gasoso que possui importantes papéis em processos fisiológicos, como na germinação, na dormência de sementes, no amadurecimento e na senescência (BLEECKER; KENDE, 2000; LIN *et al.*, 2009). O etileno ainda pode auxiliar a sobrevivência das plantas em condições ambientais adversas, tal como estresse hídrico, por meio do fechamento estomático e da indução da morte celular programada (ACHARD *et al.*, 2003; BARNA *et al.*, 2012). O papel do etileno na morte celular programada tem sido relacionado com a abscisão foliar (SAKAMOTO *et al.*, 2008). Durante esse processo, as células da camada de abscisão devem ser degradadas através da morte celular programada para que as folhas caiam (SAKAMOTO *et al.*, 2008). Assim, a queda das folhas de plantas que estão sob estresse hídrico representa uma das estratégias das plantas para evitar o consumo de água restante em suas células.

Diante do estresse hídrico, ocorrem diversas alterações bioquímicas e fisiológicas nas plantas. Tal como a produção excessiva de EROs, que em altas concentrações causam danos as membranas celulares, podendo culminar na morte da planta. Por outro lado, as plantas desempenham respostas para minimizar os efeitos adversos do estresse, como a produção de enzimas antioxidantes e/ou metabólitos que eliminam as EROs e auxiliam no ajustamento osmótico. As plantas sob condições de estresse, ainda empregam outros mecanismos para evitar a perda de água, aumentando a produção de fitoreguladores, como o ABA e o etileno.

#### **2.4.1 Potencial hídrico ( $\Psi_H$ )**

O potencial hídrico ( $\Psi_H$ ) de uma planta é composto pelo somatório de vários componentes de potenciais, conforme a seguinte equação:  $\Psi_H = \Psi_S + \Psi_P + \Psi_G + \Psi_M$  (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). O potencial de soluto ( $\Psi_S$ ) é ditado pelo número de partículas dissolvidas na água, assim, o  $\Psi_H$  diminui quando existe uma maior concentração de solutos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). De forma simplificada, o potencial de pressão ( $\Psi_P$ ) reflete as forças físicas exercidas na água pelo ambiente (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). Deste modo, quando a água é submetida a pressão negativa (tensão), o  $\Psi_P$  é menor que 0 MPa, e conseqüentemente o  $\Psi_H$  é diminuído (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). Por outro lado, o  $\Psi_H$  é aumentado quando há

uma pressão positiva (turgor) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). O potencial gravitacional ( $\Psi_G$ ) pode ter efeito substancial quando a água é transportada por longas distancias, de cinco a dez metros, mas esse componente pode ser omitido quando o transporte considerado é entre células ou em plantas pequenas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). O quarto componente, o potencial mátrico ( $\Psi_M$ ) explica como as superfícies sólidas (paredes celulares e coloides) interagem com a água, e diminuem o  $\Psi_H$  (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). No entanto, os valores de  $\Psi_M$  são pequenos e difíceis de mensurar, assim, o impacto do  $\Psi_M$  no  $\Psi_H$  da planta geralmente é ignorado (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001).

O  $\Psi_H$  é um parâmetro comumente utilizado para verificar o *status* hídrico das plantas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). Deste modo, a diferença de  $\Psi_H$  da planta e do solo determina a direção do fluxo de água, assim, a água move-se espontaneamente de regiões de alto  $\Psi_H$  para regiões adjacentes de baixo  $\Psi_H$  (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001). Portanto, plantas localizadas em regiões sazonalmente secas, normalmente reduzem seus  $\Psi_H$ , para evitar a perda de água. O potencial hídrico foliar ( $\Psi_{HF}$ ) pode ser medido utilizando uma câmara de pressão. Contudo, a validade do  $\Psi_{HF}$  como indicador do *status* hídrico de toda a planta é preciso, ao se avaliar o fluxo osmoticamente dirigido através das membranas celulares, e em plantas pequenas (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2001).

As plantas foram classificadas em duas categorias de acordo com a capacidade dos estômatos regularem o  $\Psi_{HF}$ : (a) iso-hídricas e (b) aniso-hídricas (MARTÍNEZ-VILALTA *et al.*, 2014). As iso-hídricas ajustam a sua abertura estomática de forma eficiente, enquanto as aniso-hídricas possuem um controle estomático menos rigoroso (MARTÍNEZ-VILALTA *et al.*, 2014). Tal dicotomia é utilizada para caracterizar estratégias de respostas a seca (VILALTA *et al.*, 2014). Contudo, a maioria das plantas flutuam entre esses dois comportamentos, desta forma levando a classificações inconsistentes (MARTÍNEZ-VILALTA *et al.*, 2014).

De modo geral, as respostas das plantas diante de condições de seca, são complexas e envolvem diversos ajustes em várias escalas organizacionais. Este fato, dificulta a classificação de estratégias das plantas em relação ao uso de água em condições de estresse hídrico.

#### **2.4.2 Mudanças na pigmentação em plantas sob estresse hídrico**

As clorofilas *a* e *b* são pigmentos fotossintetizantes, presentes na membrana dos tilacóides, nos cloroplastos das folhas, e em outros tecidos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2006). A abundância desses pigmentos varia de acordo com a espécie vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2006). Durante o processo fotossintético, tais pigmentos servem como um complexo antena, os quais absorvem luz e transferem a energia para os centros de reação, onde as reações químicas de oxidorredução culminam no armazenamento de energia a longo prazo (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Durante o estresse hídrico, uma série de reações bioquímicas produzem compostos que causam danos aos pigmentos fotossintetizantes, assim como às membranas dos tilacóides (ASHRAF; HARRIS, 2013). Desta forma, é esperado a redução da capacidade fotossintética das plantas sob condições de estresse hídrico (ASHRAF; HARRIS, 2013). Sob tais condições, comumente é observado a redução nos conteúdos de clorofilas (BIJANZADEH; EMAM, 2010; MAFAKHERI *et al.*, 2010; DIN *et al.*, 2011). Entretanto, alguns microrganismos presentes na porção de solo no entorno das raízes de plantas ou mesmo no seu interior, interagem positivamente com esses vegetais, induzindo maiores conteúdos de clorofilas (WANG *et al.*, 2012; ZULUETA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014; CAPPELLARI *et al.*, 2015). Porém, ainda não está totalmente claro se há uma proteção às moléculas de clorofila existentes ou se tais microrganismos induzem maior produção.

#### **2.5 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)**

As interações entre plantas e microrganismos são divididas basicamente em três grupos: (i) negativas; (ii) positivas, na qual os dois envolvidos se beneficiam por meio de uma relação dependente (simbiose) ou através de uma relação independente, em que os ambos ou apenas um dos envolvidos se beneficiam, porém sem prejudicar o outro (associação); e (iii) neutra, na qual nenhum dos indivíduos envolvidos na interação se beneficiam diretamente e nem é prejudicado (SINGH *et al.*, 2004).

Cooper (1959) em expedição aos campos agrícolas da antiga União Soviética constatou a inoculação de microrganismos não simbióticos em cerca de dez milhões de hectares, com excelentes resultados de produtividade. A partir desta publicação, aumentaram as possibilidades de pesquisas e aplicações práticas com inoculantes, a fim de intensificar a

produção agrícola, visto a avidez por alimento de um mundo em crescimento acelerado e fragilizado após o fim das duas guerras mundiais (SILVEIRA; FREITAS, 2007). Kavimandan e Gaur (1971) inocularam uma espécie bacteriana do gênero *Pseudomonas* em cultura de milho, assim como Merriman e colaboradores (1974) inocularam *Bacillus subtilis* em cereais e cenoura, ambas pesquisas obtiveram produtividade superiores dessas culturas alimentícias em relação as plantas não inoculadas. Além disso, Kloepper e Schroth (1978) ao inocularem bactérias da rizosfera de plantas de rabanetes verificaram o maior crescimento das mesmas comparadas ao controle, tanto em casa de vegetação quanto em campo, então designaram pela primeira vez o termo “Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs)”.

As RPCPs são representadas por um extenso grupo de bactérias que habitam a rizosfera e beneficiam o crescimento de plantas, através de uma relação associativa (SILVEIRA; FREITAS, 2007). Embora os rizóbios beneficiem plantas leguminosas através da fixação biológica de nitrogênio, convencionalmente não são incluídos no grupo de bactérias (RPCPs), pois apresentam uma relação simbiótica (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como organismos rizosféricos que coloniza principalmente a zona de alongação e os pêlos radiculares, algumas espécies podem ainda ser encontradas no interior das raízes (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). As espécies deste gênero podem ser consideradas universais à medida que apresentam uma ampla distribuição ecológica, colonizando plantas crescidas em diferentes habitats (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Estirpes de *Azospirillum* foram encontradas em associação com monocotiledôneas, tal como: milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras como *Digitaria*, as quais foram inicialmente denominadas *Spirillum lipoferum* por Dobereiner e Day (1976), e de acordo com Rozier e colaboradores (2016) essas espécies ainda são consideradas RPCP. Estirpes de *Azospirillum* também foram encontradas em associação com dicotiledôneas (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Atualmente, esse gênero é representado por 12 espécies, sendo algumas: *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. doebereinae*, *A. irakense* e *A. lipoferum* (PEREG; DE-BASHAN; BASHAN, 2016).

Pereg; De-Bashan e Bashan (2016) realizaram um levantamento dos efeitos em diversas culturas promovidos pela inoculação da RPCP *Azospirillum lipoferum* (Tab. 1).

**Tabela 1.** Efeitos da inoculação de *Azospirillum lipoferum* em diferentes espécies de plantas.

Tipo de planta	Espécie de planta	Condições de estudo	Efeitos na planta	País	Referência
Graminaceae	Diferentes cereais	Casa de vegetação	Aumento do crescimento e	Brasil, Israel,	BASHAN E BLEVANONY,

**Tabela 1.** Efeitos da inoculação de *Azospirillum lipoferum* em diferentes espécies de plantas.

		e campo	assimilação de minerais	USA, France, México Argentina	1987; OKON E LABANDERA-GONZALEZ 1994; DOBBELAERE <i>et al.</i> , 2001; BASHAN <i>et al.</i> , 2004; BELIMOV <i>et al.</i> , 2004
Erva daninha	Milheto ( <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R.Br.)	Culturas em vaso	Aumento da germinação, vigor da plântula, altura da planta e peso da semente	Coréia	POONGGUZHALI <i>et al.</i> , 2005
Legumes	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Casa de vegetação	Aumento do crescimento, proteção contra patógenos	Israel	BASHAN, 1998; BASHAN E VAZQUEZ, 2000.
	Tomate	Culturas em vaso	Aumento da assimilação de N	México	ESQUIVEL-COTE <i>et al.</i> , 2010
	Funcho ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	Campo	Aumento do crescimento	Egito	MAHFOUZ E SHARAF-ELDIN 2007
	Mostarda ( <i>Brassica juncea</i> (L.) Coss.)	Campo	Aumento do crescimento e assimilação de N	Índia	SAHA <i>et al.</i> , 1985; KESAVA RAO <i>et al.</i> , 1990; GAMO E AHN, 1991
Culturas industriais	Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	Casa de vegetação	Aumento do crescimento	França	FAGES AND ARSAC, 1991
	Oil palm ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	Estufa e campo	Aumento do crescimento e assimilação de N	Malásia	AMIR <i>et al.</i> 2001, 2005
Grãos (não cereais)	Grão de bico	Estufa	Aumento do crescimento, assimilação de nutrientes e aumento de	Egito	EL-MOKADEM <i>et al.</i> , 1989

**Tabela 1.** Efeitos da inoculação de *Azospirillum lipoferum* em diferentes espécies de plantas.

Amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	Campo	nodulação Aumento de nodulação e conteúdo de N	Índia	RAVERKAR E KONDE 1988
---	-------	--	-------	--------------------------

Fonte: Adaptado de PEREG; DE-BASHAN; BASHAN, 2016.

## 2.6 Mecanismos de ação de RPCPs

Cada espécie de RPCPs pode apresentar um ou mais mecanismos, diretos e/ou indiretos, de promoção do crescimento de vegetais. Esses mecanismos desempenham fundamentalmente três funções: bioproteção, biofertilização e bioestimulação (FIGUEIREDO, 2010). São atribuídas características de bioproteção às RPCPs quando essas auxiliam na eliminação de doenças e/ou patógenos nas plantas (SHAIKH; SAYYED; REDDY, 2016), enquanto a biofertilização relaciona-se como o aumento na aquisição de nutrientes e finalmente a bioestimulação consiste na indução de produção de fitormônios (FIGUEIREDO, 2010).

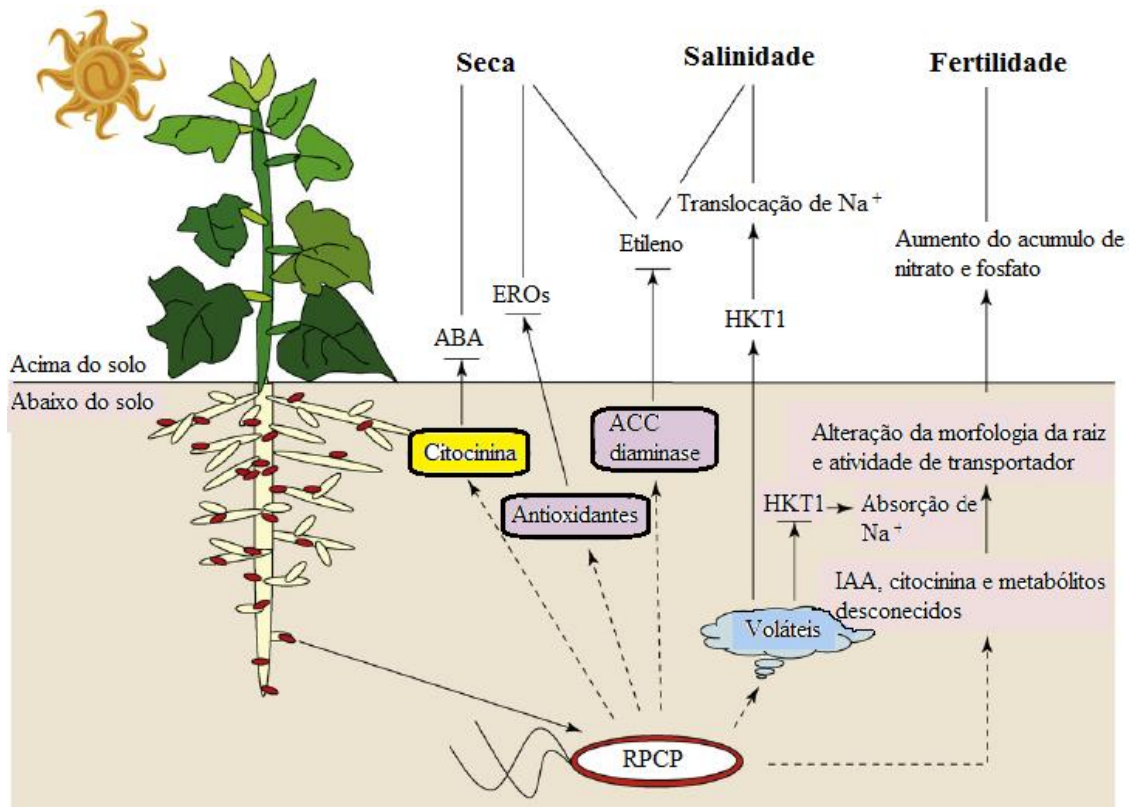
De acordo com Yang e colaboradores (2009) as RPCPs representam uma alternativa para as plantas tolerarem estresses abióticos, tais como a seca, alta salinidade e baixa fertilidade. Desta forma a RPCP provoca nas plantas a denominada resistência sistêmica induzida (RSI) ou, de acordo com Yang e colaboradores (2009), a tolerância sistêmica induzida (TSI), através do aumento da capacidade física e da parede celular, assim como alterações de reações bioquímicas e fisiológicas da planta (SHAIKH; SAYYED; REDDY 2016).

