



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JESSICA VIDAL MANDELLI

**TOLERÂNCIA À SECA DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS ASSOCIADAS COM BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E/OU MICORRIZAS  
ARBUSCULARES**

---

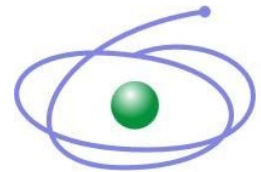
Londrina  
2019



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



CAPES

JESSICA VIDAL MANDELLI

**TOLERÂNCIA À SECA DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS ASSOCIADAS COM BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E/OU MICORRIZAS  
ARBUSCULARES**

JESSICA VIDAL MANDELLI

**TOLERÂNCIA À SECA DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
NEOTROPICAIS ASSOCIADAS COM BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E/OU MICORRIZAS  
ARBUSCULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Conservação de Habitats Fragmentados).

Orientador: Profa. Dra. Renata Stolf Moreira

Londrina  
2019

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

Mandelli, Jessica Vidal.

Tolerância à seca de espécies arbóreas neotropicais associadas com bactérias promotoras de crescimento e/ou micorrizas arbusculares / Jessica Vidal Mandelli. - Londrina, 2019.  
68 f. : il.

Orientador: Renata Stolf Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019. Inclui bibliografia.

1. Ecofisiologia vegetal - Tese. 2. Ecologia das florestas tropicais - Tese. 3. Crescimento (Plantas) - Tese. 4. Plantas - Absorção de água - Tese. I. Moreira, Renata Stolf. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.



**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Discente: Jessica Vidal Mandelli

Título: Interação entre bactérias associativas e micorrizas arbusculares para a maior tolerância à seca em espécies arbóreas neotropicais.

Data da Defesa: 15 de março de 2019 – 14:00hs, na sala da pós-graduação da genética da Universidade Estadual de Londrina.

**Banca Examinadora**

**PRESIDENTE:**

Dra. Renata Stolf Moreira

UEL

**TITULARES:**

Dr. José Antônio Pimenta

Dra. Jaqueline Dias Pereira

PARECER	
APROVADO	REPROVADO
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Parecer Final**

APROVADA

*Renata Stolf Moreira*  
\_\_\_\_\_  
Dra. Renata Stolf Moreira

*Dr. José Antônio Pimenta*  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Antônio Pimenta

*Dra. Jaqueline Dias Pereira*  
\_\_\_\_\_  
Dra. Jaqueline Dias Pereira

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que é meu guia e meu amparo;

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro;

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e disponibilidade de infraestrutura;

Ao Laboratório de Bioquímica Molecular (UEL – CCE/Biotecnologia) pelos disponibilidades dos inóculos de bactérias promotoras de crescimento;

À Universidade Regional de Blumenau (FURB) pela gentil disponibilização dos inóculos de fungos micorrízicos arbusculares;

À Profa. Dra. Renata Stolf Moreira pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade;

À Profa. Dra. Jaqueline Dias Pereira pelas análises anatômicas e pela disponibilidade e contribuições na minha banca de defesa;

Ao Prof. Dr. José Antonio Pimenta pelo apoio à realização deste trabalho e pela disponibilidade e contribuições na minha banca de defesa

Aos Profs. Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro e Dr. Artur Berbel Lirio Rondina pela disponibilidade e sugestões na banca de qualificação;

Aos Profs. Dr. Halley Caixeta e Dr. Edmilson Bianchini pelo apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pelos ensinamentos;

Aos meus pais e meu irmão pelo amor, paciência, por me incentivarem e acreditarem em meu potencial;

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial Patrícia e Natália pela ajuda, incentivo, experiências compartilhadas e amizade.

Muito obrigada!

Vidal Mandelli, Jessica. **Tolerância à seca de espécies arbóreas neotropicais associadas com bactérias promotoras de crescimento e/ou micorrizas arbusculares.** 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Devido à degradação do Bioma Mata Atlântica causada pelo desmatamento antrópico, é necessária a sua restauração de forma eficiente e com baixo custo. Porém, muitas vezes o ambiente está severamente danificado devido aos diversos estresses abióticos que as plantas se encontram, dentre eles o déficit hídrico, o que dificulta o bom desenvolvimento das plantas de espécies utilizadas em áreas de reflorestamento. A associação das mudas com bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem se mostrado como alternativa para tornar essas mudas mais tolerantes ao déficit hídrico. Objetivou-se, com este estudo, verificar como ocorre a associação de BPCP e/ou FMA com mudas das espécies arbóreas neotropicais *Heliocarpus popayanensis* (pioneira) e *Cariniana estrellensis* (não pioneira) submetidas ao déficit hídrico e as alterações estruturais que as inoculações podem causar nas mudas dessas espécies mantidas em condições de capacidade de campo. Para verificar os efeitos das inoculações em diferentes condições hídricas, as mudas foram mantidas em casa de vegetação, e inoculadas separadamente com a BPCP, o FMA e uma combinação de BPCP + FMA, submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) com 15 % de umidade gravimétrica (UG) e outro mantido em capacidade de campo (CC) com 30 % de UG. Após o período de 30 dias de tratamento foram feitas as análises de crescimento, fisiológicas e bioquímicas para avaliar a influência dessas associações na estrutura e metabolismo, enquanto para as análises anatômicas, as mudas foram mantidas em CC e realizadas as análises após 90 dias de tratamento, de acordo com metodologias usuais. Com os resultados anatômicos, foi possível observar alterações estruturais relacionadas ao desenvolvimento, como a diminuição da espessura e área do xilema secundário, e a presença de estruturas relacionadas ao crescimento primário, como a epiderme, quando inoculadas com o FMA. Enquanto, com as análises das mudas mantidas em DH foram observadas manutenção da massa seca das raízes e do caule dentre ambas as condições hídricas em mudas de *C. estrellensis* quando foram inoculadas com a BPCP *Bacillus* (ZK) e co-inoculadas (ZK+FMA). Foi observado redução no potencial hídrico de mudas de *H. popayanensis* em DH, e em *C. estrellensis* apenas nas plantas não inoculadas houve essa redução, indicando que as inoculações auxiliaram as plantas a manter o potencial hídrico. Nas mudas com menor potencial hídrico, houve também redução na condutância estomática e concentração intercelular de CO<sub>2</sub>. Dentro das respostas metabólicas, destaca-se a manutenção dos níveis de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica nas mudas de *H. popayanensis* co-inoculadas, sugerindo que houve proteção contra danos oxidativos nessas mudas. Já para a espécie *C. estrellensis* houve a manutenção dos níveis de peróxido de hidrogênio em DH quando inoculadas com ZK e FMA. Diante disso, foi possível determinar que as espécies arbóreas respondem de maneira diferente às inoculações dependendo do seu grupo sucessional e taxonômico, o que leva à conclusão de que elas se relacionam de forma diferente com os microrganismos encontrados no solo, como os

que foram utilizados nesse trabalho. Porém, é possível observar que as mudas de ambas espécies vegetais se beneficiam de alguma maneira, da adição desses micorganismos.

**Palavras-chave:** BPCP. Déficit hídrico. Fungos micorrízicos arbusculares. Interação planta-micorganismo. Trocas gasosas.

Vidal Mandelli, Jessica. **Drought tolerance of neotropical tree species associated with growth promoters and / or arbuscular mycorrhizae.** 2019. 68 p. Dissertation (Master in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Due to the degradation of the Atlantic Forest caused by anthropic deforestation, it's necessary to restore it efficiently and at a low cost. However, the environment is often severely damaged due to the various abiotic stresses of the plants, among them the water deficit, which hinders the good development of the plants of species used in reforestation areas. The association of seedlings with plant growth promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has been shown as an alternative to make these seedlings more tolerant to water deficit. The objective of this study was to verify the association of PGPR and / or AMF with Neotropical tree seedlings *Heliocarpus popayanensis* (pioneer) and *Cariniana estrellensis* (non-pioneer) submitted to water deficit and the structural alterations that inoculations can cause in the seedlings of these species maintained under field capacity conditions. In order to verify the effects of the inoculations in different water conditions, the seedlings were kept in greenhouse, and inoculated separately with PGPR, AMF and a combination of PGPR+AMF, submitted to the moderate water deficit (WD) with 15% humidity (UG) and another maintained at field capacity (FC) with 30% UG. After 30 days of treatment, growth, physiological and biochemical analyzes were performed to evaluate the influence of these associations on structure and metabolism, whereas for the anatomical analyzes, the seedlings were maintained in WD and the analyzes were performed after 90 days of treatment, according to usual methodologies. With the anatomical results, it was possible to observe structural changes related to the development, such as the decrease of the thickness and area of the secondary xylem, and the presence of structures related to the primary growth, such as the epidermis, when inoculated with the AMF. While the analyzes of the seedlings kept in WD, root and stem dry mass maintenance were observed in both seedlings of *C. estrellensis* when inoculated with PGPR *Bacillus* (ZK) and co-inoculated (ZK + AMF). There was a reduction in the water potential of *H. popayanensis* seedlings in WD, and in *C. estrellensis* only in the non inoculated plants there was this reduction, indicating that the inoculations helped the plants to maintain the water potential. In the seedlings with lower water potential, there was also a reduction in stomatal conductance and intercellular CO<sub>2</sub> concentration. Within the metabolic responses, the maintenance of the levels of hydrogen peroxide and lipid peroxidation in the seedlings of co-inoculated *H. popayanensis*, suggesting that there was protection against oxidative damages in these seedlings. For the *C. estrellensis* species, the hydrogen peroxide levels were maintained in WD when inoculated with ZK and AMF. Thus, it was possible to determine that tree species respond differently to inoculations depending on their successional and taxonomic group, which leads to the conclusion that they are related in a different way to the microorganisms found in the soil, such as those that were used in this job. However, it is possible to observe that the seedlings of both plant species benefit in some way from the addition of these microorganisms.

**Palavras-chave:** Arbuscular mycorrhizal fungi. Gas exchange. Interaction plant-microorganisms. PGPR. Water deficit.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Figura 1- Vista superficial da raiz de *Heliocarpus popayanensis* (Microscopia eletrônica de varredura) (A, C e E) e de *Cariniana estrellensis* (B, D e F), não inoculados (A e B) ou inoculados com FMA (C e D) e ZK (E e F). Em que Hi = Hifas; Ba= colônias bacterianas; Bf= Biofilme. Barras em A, E e F =5,0 µm; em C =20 µm; e em B e D = 50 µm.....32
- Figura 2** – Anatomia de raízes de *Heliocarpus popayanensis* (A, C, E e G) e *Cariniana estrellensis* (B, D, F e H) (microscopia de luz - corte transversal), não inoculados (A e B) ou inoculados com ZK (C e D), FMA (E e F) e ZK+FMA (G e H). Em que: C = câmbio; Ctx = Córtex; FI2° = floema secundário; Pe = periderme sendo instalada; XI2° = xilema secundário. Barras A, C, E e G = 100 µm e B, D, F e H = 200 .....34
- Figura 3** – Potencial de água (A e B) de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA, mantidas no solo em capacidade de campo (CC) e submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e barras pontilhadas comparam as inoculações. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico B as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico A-II as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculos. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).....37

- Figura 4** – Taxa Fotossintética Líquida (A) (A e B), Condutância estomática (gs) (C e D) e Concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci) (E e F) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e barras pontilhadas comparam as inoculações. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para os gráficos da interação (A, B, D e F) as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico das inoculações (E-II) as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculo. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).....39
- Figura 5** – Eficiência intrínseca no uso da água (A e B) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico B as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico A-II as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculo. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).....40

- Figura 6** – Teor de Nitrogênio Total (A e B) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente). Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).....41
- Figura 7** – Conteúdo de Prolina em folhas de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).....42
- Figura 8** – Peroxidação lipídica (A e B) e Peróxido de hidrogênio (C e D) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente). Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....43

**Figura 9** – Comprimento do caule (A e B) e da raiz (C e D) em mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A e C) e *Cariniana estrellensis* (B e D) controle (N.in), inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA, mantidas no solo em capacidade de campo (CC) e submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e barras pontilhadas comparam as inoculações. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico C as letras maiúsculas acima das barras comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para os gráficos A-II; B e D as letras minúsculas comparam os tratamentos inóculos. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*  $p < 0,01$ ). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) .....44

**Figura 10** – Densidade da raiz em mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) controle (N.in), inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA, mantidas no solo em capacidade de campo (CC) e submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e estão representadas nos gráficos I, e barras pontilhadas comparam as inoculações e estão representadas nos gráficos II. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico A as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico das inoculações (B-II) as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculos. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).....45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Micromorfometria de raízes em mudas de *Heliocarpus popayanensis* (Hp) e *Cariniana estrellensis* (Ce) sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA durante 60 dias. Os valores são as médias  $\pm$  erros-padrão. As letras comparam os tratamentos com inóculos. Letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).....36
- Tabela 2** – Massa seca de raiz, caule e folha de mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Os valores são médias  $\pm$  erros-padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em CC e as minúsculas os tratamentos em DH. O asterisco compara as mudas em cada condição hídrica (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). .....38

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 <i>O Bioma Mata Atlântica e o Uso de Espécies Arbóreas Neotropicais para Reflorestamento e Recuperação de Áreas Degradadas</i> .....	14
1.2 <i>Tolerância à Seca em Plantas</i> .....	17
1.3 <i>Associação de plantas com microrganismos</i> .....	21
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
1 <i>Material Biológico e Delineamento Experimental</i> .....	28
2 <i>Análises Estruturais</i> .....	31
3 <i>Análises Fisiológicas</i> .....	33
4 <i>Análises Metabólicas</i> .....	34
5 <i>Análises de Crescimento</i> .....	35
6 <i>Análises Estatísticas</i> .....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	37
<i>Análises Estruturais</i> .....	37
<i>Análises Fisiológicas</i> .....	40
<i>Análises Metabólicas</i> .....	44
<i>Análises de Crescimento</i> .....	46
<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

### *1.1 O Bioma Mata Atlântica e o Uso de Espécies Arbóreas Neotropicais para Reflorestamento e Recuperação de Áreas Degradadas*

As florestas tropicais desempenham importante papel na ciclagem do carbono e colaboram para minimizar o aumento de CO<sub>2</sub> na atmosfera, por formarem uma fonte renovável de carbono em forma de biomassa (FAVARETTO et al., 2011). Características ambientais como o índice anual de precipitação pluvial, sazonalidade, intensidade luminosa e fertilidade do solo podem determinar as características funcionais, morfológicas e fisiológicas que ocorrem nas plantas de uma floresta tropical (FAVARETTO et al., 2011).

Porém, nas últimas décadas vem ocorrendo uma ampla destruição de tais florestas, o que contribui para a perda de biodiversidade e o aquecimento global (CRAVEN et al., 2011; FAVARETTO et al., 2011). Além disso, o desmatamento contribui para a degradação do ambiente natural e da cobertura vegetal, resultando em problemas ambientais (MENDONÇA, 2006; VIANA e PINHEIRO, 1998).

O Bioma Mata Atlântica contém a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano e, é considerada um dos 25 *hotspots* mundiais da biodiversidade; porém, possui atualmente apenas 7,5 % de sua cobertura original (MYERS et al., 2000; TABARELLI et al., 2005). As regiões onde se encontram as maiores áreas de remanescentes desse Bioma estão, na maioria das vezes, associadas às unidades de conservação de proteção integral, localizadas principalmente na Mata Atlântica costeira dos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Espírito Santo (PINTO et al., 2006).

Embora a quantidade de unidades de conservação seja expressiva no Bioma Mata Atlântica, com cerca de 680 áreas de proteção integral e 130 áreas de uso sustentável, a soma de todas essas unidades totaliza apenas 2.500.000 hectares (PINTO et al., 2006). Isso corresponde a menos de 2 % da área do Bioma, um dos motivos que faz a conservação da biodiversidade depender da expansão de áreas protegidas (PINTO et al., 2006).

A conservação e a recuperação desse *hotspot* são desafiadoras devido à dificuldade de funcionamento dos seus ecossistemas num ambiente sob forte

pressão antrópica (PINTO et al., 2006). No entanto, para garantir a proteção e a biodiversidade do Bioma Mata Atlântica, é necessário o manejo adequado de espécies e ecossistemas (PINTO et al., 2006).

Levando em consideração a necessidade de recuperação de áreas degradadas através do reflorestamento, há uma maior demanda por mudas de espécies arbóreas nativas (KELLER et al., 2009). Muitas vezes, reestabelecer a vegetação nativa via reflorestamento é difícil, pois as condições do solo são adversas, tais como altas concentrações de contaminantes, pH alterado, deficiência de nutrientes, e comunidade microbiana danificada, além de áreas de maior luminosidade, déficit hídrico, menor valor nutricional do solo e maiores temperaturas (CRAVEN et al., 2011; DE-BASHAN et al., 2012). Esse dano à comunidade microbiana afeta diretamente a fertilidade do solo e, conseqüentemente, o potencial de crescimento das plantas (DE-BASHAN et al., 2012).

O reflorestamento se apresenta como parte da solução para as conseqüências do aquecimento global, exercendo importante papel ecológico, porém, é necessário o conhecimento prévio das espécies a serem utilizadas no plantio para garantir o seu sucesso em campo, como as características ecofisiológicas e as estratégias adaptativas (FAVARETTO et al., 2011). É necessário, também, o conhecimento prévio do local onde será realizado o reflorestamento e as condições que esse ambiente oferece para o crescimento das plantas (LAMB et al., 2005). Geralmente, o reflorestamento é concentrado em locais específicos como áreas ribeirinhas, de manchas florestais e corredores (LAMB et al., 2005).

Entre as conseqüências das perturbações encontradas no Bioma Mata Atlântica e da fragmentação dos ecossistemas naturais, as condições microclimáticas de áreas degradadas são diferentes daquelas encontradas na floresta madura (MATTSSON, 1997). Tais condições dificultam o crescimento e a sobrevivência das mudas após o transplante, havendo a necessidade de se produzir mudas que tenham características ecofisiológicas que favoreçam o seu estabelecimento no campo para o sucesso dos programas de reflorestamento (MATTSSON 1997).

As espécies arbóreas utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento podem ser classificadas de acordo com o grupo sucessional ao qual pertencem, sendo assim divididas em dois grupos sucessionais:

as pioneiras e as não pioneiras (AIDAR et al. 2003; FAVARETTO et al. 2011).

