



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KARINA SANADA

***HELIOCARPUS POPAYANENSIS* KUNTH E *CABRALEA*  
*CANJERANA* (VELL.) MART. APRESENTAM MAIOR  
TOLERÂNCIA À SECA QUANDO INOCULADAS COM  
BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO**

---

Londrina  
2021

KARINA SANADA

***HELIOCARPUS POPAYANENSIS* KUNTH E *CABRALEA*  
*CANJERANA* (VELL.) MART. APRESENTAM MAIOR  
TOLERÂNCIA À SECA QUANDO INOCULADAS COM  
BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Stolf Moreira  
Co-orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina  
2021

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

Sanada, Karina.

*Heliocharpus popayanensis* Kunth e *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. apresentam maior tolerância à seca quando inoculadas com bactérias promotoras de crescimento / Karina Sanada. - Londrina, 2021. 65 f.

Orientador: Renata Stolf Moreira.

Coorientador: Halley Caixeta de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Estresse abiótico - Tese. 2. Bactérias promotoras de crescimento - Tese. 3. Restauração florestal - Tese. 4. Déficit Hídrico - Tese. I. Stolf Moreira, Renata. II. Caixeta de Oliveira, Halley. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

KARINA SANADA

***HELIOCARPUS POPAYANENSIS* KUNTH E *CABRALEA*  
*CANJERANA* (VELL.) MART. APRESENTAM MAIOR  
TOLERÂNCIA À SECA QUANDO INOCULADAS COM  
BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof(a). Dra. Renata Stolf Moreira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. José Antonio Pimenta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dra. Mariana Fernandes Hertel  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de agosto de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida e por ter me dado saúde e força, não só nestes anos como aluna de mestrado, mas em todos os momentos da minha vida.

À minha família, em especial à minha mãe Rosa Catarina Sudário e ao meu padrasto Rogemar Monteiro, pelo apoio nas horas difíceis, pela paciência e pela força que eles sempre me deram para continuar esta caminhada.

Às minhas primas, Maria Vitória Braga Sudário, Giovana Ressinetti Gonçalves Dias e Bruna Cardozo Rodolfo, pela paciência nas horas de desânimo e cansaço e por escutarem minhas dificuldades, frustrações e reclamações.

Agradeço também as amigas que vou levar para sempre, principalmente a Lara Raposo Bardy, Bruno Teixeira de Sousa e a Tatiane Debiase pela paciência nestes dois anos e meio de vivência no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, pela companhia e por toda a ajuda.

Aos professores Dra. Renata Stolf Moreira, Dr. Halley Caixeta de Oliveira e Dr. José Antonio Pimenta, pela orientação, apoio e confiança, principalmente à minha orientadora Dra. Renata Stolf Moreira pelo empenho e dedicação na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de laboratório que sempre me auxiliaram e me ajudaram nos experimentos, especialmente à Dra. Mariana Fernandes Hertel que sempre acompanhou meu desempenho no laboratório.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em Ciências Biológicas e ao corpo docente e administração pelo apoio. E à CAPES pelo apoio financeiro que me permitiu realizar este projeto.

SANADA, Karina. *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. apresentam maior tolerância à seca quando associadas com bactérias promotoras de crescimento. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A necessidade de restauração de áreas degradadas acarretou em aumento na produção de mudas de espécies arbóreas nativas. Porém, quando transplantadas para o campo, as mudas estão constantemente expostas a estresses abióticos, como o déficit hídrico (DH), podendo aumentar a mortalidade, elevando os custos de programas de restauração. O uso de bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCPs) pode contribuir com a maior tolerância das plantas aos estresses abióticos, através de alterações bioquímicas e aumento da qualidade morfofisiológica. O objetivo deste trabalho foi verificar se a inoculação com duas estirpes de BPCP (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5 e *Bacillus velezensis* - ZK) favorece a ativação de respostas morfofisiológicas capazes de aumentar a tolerância ao DH em mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cabrlea canjerana* (Vell.) Mart. Para isto, as espécies foram semeadas em casa de vegetação e tratadas com inóculo das estirpes bacterianas. Após o crescimento das mudas, deu-se início ao tratamento, com duas condições hídricas, capacidade de campo (CC) e DH, totalizando 6 tratamentos. Em *H. popayanensis* a inoculação com BPCP foi eficaz, resultando no aumento da atividade da nitrato redutase (NR), quando inoculadas com Ab-V5 e o acúmulo dos compostos nitrogenados, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), quando inoculadas com ZK. Houve, ainda, quando inoculados com Ab-V5 e ZK, aumento da concentração de aminoácidos, como por exemplo a prolina, que atua no ajuste osmótico. Altas concentrações de proteínas também foram observadas nas mudas inoculadas com ZK, possivelmente, aquelas envolvidas na assimilação de  $\text{CO}_2$ , contribuindo para o crescimento das plantas, principalmente devido a manutenção da massa seca das raízes e aumento da razão raiz/parte aérea de mudas inoculadas com ZK. Em mudas de *C. canjerana* inoculadas com Ab-V5 houve maior atividade da NR em folhas. Porém na maioria dos parâmetros não houve diferença entre as plântulas quando inoculadas. A inoculação com ZK causou diminuição no conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na raiz, na atividade da NR e na assimilação de  $\text{CO}_2$ . A inoculação com BPCP em plantas submetidas ao DH resultou em alterações positivas, favorecendo a qualidade morfofisiológica em mudas, principalmente de *H. popayanensis*, demonstrando a importância da inoculação com essas bactérias em espécies destinadas a programas de restauração de áreas degradadas.

**Palavras-chave:** estresse abiótico; bactérias promotoras de crescimento; restauração florestal; ajuste osmótico; fotossíntese; potencial de água.

SANADA, Karina. *Heliocarpus popayanensis* Kunth and *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. Have greater tolerance to drought when associated with growth promoting bacteria. 2021. 64 p. Dissertation (Master's in Biological Sciences) – State University of Londrina, 2021.

## ABSTRACT

The need to restore degraded areas led to an increase in the production of seedlings of native tree species. However, when transplanted to the field, the seedlings are constantly exposed to abiotic stresses, such as water deficit (WD), which can increase mortality, increasing the costs of restoration programs. The use of plant growth-promoting bacteria (PGPBs) can contribute to greater plant tolerance to abiotic stresses, through biochemical changes and increased morphophysiological quality. The objective of this work was to verify if inoculation with two PGPB strains (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5 and *Bacillus velezensis* - ZK) favors the activation of morphophysiological responses capable of increasing WD tolerance in *Heliocarpus popayanensis* Kunth and *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. seedlings. For this, the species were sown in a greenhouse and treated with bacterial strains inoculum. After the seedlings had grown, the treatment began, with two water conditions, field capacity (FC) and WD, totaling 6 treatments. In *H. popayanensis* inoculation with PGPB was effective, resulting in increased nitrate reductase (NR) activity when inoculated with Ab-V5 and the accumulation of nitrogen compounds, nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), when inoculated with ZK. There was also when inoculated with Ab-V5 and ZK, an increase in the concentration of amino acids, such as proline, which acts in the osmotic adjustment. High protein concentrations were also observed in seedlings inoculated with ZK, possibly those involved in  $\text{CO}_2$  assimilation, contributing to plant growth, mainly due to the maintenance of root dry mass and increase in the root/shoot ratio of seedlings inoculated with ZK. In *C. canjerana* seedlings inoculated with Ab-V5 there was higher NR activity in leaves. However, in most parameters there was no difference between the seedlings when inoculated. Inoculation with ZK caused a decrease in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  content in the root, NR activity and  $\text{CO}_2$  assimilation. Inoculation with PGPB in plants subjected to WD resulted in positive changes, favoring the morphophysiological quality of seedlings, mainly of *H. popayanensis*, demonstrating the importance of inoculation with these bacteria in species destined for restoration programs in degraded areas.

**Key words:** abiotic stress; growth-promoting bacteria; forest restoration; osmotic adjustment; photosynthesis; water potential.