Durante o estresse hídrico, ocorre um aumento na concentração de ácido abscísico (ABA), que inibe o crescimento e a abertura estomática. A curto prazo, o fechamento dos estômatos pode ser benéfico por impedir a perda de água (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Algumas espécies de RPCPs podem produzir citocinina, que possivelmente afeta a sinalização do ABA, assim diminuindo a produção de ABA, ao passo que compartilham a mesma origem biossintética (Fig. 7) (Figueiredo *et al.*, 2008). Além disso, outras espécies de RPCP produzem antioxidantes como catalase que eliminam as EROs (Fig. 7) (KOHLENER *et al.*, 2008).

O etileno do mesmo modo que as EROs e o ABA em altas concentrações pode representar danos às plantas, provocando a abscisão foliar e morte celular, neste sentido as

RPCPs degradam o precursor do etileno, aminociclopropano carboxilato diaminase (ACC), pela ação da enzima ACC diaminase bacteriana, assim evitando a queda de folhas (Fig. 7) (KOHLER *et al.*, 2008; MAYAK *et al.*, 2004).

Um dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelas RPCPs diminui a expressão do gene transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidade 1 (HKT1), que regula os níveis de sódio (Na) na parte aérea e na recirculação em toda a planta sob alta salinidade (Fig. 7) (ZHANG *et al.*, 2008). As RPCPs produzem ácido indolacético e metabólitos desconhecidos podem promover aumento do comprimento das raízes, bem como a área superficial das raízes, conseqüentemente melhorando a captação de nitrato e fósforo (Fig. 7) (GYANESHWAR *et al.*, 2002; MANTELIN; TOURAINE, 2004; ADESEMOYE *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Tolerância Sistêmica Induzida (TSI) por RPCPs contra a seca, a salinidade e baixa fertilidade. (YANG; KLOEPPER; RYU 2009).

As plantas estão frequentemente expostas às condições ambientais adversas, tal como a seca, salinidade e baixa fertilidade do solo. Tais condições representam barreiras para o crescimento e desenvolvimento das plantas, alterando seu metabolismo fisiológico. Neste contexto, diferentes espécies de RPCPs podem se associarem às plantas, e empregarem um ou mais mecanismos de ação que minimizem os danos oxidativos e/ou regularem a ação de fitohormônios. Contudo, ainda não estão bem estabelecidos as vias sinalizações de tais mecanismos realizados pelas RPCPs.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta de sementes**

O experimento foi conduzido nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PGPV), na Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram utilizadas sementes de uma árvore matriz de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) localizada a 07°54'37.0"S e 38°17'58.5"W, coletadas no dia 30 de outubro de 2016 na Unidade de Conservação Estadual Parque Estadual da Mata da Pimenteira (Decreto N. 37.823/2012), Serra Talhada – PE.

#### **3.2 Preparo de semente e do substrato**

As sementes foram beneficiadas, eliminando as impurezas (inflorescências e galhos) e acondicionadas em sacos de papel e envoltos em saco plásticos e mantidas à 4 °C e umidade relativa (UR) de 30%. A temperatura e UR foram monitoradas com termohigrômetro (Incoterm) por 90 dias.

Foram selecionadas sementes com diâmetro aproximado a 5 mm, utilizando peneira granulométrica redonda com abertura nominal N° 4, normalizada com 4,75 mm. Em seguida, foram sanitizadas superficialmente em álcool etílico a 70% (vol./vol.) por 30 segundos, na sequência em hipoclorito de sódio a 1,3% (vol./vol.) por quatro minutos e por fim três lavagens com água destilada esterilizada (VAIN *et al.*, 2008).

O substrato utilizado para a germinação das sementes foi a mistura de areia lavada e vermiculita (1:1, vol./vol.), esterilizado em Autoclave Vertical AV (Phoenix) por 1 hora, à temperatura de 120° C, a 101 kPa.

#### **3.3 Preparo e inoculação com *Azospirillum lipoferum* (BR-11080)**

A produção do inoculante foi realizada com amostra da *A. lipoferum* (BR-11080), a qual foi repicada e crescida em meio caldo nutriente (5 g de cloreto de sódio, 1,5 g de extrato de carne, 1,5 g de extrato de levedura), por 48 horas a temperatura ambiente, aproximadamente a 28°C, sob agitação (agitador magnético – TECNAL, TE-0851). A suspensão bacteriana foi centrifugada (Hettich - MIKRO 220/220R) à 10.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 20 mL de água destilada esterilizada para ressuspensão do precipitado. Procedeu-se a leitura de densidade óptica (DO)

das soluções, no espectrofotômetro (Biochrom Libra S70), ajustando-as pela adição de água destilada esterilizada até DO próxima de 1,0 mm a 535 nm, indicando a presença de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)  $\text{mL}^{-1}$  de solução (KUSS *et al.*, 2007).

A inoculação foi realizada por meio do contato das sementes, previamente desinfestadas, com a suspensão da *A. lipoferum* ajustada à  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , em placa de Petri durante duas horas. Enquanto as que não receberam inoculação (controle) ficaram em contato com água destilada esterilizada por igual período. Posteriormente foram semeadas no substrato.

### **3.4 Semeadura e crescimento de *Myracrodouon urundeuva***

Foram utilizados 24 vasos de 0,9 L, perfurados e sanitizados, e com as dimensões de 10,5 cm de altura, 13 e 9 cm de diâmetro superior e inferior, respectivamente. Foram preenchidos com 1,2 kg de substrato, em seguida irrigados com água destilada e esterilizada, até 100 % da capacidade de campo (CC), representado pelo volume de água retida pelo solo após sofrer saturação e o cessamento da drenagem (SOUZA *et al.*, 2000).

As sementes não inoculadas (controle) e inoculadas com *Azospirillum lipoferum* foram semeadas e conduzidas para câmara de crescimento climatizada (Fitotron – SGC 120), sob as seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas à 28 °C e 12 horas no escuro à 26 °C; Umidade Relativa constante de 50%; intensidade luminosa  $450 \mu\text{mol}$  de fóton  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante 81 dias.

A semeadura foi realizada no dia 30 de janeiro de 2016, a germinação ocorreu após três dias da semeadura. Após sete dias foi repostos a cada 48 horas volumes de água correspondentes à 100, 75, 50 e 25% da CC, totalizando lâminas de 180mm 135, 90 e 45 mm, respectivamente, ao fim de 81 dias. As plantas foram regadas com a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), a cada sete dias (BOGINO *et al.*, 2006). A lamina de irrigação de 180 mm foi considerada controle, 135 e 90 mm foram consideradas estresse moderado e 45 mm estresse severo.

As plantas de *M. urundeuva* permaneceram na câmara de crescimento de plantas climatizada por 81 dias. Os 81 dias foram compostos por três dias até o início da germinação, em seguida, sete dias até o início da aplicação das lâminas de irrigação, e por fim 71 dias de aplicação dessas lâminas. Ao final dos 81 dias foi realizada a confirmação da inoculação, e posteriormente, foram procedidas as análises biométricas, físico-químicas e bioquímicas.

### 3.5 Confirmação da inoculação com *Azospirillum lipoferum* (BR-11080)

A confirmação da inoculação foi realizada utilizando o meio de cultura azul de bromotimol isento de nitrogênio (NFB) semissólido (Sacarose: 10 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,6 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>: 0,20 g L<sup>-1</sup>, NaCl: 0,2 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,1 g L<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub>: 2,0 g L<sup>-1</sup>, pH 6.8, 2,0 ml de solução de azul de bromotimol à 0.5%). Esse meio de cultura é seletivo para crescimento *Azospirillum* spp.

As plantas foram retiradas dos vasos e o substrato aderido às raízes foi lavado com água destilada e esterilizada, e acondicionada em potes plásticos estéreis. Posteriormente, alíquotas de 1 mL de água proveniente da lavagem das raízes foram distribuídas em frascos de penicilina contendo o meio de cultura NFB semissólido. Em seguida, estes frascos foram incubados na BOD à 30 °C por quatro dias. Após o período de incubação a mudança de cor do meio NFB de verde amarelado para azul, indicou a presença de *Azospirillum* spp. (RAMANATHAN; RAMA; DHAMAYANTHI, 2015).

### 3.6 Análise biométricas

Foram mensurados a altura da parte aérea das plantas (ALT), do colo até a gema apical, comprimento da raiz e diâmetro do coleto (DIAM), com o auxílio de um paquímetro digital (Stainless Hardened).

A área foliar foi determinada a partir da digitalização dos folíolos, de cada parcela, em um “scanner” comercial e a imagem gerada foi processada por meio do software “Leaf Area FOR Everyone (C) by Veiko Lehsten” (“LAFore”) (LEHSEN, 2002).

Uma planta de cada tratamento, parte aérea e raízes, foram mantidas em estufa de circulação forçada de ar à 60 °C por 72 horas, até atingirem a massa constante, para quantificação da massa seca.

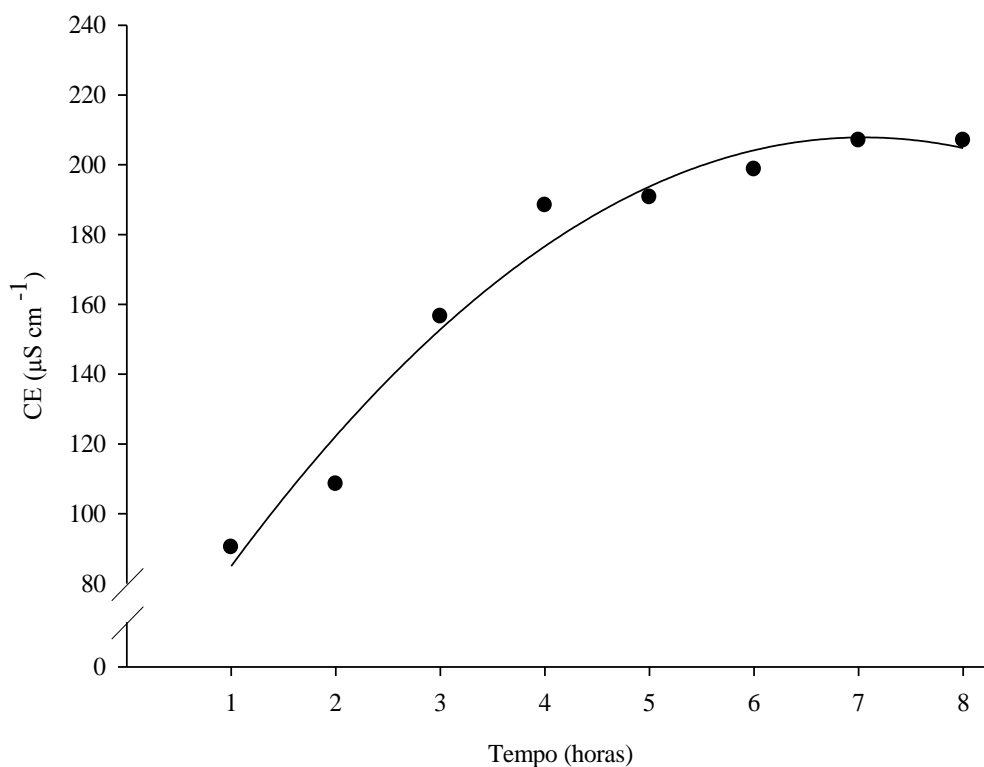
### 3.7 Análises físico-químicas

#### 3.7.1 Potencial hídrico foliar ( $\Psi_{HF}$ )

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_{HF}$ ) foi medido às 08 h da manhã em uma planta de cada tratamento, utilizando-se o terceiro ramo com folíolos completamente expandidos, mas não senescentes. Foi utilizado câmara de pressão Scholander (Modelo 3005F01), com capacidade de pressão de 100 bares (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

### 3.7.2 Extravasamento de eletrólitos

O dano de membrana foi determinado por meio do extravasamento de eletrólitos, de acordo com Shanahan e colaboradores (1990). Foram coletados discos foliares, com 10 mm de diâmetro, que foram imersos em tubos de ensaio contendo água deionizada, em seguida foram incubados a 30 °C por oito horas e determinada a condutividade elétrica (C1) (Fig. 8).



**Figura 8.** Curva do tempo de estabilização do extravasamento de eletrólitos, pela condutividade elétrica (C1) do meio líquido, de tecidos foliares de *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) A.C. Serra Talhada, PE, UFRPE-UAST, 2017.

Finalmente, o dano de membrana (DM) foi estimado utilizando a fórmula:  $DM = (C1 \div C2) \times 100$ . Onde, a condutividade elétrica (C2) foi medida após as amostras serem submetidas a 100 °C durante 1 h.

### 3.8 Análise bioquímicas

Foram coletadas quantidade de folíolos com aproximadamente três gramas de massa fresca, e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram mantidas em ultrafreezer – 80 °C, até o início das análises.