As principais características a serem levadas em consideração ao classificar uma espécie são ligadas à luminosidade, como a exigência de luz e a tolerância ao sombreamento (FAVARETTO et al., 2011; GOODALE et al., 2012). Sendo assim, elas podem fazer parte dos grupos intolerantes à sombra (pioneiras), ou tolerantes à sombra (não pioneiras).

A classificação das espécies em grupos sucessionais baseada na tolerância ao sombreamento é caracterizada por propriedades foliares, como a capacidade fotossintética, tolerância à fotoinibição e ao estresse oxidativo (FAVARETTO et al. 2011). Portanto, geralmente, espécies pioneiras tendem a ter maiores taxas fotossintéticas, maior taxa de acúmulo de biomassa e menor teor de carotenóides (FAVARETTO et al. 2011). Enquanto as espécies não pioneiras são mais vulneráveis à fotoinibição que ocorre quando a luz absorvida excede a quantidade necessária para a assimilação do carbono, gerando uma diminuição da eficiência fotossintética, além de apresentarem um menor ponto de saturação luminoso, decorrente da menor quantidade de enzimas do metabolismo fotossintético, como por exemplo, a Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), enzima chave no processo de assimilação de CO<sub>2</sub> no ciclo de Calvin (FAVARETTO et al. 2011).

As espécies pioneiras ocupam locais com maior quantidade de luz, pois apresentam uma rápida taxa de crescimento para se manter no dossel, já as espécies não pioneiras se estabelecem em ambientes com menos luz, no sub-bosque das florestas (POORTER e BONGERS, 2006). No geral, as espécies pioneiras apresentam maior área foliar específica, menor massa de semente e densidade da madeira, ao contrário do que é observado nas espécies não pioneiras, que apresentam crescimento mais lento (POORTER e BONGERS, 2006, WRIGHT et al., 2010).

Além da luminosidade, as espécies vegetais também se diferenciam pela forma como assimilam o nitrogênio. O nitrogênio disponível no solo é absorvido pelas plantas em forma de fontes inorgânicas como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (HARRISON et al, 2007). Após ser absorvido pelas células da raiz, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é reduzido a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pela enzima nitrato redutase (NR) e, em seguida, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é reduzido a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pela enzima nitrito redutase (NitR). O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é assimilado em aminoácidos através da ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato

aminotransferase (GOGAT) (KRAPP, 2015).

As plantas de espécies pioneiras assimilam preferencialmente  $\text{NO}_3^-$ , apresentando alta atividade da enzima NR nas folhas, enquanto nas espécies não-pioneiras esse nível de atividade da NR e de assimilação do  $\text{NO}_3^-$  são menores (AIDAR ET AL., 2003). Essas plantas apresentam preferência por outras fontes inorgânicas de N, provavelmente o  $\text{NH}_4^+$ , visto que há uma diminuição na razão  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  no solo ao longo da sucessão ecológica (KRONZUCKER et al., 2003).

Para garantir o maior sucesso do reflorestamento, é necessário o conhecimento das interações entre as espécies, seus processos sucessionais e padrões de uso dos recursos, pois em um ambiente natural as plantas são expostas a mudanças contínuas de luminosidade e temperatura, portanto, torna-se importante a capacidade de essas plantas em tolerar tais condições (FAVARETTO et al., 2011; OSTERTAG et al., 2015).

### *1.2 Tolerância à Seca em Plantas*

A atual mudança climática, que ocorre em grande medida devido ao desmatamento, tem causado um grande impacto nos perfis de temperatura e precipitação pluvial, aumentando a ocorrência de seca (MENDONÇA, 2006). Tais flutuações no clima, decorrentes do aquecimento global, podem levar a um aumento na evaporação de água nos solos e evapotranspiração das plantas (WILLIAMS et al., 2013). As plantas necessitam de uma quantidade de água que seja suficiente para garantir seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, sendo que a escassez de água pode ser letal (FANG e XIONG, 2014). A seca afeta negativamente o desenvolvimento das plantas, além de causar danos ecológicos como a desertificação e a erosão do solo (FANG e XIONG, 2014).

O déficit hídrico (DH) no solo é uma restrição ambiental que ocorre quando a água disponível para absorção pela planta é reduzida, e é causado principalmente por períodos intermitentes e até contínuos sem precipitação pluvial (JALEEL et al., 2009; TAIZ et al., 2017). Além de reduzir a produtividade e o desenvolvimento de plantas, o DH também resulta em mudanças anatômicas, de crescimento, fisiológicas e bioquímicas. A tolerância das plantas à seca é uma característica complexa com uma combinação de vários caracteres morfológicos, bioquímicos e moleculares, essa tolerância é encontrada em quase todas as espécies, porém a sua eficácia varia de acordo com a espécie (JALEEL et al., 2009; PANDEY e

SHUKLA, 2015).

As mudanças anatômicas observadas à tolerância a períodos de DH, geralmente estão envolvidas com proteção contra a perda excessiva de água pela planta, contra a dessecação de células corticais, e também alterações de células condutoras para a manutenção do fluxo transpiratório xilema. Enquanto as mudanças ecofisiológicas estão associadas, especialmente, às alterações no mecanismo de abertura estomática (MELO et al., 2007).

Uma mudança anatômica que pode ser encontrada nas plantas submetidas ao DH está ligada ao diâmetro dos elementos de vasos do xilema nas raízes e caule. Foi observado em gramíneas da espécie *Paspalum paniculatum* L. que o diâmetro do metaxilema tanto nas folhas quanto nas raízes diminuiu nas plantas expostas ao DH em relação àquelas em CC (MELO et al., 2007). Essa estratégia é importante, porque em situações DH os elementos de vaso são propensos a ocorrer cavitação devido à interrupção da coluna de água, resultado do aumento da tensão hidráulica ao longo do contínuo solo-planta-atmosfera (CAI e TYREE, 2010; MELO et al., 2007). Elementos de vaso com diâmetro maior são mais condutivos, porém estão mais propensos à cavitação, portanto em plantas submetidas a situações de seca é mais eficiente a formação de elementos de vaso com diâmetro menor para minimizar a cavitação (CAI e TYREE, 2010).

A planta só é capaz de absorver água eficientemente quando seu potencial de água é menor que o do solo (TAIZ et al., 2017). O potencial de água é constituído basicamente pela soma do potencial osmótico e do potencial de pressão, já que o potencial gravitacional e mátrico são geralmente desconsiderados no sistema solo-planta, pois seus valores costumam ser desprezíveis quando comparados aos demais potenciais (TAIZ et al., 2017). As plantas podem se ajustar osmoticamente quando expostas a solos com deficiência hídrica para garantir um menor potencial de água sem que haja decréscimo no turgor celular, para isso elas aumentam a concentração de solutos na célula. A manutenção do turgor celular é importante, pois permite a continuação da expansão celular e manutenção no potencial de água.

Esse ajuste osmótico pode ocorrer de duas maneiras: absorvendo íons do solo e acumulando-os predominantemente no vacúolo, lugar onde protege as enzimas citosólicas e outras organelas dos efeitos nocivos dos íons, ou transportando íons de outros órgãos da planta para a raiz de modo a aumentar a concentração de solutos nas suas células (TAIZ et al., 2017). Como os solutos são

compostos orgânicos osmoticamente ativos, as moléculas de água formam uma camada de solvatação espessa, que favorece a redução do potencial osmótico, tornando-o mais negativo na planta, permitindo que haja a manutenção do gradiente decrescente de potencial de água entre o solo e a planta mesmo durante condições de déficit hídrico. Sendo assim, é possível sugerir que o ajuste osmótico aumenta a tolerância das plantas ao DH (BIANCHI et al., 2005).

Em plantas submetidas ao DH, geralmente é alta a concentração de prolina, um aminoácido que pode atuar como soluto compatível (PER et al., 2017). A prolina protege as plantas contra os efeitos negativos do DH, principalmente por meio da manutenção do ajuste osmótico, mantendo o gradiente decrescente de potencial de água no sistema solo-planta-atmosfera (PANDEY e SHUKLA., 2015). Ainda, a prolina também pode promover o reparo de danos na planta, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes durante o déficit hídrico, acarretando a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e protegendo a integridade das membranas celulares (PANDEY e SHUKLA, 2015).

As plantas também podem aumentar a tolerância à seca pela regulação estomática eficiente, na qual o estômato é parcialmente fechado. Porém, essa condição também restringe a difusão de CO<sub>2</sub> para o interior das folhas, o que pode resultar em diminuição na atividade fotossintética (VANLERBERGHE et al., 2016). Sendo assim, pode haver um grande desequilíbrio entre a absorção da energia luminosa pelas membranas dos tilacóides e a utilização da energia metabólica pelo Ciclo de Calvin (VANLERBERGHE et al., 2016). Como resultado desse desequilíbrio decorrente da menor assimilação de CO<sub>2</sub>, há uma redução da biomassa e do crescimento da planta e pode haver aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (VANLERBERGHE et al., 2016).

A diminuição no tamanho do estômato também é uma estratégia fundamental na regulação de trocas gasosas, pois as folhas com estômatos menores proporcionam maior eficiência no uso da água (EUA), o que culmina em uma menor perda de água por transpiração por unidade de C assimilado (MELO et al., 2007). Somado a isso, o aumento da densidade estomática nas folhas é uma alternativa ao suprimento adequado de CO<sub>2</sub>, necessário para a eficiência da fotossíntese (MELO et al., 2007).

A taxa fotossintética pode ser reduzida pela limitação da difusão do CO<sub>2</sub> que ocorre com o fechamento estomático e pela redução da atividade da enzima

ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), responsável pela assimilação de CO<sub>2</sub> no ciclo de Calvin, a qual é dependente da reação com CO<sub>2</sub> para a sua ativação (PANDEY e SHUKLA, 2015). Além disso, com a limitação do CO<sub>2</sub> também há comprometimento da fase fotoquímica da fotossíntese, com a redução da eficiência do fotossistema II (FSII), pois as plantas tornam-se mais propensas a sofrer fotoinibição, resultante da absorção de fótons superior à quantidade utilizada na fotossíntese (FAVARETTO et al., 2011; PANDEY e SHUKLA, 2015).

A atividade do FSII é importante no fornecimento de NADPH e ATP que é utilizado na fase química da fotossíntese. Se a atividade de FSII exceder a demanda pode ocorrer uma redução excessiva da cadeia de transporte de elétrons fotossintética, estimulando a formação de EROs (PANDEY e SHUKLA, 2015). Por essa razão, em geral, as plantas expostas ao DH que apresentam diminuição na condutância estomática e na atividade fotossintética são propensas a um processo lipoperoxidativo nas membranas, resultado do acúmulo de EROs no FSII (APEL e HIRT, 2004).

As EROs são exemplificadas pelo oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (<sup>•</sup>HO), as quais iniciam eventos de oxidação nas células e podem danificar proteínas, enzimas, pigmentos, lipídios e ácidos nucleicos, o que gera perturbações do metabolismo e, em casos extremos, a morte das plantas (APEL e HIRT, 2004; ESPOSITO, 2018; FANG e XIONG, 2014). Em um experimento realizado por ESPOSITO et al. (2018) em diferentes espécies arbóreas pioneiras e não-pioneiras de remanescentes da Floresta Atlântica, observou-se que as plantas de espécies arbóreas não-pioneiras acumularam maior quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas folhas no período de seca e O<sub>2</sub><sup>-</sup> no período chuvoso, e apresentaram um metabolismo antioxidante menos efetivo que as plantas de espécies pioneiras. Esses resultados corroboram a importância dos mecanismos de ativação de enzimas antioxidantes observados em pioneiras a fim de aumentar a tolerância à seca.

As principais enzimas antioxidantes responsáveis pela eliminação de EROs são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR), importantes por controlar as reações de redução nas células sob condições de estresses luminoso, salino, oxidativo e hídrico (Apel e Hirt, 2004). O nível de danos oxidativos nas células depende de quão eficiente as plantas ativam essas enzimas antioxidantes (ESPOSITO et al., 2018; FAVARETTO et al.,

2011). Essas enzimas agem inibindo as EROs, por exemplo, o peróxido de hidrogênio é clivado, resultando em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> pela CAT nos peroxissomos e pela APX nos cloroplastos (FAVARETTO et al., 2011).

Em condições de DH a quantidade de pigmentos fotossintetizantes, como as clorofilas *a* e *b* e os carotenóides diminuem (JALEEL et al., 2009). Essa redução pode ocorrer devido ao comprometimento da síntese dos pigmentos, pela degradação dos pigmentos, pela perda da membrana do cloroplasto ou pelo aumento da peroxidação lipídica induzidos pelo déficit hídrico (JALEEL et al., 2009; PANDEY e SHUKLA, 2015). Consequentemente, isso gera redução do rendimento e da biomassa da planta, pois afeta a sua eficiência fotossintética, já que as clorofilas *a* e *b* são responsáveis por absorver e transferir a energia luminosa para o centro de reação do FSII (JALEEL et al., 2009; PANDEY e SHUKLA, 2015).

Em condições de DH, há também o aumento no conteúdo de ácido abscísico (ABA) na planta (PANDEY e SHUKLA, 2015). O ABA é um fitohormônio regulador de crescimento, e também capaz de regular respostas de tolerância à seca através da regulação da abertura estomática. O ABA pode mediar respostas das plantas contra o DH por meio de vias de transdução de sinais nas células-guarda, aumenta a produção de óxido nítrico (NO) que estimula a biossíntese e ação de mensageiros secundários que induzem o fechamento estomático (PANDEY e SHUKLA, 2015, TAKAHASHI et al., 2018). As plantas reconhecem a condição de déficit hídrico nas raízes e transmitem esse sinal para a parte aérea, a qual sintetiza ABA nas folhas, mas também é observado um acúmulo de ABA nas raízes que está intimamente correlacionado com uma diminuição da condutância estomática nas folhas (KUROMORI et al., 2018; PANDEY e SHUKLA, 2015).

As interações com microrganismos na rizosfera podem auxiliar as plantas a contornar os estresses hídrico e oxidativo, pois as interações aumentam o acúmulo de solutos compatíveis e de enzimas antioxidantes (RUÍZ-LOZANO et al., 2008). Além disso, os microrganismos são conhecidos por promoverem o crescimento da planta por meio da síntese de fitohormônios mesmo em condições de estresses ambientais (GLICK et al., 2012).

### *1.3 Associação de plantas com microrganismos*

Na natureza, as plantas interagem com os microrganismos do solo, especialmente Bactérias Promotoras do Crescimento em Plantas (BPCP) e Fungos

Micorrízicos Arbusculares (FMA) (BULGARELLI et al., 2013). As BPCP e os FMA estão localizados na rizosfera, que é a região do solo em torno das raízes das plantas, com, aproximadamente, 3 a 5 cm de espessura. Ela é influenciada pelo crescimento, respiração e troca de nutrientes das raízes devido à rizodeposição proveniente de células de uma região especial desse órgão, a rizoderme (BULGARELLI et al., 2013). Essa região secreta alguns compostos, tais como, ácidos orgânicos, íons inorgânicos, açúcares, vitaminas, aminoácidos e polissacarídeos (BULGARELLI et al., 2013).

Em ambientes naturais, a quantidade de nutrientes disponível no solo é limitante, porém quando se trata da rizosfera, ela se apresenta mais rica em nutrientes devido à rizodeposição e exsudatos radiculares (BULGARELLI et al., 2013). As plantas que se encontram em déficit hídrico aumentam a liberação de tais exsudatos, os quais favorecem a proliferação e crescimento de microrganismos que colonizam a rizosfera devido a maior disponibilidade de nutrientes nessa região (LIEBERSBACH et al., 2004). Os microrganismos também contribuem com a composição desses exsudatos devido aos seus efeitos no metabolismo das células da raiz e, conseqüentemente, no estado nutricional das plantas (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

As BPCP formam um grupo amplo de microrganismos que inclui quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem positivamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (FREITAS, 2007). São bactérias livres do solo que podem facilitar o crescimento das plantas por diversos mecanismos de associação e proteção contra estresses ambientais, podendo cada espécie de BPCP apresentar um ou mais desses mecanismos. Entre esses mecanismos, é possível observar o aumento do teor de nitrogênio, pois elas podem fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo às plantas, a produção de fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, solubilização de minerais como o fósforo e disponibilizar ferro, e a inibição de patógenos (GLICK et al., 2012). Dentre essas BPCP observam-se espécies de *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Agrobacterium* (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

As BPCP podem ser divididas em dois grupos quanto ao local de ocorrência da associação: as BPCP extracelulares que se encontram na rizosfera, rizoplano e nos espaços entre as células do córtex da raiz; e as BPCP intracelulares que colonizam as células das raízes, geralmente formando nódulos nas plantas

leguminosas entre outras (GRAY e SMITH, 2005). As BPCP extracelulares, como por exemplo, os gêneros *Azospirillum* e *Bacillus*, não formam nódulos, mas promovem o aumento do crescimento da planta por outros mecanismos, como a produção de fitohormônios e compostos sinalizadores que estimulam diretamente o crescimento da planta, melhoram a resistência a doenças e/ou aumentam a mobilização de nutrientes do solo (GRAY e SMITH, 2005).

O estabelecimento da associação ocorre a partir de uma sequência de acontecimentos de ambas as partes, onde as bactérias são estimuladas a se multiplicar pelas exsudações das raízes, que incluem compostos de baixo peso molecular, como açúcares e compostos fenólicos, e compostos de alto peso molecular, como polissacarídeos e proteínas (MOREL e CASTRO-SOWINSKI, 2013; TOWNSEND et al., 2009). Foi observado que os exsudatos de arroz aumentaram a resposta de quimiotaxia a *Bacillus pumilus* aos sistemas de raízes (BACILIO-JIMENEZ et al., 2003). A sinalização entre plantas e BPCP extracelulares pode envolver fitohormônios, flavonóides e compostos orgânicos voláteis (MOREL e CASTRO-SOWINSKI, 2013). Os fitohormônios agem como mensageiros químicos e podem ser produzidos pelas plantas e pelos microrganismos. As BPCP do gênero *Bacillus* são capazes de produzir fitohormônios como as citocininas e as auxinas (MOREL e CASTRO-SOWINSKI, 2013). Os polifenóis secretados pelas raízes, como os flavonóides, são importantes moléculas sinalizadoras nos eventos de interação planta-microrganismo, enquanto os compostos orgânicos voláteis, podem ser produzidos por algumas BPCP e atuam como sinalizadores estimulando o crescimento das plantas (MOREL e CASTRO-SOWINSKI, 2013).

