



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOHN DAVID OLIVEIRA DE LIMA

**EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS
DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS
NEOTROPICAIS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO SEVERO**

Londrina
2023

JOHN DAVID OLIVEIRA DE LIMA

**EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS
DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS
NEOTROPICAIS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO SEVERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Stolf Moreira
Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Pimenta

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Lima, John David Oliveira.

EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO SEVERO / John David Oliveira de Lima. - Londrina, 2023.
60 f. : il.

Orientador: Renata Stolf Moreira.

Coorientador: José Antonio Pimenta.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias promotoras de crescimento em plantas - Tese. 2. Déficit hídrico - Tese. 3. Reflorestamento - Tese. 4. Biotecnologia - Tese. I. Moreira, Renata Stolf. II. Pimenta, José Antonio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

JOHN DAVID OLIVEIRA DE LIMA

**EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE
ESPÉCIES ARBÓREAS NEOTROPICAIS SUBMETIDAS AO
DÉFICIT HÍDRICO SEVERO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Renata Stolf Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista
Universidade Estadual de Ponta Grossa –
UEPG

Londrina, 01 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha Mãe, pelo apoio, força e incentivo para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

À Sâmia por todo o companheirismo, compreensão, incentivo e ajuda em todos os momentos.

À Profa. Dra. e orientadora Renata Stolf Moreira, ao Prof. Dr. e orientador José Antonio Pimenta, Ao Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira, pela paciência, apoio, compreensão, dedicação e por todas as contribuições fundamentais para o pleno desenvolvimento deste estudo.

À Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista e ao Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira por contribuir nas correções do trabalho e por ter aceitado compor a banca.

À equipe do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal pelo auxílio durante o desenvolvimento do estudo, companheirismo, amizade e por todos os momentos de muito conhecimento e aprendizagem compartilhados.

Ao Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira pelo fornecimento das bactérias promotoras de crescimento em plantas. À Profa. Elisete Pains Rodrigues pela disponibilidade do uso do Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) e aos parceiros do LAGEM.

À equipe do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) e da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por viabilizar a realização deste trabalho.

A todos os professores da minha vida.

Aos professores da Universidade Estadual do Ceará (UECE), especialmente, ao Prof. Dr. Oriel Herrera Bonilla, pela amizade, pela formação, pelo grande apoio e incentivo na minha vida acadêmica.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pelo financiamento da bolsa de estudos, de fundamental importância para a manutenção da pesquisa.

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

“Esta pesquisa foi financiada por meio da chamada conjunta BiodivERsA 2019-2020 para propostas de pesquisa, sob o programa BiodivClim ERA-Net COFUND, e com as agências de fomento Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Agência Nacional da Pesquisa (França) e Ministério Federal da Educação e da Pesquisa (Alemanha).”

"This research was funded through the 2019-2020 BiodivERsA joint call for research proposals, under the BiodivClim ERA-Net COFUND programme, and with the funding organisations Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Agence Nationale de la Recherche (France) and Federal Ministry of Education and Research (Germany)."

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

Muito obrigado!

de Lima, John David Oliveira. **Efeito da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em mudas de espécies arbóreas neotropicais submetidas ao déficit hídrico severo**. 2023. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A recuperação de áreas desflorestadas é uma das medidas necessárias para mitigar os efeitos das mudanças climáticas. Uma das estratégias adotadas para a restauração dessas áreas é o plantio de espécies arbóreas nativas. Entretanto, as condições microclimáticas de áreas desmatadas acarretam diversas dificuldades para o desenvolvimento pleno de uma plântula, principalmente, devido à baixa disponibilidade de água no solo. O uso de Bactérias Promotoras do Crescimento em Plantas (BPCP) pode contribuir para aumentar a tolerância de plantas aos estresses abióticos, especialmente à seca. Diversas publicações abordam a inoculação e a coinoculação de BPCP em espécies cultivadas e alguns estudos abordam apenas a inoculação em espécies arbóreas neotropicais. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da coinoculação com BPCP - *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus velezensis* (ZK) - sobre variáveis biométricas, fisiológicas e bioquímicas em mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul (pioneira) e de *Cariniana estrellensis* Raddi (não-pioneira), submetidas ao déficit hídrico severo em condições de casa de vegetação. As sementes foram inoculadas desde a semeadura. Houve três grupos de associação plântula-BPCP: Ab-V5, ZK ou *pool* (coinoculação, Ab-V5 e ZK) e o controle (mudas não inoculadas – NIn), em duas condições hídricas: capacidade de campo (CC) e déficit hídrico (DH). A coinoculação e a inoculação com Ab-V5 ou ZK nas mudas de *C. pachystachya* promoveram efeitos no incremento de 42,7% de biomassa total em comparação às mudas não inoculadas, e a coinoculação acarretou maior massa seca da raiz (MSR), comparadas às mudas inoculadas com Ab-V5 ou às não inoculadas, independente da condição hídrica. Não foi observado efeito na biomassa nas mudas de *C. estrellensis* coinoculadas ou inoculadas com as BPCP. O DH promoveu reduções da biomassa, da área foliar total (AF), do potencial hídrico (Ψ_w) da parte aérea, do conteúdo relativo de água das folhas (CRA), da assimilação líquida de CO₂ (A), da condutância estomática (g_s) e da transpiração (E) em todas as mudas das duas espécies vegetais, comparadas às mantidas na CC. As mudas de *C. pachystachya* sob DH apresentaram maior conteúdo de prolina nas folhas e, quando inoculadas com ZK, foi observada maior peroxidação lipídica nas folhas. As mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH apresentaram maior conteúdo de prolina nas folhas e raízes, menor peroxidação lipídica nas folhas e, quando inoculadas com ZK, maior conteúdo de glicina-betaína nas raízes e preveniu a redução da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m). Esses resultados indicam o potencial da aplicação das BPCP como técnica promissora para aumentar a tolerância à seca, especialmente, na promoção do crescimento de mudas arbóreas neotropicais destinadas ao reflorestamento.

Palavras-chave: Mata Atlântica; árvores neotropicais; seca; estresse abiótico; reflorestamento; restauração; bactérias associativas; consórcio bacteriano.

de Lima, John David Oliveira. **Effect of coinoculation of growth-promoting bacteria on seedlings of neotropical tree species subjected to severe water deficit**. 2023. 60 p. Dissertation (Master in Biological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The recovery of deforested areas is one of the necessary measures to mitigate the effects of climate change. One of the strategies adopted for the restoration of these areas is the planting of native tree species. However, the microclimatic conditions of deforested areas cause several difficulties for the full development of a seedling, mainly due to the low availability of water in the soil. The use of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) can contribute to increasing plant tolerance to abiotic stresses, especially drought. Several publications address inoculation and coinoculation of PGPB in cultivated species and some studies address only the inoculation in neotropical tree species. The aim of this study was to analyze the effect of coinoculation with PGPB - *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) and *Bacillus velezensis* (ZK) - on biometric, physiological and biochemical variables in seedlings of *Cecropia pachystachya* Trécul and *Cariniana estrellensis* Raddi, submitted to deficit severe water stress under greenhouse conditions. Seeds were inoculated from sowing. There were three groups of seedling-PGPB association: Ab-V5, ZK, or pool (coinoculation, Ab-V5 and ZK) and control (non-inoculated seedlings - NIn), in two water conditions: field capacity (FC) and deficit water (DW). Coinoculation and inoculation with Ab-V5 or ZK of *C. pachystachya* seedlings promoted effects in the increment of 42.7% of total biomass compared to non-inoculated seedlings, and coinoculation resulted in higher root dry mass (MSR) compared to seedlings inoculated with Ab-V5 or non-inoculated, regardless of water condition. No effect was observed on the increment of biomass in *C. estrellensis* seedlings (co)inoculated with these PGPB. DW promoted reductions in biomass, total leaf area, shoot water potential, leaf relative water content, net CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in all seedlings of the two plant species, compared to those maintained in FC. *C. pachystachya* seedlings under DH showed higher proline content in the leaves and, when inoculated with ZK, higher lipid peroxidation was observed in the leaves. *C. estrellensis* seedlings subjected to DH showed higher proline content in leaves and roots, lower lipid peroxidation in leaves and, when inoculated with ZK, higher glycine-betaine content in roots. These results indicate the potential of applying BPCP as a promising technique to increase drought tolerance, especially in promoting the growth of neotropical tree seedlings intended for reforestation.

Key-words: Atlantic Forest; neotropical trees; drought; abiotic stress; reforestation; restoration; associative bacteria; bacterial consortium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Plântulas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) após 90 dias da semeadura. Bandejas foram irrigadas com inóculos: *Bacillus velezensis* (ZK), *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e o pool de ZK e Ab-V5. Uma bandeja foi irrigada apenas com água (controle – NIn)29
- Figura 2** – Plântulas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) em casa de vegetação sem sombreamento.....30
- Figura 3** – Condutância estomática (g_s) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A) e de *Cariniana estrellensis* (B) submetidas ao déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas do gráfico A, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos do dia 0 - dia anterior ao início do DH), ou minúsculas (comparam tratamentos do dia 1 - primeiro dia do DH) ou minúsculas sublinhadas (comparam tratamentos do dia 2 – último dia do DH) iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação. Não houve diferença entre os tratamentos no gráfico B (Fisher LSD; $P < 0,05$; $n = 7$)36
- Figura 4** – Massa seca das raízes (MSR, A), massa seca das folhas (MSF, B), massa seca do caule (MSC, C), massa seca da parte aérea (MSPA, D), massa seca total (MST, E), fração da massa da raiz (FMR, F) e área foliar total (AF, G) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas pontilhadas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA [teste F; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; ($n = 28$, MSR, MSC, MSF, MSPA e MST) ($n = 20$, AF)]. Nas colunas vazias, médias com letras iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação (Fisher LSD; $P < 0,05$; ($n = 14$).....37
- Figura 5** – Assimilação líquida de CO₂ (A, A), condutância estomática (g_s , B), transpiração (E, C), eficiência do uso da água (EUA, D), concentração intercelular de CO₂ (C_i , E) e eficiência instantânea de carboxilação (k , F) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos em CC) ou minúsculas (comparam tratamentos em DH) iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica dentro de cada tratamento referente à inoculação e também para as plantas NIn

- (Fisher LSD; $P < 0,05$; $n = 7$)..... 38
- Figura 6** – Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 44$)..... 39
- Figura 7** – Conteúdo relativo de água (CRA, A), potencial hídrico (Ψ_w , B), conteúdo de prolina de folhas (C), conteúdo de prolina de raízes (D), conteúdo de glicina-betaína de folhas (E) e conteúdo de glicina-betaína de raízes (F) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 20$)..... 39
- Figura 8** – Massa seca das raízes (MSR, A), massa seca das folhas (MSF, B), massa seca do caule (MSC, C), massa seca da parte aérea (MSPA, D), massa seca total (MST, E), fração da massa da raiz (FMR, F) e área foliar total (AF, G) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; [($n = 28$, MSC, MSF, MSPA e MST) ($n = 32$, AF)] 41
- Figura 9** – Assimilação líquida de CO_2 (A , A), condutância estomática (g_s , B), transpiração (E , C), eficiência do uso da água (EUA, D), concentração intercelular de CO_2 (C_i , E) e eficiência instantânea de carboxilação (k , F) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 28$)..... 41
- Figura 10** – Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas

representam os erros-padrão. Nas colunas, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos em CC) ou minúsculas (comparam tratamentos em DH) iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica dentro de cada tratamento referente à inoculação e também para as plantas NIn (*Fisher LSD*; $P < 0,05$; $n = 15$) 42

Figura 11 – Conteúdo relativo de água (CRA, A), potencial hídrico (Ψ_w , B), conteúdo de prolina de folhas (C), conteúdo de prolina de raízes (D), conteúdo de glicina-betaína de folhas (E) e conteúdo de glicina-betaína de raízes (F) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas vazias, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste *F*; $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; ($n = 20$). Nas colunas pontilhadas, médias com letras iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação (*Fisher LSD*; $P < 0,05$; $n = 10$)..... 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os valores são médias ± erros-padrão. Médias com letras iguais nas linhas não diferem entre os tratamentos de inoculação (*Fisher LSD*; $P < 0,05$; $n = 5$). Não significativo (ns). [H₂O₂] folhas – concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas; [MDA] folhas – concentração de malondialdeído nas folhas.....40
- Tabela 2** – Variáveis bioquímicas de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os valores são médias ± erros-padrão. Asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica (CC/DH) para cada parâmetro de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,001$; $n = 20$). Não significativo (ns). [H₂O₂] folhas – concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas; [MDA] folhas – concentração de malondialdeído nas folhas.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------------------|--|
| A – | Assimilação líquida de CO ₂ |
| AA – | Ácido ascórbico |
| ABA – | Ácido abscísico |
| Ab-V5 – | Estirpe de <i>Azospirillum brasilense</i> |
| AF – | Área foliar total |
| ANOVA – | Análise de variância |
| APX – | Ascorbato peroxidase |
| BPCP – | Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas |
| °C – | Graus Celsius |
| CAT – | Catalase |
| CC – | Capacidade de campo |
| C _i – | Concentração intercelular de CO ₂ |
| cm – | Centímetro |
| cm ² – | Centímetro quadrado |
| cm ³ – | Centímetro cúbico |
| CO ₂ – | Dióxido de carbono |
| CRA – | Conteúdo relativo de água |
| DAP – | Diâmetro à altura do peito |
| DH – | Déficit hídrico |
| DHAR – | Desidroascorbato redutase |
| E – | Transpiração |
| EPS – | Exopolissacarídeos |
| EROs – | Espécies reativas de oxigênio |
| EUA – | Eficiência do uso da água |
| FMF – | Fração da massa foliar |
| FMR – | Fração da massa da raiz |
| F _v /F _m – | Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II |
| g – | Gramas |

| | |
|---------------------------------|--|
| H ₂ O ₂ – | Peróxido de hidrogênio |
| GPX – | Guaiacol peroxidase |
| GR – | Glutathione redutase |
| <i>g_s</i> – | Condutância estomática |
| GSH – | Glutathione reduzida |
| h – | Hora |
| IPCC – | <i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i> |
| IRGA – | <i>Infra Red Gas Analyzer</i> |
| <i>k</i> – | Eficiência instantânea de carboxilação |
| L – | Litro |
| m – | Metro |
| min – | Minuto |
| MDA – | Malondialdeído |
| MDHAR – | Monodesidroascorbato redutase |
| mg – | Miligrama |
| mL – | Mililitro |
| MPa – | Megapascal |
| MSPA – | Massa seca da parte aérea |
| MSC – | Massa seca do caule |
| MSF – | Massa seca das folhas |
| MSR – | Massa seca da raiz |
| MST – | Massa seca total |
| NADP ⁺ – | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada |
| NIn – | Não inoculada |
| nm – | Nanômetro |
| NO – | Óxido nítrico |
| •O ₂ ⁻ – | Ânion superóxido |
| •OH – | Radical hidroxila |
| O ₂ – | Oxigênio |
| ¹ O ₂ – | Oxigênio singleto |

| | |
|----------------------------|---|
| <i>pool</i> (tratamento) – | consórcio Ab-V5 + ZK |
| RESTORE – | <i>natuRe-basEd SoluTions for imprOving REforestation</i> |
| rpm – | Rotações por minuto |
| Rubisco – | Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase |
| s – | Segundo |
| SOD – | Superóxido dismutase |
| TBARS – | Método de análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| UFC – | Unidade Formadora de Colônias |
| ZK – | Estirpe de <i>Bacillus velezensis</i> |
| Ψ_w – | Potencial hídrico |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | MUDANÇAS CLIMÁTICAS E A IMPORTÂNCIA DA RESTAURAÇÃO FLORESTAL..... | 16 |
| 1.2 | EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO NA FISIOLOGIA DAS PLANTAS | 18 |
| 1.3 | BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTA..... | 20 |
| 2 | OBJETIVO | 25 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 3 | HIPÓTESES | 26 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 | MATERIAL BIOLÓGICO | 26 |
| 4.2 | PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DOS INÓCULOS | 28 |
| 4.3 | CONDIÇÕES DE CULTIVO | 28 |
| 4.4 | ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS | 31 |
| 4.5 | POTENCIAL HÍDRICO | 32 |
| 4.6 | CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA | 32 |
| 4.7 | ANÁLISES BIOMÉTRICAS | 33 |
| 4.8 | ANÁLISES BIOQUÍMICAS..... | 33 |
| 4.9 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 34 |
| 5 | RESULTADOS | 35 |
| 5.1 | MONITORAMENTO DAS MUDAS DURANTE O DÉFICIT HÍDRICO | 35 |
| 5.2 | ANÁLISES BIOMÉTRICAS, FOTOSSINTÉTICAS, BIOQUÍMICAS E RELAÇÕES HÍDRICAS..... | 36 |
| 5.2.1 | <i>Cecropia pachystachya</i> | 36 |
| 5.2.2 | <i>Cariniana estrellensis</i> | 40 |
| 6 | DISCUSSÃO | 44 |
| 7 | CONCLUSÃO | 49 |
| 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 50 |
| | REFERÊNCIAS | 51 |
| | APÊNDICE | 59 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E A IMPORTÂNCIA DA RESTAURAÇÃO FLORESTAL

Atualmente, as mudanças climáticas estão cada vez mais nos debates políticos internacionais diante de seu impacto para a humanidade. Segundo o relatório especial do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), há modelos climáticos que projetam diferenças robustas nas características climáticas regionais entre os dias atuais e o aquecimento global de 1,5°C nas próximas décadas. A maioria dos países da América Central e do Sul está sujeita à alta vulnerabilidade às mudanças climáticas e a baixa capacidade de adaptação. Muitos eventos extremos serão mais frequentes nessas regiões, tais como: elevação de temperaturas, aumento da frequência de chuvas intensas, aumento do nível do mar, erosão costeira, acidificação de oceanos e lagos, e aumento da severidade de secas. Isso afeta, negativamente, a produção agrícola, a pesca tradicional, a segurança alimentar e a saúde humana (IPCC, 2022).