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1** - Massa seca da raiz (MSR), Massa seca da folha (MSF), Área foliar (AF) e Razão Raiz/Parte Aérea (R/PA) em mudas de *Heliocarpus popyanensis* e *Cabralea canjerana* mantidas em CC e submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com ZK e Ab-V5. Os valores são médias e erros-padrão. As diferenças entre os tratamentos N In, inoculado com Ab-V5 e inoculado com ZK estão representadas pelas letras minúsculas (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ ). Os asteriscos representam a diferença entre os níveis de hidratação do solo, CC e DH ANOVA (teste *F*;  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ;  $n = 9$ ).....36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- A** - Potencial de água e Conteúdo de prolina em folhas de *Heliocarpus popayanensis* (A e B) e *Cabralea canjerana* (C e D) mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 15 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 8, n = 10 e n = 10 respectivamente). Nas colunas cinza claro e escuro, médias com letras maiúsculas (CC) ou minúsculas (DH) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 5) .....27
- Figura 2- A** - Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{max}$ ), B: Condutância estomática ( $g_s$ ), C: Concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), D: Transpiração ( $E$ ) e E: Eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ) em mudas de *Heliocarpus popayanensis* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*\*P < 0,001; n = 24 (A) e n = 27 (B-E)). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 16 (A) e n = 18 (B-E)).....29
- Figura 3- A** - Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{max}$ ), B: Condutância estomática ( $g_s$ ), C: Concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), D: Transpiração ( $E$ ) e E: Eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ) em mudas de *Cabralea canjerana* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As

barras são médias ± erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; n = 27). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 18) .....30

**Figura 4 -** Atividade da Nitrato redutase em folhas e raízes de *Heliocarpus popayanensis* (A e B) e atividade da Nitrato redutase em folha de *Cabralea canjerana* (C) mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias ± erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 12 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 8 e n = 10 respectivamente).....30

**Figura 5- A -** Conteúdo de Nitrato foliar; B: Conteúdo de Nitrato da Raiz, C: Conteúdo de Amônio foliar e D: Conteúdo de Amônio da raiz em mudas de *Heliocarpus popyaneneis* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias ± erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (teste F; \*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 15 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 8 e n = 10 respectivamente). Nas colunas cinza claro e escuro, médias com letras maiúsculas (CC) ou minúsculas (DH) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 4) .....32

**Figura 6- A** - Conteúdo de Nitrato foliar, B: Conteúdo de Nitrato da Raiz e C: Conteúdo de Amônio da raiz em mudas de *Cabralea canjerana* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 15 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 8, n = 10 e n = 10 respectivamente).....33

**Figura 7- A** - Conteúdo de Aminoácido foliar, B: Conteúdo de Aminoácidos da Raiz, C: Proteínas totais foliares e D: Proteínas totais de raiz em mudas de *Heliocarpus popayanensis* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*\*P < 0,001; n = 15, n = 12 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 10, n = 8 e n = 10 respectivamente). Nas colunas cinza claro e escuro, médias com letras maiúsculas (CC) ou minúsculas (DH) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 5) .....34

**Figura 8- A** - Conteúdo de Aminoácido foliar, B: Conteúdo de Aminoácidos da Raiz e C: Proteínas totais foliares em mudas de *Cabralea canjerana* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de

acordo com a ANOVA (\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 15 e  
n = 15 respectivamente).....35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	BIOMA MATA ATLÂNTICA E PROGRAMAS DE REFLORESTAMENTO.....	14
2.2	RESPOSTA DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO .....	15
2.3	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS .....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.2	ANÁLISES FISIOLÓGICAS .....	24
3.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	25
3.4	BIOMETRIA .....	25
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	27
4.1	POTENCIAL DE ÁGUA E PROLINA .....	27
4.2	ANÁLISES FISIOLÓGICAS .....	28
4.3	ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE .....	30
4.4	NITRATO E AMÔNIO .....	31
4.5	AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS .....	33
4.6	BIOMETRIA .....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um dos grandes biomas brasileiros e possui grande riqueza em biodiversidade terrestre e aquática (Bustamante et al., 2019). Porém atualmente sua cobertura florestal natural representa 12,4% da floresta remanescente (Freitas et al., 2020). Assim compreender a suscetibilidade às mudanças climáticas desse bioma e sua fragmentação (Scarano e Ceotto, 2015) é importante para o sucesso da conservação e restauração desses locais, sendo que a Mata Atlântica é considerada um bioma com alto grau de fragmentação e um dos três biomas do planeta mais suscetível às mudanças climáticas (Bellard *et al.*, 2014 e Rezende et al., 2018).

A substituição da vegetação nativa promoveu perda da biodiversidade, além de alterações que resultam anualmente em grandes prejuízos econômicos, sociais e ambientais (Carvalho-Filho et al., 2003). Assim, ocorreu uma crescente necessidade de implementação de programas de restauração ativa nestas áreas, importantes para proteção de sua biodiversidade, o que acarretou no aumento da utilização de mudas de espécies arbóreas nativas devido ao maior interesse em pesquisas com estas espécies (Chaves et al., 2003).

As espécies arbóreas nativas utilizadas por estes programas de restauração de áreas degradadas, são germinadas em viveiros e posteriormente transferidas para um setor de aclimação. O ambiente de germinação e crescimento pode apresentar alta umidade relativa do ar, ausência de ventos, irrigação e temperatura controlada, ou seja, condições diferentes das encontradas em ambientes externos (Hoffmann, 2009). Assim esta diferença entre as condições ambientais pode provocar estresse nas mudas quando transplantadas para os ambientes degradados. Porém, as mudas são transferidas para setores de aclimação onde são transferidas para locais e expostas diariamente a condições de campo. Nesse processo de aclimação, as mudas desenvolvem traços anatômicos e biométricos que podem aumentar sua tolerância a estresses bióticos e abióticos, proporcionando uma maior taxa de sobrevivência quando transplantadas no campo (Craven et al., 2011; Calzavara et al., 2015).

Dentre os estresses abióticos, um dos mais importantes é o déficit hídrico (DH), e as respostas das plantas a este estresse variam de acordo com diversos fatores que influenciam direta ou indiretamente a sobrevivência das espécies vegetais (Nascimento et al., 2011). O DH é limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, causando alterações fisiológicas e metabólicas, como por exemplo a redução do potencial de água das plantas, o fechamento estomático, a limitação de trocas gasosas, diminuição no aporte

e transporte de nitrogênio (N) e no crescimento das plantas. Essas alterações interferem na alocação de biomassa vegetal, podendo ocasionar a morte das plantas e, no caso de mudas de espécies arbóreas, ocasiona elevação nos custos dos programas de restauração, devido à necessidade de substituição das plantas (Flexas et al., 2006; Rouphael et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Bista et al., 2018).

Uma alternativa para a obtenção de mudas de espécies arbóreas de maior qualidade e que minimize os danos causados pelo DH, assim como a redução do custo dos programas de restauração de áreas degradadas, é a inoculação com Bactérias Promotoras do Crescimento em Plantas (BPCP) (Tiepo et al., 2018).

As BPCP correspondem a um grupo de microrganismos que oferecem benefícios às plantas, como aumento da assimilação de N, aumento no acúmulo de solutos compatíveis, aumento da síntese de enzimas antioxidantes, maior disponibilidade de nutrientes, aumento da síntese de hormônios e de moléculas sinalizadoras podendo favorecer o aumento da tolerância das mudas ao DH (Oliveira et al., 2014).

Assim, diante da crescente necessidade de recuperação de áreas degradadas e a grande mortalidade de plantas quando submetidas a condições estressantes, o objetivo desse estudo foi verificar se a inoculação com BPCP favorece respostas morfofisiológicas capazes de aumentar a tolerância ao DH em mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth e *Cabralea canjerana* (Vell). Mart.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 BIOMA MATA ATLÂNTICA E PROGRAMAS DE RESTAURAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas brasileiros de maior biodiversidade, porém sua floresta é considerada uma das mais ameaçadas (SOS Mata Atlântica, 2020). A destruição da Mata Atlântica foi ocasionada pela ocupação humana desordenada (Rezende et al., 2018). Inicialmente, as florestas nativas foram removidas para a extração de madeira e, posteriormente, a atividade agropecuária, a mineração, projetos industriais, hidroelétricas e a acelerada urbanização contribuíram para sua devastação (Rezende et al., 2018). Assim, devido ao intenso desmatamento e distúrbios humanos que ocorreram principalmente na primeira metade do século 19 (Dean, 1996) cerca de 13% da cobertura vegetal nativa do bioma Mata Atlântica permaneceu no Brasil (Fundação SOS Mata Atlântica / INPE, 2018). Porém a partir de 2018, segundo estudos da Fundação SOS Mata Atlântica (2020), houve um crescimento de 27,2% no desmatamento da Mata Atlântica, sendo que os estados Paraná, Minas Gerais, e Bahia lideraram o ranking de desmatamento, registrando aumento de 35%, 47% e 78% respectivamente (SOS Mata Atlântica, 2020). Com isso, a Mata Atlântica cobre atualmente 12,4% da área que ocupava originalmente (Freitas et al., 2020). Isto se une ao fato do ministério do Meio Ambiente, chefiado por Ricardo Salles, ter auxiliado no desmonte de instrumentos legais de defesa da Mata Atlântica, como extinção dos conselhos e da participação social; redução da fiscalização ambiental; afrouxamento das leis ambientais; flexibilização na aplicação de multas; além do enfraquecimento do Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (SOS Mata Atlântica 2020).