As BPCP são conhecidas por melhorarem o crescimento vegetal mesmo sob condições ambientais limitantes como, por exemplo, o déficit hídrico; são capazes, por exemplo, de ajustar os níveis de fitohormônios endógenos, a fim de diminuir os efeitos negativos dos estresses ambientais e manter o crescimento e reprodução das plantas (SALAMONE et al., 2005). Em *Arabidopsis* inoculada com BPCP foi observado um aumento na tolerância ao déficit hídrico por meio da elevação de ácido abscísico (ABA), resultando na diminuição da transpiração foliar (BRESSON et al. 2013).

Em plantas de pimenta e tomate inoculadas com a BPCP *Achromobacter piechaudii*, houve aumento da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase), resultando em maior resistência sistêmica em

resposta ao déficit hídrico (MAYAK et al., 2004). Em diversas condições de estresses, incluindo o DH, o hormônio vegetal etileno produzido de forma endógena, faz com que a planta regule a homeostase, gerando uma redução no crescimento de raízes e brotos (GLICK et al., 2007). Plantas inoculadas com as BPCP que produzem ACC desaminase, responsável por degradar o ACC que é o precursor imediato da síntese de etileno, possibilitam o crescimento normal da planta mesmo sob essas condições de estresse (GLICK et al., 2007).

Ainda sob condições de déficit hídrico, foi observado por Ortiz et al. (2015) que mudas da espécie *Trifolium repens* L. inoculadas com a BPCP *Pseudomonas putida* em condições de DH apresentaram aumento da quantidade de pigmentos fotossintéticos e da taxa fotossintética, combinados com maior quantidade de açúcares solúveis e conteúdo de prolina nas folhas, os quais auxiliam na manutenção do turgor celular da planta por meio do ajuste osmótico (ORTIZ et al., 2015; RUÍZ-LOZANO et al., 2008; SANDHYA et al., 2010).

Os FMA penetram nas raízes da planta hospedeira por meio do micélio que se encontra no solo, ou por hifas originadas de esporos dos fungos (TOWNSEND et al., 2009). Após a penetração na célula cortical da raiz, o fungo forma um arbúsculo intracelular e finamente ramificado (TOWNSEND et al., 2009). Ambos os organismos se beneficiam da associação, como por exemplo, a melhora nutricional da planta hospedeira, por influência da nutrição mineral e absorção de água, conseqüentemente o crescimento e a tolerância a patógenos (BONFANTE e GENRE, 2010). Em troca, a planta auxilia no crescimento e na reprodução do fungo por meio da disponibilização de carbono assimilado, sendo que cerca de 20 % de todo o carbono assimilado pelas plantas associadas ao FMA é transferido para as estruturas fúngicas (AUGÈ et al., 2014; BONFANTE e GENRE, 2010). A capacidade dos fungos em produzir hifas finas, que são mais eficazes para a absorção de nutrientes e por secretar enzimas e ácidos orgânicos para mobilizar os nutrientes, é fundamental no mutualismo (OWEN et al., 2015).

Em um experimento realizado por Rondina et al., (2014) foi observado que plantas herbáceas e arbustivas expostas a solos de baixa fertilidade tiveram um aumento na absorção de nutrientes quando inoculadas com FMA, o que proporcionou o crescimento e sobrevivência dessas plantas.

Considerando a interação da planta com os FMA, a simbiose aumenta a tolerância à seca mantendo um balanço hídrico mais próximo ao de plantas em

capacidade de campo, por meio do ajuste osmótico (AUGÉ, 2004). Isso é possível, pois as finas hifas produzidas pelos fungos são mais eficazes que os pêlos das raízes das plantas na absorção de minerais do solo, que agem no ajuste osmótico da planta, reduzindo seu potencial de água para manter a absorção de água em períodos de seca (CAVAGNARO et al., 2015). Além do mais, as hifas dos FMA podem se estender por 10 centímetros além da superfície da raiz, aumentando o volume do solo explorado, e conseqüentemente a captação de água que não estaria disponível para as raízes, proporcionando uma melhor absorção de água do que as plantas não-micorrizadas do mesmo ambiente (AUGÉ, 2004; CAVAGNARO et al., 2015). Assim, as plantas associadas ao FMA apresentam a capacidade de manter a abertura estomática e, conseqüentemente, a assimilação de carbono (AUGÉ, 2004). Esta característica mantém o gradiente decrescente de potencial de água entre o solo e a planta, comparadas às plantas na mesma condição de déficit hídrico, porém sem interações micorrízicas (AUGÉ, 2004).

A associação com FMA também influencia no aumento de prolina nas plantas, como visto em *Lactuca sativa* L. (alface) (RUÍZ-LOZANO et al., 1995), que age como osmorregulador em situações de déficit hídrico. Ademais, plantas inoculadas com FMA também podem absorver mais água em condições de déficit hídrico quando comparadas àquelas que não possuem essa associação (NADEEM et al., 2014). Esse fato provavelmente está ligado com a modificação estrutural da raiz, que apresenta mais ramificações quando associadas com o FMA (NADEEM et al., 2014).

Foi observado que as interações entre micorrizas e plantas foram diferentes nos grupos funcionais de sucessão tropical, sendo que plantas de espécies pioneiras são mais propensas a terem suas raízes colonizadas por FMA do que as de espécies não pioneiras, independentemente do nível de fertilidade do solo (RONDINA et al., 2014; ZANGARO et al., 2012). Ainda, as plantas das espécies pioneiras apresentaram também suas raízes com características morfológicas que possibilitam o aumento do potencial de exploração do solo (ZANGARO et al., 2014).

Plantas micorrizadas também podem interagir com outros microrganismos do solo, incluindo as BPCP, aumentando ainda mais a tolerância dessas plantas a situações de estresses. Além disso, a co-inoculação pode melhorar a ciclagem de nutrientes, como N e P, e melhorar as propriedades físico-químicas do solo, como a formação de agregados (BAREA et al., 2005).

A combinação dos dois tipos de microrganismos (FMA e BPCP) pode ser de grande interesse para a produção de mudas em viveiros (BURDMAN et al., 2000). Quando somadas as inoculações, é possível a formação de mudas mais tolerantes a patógenos e à seca, com um sistema radicial mais desenvolvido para otimizar a absorção de nutrientes, o que pode melhorar as taxas de sobrevivência das mudas, reduzindo assim a perda econômica associada (PROBANZA et al., 2001).

A interação da inoculação com a BPCP *Azospirillum sp.* e FMA nas plantas mostraram bons resultados em plantas de arroz, pois o seu desenvolvimento morfológico e a condutância estomática aumentaram quando co-inoculadas (BPCP+FMA) (RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Em outro experimento com co-inoculação (BPCP+FMA) Armada et al., (2016) observaram maiores atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX, em plantas de *Lavandula dentata L.* inoculadas com FMA (*Diversispora aunantia* e *Archaeospora trappei*) ou pela mistura de FMA com a BPCP *Bacillus thuringiensis* em condições controladas em casa de vegetação. No mesmo experimento, foi observado também que a BPCP *B. thuringiensis* associada a FMA alivia o estresse oxidativo de plantas de *L. dentata* submetidas ao DH por meio da redução dos níveis de MDA. A interferência positiva nas respostas antioxidantes das plantas tratadas com microrganismos do solo (BPCP e FMA) é um importante efeito para plantas que se encontram em DH moderado, pois com essa resposta tais microrganismos podem aumentar o crescimento e o estado nutricional de plantas mesmo sob condições de estresse (ARMADA et al., 2016).

Em estudos com alface, ambas as inoculações, BPCP *Pseudomonas mendocina* e os FMA *Glomus intraradices* ou *Glomus mosseae*, juntos e isoladamente, estimularam a atividade da enzima chave na assimilação de nitrogênio, a nitrato redutase (NR), quando submetidas à seca moderada, sugerindo que houve maior assimilação de nitrogênio nessas plantas (KOHLENER et al., 2008). Já na seca severa as plantas apresentaram acúmulo de prolina em suas folhas, que atua como osmorregulador para manter um potencial de água adequado nessas condições (KOHLENER et al., 2008).

Em um experimento realizado por Marulanda et al. (2006), foi observado que em mudas da espécie arbórea *Retama sphaerocarpa* (L) Boiss (Piorno amarelo), a co-inoculação de *Bacillus thuringiensis* e um fungo do gênero *Glomus* reduziu em 42 % a água necessária para produzir 1 mg de biomassa da

parte aérea em comparação com plantas não inoculadas, o que indica a capacidade dos microrganismos em aumentar a eficiência no uso da água nessas plantas.

Os projetos de reflorestamento são utilizados como parte da solução para os danos ecológicos causados pelo desmatamento, e exigem atenção e estudos para obter mais informações sobre as variações ambientais, como o déficit hídrico, que as plantas podem encontrar durante o replantio, para então ser possível a produção de mudas mais tolerantes a estes fatores abióticos (FAVARETTO et al., 2011).

A interação entre BPCP com as plantas apresentam bons resultados em experimentos realizados em espécies arbóreas neotropicais, como observado por Tiepo et al, (2018) em *Trema micrantha* (L.) Blum. (Trema) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) (Jequitibá-branco) Kuntze, as quais inoculadas com *Azospirillum brasilense* apresentaram ativação de processos metabólicos que levaram a maior tolerância à seca. Além disso, a simbiose com FMA também pode ser considerada uma importante ferramenta em projetos de reflorestamento com espécies arbóreas pioneiras por agir na recuperação de solos degradados de ambientes tropicais do Sul do Brasil, como observado por Zangaro et al., (2003).

Baseado no exposto é importante conhecer os benefícios da co-inoculação das BPCP e FMA em espécies arbóreas neotropicais usadas em programas de reflorestamento e de recuperação de áreas degradadas do Bioma Mata Atlântica.

## 2. OBJETIVO

Identificar os efeitos da inoculação com BPCP e/ou FMA em mudas de espécies arbóreas neotropicais de diferentes estádios sucessionais sob condições de déficit hídrico no solo, avaliando aspectos de crescimento e fisiologia desses indivíduos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Identificar as alterações fisiológicas nas mudas de espécies arbóreas neotropicais inoculadas com BPCP e/ou FMA que favoreçam maior tolerância à seca.
- Comparar as respostas estruturais e fisiológicas relacionadas à tolerância à seca entre as espécies pioneira e não pioneira inoculadas com BPCP e/ou FMA.
- Verificar alterações estruturais de raízes de espécies arbóreas neotropicais inoculadas com BPCP e/ou FMA.

### 3. HIPÓTESES

I- A inoculação com BPCP e/ou FMA promove alterações estruturais, fisiológicas, metabólicas e de crescimento que resultam em maior tolerância à seca em espécies arbóreas neotropicais.

II- A inoculação individual com BPCP ou FMA é mais eficiente na tolerância à seca de mudas da espécie não pioneira em relação à co-inoculação.

III- A co-inoculação com BPCP+FMA promove alterações metabólicas que garantem maior tolerância à seca em mudas da espécie pioneira em relação a inoculação com BPCP e FMA individualmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos. Um deles foi feito para a obtenção dos dados anatômicos, enquanto o outro para análises de crescimento (parâmetros morfológicos), fisiológicas e metabólicas.

### *1-Material Biológico e Delineamento Experimental*

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação localizada no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Em ambos os experimentos foram utilizadas duas espécies arbóreas neotropicais de grupos ecológicos distintos, presentes no Bioma Mata Atlântica, sendo uma pioneira (intolerante à sombra), e a outra não pioneira (tolerante à sombra). Ambas utilizadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da UEL.

A espécie pioneira foi representada por *Heliocarpus popayanensis* Kunth da família Malvaceae, conhecida popularmente como Jangadeiro. É uma espécie arbórea característica de bordas de matas e florestas secundárias (LORENZI, 2002). A espécie não pioneira foi *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, da família Lecythidaceae, conhecida como Jequitibá-branco. É uma espécie arbórea tolerante à sombra e encontrada em estádios mais tardios da sucessão (LORENZI, 2002).

As sementes das espécies arbóreas foram obtidas de vários indivíduos da mesma espécie, sendo que as sementes de *H. popayanensis* foram coletadas na região de Londrina - PR, enquanto as mudas de *C. estrellensis* foram obtidas da

empresa Sementes Caiçara Ltda®, situada no município Brejo Alegre/SP.

Foi utilizado inóculo de uma espécie de BPCP (*Bacillus* sp. - ZK), proveniente da coleção de bactérias promotoras do crescimento em plantas da Universidade Estadual de Londrina (CBPCV-UEL). A seleção dessa estirpe bacteriana foi feita a partir dos resultados obtidos em experimentos anteriores realizados em casa de vegetação com espécies arbóreas neotropicais. O inóculo foi preparado a partir de culturas puras fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL. Alíquotas provenientes da cultura pura foram transferidas para meio líquido DYGS (g L<sup>-1</sup>, glicose, 2,0; ácido málico, 2,0; extrato de levedura, 2,0; ácido glutâmico, 1,5; peptona, 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>, 0,5) e mantidas em agitador orbital a 180 RPM e 28 °C por 24 horas. Após esse período, uma alíquota desse pré-inóculo foi transferida para o meio líquido de cultivo chamado MCA4, sendo esse meio preparado com baixa razão C:N e com quantidades definidas de glicerol (46,6 %), sacarose (23,3 %), extrato de levedura (23,3 %), goma xantana (0,47 %), polivinilpirrolidona (0,47 %), minerais (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Fe-EDTA) e micronutrientes (Mo, Mn, B, Cu, Zn). A cultura de bactéria foi crescida em Erlenmeyer (250 mL volume) contendo 50 mL do meio de cultura que foram mantidos em agitadores orbitais a 180 RPM e 28 °C por 48 horas. Ao final desse período, o cultivo foi interrompido sendo a concentração de células estimada por absorvância ( $\lambda = 560$  nm) e a contagem pela técnica de unidades formadoras de colônias (UFC) para a normalização da concentração de células nos inoculantes para cerca de  $1 \times 10^9$  UFC/mL<sup>-1</sup>.

Foi utilizado também um “pool” de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) contendo concentrações semelhantes das espécies *Gigaspora margarita*, *Acaulaspora morrowiae*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Rhizophagus clarus* cultivado em areia, que foi gentilmente cedido pela Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG) da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

As sementes das espécies arbóreas neotropicais foram tratadas por meio da aplicação de 500 mL de inoculante bacteriano na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, em bandejas plásticas de 1 L contendo areia previamente esterilizada. A inoculação com os FMA foi feita apenas no transplante.

### 1.1 Experimento para o estudo anatômico

Após a germinação e as mudas terem expandido completamente seu

primeiro par de folhas, foi realizada a transferência de cinco plântulas por vaso de 3L (17 cm de altura, 15,5 cm de diâmetro inferior e 21 cm de diâmetro superior) contendo substrato inerte (areia) previamente esterilizado. No momento do transplante, foram adicionados mais 40 mL de inóculo de ZK na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> por vaso, assim como a cada 15 dias por quatro vezes (período de aclimação). Nos tratamentos contendo FMA a inoculação foi feita pela adição de 10 g do solo-inóculo fresco contendo esporos, hifas e raízes colonizadas em orifícios de plantio feitos no substrato de cada vaso.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, constituído do controle (não-inoculado) e três tratamentos com cinco repetições cada: ZK, FMA e ZK+FMA, contendo cinco mudas por vaso, para cada espécie vegetal. Os solos dos vasos foram mantidos em capacidade de campo (CC – 30 % de umidade gravimétrica - UG). Ao fim de 90 dias, sendo 60 dias após as inoculações, as mudas foram retiradas dos vasos e as raízes mergulhadas em potes com água para realizar a limpeza do excesso de areia, de modo a evitar a remoção dos inóculos presentes nas raízes. Foram seccionados fragmentos das raízes, distantes 1 cm do ápice, para análises em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. De acordo com o desenvolvimento de cada espécie, na mesma região, obteve-se tanto raiz em estágio primário como secundário. As raízes foram fixadas de acordo com cada análise específica (descritos no item 2).

## 1.2 Experimento para as análises de crescimento, fisiológicas e metabólicas

Foram utilizados vasos de 2L (10,5 cm de altura, 9,5 cm de diâmetro inferior e 14 cm de diâmetro superior) contendo solo fértil (pH 5,8; CTC 4,4 cmolc dm<sup>3</sup>; NO<sup>3-</sup> 47,23 ppm; NH<sup>4+</sup> 3,28 ppm), caracterizado como Latossolo Vermelho eutrófico (EMBRAPA, 1999) e areia na proporção de 1:1, com uma planta por vaso. A aplicação dos inóculos foi semelhante ao descrito no item 1.1.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, constituído de oito tratamentos contendo sete repetições: Não inoculado em Capacidade de Campo (N.in CC), ZK CC, FMA CC, ZK+FMA CC, Não inoculado em Déficit Hídrico (N.in DH), ZK DH, FMA DH e ZK+FMA DH. Os tratamentos em CC correspondem às mudas mantidas em 30 % de Umidade Gravimétrica (UG) e os tratamentos em DH correspondem a 15 % de UG (déficit hídrico moderado).

Após o período de aclimação (60 dias) que corresponde ao crescimento

das mudas nos sacos plásticos, iniciou-se o tratamento de déficit hídrico por mais 30 dias, nos quais os vasos foram pesados semanalmente e observados quanto à murcha das folhas para garantir a manutenção no déficit hídrico moderado. Quando necessário, foram adicionados 40 mL de água para evitar o dessecamento das mudas.

## 2- Análises estruturais

### 2.1 Microscopia eletrônica de Varredura

As amostras de raízes foram fixadas em paraldeído 3 % e glutaraldeído 2,5 % juntamente com tampão cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,2) durante a noite. Após a fixação, foram tratadas com ósmio por 40 minutos no escuro, e desidratadas em série etílica crescente (álcool 30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A secagem ao ponto crítico foi realizada com CO<sub>2</sub> líquido no Aparelho de secagem ao Ponto Crítico (modelo CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Após cobertura com ouro, em metalizador (modelo SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) o material vegetal foi analisado no microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 da FEI, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL.