O aquecimento global é considerado uma consequência do aumento dos gases do efeito estufa na atmosfera (Cook et al., 2013; Sherwood et al., 2014), dentre os gases que contribuem para o aumento da temperatura, o dióxido de carbono (CO₂) é o mais representativo (Dixon et al., 1994; Anderson et al., 2016). Globalmente, o principal fator que promove emissões de CO₂ para a atmosfera é queima de combustíveis fósseis e o desmatamento é o segundo maior (van der Werf et al., 2009). No Brasil, a maior fonte de emissão bruta de gases do efeito estufa é devido às mudanças no uso da terra (desmatamento), responsáveis pela emissão de 998 milhões de toneladas de CO₂ em 2020, representando 46% do total nacional (Seeg, 2021).

A conservação das florestas nativas contribui para a manutenção de serviços ambientais, como a preservação dos recursos hídricos, a redução de enxurradas, a manutenção do clima, a transferência de nutrientes entre a atmosfera e as camadas superficiais e profundas do solo, e a estocagem de carbono na biomassa vegetal e no solo (Rodrigues et al., 2009; Allen et al., 2010; Pan et al., 2011). Entretanto, a perda de cobertura vegetal em florestas tropicais vem se intensificando ao longo da história, sobretudo, considerando a exploração de fontes energéticas, expansão da agropecuária e da urbanização e atividades econômicas insustentáveis,

o que resulta na degradação e na destruição dos ecossistemas (Laurentino et al., 2021).

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical da América do Sul, abrangendo uma região heterogênea que se distribui em milhares de fragmentos, desde o Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, a qual compõe uma grande pluralidade de fitofisionomias e diferentes composições florestais (Soares e Medri, 2002; Ribeiro et al., 2011). Esse bioma é considerado um *hotspot*, devido a sua grande diversidade, endemismo e paisagem altamente fragmentada, sendo áreas de grande interesse para conservação (Mittermeier et al., 2004; Ribeiro et al., 2009).

Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica é considerada o bioma com maior alteração antrópica, possuindo aproximadamente 12,4% de sua cobertura original, concentrada em fragmentos pequenos de floresta secundária (< 50 ha) em estágios iniciais ou médios de sucessão, que estão isolados e próximos das bordas das florestas (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2021; Ribeiro et al., 2009). A restauração dessas áreas desflorestadas, como o plantio de mudas nativas e/ou a semeadura direta, é uma das medidas necessárias que auxilia na recuperação da qualidade dos serviços ambientais e da biodiversidade, contribuindo também para mitigação dos efeitos das mudanças climáticas (Dixon et al., 1994; Ellison et al., 2017), já que as áreas de floresta acumulam moléculas de carbono na biomassa e no solo, diminuindo assim a emissão líquida de CO₂ para a atmosfera (Pan et al., 2011; Shimamoto et al., 2014; Cunningham et al., 2015).

O plantio de mudas nativas produz melhores resultados do que a semeadura direta em termos de aumento da sobrevivência das plântulas e, possivelmente, também na aceleração da restauração estrutural dos fragmentos florestais, promovendo a recuperação gradual de processos ecológicos, de biodiversidade e de serviços ambientais (Palma e Laurance, 2015). Entretanto, as condições microclimáticas dos sítios de restauração acarretam diversas dificuldades para o desenvolvimento pleno de uma plântula no campo, pois o desmatamento contribui para o aumento da incidência luminosa, da temperatura do solo, do déficit de pressão de vapor e, ainda, das flutuações do potencial de água do solo (Craven et al., 2010). Portanto, as mudas a serem plantadas devem estar aptas a sobreviver a essas condições de estresse (Nyberg et al., 2012; Ellison et al., 2017).

Para isso, uma das estratégias adotadas por viveiristas é a criação de setores de aclimação nos viveiros, os quais auxiliam na promoção de alterações

metabólicas e morfológicas das mudas que são submetidas ao campo, expondo-as gradativamente às condições ambientais mais semelhantes àquelas encontradas nos locais do plantio, permitindo assim maiores condições de sobrevivência (Claussen, 1996; Calzavara et al., 2015; Mazzanatti et al., 2016). Esse processo envolve a exposição das mudas à alta luminosidade e à diminuição gradativa da irrigação, por quantidade e frequência (Embrapa, 2002, 2013). Dessa forma, a rustificação de mudas é necessária diante das condições de déficit hídrico (DH), já que em ambientes desflorestados há maior déficit de pressão de vapor, maior luminosidade, menor infiltração de água no terreno e menor capacidade de retenção hídrica no solo do que em áreas florestais (Lal, 1996; Nyberg et al., 2012; Ellison et al., 2017).

1.2 EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO NA FISIOLOGIA DAS PLANTAS

O DH é um estresse que ocorre quando a disponibilidade de água no solo é incapaz de atender à demanda hídrica da planta, resultando em dano potencial aos tecidos vegetais e dependendo da intensidade promove a mortalidade (Swann, 2018). A redução da disponibilidade hídrica é percebida pelas raízes, acarretando um aumento dos níveis de ácido abscísico (ABA) que é transportado por meio do xilema até a parte aérea e o seu acúmulo estimula o fechamento estomático (Davies e Zhang, 1991; Wilkinson e Davies, 2010; Hossain et al., 2016; Gupta et al., 2020). Isso acarreta redução da condutância estomática (g_s) promovendo uma redução da perda de água por meio da transpiração, amenizando a diminuição do potencial hídrico (Ψ_w) nas folhas (Sperry et al., 2002).

Por outro lado, uma queda na g_s ocasiona uma redução na entrada de CO_2 no meio intercelular do mesofilo, limitando a atividade carboxilase da enzima Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase (Rubisco) no estroma (Flexas et al., 2002; Flexas et al., 2006; Wilkinson e Davies, 2010). Essa menor disponibilidade de CO_2 no mesofilo em relação ao oxigênio (O_2), associada a manutenção da incidência luminosa, induz aumento da atividade oxigenase da Rubisco (fotorrespiração) que ocasiona perda parcial do carbono, promovendo assim uma diminuição da assimilação líquida de CO_2 (A) e, conseqüentemente, um menor incremento de biomassa vegetal (Nogués e Baker, 2000; Grant, 2011; Lawson e Vialet-Chabrand, 2019; Gupta et al., 2020).

A redução das reações de carboxilação da Rubisco, causada pela baixa absorção de CO₂ devido ao DH, afeta o transporte de elétrons na membrana dos tilacóides e nas lamelas estromais para redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP⁺) podendo ocorrer a redução do O₂ que pode se tornar um dos aceptores de elétrons (Dat et al., 2000). O O₂ reduzido produz espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxila (\bullet OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido (\bullet O₂⁻), e o O₂ excitado pela clorofila produz oxigênio singleto (¹O₂) (Anjum et al., 2011; Das e Roychoudhury, 2014). Quando essas EROs aumentam a níveis tóxicos, as células vegetais podem ser danificadas, acarretando o aumento da peroxidação lipídica, da degradação proteica e da fragmentação do DNA (Grant, 2011). Esses níveis de EROs também contribuem para o aumento do conteúdo de malondialdeído (MDA), que é considerado um marcador da peroxidação lipídica de membranas como consequência do estresse oxidativo (Anjum et al., 2011).

Embora a concentração de níveis tóxicos de EROs promova danos oxidativos nas estruturas celulares, em níveis toleráveis de moléculas como o H₂O₂ podem atuar como sinalizadoras e ativar mecanismos de tolerância a estresses abióticos interagindo com outras moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico (NO) (Niu e Liao, 2016). Existem duas rotas metabólicas antioxidantes, enzimática e não-enzimática, que estabelecem mecanismos de manutenção do balanço entre produção e eliminação de EROs, o que auxilia na manutenção das vias bioquímicas celulares (Das e Roychoudhury, 2014). Os antioxidantes enzimáticos são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona redutase (GR) e guaiacol peroxidase (GPX); e os antioxidantes não-enzimáticos são: ácido ascórbico (AA), glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenóides, compostos fenólicos, flavonóides e prolina (Das e Roychoudhury, 2014).

Outras respostas fisiológicas podem ocorrer diante do DH. Os mecanismos de dissipação de energia, como o fluxo cíclico de elétrons no fotossistema I, a perda de energia na forma de calor por meio de pigmentos fotoprotetores e a fotorrespiração auxiliam na diminuição do potencial de formação de EROs e na proteção do aparelho fotossintético, evitando a fotoinibição crônica (Franco et al., 2007; Voss et al., 2013; Fang e Xiong, 2014). O ajuste osmótico é outro mecanismo que promove a manutenção do turgor foliar por meio do acúmulo de solutos compatíveis, como a prolina, a sacarose, os carboidratos solúveis e a glicina-betaína. Isso acarreta a

redução do potencial osmótico o qual promove redução do Ψ_w , intensificando a absorção de água do solo em DH pelas raízes (Anjum et al., 2011).

O DH interfere no crescimento celular que é considerado um dos processos fisiológicos mais sensíveis à seca devido à redução da pressão de turgor, contribuindo para a redução da expansão celular (Anjum et al., 2011). A nutrição mineral das plantas também é afetada, uma vez que a seca pode influenciar os fatores físico-químicos do solo, causando deficiência de nutrientes e ainda reduzindo a mobilidade e o aporte de nutrientes para a planta (Ahmad et al. 2016).

Em relação às respostas biométricas, as plantas podem manter o crescimento das raízes em detrimento do crescimento da parte aérea, favorecendo a proporção da área de absorção de água em comparação a área de perda de água (Mokany et al., 2006; 2007; Poorter et al., 2012). Além disso, as plantas podem apresentar senescência e abscisão foliar, diminuindo assim a superfície transpirante e a A (Poorter et al., 2012; Gupta et al., 2020).

1.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

A aclimação das mudas é uma das estratégias adotadas por viveiristas para auxiliar no aumento da tolerância das plântulas em ambientes de reflorestamento, e a busca de novas alternativas para potencializar esse objetivo é fundamental. O uso de espécies vegetais associadas a Bactérias Promotoras do Crescimento em Plantas (BPCP) tem sido uma importante ferramenta biotecnológica capaz de induzir ou alterar vias bioquímicas de tolerância à seca em plantas (Bashan e de-Bashan, 2010; Vurukonda et al., 2016; Khan et al., 2018).

As BPCP constituem um grupo de microrganismos que estabelece relações benéficas com as plantas e possuem a capacidade de colonizar a rizosfera, a superfície das raízes e tecidos internos das plantas (Hungria et al., 2010). Os exsudatos das raízes constituem de diversos compostos liberados por diferentes partes do sistema de raízes que criam um ambiente único no solo circundante, a rizosfera, onde ocorrem interações mútuas entre a planta e os microrganismos (Ortíz-Castro et al., 2009). Esses compostos são constituídos por açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenólicos, vitaminas, metabólitos secundários, proteínas, CO_2 , álcoois e aldeídos (Ortíz-Castro et al., 2009).

Os primeiros experimentos de campo com BPCP (bactérias associativas) ocorreram na década de 1980 com *Azospirillum* sp., em que foram observados efeitos benéficos sobre o crescimento e a produtividade das plantas por meio da redução dos estresses ambientais promovidos por esses microrganismos (Bashan e de-Bashan, 2010). Além do *Azospirillum* sp., outros gêneros são capazes de promover o efeito de crescimento em plantas, como *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. e *Variovorax* sp. (Hayat et al., 2010; Vejan et al., 2016; Khan et al. 2018).

O potencial efeito das BPCP sobre o crescimento e a produtividade das culturas agrícolas contribuiu para publicação de diversos estudos ao longo das últimas décadas (Barka et al. 2006; Bashan e de-Bashan, 2010; Hungria et al., 2010; Rojas-Tapias et al., 2012; Almeida et al., 2021). A partir desses estudos, foi observado que o efeito de crescimento das plantas pode ocorrer mediante a produção de fitormônios por BPCP, como indol-3-acético (IAA) e giberelinas (GA), que aumentam o desenvolvimento dos pelos da raiz e aumentam a área total da raiz, o que permite maior absorção de nutrientes pelas plantas (Khan et al., 2018). As BPCP melhoram as taxas de fotossíntese em plantas sob condições de estresse hídrico mediante produção de citocininas que contribui no aumento da condutância estomática, e promove divisão e diferenciação celular nos estágios iniciais do desenvolvimento foliar, estimulando aumento do número de feixes vasculares e do número de células por área foliar (Ahluwalia et al., 2021). Nas mudas de *Sambucus williamsii* inoculadas com *Acinetobacter calcoaceticus*, sob DH, foram observadas maior *A* (13%) e maior *g_s* (11,6%) do que as mudas não inoculadas (Liu et al., 2019).

A produção da enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) desaminase por BPCP estimula o crescimento vegetal atraindo e clivando o ACC produzido pela planta, diminuindo assim o nível de etileno (Glick et al., 2005). A inoculação de plantas de milho (*in vitro*) com *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Achromobacter xylosoxidans* ou *Leclercia adecarboxylata*, sob estresse hídrico, estimulou produção ACC desaminase que reduziu níveis de etileno, resultando melhor crescimento de raiz e da parte aérea, melhor absorção de nutrientes e melhor conteúdo de clorofila (Danish et al., 2020).

As BPCP podem aumentar o suprimento de nutrientes na rizosfera e/ou estimular os sistemas de transporte de íons nas raízes (Vacheron et al., 2013). Há estirpes de BPCP que, mediante atividade da enzima nitrogenase, fixam o nitrogênio

atmosférico e o disponibilizam para as plantas como amônia (Ahluwalia et al., 2021). Outra característica desses microrganismos é a capacidade de solubilizar fosfato mediante liberação de ácidos orgânicos que quelam os cátions ligados ao fosfato e a produção de fosfatases/fitases que hidrolisam formas orgânicas de compostos de fosfato, aumentando a disponibilidade desse nutriente para as plantas (Vacheron et al., 2013). As BPCP podem produzir sideróforos, moléculas orgânicas quelantes de ferro de alta afinidade, que atuam no controle de fitopatógenos, na solubilização do fosfato e na disponibilidade de ferro (Fe) às plantas (Ingle e Padole, 2017; Khan et al., 2018; Ahluwalia et al., 2021).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) por microrganismos associados às plantas submetidas ao DH contribuem na prevenção da dessecação, formando biofilmes hidrofílicos na superfície da raiz, e na melhor agregação do solo-raiz (Ahluwalia et al., 2021). A inoculação de sementes de milho com estirpes de *Pseudomonas* spp. produtoras de EPS, sob DH, melhoraram a biomassa vegetal, o conteúdo relativo de água (CRA), o Ψ_w foliar, a relação solo aderido/raiz e a diminuição da perda de água foliar (Sandhya et al., 2010).

O acúmulo de prolina em muitas espécies de plantas submetidas ao estresse hídrico tem sido correlacionado à tolerância ao DH (Anjum et al., 2011). A prolina é um dos principais osmoprotetores que contribui para manutenção do turgor celular e estabilização de estruturas como proteínas, enzimas, membranas celulares e lipídios; podendo agir como tampão de pH citosólico e atuar como fonte de carbono orgânico, nitrogênio e energia durante o estágio de recuperação do estresse hídrico (Ahluwalia et al., 2021). A inoculação de plantas de milho com *Pseudomonas fluorescens* (estirpes 153 ou 169) ou com *Pseudomonas putida* (estirpes 4 ou 108), submetidas ao DH, resultou em maior conteúdo de prolina nas folhas do que as plantas não inoculadas (Ansary et al., 2012). Maior acúmulo do conteúdo de prolina e de glicina-betaína em plantas inoculadas com BPCP indica melhor tolerância dessas plantas ao estresse hídrico do que plantas não inoculadas (Vurukonda et al., 2016). Zhang et al. (2010) observaram nas mudas de *Arabidopsis thaliana*, sob DH e inoculadas com *Bacillus subtilis* (GB03), maior acúmulo de colina (precursor de glicina-betaína) e de glicina-betaína, promovendo efeito osmoprotetor nessas mudas.

As BPCP podem contribuir no aumento da concentração e da atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo assim o acúmulo de EROs (Ahluwalia et al., 2021). Foi observado nas mudas de batatas inoculadas com *Bacillus subtilis*, sob estresse

hídrico, menor produção de EROs e MDA e maior atividade enzimática de CAT, SOD e peroxidase com maior produção de açúcares solúveis totais, proteínas solúveis totais e prolina (Batool et al., 2020).