Devido a essas pressões, torna-se necessário a implementação de programas de conservação e restauração ativa (Brancalion et al., 2019), sendo necessárias para amenizar os efeitos dos desmatamentos (Ellison et al., 2017) que causam estresse fisiológico nas plantas, podendo afetar sua sobrevivência nos ambientes degradados (Young et al. 2019).

A utilização de espécies arbóreas nativas para a restauração de áreas degradadas é uma das estratégias de restauração de ecossistemas e tem como objetivo reduzir o impacto ambiental causado pelos desmatamentos e contribuir para a conservação da biodiversidade (Shoo et al., 2015). Esse processo possibilita a recuperação de características naturais dos ecossistemas, a preservação da biodiversidade, a manutenção dos serviços ecossistêmicos e, ainda, o reestabelecimento da homeostase do bioma (Hall et al., 2011).

O custo desses programas de restauração de áreas degradadas torna-se elevado diante da necessidade continuada de replantio de mudas, decorrente dos altos índices de mortalidade em campo, uma vez que são submetidas muitas vezes a condições ambientais para as quais não se encontram devidamente aclimatadas (Carvalho-Filho et al., 2003). Isto também ocorre devido às mudas de espécies arbóreas nativas poderem ser vulneráveis a degradação dos ambientes que irão restaurar e aos estresses ambientais comuns nessas áreas. Entre eles o aumento da incidência luminosa, aumento da temperatura do solo, aumento no déficit de pressão de vapor, flutuações no potencial de água do solo e estresses bióticos e abióticos (Craven et al., 2011). Portanto, torna-se necessária a produção de mudas que sejam devidamente aclimatadas e mais tolerantes a estresses (Craven et al., 2011). Uma das maneiras de aclimação de mudas ocorre em viveiros, onde as mudas são transferidas para locais com condições climáticas próximas às encontradas em campo, fazendo com que as mudas desenvolvam traços que auxiliam no aumento da tolerância aos estresses (Calzavara et al. 2015).

Dentre os estresses abióticos que mais afetam o desenvolvimento das mudas no campo, encontram-se o DH, as altas intensidades luminosas e a deficiência de nutrientes minerais, como o N (Menge et al., 2012). As respostas das plantas a situações de DH variam de acordo com diversos fatores que influenciam direta ou indiretamente a sobrevivência das espécies vegetais; deste modo, não existe uma variável fisiológica que sozinha seja capaz de indicar a tolerância das plantas à seca (Nascimento et al., 2011). Quanto mais rápido for o desenvolvimento das mudas após o plantio, mais rápida será a formação da cobertura florestal (dossel) e menor será a necessidade de manejo, minimizando os custos. Portanto, para o sucesso desejado na implantação de projetos de restauração, é importante o devido manejo das mudas nos viveiros (Craven et al., 2011).

Assim, alternativas que aumentam a tolerância das mudas aos estresses comuns encontrados nas áreas degradadas são fundamentais para a obtenção de mudas de melhor qualidade e para a redução do custo de produção. Neste sentido, o estudo de ferramentas biotecnológicas que proporcionem um aumento da tolerância dessas mudas a estresses abióticos como a seca é de grande importância (Vurukonda et al. 2016).

## 2.2 RESPOSTA DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO

As respostas das plantas ao DH influenciam na sobrevivência das espécies vegetais (Nascimento et al., 2011). Dentre as estratégias que aumentam a tolerância das plantas ao DH está o desenvolvimento de estruturas funcionais tais como: aumento do comprimento e

produção de raízes em espécies arbóreas, que possibilitam maior área de absorção no solo, pois o aumento da tolerância à seca depende da capacidade da árvore de minimizar a perda e maximizar a absorção de água (Chaves et al., 2003). Assim outro fator importante é a diminuição na produção de área foliar através da queda das folhas, controlada pela ação de hormônios como o etileno, ácido abscísico (ABA) e auxina, de modo que diminui a área transpirante da planta, podendo se recuperar em caso de reidratação (Serraj e Sinclair, 2002; Alves e Setter, 2004). A arquitetura hidráulica do caule também pode ser uma estratégia das árvores ao DH, pois mantém o transporte de água durante a seca e pode auxiliar no reestabelecimento do fluxo de água após a reabsorção de água (Hacke et al., 2001). Independente das estratégias utilizadas, durante períodos de DH, muitas mudanças ocorrem no metabolismo vegetal, evidenciando que a resposta ao DH é uma característica multigênica (Nepomuceno et al., 2001).

Uma das respostas fisiológicas que ocorre em situações de DH é o ajuste osmótico. Este ocorre por meio do acúmulo de solutos osmoticamente ativos em resposta a condições de baixa disponibilidade de água no solo (Chaves et al., 2009; Vílchez et al., 2018), pois auxiliam no aumento do movimento líquido de água de solos com decréscimo do potencial de água da planta (Das et al., 2017). Isto ocorre através da redução do potencial osmótico e, conseqüentemente, do potencial de água ( $\Psi_w$ ) das células das plantas, essencial para a manutenção da absorção de água de solos com baixo potencial de água e conseqüentemente do turgor celular (Chaves-Filho & Stacciarini-Seraphin, 2001; Taiz et al., 2017). Esta manutenção do turgor é imprescindível para a manutenção dos processos de expansão celular, sugerindo que o ajuste osmótico aumenta a tolerância ao DH (Vílchez et al., 2018). Os solutos compatíveis são divididos em quatro grupos, os açúcares; os aminoácidos como a prolina; os compostos iônicos, incluindo amônio terciário e quaternário (glicina-betaína); e polióis e álcoois de açúcar (manitol, pinitol, glicerol) (Hossain et al., 2016). A síntese e o acúmulo de solutos compatíveis têm sido demonstrados como importantes agentes na proteção contra os possíveis danos gerados pelo DH (Chaves-Filho & Stacciarini-Seraphin, 2001).

O aminoácido prolina é um soluto osmoticamente ativo que é sintetizado em maior quantidade quando se tem decréscimo no potencial osmótico e do potencial de água, pois auxilia na manutenção da absorção de água, no turgor celular e na manutenção da osmorregulação, possibilitando uma rápida recuperação do estresse oxidativo (Nepomuceno et al., 2001; Sofo et al., 2004; Jatav et al., 2012; Ahmad et al., 2015; Per et al., 2017). Vários estudos mostraram a ação da prolina em mudas sob DH, como de Alwhibi et al. (2017), em que observaram que o estresse hídrico causou acúmulo de prolina em

tomateiros. E estudo de Robakowski et al. (2020) que mostrou aumento no conteúdo de prolina em angiospermas quando submetidas ao DH.

O DH também afeta diretamente o metabolismo fotossintético e o equilíbrio de carbono (C), levando a alterações como a redução da condutância estomática ( $g_s$ ), da transpiração ( $E$ ) e da taxa fotossintética líquida (Melo et al., 2007). A redução da taxa fotossintética líquida está relacionada com a redução da  $g_s$ , pois a absorção de  $CO_2$  ocorre através dos estômatos, associada à perda de água pela transpiração (Wall et al., 2001; Ainsworth e Long, 2005; Ainsworth e Rogers, 2007; Ziska, 2012), assim, a redução do potencial de água da planta pode gerar respostas de tolerância, como aumento da síntese de ácido abscísico (ABA), que por sua vez estimula o fechamento estomático (Hossain et al. 2016). O fechamento estomático auxilia, então, na diminuição da perda de água das plantas por transpiração, porém ao mesmo tempo que auxilia na economia de água gera redução no influxo de  $CO_2$  para o mesofilo, reduzindo, conseqüentemente, a quantidade de carbono disponível para a síntese de gliceraldeído-3-fosfato, afetando negativamente a atividade carboxilase da enzima Ribulose 1-5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (Taiz et al. 2017).