As diferentes formas de inoculação na raiz das mudas das espécies arbóreas (N.in, ZK, FMA e ZK+FMA) estão apresentadas na Figura 1 (*H. popayanensis*: A, C, e E ; *C. estrellensis*: B, D, e F).

Observa-se a superfície da raiz de *H. popayanensis* na Figura 1 (A, C e E), e a superfície de raiz de *C. estrellensis* na Figura 1 (B, D e F), destacando-se as raízes inoculadas com FMA e com ZK, nas quais, na Figura 1-C e D é possível observar a presença de hifas sobre os pêlos radiciais, comprovando a presença de FMA nessas mudas, já na Figura 1- E e F é possível observar a formação de colônias bacterianas com características do gênero *Bacillus*, além de evidenciar a formação de um biofilme que auxilia as bactérias a se fixarem umas nas outras e nas raízes da planta, confirmando a inoculação com BPCP. Não houve inoculação nas raízes das mudas de *H. popayanensis* e *C. estrellensis* no controle, assim sendo, não é possível visualizar colônias de microrganismos (Figuras 1–A e B).

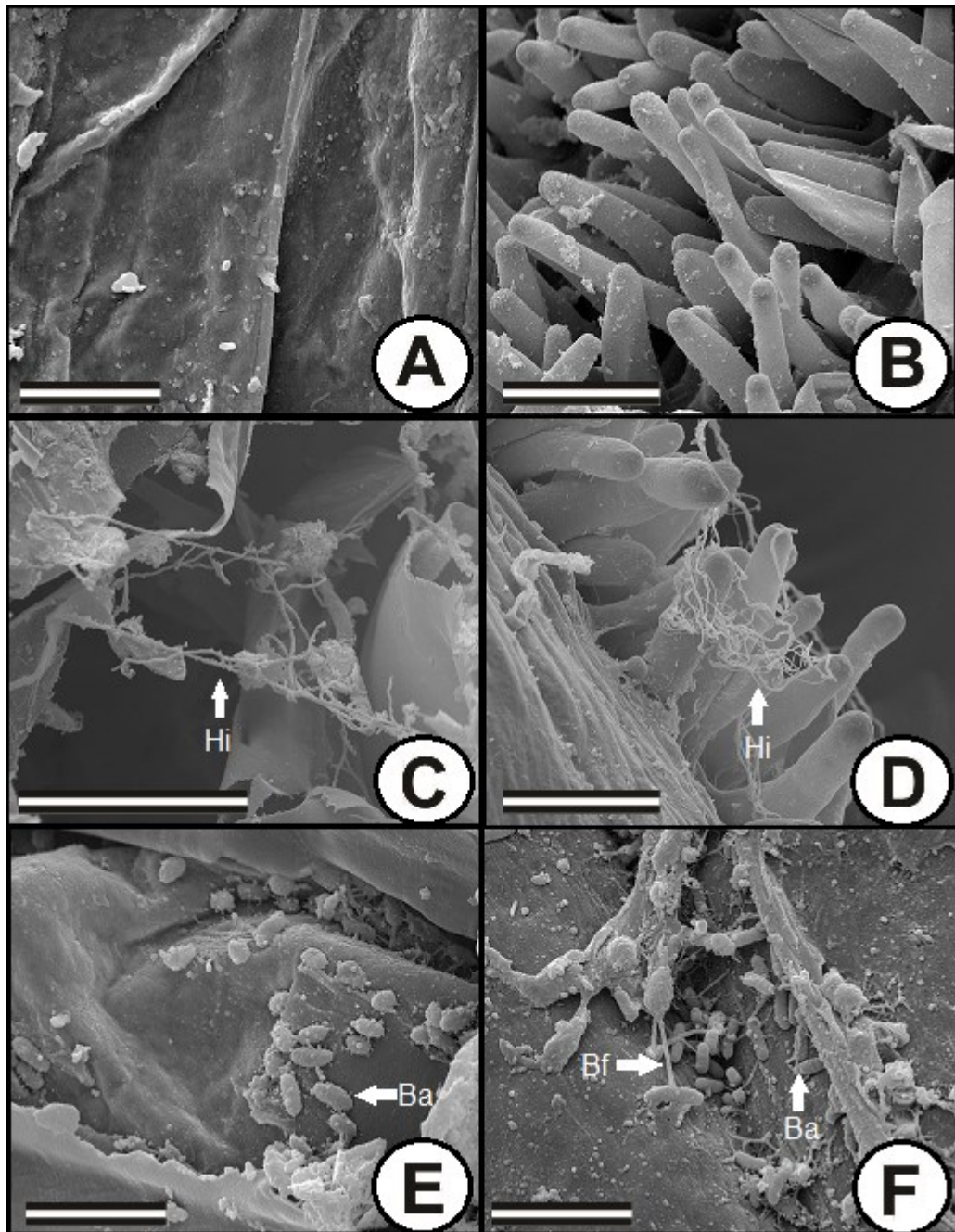


Figura 1- Vista superficial da raiz de *Heliocarpus popayanensis* (Microscopia eletrônica de varredura) (A, C e E) e de *Cariniana estrellensis* (B, D e F), não inoculados (A e B) ou inoculados com FMA (C e D) e ZK (E e F). Em que Hi = Hifas; Ba= colônias bacterianas; Bf= Biofilme. Barras em A, E e F =5,0  $\mu$ m; em C =20  $\mu$ m; e em B e D = 50  $\mu$ m.

## 2.2 Microscopia de Luz

As raízes foram coletadas a 1 cm do ápice e fixadas em FAA 50%, estocadas em álcool 70% e desidratadas em série etilica crescente. As amostras foram incluídas em historesina (Leica) e os cortes foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica – RM 2255), com espessura de 8  $\mu$ m, e corados com

azul de toluidina. As lâminas foram montadas com resina sintética Permount.

Para as avaliações micromorfométricas, foram selecionados dois cortes, das duas lâminas confeccionadas, de dois blocos distintos. Os cortes foram fotografados em fotomicroscópio Olympus (modelo BX41 -com sistema UPhoto- Olympus Q color 3), sendo realizadas três medidas dos tecidos de cada raiz (espessura da epiderme ou periderme, córtex, floema 2º, xilema 2º e área do xilema 2º), totalizando 24 medições por tratamento. As medições foram realizadas com o auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5.

### *3-Análises Fisiológicas*

#### 3.1 Potencial de água

O potencial de água das mudas foi medido utilizando-se uma câmara de pressão do tipo Schölander (Soil Moisture – SAPSII, modelo 3115, Santa Barbara, CA, EUA), acoplada ao gás N<sub>2</sub>. A parte aérea com as folhas foi colocada dentro de um recipiente hermético que suporta a pressão do gás inerte, e adicionando-se o gás pode-se observar a seiva exsudando pelo caule. O valor marcado no manômetro no momento que se inicia exsudação é o mesmo do potencial de pressão da seiva do xilema, e como o potencial osmótico nesse caso pode ser considerado insignificante, considera-se esse valor o potencial de água em MPa.

#### 3.2 Trocas gasosas

Foram determinadas a taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), e Eficiência intrínseca no uso da água ( $EUA_{int} = A/g_s$ ). Essas análises de trocas gasosas foram realizadas no período da manhã entre às 8h e 10 h, utilizando-se um analisador portátil de gás infravermelho (Irga) (Li-Cor, modelo LI 6400 XT, Biosciences, Lincoln, NE, USA) conectado a uma câmara 6 cm<sup>2</sup>. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF) ideal para as análises foi de 1900 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, definida por estudos prévios com as espécies utilizadas nesse trabalho (CALZAVARA et al., 2018).

#### 4-Análises metabólicas

##### 4.1 Dosagem de Nitrogênio Total

As folhas (100 mg) foram trituradas, transferidas para tubos de ensaios e submetidas à digestão com 7 mL de ácido sulfúrico concentrado com sulfato de cobre em bloco digestor (EMBRAPA, 2009). A temperatura inicial do bloco de digestão foi 100 °C com aumento de temperatura a cada 30 minutos (150, 200, 250 e 350 °C) totalizando cerca de 3 horas de digestão. A quantidade de N presente na solução ácida resultante da digestão foi determinada pelo método de Kjeldahl no qual a solução ácida reagiu com o hidróxido de sódio 15 N (NaOH) e a amônia (NH<sub>3</sub>) liberada pela reação, coletada em um frasco contendo ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>). A junção de NH<sub>3</sub> com o H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> levou a formação de borato de amônio (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>), que foi titulado com Ácido cianídrico (HCN) de título conhecido até a mudança de cor do indicador (azul para rósea). O nitrogênio total foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ N total} = \frac{(\text{Amosta} - \text{branco}) * 100}{0,1} * \text{Fator do titulante} * 0,0007\text{N}$$

O valor resultante foi multiplicado por 10 para converter a porcentagem de N total em g de N por Kg de massa seca.

##### 4.2 Determinação de prolina

Para a determinação de prolina foi utilizado 200 mg de massa fresca de folhas. Para a extração, as amostras foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e adicionado 2 mL de álcool etílico 70 %. A determinação foi realizada a partir da reação com ninhidrina (1 % m/v) em meio ácido (ácido acético 60 %) em uma reação a 95 °C em banho-maria por 20 minutos. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (Molecular Devices, modelo Spectra Max Plus 384, China) a 520 nm (CARILLO e GIBON 2011). Os valores obtidos foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\text{Prolina } (\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ MF}) = \frac{\text{Abs extrato} - \text{branco}}{\text{curva} * \frac{\text{Vol extrato}}{\text{Vol aliquota}}} * \frac{1}{\text{MF}}$$

Onde: MF= Massa Fresca; Abs= Absorbância; Vol= Volume

##### 4.3 Análises de estresse oxidativo

Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram

mensurados através da dosagem de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e da peroxidação lipídica. Para isso, 100 mg de folha foram coletadas e maceradas em cadinho com 1 mL de Ácido tricloroacético TCA (0,2 %) diluído em metanol, e o extrato obtido foi centrifugado (13700 g, 5 min, 4°C).

A peroxidação lipídica foi determinada por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), seguindo a metodologia descrita por Federici et al. (2007). Serão adicionados ao sobrenadante BHT 0,02 %, tampão PBS com pH 7,4 (KCl 1,4 mM;  $KH_2PO_4$  1,4 mM; NaCl 137 mM e  $Na_2HPO_4$  10 mM), ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3 %) em NaOH 0,3 % na presença de ácido tricloroacético (TCA 50 %), a reação ocorrerá a 60 °C em estufa por 60 minutos. A concentração de TBARS foi determinada por uma curva padrão de Malondialdeído (MDA), e obtida pela leitura de fluorescência em 535 nm de excitação e 590 nm de emissão no leitor de microplaca VICTOR<sup>3</sup> Multilabel Plate Counter.

Os valores de MDA obtidos foram calculados pela seguinte fórmula:

$$TBARS \text{ (nmol. mL MF)} = \frac{(\text{Abs extrato} - \text{branco})}{\text{curva}} * \frac{\text{Vol extrato}}{\text{MF}}$$

Para a dosagem do peróxido de hidrogênio o sobrenadante foi submetido à reação com iodeto de potássio 1 M (KI) e tampão fosfato de potássio com pH 7,5 ( $KH_2PO_4$  0,2 M e  $K_2HPO_4$  0,2 M), mantido no gelo e no escuro por uma hora para medida de absorvância em 390 nm. Foi utilizada uma curva padrão de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Ambas as leituras foram realizadas em leitor de microplacas (Perkin Elmer, modelo Victor TM 3, Turku, Finlândia). Em seguida determinadas pela fórmula:

$$H_2O_2 \text{ (}\mu\text{g. g MF)} = \frac{(\text{Abs extrato} - \text{branco})}{\text{curva}} * \frac{\text{Vol extrato}}{\text{MF}}$$

### *5-Análises de Crescimento*

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos das mudas: comprimento da parte aérea e raízes com uma régua milimetrada; e massa seca de raízes, caules e folhas. Para a determinação da massa seca, os componentes das

mudas foram separados, acondicionados em sacos de papel e secos em estufa à temperatura de 60 °C até atingirem peso constante. As raízes, antes da secagem, foram lavadas em água com o auxílio de peneiras evitando-se desestruturar a raiz e perder material de estudo. A densidade das raízes foi determinada pela razão entre a massa seca e massa fresca da raiz (ZANGARO et al., 2016).

#### 6- Análises estatísticas

Para o experimento de obtenção dos dados anatômicos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, comparando apenas o efeito da inoculação, e quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa *Statistica*, v. 10.0 (Statsoft Inc., USA).

No experimento para as análises de crescimento, fisiológicas e metabólicas, os dados foram submetidos à ANOVA de dois fatores, comparando os efeitos do déficit hídrico (DH) e da inoculação e quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa *Sisvar 5.6 Ink*.

Em relação a esta última análise dos dados, quando o fator estresse hídrico afetou ( $p \leq 0,05$ ) a variável resposta, os tratamentos foram denominados Capacidade de Campo (CC) e Déficit Hídrico (DH) e representaram a média de todas as mudas mantidas em CC e DH, respectivamente. Quando o fator inoculação afetou ( $p \leq 0,05$ ) a variável resposta, os tratamentos foram denominados: não inoculado (N.in) representando uma média entre todas as mudas que receberam apenas água, ZK para a média de todas as mudas que receberam apenas o inóculo de ZK, FMA a média de todas as mudas que receberam apenas o inóculo de FMA, e ZK+FMA a média de todas as mudas que receberam os inóculos de ZK e FMA juntos. Nessas denominações, as médias abrangeram os dados de mudas mantidas em CC e DH. Quando houve interação entre estresse hídrico e inoculação ( $p \leq 0,05$ ) indicando que os dois fatores em conjunto influenciaram a variável resposta, os tratamentos foram separados em CC e DH e em cada condição hídrica houve a distinção entre as inoculações (N.in, ZK, FMA e ZK+FMA)

## RESULTADOS

### *Análises Estruturais*

As raízes das plantas das duas espécies apresentam-se em crescimento secundário, exceto as raízes de *C. estrellensis* inoculadas com FMA, nas quais observou-se que estava em estágio primário de desenvolvimento (Figura 2-F), e as demais raízes dessa espécie ainda estavam eliminando a epiderme e o córtex (Figura 2-B, D e H).

Em *H. popayanensis*, o controle (N. in) e o tratamento com FMA apresentaram elementos de vaso bem diferenciados e de maior diâmetro em comparação aos demais tratamentos (Tabela 1).

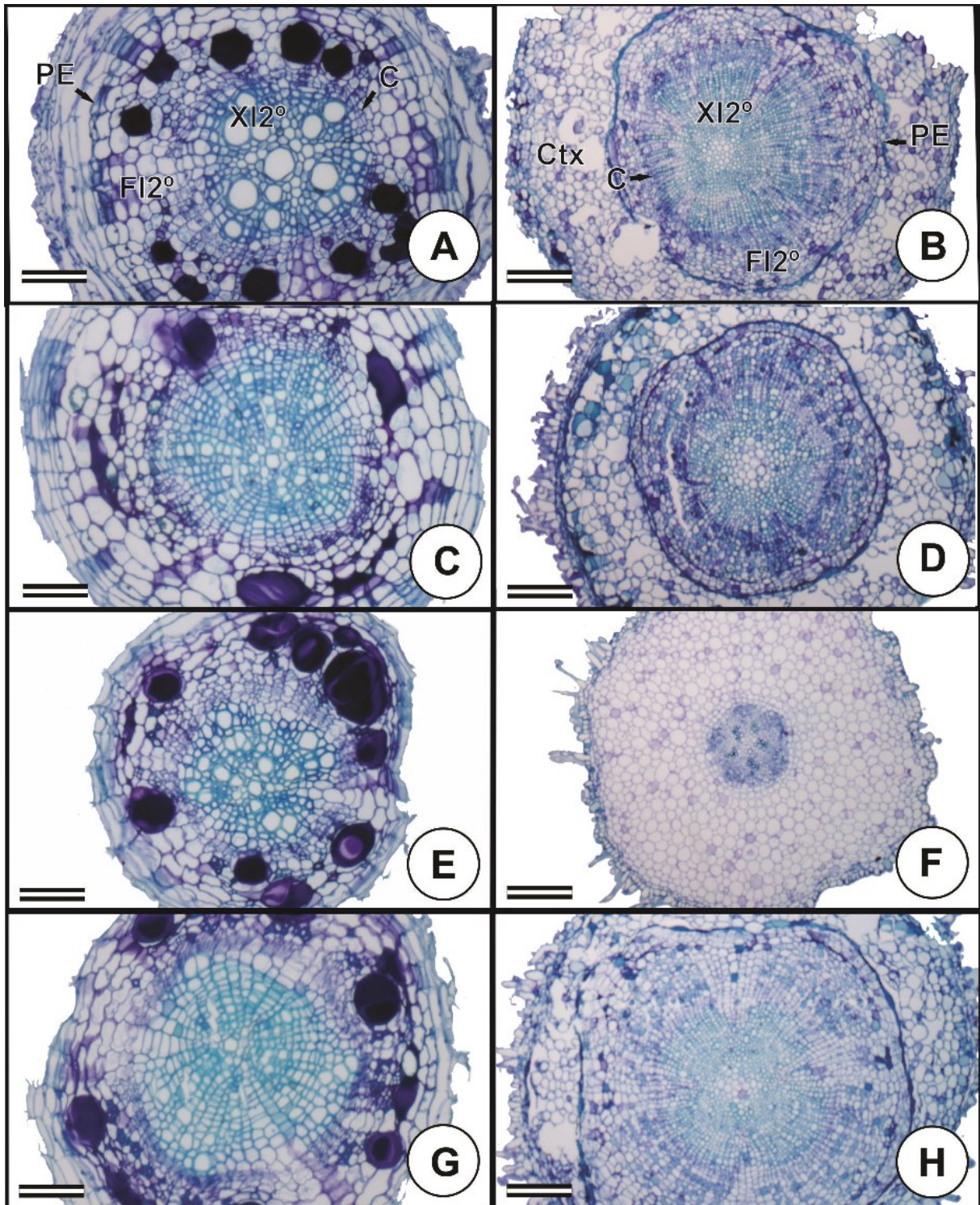


Figura 2- Anatomia de raízes de *Heliocarpus popayanensis* (A, C, E e G) e *Cariniana estrellensis* (B, D, F e H) (microscopia de luz - corte transversal), não inoculados (A e B) ou inoculados com ZK (C e D), FMA (E e F) e ZK+FMA (G e H). Em que: C = câmbio; Ctx = Córtex; FI2° = floema secundário; Pe = periderme sendo instalada; XI2° = xilema secundário. Barras A, C, E e G = 100  $\mu$ m e B, D, F e H = 200  $\mu$ m.