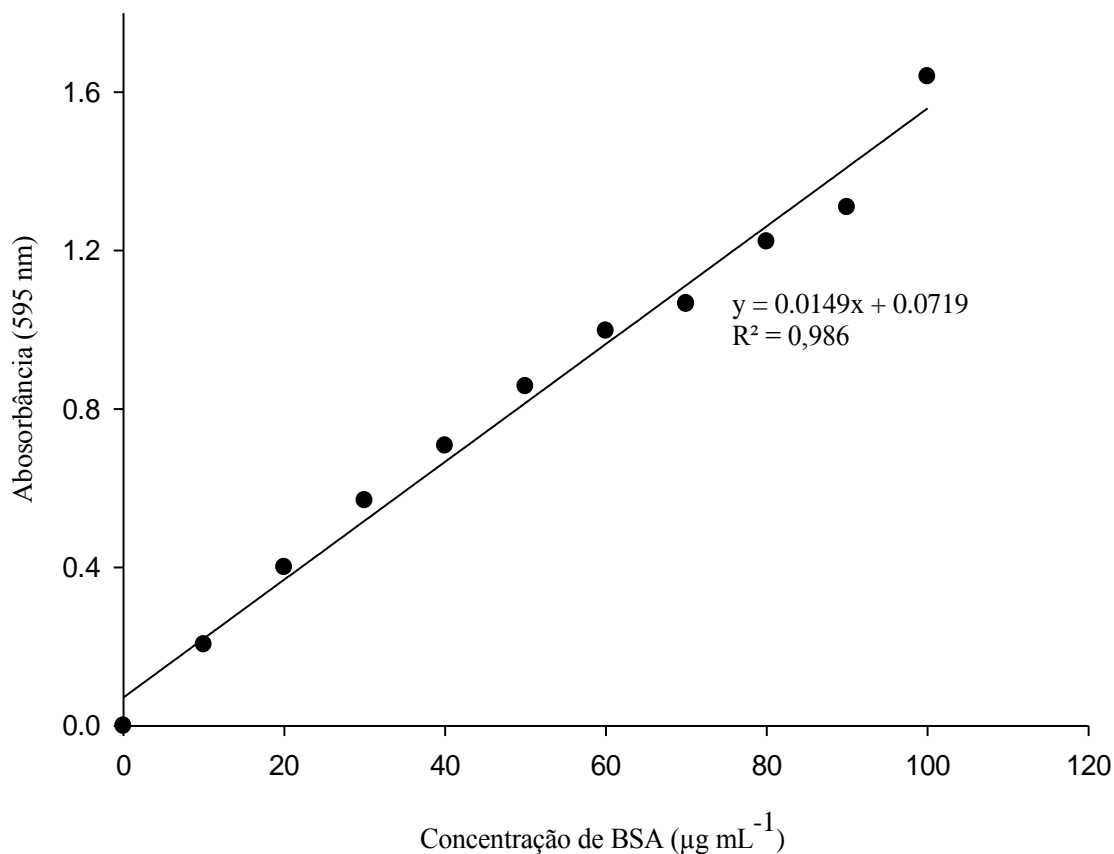
#### 3.8.1 Teor de proteína solúveis totais

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam *et al.* (2006), com modificações. Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz com a N<sub>2</sub> líquido, em seguida foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0).

O conteúdo de proteínas solúveis foi mensurado conforme Bradford (1976) e quantificado com base em curva padrão de (BSA) (Tab. 2 e Fig. 9).

**Tabela 2.** Solução padrão de Bovine Serum Albumin, Água destilada, volume final e concentração final para a confecção curva de calibração, Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2017.

BSA (µL)	H <sub>2</sub> O destilada (µL)	Vol. final (µL)	Conc. Final BSA (µg 100µL <sup>-1</sup> )
0	1000	1000	0
100	900	1000	10
200	800	1000	20
300	700	1000	30
400	600	1000	40
500	500	1000	50
600	400	1000	60
700	300	1000	70
800	200	1000	80
900	100	1000	90
1000	0	1000	100



**Figura 9.** Absorbância a 595 nm em função da concentração de BSA (Bovine Serum Albumin) para a curva de calibração. Serra Talhada, PE, UFRPE-UAST, 2017.

### 3.8.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada segundo metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977).

Alíquotas de 0,1 ml do extrato proteico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75  $\mu\text{M}$  de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats ( $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), durante seis minutos. A reação foi

interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm.

A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). A atividade foi expressa em U.A.  $\text{g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$ .

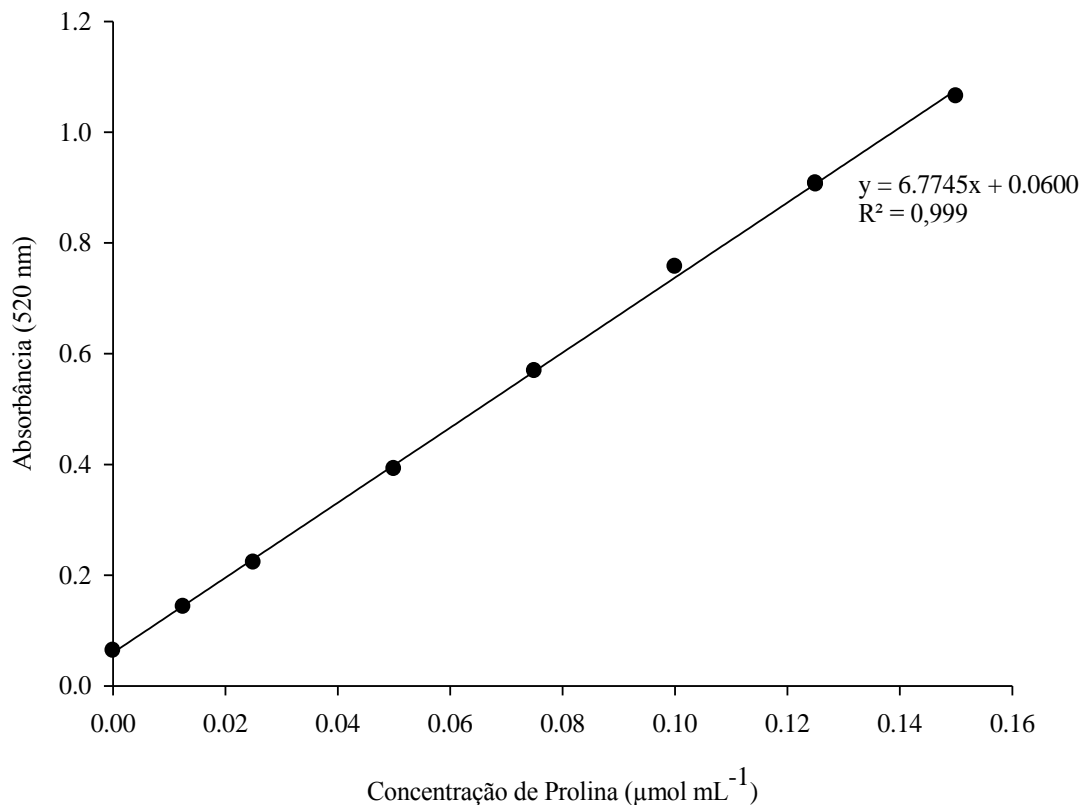
### 3.8.3 Conteúdo de prolina

O conteúdo de prolina foi mensurado com o método da ninhidrina ácida (BATES *et al.*, 1973). Foram pesados 20 mg de tecido foliar fresco e imersos em tubos de ensaio contendo 10 mL de água deionizada, em seguida foram aquecidos à 100 °C em banho maria (TECNAL – TE 056 mag) por uma hora. Alíquotas de 1 mL de extrato foram transferidas para tubos rosqueados e acrescidos 1 mL do reagente de ninhidrina ácida, 1 mL de ácido acético glacial e agitados vigorosamente em agitador (PHOENIX, AP 56). Em seguida, os tubos foram levados novamente ao banho maria à 100 °C por 1 hora e na sequência colocados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente. Por fim, foram acrescidos 2 mL de tolueno P.A. e agitados vigorosamente por 15 segundos.

As leituras foram feitas à 520 nm no espectrofotômetro. O conteúdo de prolina foi quantificado com base na curva padrão de L-prolina (Tab. 3 e Fig. 10).

**Tabela 3.** Solução padrão de L-Prolina, solução estoque, água destilada, volume final e concentração final para a confecção curva de calibração, Serra Talhada-PE, UFRPE/UAST, 2017.

Vol. do estoque ( $\mu\text{L}$ )	Vol. $\text{H}_2\text{O}$ destilada ( $\mu\text{L}$ )	Vol. final ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )
0	4000	4000	0
50	3950	4000	0,0125
100	3900	4000	0,025
200	3800	4000	0,05
300	3700	4000	0,075
400	3600	4000	0,1
500	3500	4000	0,125
600	3400	4000	0,15



**Figura 10.** Absorbância a 520 nm em função da concentração de L-Prolina para a curva de calibração. Serra Talhada, PE, UFRPE-UAST, 2017.

### 3.8.4 Teor de clorofilas

Os teores de clorofila *a*, *b* e total foram quantificados de acordo com Lichtenthaler e Buschmann (2001). Foram macerados 80 mg de folíolos em 2 mL de acetona (80 %) com pequena adição  $\text{CaCO}_3$ . O macerado foi filtrado e lido em espectrofotômetro (biochrom) a 645, 652 e 663 nm.

Além disso, foi registrada uma absorbância não específica de 710 nm, a qual clorofila *a*, *b* e totais não absorvem, para correção de cor, turbidez, e os compostos contaminantes (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).



### 3.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e ao teste de homocedasticidade (Bartlett).

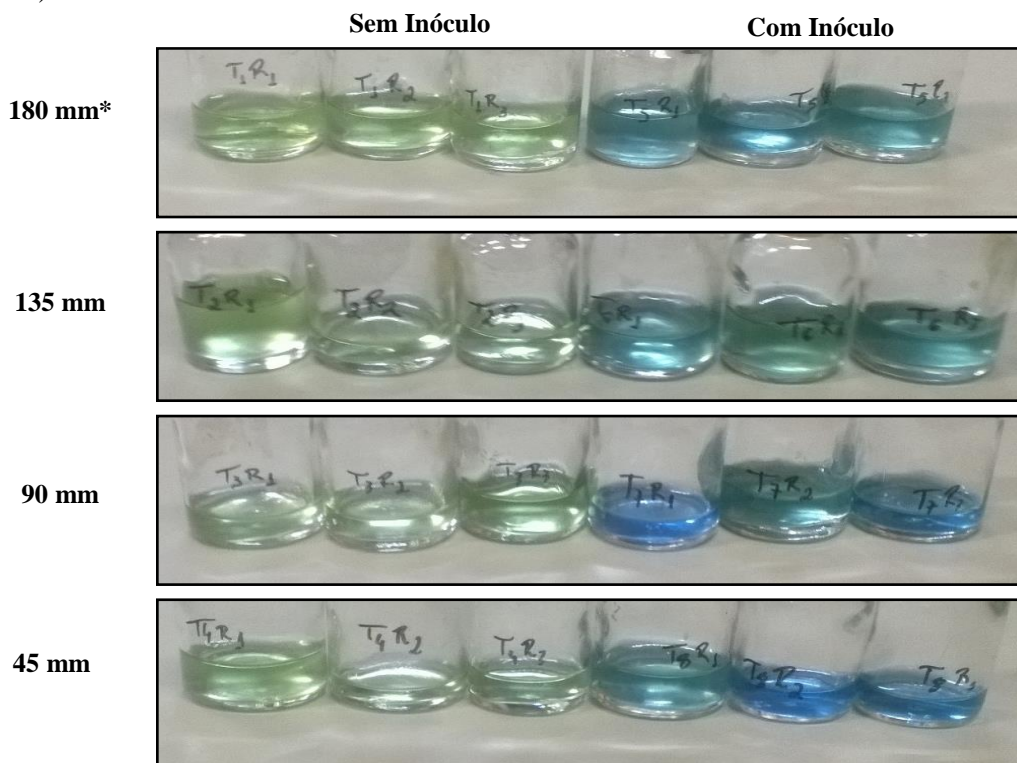
O experimento foi executado em delineamento inteiramente casualizado e as análises de variância e regressão foram efetuadas em esquema fatorial 2 x 4 (com e sem inóculo x quatro lâminas de irrigação), desta forma foram obtidos oito tratamentos, com três repetições.

No total do experimento foram obtidas 24 parcelas (vasos). As médias  $\pm$  desvio padrão foram comparadas pelo teste da diferença mínima significativa (least significant difference (LSD) test) com  $P < 0.05$ . Os testes estatísticos foram realizados pelo pacotes ExpDes e Agricolae do software R ([www.R-project.org](http://www.R-project.org)) versão 3.0.2. Os gráficos foram gerados por meio do software Sigma Plot versão 12.

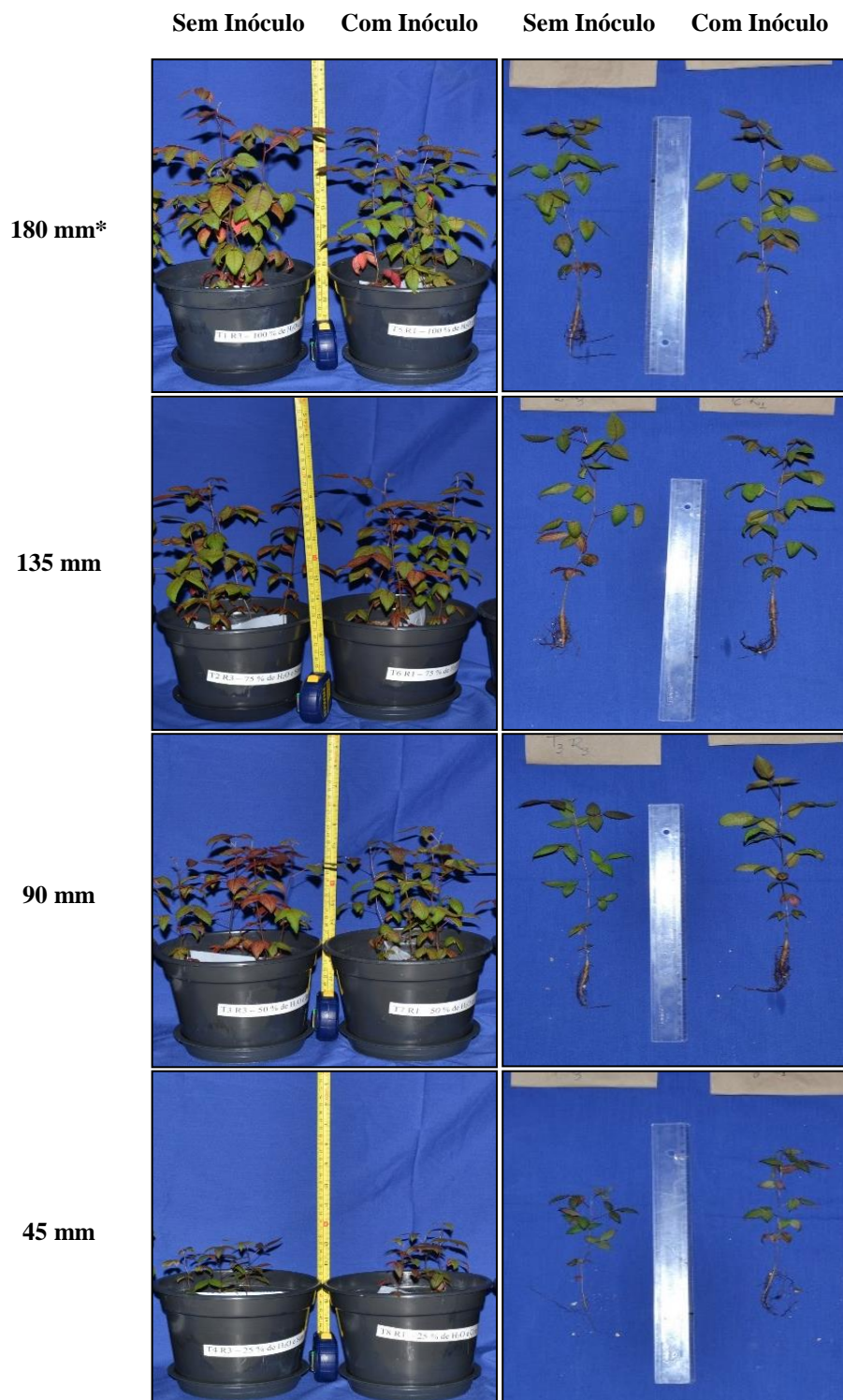
## 4. RESULTADOS

A eficiência da colonização da Rizobactéria Promotora do Crescimento de Plantas (RPCP), *Azospirillum lipoferum*, foi evidenciada pela mudança da coloração do meio de cultura NFB, de verde amarelado para azul, nas plantas de *Myracrodruon urundeuva* que passaram pelo processo de inoculação (Fig. 11). Enquanto as plantas que não foram inoculadas, a coloração do meio NFB permaneceu inalterada (Fig. 11).