A redução no influxo de  $CO_2$  pode ocasionar na menor razão  $CO_2:O_2$ , aumentando a atividade oxigenase da Rubisco (fotorrespiração), pois esta enzima reage com ambos, ocasionando perda parcial do carbono fixado pelo ciclo de Calvin-Benson, e como consequência diminuição na síntese de carboidratos, afetando negativamente o crescimento das plantas (Nogués e Baker 2000; Lawson and Vialet-Chabrand 2019). A fotorrespiração pode atuar como dreno para equivalentes redutores, como o NADPH, proveniente da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (Das e Roychoudhury 2014). Porém, mesmo que a fotorrespiração seja um mecanismo importante para o dreno de equivalentes redutores, o acúmulo de NADPH, ocasionado pelo DH, leva à síntese e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas a partir de reações redox (Triantaphylidès e Havaux, 2009; Barbosa et al., 2014). Neste processo, o  $O_2$  pode receber elétrons ou energia de excitação elétrica, de modo que são formados oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Triantaphylidès & Havaux, 2009). De acordo com a toxicidade das EROs, as espécies vegetais necessitam de mecanismos de desintoxicação adequados, como componentes antioxidantes, que proporcionem a rápida remoção desses componentes evitando possíveis danos aos sistemas biológicos das plantas (Ruíz-Sánchez et al., 2011). Assim as plantas possuem mecanismos para manter a homeostase das EROs e proteger as células

contra este dano. Esses mecanismos consistem em duas rotas metabólicas antioxidantes: enzimática e não-enzimática (Das and Roychoudhury, 2014).

A rota enzimática é composta pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Ascorbato peroxidase (APX), Catalase (CAT), entre outras (Barbosa et al., 2014; Gill e Tuteja, 2010; Das e Roychoudhury, 2014). A via bioquímica não-enzimática compreende compostos como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides (Das e Roychoudhury, 2014), polifenóis, alcaloides e alguns aminoácidos como a prolina (Gómez-Caravaca et al., 2014). Ambas as rotas atuam em coordenação para eliminar o excesso de EROs das células vegetais, protegendo os lipídeos e outros componentes da membrana dos cloroplastos (Triantaphylidès e Havaux, 2009; Das e Roychoudhury, 2014; Hasanuzzaman et al., 2018).

Alterações no metabolismo do N também ocorrem devido aos eventos de seca, provocando limitação do aporte e transporte de N das raízes para as folhas, pois os compostos nitrogenados inorgânicos, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), necessitam de água para solubilizar e para serem transportados até a superfície das raízes (Wang et al., 2017). Além disso, o DH causa inibição da atividade das enzimas de assimilação do N, como nitrato redutase (NR), nitrito redutase (NiR), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (Xu e Zhou, 2006; Chaves et al., 2009). Estas enzimas são importantes, pois o  $\text{NO}_3^-$  absorvido pelas raízes é reduzido à nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por uma reação catalisada pela enzima NR, o qual é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela NiR. O nitrogênio do  $\text{NH}_4^+$  então é incorporado a moléculas orgânicas, como o glutamato, que é o precursor dos aminoácidos em reações catalisadas pela GS e GOGAT (Wang et al., 2017).

A rota de absorção e assimilação de N é essencial para os processos metabólicos das plantas devido ao N integrar com o metabolismo do C durante a síntese de aminoácidos e de constituir moléculas como ácidos nucleicos e proteínas (Foyer et al., 1998) que podem participar como enzimas nos processos metabólicos das plantas, tendo assim um papel funcional e estrutural (Heldt & Piechulla, 2005; Pallardy, 2008). Assim, a diminuição no aporte de N, causado pelo DH, está diretamente relacionado a mudanças em diversas vias metabólicas, como também, no crescimento e desenvolvimento vegetal (Das et al., 2017).

A condição de seca pode provocar, também, alterações na quantidade e tipo de proteínas, devido a mudanças na expressão gênica, podendo ocasionar aumento na síntese de enzimas e proteínas relacionadas com proteção osmótica, com a detoxificação das EROs e com os processos metabólicos (Hildebrandt et al., 2015). E também, a quantidade de aminoácidos pode ser aumentada através da quebra de proteínas, uma vez que a degradação dos aminoácidos pode fornecer aumento do ajuste osmótico e conexão energética entre o metabolismo do C e do N, que fornecem a energia necessária em certos

órgãos permitindo que as plantas lidem com as condições de estresse (Hildebrandt et al., 2015). Dessa forma, o aumento da quantidade de alguns aminoácidos é considerado um traço de tolerância à seca por meio do aprimoramento do ajuste osmótico e do metabolismo antioxidante (Khan et al., 2018).

### 2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

Diante das consequências negativas que o DH pode acarretar nas plantas, uma estratégia possível e que auxilia na obtenção de mudas de espécies arbóreas de maior qualidade é a inoculação com Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (BPCP). As BPCP correspondem a um grupo de microrganismos benéficos com capacidade de colonizar o rizoplane (superfície absorvente da raiz), a rizosfera (solo do entorno imediato da raiz) e até mesmo os tecidos internos da planta, onde disponibilizam nutrientes essenciais ou facilitam o seu acesso pela planta, como também conferem maior tolerância das plantas contra estresses bióticos e abióticos (Hungria et al. 2010). Apesar de possuírem potencial para minimizar os efeitos da degradação ambiental, por sua aplicação em programas de fitorremediação e de restauração de áreas degradadas, poucos estudos envolvendo a utilização de BPCP em espécies arbóreas nativas no Brasil são disponíveis na literatura (De-Bashan et al., 2012).

A identificação de microrganismos com potencial aplicação biotecnológica e sua utilização como insumo para a produção de mudas florestais pode contribuir significativamente para a melhoria da atividade de restauração florestal, uma vez que deve proporcionar a obtenção de plantas melhor nutridas, mais resistentes a doenças e estresses, e melhor aclimatadas a condições ambientais desfavoráveis (Armada et al. 2018). Os efeitos promotores de crescimento das BPCP podem ser atribuídos ao fornecimento direto de nutrientes essenciais como o N, proveniente da sua fixação biológica; e disponibilização de minerais como o fósforo, auxiliando na manutenção de nutrição adequada, sobrevivência e crescimento das plantas (Khan et al., 2016; Khan et al., 2018).

A ação das BPCP pode estar relacionada, ainda, com as vias bioquímicas do metabolismo fotossintético. Isto foi observado por Tiepo et al (2018), em que as espécies *Trema micranta* (L.) Blume e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, associadas a bactérias, apresentaram manutenção da eficiência de carboxilação em mudas submetidas ao DH. Os autores discutiram que esta resposta pode ter ocorrido devido à influência positiva das BPCP na atividade da Rubisco (Tiepo et al. 2018) e possivelmente a outras enzimas presentes na assimilação de CO<sub>2</sub>, no ciclo de Calvin.

As BPCP também podem modular os níveis hormonais das plantas pela produção de hormônios que estimulam o crescimento vegetal, podendo auxiliar no aumento da tolerância da planta a estresses abióticos e bióticos (Lugtenberg et al., 2009 e Bashan e de-Bashan, 2010). Essas bactérias podem induzir, então, a produção do ácido indol acético (AIA), uma auxina que induz o crescimento das raízes, estimula o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiciais, estimulando a absorção de nutrientes do solo (Luo et al., 2018). Estudos como o de Yahalom et al. (1990) mostraram efeitos benéficos da inoculação com BPCP em leguminosas, auxiliando na fixação biológica de nitrogênio e na morfologia da raiz e do nódulo. Bothe et al. (1992) demonstraram que a inoculação de plantas de trigo com *Azospirillum brasilense* aumentou significativamente a formação de raízes laterais e aumentou ligeiramente o peso seco das raízes e a formação de pelos da raiz, enquanto a aplicação exógena de AIA aumentou significativamente o peso seco da raiz, mas não teve efeito na formação das raízes laterais. Loper e Schroth (1986) viram que as BPCP produziram AIA e observaram também uma correlação positiva entre a produção de auxina e a promoção do crescimento quando inoculadas com BPCP nas espécies *Brassica juncea* (L.) Czern e trigo.