Devido à diferença de estágio de desenvolvimento entre as inoculações, as comparações observadas foram:

A espessura da epiderme de *C. estrellensis* apresentou maior valor no controle, enquanto a espessura do córtex foi maior nas mudas controle e naquelas inoculadas com FMA (Tabela 1). A espessura da periderme em *H. popayanensis* foi maior nas mudas inoculadas com ZK, em comparação ao controle. Em *C. estrellensis* não foi possível realizar a medição da periderme em todos os tratamentos, devido ao fato de as mudas inoculadas com FMA se encontrar ainda em estágio primário de desenvolvimento. Porém, dentre as medidas obtidas, as mudas não inoculadas apresentaram maior espessura.

Em *H. popayanensis*, a espessura do floema secundário em raízes inoculadas com ZK apresentaram maiores valores quando comparadas aos demais tratamentos (Tabela 1). Não foi possível obter dados sobre as medidas do floema secundário nas mudas inoculadas com FMA em *C. estrellensis* pelo fato de as raízes dessas mudas estarem em estágio de desenvolvimento primário.

A espessura do xilema secundário em *H. popayanensis* foi superior em mudas inoculadas com ZK, quando comparadas ao controle, enquanto em *C. estrellensis* houve a manutenção do tamanho em ZK e ZK+FMA em relação ao controle. Em raízes de mudas de *H. popayanensis* a área do xilema secundário foi superior nas mudas inoculadas com ZK, em comparação aos demais tratamentos, enquanto em mudas de *C. estrellensis* inoculadas com FMA a área do xilema secundário foi menor.

A espessura total da raiz, que é resultado da soma das espessuras da periderme + floema 2º + xilema 2º, foi maior em raízes de *H. popayanensis* inoculadas com ZK e em raízes de *C. estrellensis* inoculadas com FMA e ZK+FMA, comparadas aos respectivos controles (Tabela 1).

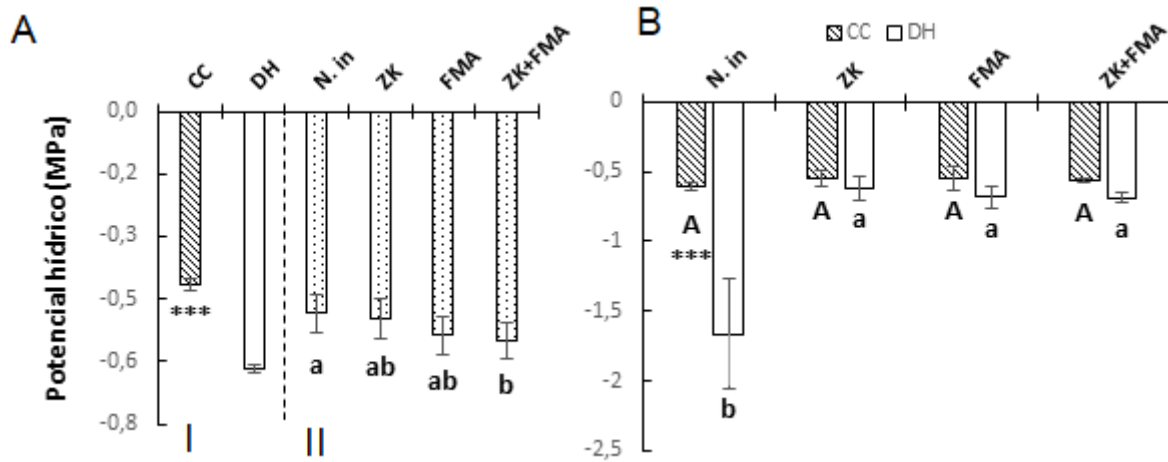
**Tabela 1.** Micromorfometria de raízes em mudas de *Heliocarpus popayanensis* (*Hp*) e *Cariniana estrellensis* (*Ce*) sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA durante 60 dias. Os valores são as médias  $\pm$  erros-padrão. As letras comparam os tratamentos com inóculos. Letras iguais indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Parâmetro	Inoculação	<i>Hp</i>	<i>Ce</i>
Espessura da epiderme ( $\mu\text{m}$ )	NÃO INOCULADO	X	28,6 $\pm$ 1,05 <b>a</b>
	ZK		22,9 $\pm$ 0,56 <b>b</b>
	FMA		23,4 $\pm$ 0,78 <b>b</b>
	ZK+FMA		20,9 $\pm$ 0,79 <b>b</b>
Espessura do córtex ( $\mu\text{m}$ )	NÃO INOCULADO	X	363,1 $\pm$ 35,21 <b>a</b>
	ZK		238,1 $\pm$ 1,73 <b>b</b>
	FMA		353,2 $\pm$ 4,56 <b>a</b>
	ZK+FMA		152,6 $\pm$ 3,34 <b>c</b>
Espessura da periderme ( $\mu\text{m}$ )	NÃO INOCULADO	11,5 $\pm$ 0,22 <b>d</b>	20,5 $\pm$ 1,08 <b>a</b>
	ZK	17,5 $\pm$ 0,47 <b>a</b>	15,6 $\pm$ 0,31 <b>b</b>
	FMA	16,0 $\pm$ 0,45 <b>b</b>	_____
	ZK+FMA	14,7 $\pm$ 0,19 <b>c</b>	14,8 $\pm$ 0,55 <b>b</b>
Espessura do floema secundário ( $\mu\text{m}$ )	NÃO INOCULADO	132,9 $\pm$ 2,76 <b>b</b>	165,7 $\pm$ 4,41 <b>b</b>
	ZK	171,3 $\pm$ 6,49 <b>a</b>	152,6 $\pm$ 8,24 <b>b</b>
	FMA	97,6 $\pm$ 3,95 <b>c</b>	_____
	ZK+FMA	97,0 $\pm$ 3,78 <b>c</b>	240,3 $\pm$ 3,34 <b>a</b>
Espessura do xilema secundário ( $\mu\text{m}$ )	NÃO INOCULADO	129,5 $\pm$ 2,69 <b>b</b>	238,7 $\pm$ 16,60 <b>a</b>
	ZK	150,9 $\pm$ 5,56 <b>a</b>	253,2 $\pm$ 21,44 <b>a</b>
	FMA	98,5 $\pm$ 0,71 <b>c</b>	133,7 $\pm$ 1,23 <b>b</b>
	ZK+FMA	142,8 $\pm$ 2,89 <b>ab</b>	254,5 $\pm$ 1,92 <b>a</b>
Espessura total da raiz ( $\mu\text{m}$ )	NÃO INOCULADO	266,5 $\pm$ 3,11 <b>b</b>	427,2 $\pm$ 20,48 <b>b</b>
	ZK	345,1 $\pm$ 12,00 <b>a</b>	411,8 $\pm$ 12,22 <b>b</b>
	FMA	213,8 $\pm$ 3,46 <b>c</b>	511,2 $\pm$ 2,95 <b>a</b>
	ZK+FMA	247,2 $\pm$ 6,31 <b>b</b>	507,7 $\pm$ 3,41 <b>a</b>
Área do xilema secundário ( $\mu\text{m}^2$ )	NÃO INOCULADO	50539 $\pm$ 1471 <b>b</b>	181306 $\pm$ 27634 <b>a</b>
	ZK	82632 $\pm$ 6656 <b>a</b>	225781 $\pm$ 32241 <b>a</b>
	FMA	34175 $\pm$ 1431 <b>c</b>	56853 $\pm$ 1159 <b>b</b>
	ZK+FMA	63267 $\pm$ 955 <b>b</b>	209654 $\pm$ 3658 <b>a</b>

### Análises Fisiológicas

O potencial de água ( $\psi_w$ ) em *H. popayanensis* foi menor no DH, comparado às mudas em CC (Figura 5-A I), mas não houve alteração entre as plantas N. in e aquelas inoculadas com ZK e FMA (Figura 5-A II). Em *C. estrellensis* o  $\psi_w$  foi maior nas mudas inoculadas e submetidas ao DH, comparado ao N. in em DH; não

havendo diferenças no  $\psi_w$  nas mudas em CC (Figura 5-B).



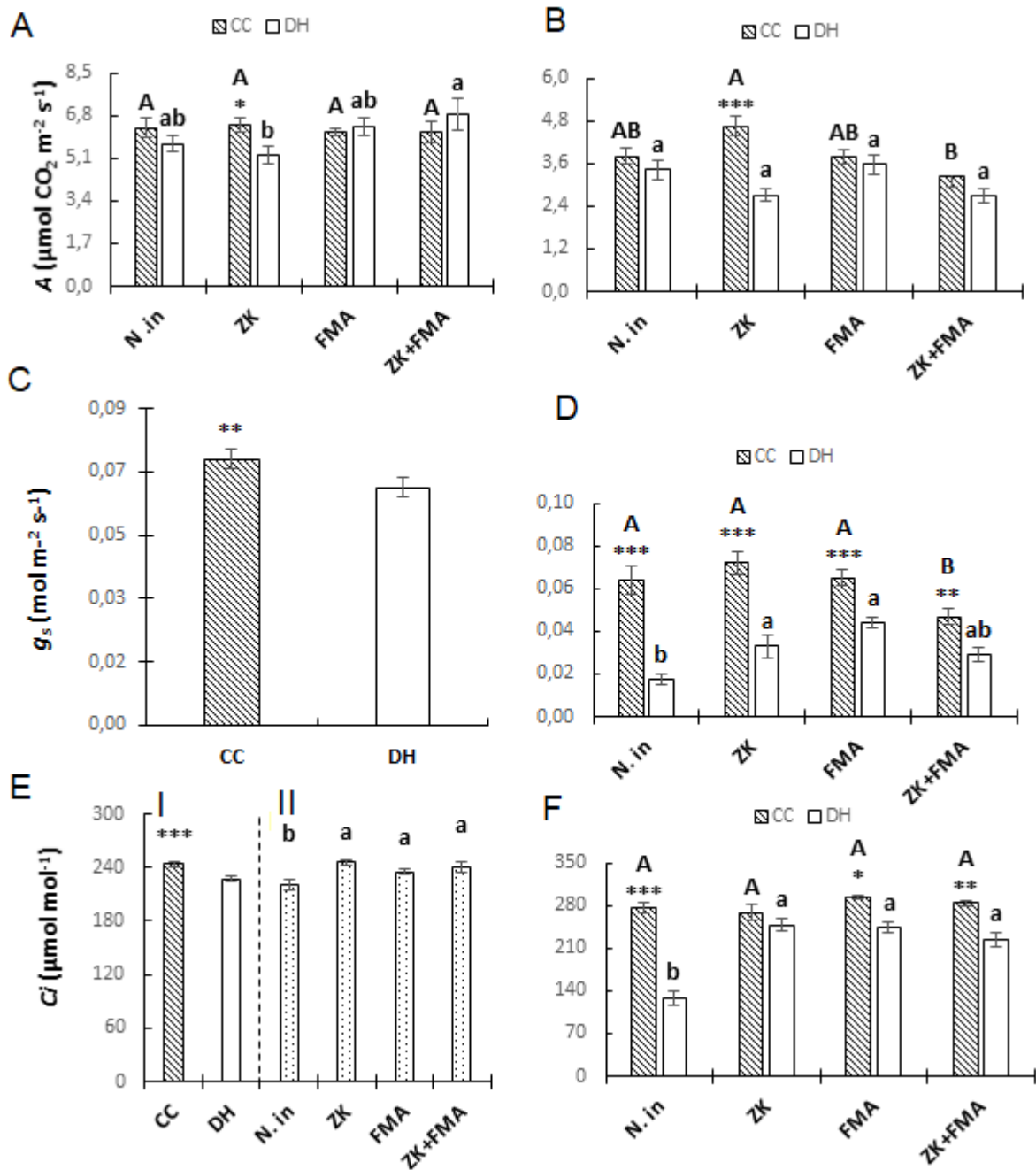
**Figura 3.** Potencial de água (A e B) de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA, mantidas no solo em capacidade de campo (CC) e submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e barras pontilhadas comparam as inoculações. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico B as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico A-II as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculos. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

A taxa fotossintética líquida ( $A$ ) na espécie pioneira *H. popayanensis* não diferiu entre os tratamentos, comparados aos respectivos controles; porém, foi superior nas mudas inoculadas com ZK mantidas em CC em relação ao mesmo tratamento em DH (Figura 6-A). Já para *C. estrellensis* a  $A$  foi reduzida apenas em ZK no DH, quando comparada ao mesmo tratamento em CC (Figura 6-B).

A condutância estomática ( $g_s$ ) em *H. popayanensis* foi menor em DH, comparada à CC (Figura 6-C). Em *C. estrellensis* a  $g_s$  foi reduzida em todos os tratamentos de DH, comparado aos mesmos tratamentos em CC. Além disso, foi menor nas mudas inoculadas com ZK+FMA em CC em comparação aos demais tratamentos na mesma condição, e maiores em ZK e FMA mantidas em DH em comparação às não inoculadas na mesma condição hídrica (Figura 6-D).

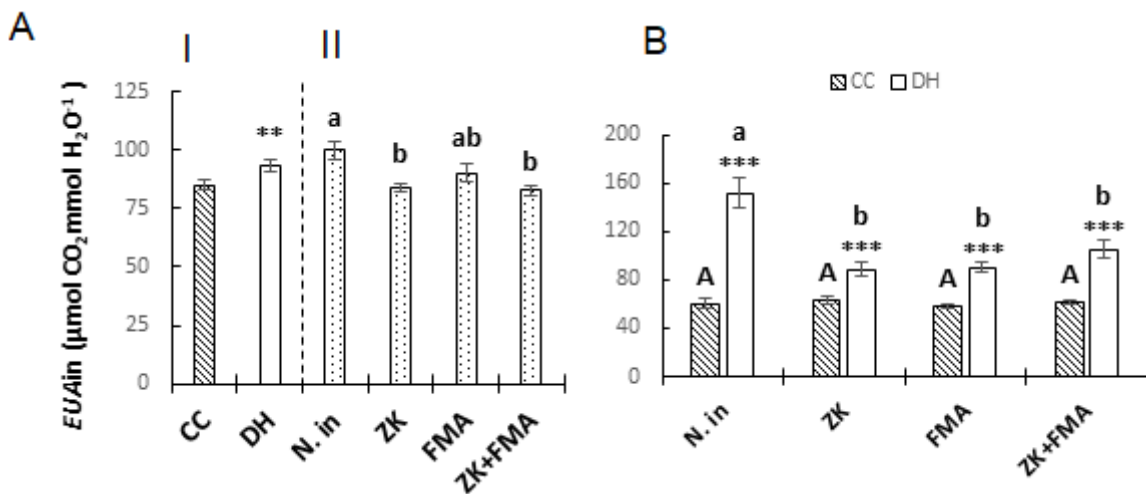
A concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) em *H. popayanensis* foi menor em DH, comparada à CC (Figura 6-E I); e ainda, em todos os tratamentos com

inoculação houve aumento de  $C_i$ , comparados às mudas não inoculadas (Figura 6-E II). Em *C. estrellensis* a  $C_i$  não foi reduzida apenas nas mudas inoculadas com ZK em DH comparadas àquelas em CC, diferente do que aconteceu nos demais tratamentos, nas mudas mantidas em DH os tratamentos inoculados apresentaram maiores valores do que o N. in (Figura 6-F).



**Figura 4.** Taxa Fotossintética Líquida (A) (A e B), Condutância estomática ( $g_s$ ) (C e D) e Concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) (E e F) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e barras pontilhadas comparam as inoculações. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão ( $n=7$ ). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para os gráficos da interação (A, B, D e F) as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico das inoculações (E-II) as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculo. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

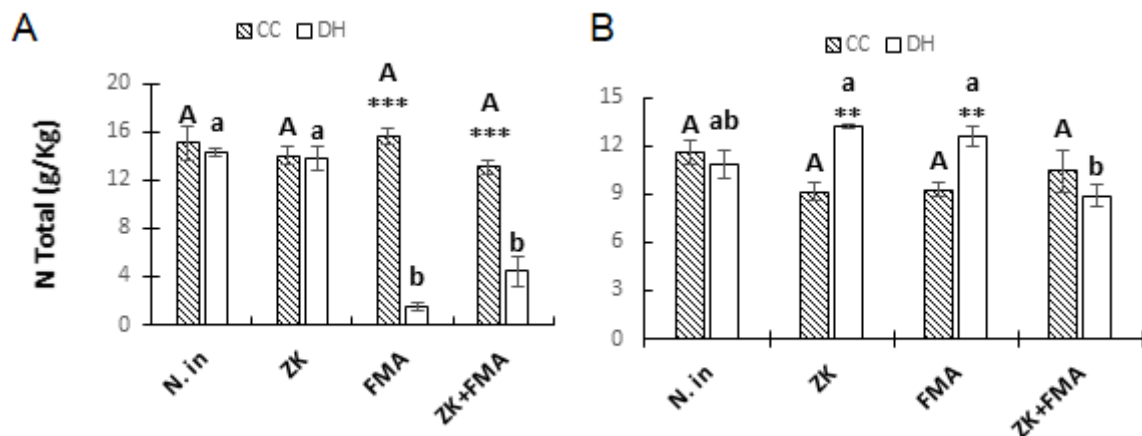
A eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ) em *H. popayanensis* foi maior em mudas submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC (Figura 7-A I) e manteve o valor nas mudas inoculadas com FMA comparadas às mudas sem inoculação (Figura 7-A II). Em *C. estrellensis* a  $EUA_{int}$  foi maior nas mudas mantidas em DH em comparação com àquelas em CC em todos os tratamentos. Dentro da condição hídrica, as mudas inoculadas em DH apresentaram menores valores em comparação às N. in (Figura 7-D).