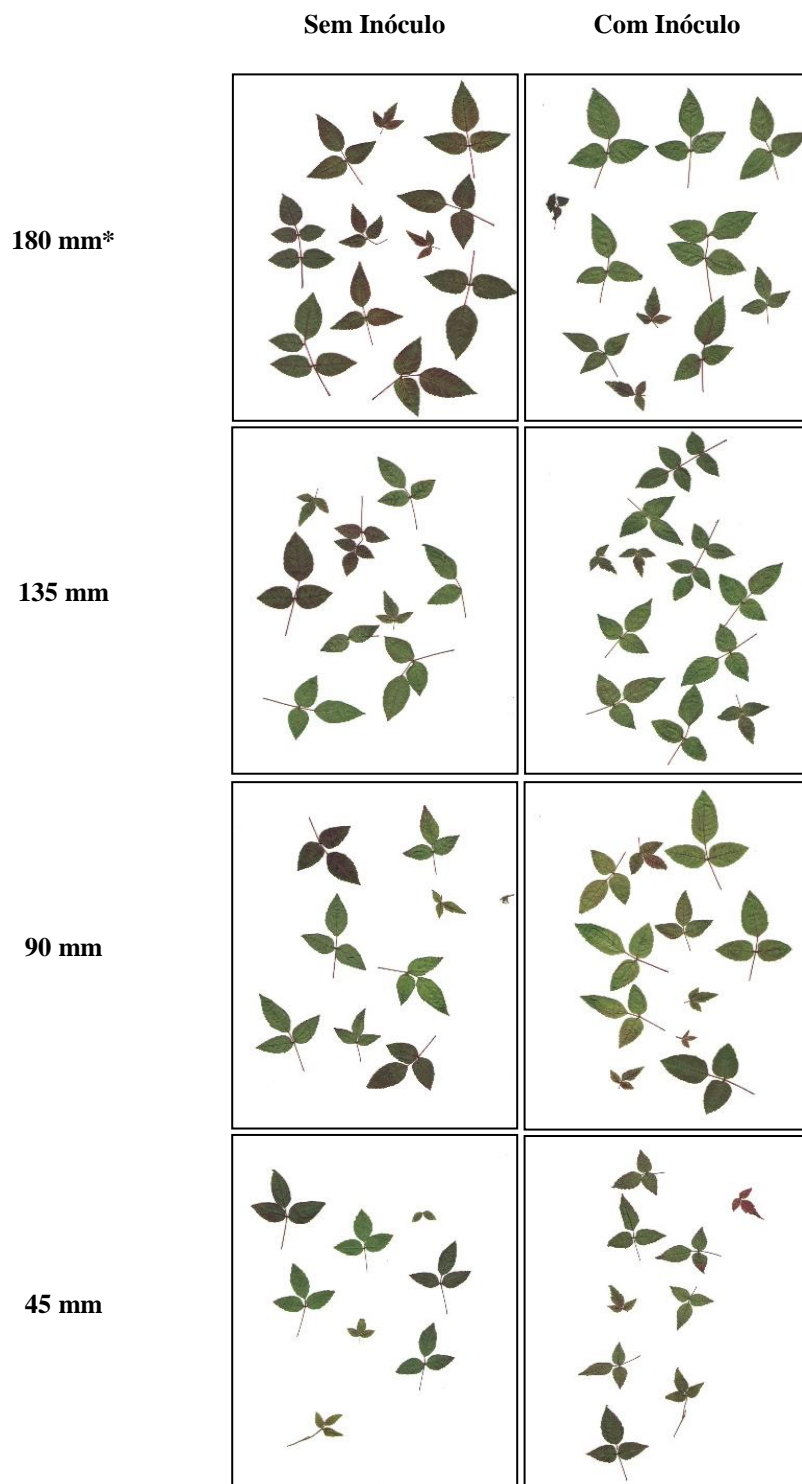
Todas plantas apresentaram uma pequena diminuição da altura em relação ao controle, em torno de 1,10 cm, quando se reduziu a lâmina de irrigação de 180 para 135 mm (Fig. 12). Enquanto, nas lâminas de 135 para 90 mm e 90 para 45 mm, as reduções médias foram relativamente proporcionais, aproximadamente 3,0 cm (Fig. 12). Por outro lado, aparentemente, as plantas com e sem inóculo não apresentaram diferenças visuais perceptíveis (Fig. 12). Porém, as plantas que foram inoculadas mantiveram maior número de folíolos com tonalidade verde, enquanto as plantas não inoculadas apresentaram maior quantidade de folíolos com tonalidade roxa (Fig. 13). Além disso, observou-se que a redução nos níveis de irrigação, resultou em menor número de folíolos com tom roxo para as plantas sem inóculo (Fig. 13).



**Figura 11.** Meio de cultura NFB semisólido com adição de alíquotas de água destilada esterilizada, utilizadas na lavagem do substrato rizosférico de plantas de *Myracrodruon urundeuva*, aos 81 dias, sem e com inóculo (*Azospirillum lipoferum*), sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). \*mm: milímetro.

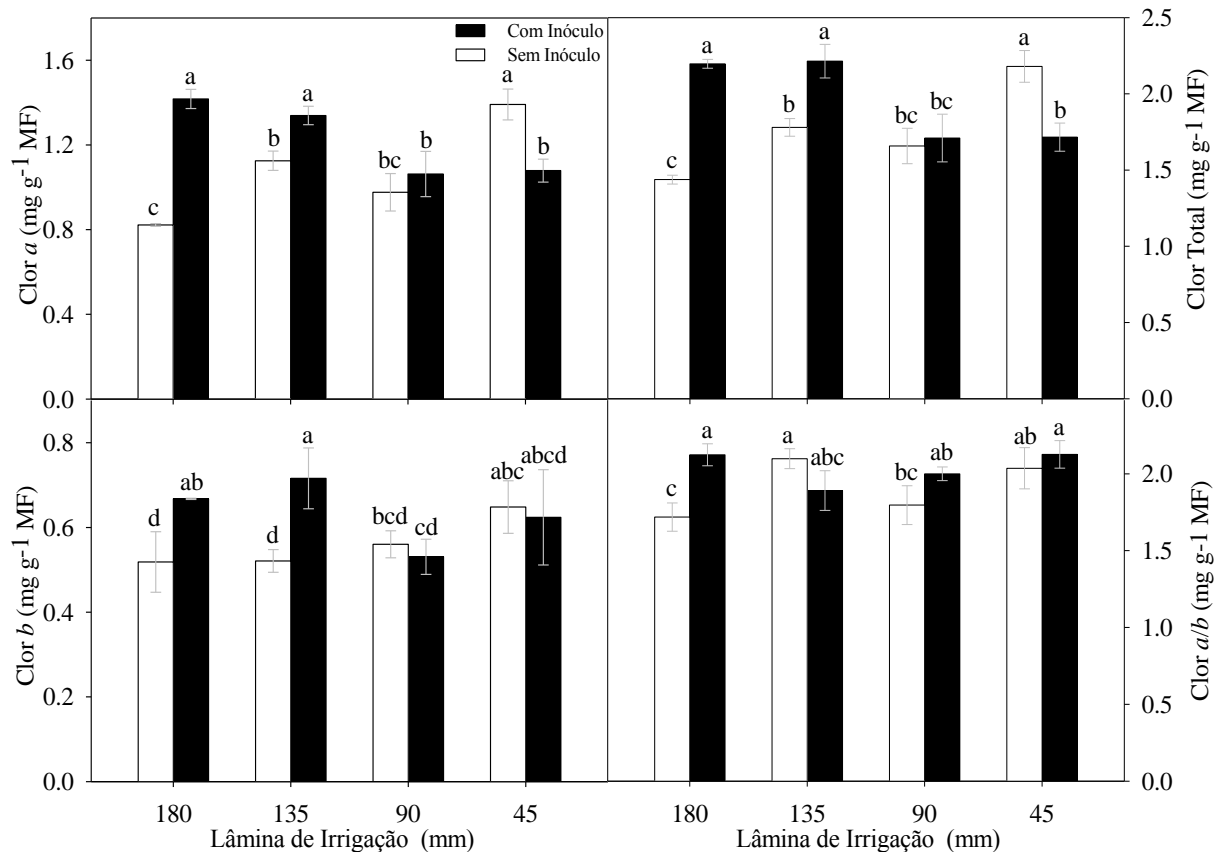


**Figura 12.** Plantas jovens de *Myracrodouon urundeuva* sem e com inóculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm), cultivadas em vasos de 1,2 kg aos 81 dias após germinação, submetidas às seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas à 28 °C e 12 horas no escuro à 26 °C; Umidade Relativa constante de 50%; intensidade luminosa 450  $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . mm\*: mil\u00edmetro.



**Figura 13.** Folíolos de *Myracrodouon urundeuva* sem e com inóculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Coleta realizada aos 81 dias nas seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas à 28 °C e 12 horas no escuro à 26 °C; Umidade Relativa constante de 50%; intensidade luminosa 450  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . mm\*: milímetro.

Os teores de clorofila *a*, *b* foram significativamente superiores nos folíolos das plantas que foram inoculadas e irrigadas com 180 e 135 mm em relação ao controle (Fig. 14 A, B). Isso resultou no aumento de clorofilas totais, nas lâminas de 180 e 135 mm, e na razão *a/b* apenas na irrigação máxima (180 mm) (Fig. 14 C e D). Em contrapartida, a inoculação não manteve os teores de clorofila *a*, *b*, totais e razão *a/b* superiores ao controle na restrição hídrica máxima (45 mm).



**Figura 14.** Clorofila *a* (A), *b* (B), total (C) e razão clorofila *a/b* (D) de plantas de *Myracrodouon urundeuva*, com e sem inoculação (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em  $P \leq 0.05$ .

À medida que se diminuiu as lâminas de irrigação, o número de folíolos caídos foi menor para as plantas não inoculadas (Tabela 4). Por outro lado, as plantas inoculadas apresentaram, nitidamente, menores porcentagens de folíolos caídos, além de manter todos os folíolos na lâmina de irrigação máxima, 180 mm (Tabela 4).

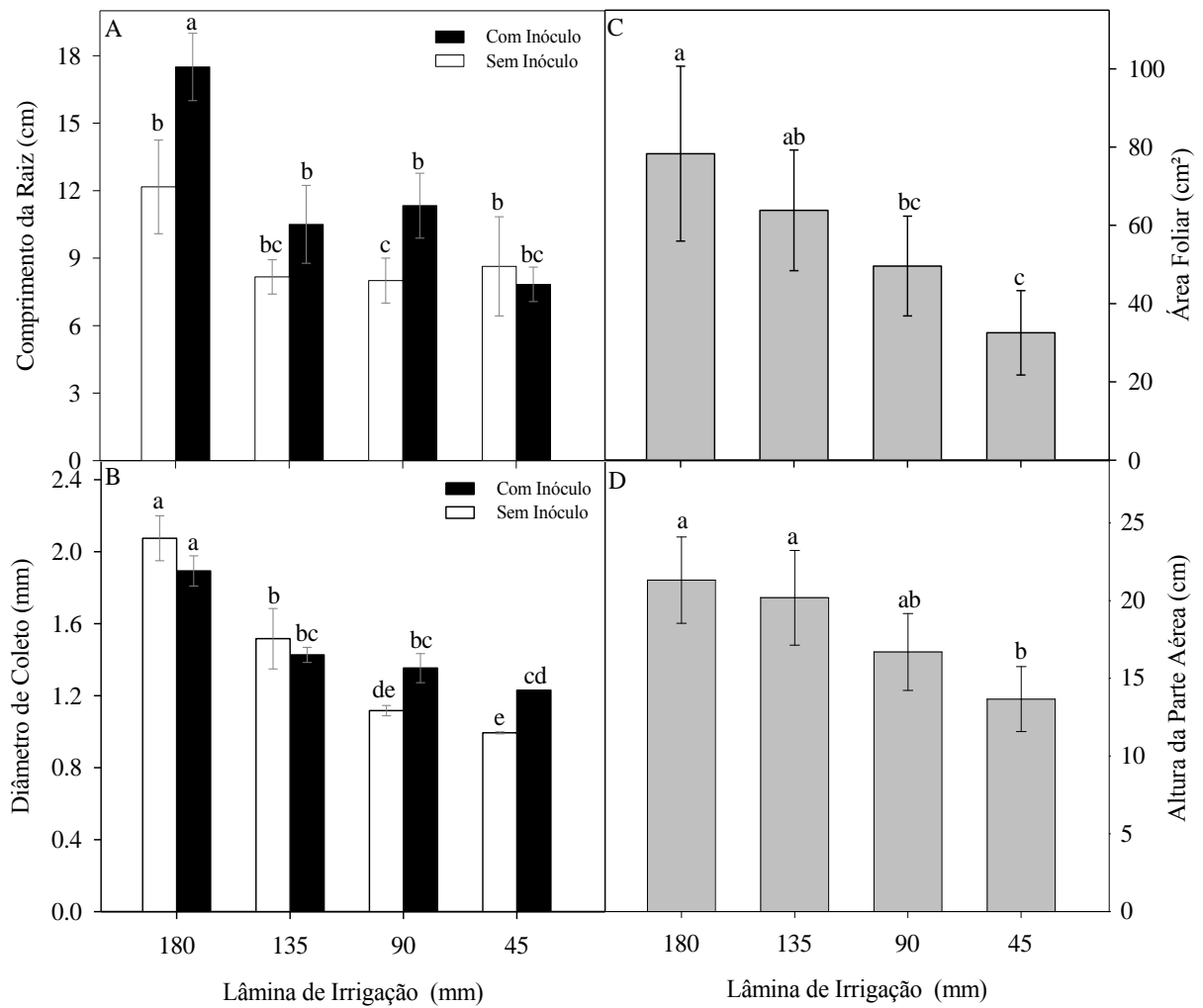
**Tabela 4.** Porcentagem de folíolos caídos de plantas de *Myracroduton urundeuva* com e sem inoculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro níveis de irrigação (45, 90, 135 e 180 mm).