As BPCP também induzem aumento nos níveis de giberelina, que por sua vez auxilia no crescimento vegetal através da indução do crescimento da parte aérea (Probanza et al., 2002). Estudo de Kang et al. (2014) mostrou que a inoculação com BPCP em mudas de pepino e arroz aumentou a quantidade de giberelina na parte aérea resultando no aumento do crescimento.

Já as citocininas estimulam a divisão celular vegetal, a diferenciação vascular e induzem a proliferação de pelos radiciais, porém podem inibir a formação de raízes laterais e o alongamento das raízes (Aloni et al., 2006). Estudo de Grosskinsky et al. (2016) mostrou que o aumento da citocinina, devido à inoculação com BPCP, promoveu resistência das plantas a doenças, pois este aumento melhorou a resistência de mudas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh à infecção com *Pseudomonas syringae* (Grosskinsky et al., 2016). Estudo de López-Bucio et al. (2007) observou que a inoculação com BPCP promoveu aumento na produção de biomassa de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh e plantas de feijão *in vitro* e no solo. Esse efeito foi então relacionado à arquitetura alterada do sistema radicial em plantas inoculadas, com inibição no crescimento da raiz primária seguida por um aumento na formação de raiz lateral e comprimento dos pelos da raiz (Ortiz-Castro et al., 2009).

O etileno é outro hormônio pelo qual as BPCP regulam o crescimento vegetal, sendo que a diminuição deste aumenta o crescimento das plantas (Glick et al., 2007) uma vez que causa efeito adverso no crescimento das plantas, particularmente no alongamento da raiz

(Belimov et al., 2002). Porém a concentração de etileno em condições estressantes, como o DH, é aumentada, devido ao aumento da produção de ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), um precursor imediato da rota de biossíntese do etileno (Glick et al., 2007) que pode ser regulado pelas BPCP. Estudo de Mayak et al. (2004) relataram que ACC desaminase em plantas inoculadas com BPCP aumentou significativamente a massa fresca e seca de mudas de tomate e pimenta expostas a estresse hídrico transitório. Além disso, o estudo de Dodd et al. (2004) mostrou que as bactérias reduziram a produção de etileno em mudas de tomate expostas ao estresse hídrico e que a longo prazo, auxiliou no maior rendimento de sementes, número de sementes e acúmulo de nitrogênio nas sementes.

Além disso, plantas arbóreas submetidas ao DH e inoculadas com diferentes espécies de BPCP apresentaram estratégias que indicam uma maior tolerância à seca, incluindo maior eficiência no uso da água, alterações no conteúdo de solutos compatíveis, maior proteção a danos oxidativos e um maior desenvolvimento do sistema de raízes e da parte aérea (Tiepo et al., 2020).

Como mencionado, o DH causa aumento na síntese de EROs, porém a associação das plantas com as BPCP pode gerar proteção contra o dano oxidativo que estas EROs podem causar (Khan et al., 2018). Isto ocorre, porque estas bactérias aumentam a atividade de enzimas antioxidantes como CAT, SOD e APX (Fukami et al., 2018) neutralizando os radicais livres e EROs. Deste modo, as bactérias aumentam a tolerância das plantas ao DH ao diminuir o estresse oxidativo e possíveis danos em membranas (Kohler et al., 2008).

Estudos realizados por de Souza et al. (2020) mostraram que a inoculação com BPCP, ainda em viveiro, auxilia na germinação de sementes, no vigor das plântulas e na diminuição do tempo de germinação. Além disso, estas bactérias auxiliaram na maior ativação da enzima Fenilalanina amônia-liase que atua na regulação da síntese de compostos envolvidos em funções essenciais, como a produção de lignina e pigmentos, e na diminuição de estresses bióticos e abióticos (MacDonald e D'Cunha 2007; Pourcel et al. 2007). Assim como da enzima Polifenol oxidase que atua nas vias de sinalização envolvidas na expressão de mecanismos envolvidos na modulação das reações de defesa da planta e resposta aos estresses ambientais (Mayer, 2006). Conseqüentemente, as BPCP, podem auxiliar na eficiência e qualidade da produção de mudas, conferindo melhora na defesa das plantas aos danos causados pelo DH (de Souza et al., 2020).

A associação com BPCP também afeta positivamente o metabolismo de N de plantas submetidas ao DH, levando ao acúmulo de aminoácidos livres, como a prolina, atuando no ajuste osmótico e tolerância à seca (GagnéBourque et al., 2016; Tiepo et al., 2018; Vílchez

et al., 2018). Essas bactérias também favoreceram o aporte de N nas plantas quando submetidas à limitação de N, beneficiando mudas sob situações estressantes (Calzavara et al., 2016). Indiretamente, as BPCP podem estimular o crescimento das plantas pelo controle biológico de fitopatógenos por compostos antimicrobianos, sideróforos e por enzimas líticas (Glick et al., 2012).

As BPCP apresentam, ainda, a capacidade de induzir a produção de moléculas sinalizadoras, como o óxido nítrico (NO), que é uma espécie reativa de N que atua na modulação de diferentes processos metabólicos e fisiológicos, resultando em alterações no desenvolvimento e crescimento das plantas, induzindo a expressão de mecanismos de defesa e favorecendo a aclimatação de plantas sob estresses abióticos (DH e elevadas intensidades luminosas) e bióticos (Molina-Favero et al., 2007; Nabi et al., 2019). Em situação de DH, o NO, seja endógeno ou exógeno, é capaz de atuar como antioxidante, pela remoção de ERO e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Narendra e Sopory, 2008; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2017); na síntese de hormônios vegetais (Freschi, 2013; Prakash et al., 2019); no crescimento das plantas (Oliveira et al., 2016; Gadelha et al., 2017) e no aumento do conteúdo relativo de água (Gan et al., 2015; Silveira et al., 2016).

Essa atuação positiva do NO foi observado por Hertel (2020) com doadores de NO aplicados exogenamente associados à BPCP em mudas de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. submetidas ao DH. Essas plantas apresentaram maior  $C_i/C_a$ , diminuição na peroxidação lipídica e maior razão raiz/parte aérea. Hertel (2020) observou, também, melhora nos parâmetros fotossintéticos através da maior  $E$ , maior  $k$  e aumento na  $EUA_{int}$  em mudas de *Heliocarpus popayanensis* Kunth tratados com NO e BPCP, além de aumento no conteúdo relativo de água e aumento na massa seca das folhas, confirmando maior crescimento e desenvolvimento de plantas quando tratadas com NO (Hertel, 2020).

A inoculação de BPCP em espécies arbóreas nativas pode favorecer a ativação de respostas bioquímicas e metabólicas nas plantas, devido a inúmeros benefícios que estas fornecem. Deste modo, as plantas inoculadas podem ter maior tolerância a estresses como o DH e, portanto, podem ter maior chance de sobrevivência gerando mudas de melhor qualidade, que por sua vez provocam diminuição nos custos de programas de restauração ativa devido à diminuição na necessidade de replantio (Creus et al., 2005; Khan et al., 2018).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina sob condições ambientais de temperatura e luminosidade. Para a montagem do experimento foram utilizados inóculos de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Bacillus velezensis* (ZK), obtidos da Coleção de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (CBPCV-UEL).

Foram utilizadas duas espécies arbóreas neotropicais nativas da Mata Atlântica, *Heliocarpus popayanensis* Kunth, conhecida popularmente como Jangadeiro, intolerante à sombra e encontrada nos estágios iniciais da sucessão (pioneira); e *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., conhecida popularmente como Canjarana, tolerante à sombra e encontrada nos estágios tardios da sucessão (não pioneira). Mudanças de ambas as espécies foram produzidas a partir de sementes coletadas em regiões de fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual sendo utilizadas em programas de restauração de áreas degradadas.