**Figura 5.** Eficiência intrínseca no uso da água (A e B) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão ( $n=7$ ). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico B as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico A-II as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculo. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

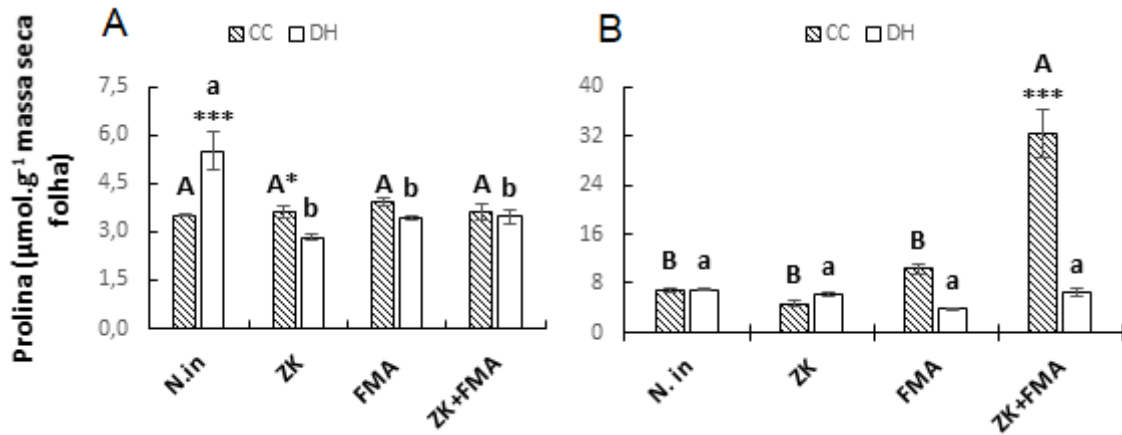
### Análises Metabólicas

O teor de nitrogênio total das folhas de *H. popayanensis* foi reduzido nas mudas inoculadas com FMA e co-inoculadas com ZK+FMA em DH, comparadas aos demais tratamentos em DH e CC (Figura 8-A). Em *C. estrellensis* o N total das folhas foi maior em ZK e FMA em DH, comparado ao mesmo tratamento em CC, e reduziu em ZK+FMA em DH comparada às N. in em DH (Figura 8-B).



**Figura 6.** Teor de Nitrogênio Total (A e B) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente). Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

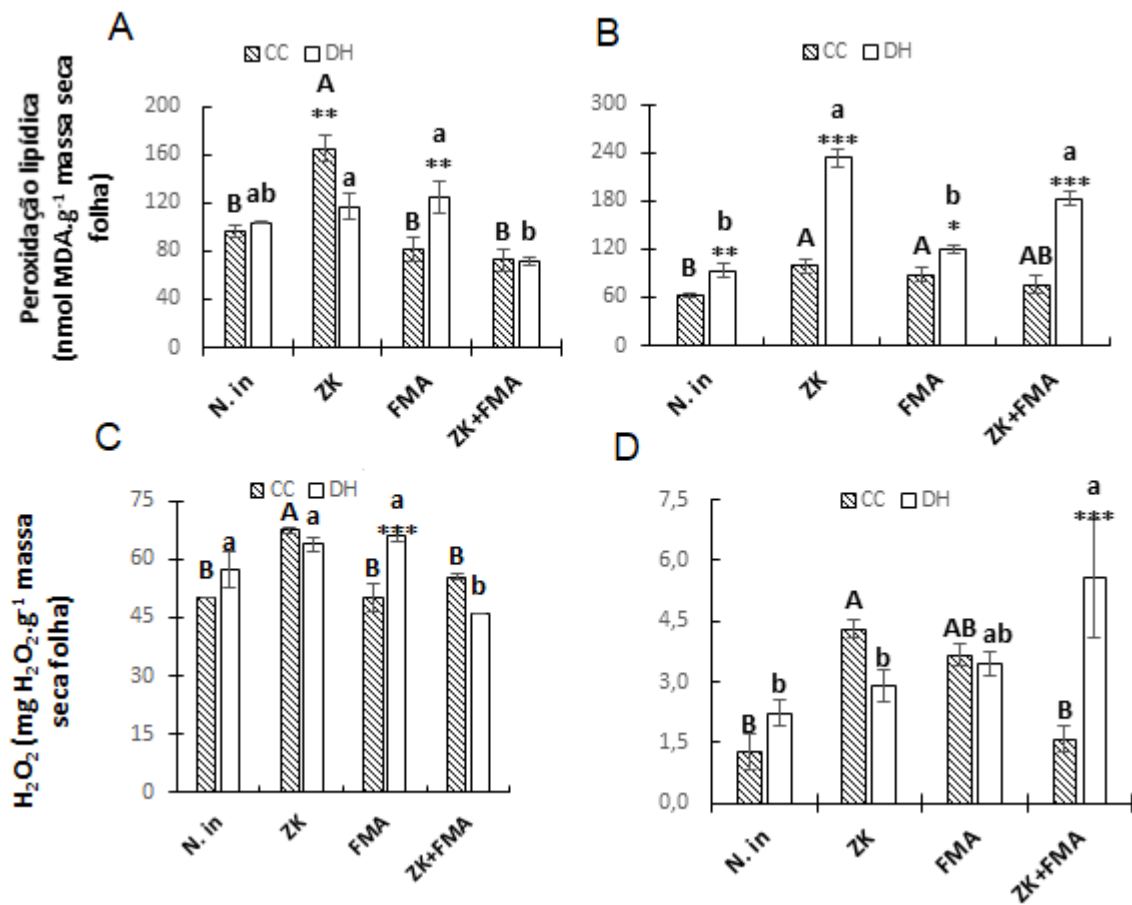
O conteúdo de prolina em *H. popayanensis* foi menor nas mudas inoculadas em DH, comparadas às que não foram inoculadas; e ainda, foi maior nas mudas N. in em DH em relação à CC, e maior em ZK em CC em relação ao DH (Figura 9-A). Em *C. estrellensis* o conteúdo de prolina se manteve em todas as plantas em DH e aumentou nas mudas co-inoculadas com ZK+FMA em CC (Figura 7B).



**Figura 7.** Conteúdo de Prolina em folhas de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

A peroxidação lipídica foi analisada pelos níveis de MDA. As mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK em DH apresentaram menores valores de MDA, quando comparadas ao mesmo tratamento em CC, e as mudas inoculadas com FMA apresentaram maiores valores em DH, comparadas com aquelas em CC (Figura 10-A) em ZK+FMA houve manutenção dos valores em CC e DH e em comparação ao N. in. Em *C. estrellensis* os valores de MDA foram maiores em todos os tratamentos em DH em relação aos mesmos em CC, além disso, foi também maior em mudas inoculadas com ZK e ZK+FMA em DH, comparadas ao N. in (Figura 10-B).

Maiores níveis de peróxido de hidrogênio foram encontrados nas mudas de *H. popayanensis* inoculadas com FMA em DH, comparadas àquelas com a mesma inoculação em CC, enquanto dentro da condição de CC houve manutenção dos valores em FMA e ZK+FMA em relação ao N.in, e dentro da condição de DH o menor valor foi encontrado na co-inoculação (Figura 10-C). Em *C. estrellensis* maiores níveis de peróxido de hidrogênio foram observados em mudas co-inoculadas em DH comparadas à mesma inoculação em CC e às mudas não inoculadas, enquanto em CC houve manutenção dos valores em FMA e ZK+FMA em relação ao N.in (Figura 10-D).

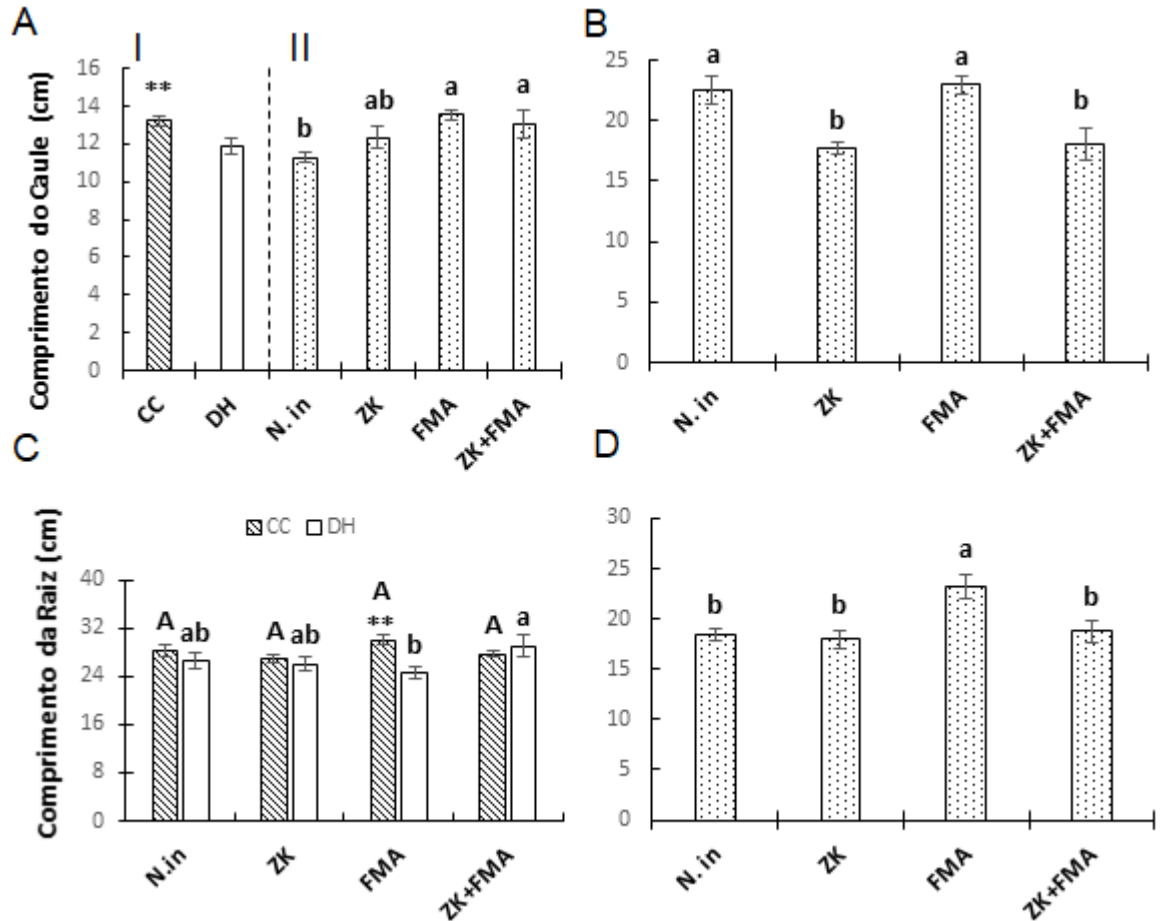


**Figura 8.** Peroxidação lipídica (A e B) e Peróxido de hidrogênio (C e D) em folhas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente). Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=3). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### Análises de crescimento

Em *H. popayanensis* o comprimento do caule foi reduzido em DH, comparado à CC (Figura 3-A I), porém foi maior nas mudas inoculadas com FMA e ZK+FMA, comparadas ao tratamento sem inoculação (Figura 3-A II). Já em *C. estrellensis* houve manutenção do comprimento do caule em FMA em relação ao N. in (Figura 3-B). Em *H. popayanensis* o comprimento da raiz se manteve em ZK e ZK+FMA submetidas ao DH em relação ao controle, e foi reduzido apenas em FMA no DH, comparado ao mesmo tratamento em CC (Figura 3-C). Em *C. estrellensis* o

tratamento com FMA favoreceu o crescimento da raiz, comparado ao tratamento sem inoculação (Figura 3-D).



**Figura 9.** Comprimento do caule (A e B) e da raiz (C e D) em mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A e C) e *Cariniana estrellensis* (B e D) controle (N.in), inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA, mantidas no solo em capacidade de campo (CC) e submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e barras pontilhadas comparam as inoculações. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico C as letras maiúsculas acima das barras comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para os gráficos A-II; B e D as letras minúsculas comparam os tratamentos inóculos. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*\*  $p < 0,01$ ). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A massa seca de raiz, caule e folha em *H. popayanensis* foi reduzida em DH, comparada à CC. Em *C. estrellensis* a massa seca da raiz se manteve semelhante em ZK e ZK+FMA em ambas condições hídricas e foi reduzida nas inoculadas com FMA e nas N. in em DH. A massa seca do caule foi mantida nas mudas inoculadas

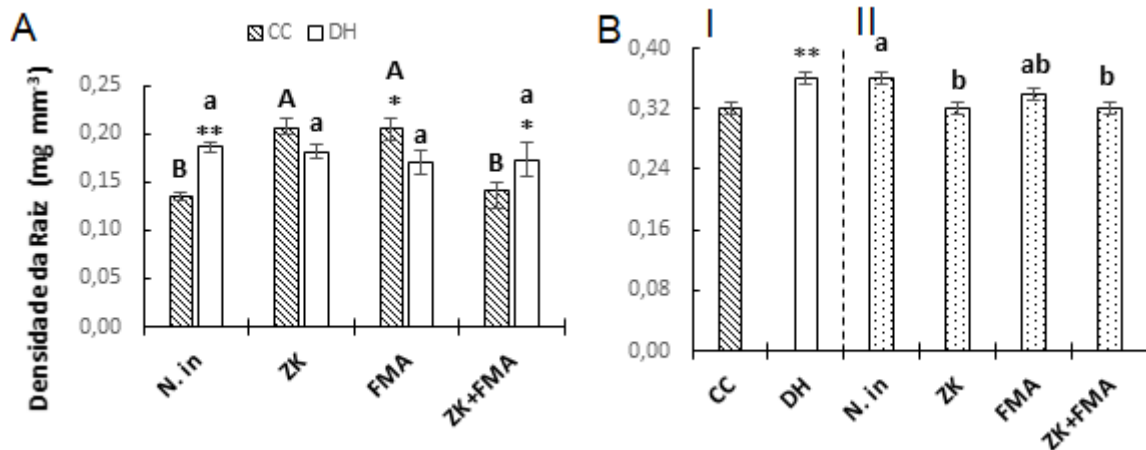
com ZK e ZK+FMA em DH comparadas às mesmas inoculações em CC, em CC houve redução apenas nas co-inoculadas comparada às mudas não inoculadas, e não houve diferença entre as inoculações no DH, além disso, a massa seca do caule das mudas inoculadas com FMA em DH foram menores do que em CC. A massa seca da folha não diferiu em nenhuma inoculação em relação aos controles de ambas condições hídricas, também não houve diferença em ZK em DH comparado ao CC, enquanto houve aumento na massa seca das folhas na inoculação com FMA no DH em relação ao CC (Tabela 2).

**Tabela 2.** Massa seca de raiz, caule e folha de mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cariniana estrellensis* sem inoculação e inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Os valores são médias  $\pm$  erros-padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em CC e as minúsculas os tratamentos em DH. O asterisco compara as mudas em cada condição hídrica (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Parâmetro	Espécie	Inoculação	CC	DH
Massa Seca da Raiz (g)	Hp	NÃO INOCULADO	0,37 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,03
		ZK	0,53 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,02
		FMA	0,50 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,07
		ZK+FMA	0,35 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,13
		MÉDIA	0,44 $\pm$ 0,03 *	0,35 $\pm$ 0,04
Massa Seca do Caule (g)	Hp	NÃO INOCULADO	0,34 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01
		ZK	0,48 $\pm$ 0,08	0,20 $\pm$ 0,02
		FMA	0,38 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,04
		ZK+FMA	0,35 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,12
		MÉDIA	0,39 $\pm$ 0,03 **	0,27 $\pm$ 0,03
Massa Seca da Folha (g)	Hp	NÃO INOCULADO	0,34 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02
		ZK	0,35 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,01
		FMA	0,32 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,02
		ZK+FMA	0,33 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,05
		MÉDIA	0,33 $\pm$ 0,01 **	0,27 $\pm$ 0,01
Massa Seca da Raiz (g)	Ce	NÃO INOCULADO	0,95 $\pm$ 0,08 AB*	0,75 $\pm$ 0,04 a
		ZK	0,76 $\pm$ 0,06 B	0,76 $\pm$ 0,06 a
		FMA	1,07 $\pm$ 0,10 A*	0,72 $\pm$ 0,08 a
		ZK+FMA	0,45 $\pm$ 0,03 C	0,63 $\pm$ 0,04 a
		MÉDIA	0,81 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,03
Massa Seca do Caule (g)	Ce	NÃO INOCULADO	0,79 $\pm$ 0,03 AB*	0,58 $\pm$ 0,04 a
		ZK	0,66 $\pm$ 0,03 BC	0,57 $\pm$ 0,03 a
		FMA	0,84 $\pm$ 0,04 A*	0,51 $\pm$ 0,04 a
		ZK+FMA	0,61 $\pm$ 0,04 C	0,56 $\pm$ 0,02 a
		MÉDIA	0,72 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,02
Massa Seca da Folha (g)	Ce	NÃO INOCULADO	0,93 $\pm$ 0,06 A	0,88 $\pm$ 0,05 ab
		ZK	0,77 $\pm$ 0,04 A	0,81 $\pm$ 0,05 ab
		FMA	0,98 $\pm$ 0,05 A*	0,79 $\pm$ 0,06 b
		ZK+FMA	0,84 $\pm$ 0,07 A	1,02 $\pm$ 0,07 a*
		MÉDIA	0,88 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,03

A densidade da raiz em *H. popayanensis* foi maior com ZK e FMA mantidas

em CC, comparadas àquelas não inoculadas, e foi maior no tratamento FMA mantido em CC comparado ao DH, enquanto para as co-inoculadas (ZK+FMA) foram maiores em DH (Figura 4-A). Já em *C. estrellensis* a densidade das raízes foi maior nas mudas mantidas em DH, comparadas àquelas em CC (Figura 4-B I), e manteve nas mudas inoculadas com FMA comparadas às mudas sem inoculação (Figura 4-B II).



**Figura 10.** Densidade da raiz em mudas de *Heliocarpus popayanensis* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) controle (N.in), inoculadas com ZK, FMA e ZK+FMA, mantidas no solo em capacidade de campo (CC) e submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Barras hachuradas e não preenchidas comparam diferentes condições hídricas (CC e DH, respectivamente) e estão representadas nos gráficos I, e barras pontilhadas comparam as inoculações e estão representadas nos gráficos II. Traços acima das barras correspondem ao erro padrão (n=7). Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o gráfico A as letras maiúsculas comparam as inoculações em CC e as minúsculas as inoculações em DH. Para o gráfico das inoculações (B-II) as letras minúsculas comparam os tratamentos com inóculos. O asterisco compara as inoculações em ambas condições hídricas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

## DISCUSSÃO

Considerando que houve interação das plantas com microrganismos inoculados, conforme apresentado na Figura 1, é possível observar respostas estruturais, fisiológicas e metabólicas das mudas de ambas as espécies vegetais associadas com os microrganismos estudados.