A maioria dos trabalhos publicados nas últimas décadas estudaram os efeitos das BPCP em espécies cultivadas e, recentemente, alguns trabalhos foram elaborados para analisar os efeitos desses microrganismos em espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica (Tiepo et al., 2018, 2020a; Souza et al., 2020; Calzavara et al., 2021). Souza et al. (2020) observaram que as sementes de espécies de diferentes grupos sucessionais da Mata Atlântica inoculadas com BPCP tiveram maior germinação e maior vigor das plântulas, especialmente, em espécies pioneiras. A inoculação de sementes de *Cecropia pachystachya* com *A. brasilense* (Ab-V5), *Bacillus* sp. (*Bacillus velezensis* – ZK) ou *Azomonas* sp. (inoculadas individualmente) aumentou a porcentagem de sementes germinadas e o índice de vigor das mudas, enquanto que o tempo médio de germinação diminuiu, comparadas ao controle (mudas não inoculadas). Nas plantas de *Trema micrantha* inoculadas com ZK ou *Azomonas* sp., foi observado maior índice de vigor das mudas em comparação ao controle. A inoculação com ZK ou *Azomonas* sp. em mudas de *Cabralea canjerana* apresentou maior atividade de fenilalanina amônia liase e polifenol oxidase; e menor porcentagem de sementes germinadas e menor índice de vigor, comparadas às mudas não inoculadas (Souza et al., 2020).

Calzavara et al. (2021) realizaram experimento com limitações de nitrogênio e observaram aumento da concentração de moléculas nitrogenadas em mudas de três espécies vegetais, *C. pachystachya*, *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis*, inoculadas com ZK em comparação às mudas não inoculadas. A inoculação com estipes bacterianas teve efeito positivo na A em mudas de duas espécies vegetais: *H. popayanensis* inoculadas com ZK em e *C. estrellensis* inoculadas com Ab-V5, comparadas às mudas não inoculadas (Calzavara et al., 2021).

Hertel (2020) estudou espécies vegetais nativas da Mata Atlântica submetidas ao DH moderado e concluiu que a inoculação com ZK em mudas de *Hymenaea courbaril* melhorou as relações hídricas das plantas e influenciou positivamente no metabolismo do nitrogênio, aumentando o conteúdo de proteínas foliares. A inoculação dessa mesma espécie vegetal com Ab-V5 também estimulou o metabolismo do nitrogênio e ambas as estirpes (Ab-V5 ou ZK) estimularam o acúmulo

de prolina nas folhas. Para *Bauhinia forficata*, a inoculação com Ab-V5 permitiu a manutenção da A, sob DH, diminuiu a peroxidação lipídica nas folhas e a inoculação com Ab-V5 ou ZK aumentou a eficiência do uso da água (EUA) pela planta (Hertel, 2020).

Tiepo et al. (2018) observaram efeitos positivos sobre a massa seca da raiz e da parte aérea em mudas *T. micrantha* e *C. estrellensis* inoculadas com ZK ou *Azorhizophillus* sp. ou *Azomonas* sp. (somente em *C. estrellensis*), pois não houve reduções de massas nas mudas submetidas ao DH moderado em comparação aos seus respectivos tratamentos em solo na capacidade de campo (CC). Sob estresse hídrico, a inoculação de mudas de *T. micrantha* com *Azorhizophillus* sp. e mudas de *C. estrellensis* com *Azomonas* sp. promoveu maior Ψ_w (parte aérea) nessas mudas, comparadas às mudas não inoculadas, favorecendo o estado hídrico das plantas. A inoculação com ZK em mudas de *T. micrantha*, sob DH, promoveu reduções no teor de peróxido de hidrogênio e na peroxidação lipídica, e com *Azomonas* sp. promoveu reduções apenas no teor de peróxido de hidrogênio. Essas observações indicam maior tolerância dessas plantas inoculadas aos possíveis danos oxidativos causados pelo estresse hídrico (Tiepo et al., 2018).

Tiepo et al. (2020a) verificaram, em mudas de *C. pachystachya* submetidas ao DH moderado e inoculadas com Ab-V5, aumento da atividade de APX e SOD em relação às mudas não inoculadas sob DH, afetando positivamente o nível de compostos antioxidantes não enzimáticos. A inoculação com Ab-V5 em mudas de *C. estrellensis* sob o DH aumentou a atividade de APX. Em ambas as espécies arbóreas, a inoculação com Ab-V5 ou ZK induziu aumento no teor de trigonelina, composto antioxidante não enzimático, em comparação com plantas não inoculadas mantidas na CC ou submetidas ao DH (Tiepo et al., 2020a).

Os consórcios de microrganismos são usados com objetivo de obter respostas mais eficazes para promoção de tolerância em espécies vegetais (coinoculação) a estresses bióticos e abióticos, comparados à inoculação individual de microrganismos em plantas (Hossain et al., 2016). Benjelloun et al. (2021) observaram maior biomassa e maior rendimento de grãos de mudas de *Cicer arietinum* coinoculadas com *Mesorhizobium* sp. (MA72) e *Enterobacter aerogenes* (P1S6), comparadas à inoculação individual das estirpes bacterianas. Apesar disso, nem sempre a coinoculação promoverá efeitos sinérgicos, podendo haver uma competição entre as estirpes e resultar em crescimento reduzido da planta. Probanza

et al. (2002) concluíram as estirpes *Bacillus licheniformis* (CECT 5106) ou *Bacillus pumilus* (CECT 5105) inoculadas em *Pinus pinea* promoveram o crescimento vegetal, mas esse efeito não foi observado quando houve a coinoculação. Outro resultado da coinoculação pode ser ausência de um efeito aditivo na promoção de tolerância em plantas a estresses ambientais, comparadas às formas individuais de inoculação. Almeida et al. (2021) observaram maior altura e maior massa seca das raízes e da parte aérea em mudas de milho inoculadas com *Bacillus thuringiensis* (RZ2MS9) ou coinoculadas com RZ2MS9 e Ab-V5, comparadas às mudas não inoculadas, sendo que não foi observado diferenças nesses parâmetros entre as mudas inoculadas ou coinoculadas.

A partir da necessidade de realizar ações de reflorestamento na Mata Atlântica sob um contexto de períodos prolongados de seca, intensificados pelas mudanças climáticas, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas para potencializar a tolerância de mudas nativas de diferentes grupos sucessionais utilizadas nessas ações. De acordo com a busca na literatura, não foi encontrado estudos sobre os efeitos da coinoculação de BPCP em mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica submetidas ao DH severo.

Este trabalho está inserido no projeto transnacional natuRe-basEd SoluTions for imprOving Reforestation (RESTORE) que objetiva diminuir os impactos negativos das mudanças climáticas por meio da restauração florestal e visa utilizar ferramentas biotecnológicas para melhorar o sucesso da restauração florestal (Biodiversa, 2023; UEL; 2023).

2 OBJETIVO

Analisar o efeito da coinoculação com bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) - *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus velezensis* (ZK) – sobre variáveis biométricas, fisiológicas e bioquímicas em mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul e de *Cariniana estrellensis* Raddi, submetidas ao déficit hídrico severo em condições de casa de vegetação.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e comparar alterações biométricas, fisiológicas e bioquímicas nas mudas de *Cecropia pachystachya* e de *Cariniana estrellensis*, submetidas ao DH severo, mediante a inoculação e a coinoculação de BPCP;
- Relacionar a melhor resposta fisiológica/metabólica do efeito da inoculação e da coinoculação bacteriana com o grupo sucessional das espécies arbóreas;
- Avaliar o efeito da inoculação e da coinoculação no crescimento e na fisiologia das mudas mantidas na capacidade de campo (CC).

3 HIPÓTESES

1. Mudas inoculadas ou coinoculadas com BPCP apresentam alterações biométricas, fisiológicas e bioquímicas que favorecem, de acordo com o grupo sucessional, a melhor tolerância ao DH severo;
2. A coinoculação bacteriana é mais efetiva em promover respostas biométricas, fisiológicas e bioquímicas que favorece no aumento da tolerância ao DH severo, em relação à inoculação bacteriana individual.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As duas espécies arbóreas utilizadas neste estudo, *Cecropia pachystachya* Trécul (embaúba-do-brejo) e *Cariniana estrellensis* Raddi (jequitibá-branco), foram selecionadas devido ao seu uso frequente em sítios de reflorestamento no Bioma Mata Atlântica.

A espécie *C. pachystachya* é pertencente à família Urticaceae, popularmente, conhecida como Embaúba-do-brejo. Trata-se de uma espécie arbórea pioneira, perenifólia com densidade média da madeira de 0,41 g/cm³. Geralmente, apresenta 4 a 8 m de altura podendo atingir, excepcionalmente, 25 m de altura e 45 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) na idade adulta. No Brasil, essa espécie ocorre em todos os biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas e Pantanal (Embrapa, 2006; Zanne et al., 2009; Gaglioti e Aguiar, 2020).

A espécie *C. estrellensis* é pertencente à família Lecythidaceae, popularmente, conhecida como Jequitibá-branco. Trata-se de uma espécie arbórea não-pioneira, heliófila que tolera sombreamento na fase juvenil, semidecídua no inverno, encontrada no sub-bosque chegando a atingir o dossel, com densidade média da madeira de 0,64 g/cm³. Geralmente, apresenta 15 a 35 m de altura e 50 a 80 cm de DAP podendo atingir, excepcionalmente, 50 m de altura e 215 cm de DAP na idade adulta. No Brasil, essa espécie ocorre na Amazônia, Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica (Embrapa, 2003; Zanne et al., 2009; Smith e Prance, 2015).

As duas estirpes bacterianas utilizadas neste estudo, *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus velezensis* (ZK), foram selecionadas considerando os resultados obtidos em experimentos anteriores, do grupo de estudos da UEL, realizados em casa de vegetação com espécies arbóreas neotropicais (Tiepo et al., 2018, 2020a; Souza et al., 2020; Calvazara et al., 2021).

A estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*) é registrada no Ministério da Agricultura para uso em inoculantes comerciais (Hungria et al., 2010), caracterizada como diazotrófica, possuindo a capacidade de sintetizar sideróforos, auxinas, citocininas e giberelinas, que podem agir como sinalizadores no metabolismo vegetal ou induzir respostas de crescimento na parte aérea e nas raízes das plantas (Bashan e de-Bashan, 2010; Fukami et al. 2017).

A estirpe ZK (*Bacillus velezensis*) (Goes et al., 2012; Dunlap et al., 2016; Tiepo et al., 2020a) foi isolada a partir de raízes de girassol em solo agrícola e caracterizada como BPCP por Goes et al. (2012), desempenhando atividade antagônica (*in vitro*) contra *Sclerotinia sclerotiorum* (causador do mofo-branco) e possuindo a capacidade de sintetizar auxinas e sideróforos, que são compostos importantes para a promoção do crescimento vegetal; porém, essa estirpe não é diazotrófica.

4.2 PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DOS INÓCULOS

As estirpes bacterianas utilizadas fazem parte da Coleção de BPCP da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e os inóculos foram preparados de acordo com Oliveira et al. (2017).

As estirpes de BPCP foram inicialmente cultivadas em 5 mL de meio líquido DYGS (*Dextrose Yeast Glutamato*) em tubos de ensaio mantidos sob agitação orbital (180 rpm) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h para a preparação do pré-inóculo. Os inóculos foram preparados a partir de 500 μL do pré-inóculo inoculado em 50 mL de meio de cultura F4 (FORM15) em Erlenmeyer e mantido sob agitação orbital (180 rpm) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h (Oliveira et al., 2017). Após o período de crescimento, as culturas foram normalizadas por diluição do meio de cultura F4 em água destilada (1:1.000) até uma densidade final de 1×10^6 UFC mL^{-1} . Após o preparo individual dos inóculos (Ab-V5 ou ZK), foi utilizado a proporção de 1:1 ($0,5 \times 10^6$ UFC Ab-V5 mL^{-1} + $0,5 \times 10^6$ UFC ZK mL^{-1}) para a produção do coinóculo (*pool*, Ab-V5 + ZK). A partir disso ocorreu a aplicação nas sementes e nas mudas.

A aplicação nos tratamentos foi efetuada com a adição de 1 L de inóculo diretamente na areia esterilizada em bandejas de 4 L, uma vez a cada 30 dias a partir da semeadura. Após o transplântio das plântulas para tubetes de 290 mL, a aplicação nos tratamentos foi efetuada com a adição de 40 mL de inóculo diretamente no substrato, uma vez a cada 30 dias. O período total de aplicação dos inóculos ocorreu desde a semeadura até o dia anterior ao início do DH para cada espécie vegetal.

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As sementes de *C. pachystachya* e de *C. estrellensis* foram adquiridas comercialmente por intermédio da empresa Arbocenter Comércio de Sementes – safra 2021. A semeadura ocorreu em areia esterilizada acondicionada em quatro bandejas de polipropileno de 4 L regadas com Ab-V5, outra com ZK e outra com a coinoculação de Ab-V5 e ZK (*pool*). Já para o tratamento controle (NIn), a areia foi irrigada apenas com 1 L água destilada.

A inoculação dessas bactérias associativas a cada uma das espécies vegetais ocorreu no primeiro dia a partir da semeadura e houve uma nova inoculação

a cada 30 dias. Desde a semeadura até o dia anterior ao início do DH severo foram realizadas 11 inoculações para *C. pachystachya* e 6 inoculações para *C. estrellensis*. Isso ocorreu devido a diferença no crescimento das plântulas de cada espécie, durante o desenvolvimento inicial nas bandejas, para estarem aptas ao transplântio.

A hidratação das sementes/mudas foi mantida em todos os tratamentos por meio da irrigação diária do substrato com água da torneira, exceto nos dias em que ocorreram as inoculações. No segundo mês após a semeadura, foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938) com modificações nas bandejas de todos os tratamentos, em concentrações iguais para acelerar o crescimento das plântulas.

As mudas foram mantidas nas bandejas em casa de vegetação com sombreamento parcial (60% de retenção de luz solar) de abril a novembro de 2021 para *C. pachystachya* (Figura 1 A) e de novembro de 2021 a fevereiro de 2022 para *C. estrellensis* (Figura 1 B).

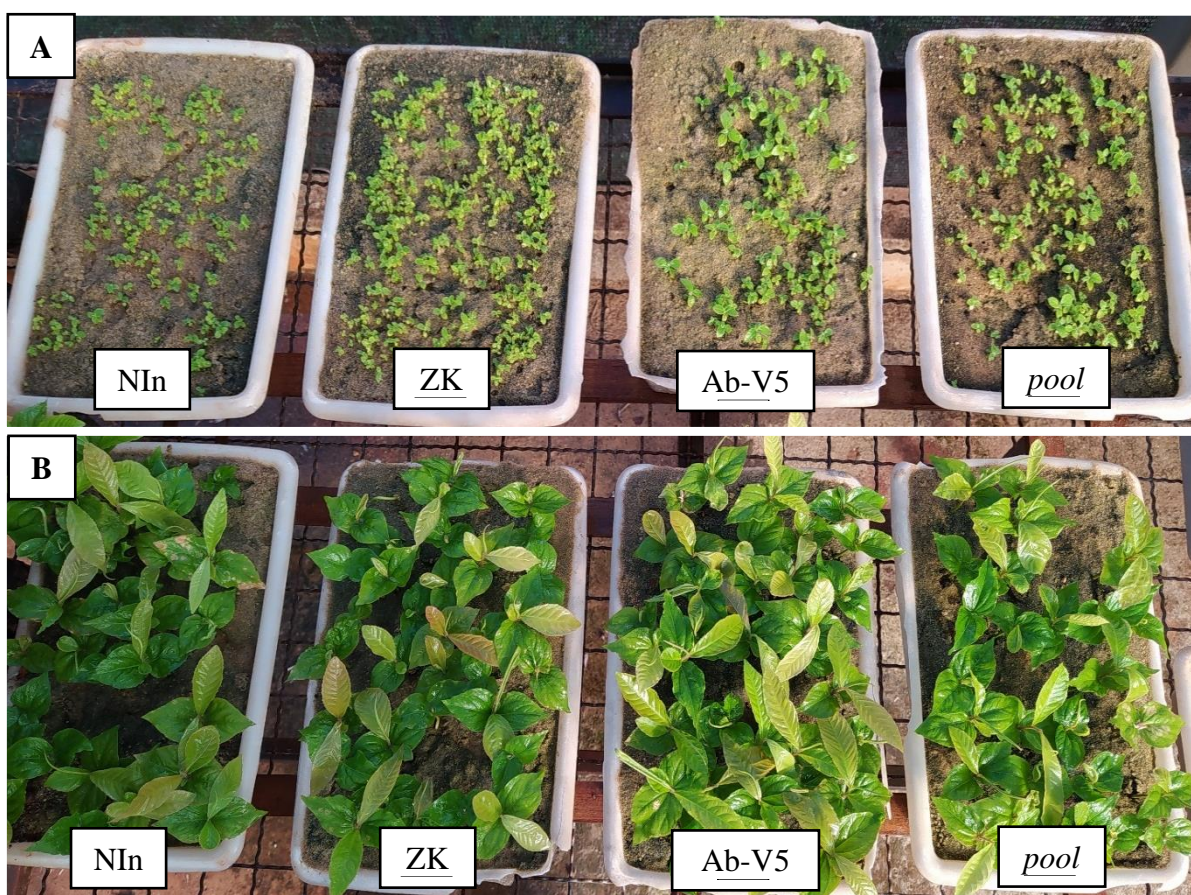


Figura 1. Plântulas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) após 90 dias da semeadura. Bandejas foram irrigadas com inóculos: *Bacillus velezensis* (ZK), *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e o pool de ZK e Ab-V5. Uma bandeja foi irrigada apenas com água (controle – NIn). Fonte: o próprio autor.