Os inoculantes bacterianos foram preparados a partir de cultura pura das duas estirpes: ZK foi caracterizada como BPCP por Goes et al. (2012) e Ab-V5 (diazotrófica) registrada no Ministério da Agricultura para uso em inoculantes comerciais (Hungria et al., 2010); ambas identificadas e caracterizadas para uso como biofertilizantes apresentando alto potencial como promotoras do crescimento. Colônias isoladas destas estirpes foram cultivadas em meio líquido Dygs e transferidas para meio de cultivo líquido específico para o preparo de inoculantes bacterianos, desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da Universidade Estadual de Londrina. Os isolados foram cultivados em agitadores orbitais a 180 rpm a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Após este período, os cultivos foram interrompidos e a concentração de células foi estimada por absorbância ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ), sendo realizada contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para a normalização da concentração de células nos inoculantes para cerca de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Sementes de *Heliocarpus popayanensis* e *Cabralea canjerana* foram semeadas em bandejas plásticas de 1 L contendo areia previamente esterilizada, sendo que cada bandeja foi tratada por meio da aplicação de um inóculo, ZK e Ab-V5, correspondente a 20% do volume de substrato na concentração de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  e a bandeja N In foi regada apenas com água. Após a expansão do primeiro par de folhas, ocorreu a transferência das plântulas, para sacos de 2 L (15 cm de altura e 13 cm de diâmetro) contendo areia

previamente esterilizada e solo argiloso (1:1). No momento do transplântio, foram adicionados 30 mL de solução com os inóculos em cada saco contendo o solo e a planta. As mudas permaneceram em casa de vegetação até o desenvolvimento de três pares de folhas totalmente expandidas. Durante o período de crescimento, os sacos das plântulas foram regados com solução nutritiva de Hoagland uma vez ao mês.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com os seguintes tratamentos: 1) não inoculado (N In) 2) com o inóculo da estirpe bacteriana ZK, e 3) com o inóculo da estirpe bacteriana Ab-V5. Após o crescimento, 45 plantas (N In, inoculadas com ZK e inoculadas com Ab-V5) foram mantidas em capacidade de campo (CC, 27% unidade gravimétrica (UG)). O segundo grupo, também com 45 plantas (N In e inoculadas com ZK e Ab-V5), foram mantidos sob DH moderado (DH, 16% UG), totalizando-se seis tratamentos com 15 plantas em cada. As mudas foram mantidas por 3 semanas em condição de DH e, quando necessário, foram feitas regas limitadas de acordo com o grau de murcha das folhas e de acordo com a textura do solo, a fim de evitar o dessecação.

O experimento com a espécie *C. canjerana* ocorreu de março a abril de 2018 e com a espécie *H. popayanensis* ocorreu de maio a junho de 2018. Segundo dados do IAPAR (2018) a temperatura, mínima/máxima, foi de 20,8°C/28°C em março; 17,5°C/28,5°C em abril; 16,6°C/28°C em maio; e 14,8°C/21,3°C em junho.

### 3.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

Para análise de potencial de água ( $\Psi_w$ , MPa), realizado no período da manhã, foram coletadas parte aérea das plantas e colocadas em uma câmara de pressão do tipo Scholander (Scholander et al., 1965). 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 da 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.

Foram mensuradas a assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{max}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e transpiração ( $E$ ). Essas análises de trocas gasosas foram realizadas no período da manhã entre 8 horas e 10 horas, utilizando-se um analisador portátil de gás infravermelho (Irga) (Li-Cor, modelo LI 6400 XT, Biosciences, Lincoln, NE, USA) conectado a uma câmara de 6 cm<sup>2</sup>. A densidade do fluxo de fótons (DFF) ideal para as análises foi de 1.900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e o fluxo de 400  $\text{mol min}^{-1}$ . Foram calculadas a

eficiência do uso da água ( $EUA$ ):  $A_{max}/E$   $\mu\text{mol mmol}^{-1}$  e a eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ):  $A_{max}/g_s$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ .

A 3ª ou 4ª folha do ápice para a base completamente expandida de cada muda foi utilizada.

### 3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Foram coletados 100 mg de folhas para as análises de prolina. A metodologia da prolina foi descrita por Carillo e Gibón (2011), onde o tecido é macerado com  $N_2$  líquido, diluído em etanol 70% e os extratos incubados a  $96^\circ\text{C}$  com ninhidrina em meio ácido, e análise espectrofotométrica utilizando-se o leitor de microplacas (Molecular Devices, modelo Spectra Max Plus 384), a 520 nm.

Para extração de metabólitos relacionados ao metabolismo do N foram coletados 200 mg de folha e 200 mg de raízes. Estas amostras foram maceradas em  $N_2$  líquido e a extração de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e aminoácidos foi feita utilizando metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v:v:v, MCW) seguindo a metodologia de Oliveira e Sodek (2013). O  $\text{NO}_3^-$  foi determinado através da sua redução a  $\text{NO}_2^-$  usando cloreto de vanádio (0,4% em HCl 0,5 M). O  $\text{NH}_4^+$  foi quantificado pela leitura da absorbância a 625 nm após a reação de Berthelot (McCullough, 1967). E os aminoácidos totais livres foram determinadas espectrofotometricamente usando ninhidrina (Yemm e Cocking, 1955).

As proteínas foram extraídas do precipitado da extração com MCW utilizando tampão NaOH 0,1 M. A concentração de proteínas foi determinada espectrofotometricamente usando o reagente Bio-Rad Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976).

A atividade da NR foi determinada *in vivo* seguindo a metodologia de Stewart et al. (1986). Foram coletados 150 mg da primeira folha completamente expandida e 150 mg de raízes. Os tecidos coletados foram cortados em pequenos pedaços e colocados em uma seringa no intuito de infiltra-los a vácuo com 5 mL de solução tampão ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05 M, pH 7,5;  $\text{KNO}_3$  0,05 M, e 1% propanol). As amostras foram incubadas por 40 minutos no escuro a temperatura ambiente. O  $\text{NO}_2^-$  liberado foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm após reação com sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 0,02% de cloreto de N-naftil-etilenodiamina (NEED) em água.

### 3.4 BIOMETRIA

Foi avaliada a área foliar ( $\text{cm}^2$ ) utilizando-se de um integrador de área foliar portátil, modelo LI-3000 CAP acoplado à esteira LI-3050C (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA).

Para a determinação da massa seca da raiz (MSR) e massa seca da folha (MSF), os componentes das mudas foram separados, acondicionados em sacos de papel e secos em estufa à temperatura de 60°C por aproximadamente 72 horas até atingirem peso constante. Foram calculadas também a razão da massa da raiz pela massa da parte aérea (R/PA).

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

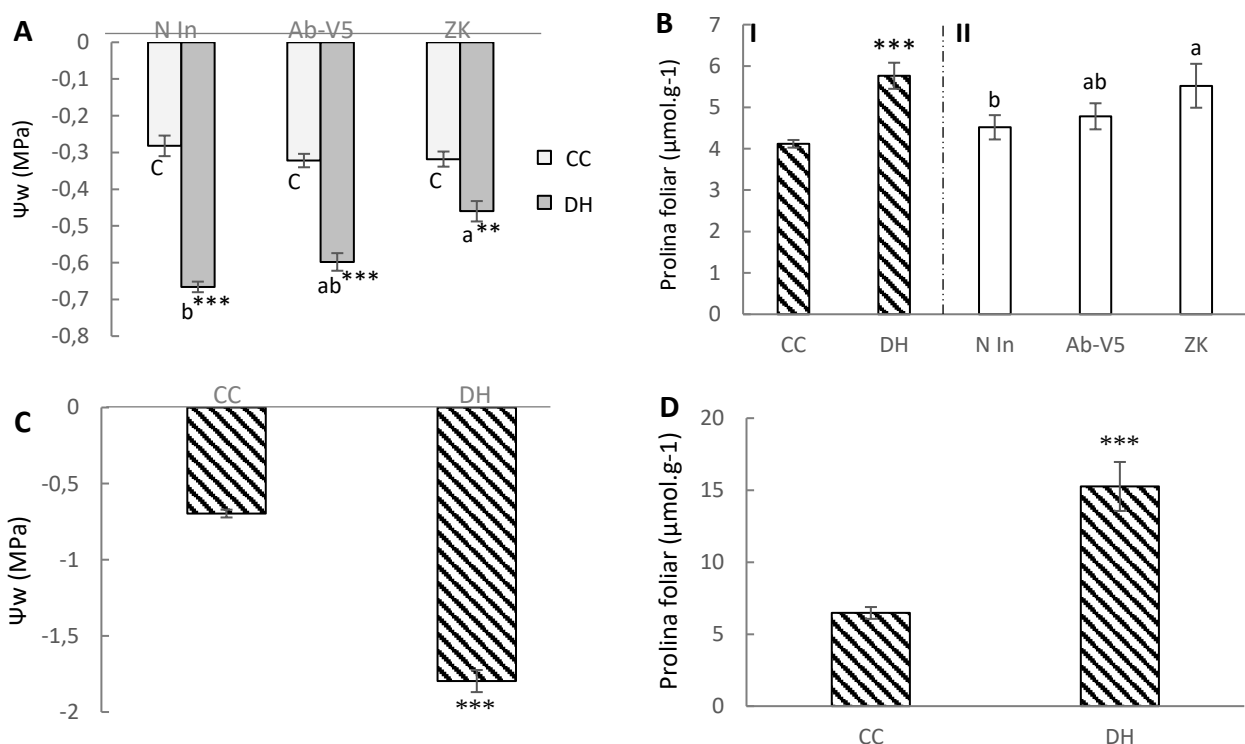
O experimento teve delineamento inteiramente ao acaso. O arranjo fatorial foi 2x3, sendo considerados os fatores umidade do solo (CC e DH) e inoculação (N In, ZK e Ab-V5).