Como respostas estruturais observou-se que a espécie não-pioneira apresenta desenvolvimento mais lento já que as raízes apresentaram características

de desenvolvimento primário, com a presença de córtex e epiderme. Já as mudas de *H. popayanensis* apresentaram crescimento secundário, no qual já foi possível diferenciar o xilema e floema secundários, além da periderme ocupando o lugar da epiderme, e córtex que já foram eliminados (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2000).

Para a espécie *H. popayanensis* a inoculação com ZK foi responsável por aumentar a espessura do xilema secundário e consequentemente da área do xilema secundário, apesar de não ter apresentado diferenças na massa seca e no comprimento da raízes de mudas expostas ao mesmo tratamento. Esse aumento em espessura também foi observado por Calzavara et al., (2018) em *Zea mays* L. (milho) inoculadas com ZK, as quais aumentaram a área total dos elementos de vaso, o número de vasos do metaxilema, e a espessura do cilindro vascular. Se essas plantas fossem expostas à situações de DH poderia haver diminuição na tolerância das mesmas, visto que o maior diâmetro de vaso pode ocasionar embolia e cavitação (CAI e TYREE, 2010). Algumas espécies de BPCP, como *Bacillus sp.* são conhecidas por estimular o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios como as auxinas, as quais podem ser responsáveis por aumentar a taxa de formação do xilema e podem estar envolvidas no aumento da área dos vasos, assim como observado em mudas de trigo tratadas com BPCP (BASHAN e DE BASHAN, 2010).

Em *C. estrellensis* não houve um padrão de inoculação exclusivo que se mostrou mais eficaz para o aumento do diâmetro do xilema e floema secundários. Porém, mudas inoculadas com FMA reduziram tanto a área quanto a espessura do xilema secundário, além de não apresentar desenvolvimento do floema secundário. Tais fatos podem ser indicadores de um retardo no desenvolvimento das raízes inoculadas com FMA. Esse retardo pode estar ligado ao fato de que as raízes, quando inoculadas com FMA, tendem a investir no desenvolvimento do FMA, o que demanda altas concentrações de carbono (BAGO et al., 2003), comprometendo o desenvolvimento da raiz principal. Ainda, a menor espessura e área do xilema, observados em *C. estrellensis* quando inoculadas com FMA, indica que mudas inoculadas com FMA podem ser mais tolerantes em situações de seca, já que a raiz é capaz de ajustar seu potencial hídrico baseado no diâmetro do xilema (MELO et al., 2007). Essa alteração no diâmetro do xilema é importante para manter a condutividade hidráulica, uma vez que em DH os elementos de vaso estão mais suscetíveis a sofrer cavitação e interrupção da coluna d'água, desse modo, o menor

diâmetro pode ajudar a reduzir o índice de mortalidade das mudas das espécies utilizadas em programas de reflorestamento, quando as mesmas são levadas à campo. Nesse trabalho, foi observado a manutenção do potencial hídrico de mudas de *C. estrellensis* inoculadas com FMA individualmente ou co-inoculadas. Nessas condições torna-se desfavorável um elemento de vaso com diâmetro maior (CAI e TYREE, 2010; MELO et al., 2007).

Em situações de seca, quando o potencial de água no solo é reduzido, pode haver o ajuste osmótico nas mudas para garantir o turgor celular, o que diminui também seu potencial de água (JALEEL et al., 2009), assim como observado na espécie pioneira *H. popayanensis* na condição de DH. A diminuição do potencial de água em mudas de espécies arbóreas mantidas em DH também foi observado por Tiepo et al., (2018), em mudas de *T. micrantha* e *C. estrellensis*.

O fato de não ter sido observado diferenças no potencial de água em duas das inoculações, ZK e FMA em *H. popayanensis*, pode estar relacionado ao grupo sucessional dessa espécie. Por ser uma espécie pioneira, em condições naturais são geralmente encontradas em locais de início de sucessão, e conseqüentemente suporta estresses como a alta luminosidade e diminuição do conteúdo de água no solo (TONELLO e TEIXEIRA FILHO, 2012). Nesse caso, o microrganismo pode não trazer benefício adicional à manutenção do potencial de água, quando comparada àquelas mudas não inoculadas.

Na espécie não-pioneira *C. estrellensis*, as mudas inoculadas e submetidas ao DH mantiveram seu potencial de água semelhante às mudas em CC. Tanto os fungos quanto as bactérias são capazes de tolerar as condições de seca no solo e auxiliar as plantas a sobreviverem aos efeitos do DH (GLICK et al 2007; MARULANDA et al., 2009). As BPCP e os FMA são conhecidos por aumentar a absorção de água pelas raízes, tanto por meio do maior desenvolvimento do sistema radicial estimulado pela produção de AIA pelas BPCP, que favorece o crescimento das raízes, quanto pela presença de micélios dos FMA que são capazes de transportar água de regiões do solo mais distantes para o interior das raízes (MARULANDA et al., 2009).

Foi observado também em *C. estrellensis*, que houve menor  $g_s$  nas mudas em DH em relação às mesmas inoculações em CC. Nesse caso, por se tratar de uma espécie que não é adaptada às condições de seca, as inoculações testadas podem agir de forma a manter o potencial de água da planta em condição de DH

para que ela continue a absorver água e mantenha-se hidratada, mesmo com o fechamento parcial dos estômatos. A manutenção do potencial de água acompanhada do fechamento estomático em condições de DH também foi observado em plantas de *Solanum lycocarpum* St.-Hil, mantidas em DH (CHAVES FILHO e STACCIARINI-SERAPHIN, 2001).

Quando analisada a quantidade de prolina em mudas de *H. popayanensis*, apenas as mudas não inoculadas em DH apresentaram valor elevado, enquanto as mudas inoculadas com ZK apresentaram menor concentração de prolina em DH, e as demais inoculações se mantiveram semelhantes às mudas em CC, o contrário do que era esperado; já que a prolina age no ajuste osmótico por meio da concentração desse soluto nas células, auxiliando na redução do potencial osmótico (BIANCHI et al., 2005; PANDEY e SHUKLA, 2015). Foi observado por Marulanda et al., (2009) que em folhas de *Trifolium repens* quando inoculadas com *Bacillus megateri* houve maior tolerância ao déficit hídrico causado por estresse osmótico (NaCl) aumentando a produção de prolina e AIA conforme o aumento do estresse. Além disso, mudas de arroz expostas ao DH e inoculadas com FMA apresentaram baixo potencial hídrico seguido de um maior acúmulo de prolina (RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011). No entanto, já foi relatado que o menor acúmulo deste aminoácido ocorre em plantas que são menos afetadas pelas situações de estresses (SANDHYA et al. 2010), indicando que as inoculações com microrganismos podem ter contribuído com a proteção contra possíveis danos causados pelo DH (RUÍZ-SÁNCHEZ et al. 2011).

Resultado semelhante também foi observado nas mudas de *C. estrellensis*, que também apresentou uma manutenção nos níveis de prolina nas plantas submetidas à seca, inclusive sendo menor na co-inoculação em DH comparada à CC. Em mudas de ambas as espécies pode estar ocorrendo outro mecanismo de ajuste osmótico, que não seja a síntese de prolina, por exemplo pela síntese e acúmulo de açúcares solúveis, que proporcionam uma manutenção do potencial hídrico nessas mudas (CHAVES-FILHO e STACCIARINI-SERAPHIN 2001). Um aumento na quantidade de açúcares solúveis totais foi observado por Tiepo et al., (2018) em folhas de *Trema micrantha* submetidas ao DH. Em um experimento realizado por Marur (1999) plantas do gênero *Gossypium* L. (algodoeiro) submetidas ao DH tiveram um ajustamento osmótico consequente do aumento no teor de carboidratos redutores, que se mostrou associado à diminuição do potencial hídrico.

Em ambas as espécies vegetais, as mudas submetidas ao DH apresentaram

menores valores de  $g_s$ , e como consequência desse fechamento estomático também foi observado a diminuição da  $C_i$  quando submetidas ao DH. Os estômatos regulam as taxas de assimilação de carbono e perda de água, portanto a condutância estomática ( $g_s$ ) determina as taxas de entrada de  $CO_2$  e saída de vapor de água por meio da transpiração, sendo assim, age controlando a taxa fotossintética ( $A$ ), a hidratação e acúmulo de  $CO_2$  intercelular ( $C_i$ ) (AUGÉ et al., 2014). A diminuição dos parâmetros fotossintéticos quando em DH também foi observado por Tiepo et al., (2018) em mudas de *T. micrantha* e *C. estrellensis* submetidas ao DH moderado, nas quais houve a diminuição da taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ).

No entanto, ao comparar as inoculações, em *C. estrellensis* as mudas em DH inoculadas com ZK e com FMA individualmente apresentaram maior valor de  $C_i$  em relação às que não foram inoculadas. Resultados semelhantes foram observados com a colonização por FMA do gênero *Glomus* em plantas de alface, nas quais aumentou a condutância estomática em relação às plantas não inoculadas. Ainda, em plantas de trigo e de rosas foi observado que no momento do fechamento estomático o potencial de água da folha das plantas inoculadas com FMA era menor do que o das plantas não inoculadas, mostrando nessas plantas uma maior tolerância à desidratação (AUGÉ, 2001). Ainda, resultado semelhante foi observado por Vivas et al. (2003) também em alface, na qual a inoculação com *Bacillus sp.* aumentou a condutância estomática em comparação ao controle.

O fato da  $C_i$  se apresentar superior em mudas inoculadas de ambas as espécies, sendo em *C. estrellensis* nas inoculadas mantidas em DH em relação às N. in, sugere que as inoculações podem garantir a melhor assimilação de  $CO_2$ . E ao observar que nas duas espécies a  $A$  se manteve constante em ambas condições hídricas em quase todos os tratamentos, exceto nas mudas inoculadas com ZK, pode-se supor que nessas mudas houve uma maior atividade da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), gerando uma maior eficiência instantânea de carboxilação, sem que haja alteração na taxa fotossintética, mesmo em condição de DH, visto que a eficiência instantânea de carboxilação pode ser relacionada com a concentração intracelular de  $CO_2$  e com a taxa de assimilação de  $CO_2$  (Ferraz et al., 2012; Tiepo et al., 2018). Essa manutenção na taxa fotossintética mesmo em DH é o contrário do que era esperado nessa situação pois a concentração  $C_i$  no mesófilo foliar geralmente é reduzida pela diminuição da  $g_s$  com consequente diminuição na

taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (Ferraz et al., 2012).

Foi observado em ambas as espécies que a eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ) se manteve superior nas mudas em condição de DH, resultado semelhante ao encontrado por Hentschel et al., (2015) na espécie arbórea *Fagus sylvatica* L. após um período de seca na Europa. A ( $EUA_{int}$ ), é normalmente usada como uma resposta da planta a estresses abióticos como a seca, já que uma elevada  $EUA_{int}$  está associada ao uso mais conservador da água, o que é benéfico para plantas submetidas ao déficit hídrico (CONDON et al., 2002; HENTSCHEL et al., 2015).

Nas mudas de *C. estrellensis* inoculadas com ZK em DH foram encontradas maiores concentrações de MDA do que na mesma inoculação em CC, indicando que a peroxidação lípídica e produção de EROs foram prejudiciais e causaram danos no aparelho fotossintético dessas mudas, como foi observado pela diminuição da *A* nesse tratamento (VANLERBERGHE et al., 2016). A maior peroxidação lipídica nas plantas de *C. estrellensis* mantidas em DH pode estar relacionada ao fato de que o déficit hídrico aumenta a produção de EROs que podem causar peroxidação lipídica, degradação protéica, dano à membrana e morte celular (APEL e HIRT, 2004). Já o fato de em mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK em DH ter sido observado uma redução nos níveis de MDA comparado à CC, e uma manutenção dos níveis quando co-inoculadas em ambas condições hídricas, indica que a inoculação com a BPCP pode ter promovido mecanismos para proteger dos possíveis danos oxidativos que são causados pelo DH, com a diminuição da peroxidação lipídica, resultado semelhante ao encontrado por Tiepo et al., (2018) em mudas de *Trema micrantha* inoculadas com ZK em DH.

A não diferença do nível de peróxido de hidrogênio nas mudas das espécies inoculadas com ZK em ambas condições hídricas, pode estar associado a mecanismos de proteção das mudas inoculadas contra formação de EROs nas plantas em DH. Isto pode ser decorrente da ativação de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e APX, assim como observado em *Lavandula dentata* inoculada com *Bacillus thuringiensis* e um “pool” de FMA em condições de DH, as quais as plantas inoculadas com *Bacillus* e co-inoculadas apresentaram aumento na atividade dessas enzimas antioxidantes (ARMADA et al., 2016). O contrário foi observado na co-inoculação em *C. estrellensis*, a qual não se apresentou benéfica em DH, sendo inclusive superior ao valor observado nas plantas não-inoculadas.

A diminuição do conteúdo de N total nas folhas de *H. popayanensis* nos tratamentos com FMA e co-inoculado em DH, sugere que o nitrogênio absorvido por essas mudas foi realocado para outro órgão da planta, imobilizado pelos FMA ou ainda, que não foi absorvido em grande quantidade (ZHOU et al., 2014). Em *C. estrellensis*, foi observado um acréscimo na quantidade de N nas folhas das mudas inoculadas com ZK em DH, podendo ser resultado de um aumento na atividade da enzima nitrato redutase (NR), assim como observado por Tiepo (2018), que em *C. estrellensis* observou aumento na atividade da NR nas folhas de mudas inoculadas com ZK comparadas ao mesmo tratamento em CC e ao tratamento não inoculado em DH. Também foi maior o nível de nitrogênio assimilado obtido por Kohler et al. (2008) que observaram em folhas de alface que a associação com BPCP submetidas ao DH moderado pode aumentar os níveis de nitrogênio assimilado por meio da ação da enzima nitrato redutase.

Ainda, em *H. popayanensis* a redução da massa seca do caule em mudas submetidas ao DH pode estar associado ao menor comprimento do caule na mesma condição, sugerindo uma queda no investimento do crescimento da parte aérea de mudas submetidas ao DH. Esse menor investimento pode ser resultado da regulação pelo hormônio etileno, que sob condições de estresse é capaz de regular de forma endógena a homeostase da planta, resultando em redução do crescimento da parte aérea (DAR et al., 2018).

Ao comparar apenas as inoculações, o acréscimo no comprimento do caule das mudas inoculadas com FMA e ZK+FMA, pode ser efeito do FMA que possibilitou maior absorção de nutrientes devido à produção das hifas dos fungos, as quais podem se expandir pelo solo alcançando regiões mais distantes da raiz, e assim contribuir para a absorção de nutrientes (OWEN et al., 2015). Esse aumento na altura do caule também foi observado em mudas de *Hevea brasiliensis* L. (seringueira) inoculadas com FMA em condições de campo (DINIZ et al., 2010).

Para as análises de crescimento da raiz, a redução do comprimento em mudas de *H. popayanensis* inoculadas com FMA quando expostas ao DH e redução da massa seca em DH, também pode ser resultado de um provável aumento do nível de etileno nas raízes que, além de reduzir o comprimento do caule, também pode agir na inibição do crescimento radicial (GLICK et al., 2007). Por outro lado, a manutenção da densidade da raiz nesse tratamento comparado à mesma inoculação em CC, mesmo apresentando menor comprimento, pode estar associado

com a modificação estrutural da raiz, pois as raízes podem apresentar mais ramificações quando associadas com o FMA (NADEEM et al., 2014). Um resultado semelhante foi observado em raízes de tomateiro inoculadas com FMA, o qual apesar da redução em comprimento da raiz, esta apresentou maior ramificação com formação de raízes secundárias (BERTA et al., 2005).

As análises morfológicas da espécie não-pioneira *C. estrellensis* apresentaram diferentes padrões de resposta quando comparadas à espécie pioneira. Quanto às medidas de comprimento, o fato de não ter apresentado diferenças significativas no teste da ANOVA entre as condições hídricas e entre as interações (inoculação x condição hídrica), sugere que apenas as inoculações exerceram influência nessas mudas, já que apresentaram diferenças no mesmo teste estatístico.

Os FMA podem interferir na síntese e translocação de fitormônios capazes de regular a emissão de raízes e crescimento de caule e raiz (SOUZA, 2000). Os resultados encontrados nesse trabalho confirmam isso em *C. estrellensis*, no qual a inoculação com o FMA se mostrou mais eficiente tanto para o crescimento do caule quanto da raiz, assim como a não alteração da densidade de raiz. Resultado semelhante também foi observado por Anzanello et al., (2011) o qual porta-enxertos de videira inoculadas com FMA apresentaram maior estímulo à formação de raízes. Pelo fato de *C. estrellensis* ter apresentado maior densidade de raiz nos tratamentos em DH, esperava-se que essas mudas também tivessem apresentado aumento na massa seca nessa condição, já que raízes com maior densidade geralmente são mais grossas, porém não foi o observado. O aumento da densidade pode ser decorrente de um investimento em número de raízes, com maior quantidade, como uma modificação na arquitetura radicial das plantas para que possa explorar partes mais profundas do solo, o que é importante para plantas expostas à situações de seca (ROLLI et al., 2015).

## **CONCLUSÃO**

As espécies arbóreas neotropicais de diferentes estágios sucessionais utilizadas nesse trabalho apresentaram diferentes padrões de respostas às associações com ZK, FMA e à co-inoculação (ZK+FMA) sob déficit hídrico, os quais

podem auxiliar a reduzir o índice de mortalidade das mudas dessas espécies quando levadas a campo.