Após o desenvolvimento inicial das plântulas nas bandejas, 226 dias para *C. pachystachya* e 104 dias para *C. estrellensis*, as mesmas foram transplantadas em tubetes de 290 mL confeccionados com polipropileno atóxico fotoestabilizado com aditivo anti-ultravioleta. Todas as mudas continham o mesmo volume de substrato, comercializado pela empresa Fertilizare LTDA (PR-95069 10005-1 – Ministério da Agricultura), sendo composto por vermiculita, carvão vegetal, casca de pinus/eucalipto e pó de coco, suplementado com um fertilizante de liberação controlada (5 g/L, 14% N, 14% P₂O₅ e 14% K₂O).

No mesmo dia do transplântio, o substrato foi irrigado com 40 mL de suspensão de células bacterianas em água destilada a 10⁶ UFC mL⁻¹, de acordo com cada tratamento das BPCP. O tratamento sem inoculação (NIn) foi irrigado com água destilada apenas no dia de aplicação dos inóculos. A irrigação foi mantida com água da torneira para todos os tratamentos com frequência diária.

As mudas transplantadas em tubetes (Figuras 2 A e B) permaneceram, inicialmente, por 30 dias em casa de vegetação com sombreamento parcial (60% de retenção de luz solar) e mais 30 dias em casa de vegetação sem sombreamento para o desenvolvimento em condições de luminosidade mais próximas às condições de campo. Esse período ocorreu de dezembro de 2021 a janeiro de 2022 para *C. pachystachya* e de fevereiro a abril de 2022 para *C. estrellensis*.



Figura 2. Plântulas de *Cecropia pachystachya* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) em casa de vegetação sem sombreamento. Fonte: o próprio autor.

Após 60 dias do desenvolvimento das mudas nos tubetes, foi realizada a última rega com os inoculantes de acordo com cada tratamento das BPCP e a última rega com água destilada nas mudas do tratamento NIn. Após 30 minutos dessa última irrigação, foi realizada a primeira coleta de dados de trocas gasosas em todos os tratamentos entre 7:30 a 9:30 h. No dia seguinte, foi iniciado o DH severo por meio da suspensão da irrigação nos tratamentos em DH. Já os tratamentos não submetidos ao DH, ou seja, mantidos em capacidade de campo (CC), permaneceram com a irrigação diária.

Durante todo período de aplicação do DH severo, ocorreu o monitoramento da g_s , diariamente, por meio da coleta de dados de trocas gasosas em todos os tratamentos entre 7:30 a 9:30 h utilizando o Analisador Portátil de Gás Infravermelho (IRGA – *Infra Red Gas Analyzer* – modelo LICOR 6400 XT, *Biosciences Lincoln NE, USA*). O período do DH severo durou até que a g_s do grupo DH atingisse cerca de 10% da g_s do grupo CC (razão $g_s = g_{sDH} / g_{sCC} = 0,1$). A partir do momento em que esse critério foi atingido, realizou-se mais uma coleta de dados de trocas gasosas, potencial de água e coleta de material vegetal para obtenção de dados biométricos e bioquímicos.

O período de aplicação do DH severo realizado em *C. pachystachya* durou dois dias (13 e 14 de fevereiro de 2022). Enquanto para *C. estrellensis* esse período foi de sete dias (23 a 29 de abril de 2022). Os dados de temperatura e umidade relativa do ar (UR) foram obtidos pelo sensor EasyLog EL-USB-2 (Lascar Electronics Ltd. PA, USA) instalado dentro da casa de vegetação. Nos dias 13 e 14 de fevereiro de 2022, a temperatura média foi de 27,3°C, com máxima de 40,5°C e mínima de 18°C, e a UR média foi de 59,1%, com máxima de 82% e mínima de 33,5%. Nos dias 23 a 29 de abril de 2022, a temperatura média foi de 24,8°C, com máxima de 36,5°C e mínima de 17°C, e a UR média foi de 70,7%, com máxima de 90% e mínima de 42,5%.

4.4 ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS

Nos indivíduos das duas espécies estudadas foram determinadas as taxas de assimilação líquida de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de concentração intercelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Além disso, foram calculadas a eficiência do uso da água (EUA : $\mu\text{mol mmol}^{-1}$,

A/E) e a eficiência instantânea de carboxilação (k ; A/C_i , mol m⁻² s⁻¹). As análises de trocas gasosas foram realizadas em dias ensolarados, entre 7:30 h e 9:30 h, a partir do dia anterior do início da aplicação DH severo até o último dia do DH, dia em que ocorreu a desmontagem do experimento. Utilizou-se, para mensuração das trocas gasosas, o IRGA conectado a uma câmara de 6 cm² sob uma radiação fotossinteticamente ativa saturante de 1.500 µmol m⁻² s⁻¹ e a uma taxa de fluxo fixo de ar de 400 µmol m⁻² s⁻¹. Essas medidas foram mensuradas, a partir do ápice, na primeira folha completamente expandida de cada muda.

Foi mensurada a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) em folhas intactas por meio de um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, EUA), conforme descrito por Shimizu et al. (2006). As análises da F_v/F_m foram realizadas antes do amanhecer entre 04:00 h e 05:30 h.

4.5 POTENCIAL HÍDRICO

O potencial hídrico (Ψ_w) da parte aérea de cada muda foi mensurado em Megapascal (MPa) com uma câmara de pressão do tipo Schölander (Soil Moisture – SAPSII, modelo 3115, Santa Barbara, CA, EUA). Essas medidas foram realizadas no último dia de aplicação do DH entre 6:30 h e 8 h.

4.6 CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA

Em ambas as espécies, foi determinado o conteúdo relativo de água (CRA, %) por meio da coleta de 0,1 g de massa fresca de folha de cada muda a partir das 6:30 h do último dia do DH. Cada uma dessas massas frescas de folha foi submersa em água destilada por 24 h para a determinação da massa túrgida. Após a permanência dessas porções de folhas em estufa a 60°C por 72 h, foi obtida a massa seca (Smart e Bingham, 1974). O CRA (%) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{CRA (\%)} = \frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa túrgida} - \text{massa seca}} \times 100$$

4.7 ANÁLISES BIOMÉTRICAS

A área foliar total (AF, cm²) foi obtida a partir das folhas completamente expandidas, utilizando o medidor de área foliar LI-3000CAP acoplado à esteira LI-3050C (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA).

Foram mensuradas as massas das plântulas por meio da coleta da massa seca da raiz (MSR, g), do caule (MSC, g) e das folhas (MSF, g). Para isso, os órgãos vegetais foram segmentados no dia da desmontagem do experimento e acondicionadas em estufa de secagem a 60°C por 72 h. Foi calculada a massa seca total das plântulas (MST, g – soma da MSR, da MSC e da MSF), a massa seca da parte aérea (MSPA, g – soma da MSC e da MSF), fração da massa foliar (FMF: MSF/MST), a fração da massa da raiz (FMR: MSR/MST) e a razão da massa da raiz pela massa da parte aérea (MSR/MSPA).

4.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises bioquímicas foram realizadas a partir de porções frescas de folhas para a concentração de MDA e de peróxido de hidrogênio, e de folhas e de raízes para o conteúdo de prolina e de glicina-betaína. Essas massas foram coletadas no dia da desmontagem do experimento, acondicionadas temporariamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C. Todos os dados bioquímicos foram normalizados por massa seca.

A estimativa da peroxidação lipídica foi determinada por meio da concentração de MDA. Para isso, utilizou-se 100 mg de massa fresca de folhas maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas com ácido tricloroacético a 0,2% em metanol. Após a centrifugação a 12.000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação de MDA por meio da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com medidas de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) (Camejo et al., 1998) utilizando o leitor de microplacas Victor TM 3 (Perkin Elmer, Turku, Finlândia).

O mesmo extrato utilizado no método TBARS foi usado para a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio após reação em gelo com tampão fosfato de potássio 0,1 M e iodeto de potássio 1 M. A determinação foi obtida

a 390 nm utilizando o leitor de microplacas Victor TM 3 (Perkin Elmer, Turku, Finlândia).

A extração e determinação de prolina foram realizadas a partir de 100 mg de massa fresca de folhas e 100 mg de massa fresca de raízes maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas com álcool etílico 70%. Após a centrifugação a 4.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi submetido à reação com nihidrina (1% m/v) em ácido acético a 60%, adicionado etanol a 20%, em uma reação a 95°C em banho-maria por 20 min. A concentração de prolina foi determinada a 520 nm (Carillo et al., 2008) utilizando o leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

O conteúdo de glicina-betaína seguiu a metodologia de Grieve & Grattan (1983) e de Valadez-Bustos et al. (2016), com modificações. A extração e a determinação de glicina-betaína foram realizadas a partir de 10 mg de massa fresca de folhas e 10 mg de massa fresca de raízes, maceradas com nitrogênio líquido, em ácido sulfúrico 1 M (2 N) no banho-maria a 60°C por 10 min. Após a centrifugação a 12.000 rpm por 25 min a 25°C, foi adicionado KI-I₂ gelado ao sobrenadante e acondicionado entre 0°C a 4°C no escuro por 16 h. Após uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 25 min a 0°C, o sobrenadante foi descartado e os cristais de glicina-betaína foram homogeneizados com acetona. Após 2:30 h, o conteúdo foi lido a 365 nm no espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento teve delineamento em blocos casualizados com dois fatores (4 x 2) – fator inoculação com quatro níveis (NIn, Ab-V5, ZK ou *pool*) e fator condição hídrica com dois níveis (CC ou DH). Os tratamentos foram formados por: NIn CC (controle, mudas não inoculadas em solo na CC), ZK CC (mudas inoculadas com ZK em solo na CC), Ab-V5 CC (mudas inoculadas com Ab-V5 em solo na CC), *pool* CC (mudas coinoculadas com ZK e Ab-V5 em solo na CC), NIn DH (mudas não inoculadas sob DH), ZK DH (mudas inoculadas com ZK sob DH), e Ab-V5 DH (mudas inoculadas com Ab-V5 sob DH) e *pool*/DH (mudas coinoculadas com ZK e Ab-V5 sob DH). Foram

utilizadas sete réplicas para os parâmetros de trocas gasosas e de massa seca, onze réplicas para F_v/F_m e cinco réplicas para os parâmetros AF, CRA, Ψ_w e bioquímicos.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Levene), e transformados quando necessário para atingir os pressupostos dos testes paramétricos. Em seguida, esses dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) fatorial (teste F) e, quando houve efeito da interação (inoculação x condição hídrica), as médias foram comparadas pelo teste de Fisher LSD ($P < 0,05$) dentro de cada nível dos fatores de inoculação (NIn, Ab-V5, ZK e *pool*) e de condição hídrica (CC e DH). As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Rstudio (versão 2022.07.1 – Build 554).

5 RESULTADOS

5.1 MONITORAMENTO DAS MUDAS DURANTE O DÉFICIT HÍDRICO

O monitoramento da g_s nas mudas de *C. pachystachya* foi iniciado no dia anterior do início do DH (dia 0) até o final do período do DH (dia 2). As mudas mantidas na CC (dia 0) não apresentaram diferenças na g_s entre os tratamentos (NIn, Ab-V5, ZK ou *pool*). No primeiro dia do DH (dia 1), foi observada redução da g_s nas mudas inoculadas com ZK, comparadas ao controle (NIn). No segundo e último dia do DH (dia 2), observou-se a redução da g_s em todas as plantas inoculadas em comparação ao controle (Figura 3 A).

O monitoramento da g_s nas mudas de *C. estrellensis* também foi iniciado no dia anterior do início do DH (dia 0) até o final do período do DH (dia 7). Não foi observada diferença na g_s entre os tratamentos (NIn, Ab-V5, ZK ou *pool*) em cada um dos dias durante o período do DH (Figura 3 B).

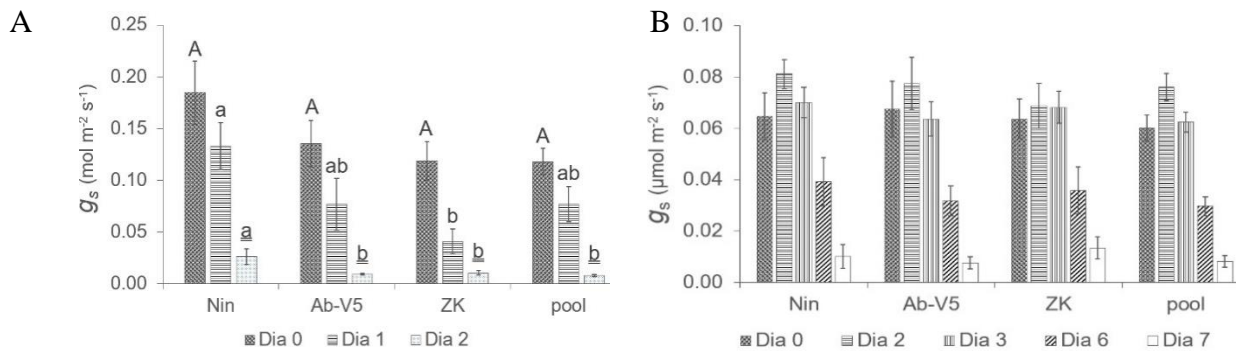


Figura 3. Condutância estomática (g_s) de mudas de *Cecropia pachystachya* (A) e de *Cariniana estrellensis* (B) submetidas ao déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas do gráfico A, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos no dia 0 – dia anterior ao início do DH), ou minúsculas (comparam tratamentos no dia 1 – primeiro dia do DH) ou minúsculas sublinhadas (comparam tratamentos no dia 2 – último dia do DH) iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação. Não houve diferença entre os tratamentos no gráfico B (Fisher LSD; $P < 0,05$; $n = 7$).

5.2 ANÁLISES BIOMÉTRICAS, FOTOSSINTÉTICAS, BIOQUÍMICAS E RELAÇÕES HÍDRICAS

5.2.1 *Cecropia pachystachya*

As mudas de *C. pachystachya* submetidas ao DH apresentaram redução de biomassa e AF em comparação às mudas mantidas na CC (Figura 4 A, B, C, D, E e G). Independente da condição hídrica, as plantas inoculadas com Ab-V5, ZK ou *pool* apresentaram maior MSF, MSC, MSPA e MST em relação às plantas NIn (Figura 4 B, C, D e E).

Foi observada maior MSR nas mudas inoculadas com ZK ou com o *pool*, comparadas ao controle (Figura 4 A). A FMR diminuiu nas mudas inoculadas com Ab-V5 ou ZK em relação às mudas NIn (Figura 4 F), independente da condição hídrica em que as plantas estavam submetidas. A FMF e a razão da MSR/MST não diferiram entre os tratamentos (dados não apresentados).

Houve redução na A , na g_s , na E e na k em mudas de *C. pachystachya* submetidas ao DH, comparadas às mudas mantidas na CC (Figura 5 A, B, C e F). As plantas inoculadas em DH apresentaram maior C_i e menor EUA , comparadas às plantas inoculadas mantidas na CC (Figura 4 D e E).

Foi verificada nas mudas inoculadas com o *pool* na CC redução da g_s em relação às mudas inoculadas com Ab-V5 ou ZK (Figura 5 B), e da E em relação às

mudas inoculadas com Ab-V5 (Figura 5 C). Observou-se maior C_i , e menor A , g_s , E , EUA e k inferiores nas mudas inoculadas e submetidas ao DH em relação às mudas NIn em DH (Figura 5).