*mm	Folíolos caídos (%)	
	Sem Inóculo	Com Inóculo
<b>180</b>	6,39 ± a	0 ± d
<b>135</b>	3,66 ± b	2,70 ± bc
<b>90</b>	2,15 ± c	2,07 ± bc
<b>45</b>	2,30 ± bc	1,88 ± c

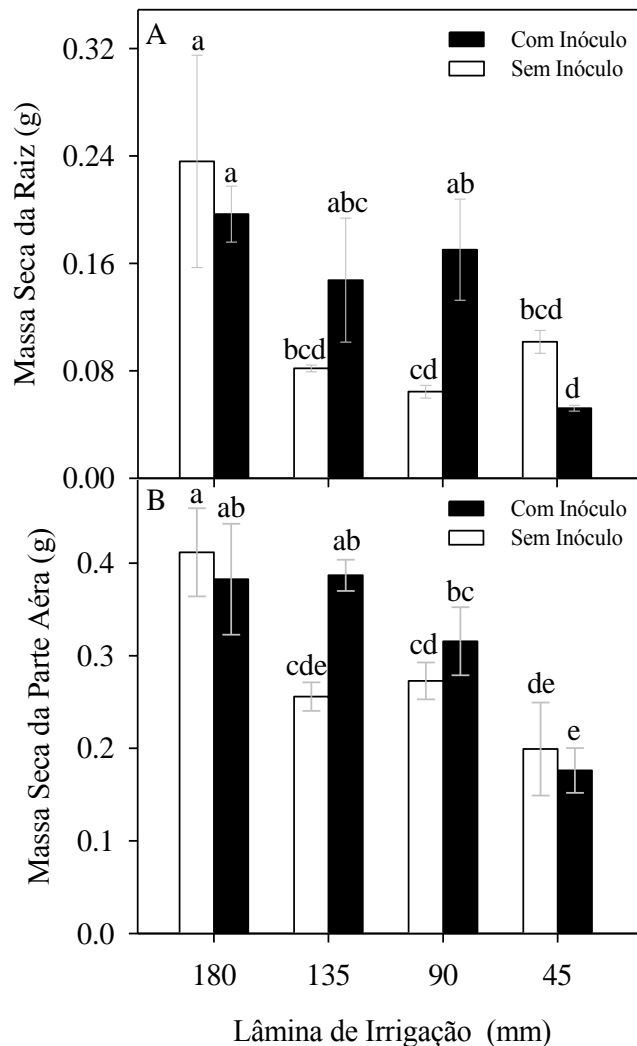
\*mm: milímetro. Médias ± desvio padrão. Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em  $P \leq 0.05$ .

As plantas que foram inoculadas apresentaram comprimentos de raízes significativamente superiores às não inoculadas, com aumentos significantes na ordem de 30%, nas lâminas de irrigação de 90 e 180 mm (Fig. 15 A). Adicionalmente, o crescimento das raízes foi máximo quando as plantas inoculadas foram irrigadas com a lâmina de 180 mm (Fig. 15 A). Conseqüentemente, a massa seca da raiz foi significativamente maior com a inoculação, em torno de 50 %, para as plantas irrigadas com 90 mm (Fig. 16 A).

A parte aérea das plantas inoculadas apresentaram diâmetro de coletos significativamente maiores, cerca de 13%, quando irrigadas com 45 e 90 mm (Fig. 15 B). Ainda na parte aérea, a altura da planta e a área foliar não foram influenciadas significativamente com a inoculação da RPCP (Fig. 15 C e D). Por outro lado, diminuições nas lâminas de irrigação resultaram em decréscimos gradativos dessas medidas (Fig. 15 C e D). Ademais, a massa seca da parte aérea foi significativamente maior com a inoculação, em torno de 34%, para as plantas irrigadas com 135 mm (Fig. 16 B).



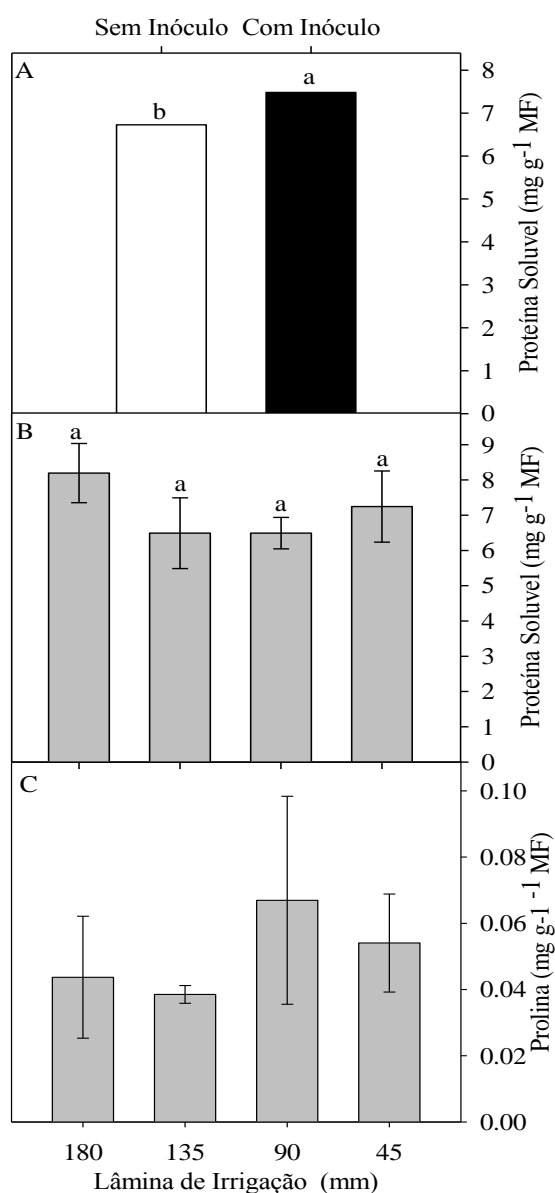
**Figura 15.** Comprimento da raiz (A), diâmetro de coleto (B), área foliar (C) e altura da parte aérea (D) de plantas de *Myracrodon urundeuva*, com e sem inóculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro níveis de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em  $P \leq 0.05$ .



**Figura 16.** Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (B) de plantas de *Myracrodouon urundeuva*, com e sem inóculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em  $P \leq 0.05$ .

O teor de proteínas solúveis foi superior em 10% nas plantas inoculadas em relação ao controle (Fig. 17 A). Além disso, embora a quantidade de água fornecida para as plantas também foi significativa para o conteúdo de proteína solúvel, os conteúdos médios mantiveram-se estatisticamente iguais em todas as lâminas de irrigação (Fig. 17 B). Ademais, as lâminas de irrigação aplicadas e o processo de inoculação não foram significativos para o conteúdo de prolina nas plantas de *M. urundeuva* (Fig. 17 C).

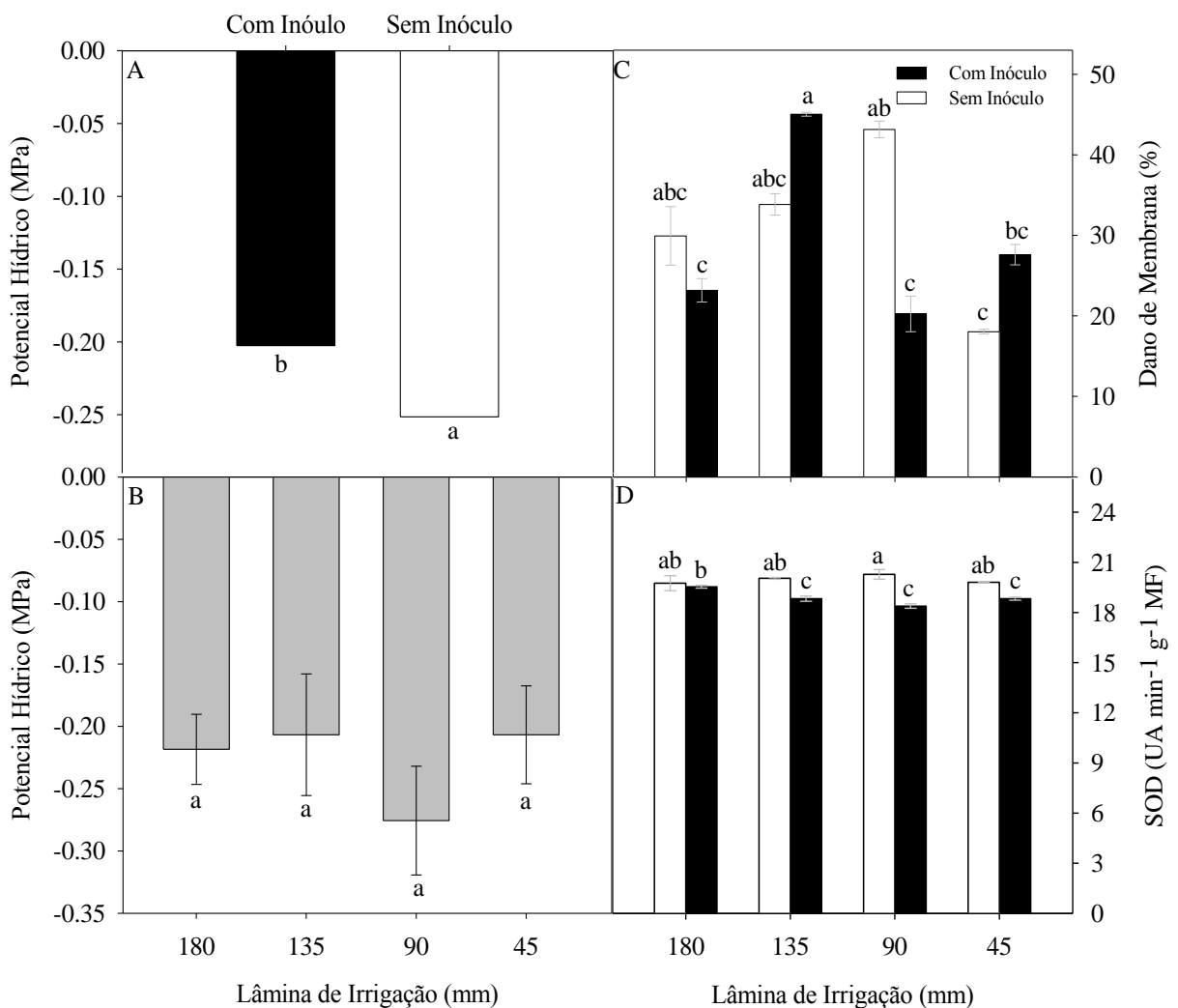




**Figura 17.** Teor proteína solúvel (A e B) e de prolina (C) em plantas de *Myracrodouon urundeuva*, com e sem inóculo (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em  $P \leq 0.05$ .

O potencial hídrico foliar se manteve 5 % superior nas plantas que foram previamente inoculadas em relação ao controle (Fig. 18 A). Além disso, pequenas variações foram observadas no potencial hídrico foliar à medida que se restringiu a água, com exceção da lâmina de irrigação de 90 mm (Fig. 18 B). Adicionalmente, a inoculação reduziu significativamente o dano de membrana nas plantas irrigada 90 mm (Fig. 18 C). Embora, isso não tenha sido observado nas lâminas de 180, 135 e 45 mm (Fig. 18 C).

Os folíolos das plantas que não foram inoculadas apresentaram atividade da superóxido dismutase (SOD) significativamente superior as plantas inoculadas (Fig. 18 D). Além disso, a redução contínua no fornecimento de água até 90 mm resultou em aumento gradativo da atividade da SOD nos folíolos das plantas não inoculadas. Enquanto nas plantas inoculadas houve um decréscimo gradativo da atividade de SOD, também até a lâmina de 90 mm (Fig. 18 D). Ademais, a redução de água de 90 para 45 mm resultou no aumento da atividade da SOD nos folíolos das plantas inoculadas e redução nos folíolos das plantas não inoculadas (Fig. 18 D).



**Figura 18.** Potencial hídrico foliar (A e B), dano de membrana (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) de plantas de *Myracrodruon urundeuva*, com e sem inoculação (*Azospirillum lipoferum*) sob quatro lâminas de irrigação (180, 135, 90 e 45 mm). Os valores de médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes em  $P \leq 0.05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A inoculação foi confirmada por meio da mudança de cor do meio de cultura NFB, específico para o crescimento de *Azospirillum* spp., de verde amarelado para azul (Fig. 11) (RAMANATHAN; RAMA; DHAMAYANTHI, 2015). Isso indica que a colonização *A. lipoferum* na rizosfera das plantas foi eficiente.

As plantas nativas de regiões de clima semiárido estão frequentemente sujeitas aos efeitos prejudiciais provocados pelo estresse hídrico, representando uma adversidade principalmente no crescimento inicial. Deste modo, de acordo com Figueirôa; Barbosa; Simabukuro (2004) a fase de plântula é a mais crítica, ao passo que a sobrevivência depende da germinação, com rápido aprofundamento da raiz na estação chuvosa. O intuito de inocular *A. liporefum* foi apresentar uma alternativa para a produção de plantas de *M. urundeuva*, mais tolerantes à restrição hídrica no estágio inicial de crescimento.

O crescimento e desenvolvimento vegetal são conceitos intrinsecamente relacionados, enquanto o crescimento está associado a multiplicação das células, que resulta na expansão celular, o desenvolvimento refere-se a diferenciação das células, no qual distintos tecidos integrantes do vegetal serão formados (LASTDRAGER; HANSON; SMEEKENS 2014). No presente estudo, a redução no fornecimento de água para as plantas, provocou mudanças visuais na morfologia da parte aérea e da raiz (Fig. 12). Isso foi confirmado com as medidas biométricas, nas quais, verificou-se gradativas diminuições na altura da parte aérea, no comprimento da raiz, no diâmetro de coleto e na área foliar, tanto nas plantas previamente inoculadas, como nas plantas controle (Fig. 15). Tais mudanças estão relacionadas com a redução de pressão de turgor das plantas submetidas às restrições hídricas (BARTLETT; SCOFFONI; SACK, 2012).