**I- A inoculação com BPCP e/ou FMA promove alterações estruturais, de crescimento, fisiológicas e metabólicas que resultam em maior tolerância à seca em espécies arbóreas neotropicais.** Aceita-se essa hipótese. Em mudas de *C. estrellensis* inoculados com FMA as plantas apresentaram menor área do xilema secundário e espessura do xilema, fato que pode ser mais eficiente em situações de seca, já que a raiz é capaz de ajustar seu potencial hídrico baseado no diâmetro do xilema. Quanto às respostas fisiológicas houve o aumento na  $C_i$  em mudas de ambas as espécies quando inoculadas, e o aumento da  $g_s$  em mudas de *C. estrellensis* inoculadas com ZK e FMA quando em DH em relação às não inoculadas, sendo que tais alterações podem acarretar na manutenção da fotossíntese em condições de seca. Em relação às metabólicas, o nível de prolina foi reduzido em *H. popayanensis* inoculadas em DH, sugerindo que essas mudas apresentaram algum outro mecanismo de ajuste osmótico. Ainda, em *C. estrellensis* houve a manutenção no nível de MDA nas plantas inoculadas com FMA em DH, portanto não houve aumento na peroxidação lipídica. Dessa forma, a inoculação com FMA protegeu contra os danos na membrana lipídica. Enquanto nas mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK em DH houve redução no valor de MDA, dessa forma, para essa espécie, o inóculo com a BPCP foi responsável por promover mecanismos para aliviar os danos na membrana lipídica. Quanto ao peróxido de hidrogênio, as mudas de *H. popayanensis* co-inoculadas (ZK+FMA) em DH obtiveram valores semelhantes às plantas sem déficit hídrico, fato que pode estar associado à mecanismos de evitação à formação de EROs por meio da ativação de enzimas antioxidantes.

**II- A inoculação individual com BPCP ou FMA é mais eficiente na tolerância à seca de mudas da espécie não pioneira em relação à co-inoculação.** Aceita-se a hipótese. Em mudas de *C. estrellensis* inoculadas apenas com FMA foi observado menor valor da área do xilema secundário, o que pode ser benéfico quando em situações de seca a fim de evitar embolia e cavitação dos elementos de vaso. Além disso, não houve redução no comprimento do caule nas mudas inoculadas com FMA e houve aumento no comprimento da raiz nas mesmas mudas. Quanto à massa seca, nessa espécie houve manutenção dos valores de massa seca do caule, raiz e folhas em DH quando inoculadas individualmente com ZK, o que sugere que as

plantas continuaram investindo em crescimento mesmo sob condições de seca. Em mudas da espécie não pioneira inoculadas com ZK e FMA individualmente foram observados maiores valores de  $g_s$  em DH quando comparadas às mudas não inoculadas da mesma condição hídrica, com isso as mudas nesses tratamentos foram capazes de manter maior condutância estomática, o que pode ser benéfico para a manutenção da fotossíntese nessas condições de estresse. Além disso, as inoculações individuais também auxiliaram na proteção contra o estresse oxidativo nessa espécie vegetal, visto que a inoculação com FMA em DH apresentou menor valor de MDA e a inoculação com ZK em DH apresentou menor concentração de peróxido de hidrogênio em relação à co-inoculação.

**III- A co-inoculação com BPCP+FMA promove alterações metabólicas que garantem maior tolerância à seca em mudas da espécie pioneira em relação a inoculação com BPCP e FMA individualmente.** Aceita-se. A co-inoculação apresentou menores valores de MDA em mudas de *H. popayanensis* quando submetidas ao DH em relação às inoculações individuais na mesma condição hídrica, e manteve valores semelhantes à mesma inoculação em CC. Ainda, as mudas co-inoculadas apresentaram menor concentração de peróxido de hidrogênio do que as mudas não inoculadas e àquelas inoculadas apenas com ZK ou FMA na mesma condição hídrica. Esses resultados sugerem que houve uma proteção por meio da ativação de enzimas anti-oxidantes nessas mudas da espécie pioneira, agindo contra os danos oxidativos.

## REFERÊNCIAS

- AIDAR, M. P. M. et al. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell And Environment**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.389-399, mar. 2003. Wiley.
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P. V. D.; CASAMALI, B.. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.409-415, 2011. FapUNIFESP (SciELO).
- APEL, K.; HIRT, H.. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.373-399, 2 jun. 2004. Annual Reviews.
- ARMADA, E. et al. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 192, p.1-12, mar. 2016. Elsevier BV.
- AUGÉ, R. M.. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.3-42, 28 maio 2001. Springer Nature.
- AUGÉ, R. M.. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. **Canadian Journal Of Soil Science**, [s.l.], v. 84, n. 4, p.373-381, nov. 2004. Canadian Science Publishing.
- AUGÉ, R. M.; TOLER, H. D.; SAXTON, A. M.. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.13-24, 16 maio 2014. Springer Nature.
- BACILIO-JIMÉNEZ, M. et al. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant And Soil**, [s.l.], v. 249, n. 2, p.271-277, 2003. Springer Nature.
- BAGO, B.. Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as well as Lipid. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 131, n. 3, p.1496-1507, 27 fev. 2003. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.007765>.
- BAREA, J. M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C.. Interactions Between Mycorrhizal Fungi and Bacteria to Improve Plant Nutrient Cycling and Soil Structure. **Soil Biology**, [s.l.], p.195-212, 2005. Springer-Verlag.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. **Advances In Agronomy**, [s.l.], p.77-136, 2010. Elsevier.

BERTA, G. et al. Suppression of Rhizoctonia root-rot of tomato by Glomus mossae BEG12 and Pseudomonas fluorescens A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis. **European Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.279-288, mar. 2005. Springer Nature.

BIANCHI, Cleusa Adriane Menegassi et al. Ajuste osmótico em milho cultivado em diferentes sistemas de manejo de solo e disponibilidade hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 40, n. 7, p.645-651, jul. 2005. FapUNIFESP (SciELO).

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.1-11, 27 jul. 2010. Springer Nature.

BRESSON, J. et al. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, [s.l.], v. 200, n. 2, p.558-569, 4 jul. 2013. Wiley.

BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.807-838, 29 abr. 2013. Annual Reviews.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E.. Surface Characteristics of *Azospirillum brasilense* in Relation to Cell Aggregation and Attachment to Plant Roots. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.91-110, jan. 2000. Informa UK Limited.

CAI, J.; TYREE, M. T.. The Impact of Vessel Size on Vulnerability Curves: Data and Models for Within-Species Variability in Saplings of Aspen, *Populus tremuloides* Michx. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], p.1059-1069, fev. 2010. Wiley.

CALZAVARA, A. K. et al. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.870-878, 6 jun. 2018. Wiley.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A.. A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Irobiana e na Nutrição de Plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. Cap. 5. p. 79-96.

CARILLO, P.; GIBON, Y. "PROTOCOL: Extraction and determination of proline." **Protocols in Ecological and Environmental Plant Physiology**. CSIRO, Australia, 2011.

CAVAGNARO, Timothy R. et al. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.283-290, maio 2015. Elsevier BV.

CHAVES-FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico<sup>1</sup>. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, p.199-204, 2011.

CONDON, A. G. et al. Improving Intrinsic Water-Use Efficiency and Crop Yield. **Crop Science**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.122-131, 2002. Crop Science Society of America.

CRAVEN, D. et al. Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama. **Forest Ecology And Management**, [s.l.], v. 261, n. 10, p.1643-1653, maio 2011. Elsevier BV.

DAR, Z. M. et al. Review on Drought Tolerance in Plants Induced by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences**, [s.l.], v. 7, n. 05, p.412-422, 10 maio 2018. Excellent Publishers.

DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J.; BASHAN, Y.. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 61, p.171-189, out. 2012. Elsevier BV

DINIZ, P. F. A. et al. Crescimento, parâmetros biofísicos e aspectos anatômicos de plantas jovens de seringueira inoculadas com fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.65-72, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos.**: Sistema brasileiro de classificação de solos.. Brasília: Embrapa, 1999. 412 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. . **Ata da XXX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. 350 p.

ESPOSITO, M. P. et al. Oxidant-antioxidant balance and tolerance against oxidative stress in pioneer and non-pioneer tree species from the remaining Atlantic Forest. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 625, p.382-393, jun. 2018. Elsevier BV.

FANG, Y.; XIONG, L.. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 72, n. 4, p.673-689, 22 out. 2014. Springer Nature.

FAVARETTO, V. F. et al. Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.20-28, jan. 2011. Elsevier BV.

FEDERICI, G; SHAW, B; HANDY, R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 84, n. 4, p.415-430, 30 out. 2007. Elsevier BV.

FERRAZ, Renner Luciano de Souza et al. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.181-188, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1983-40632012000200010>.

FREITAS, Sueli dos Santos. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. In: SILVEIRA, Adriana Parada Dias da; FREITAS, Sueli dos Santos. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo Campinas, 2007. Cap. 1. p. 1-20.

GLICK, B. R. et al. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. **Critical Reviews In Plant Sciences**, [s.l.], v. 26, n. 5-6, p.227-242, 23 out. 2007. Informa UK Limited.

GLICK, B. R.. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, [s.l.], v. 2012, p.1-15, 2012. Hindawi Limited.

GOODALE, U. M. et al. Disturbance and tropical pioneer species: Patterns of association across life history stages. **Forest Ecology And Management**, [s.l.], v. 277, p.54-66, ago. 2012. Elsevier BV

GRAY, E.J.; SMITH, D.L.. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.395-412, mar. 2005. Elsevier BV.

HARRISON, K. A.; BOL, R.; BARDGETT, R. D.. PREFERENCES FOR DIFFERENT NITROGEN FORMS BY COEXISTING PLANT SPECIES AND SOIL MICROBES. **Ecology**, [s.l.], v. 88, n. 4, p.989-999, abr. 2007. Wiley.

HENTSCHEL, R. et al. Stomatal conductance and intrinsic water use efficiency in the drought year 2003: a case study of European beech. **Trees**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.153-174, 16 set. 2015. Springer Nature.

JALEEL, C. A. et al. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. **International Journal Of Agriculture & Biology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.100-105, 2009.

KELLER, L. et al. Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies arbóreas nativas. **Revista Árvore**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.305-314, abr. 2009. FapUNIFESP (SciELO).

KOHLER, J. et al. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. **Functional Plant Biology**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.141-151, 2008. CSIRO Publishing.

KRAPP, Anne. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. **Current Opinion In Plant Biology**, [s.l.], v. 25, p.115-122, jun. 2015. Elsevier BV.

KRONZUCKER, H. J. et al. Root ammonium transport efficiency as a determinant in forest colonization patterns: an hypothesis. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 117, n. 2, p.164-170, fev. 2003. Wiley.

KUROMORI, T.; SEO, M.; SHINOZAKI, K.. ABA Transport and Plant Water Stress Responses. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.513-522, jun. 2018. Elsevier BV.

LAMB, D.; ERSKINE, P. D.; PARROTTA, J. A.. Restoration of Degraded Tropical Forest Landscapes. **Science**, [s.l.], v. 310, n. 5754, p.1628-1632, 9 dez. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

LIEBERSBACH, H.; STEINGROBE, B.; CLAASSEN, N.. Roots regulate ion transport in the rhizosphere to counteract reduced mobility in dry soil. **Plant And Soil**, [s.l.], v. 260, n. 1/2, p.79-88, mar. 2004. Springer Nature.

LORENZI, H.. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4ª edição. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002

MARTÍNEZ-VIVEROS, O et al. MECHANISMS AND PRACTICAL CONSIDERATIONS INVOLVED IN PLANT GROWTH PROMOTION BY RHIZOBACTERIA. **Journal Of Soil Science And Plant Nutrition**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.293-319, jul. 2010. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT).

MARUR, C. J.. Curvas pressão-volume e expansão foliar em cultivares de algodoeiro submetidos à déficit hídrico. **Scientia Agrícola**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.563-569, jul. 1999. FapUNIFESP (SciELO).

MARULANDA, A.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R.. An Indigenous Drought-Tolerant Strain of *Glomus intraradices* Associated with a Native Bacterium Improves Water Transport and Root Development in *Retama sphaerocarpa*. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.670-678, 31 out. 2006. Springer Nature.

MARULANDA, A.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R.. Stimulation of Plant Growth and Drought Tolerance by Native Microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from Dry Environments: Mechanisms Related to Bacterial Effectiveness. **Journal Of Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.115-124, 24 fev. 2009. Springer Nature.

MATTSSON, A.. Predicting field performance using seedling quality assessment. **New Forests**, [s.l.], v. 13, n. 1-3, p.227-252, 1997. Springer Nature.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R.. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, [s.l.], v. 166, n. 2, p.525-530, fev. 2004. Elsevier BV.

MELO, H. C. de et al. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.145-153, 2007. FapUNIFESP (SciELO).

MENDONÇA, F.. AQUECIMENTO GLOBAL E SUAS MANIFESTAÇÕES REGIONAIS E LOCAIS: ALGUNS INDICADORES DA REGIÃO SUL DO BRASIL. **Revista Brasileira de Climatologia**, [s.l.], v. 2, p.71-86, 31 dez. 2006. Universidade Federal do Parana.

MOREL, María A.; CASTRO-SOWINSKI, Susana. The Complex Molecular Signaling Network in Microbe–Plant Interaction. **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**, [s.l.], p.169-199, 2013. Springer India. [http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_6).

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, [s.l.], v. 403, n. 6772, p.853-858, fev. 2000. Springer Nature.

NADEEM, S. M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.429-448, mar. 2014. Elsevier BV.

ORTIZ, N. et al. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 174, p.87-96, fev. 2015. Elsevier BV.

OSTERTAG, Rebecca et al. Using plant functional traits to restore Hawaiian rainforest. **Journal Of Applied Ecology**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.805-809, 13 mar. 2015. Wiley..

OWEN, D. et al. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 86, p.41-54, fev. 2015. Elsevier BV.

PANDEY, V.; SHUKLA, A.. Acclimation and Tolerance Strategies of Rice under Drought Stress. **Rice Science**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.147-161, jul. 2015. Elsevier BV.

PER, Tasir S. et al. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 115, p.126-140, jun. 2017. Elsevier BV.

PINTO, L. P. et al. Mata Atlântica Brasileira: os Desafios para Conservação da Biodiversidade de um Hotspot Mundial. In: ROCHA, Carlos Frederico Duarte et al (Ed.). **Biologia da conservação: Essências**. [s.l.]: Rima Editora, 2006. Cap. 4. p. 91-118

POORTER, L.; BONGERS, F.. Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. **Ecology**, Wageningen, v. 7, n. 87, p.1733-1743, jan. 2006

PROBANZA, A. et al. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.140-148, fev. 2001. Springer Nature.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; NOGUEIRA, S. S. S.; MIRANDA, M. A. C. Aspectos da estrutura da raiz e do desenvolvimento de plantas de soja em solos compactados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.929-938, maio 2000. FapUNIFESP (SciELO).

ROLLI, E. et al. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.316-331, 25 mar. 2014. Wiley.

RONDINA, A. B. L. et al. Arbuscular mycorrhizas increase survival, precocity and flowering of herbaceous and shrubby species of early stages of tropical succession in pot cultivation. **Journal Of Tropical Ecology**, [s.l.], v. 30, n. 06, p.599-614, 26 set. 2014. Cambridge University Press (CUP).

RUIZ-LOZANO, J. M.; AZCON, R.. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.472-478, mar. 1995. Wiley.

RUIZ-LOZANO, J. M.; PORCEL, R.; AROCA, R.. Evaluation of the Possible Participation of Drought-induced Genes in the Enhanced Tolerance of Arbuscular Mycorrhizal Plants to Water Deficit. **Mycorrhiza**, [s.l.], p.185-205, 2008. Springer Berlin Heidelberg.

RUIZ-SÁNCHEZ, M. et al. Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 168, n. 10, p.1031-1037, jul. 2011. Elsevier BV.

SALAMONE, I. E. de G.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M.. Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria. **Pgpr: Biocontrol and Biofertilization**, [s.l.], p.173-195, 2005. Springer Netherlands.

SANDHYA, V. et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.21-30, 7 maio 2010. Springer Nature.

SIQUEIRA, J.; SAGGIN-JÚNIOR, O.. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.245-255, 1 out. 2001. Springer Nature.

SOUZA, P. V. D.. Interação entre micorrizas arbusculares e ácido giberélico no desenvolvimento vegetativo de plantas de citrange carrizo. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.783-787, out. 2000. FapUNIFESP (SciELO).

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.m.c.. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.132-138, jun. 2005.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAKAHASHI, F. et al. Regulatory Gene Networks in Drought Stress Responses and Resistance in Plants. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p.189-214, 2018. Springer Singapore.

TIEPO, A. N. et al. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 130, p.277-288, set. 2018. Elsevier BV.

TONELLO, K. C.; TEIXEIRA FILHO, J.. Ecofisiologia de três espécies arbóreas nativas da mata atlântica do brasil em diferentes regimes de água. **Irriga**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.85-101, 16 abr. 2012. Brazilian Journal of Irrigation and Drainage - IRRIGA.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L.. **Fundamentos em ecologia**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009

VANLERBERGHE, G. C.; MARTYN, G. D.; DAHAL, K.. Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 157, n. 3, p.322-337, 24 maio 2016. Wiley.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V.. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica Ipef**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p.25-42, 1998.

VIVAS, A. et al. Influence of a Bacillus sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.249-256, 1 out. 2003. Springer Nature.

WILLIAMS, D.g. et al. Evapotranspiration components determined by stable isotope, sap flow and eddy covariance techniques. **Agricultural And Forest Meteorology**, [s.l.], v. 125, n. 3-4, p.241-258, out. 2004. Elsevier BV.

WRIGHT, S. J. et al. Functional traits and the growth–mortality trade-off in tropical trees. **Ecology**, [s.l.], v. 91, n. 12, p.3664-3674, dez. 2010. Wiley.

ZANGARO, W. et al. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal Of Tropical Ecology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.315-324, 28 abr. 2003. Cambridge University Press (CUP).

ZANGARO, W. et al. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.221-233, 9 out. 2012. Springer Nature.

ZANGARO, W. et al. Succession and environmental variation influence soil exploration potential by fine roots and mycorrhizal fungi in an Atlantic ecosystem in southern Brazil. **Journal Of Tropical Ecology**, [s.l.], v. 30, n. 03, p.237-248, 10 mar. 2014. Cambridge University Press (CUP).

ZANGARO, Waldemar et al. Differences between root traits of early- and late-successional trees influence below-ground competition and seedling establishment. **Journal Of Tropical Ecology**, [s.l.], v. 32, n. 04, p.300-313, 13 jun. 2016. Cambridge University Press (CUP).

ZHOU, Q. et al. Changes in carbon and nitrogen allocation, growth and grain yield induced by arbuscular mycorrhizal fungi in wheat (*Triticum aestivum* L.) subjected to a period of water deficit. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 75, n. 3, p.751-760, 21 set. 2014. Springer Nature.