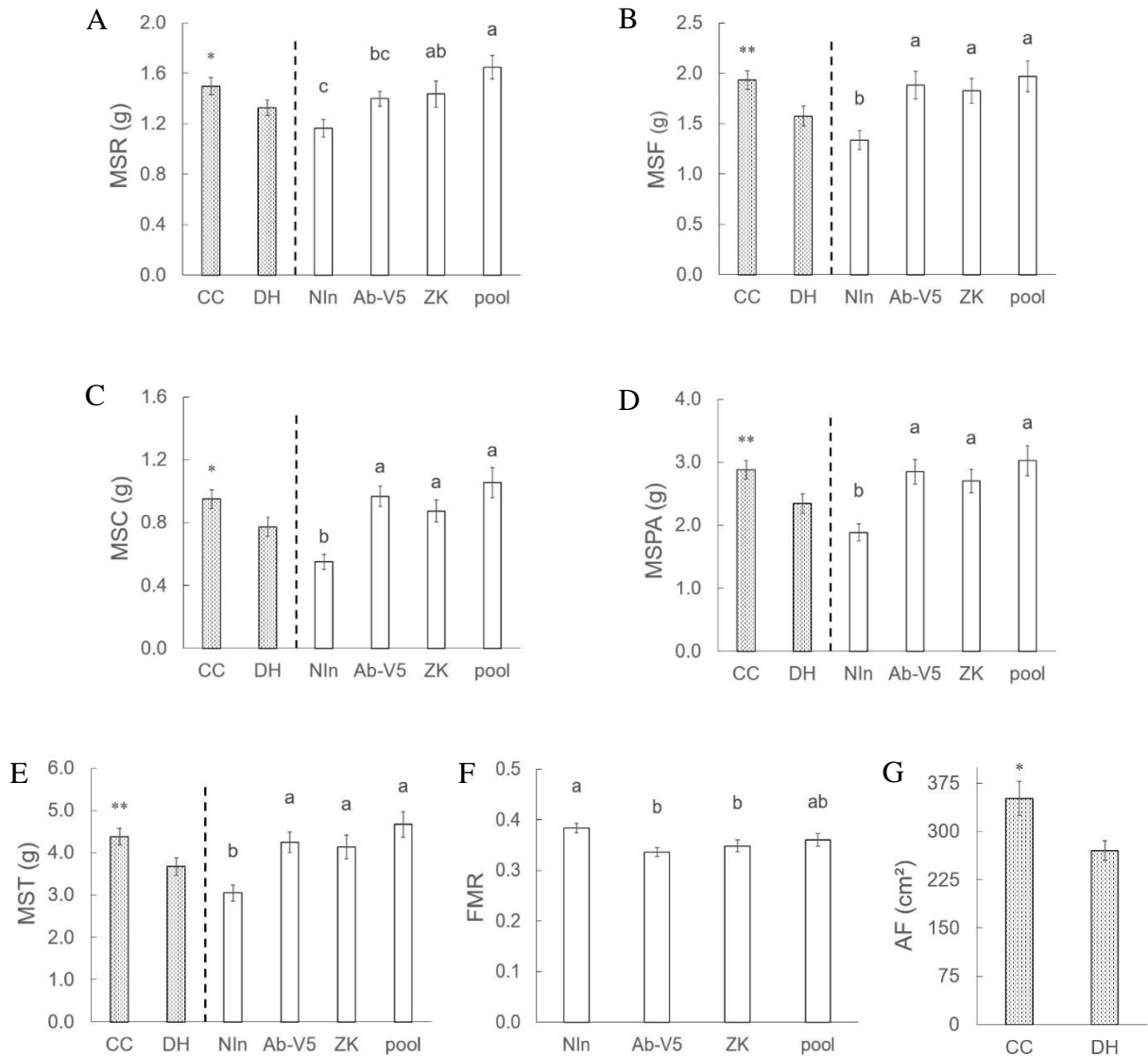


Figura 4. Massa seca das raízes (MSR, A), massa seca das folhas (MSF, B), massa seca do caule (MSC, C), massa seca da parte aérea (MSPA, D), massa seca total (MST, E), fração da massa da raiz (FMR, F) e área foliar total (AF, G) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas pontilhadas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA [teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ($n = 28$, MSR, MSC, MSF, MSPA e MST) ($n = 20$, AF)]. Nas colunas vazias, médias com letras iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação (Fisher LSD; $P < 0,05$; ($n = 14$).

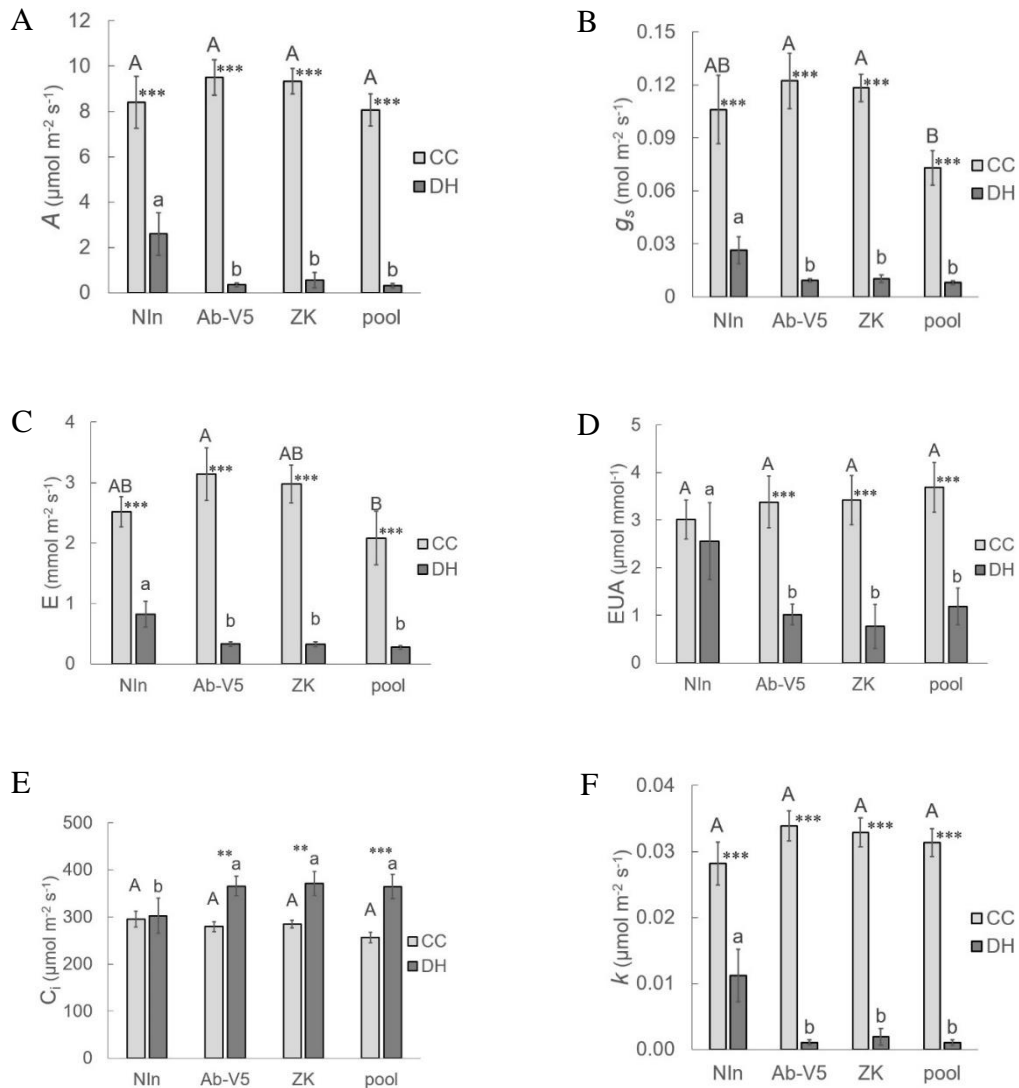


Figura 5. Assimilação líquida de CO_2 (A, A), condutância estomática (g_s , B), transpiração (E, C), eficiência do uso da água (EUA, D), concentração intercelular de CO_2 (C_i , E) e eficiência instantânea de carboxilação (k , F) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos em CC) ou minúsculas (comparam tratamentos em DH) iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica dentro de cada tratamento referente à inoculação e também para as plantas NIn (Fisher LSD; $P < 0,05$; $n = 7$).

As mudas de *C. pachystachya* submetidas ao DH apresentaram menor F_v/F_m em comparação às mudas mantidas na CC, independente da inoculação (Figura 6).

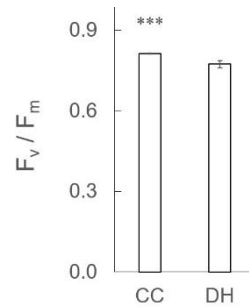


Figura 6. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 44$).

Foi observado menor CRA, menor Ψ_w e maior conteúdo de prolina nas folhas de *C. pachystachya* submetidas ao DH, comparadas às mudas mantidas na CC, independente da inoculação (Figura 7 A, B e C). O conteúdo de prolina nas raízes (Figura 7 D) e o conteúdo de glicina-betaína nas folhas e raízes (Figura 7 E e F) não diferiram entre os tratamentos.

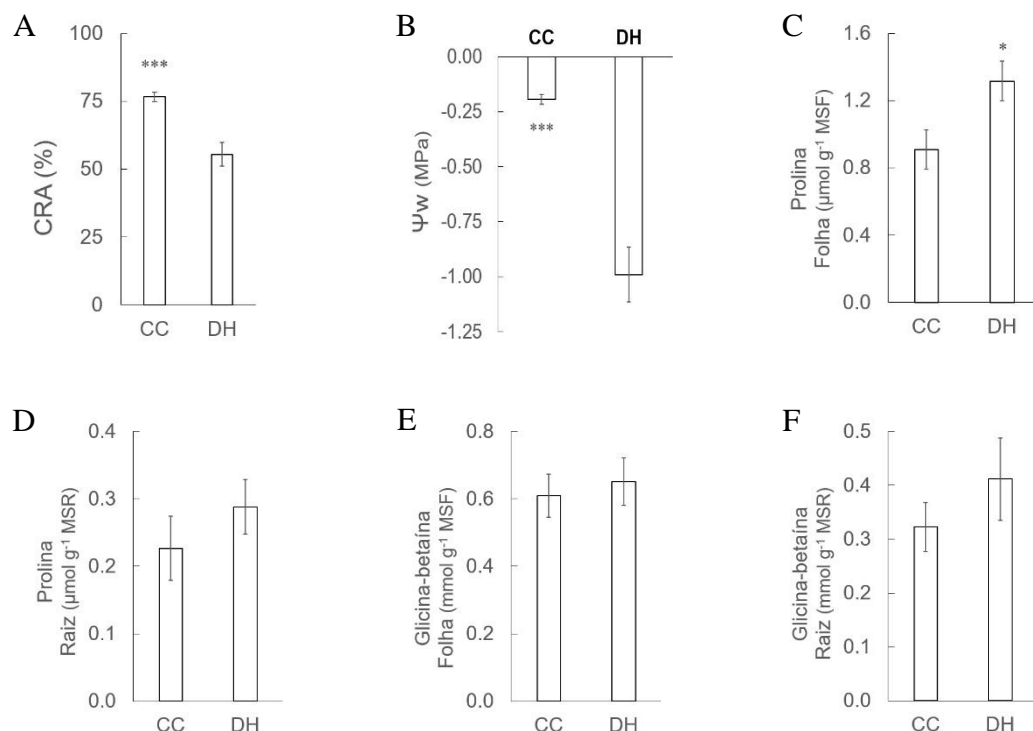


Figura 7. Conteúdo relativo de água (CRA, A), potencial hídrico (Ψ_w , B), conteúdo de prolina de folhas (C), conteúdo de prolina de raízes (D), conteúdo de glicina-betaína de folhas (E) e conteúdo de glicina-betaína de raízes (F) de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas

representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 20$).

Foi observada maior peroxidação lipídica nas folhas (maior conteúdo de MDA) das plantas inoculadas com ZK em relação aos demais tratamentos, independente da condição hídrica (Tabela 1). A concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas não diferiu entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cecropia pachystachya* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os valores são médias \pm erros-padrão. Médias com letras iguais nas linhas não diferem entre os tratamentos de inoculação (Fisher LSD; $P < 0,05$; $n = 5$). Não significativo (ns). [H₂O₂] folhas – concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas; [MDA] folhas – concentração de malondialdeído nas folhas.

| Parâmetro bioquímico | Condição hídrica | Inoculação | | | |
|---|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | NIn | Ab-V5 | ZK | <i>pool</i> |
| [H ₂ O ₂] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$) | CC | 21.903 \pm 3.497 | 20.241 \pm 2.411 | 14.722 \pm 3.372 | 17.959 \pm 2.784 |
| | DH | 13.400 \pm 1.592 | 17.451 \pm 4.515 | 16.346 \pm 3.540 | 12.461 \pm 1.212 |
| [MDA] folhas (nmol g^{-1}) | CC | 0.060 \pm 0.005 b | 0.069 \pm 0.015 b | 0.099 \pm 0.006 a | 0.068 \pm 0.005 b |
| | DH | 0.062 \pm 0.011 b | 0.059 \pm 0.013 b | 0.078 \pm 0.015 a | 0.056 \pm 0.006 b |

5.2.2 *Cariniana estrellensis*

Nas mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH, observou-se redução na MSC, MSF, MSPA, MST e AF em relação às mudas mantidas na CC (Figura 8 B, C, D, E e G), independente da inoculação. A MSR, FMR (Figura 8 A e F), FMF e a razão MSR/MSPA (dados não apresentados) não diferiram entre dos tratamentos.

Foi observada, independente da inoculação, redução na A , na g_s e na E em mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH, comparadas às mudas mantidas na CC (Figura 9 A, B e C). Por outro lado, observou-se maior EUA nas plantas em DH em relação às mudas mantidas na CC (Figura 9 D). A C_i e a k não diferiram entre os tratamentos (Figura 9 E e F).

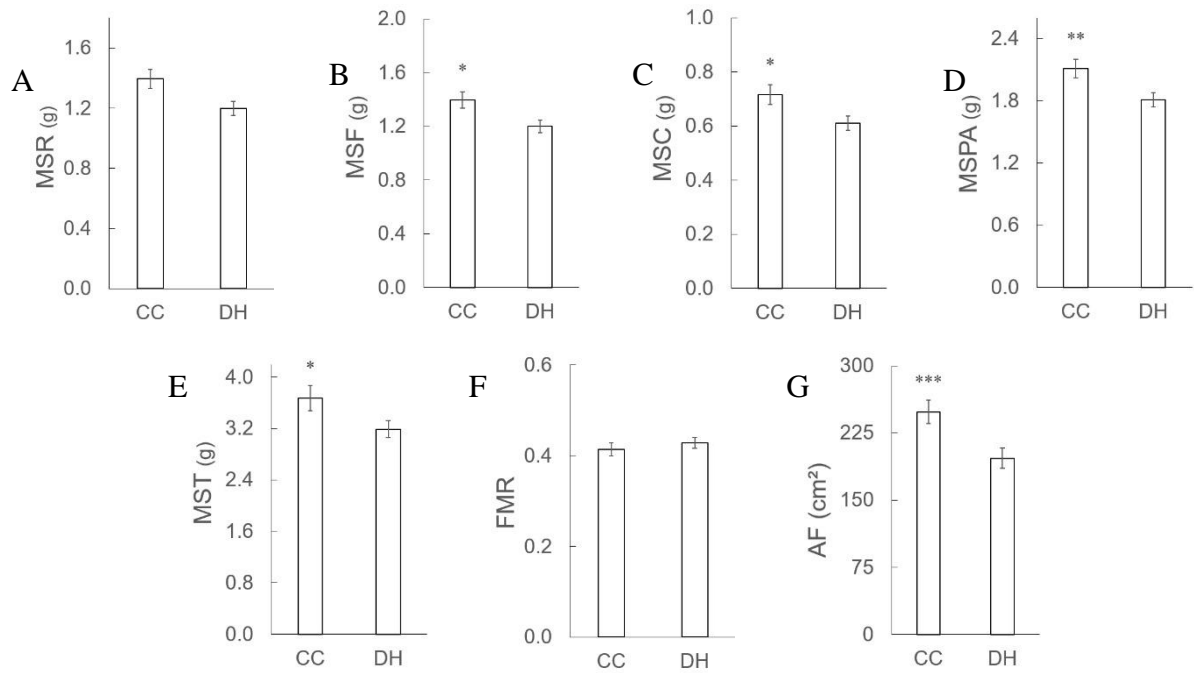


Figura 8. Massa seca das raízes (MSR, A), massa seca das folhas (MSF, B), massa seca do caule (MSC, C), massa seca da parte aérea (MSPA, D), massa seca total (MST, E), fração da massa da raiz (FMR, F) e área foliar total (AF, G) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NI) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o pool (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; [(n = 28, MSC, MSF, MSPA e MST) (n = 32, AF)].

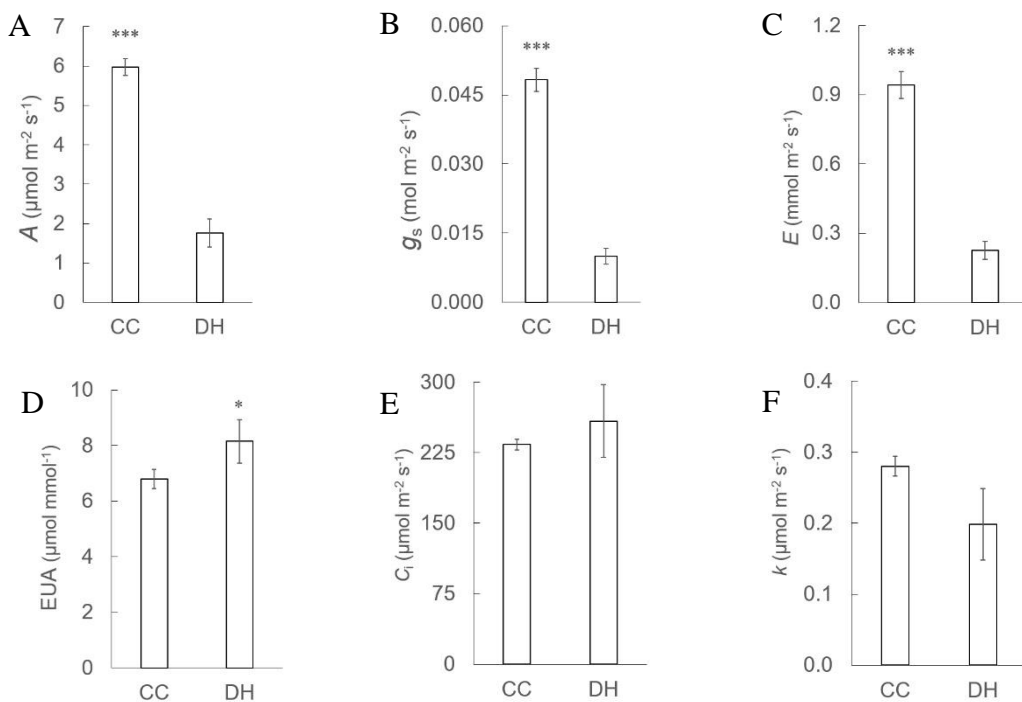


Figura 9. Assimilação líquida de CO_2 (A , A), condutância estomática (g_s , B), transpiração (E , C), eficiência do uso da água (EUA , D), concentração intercelular de CO_2 (C_i , E) e eficiência instantânea de carboxilação (k , F) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou

em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste *F*; **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *n* = 28).