Os dados foram submetidos a análises de normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors (normalidade) e de Hartley e Levene (homocedasticidade). Quando as variâncias foram consideradas homogêneas, foi realizado a ANOVA de dois fatores (2 × 3 fatorial), e, quando necessário, as médias foram comparadas usando o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Quando não atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos a transformação por meio de Log 10 e Raiz quadrada +0,5. Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica versão 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 POTENCIAL DE ÁGUA E CONTEÚDO DE PROLINA

A interação regime hídrico x inoculação afetou o potencial de água de *H. popayanensis*, com redução deste potencial em todos os tratamentos submetidos ao DH comparados com CC, mas foi observado menor redução nas plantas que foram inoculadas com ZK (Figura 1A). Para o conteúdo de prolina de *H. popayanensis* foram observados efeitos isolados para cada fator (Figura 1B-I e B-II), em que houve aumento no conteúdo de prolina em folhas de mudas submetidas ao DH quando comparadas às em CC (Figura 1B-I), e aumento no conteúdo de prolina quando as mudas foram inoculadas com ZK comparadas às N In (Figura 1B-II), independente da condição do solo que as mudas estavam expostas. Em *C. canjerana* cada fator afetou isoladamente o conteúdo de prolina e o potencial de água, com resultados iguais para os diferentes tratamentos de inoculação (Figura 1C e D), sendo que para o fator hídrico houve decréscimo no potencial de água quando as mudas foram submetidas ao DH (Figura 1C) e aumento no acúmulo de prolina em mudas submetidas ao DH comparadas às em CC (Figura 1D).



**Figura 1. A:** Potencial de água e Conteúdo de prolina em folhas de *Heliocarpus popayanensis* (A e B) e *Cabralea canjerana* (C e D) mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 12$ ,  $n = 15$  e  $n = 15$  respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ,  $n = 10$  e  $n = 10$  respectivamente). Nas colunas cinza claro e escuro, médias com letras

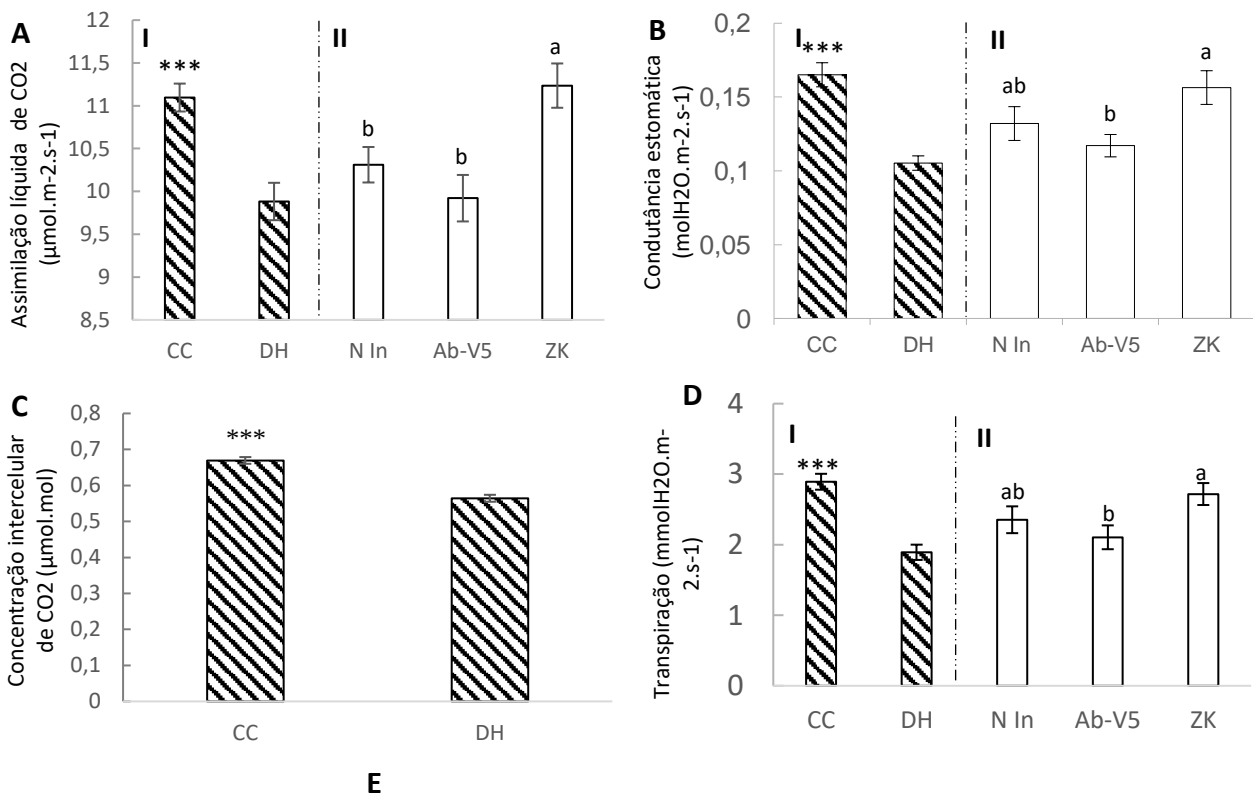
maiúsculas (CC) ou minúsculas (DH) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

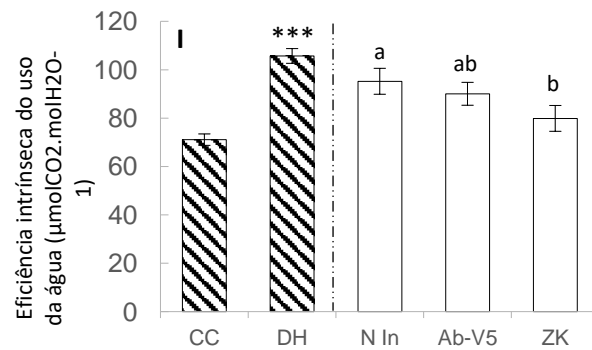
#### 4.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

O fator hídrico afetou negativamente as trocas gasosas, sendo que a  $A_{max}$ ,  $g_s$ ,  $C_i$  e  $E$  diminuíram em *H. popayanensis* e *C. canjerana* em mudas submetidas ao DH comparadas às mudas em CC (Figuras 2A-I, B-I, C e D-I e 3A-I, B, C e D). Quanto aos efeitos da inoculação, as mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK apresentaram maiores valores de  $A_{max}$  em relação às N In e as inoculadas com Ab-V5 (Figura 2A-II), enquanto mudas de *C. canjerana* inoculadas com ZK apresentaram menores valores de  $A_{max}$  quando comparadas ao N In (Figura 3A-II). As mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK, independente do regime hídrico, apresentaram maior  $g_s$  e  $E$  quando comparadas as inoculadas com Ab-V5, porém não apresentaram diferença quando comparadas as N In (Figura 2B-II e 2D-II).