Tratando-se da aparência das plantas, ao comparar aquelas inoculadas com o controle (não inoculadas), não foi possível notar mudanças visuais no tamanho (Fig. 12). Porém, quando foi medido o comprimento da raiz, as plantas inoculadas e irrigadas com as lâminas máxima e intermediária (180 e 90 mm) respectivamente, apresentaram aumentos de aproximadamente 30 % (Fig. 15 A). Esses maiores comprimentos de raízes das plantas inoculadas também refletiram em aumentos significativos de 50 % na massa seca das raízes (Fig. 16 A). Essa expansão radicular induzida por RPCP, sob estresse hídrico, também ocorreu em milho (VARDHARAJULA, 2011; NASEEM; BANO, 2014). Isso sugere que, a indução do maior comprimento das raízes pode estar relacionado com a produção de ácido

indolacético e/ou outros metabólitos ainda desconhecidos produzidos pela RPCP (GYANESHWAR *et al.*, 2002; MANTELIN; TOURAINÉ, 2004; ADESEMOYE *et al.*, 2008).

A inoculação não apresentou efeito significativo na altura da parte aérea das plantas (Fig. 15 D). No entanto, as plantas que foram inoculadas apresentaram aumentos significativos no diâmetro do coleto, na irrigação intermediária e mínima, 90 e 45 mm, respectivamente (Fig. 15 B), resultando em acréscimo de aproximadamente 13 %. Ullah *et al.* (2016) também evidenciaram esse aumento significativo, próximo à 8 %, no diâmetro de plantas de tomate inoculada com uma espécie de RPCP sob restrição hídrica. Contudo, as raízes de plantas com inóculo apresentaram massa seca da parte aérea 34 % superior as não inoculadas (Fig. 16 B), comprovando a eficiência da RPCP, *A. lipoferum*, no incremento de massa seca da parte aérea, sob estresse moderado. Esse fato, foi reflexo, principalmente, de maiores diâmetros (Fig. 15 B) e maior número de folíolos (Tab. 4) das plantas com inóculo. Além disso, esses dados convergem com aumentos significativos de matéria seca em diversas culturas inoculadas, sob estresse hídrico (NASEEM; BANO 2014; PRUDENT *et al.*, 2015; ULLAH *et al.*, 2016).

O benefício da inoculação no comprimento da raiz e no diâmetro do coleto, possivelmente, deve-se à proximidade do sítio de interação entre as RPCPs e as plantas (SOTTERO *et al.*, 2006). O aumento dessas medidas, no estresse hídrico moderado e/ou severo (90 e 45 mm), provavelmente, favoreceu a absorção e condução de água nas plantas inoculadas (NOUMAVO *et al.*, 2016).

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_{HF}$ ) de plantas adultas de *M. urundeuva*, situadas em área de Caatinga, apresentam pouca variação, próximo a -0,3 MPa, independente do período, chuvoso ou seco (TROVÃO *et al.*, 2008). Isso está relacionado com a presença de raízes tuberosas dessa espécie, visto que são capazes de armazenar nutrientes e água, auxiliando a planta a manter seu potencial hídrico foliar elevado sob condições adversas de seu habitat natural (FELICIANO; MARANGON; HOLANDA, 2008). Esses dados podem explicar os achados no presente estudo, no qual os valores de  $\Psi_{HF}$  tiveram pequenas variações nesta planta, com médias em torno de -0,25 MPa (Fig. 18 B). Esses valores são relativamente altos quando comparados com outras plantas da Caatinga, em média -1,0 MPa (TROVÃO *et al.*, 2008). Além disso, o  $\Psi_{HF}$  das plantas inoculadas com a RPCP foi 5% superior às não inoculadas (Fig. 18 A). O  $\Psi_{HF}$  ajuda a descrever o *status* hídrico da planta, e está diretamente relacionado com a integridade da membrana plasmática (RINCÓN *et al.*, 2008). Desse modo,

a superioridade no  $\Psi_{HF}$ , promovido pela associação entre as plantas e a RPCP, pode ter influenciado em menores danos de membrana, na irrigação máxima (180 mm) e na seca moderada (90 mm) (Fig. 18 C), como verificado por Ullah *et al.* (2016).

O estresse hídrico implica na redução da qualidade das plantas, resultando em perda de turgor das folhas (redução do  $\Psi_{HF}$ ) (BARLETT *et al.*, 2012), e provocando aumento da senescência foliar (DAS *et al.*, 2015). Entretanto, as plântulas previamente inoculadas e submetidas à irrigação máxima (180 mm) e intermediária (135), apresentaram o  $\Psi_{HF}$  alto, mantendo a pressão de turgor, evitando o aumento nos danos de membranas (Fig. 18 A e C), minimizando a queda de folíolos (Tab. 4), bem como, preservando a tonalidade de verde dessas plantas (Fig. 13). Isso foi verificado pela maior concentração de clorofila *a*, *b* e total, (Fig. 14 A, B e C), sugerindo que a inoculação em condições de seca moderada contribuiu na longevidade dos folíolos de *M. urundeuva*.

Sob condições de estresse hídrico em plantas, tal como o imposto no presente estudo, geralmente ocorre uma maior produção do que eliminação das EROs (DAS *et al.*, 2015). Alguns estudos mostram que um dos pilares para a tolerância das plantas ao estresse é o aumento da atividade de enzimas que eliminam as EROs, que se inicia pela superóxido dismutase – SOD (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). No presente estudo, este comportamento ocorreu nos folíolos de plantas que não foram inoculadas, quando se restringiu a irrigação até 90 mm (Fig. 18 D). Por outro lado, nos folíolos das plantas inoculadas, essa restrição de água causou queda na atividade da SOD (Fig. 18 D). Isso sugere que nessas condições a SOD não foi um bom marcador bioquímico, pois a tolerância destas plantas às condições de restrição hídrica pode ter ocorrido por fatores não enzimáticos (OSAKABE *et al.*, 2014), os quais não foram avaliados no presente estudo.

Os níveis de prolina parecem não estarem também envolvidos na tolerância dessas plantas inoculadas ao estresse hídrico (Fig. 17 C). Por outro lado, as plantas inoculadas tiveram menos folíolos caídos em relação àquelas não inoculadas, no qual pode ter sido influenciado pela produção de citocinina, a qual antagoniza a produção de ácido abscísico (ABA), por compartilharem a mesma rota biossintética (YANG *et al.*, 2009), além de estar envolvida na abscisão foliar (YANG *et al.*, 2009). Os fitorreguladores supracitados não foram medidos no presente estudo. Porém, ainda é pouco conhecido as sinalizações envolvendo RPCP e fitorreguladores (MAYAK *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; KOHLER *et al.*, 2008).

No presente estudo, os teores de proteínas solúveis foram 10 % superior nos folíolos das plantas inoculadas em relação aos folíolos das plantas controle (Fig.17 A). Isso evidencia que o *turnover* está sendo favorável para síntese de novas proteínas ou de proteínas preexistentes envolvidas na tolerância ao estresse hídrico induzido pela RPCP, como evidenciado por Gagné-Bourque e colaboradores (2015). Embora no presente estudo não tenha sido identificado tais proteínas.

Assim, a inoculação com *A. lipoferum*, presumivelmente conferiu às plantas de *M. urundeuva* uma certa tolerância ao estresse hídrico moderado (135 e 90 mm). Este fato pôde ser verificado na raiz, pelo incremento do comprimento e da massa seca. Enquanto na parte aérea, as mudanças de tamanho foram menos pronunciadas, com exceção do aumento do diâmetro de coleto, incremento da massa seca, redução da queda de folíolos, bem como, o aumento da tonalidade de verde, confirmado nos teores de clorofilas. Adicionalmente, os parâmetros físico-químicos e bioquímicos estudados, tais como, concentração de proteínas solúveis, potencial hídrico foliar e clorofilas individuais e totais foram maiores nas plantas inoculadas, submetidas ao estresse hídrico moderado (135 e 90 mm). O oposto foi verificado na atividade da SOD, no qual as plantas inoculadas apresentaram menor atividade desta enzima, este fato pode evidenciar a relativa proteção por fatores não enzimáticos.

Desse modo, a inoculação minimizou os danos às plantas provocados pelo estresse hídrico, mais evidente na seca moderada imposta (90 mm). Contudo, os mecanismos de ação da RPCP que sinalizam as defesas dessas plantas, como os hormônios, devem ser o centro de investigação para os próximos estudos. O presente estudo mostrou que a prolina não foi um metabólito que intermediou a sinalização de estresse hídrico nas plantas inoculadas. Acredita-se que os fitorreguladores ABA, citocina, etileno e ACC podem ser a chave para os mecanismos de tolerância ao estresse hídrico. Assim, são necessários mais estudos que visem identificar os metabólitos e enzimas que intermedeiem a sinalização e transdução da sinalização que conferem às plantas de *M. urundeuva* inoculadas com RPCP maior tolerância ao estresse hídrico.

Portanto, a utilização da RPCP, *A. lipoferum* conferiu maior tolerância ao estresse hídrico em plantas de *M. urundeuva*. Atualmente, essa espécie vegetal está ameaçada de extinção e seu habitat natural, a Caatinga, sofre inúmeras pressões ambientais. Diante dessas circunstâncias, existe uma necessidade latente de recuperação desse ambiente, entretanto, não existem muitas informações que auxiliem na elaboração de planos de manejo e recuperação de áreas degradadas. Neste sentido, o atual estudo mostrou potenciais avanços com a

inoculação da RPCP em *M. urundeuva* como alternativa para subsidiar a confecção de programas de recuperação e reflorestamento de áreas degradadas.

## REFERÊNCIAS

- ACHARD, P.; VRIEZEN, W.H.; STRAETEN, D.; DER, V.; HARBERD, N.P. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. **The Plant Cell**, v. 15, p. 2816-2825, 2003.
- ADESEMOYE, A.O.; TORBERT, H.A.; KLOEPPER, J.W. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 876-886, 2008.
- AHMAD, P.; JAMSHEED, S.; HAMEED, A.; RASOOL, S.; SHARMA, I.; AZOOZ, M. M.; HASANUZZAMAN, M. Drought Stress Induced Oxidative Damage and Antioxidants in Plants. In: Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling. (ed.) AHMAD, P. **Academic Press**, cap. 11, p. 345-367, 2014.
- AMIR, H.G.; SHAMSUDDIN, Z.H.; HALIMI, M.S.; MARZIAH, M.; RAMLAN, M.F. Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings caused by PGPR under field nursery conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 36, p. 2059-2066, 2005.
- AMIR, H.G.; SHAMSUDDIN, Z.H.; HALIMI, M.S.; RAMLAN, M.F.; MARZIAH, M. Effects of *Azospirillum* inoculation on N<sub>2</sub> fixation and growth of oil palm plantlets at nursery stage. **Journal of Oil Palm Research**, v. 13, p. 42-49, 2001.
- ARIAS, H.O.R.; WOOD, M.K.; NIETO, C.M.; LÓPEZ, G.R.; DE LA VEGA, L. Above- and below-ground responses of *Eragrostis* and *Bouteloua* grass seedlings to the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of arid environments**, v. 59, p. 19-26, 2004.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- BADRI, D.V.; WEIRT, L.; LELIE D.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 642-650, 2009.
- BARNA, B.; POGÁNY, M.; KOEHL, J.; HEISER, I.; ELSTNER, E. F. Induction of ethylene synthesis and lipid peroxidation in damaged or TMV-infected tobacco leaf tissues by light. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 1905-1914, 2012.



- BARRIUSO J.; SOLANO B.R.; MAÑERO F.J.G. Protection Against Pathogen and Salt Stress by Four Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. **Biological Control**, v. 98, n. 6, p. 666-672, 2008.
- BARTLETT, M.K.; SCOFFONI, C.; SACK, L. The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. **Ecology Letters**, v. 15, p. 393-405, 2012.
- BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 168–174, 1998.
- BASHAN, Y.; LEVANONY H. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. **Journal of general microbiology**, v.133, p. 3473-3480, 1987.
- BASHAN, Y.; VAZQUEZ P. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 450-459, 2000.
- BATES, L.S., WALDREN, R.P., TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 205-207, 1973.
- BECKNELL, J.M., KISSING HUCEK, L.; POWERS J.S. Aboveground biomass in mature and secondary seasonally dry tropical forests: a literature review and synthesis. **Forest Ecology and Management**, v. 276, p. 88-95, 2012.
- BELIMOV, A.A.; KUNAKOVA, A.M.; SAFRONOVA, V.I.; STEPANOK, V.V.; YUDKIN, L.Y.; ALEKSEEV, Y.V.; KOZHEMYAKOV, A.P. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. **Microbiology**, v. 73, p. 99-106, 2004.
- BERGAMASCHI H. Desenvolvimento de déficit hídrico em culturas. In: Agrometeorologia aplicada à irrigação. (ed.) BERGAMASCHI, H. **Ed. Universidade**, Porto Alegre: UFRGS, p. 25-32, 1992.
- BEUCHLE, R.; GRECCHI, R.C.; SHIMABUKURO, Y.E.; SELIGER, R.; EVA, H.D.; SANO, E.; ACHARD, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, v. 58, p. 116-127, 2015.

- BIJANZADEH, E.; EMAM, Y. Effect of defoliation and drought stress on yield components and chlorophyll content of wheat. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, p. 699-705, 2010.
- BLEECKER, A. B., KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 1-18, 2000.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **Rockville: American Society of Plant Physiologists**, p. 1-1341, 2001.
- BURRITT, D.J. Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications. In: Current Frontiers in Cryopreservation. (Ed.) KATKOV, I. **INTECH-open access publisher**, Croatia, p. 415-430, 2012.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 463-468, 1991.
- CAPPELLARI, L.D.R.; SANTORO, M.V.; REINOSO, H.; TRAVAGLIA, C.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. Anatomical, Morphological, and Phytochemical Effects of Inoculation with Plant Growth- Promoting Rhizobacteria on Peppermint (*Mentha piperita*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 149-158, 2015.
- CARLESSO, R. Absorção de água pelas plantas: água disponível versus extrável e a produtividade das culturas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 183-188, 1995.
- CARMELLO-GUERREIRO, S.M.; PAOLI, A.A.S. Aspectos morfológicos e anatômicos da semente de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allem.- Anacardiaceae), com notas sobre paquicalaza. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, p. 222-228, 1999.
- CARNEIRO R.F.V.; JÚNIOR F.M.C.; PEREIRA L.F.; ARAÚJO A.S.F.; SILVA G.A. Fungos micorrízicos arbusculares como indicadores da recuperação de áreas degradadas no Nordeste do Brasil. **Revista Ciência Agronômicas**, v. 43, n. 4, p. 648-657, 2012.
- COOPER, R. Bacterial fertilizers in the Soviet Union. **Soils and Fertilizers**, v. 22, p. 327-333, 1959.