Verificou-se nas mudas inoculadas com Ab-V5 ou com o *pool*, submetidas ao DH, redução da F_v/F_m em relação aos seus respectivos tratamentos de inoculação na CC e em relação às mudas NIn em DH (Figura 10). As mudas inoculadas com ZK ou NIn não apresentaram redução da F_v/F_m quando foram submetidas ao DH.

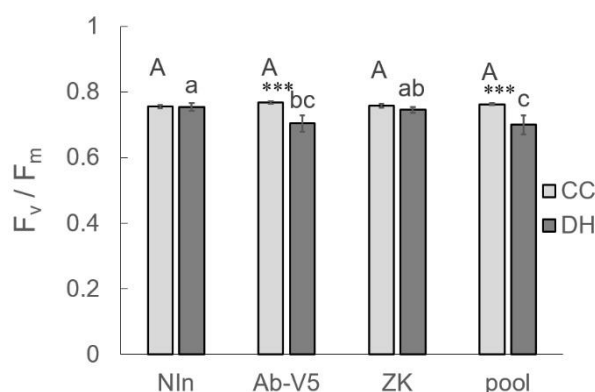


Figura 10. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas, médias com letras maiúsculas (comparam tratamentos em CC) ou minúsculas (comparam tratamentos em DH) iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica dentro de cada tratamento referente à inoculação e também para as plantas NIn (Fisher LSD; *P* < 0,05; *n* = 15).

As mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH apresentaram menor CRA, menor Ψ_w e maior conteúdo de prolina nas folhas e raízes em comparação às mudas mantidas na CC, independente da inoculação (Figura 11 A, B, C e D). Foi observado nas mudas inoculadas com ZK maior conteúdo de glicina-betaína nas raízes em relação aos demais tratamentos, independente da condição hídrica. Verificou-se também redução do conteúdo de glicina-betaína nas raízes das plantas inoculadas com Ab-V5, comparadas àquelas inoculadas com ZK ou com o *pool* (Figura 11 F). O conteúdo de glicina-betaína nas folhas não diferiu entre os tratamentos (Figura 11 E).

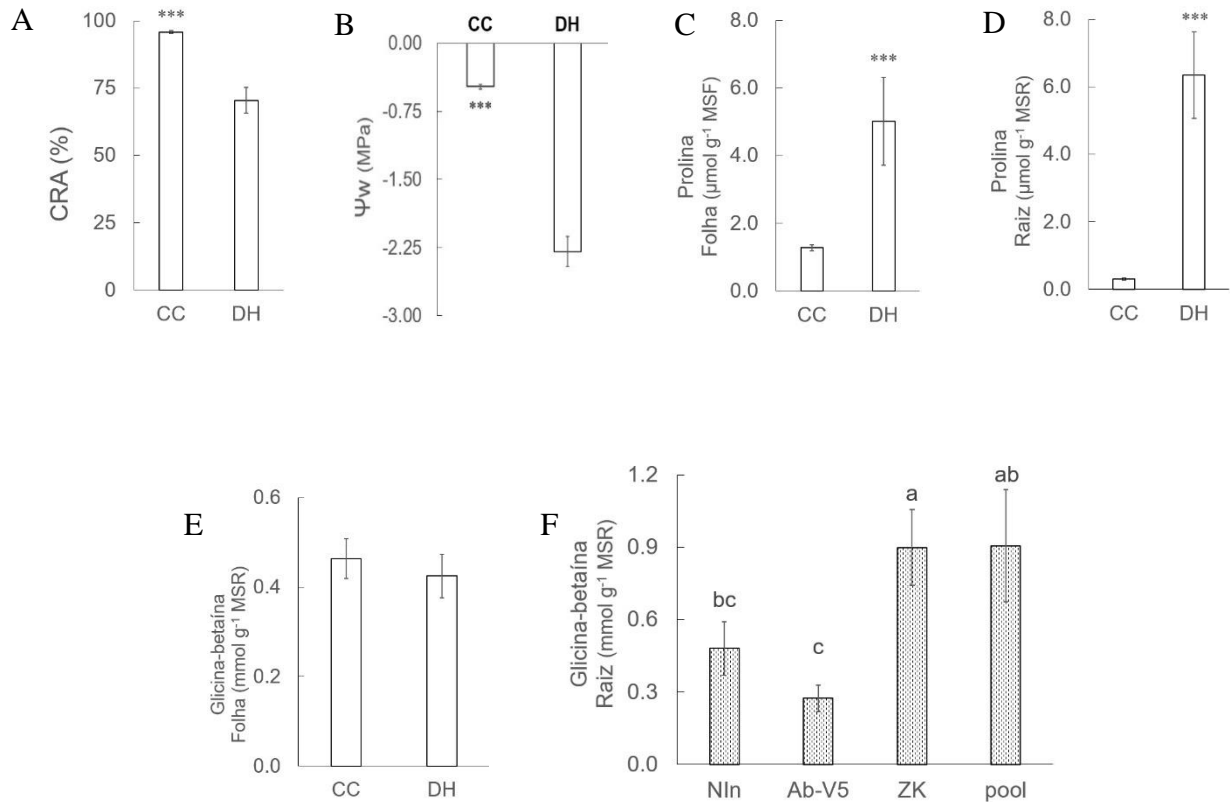


Figura 11. Conteúdo relativo de água (CRA, A), potencial hídrico (Ψ_w , B), conteúdo de prolina de folhas (C), conteúdo de prolina de raízes (D), conteúdo de glicina-betaína de folhas (E) e conteúdo de glicina-betaína de raízes (F) de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os traços verticais acima das colunas representam os erros-padrão. Nas colunas vazias, asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica, de acordo com a ANOVA (teste F; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ($n = 20$). Nas colunas pontilhadas, médias com letras iguais não diferem entre os tratamentos de inoculação (Fisher LSD; $P < 0,05$; $n = 10$).

Foi observada menor na peroxidação lipídica nas folhas das plantas sob DH em relação às plantas mantidas na CC (Tabela 2). A concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas não diferiu entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis bioquímicas de mudas de *Cariniana estrellensis* cultivadas em capacidade de campo (CC) ou em déficit hídrico (DH), não inoculadas (NIn) ou inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) ou com *Bacillus velezensis* (ZK) ou com o *pool* (Ab-V5 e ZK). Os valores são médias \pm erros-padrão. Asteriscos indicam diferença entre os tratamentos de condição hídrica (CC/DH) para cada parâmetro de acordo com a ANOVA (teste *F*; **P* < 0,001; *n* = 20). Não significativo (ns). [H₂O₂] folhas – concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas; [MDA] folhas – concentração de malondialdeído nas folhas.

| Parâmetro bioquímico | Condição hídrica | Inoculação | | | |
|---|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | NIn | Ab-V5 | ZK | <i>pool</i> |
| [H ₂ O ₂] folhas ($\mu\text{mol g}^{-1}$) | CC | 18.469 \pm 2.551 | 15.387 \pm 3.111 | 18.155 \pm 2.305 | 17.038 \pm 1.656 |
| | DH | 16.485 \pm 1.864 | 13.982 \pm 2.832 | 16.582 \pm 2.483 | 14.522 \pm 2.670 |
| [MDA] folhas (nmol g^{-1}) | CC | 374.373 \pm 24.299 * | 252.489 \pm 12.921 * | 301.352 \pm 35.594 * | 309.170 \pm 28.368 * |
| | DH | 232.873 \pm 28.341 | 212.931 \pm 35.633 | 237.223 \pm 27.808 | 243.926 \pm 21.172 |

6 DISCUSSÃO

Os resultados da biomassa nas mudas de *C. pachystachya* evidenciam que a interação com Ab-V5, ZK ou *pool* promoveu efeitos no incremento de 42,7% em comparação às mudas NIn, independente da condição hídrica. A coinoculação (*pool*) nessa espécie vegetal promoveu maior MSR, comparadas às mudas NIn e às inoculadas com Ab-V5, independente da condição hídrica. Esses resultados indicam a compatibilidade da inoculação ou da coinoculação dessas espécies bacterianas associativas (Ab-V5, ZK ou *pool*) com a espécie *C. pachystachya*, e a promoção do crescimento dessas plantas em relação às mudas NIn. Outros estudos evidenciaram o aumento de biomassa em espécies cultivadas inoculadas com BPCP (Grover et al., 2013; Batista et al., 2018; Almeida et al., 2021). Diferentemente do que ocorreu nas mudas de *C. pachystachya*, não foi observado alteração de biomassa nas mudas de *C. estrellensis* entre os tratamentos (NIn, Ab-V5, ZK ou *pool*) mantidos na CC ou submetidos ao DH. Esse mesmo resultado foi observado por Tiepo et al. (2018) nas mudas de *C. estrellensis* inoculadas com Ab-V5 ou ZK mantidas na CC ou submetidas ao DH moderado.

No DH, as mudas de *C. pachystachya* apresentaram menor biomassa (MSR, MSC, MSF, MSPA e MST) e AF em todos os tratamentos, comparadas às plantas mantidas na CC. O mesmo resultado ocorreu em *C. estrellensis*, exceto a MSR que não foi reduzida. Tiepo et al. (2020a) observaram que nas mudas de *C.*

pachystachya inoculadas com Ab-V5 ou ZK, submetidas ao DH moderado, houve maior MSR e maior razão MSR/MSPA em relação às mudas NIn (CC ou DH); e menor MSPA nas mudas sob DH inoculadas com Ab-V5, comparadas às mudas inoculadas com ZK (DH) ou às mudas NIn (CC ou DH). As plantas podem manter maior crescimento das raízes em relação à parte aérea, esse fato pode contribuir para maior absorção de água e nutrientes (Mokany et al., 2006). A redução da disponibilidade hídrica percebida pelas raízes acarreta aumento dos níveis de ABA e seu acúmulo na parte aérea da planta estimula fechamento estomático (Wilkinson e Davies, 2010; Hossain et al. 2016). Esse processo reduz a perda de água por meio da E e reduz a entrada de CO_2 pela folha, promovendo assim uma diminuição da A e, conseqüentemente, um menor incremento de biomassa vegetal (Flexas et al. 2002; Sperry et al., 2002; Lawson e Vialet-Chabrand 2019).

Acredita-se que a maior biomassa observada nas mudas inoculadas e coinoculadas de *C. pachystachya* submetidas ao DH, em relação às mudas NIn (DH), seja mais decorrente do acúmulo (de biomassa) durante o período em que as mesmas eram mantidas na CC do que o produto da interação planta-BPCP diante do DH, pois esse período durou apenas dois dias. Apesar disso, é possível que haja manutenção ou até incremento de massa nessas mudas inoculadas e/ou coinoculadas em relação às mudas NIn sob DH moderado por um período mais prolongado, como foi observado por Tiepo et al. (2020a) no DH moderado (inoculação).

As plantas de *C. pachystachya* submetidas ao DH apresentaram menor F_v/F_m , comparadas àquelas mantidas na CC. Foi observada nas mudas de *C. estrellensis* inoculadas com Ab-V5 ou *pool* sob DH menor F_v/F_m , em comparação com as mudas NIn (DH) e com os seus respectivos tratamentos na CC. Esses resultados indicam que o DH, nesses tratamentos, afetou o transporte de elétrons da atividade fotoquímica da fotossíntese. A inoculação com ZK em mudas de *C. estrellensis* preveniu a redução do F_v/F_m quando submetido ao DH severo, indicando um efeito protetor ao fotossistema II.

Em mudas de *C. pachystachya* coinoculadas com Ab-V5 e ZK (*pool*) mantidas na CC, foi observada menor g_s em comparação às mudas inoculadas (Ab-V5 ou ZK), menor E em relação às mudas inoculadas com Ab-V5 e mesma A em todos os tratamentos (na CC). Esses resultados podem indicar uma tendência de melhor ajuste estomático em relação a redução de perda de água por meio da E , sem redução de A .

As mudas das duas espécies vegetais submetidas ao DH apresentaram reduções da g_s , da E e da A , comparadas às mudas mantidas na CC. Essa menor g_s pode indicar uma resposta ao aumento da concentração do ABA nessas mudas diante do DH, o que promoveu a redução da E e da A (Flexas et al. 2002; Wilkinson e Davies, 2002). As plantas de *C. pachystachya* inoculadas com Ab-V5, ZK ou *pool*, submetidas ao DH, apresentaram menor A , g_s , E , EUA e k ; e maior C_i , comparadas às plantas NIn (DH) e aos seus respectivos tratamentos na CC. Esses resultados divergem dos observados por Tiepo et al. (2020b) no DH moderado, em que a A e a g_s se mantiveram maiores em mudas dessa mesma espécie inoculadas com ZK (DH) em comparação às mudas NIn (DH) e às mudas inoculadas com Ab-V5 (DH); e não foi observada alteração de C_i nos tratamentos (CC/DH).

Observou-se, nas mudas inoculadas (Ab-V5, ZK ou *pool*) de *C. pachystachya* submetidas ao DH, que a redução média da A (21,7 vezes) foi maior do que a redução média da g_s (11,27 vezes), em contrapartida houve aumento na C_i . Esses dados sugerem que o aparelho fotossintético foi parcialmente afetado nas mudas inoculadas em DH (limitação não estomática). Isso não foi observado nas mudas NIn (DH), sendo que a redução média da A (3,4 vezes) foi menor do que a redução média da g_s (4 vezes) e não houve aumento de C_i . Anyia e Herzog (2003) submeteram alguns genótipos de *Vigna unguiculata* sob DH severo por 10 dias e observaram que o declínio médio da A (84%) foi maior do que a redução média da g_s (71%), enquanto a C_i aumentou em todos os genótipos e concluíram que ambos foram evidências de que, além do fechamento estomático, o aparelho fotossintético (ação enzimática) também foi parcialmente afetado. Em condições de DH moderado, o aparelho fotossintético não é danificado e continua funcionando (Brestic et al., 1995), mas diante do DH severo, a capacidade fotossintética é reduzida, o que pode ser refletido no aumento da C_i (Herzog e Anyia, 2001; Brodribb, 1996; Farquhar et al., 1982).

Considerando que todas as mudas estavam em tubetes com 280 cm³ de substrato na CC até o início da suspensão hídrica, e que as mudas de *C. pachystachya* inoculadas apresentaram maior crescimento durante este período, é possível que essas mudas reduziram a umidade do substrato mais rápido do que às NIn durante o DH, o que pode ter ocasionado um DH mais intenso nas mudas inoculadas e coinoculadas (DH) em relação às NIn (DH). Diferentemente das mudas de *C. pachystachya*, as mudas de *C. estrellensis* não apresentaram diferenças na

biomassa entre os tratamentos submetidos ao DH, o que pode ter contribuído para um DH mais uniforme entre os tratamentos (NIn, Ab-V5, ZK e *pool*) e, possivelmente, essas mudas não foram submetidas a um DH tão intenso como as mudas inoculadas (Ab-V5, ZK e *pool*) de *C. pachystachya*, as quais apresentaram aumento da C_i , comparadas às mudas NIn (DH).

Dessa forma, é possível que a maior redução da A nas mudas inoculadas de *C. pachystachya* seja devido a um DH mais intenso do que nas NIn (DH) devido a limitação não estomática que pode ser observada por meio da maior redução média da A em relação à redução média da g_s , seguido da observação do aumento da C_i .

As mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH apresentaram maior EUA e menor g_s , A e E , comparadas às mudas mantidas na CC independente da inoculação, e não foram observadas alterações na C_i e na k . Tiepo et al. (2018) observaram nessas mudas submetidas ao DH moderado menor g_s , A e C_i , comparadas às mudas mantidas na CC; e maior A e k nas mudas inoculadas com Ab-V5 (DH) em comparação às mudas NIn (DH) e às mudas inoculadas com ZK (DH).

Nas mudas de *C. pachystachya* e de *C. estrellensis* submetidas ao DH, inoculadas e não inoculadas, foram observadas reduções do CRA e do Ψ_w . Tiepo et al. (2018) também observaram a redução do Ψ_w nas mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH moderado, comparadas às mudas mantidas na CC, independente da inoculação com Ab-V5 ou ZK ou sem inoculação (controle). Nayyar e Gupta (2006) observaram que as plantas submetidas ao DH exibem reduções no CRA e no Ψ_w , de modo que, quanto maior o estresse, maior pode ser essa redução.

Observou-se maior conteúdo de prolina nas folhas (1,4 vezes) das mudas de *C. pachystachya* e nas folhas (3,9 vezes) e nas raízes (21,1 vezes) de *C. estrellensis*, submetidas ao DH em comparação às mudas mantidas na CC, independente da inoculação (Ab-V5, ZK ou *pool*) ou sem inoculação. Esses resultados obtidos nas mudas de *C. estrellensis* divergem dos encontrados por Tiepo et al. (2018), que não observaram alterações no conteúdo de prolina nessas mudas inoculadas (Ab-V5 ou ZK) ou sem inoculação (controle) em DH moderado, comparadas às mudas mantidas na CC. Isso indica que a espécie *C. estrellensis* pode acumular prolina dependendo da intensidade do DH. O acúmulo de prolina nas células é uma resposta das plantas a situações de DH e esse soluto compatível contribui para o ajuste osmótico, podendo ter função na resposta antioxidante, na manutenção da integridade de proteínas e na proteção de membranas (Alia et al., 1997; Szabados e

Savouré, 2009; Anjum et al., 2011).