- CRAFTS-BRANDNER, S.J.; PONELEIT, C.G. Selection for seed growth characteristics: effect on leaf senescence in maize. **Crop Science**, Madison, v.32, p.127-131, 1992.
- DAS, P.; NUTAN, K.K.; SINGLA-PAREEK, S.L.; PAREEK, A. Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 1-11, 2015.
- DÍAZ S.; CABIDO M.; ZAK M.; MARTÍNEZ C.E.; ARANÍBAR J. Plant functional traits, ecosystem structure and land-use history along a climatic gradient in central-western Argentina. **Journal of Vegetation Science**, v. 10, p. 651-660, 1999.
- DIN, J.; KHAN, S.U.; ALI, I.; GURMANI, A.R. Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 21, p. 78-82, 2011.
- DJOUDI, H., VERGLES, E., BLACKIE, R.R., KOFFI KOAME, C.; GAUTIER, D. Dry forests, livelihoods and poverty alleviation: understanding current trends. **International Forestry Review – Special Issue: Global Dry Forests**, v. 17, p. 53–68, 2015.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M. Associateve symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixation sites. In: Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. (ed.) NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J.N. **Washington: Pullman. Washington State University of Press**, p. 518-538, 1976.
- DRADFORD, M.M. Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 284-252, 1976.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REDERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

- EL-MOKADEM, M.T, HELEMISH, F.A.; ABOU-BAKR, Z.Y.M.; SHETEAWI, S.A. Associative effect of *Azospirillum lipoferum* and *Azotobacter chroococcum* with *Rhizobium* spp. on mineral composition and growth of chickpea (*Cicer arietinum*) on sandy soils. **Zbl Mikrobiol.**, v. 144, p. 255-265, 1989.
- ESQUIVEL-COTE, R.; RAMÍREZ-GAMA, R.M.; TSUZUKI-REYES, G.; OROZCO-SEGOVIA, A.; HUANTE, P. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant Soil**, v. 337, p. 65-75, 2010.
- FAGES, J.; ARSAC, J.F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Soil**, v. 137, n. 87-90, 1991.
- FAVER, K.L.; GERIK, T.J.; THAXTON, P.M. EL-ZIK, K.M. Late season water stress in cotton: Leaf gas exchange and assimilation capacity. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 922-928, 1996.
- FELICIANO, A. L. P.; MARANGON, L. C.; HOLANDA, A. C. Morfologia de sementes, de plântulas e de plantas jovens de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 110-118, 2008.
- FIGUEIREDO, M. do V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E. de R.S. Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. **Guaíba: Agrolivros**, cap. 4, p. 97-118, 2008.
- FIGUEIREDO, M. do V.B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R. de L.R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, p. 21-43, 2010.
- FIGUEIREDO, V.B.; BURITYA, H.A.; MARTÍNEZ, C.R.; CHANWAY, C.P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p. 182-188, 2008.
- FIGUEIRÔA, J.M.; BARBOSA, D.C. de A.; SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 573-580, 2004.
- FOLI, S.; REED, J.; CLENDENNING, J.; PETROKOFISKY, G.; PADOCH, C.; SUNDERLAND, T. To what extent does the presence of forests and trees contribute

to food production in humid and dry forest landscapes?: a systematic review protocol. **Environmental Evidence**, v. 3, n. 1, 2014.

FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.; SIVA, E.M.R.; FARIA S.M.; ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, p. 57-67, 1998.

GAGNÉ-BOURQUE, F.; MAYER, B.F.; CHARRON, J.B.; H VALI, H.; ANNICK BERTRAND, A.; JABAJI, S. Accelerated Growth Rate and Increased Drought Stress Resilience of the Model Grass *Brachypodium distachyon* Colonized by *Bacillus subtilis* B26. **Plos ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-23, 2015.

GAMO, T.; AHN, S.B. Growth-promoting *Azospirillum* spp. isolated from the roots of several non-gramineous crops in Japan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 37, p. 455-461, 1991.

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

GIULIETTI, A.M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L.P. Riqueza de espécies e Caracterização das Fanerógamas do Semi-árido Brasileiro. **Associação Plantas do Nordeste, Ministério da Ciência e Tecnologia**, Recife, 2006.

GOMES, M.P.; SMEDBOL, E.; CARNEIRO, M.M.L.C.; GARCIA, Q.S.; JUNEAU, P. Reactive Oxygen Species and Plant Hormones. In: Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling. (ed.) AHMAD, P. **Academic Press**, cap. 2, p. 65-88, 2014.

GRACIANO E.S.A.; NOGUEIRA R.J.M.C.; LIMA, D.R.M.; PACHECO, C.M.; SANTOS R.C. Crescimento e capacidade fotossintética da cultivar de amendoim BR 1 sob condições de salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 8, p.794-800, 2011.

GURGEL-GARRIDO, L.M.A.; CRUZ, S.F.; FARIA, H.H.; GARRIDO, M.A.O.; VILAS BOAS, O. Efeitos do sombreamento no crescimento da aroeira - *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Revista do Instituto Florestal**, v. 9, p.47-56, 1997.

- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83–93, 2002.
- HAJIBOLAND, R. Reactive oxygen species and photosynthesis. In: *Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling*. (ed.) AHMAD, P. **Academic Press**, cap. 1, p. 1-63, 2014.
- HANSEN, M.C.; DEFRIES, R.S.; TOWNSHEND, J.R.G.; CARROLL, M.; DIMICELI, C.; SOHLBERG, R.A. Global percent tree cover at a spatial resolution of 500 meters: first results of the MODIS Vegetation Continuous Fields algorithm. **Earth Interactions**, v. 7, p. 1-15, 2003.
- HAVIR, E.A., MCHALE, N.A.C. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, 450-455, 1987.
- HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M.N.; WANI, A.S., PICHTEL; J., AHMAD, A. Role of proline under changing environments a review. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 1-11. 2012.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil.: **Califórnia Agricultural Experiment Station**, Berkeley, p. 32 (Circular 347), 1950.
- HOSSAIN, M. A.; HOQUE, M. A.; BURRITT, D. J.; FUJITA, M. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In: *Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling*. (ed.) AHMAD, P. **Academic Press**, cap. 16, p. 477-522, 2014.
- HOSSAIN, M.A.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; FUJITA, M. Glyoxalase system and reactive oxygen species detoxification system in plant abiotic stress response and tolerance: an intimate relationship. In: *Abiotic Stress/Book 1*. (Eds.) SHANKER, A. K.; VENKATESWARLU, B. **INTECH Open Access Publisher**, Rijeka, Croatia, p. 235-266, 2011.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estados: População, Instituto Brasileiro de Geografia, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/apps/atlas/>, 2010.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 315-319, 1976.

- KAUSHAL, M.; WANI, S.P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 35-42, 2015.
- KAVIMANDAN, S.K.; GAUR, A.C. Effect of seed inoculation with *Pseudomonas* sp. On phosphate uptake and yield of maize. **Current Science**, v. 40, p. 439-40, 1971.
- KESAVA, R.O.; ARUNACHALAM, V.; TILAK, K.V.B.R. Genotype dependent response to *Azospirillum* treatment in yield and nitrogenase activity in *Brassica juncea* L. **Current Science**, v. 59, p. 607-609, 1990.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria**, v, 2. p. 879-882, 1978.
- KOHLER, J.; HERNÁNDEZ, J. A.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 141-151, 2008.
- KRATKA, P.C.; CORREIA, C.R.M. de A. Crescimento inicial de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* allemão) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.39, n.3, p. 551-559, 2015.
- LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. Sugar signals and the control of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 799-807, 2014.
- LECOEUR, J.; SINCLAIR, R.T. Field pea transpiration and leaf growth in response to soil water deficits. **Crop Science**, Madison, v.36, p. 331-335, 1996.
- LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1-8, 2001.
- LIMA, R.L.F.A.; SALCEDO, I.H.; FRAGA, V.S. Propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em solos deficientes em fósforo sob diferentes usos, da região semi-árida do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 257-268, 2007.

- LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 12, p. 3311-3336, 2009.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 6 ed. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, v. 1, p. 1-24, 2014.
- LUCAS, J.A.; CRISTOBAL, J.G.; BONILLA, A.; RAMOS, B.; MAÑERO, J.G. Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 44-53, 2014.
- LUDLOW, M.M.; MUCHOW, R.C. A critical evaluation of trits for improving crop yields in water-limited environments. **Advance in Agronomy**, São Diego, v. 43, p. 107-153, 1990.
- MAFAKHERI, A.; SIOSEMARDEH, A.; BAHRAMNEJAD, B.; STRUIK, P.C; SOHRABI, Y. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. **Australian Journal of Crop Science**, v. 4, p. 580-585, 2010.
- MAHFOUZ, S.A.; SHARAF-ELDIN, M.A. Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield, and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **International Agrophysics**, v. 21, p. 361-366, 2007.
- MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 27-34, 2004.
- MARTÍNEZ-VILALTA, J.M.; POYATOS, R.; AGUADÉ, D.; RETANA, J.; MENCUCCINI, M. A new look at water transport regulation in plants. **New Phytologist**, v. 204, p. 105-115, 2014.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 565-572, 2004.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 25, p. 219-226, 1974.



- MILES, L.; NEWTON, A.C.; DEFRIES, R.S.; RAVILIOUS, C.; MAY, I.; BLYTH, S.; VALERIE KAPOS, V.; GORDON, J.E. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 491-502, 2006.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa Nº 6, de 23 de Setembro de 2008, Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Disponível em: [www.mma.gov.br/estruturas/179/\\_arquivos/179\\_05122008033615.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf), 2008.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. Subsídios para a Elaboração do Plano de Ação para a Prevenção e Controle do Desmatamento na Caatinga. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/168/\\_arquivos/diagnostico\\_do\\_desmatamento\\_na\\_caatinga\\_168.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/168/_arquivos/diagnostico_do_desmatamento_na_caatinga_168.pdf), 2011.
- MMA-IBAMA - Ministério do Meio Ambiente-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite e acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA. Monitoramento do bioma Caatinga: 2002 a 2008. Disponível em: [http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/caatinga/relatrio\\_tcnico\\_caatinga\\_72.pdf](http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/caatinga/relatrio_tcnico_caatinga_72.pdf), 2010.
- MØLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459–81. 2007.
- MOORE, S.; STEIN, W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **Journal Biology Chemistry**, v. 176, n. 367-388, 1948.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. **Editora UFLA**, p. 1-729, 2006.
- MOURA, M.S.B. de; GALVINCIO, J.D.; BRITO, L.T. de L.; SOUZA, L.S.B. de; SÁ, I.I.S.; SILVA, T.G.F. da. Clima e água de chuva no Semi-Árido. In: Potencialidades da água de chuva no Semi-Árido brasileiro. (Ed.) BRITO, L. T. de L.; MOURA, M. S. B. de; GAMA, G. F. B. **Petrolina: Embrapa Semi-Árido**, cap. 2, p. 37-59, 2007.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, v. 22, n. 867-880, 1981.
- NASEEM, H.; BANO, A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 689-701, 2014.

- NOUMAVO, P.A.; AGBODJATO, N.A.; BABA-MOUSSA, F.; ADJANOHOON, A.; BABA-MOUSSA, L. Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 27, p. 1452-1463, 2016.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994.
- OLIVEIRA, M.T.; MATZEK, V.; MEDEIROS, C.D. RIVAS, R.; FALCÃO, H.M.; SANTOS, M.G. Stress Tolerance and Ecophysiological Ability of an Invader and a Native Species in a Seasonally Dry Tropical Forest. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- OLIVEIRA, M.T.; MEDEIROS, C.D.; FROSI, G.; SANTOS, M.G. Different mechanisms drive the performance of native and invasive woody species in response to leaf phosphorus supply during periods of drought stress and recovery. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, n. 66-75, 2014.
- OLSON, D.M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E.D.; BURGESS, N.D.; POWELL, G.V.N.; UNDERWOOD, E.C.; D'AMICO, J.A.; ITOUA, I.; STRAND, H.E.; MORRISON, J.C.; LOUCKS, C.J.; ALLNUTT, T.F.; RICKETTS, T.H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J.F.; WETTENGEL, W.W.; HEDAO, P.; KASSEM, K.R. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth. **BioScience**, v. 51, p. 933-938, 2001.
- OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L.S. P. Response of plant to water stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-8, 2014.
- PEREG, L.; DE-BASHAN, L.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v. 399, p. 389-414, 2016.
- POONGGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M.; RYU, J.; CHUNG, K.; SA, T. Effects of co-cultures, containing N-fixers and P solubilizers, on the growth and yield of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) and blackgram (*Vigna mungo* L.). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 903-908, 2005.
- PORTILLO-QUINTERO, C.A.; SANCHEZ-AZOFEIF, G.A. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. **Biological Conservation**, v. 143, p. 144-155, 2010.