O conteúdo de glicina-betaína foi maior nas mudas de *C. estrellensis* inoculadas com ZK do que nas inoculadas com Ab-V5, independente da condição hídrica. As mudas de *C. pachystachya* não apresentaram diferenças, para esse parâmetro, entre os tratamentos. O acúmulo de glicina-betaína ocorre, principalmente, como uma resposta ao estresse hídrico, contribuindo para o aumento de enzimas antioxidantes (Dikilitas et al. 2020).

Nas mudas de *C. pachystachya*, foi observada maior peroxidação lipídica nas folhas das plantas inoculadas com ZK em relação aos demais tratamentos, independente da condição hídrica. Observou-se menor peroxidação lipídica nas folhas das mudas de *C. estrellensis* sob DH, comparadas às plantas mantidas em CC. Esses resultados obtidos nas mudas de *C. estrellensis* divergem dos encontrados por Tiepo et al. (2018), que não observaram alterações no conteúdo de MDA nessas mudas inoculadas (Ab-V5 ou ZK) ou sem inoculação (controle) em DH moderado, comparadas às mudas mantidas na CC.

O DH estimula a redução da g_s seguida da diminuição da A , o que pode contribuir no aumento da produção de EROs a níveis tóxicos, contribuindo para o aumento do conteúdo de MDA, o qual é considerado um marcador da peroxidação lipídica de membranas como consequência do estresse oxidativo (Anjum et al., 2011; Grant, 2011; Gupta et al., 2020). Kumar e Yadav (2009) observaram que a aplicação exógena de prolina e de glicina-betaína em mudas de *Camellia sinensis* protege o tecido contra danos celulares durante o estresse pelo frio, eliminando EROs e impedindo a formação de MDA. A diminuição do conteúdo de MDA nas mudas de *C. estrellensis*, submetidas ao DH, pode estar relacionada ao aumento de prolina observada nas folhas (3,9 vezes) e nas raízes (21,1 vezes). É possível que a divergência dessas observações seja devido ao DH implementado neste estudo, o qual foi mais intenso do que o DH moderado aplicado por Tiepo et al. (2018).

As mudas das duas espécies vegetais não apresentaram alterações na concentração do peróxido de hidrogênio em folhas. Os mesmos resultados foram encontrados por Tiepo et al. (2018) nas folhas de mudas inoculadas (Ab-V5 ou ZK) ou não inoculadas de *C. estrellensis* submetidas ao DH moderado em comparação às mudas mantidas na CC. É possível que a não redução da C_i nas mudas submetidas ao DH possa ter mantido os níveis baixos da atividade oxigenase da Rubisco em relação a atividade carboxilase, mantendo assim a fotorrespiração baixa. Isso pode

ter contribuído para manutenção das concentrações do peróxido de hidrogênio entre as mudas submetidas ao DH e as mantidas na CC, sendo que a fotorrespiração produz a maior parte do peróxido de hidrogênio presente nas folhas quando há redução de C_i (Noctor et al., 2002).

A inoculação ou a coinoculação na espécie pioneira (*C. pachystachya*) induziu maior responsividade na promoção do crescimento vegetal em relação aos aspectos gerais observados, o que não ocorreu na espécie não-pioneira (*C. estrellensis*). Os resultados evidenciam diferentes respostas entre as espécies vegetais aos efeitos promovidos mediante associação das estirpes bacterianas, indicando a ocorrência de interações espécie-específicas. Resultados semelhantes foram observados Xiong et al. (2016), que estudaram a inoculação e a coinoculação com três estirpes bacterianas solubilizadoras de fosfato (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*) e três estirpes fixadoras de nitrogênio (*Azospirillum halopraeferens*, *Azotobacter chroococcum* e *Ochrobactrum anthropi*) em três espécies vegetais tolerantes ao sal (*Aegiceras corniculatum*, *Bruguiera gymnoihiza* e *Casuarina equisetifolia*) e concluíram que a inoculação/coinoculação das BPCP tiveram um efeito geral de promoção de crescimento nas mudas e as diferenças na magnitude dos efeitos foram devidas às interações espécie-específicas.

7 CONCLUSÃO

A coinoculação e a inoculação com Ab-V5 ou ZK nas mudas de *C. pachystachya* promoveram respostas biométricas, especialmente no incremento de biomassa vegetal, independente da condição hídrica. Isso pode contribuir para potencializar a sobrevivência dessas plântulas durante o DH no campo, e pode promover a redução dos custos de produção dessas mudas, quando mantidas em solo na CC, já que as mesmas podem atingir tamanho ideal para plantio no campo em menor tempo, contribuindo na redução do período de ocupação nos viveiros. Esse resultado não foi observado nas mudas *C. estrellensis*. Entretanto, esta espécie vegetal já apresentou, em outros estudos, respostas de tolerância ao DH moderado quando inoculadas com as estirpes Ab-V5 ou ZK.

A coinoculação das BPCP promoveu, em parte, efeitos sinérgicos (aditivos) nas espécies vegetais em comparação com a inoculação individual das BPCP. Pode

ser que haja uma interação sinérgica mais expressiva dessas estirpes bacterianas (coincoculação) nessas espécies vegetais quando submetidas ao DH moderado, visto que não foi observado efeito prejudicial nas mudas. Por isso, é necessário a elaboração de novos estudos para avaliar os efeitos da coincoculação de Ab-V5 e ZK nessas espécies arbóreas sob DH moderado.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação do DH severo em mudas, por meio da interrupção da irrigação, nos tubetes de 290 mL teve algumas limitações. Em primeiro lugar, o tamanho do tubete limitou a quantidade de substrato e a capacidade de retenção de água no solo, acarretando a redução de 90% da g_s em apenas dois dias nas mudas de *C. pachystachya* e em sete dias nas mudas de *C. estrellensis*, quando submetidas ao DH severo em comparação com as mudas mantidas em solo na CC. Em segundo lugar, as BPCP promoveram maior crescimento de raízes e da parte aérea nas mudas de *C. pachystachya* em relação às mudas não inoculadas. Isso pode ter ocasionado um consumo maior de água pelas plantas nos tubetes das mudas inoculadas em relação às mudas não inoculadas, e o fato da não reposição de água nesses tubetes pode ter contribuído para diferentes intensidades do DH entre os tratamentos inoculados e não inoculados, o que pode aumentar o erro experimental.

Dessa forma, recomenda-se utilizar o DH moderado, quando há reposição parcial de água no substrato. Caso a utilização do DH severo, por meio da interrupção da irrigação, seja indispensável para a execução de um estudo, é recomendável a utilização de vasos maiores que acomodem maiores volumes de substrato, aumentando a capacidade de retenção de água no solo. Isso pode atenuar a redução repentina da umidade no substrato.

Este trabalho foi o primeiro a estudar a coincoculação de estirpes bacterianas promotoras de crescimento em espécies arbóreas neotropicais submetidas ao estresse hídrico severo e mantida em casa de vegetação. As metodologias empregadas, neste documento, servem como base para adequações futuras em novos estudos com outros microrganismos associativos e/ou outras espécies arbóreas neotropicais.

REFERÊNCIAS

- Ahluwalia, O., Singh, P.C., Bhatia, R., 2021. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5, 100032.
- Ahmad, P. 2016. Water stress and crop plants: A sustainable approach. In Ahanger MA, Morad-Talab N, Abd-Allah EF, Ahmad P, Hakiboland R (ed) *Plant growth under drought stress: Significance of mineral nutrients*, 1st edn. West Sussex, UK, pp 649-668.
- Alía, Saradhi, P.P., Mohanty, P., 1997. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology*, 38, 253-257.
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling A, Breshears DD, Hogg EH, Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol.*
- Almeida, J.R. de, Bonatelli, M.L., Batista, B.D., Teixeira-Silva, N.S., Mondin, M., Dos Santos, R.C., Bento, J.M.S., de Almeida Hayashibara C.A., Azevedo, J.L., Quecine, M.C., 2021. *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, a tropical plant growth-promoting rhizobacterium, colonizes maize endophytically and alters the plant's production of volatile organic compounds during co-inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5. *Environ Microbiol Rep.* 2021 Dec;13(6):812-821.
- Anderson, T. R., Hawkins, E., & Jones, P. D., 2016. CO₂, the greenhouse effect and global warming: from the pioneering work of Arrhenius and Callendar to today's Earth System Models. *Endeavour*, 40(3), 178-187.
- Anyia, A. O., Herzog H., 2003: Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under midseason drought. *Eur. J. Agron.* 20, 327—339.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W., 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- Ansary, M.H., Rahmani, H.A., Ardakani, M.R., Paknejad, F., Habibi, D., Mafakheri, S., 2012. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on proline and phytohormonal status of maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. *Annal. Biol. Res.* 3, 1054–1062.
- Barka, E.A., Nowak, J., Clément, C., 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7246–7252.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. *Advances in Agronomy* 108, 77-136.
- Batista, B. D., Lacava, P. T., Ferrari, A., Teixeira-Silva, N. S., Bonatelli, M. L., Tsui, S., ... & Quecine, M. C., 2018. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological research*, 206, 33-42.

- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., ... & Mubushar, M., 2020. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1), 16975.
- Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia L.M., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35(4): 1044-1051.
- Biodiversa, 2023. natuRe-basEd SoluTions for imprOving REforestation - RESTORE. Biodiversa+ European co-funded biodiversity partnership. <https://www.biodiversa.eu/2022/10/26/restore> (acessado em 23/02/2023)
- Brestic, M., Cornic, G., Freyer, M. J., & Baker, N. R., 1995. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress?. *Planta*, 196, 450-457.
- Brodribb, T., 1996. Dynamics of changing intercellular CO₂ concentration (C_i) during drought and determination of minimum functional C_i. *Plant Physiol.* 111, 179–185.
- Calzavara, A. K., Bianchini, E., Mazzanatti, T., Oliveira, H. C., Stolf-Moreira, R., & Pimenta, J. A., 2015. Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. *Photosynthetica*, 53, 597-608.
- Calzavara, A. K., Hertel, M. F., Debiasi, T. V., Tiepo, A. N., de Oliveira, A. L. M., Oliveira, H. C., ... & Pimenta, J. A., 2021. Does inoculation with associative bacteria improve tolerance to nitrogen deficiency in seedlings of Neotropical tree species?. *Environmental and Experimental Botany*, 189, 104529.
- Carillo, P., Mastrolonardo, G., Nacca, F., Parisi, D., Verlotta, A. & Fuggi, A., 2008. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Functional Plant Biology*, 35(5), 412–426.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M., 1998. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong, D. (Ed.), *Free Radical and Antioxidants Protocols*. Humana Press, Molndal, 377–387.
- Claussen, J.W., 1996. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. *Forest Ecology and Management* 80, 245-255.
- Cook, J., Nuccitelli, D., Green, S. A., Richardson, M., Winkler, B., Painting, R., ... & Skuce, A., 2013. Quantifying the consensus on anthropogenic global warming in the scientific literature. *Environmental research letters*, 8(2), 024024.
- Craven, D., Dent, D., Braden, D., Ashton, M.S., Berlyn, G.P., Hall, J.S., 2010. Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama. *Forest Ecology and Management*. 261, 1643–1653.
- Cunningham, S. C., Mac Nally, R., Baker, P. J., Cavagnaro, T. R., Beringer, J., Thomson, J. R., & Thompson, R. M., 2015. Balancing the environmental benefits of reforestation in agricultural regions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17(4), 301-317.
- Danish, S., Zafar-Ul-Hye, M., Hussain, S., Riaz, M., & Qayyum, M. F., 2020. Mitigation of drought stress in maize through inoculation with drought tolerant ACC deaminase containing PGPR under axenic conditions. *Pak. J. Bot*, 52(1), 49-60.

- Das K., Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2:1–13.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- Davies, W. J., Zhang, J., 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology*, 42(1), 55-76.
- Dikilitas, M.; Simsek, E.; Roychoudhury, A. 2020. Role of proline and glycine betaine in overcoming abiotic stresses. In *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives*; Tripathi, D.K.A., Ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK, 2020; pp. 1–23.
- Dixon, R. K., Solomon, A. M., Brown, S., Houghton, R. A., Trexler, M. C., & Wisniewski, J., 1994. Carbon pools and flux of global forest ecosystems. *Science*, 263(5144), 185-190.
- Dunlap, C.A., Kim, S.J., Kwon, S.W., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 1212-1217.
- Ellison, D., Morris, C. E., Locatelli, B., Sheil, D., Cohen, J., Murdiyarso, D., ... & Sullivan, C. A., 2017. Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Global environmental change*, 43, 51-61.
- Embrapa, 2002. *A restauração da Mata Atlântica em áreas de sua primitiva ocorrência natural* / Antonio Paulo Mendes Galvão e Antonio Carlos de Souza Medeiros (editores técnicos) - Colombo: Embrapa Florestas, 2002.
- Embrapa, 2003. *Espécies arbóreas brasileiras* / Paulo Ernani Ramalho Carvalho. Brasília-DF. Embrapa Florestas.
- Embrapa, 2006. *Espécies arbóreas brasileiras* / Paulo Ernani Ramalho Carvalho. Brasília-DF. Embrapa Florestas.
- Embrapa, 2013. *Manual técnico para a restauração de áreas degradadas no Estado do Rio de Janeiro* / Luiz Fernando Duarte de Moraes et al. – Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.
- Fang, Y., & Xiong, L., 2014. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 72, 673-689.
- Farquhar, G.D., O’ Leary, M.H., Berry, J.A., 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9, 121–137.
- Flexas, J., Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89, 183-189.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., Medrano, H., 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced

by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172, 73–82.

- Franco AC., Matsubara S, Orthen B. 2007. Photoinhibition, carotenoid composition and the co-regulation of photochemical and non-photochemical quenching in neotropical savanna trees, *Tree Physiology*, Volume 27, Issue 5, May 2007, Pages 717–725.
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M., 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7, 1-13.
- Fundação SOS Mata Atlântica e Inpe, 2021. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2019/2020, relatório técnico. Fundação SOS Mata Atlântica / Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE. São Paulo-SP. 73p.
- Gaglioti, A.L., Aguiar, D.P.P. 2020. *Cecropia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB15041> (acessado em 03/10/2022).
- Glick, B. R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 1–7.
- Goes, K.C.G.P., Fisher, M.L.C., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Carvalho, C.G.P., Oliveira, A.L.M., 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 437–447.
- Grant, O.M., 2011. Understanding and exploiting the impact of drought stress on plant physiology. In: *Abiotic stress responses in plants*. Springer, New York, p 89.
- Grieve, C.M., Grattan, S.R., 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70, 303–307.
- Grover M, Madhubala R, Ali SZ, Yadav SK, Venkateswarlu B., 2014. Influence of *Bacillus* spp. strains on seedling growth and physiological parameters of sorghum under moisture stress conditions. *J Basic Microbiol. Sep;54(9):951-61*.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I., 2020. The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266-269.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598.
- Hertel, M. F., 2020. Bactérias associativas e óxido nítrico aumentam a tolerância ao déficit hídrico de espécies arbóreas da mata atlântica. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Herzog, H., Anyia, A.O., 2001. Genotypic variations in gas-exchange, dry matter partitioning, and grain yield of cowpea following mid season water deficit. In: *Proceedings of Fourth European Conference on Grain Legumes AEP (Eds.)*, Cracow, Poland, pp. 314–316.
- Hoagland, D.R. e Arnon, D.I., 1938. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, Circular 347.
- Hossain, M.A., Wani, S.H., Bhattacharjee, S., Burritt, D.J., Tran, L.P., 2016. Drought stress tolerance in plants. In Salehi-Lisar SY and Bakhshayeshan-Agdam H (ed)

Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance, 1st edn. Switzerland, pp 1-16.

- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., Pedrosa, F.O., 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331, 413–425.
- Ingle, K. P., Padole, D. A. 2017. Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(1): 844-852.
- IPCC, 2022: Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 3056 pp.
- Kabiraj, A., Majhi, K., et al., 2020. Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for crop stress management. In: *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 367–389.
- Khan, N., Bano, A., Shahid, M.A., Babar, A.M.D., 2018. Interaction between PGPR and PGR for water conservation and plant growth attributes under drought condition. *Biologia* 73:1083–1098
- Kumar, V., Yadav, S.K., 2009. Proline and betaine provide protection to antioxidant and methylglyoxal detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Acta Physiol Plant* 31, 261–269.
- Lal, R., 1996. Deforestation and land-use effects on soil degradation and rehabilitation in western Nigeria. I. Soil physical and hydrological properties. *Land Degradation e Development* 7, 19-45.
- Laurentino, C. M.M., da Silva, L. A. P., Marques, S. C. S., & Leite, M. E., 2021. Desmatamento na bacia do Rio Verde Grande, norte de Minas Gerais-Brasil. *Geoambiente On-line*, (39).
- Lawson T., Vialet-Chabrand S., 2019. Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist* 221:93–98.
- Liu, F., Ma, H., Peng, L., Du, Z., Ma, B., & Liu, X., 2019. Effect of the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the photosynthetic characteristics of *Sambucus williamsii* Hance container seedlings under drought stress. *AMB Express*, 9(1), 1-9.
- Mazzanatti, T., Calzavara, A.K., Pimenta, J.A., Oliveira, H.C., Stolf-Moreira, R., Bianchini, E., 2016. Light acclimation in nursery: morphoanatomy and ecophysiology of seedlings of three light-demanding neotropical tree species. *Brazilian Journal of Botany* 39, 19-28.
- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., Fonseca, G.A.B., 2004. In: *Hotspots revisited*. Cemex, Cidade do México.
- Mokany, K., Raison, R.J., Prokushkin, A.S., 2006. Critical analysis of root: shoot ratios in terrestrial biomes. *Global Change Biology* 12, 84-96.

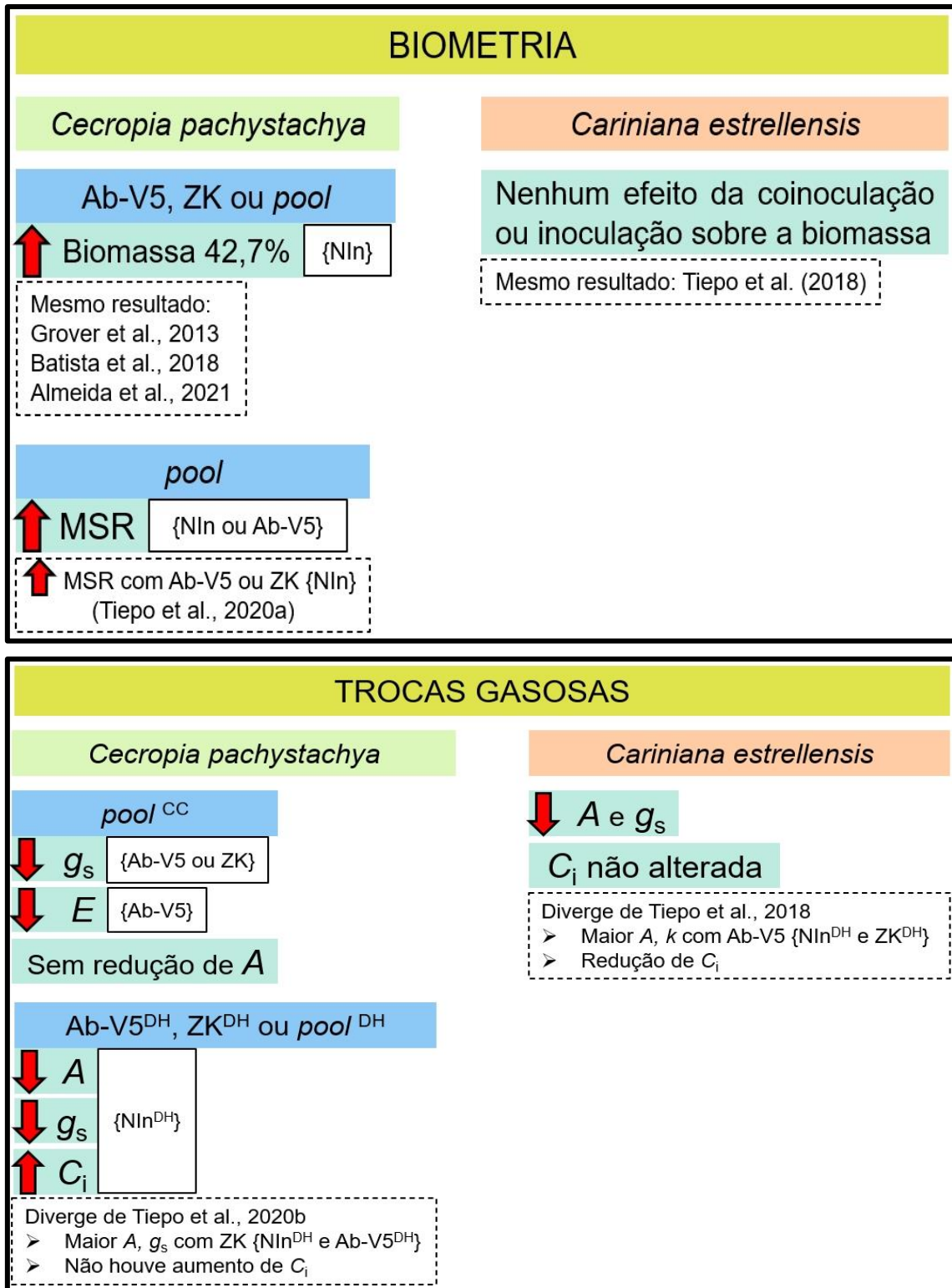
- Nayyar, H., Gupta, D., 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 58: 106-113.
- Niu, L., LIAO, W., 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science* 7, 230.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H, 2022. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Ann Bot.* 2002 Jun;89 Spec No(7):841-50.
- Nogués S., Baker N.R., 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany* 51:1309-1317.
- Nyberg, G., Tobella, A.B., Kinyang, J., Ilstedt, U., 2012. Soil property changes over a 120-yr chronosequence from forest to agriculture in western Kenya. *Hydrology and Earth System Sciences* 16, 2085–2094.
- Oliveira, A. L., Santos, O. J., Marcelino, P. R., Milani, K. M., Zuluaga, M. Y., Zucareli, C., & Gonçalves, L. S., 2017. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Frontiers in microbiology*, 8, 1873.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4, 701–712.
- Palma, A.C., e Laurance, S.G.W., 2015. A review of the use of direct seeding and seedling plantings in restoration: what do we know and where should we go? *Appl Veg Sci* 18:561–568.
- Pan, Y., Birdsey, R. A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P. E., Kurz, W. A., ... & Hayes, D., 2011. A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science*, 333(6045), 988-993.
- Poorter, H., Niklas, K.J., Reich, P.B., Oleksyn, J., Poot, P., Mommer, L., 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193, 30-50.
- Probanza, A., Lucas-García, J.A., Ruiz-Palomino, M., Ramos, B., Gutiérrez-Mañero, F.J., 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Appl. Soil Ecol.* 20, 75–84.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M., 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological conservation*, 142(6), 1141-1153.
- Ribeiro, M.C., Martensen, A.C., Metzger, J.P., Tabarelli, M., Scarano, F., Fortin, M.J. 2011. The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In *Biodiversity hotspots*. Springer, Berlin, Heidelberg, p 405.
- Rodrigues, R. R., Lima, R. A., Gandolfi, S., & Nave, A. G., 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological conservation*, 142(6), 1242-1251.

- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R., 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* 61:264–272.
- Sandhya, V. S. K. Z., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B., 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant growth regulation*, 62, 21-30.
- Seeg, 2021. Análise das emissões brasileiras de gases de efeito estufa e suas implicações para as metas climáticas do Brasil (1970 – 2020). Sistema de Estimativa de Emissões e Remoções de Gases de Efeito Estufa, Observatório do Clima, Brasil. <http://seeg.eco.br/documentos-analiticos> (acessado em 12/12/2022).
- Sherwood, S.C., Bony, S., Dufresne, J.L., 2014. Spread in model climate sensitivity traced to atmospheric convective mixing. *Nature*. Jan 2;505(7481):37-42.
- Shimamoto, C. Y., Botosso, P. C., & Marques, M. C., 2014. How much carbon is sequestered during the restoration of tropical forests? Estimates from tree species in the Brazilian Atlantic forest. *Forest Ecology and Management*, 329, 1-9.
- Shimizu, M., Ishida, A., Tange, T., Yagi, H., 2006. Leaf turnover and growth responses of shade-grown saplings of four *Shorea* rain forest species to a sudden increase in light. *Tree Physiol.* 26, 449–457.
- Smart, R. E., Bingham, G. E., 1974. Rapid Estimates of Relative Water. *Plant Physiology*. 53: 258-260.
- Smith, N.P., Mori, S.A., Prance, G.T. 2015. Lecythidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8541> (acessado em 03/10/2022).
- Soares, F. S., & Medri, M. E., 2002. Alguns aspectos da colonização da bacia do rio Tibagi. *A bacia do rio Tibagi*. Londrina, Editora dos Editores, 595p, 69-79.
- Souza, N. L., Rocha, S. S., Narezzi, N. T., Tiepo, A. N., de Oliveira, A. L. M., Oliveira, H. C., ... & Stolf-Moreira, R., 2020. Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of neotropical tree species with contrasting tolerance to shade. *Trees*, 34, 121-132.
- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R., Comstock, J.P., 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment* 25, 251-263.
- Swann, A.L.S., 2018. Plants and Drought in a Changing Climate. *Curr Clim Change Rep* 4, 192–201.
- Szabados L., Savoure, A., 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.*, 15: 89-97.
- Tiepo, A. N., Hertel, M. F., Rocha, S. S., Calzavara, A. K., De Oliveira, A. L. M., Pimenta, J. A., ... & Stolf-Moreira, R., 2018. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Plant physiology and biochemistry*, 130, 277-288.

- Tiepo, A. N., Constantino, L. V., Madeira, T. B., Gonçalves, L. S. A., Pimenta, J. A., Bianchini, E., ... & Stolf-Moreira, R. (2020a). Plant growth-promoting bacteria improve leaf antioxidant metabolism of drought-stressed Neotropical trees. *Planta*, 251, 1-11.
- Tiepo, A. N., 2020b. Bactérias promotoras do crescimento vegetal influenciam rotas metabólicas e aumentam a tolerância ao déficit hídrico em espécies arbóreas neotropicais: potencial para recuperação de áreas degradadas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- UEL, 2023. natuRe-basEd SoluTions for imprOving REforestation - RESTORE. Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. <https://pos.uel.br/biologicas/restore-2> (acessado em 23/02/2023)
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci*. 2013 Sep 17;4:356.
- Valadez-Bustos MG, Aguado-Santacruz GA, Tiessen-Favier A, Robledo-Paz A, Muñoz-Orozco A, Rascón-Cruz Q, Santacruz-Varela A. 2016. A reliable method for spectrophotometric determination of glycine betaine in cell suspension and other systems. *Anal Biochem*. 2016 Apr 1;498:47-52.
- van der Werf, G. R., Morton, D. C., DeFries, R. S., Olivier, J. G., Kasibhatla, P. S., Jackson, R. B., ... & Randerson, J. T., 2009. CO₂ emissions from forest loss. *Nature geoscience*, 2(11), 737-738.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A.N., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules* 21, 573.
- Voss, I., Sunil, B., Scheibe, R. and Raghavendra, A.S., 2013. Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biol J*, 15: 713-722.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A., 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 184, 13-24.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 195-210.
- Wilkinson, S., & Davies, W. J., 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, cell & environment*, 33(4), 510-525.
- Xiong, Y., Zhang, X., He, X., Li, M., & Liao, B., 2016. Species-specific effects of P-solubilizing and N₂-fixing bacteria on seedling growth of three salt-tolerant trees. *Russian Journal of Ecology*, 47, 259-265.
- Zanne, A.E., Lopez-Gonzalez, G., Coomes, D. A., Ilic, J., Jansen, S., Lewis, S. L., ... & Chave, J., 2009. Data from: towards a worldwide wood economics spectrum, Dryad, Dataset. <https://doi.org/10.5061/dryad.234> (acessado em 28/12/2022)
- Zhang, H., Murzello, C., Sun, Y., Kim, X., Mi-S, R., Jeter, R.M., Zak, J.C., Scot Dowd, E., Pare, P.W., 2010. Choline and osmotic-stress tolerance induced in Arabidopsis by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Mol. Plant Microb. Interact*. 23,1097–1104.

APÊNDICE

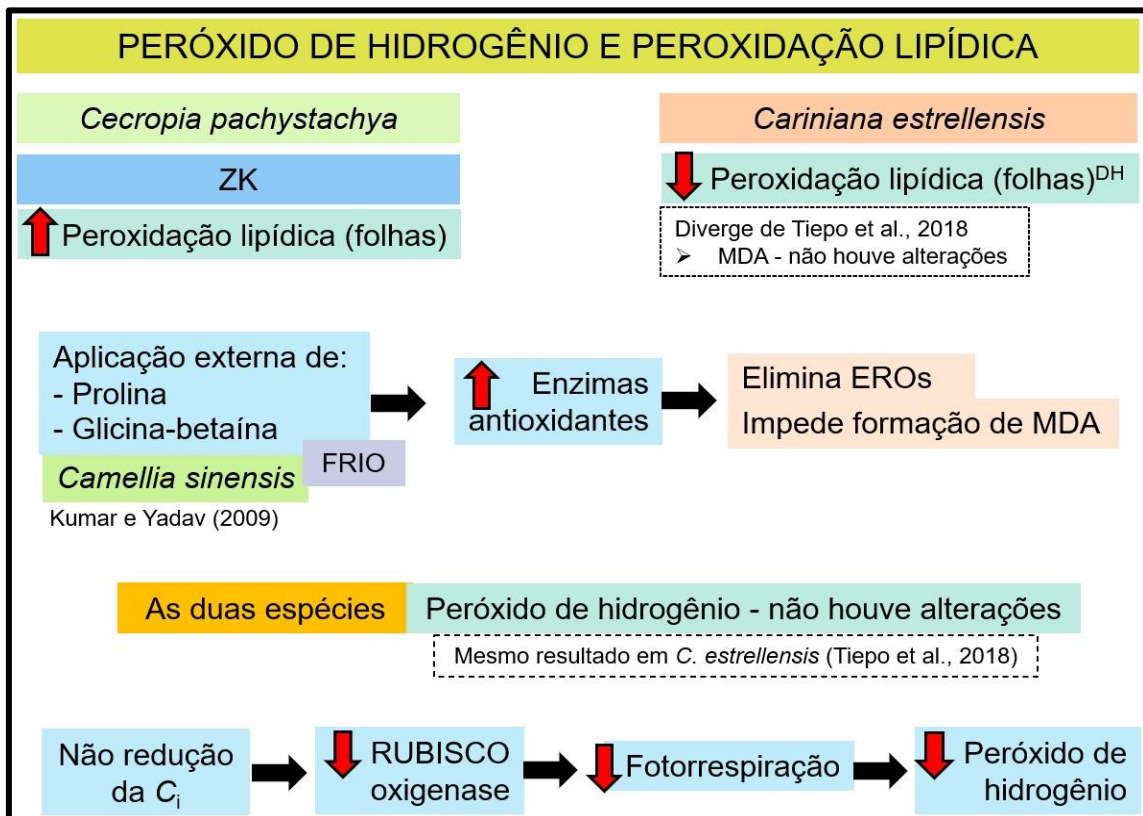
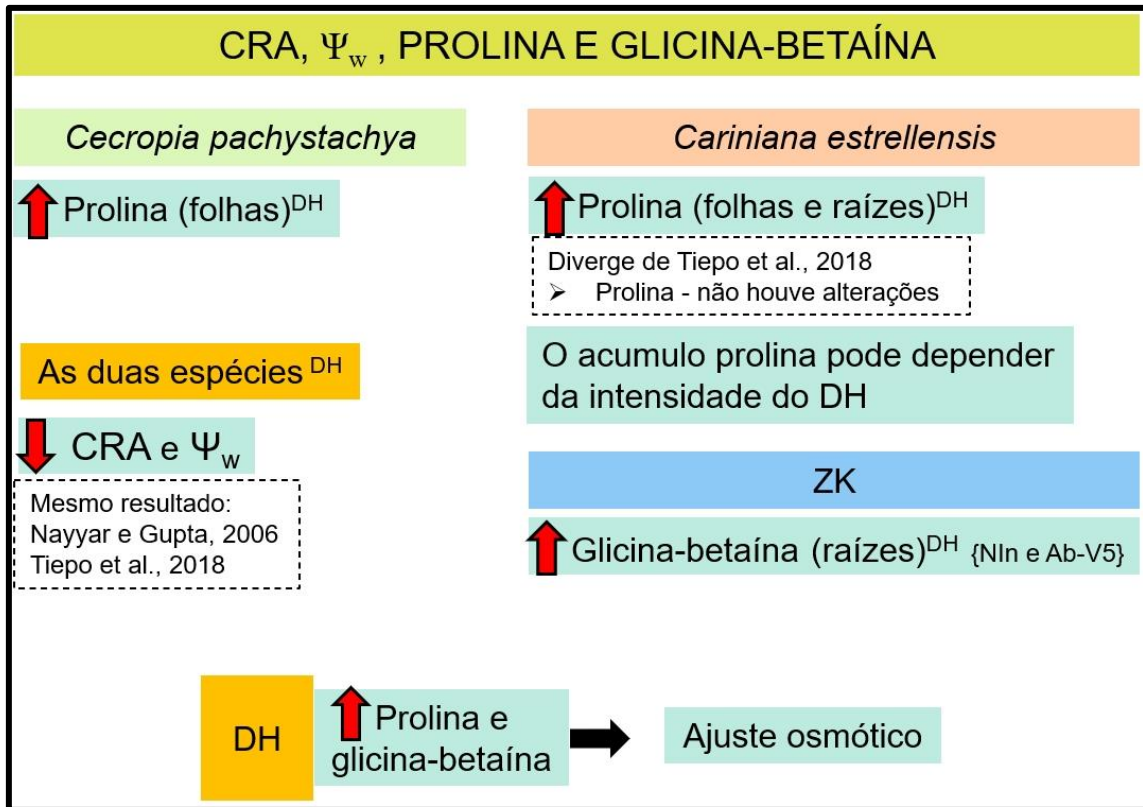
Síntese comparativa dos principais resultados deste estudo.



LEGENDA:

{“x”} – comparação à “x”

Comparação a outros estudos



LEGENDA:

{ "x" } – comparação à "x"

Comparação a outros estudos