- PORTILLO-QUINTERO, C.A.; SANCHEZ-AZOFEIFA, G.A.; CALVO-ALVARADO, J.; QUESADA, M.; ESPIRITO-SANTO, M.M. The role of tropical dry forests for biodiversity, carbon and water conservation in the neotropics: lessons learned and opportunities for its sustainable management. **Regional Environmental Change**, v. 15, 2014.
- PRAMOVA, E.; LOCATELLI, B.; DJOUDI, H.; SOMORIN, O.A. Forests and trees for social adaptation to climate variability and change. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change**, v. 3, n. 6, p. 581-596, 2012.
- PRUDENT, M.; SALON, C.; SOULEIMANOV, A.; EMERY, R.J.N.; SMITH, D.L. Soybean is less impacted by water stress using *Bradyrhizobium japonicum* and thuricin-17 from *Bacillus thuringiensis*. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 749-757, 2015.
- RAVERKAR, K.P.; KONDE, B.K. Effect of Rhizobium and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. **Plant Soil**, v. 106, p. 249-252, 1988.
- REICH, P.B.; WRIGHT, I.J.; CAVENDER-BARES, J.; CRAINE, J.M.; OLEKSYN, J.; WESTOBY, M.; WALTERS M.B. The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 143-164, 2003.
- RINCÓN, A.; VALLADARES, F.; GIMENO, T.E.; PUEYO, J.J. Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. **Tree Physiology**, v. 28, p. 1693-1701, 2008.
- RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V.; BARROS, B.G.F.; FIGUEREDO, M.V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 196-202, 2012.
- ROZIER, C.; ERBAN, A.; HAMZAOU, J.; PRIGENT-COMBARET, C.; Comte, G.; KOPKA, J.; CZARNES, S.; LEGENDRE, L. Xylem Sap Metabolite Profile Changes During Phytostimulation of Maize by the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Azospirillum lipoferum* CRT1. **Metabolomics**, Los Angel, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2016.
- SAHA, K.C.; SANNIGRAHI, S.; MANDAL, L.N. Effect of inoculation of *Azospirillum lipoferum* on nitrogen fixation in rhizosphere soil, their association with root, yield

- and nitrogen uptake by mustard (*Brassica juncea*). **Plant Soil**, v. 87, p. 273–280, 1985.
- SAKAMOTO, M.; MUNEMURA, I.; TOMITA, R.; KOBAYASHI, K. Involvement of hydrogen peroxide in leaf abscission signaling, revealed by analysis with an in vitro abscission system in Capsicum plants. **The Plant Journal**, v. 56, p. 13-27, 2008.
- SANTIN, D.A; LEITÃO FILHO, H.F. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Allemão (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, p. 133-145, 1991.
- SANTOS, J.C.; LEAL, I.R.; CORTEZ, J.S.A.; FERNANDES, G.W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v. 4, p. 276-286, 2011.
- SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p.287-294, 1998.
- SEVERINO, L.S.; DO VALE, L.S.; BELTRÃO, N.E. de M. A simple method for measurement of *Jatropha curcas* leaf area. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.11, p. 9-14, 2007.
- SHAIKH, S.S.; SAYYED, R.Z.; REDDY, M.S. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: An Eco-friendly Approach for Sustainable Agroecosystem. **Plant, Soil and Microbes**, p. 181-201, 2016.
- SILVA, M.T.; DO AMARAL, J.A.B. Zoneamento de risco climático para a cultura do amendoim no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 93-99, 2007.
- SILVA, V.P.R.; PEREIRA, E.R.R.; AZEVEDO, P. V.; SOUSA, F.A.S.; SOUSA, I. F. Análise da pluviometria e dias chuvosos na região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 2, p.131-138, 2011.
- SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S. dos S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. **Instituto Agrônomo de Campinas**, cap. 1, p. 1-20, 2007

- SINGH B.K.; MILLARD P.; WHITELEY A.S.; Murrell J.C. Unravelling rhizosphere – microbial interactions: opportunities and limitations. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 386-393, 2004.
- SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, p. 225-234, 2006.
- SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Science**, v. 15, 89-97, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. **Porto Alegre: Artmed**, p. 1-722, 2006.
- THOMAS, R.L.; SHEARD, R.W.; MOYER, J.R. Comparison of conventional and automated procedure for nitrogen, phosphorus and potassium analysis of plant material using single digest. **Agronomy Journal**, v. 59, n. 240-243, 1967.
- TROVÃO, D.M.B.M.; FERNANDES, P.D.; ANDRADE, L.A., DANTAS, N.J. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 307-311, 2007.
- ULLAH, U.; ASHRAF, M.; SHAHZAD, S.M.; SIDDIQUI, A.R.; PIRACHA, M.A.; SULEMAN, M. Growth behavior of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under drought stress in the presence of silicon and plant growth promoting rhizobacteria. **Soil Environment**, v. 35, n. 1 p. 65-75, 2016.
- VANDENABEELE, S.; KELEN, K.V.D.; JAMES DAT, J.; ILYA GADJEV, I.; BOONEFAES, T.; MORSA, S.; ROTTIERS, P.; SLOOTEN, L.; MONTAGU, M.V.; ZABEAU, M.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, K.V. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 16113-16118, 2003.
- VARDHARAJULA, S.; ALI, S.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; BANDI, V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 1, p. 1 - 14, 2011.
- VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C. ECORREGIÕES Propostas para o Bioma Caatinga. Recife: Associação Plantas do Nordeste. **Instituto de Conservação Ambiental - The Nature Conservancy of Brasil**, p. 1-75, 2002.

- VIEIRA, R.M.S.P.; TOMASELLA, J.; ALVALÁ, R.C.S.; SESTINI, M.F.; AFFONSO, A.G.; RODRIGUEZ, D.A.; BARBOSA, A.A.; CUNHA, A.P.M.A.; VALLES, G.F.; CREPANI, E.; DE OLIVEIRA, S.B.P.; DE SOUZA, M.S.B.; CALIL, P.M.; DE CARVALHO, M.A.; VALERIANO, D.M.; CAMPELLO, F.C.B.; SANTANA, M.O. Identifying areas susceptible to desertification in the Brazilian northeast. **Solid Earth**, v. 6, p. 347-360, 2015.
- WANG, C.J.; YANG, W.; WANG, C.; GU, C.; NIU, D.D.; LIU, H.X.; WANG, Y.P.; GUO, J.H. Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012.
- WAROUX, Y. P.; LAMBIN, E.F. Monitoring degradation in arid and semi-arid forests and woodlands: The case of the argan woodlands (Morocco). **Applied Geography**, v. 32, p. 777-786, 2012.
- YADAV J.; VERMA J.P. Effect of seed inoculation with indigenous Rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 63, p. 70-77, 2014.
- YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, 2009.
- ZHANG, H.; KIM, M.S.; SUN, Y.; DOWD, S.E.; SHI, H.; PARÉ, P.W. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 737-744, 2008.
- ZINGARETTI, S.M.; INÁCIO, M.C.; PEREIRA, L.M.; PAZ, T.A.; FRANÇA, S.C. Water Stress and Agriculture. In: Water Stress and Agriculture, Responses of Organisms to Water Stress. (Ed.) AKINCI, S., **InTech open science / open mids**, cap. 7, p. 151-179, 2013.
- ZULUETA-RODRIGUEZ, R.; CORDOBA-MATSON, M.V.; HERNANDEZ-MONTIEL, L.G.; MURILLO-AMADOR, B.; RUEDA-PUENTE, E.; LARA, L. Effect of *Pseudomonas putida* on Growth and Anthocyanin Pigment in Two Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) Cultivars. **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2014.

## **APÊNDICE**

**Tabela 5.** ANAVA – Comprimento de Raiz de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Irrigação	3	157.645	52.548	23.3160	0.0000044**
Inoculo	1	41.607	41.607	18.4611	0.0005545**
Irrigação*Inoculo	3	30.353	10.118	4.4893	0.0181157*
Erro	16	36.060	2.254		
Total	23	265.665			
CV (%)	14.33				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 6.** ANAVA – Diâmetro do coleto de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Irrigação	3	2.76759	0.92253	111.079	0**
Inoculo	1	0.00128	0.00128	0.154	0.70025 <sup>ns</sup>
Irrigação*Inoculo	3	0.14219	0.0474	5.707	0.00747**
Erro	16	0.13288	0.00831		
Total	23	3.04394			
CV (%)	6.31				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).



**Tabela 7.** ANAVA – Altura Parte Aérea de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	217.38	72.461	10.0333	0.00058**
Inoculo		1	0.17	0.167	0.0231	0.88116 <sup>ns</sup>
Irrigação*Inoculo		3	21.63	7.21	0.9983	0.41895 <sup>ns</sup>
Erro		16	115.55	7.222		
Total		23	354.73			
CV (%)		14.96				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 8.** ANAVA – Área foliar de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	51.526	17.1752	9.7273	0.00068**
Inoculo		1	0.865	0.8647	0.4897	0.4941 <sup>ns</sup>
Irrigação*Inoculo		3	6.877	2.2922	1.2982	0.30927 <sup>ns</sup>
Erro		16	28.251	1.7657		
Total		23	87.518			
CV (%)		28.01				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 9.** ANAVA – Massa seca da raiz de *Myracroduton urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.063999	0.0213329	16.5007	0.000037**
Inoculo		1	0.002564	0.0025637	1.9830	0.178211 <sup>ns</sup>
Irrigação*Inoculo		3	0.026672	0.0088908	6.8769	0.003458*
Erro		16	0.020686	0.0012929		
Total		23	0.113920			
CV (%)		27.39				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 10.** ANAVA – Massa seca da parte aérea de *Myracroduton urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.135383	0.045128	32.187	0.000001**
Inoculo		1	0.005546	0.005546	3.956	0.064087 <sup>ns</sup>
Irrigação*Inoculo		3	0.02501	0.008337	5.946	0.006347**
Erro		16	0.022433	0.001402		
Total		23	0.188373			
CV (%)		12.48				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 11.** ANAVA – Conteúdo de proteína de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	11.7549	3.9183	7.2538	0.002737**
Inoculo		1	3.4063	3.4063	6.3058	0.023149*
Irrigação*Inoculo		3	2.6113	0.8704	1.6114	0.226079 <sup>ns</sup>
Erro		16	8.6428	0.5402		
Total		23	26.4153			
CV (%)		10.34				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 12.** Teste de Tukey – Conteúdo de proteína de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

Grupo	QM	
	<i>A. lipoferum</i>	Sem Inoculo
a	7.482303	-
b	-	6.728839

Letras diferentes indica que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 13.** ANAVA – Potencial hídrico foliar de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.019524	0.006508	6.374	0.00477**
Inoculo		1	0.014357	0.014357	14.0612	0.00175**
Irrigação*Inoculo		3	0.002557	0.000852	0.8347	0.4943 <sup>ns</sup>
Erro		16	0.016337	0.001021		
Total		23	0.052775			
CV (%)		-14.08				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 14.** Teste de Tukey – Potencial hídrico foliar de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

Grupo	QM	
	<i>A. lipoferum</i>	Sem Inoculo
b	-0.2025	-
a	-	-0.2514

Letras diferentes indica que houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 15.** ANAVA – Dano de membrana de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Irrigação	3	932.09	310.7	66.874	0**
Inoculo	1	29.7	29.7	6.393	0.02236*
Irrigação*Inoculo	3	1151.36	383.79	82.605	0**
Erro	16	74.34	4.65		
Total	23	2187.48			
CV (%)		1.07			

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 16.** ANAVA – Clorofila *a* de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Irrigação	3	0.19151	0.063838	15.208	6.05E-05**
Inoculo	1	0.12759	0.127593	30.396	4.72E-05**
Irrigação*Inoculo	3	0.62973	0.209909	50.007	2.40E-08**
Erro	16	0.06716	0.004198		
Total	23	1.016			
CV (%)		5.63			

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 17.** ANAVA – Clorofila *b* de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.02788	0.009293	2.4592	0.100239 <sup>ns</sup>
Inoculo		1	0.031554	0.031554	8.3498	0.010669*
Irrigação*Inoculo		3	0.06093	0.02031	5.3744	0.009431**
Erro		16	0.060464	0.003779		
Total		23	0.180827			
CV (%)		10.28				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 18.** ANAVA – Clorofilas totais de *Myracrodouon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.35563	0.11854	12.711	1.67E-04**
Inoculo		1	0.22968	0.22968	24.628	1.41E-04**
Irrigação*Inoculo		3	1.24566	0.41522	44.524	5.40E-08**
Erro		16	0.14921	0.00933		
Total		23	1.98018			
CV (%)		5.19				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 19.** ANAVA – Razão clorofila *a/b* de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.12265	0.040883	4.1714	0.023196*
Inoculo		1	0.09057	0.090567	9.2407	0.007803**
Irrigação*Inoculo		3	0.2946	0.0982	10.0195	0.000588**
Erro		16	0.15681	0.009801		
Total		23	0.66463			
CV (%)		5.02				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 20.** ANAVA – Atividade da SOD de Plântulas de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.4159	0.1386	3.225	0.050585 <sup>ns</sup>
Inoculo		1	6.8928	6.8928	160.376	0**
Irrigação*Inoculo		3	2.1696	0.7232	16.827	0.000033**
Erro		16	0.6877	0.043		
Total		23	10.166			
CV (%)		1.07				

A sigla (ns) indica que não há diferença significativa entre os tratamentos, (\*) indica significativa entre os tratamentos  $P < 0.01$ , (\*\*) indica diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 21.** ANAVA da regressão – Atividade da SOD em *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

Modelo Testado	QM	
	<i>A. lipoferum</i>	Sem Inóculo
Linear	0.99663**	0.02335 <sup>ns</sup>
Quadrático	1.00452**	0.43636**
Cubico	0.05977 <sup>ns</sup>	0.06486 <sup>ns</sup>

A sigla (ns) indica que não há diferença significativa entre os tratamentos, (\*) indica significativa entre os tratamentos  $P < 0.01$ , (\*\*) indica diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 22.** ANAVA – Conteúdo de prolina de *Myracroduon urundeuva* inoculadas com *Azospirillum lipoferum* sob quatro níveis de irrigação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc	
Irrigação		3	0.002836	0.000945	2.7405	0.07754 <sup>ns</sup>
Inoculo		1	0.001507	0.001507	4.3699	0.0529 <sup>ns</sup>
Irrigação*Inoculo		3	0.000735	0.000245	0.7097	0.56021 <sup>ns</sup>
Erro		16	0.005519	0.000345		
Total		23	0.010597			
CV (%)		36.56				

A sigla (ns) indica que o modelo testado não foi significativo, (\*\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.01$ ), (\*) indica que o modelo testado foi significativo ( $P < 0.05$ ).

## **ANEXO**



CA UGUC N° 03/2017

Recife, 30 de março de 2017

Ao Senhor

**Douglas Moreira de Oliveira**

Pesquisador

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE/UAST

Serra Talhada - PE

Assunto: **Autorização e apoio para pesquisa científica em Unidade de Conservação Estadual**

Senhor Pesquisador,

Cumprimentando-o cordialmente, vimos por meio desta, levar a Vosso conhecimento o resultado da solicitação de Autorização de Pesquisa Científica, projeto intitulado **"Inoculação de Rizobactéria Promotora do Crescimento de Plantas (RPCP) em Myracrodruon urundeuva (Allemao) confere tolerância ao estresse hídrico"**, protocolada na forma do Processo CPRH N° 001384/2017, a ser executado no Parque Estadual Mata da Pimenteira (PEMP), Serra Talhada - PE.

Após análise, conclui-se tratar de projeto de pesquisa básica e aplicada para a conservação da biodiversidade e que não coloca em risco a sobrevivência das espécies integrantes dos ecossistemas protegidos na supracitada Unidade de Conservação. Portanto, esta Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH) dá como deferida a solicitação, estando a equipe executora **AUTORIZADA** a desenvolver as atividades previstas no cronograma geral, sendo esta autorização válida até 31/12/2017.

Informa-se a necessidade de apresentar a esta Agência relatório das atividades desenvolvidas no referido Parque, bem como os resultados da pesquisa, no prazo de 60 (sessenta) dias após a conclusão dos trabalhos.

Atenciosamente,

  
**Gleydson Castelo Branco Galeno**  
Gerente da Unidade de Gestão das  
Unidades de Conservação  
UGUC/DRFB/CPRH

**Gleydson Castelo Branco Galeno**

Gerente da Unidade de Gestão de Unidades de Conservação -

UGUC/DRFB/CPRH