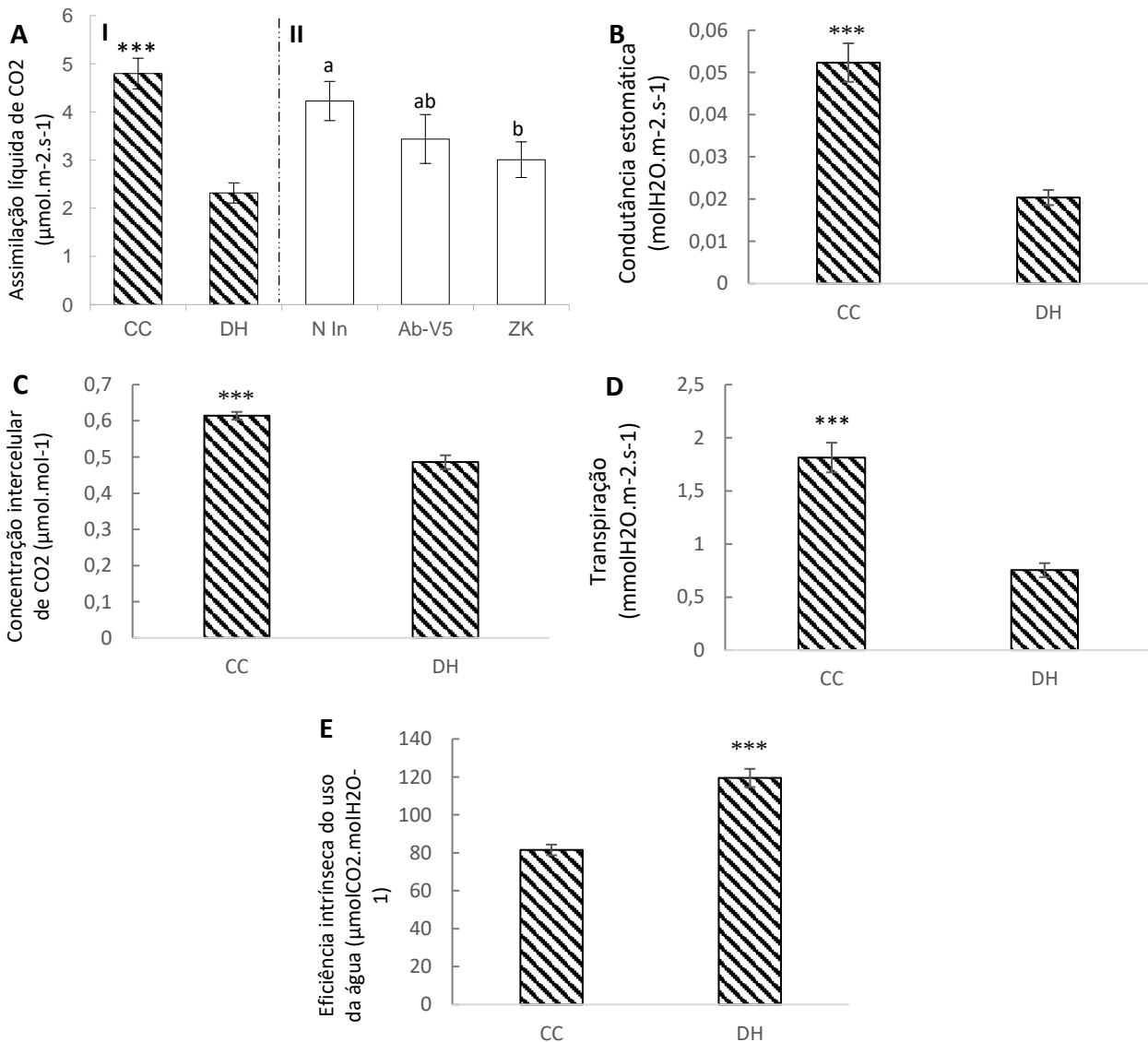
Em *H. popayanensis* a  $EUA_{int}$  apresentou efeito isolado para cada fator, sendo que houve aumento deste parâmetro em mudas submetidas ao DH em relação àquelas em CC (Figuras 2E-I). E apresentou diminuição em mudas inoculadas com ZK comparadas às N In (Figura 2E-II).

Em *C. canjerana* a  $EUA_{int}$  apresentou efeito apenas para o fator hídrico, sendo maior nas mudas submetidas ao DH em relação àquelas em CC (Figuras 2E-I e 3E).





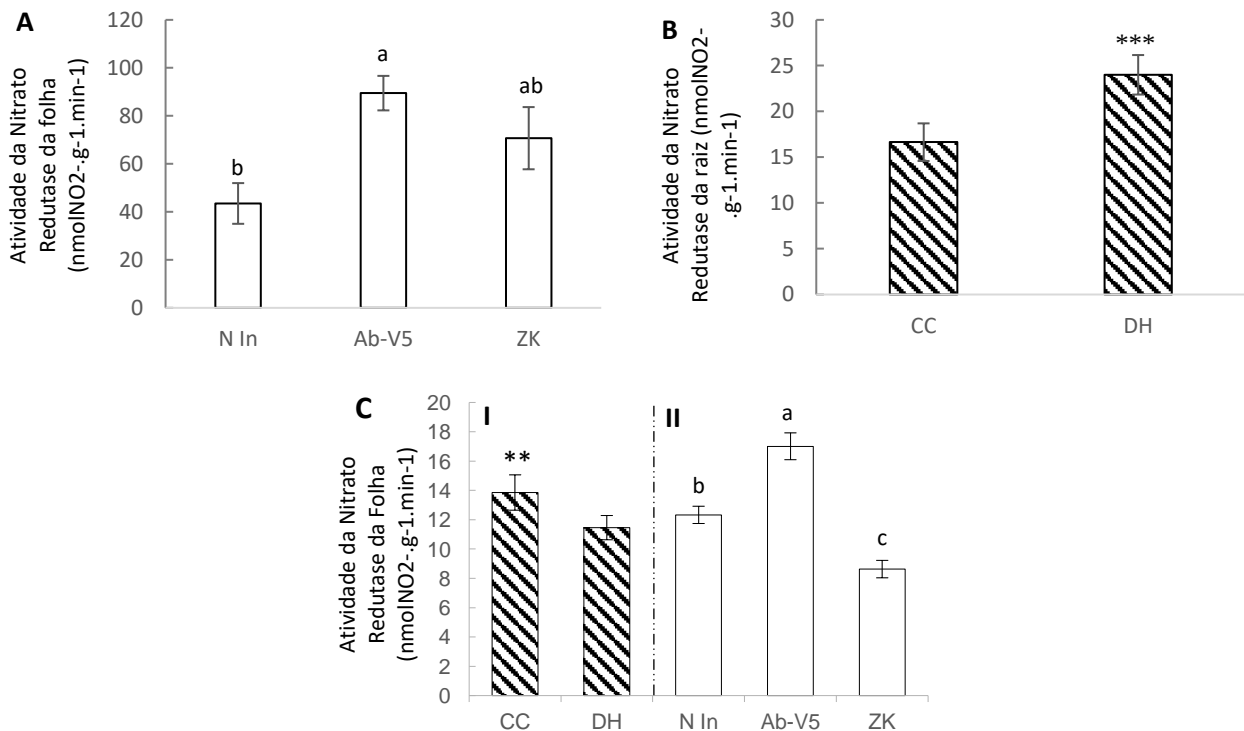
**Figura 2. A:** Assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_{max}$ ), **B:** Condutância estomática ( $g_s$ ), **C:** Concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), **D:** Transpiração ( $E$ ) e **E:** Eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ) em mudas de *Helicarpus popayanensis* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*\*)  $P < 0,001$ ;  $n = 24$  (**A**) e  $n = 27$  (**B-E**)). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 16$  (**A**) e  $n = 18$  (**B-E**)).



**Figura 3. A:** Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A_{max}$ ), **B:** Condutância estomática ( $g_s$ ), **C:** Concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), **D:** Transpiração ( $E$ ) e **E:** Eficiência intrínseca do uso da água ( $EUA_{int}$ ) em mudas de *Cabralea canjerana* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 27$ ). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 18$ ).

#### 4.3 ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE

A atividade da NR em folhas de *H. popayanensis* e *C. canjerana*, e em raízes de *H. popayanensis* apresentaram efeitos isolados para cada fator (Figura 4A, B e C). A atividade da NR em folhas de *H. popayanensis* foi igual entre as mudas em CC e em DH, porém houve aumento na atividade dessa enzima quando as mudas foram inoculadas com Ab-V5, comparadas às N In (Figura 4A). A atividade da NR em raízes de *H. popayanensis* aumentou em mudas submetidas ao DH comparadas às em CC, porém apresentou resultados iguais para os diferentes tratamentos de inoculação (Figura 4B). Já a atividade da NR em folhas de *C. canjerana* foi menor em mudas submetidas ao DH, comparadas às em CC (Figura 4C-I), mas houve aumento quando inoculadas com Ab-V5 comparadas às N In e as inoculadas com ZK, sendo que as inoculadas com ZK foram menores, também, que as N In (Figura 4C-II). A atividade da NR em raízes de *C. canjerana*, não apresentou diferença entre os diferentes regimes hídricos e inoculações.



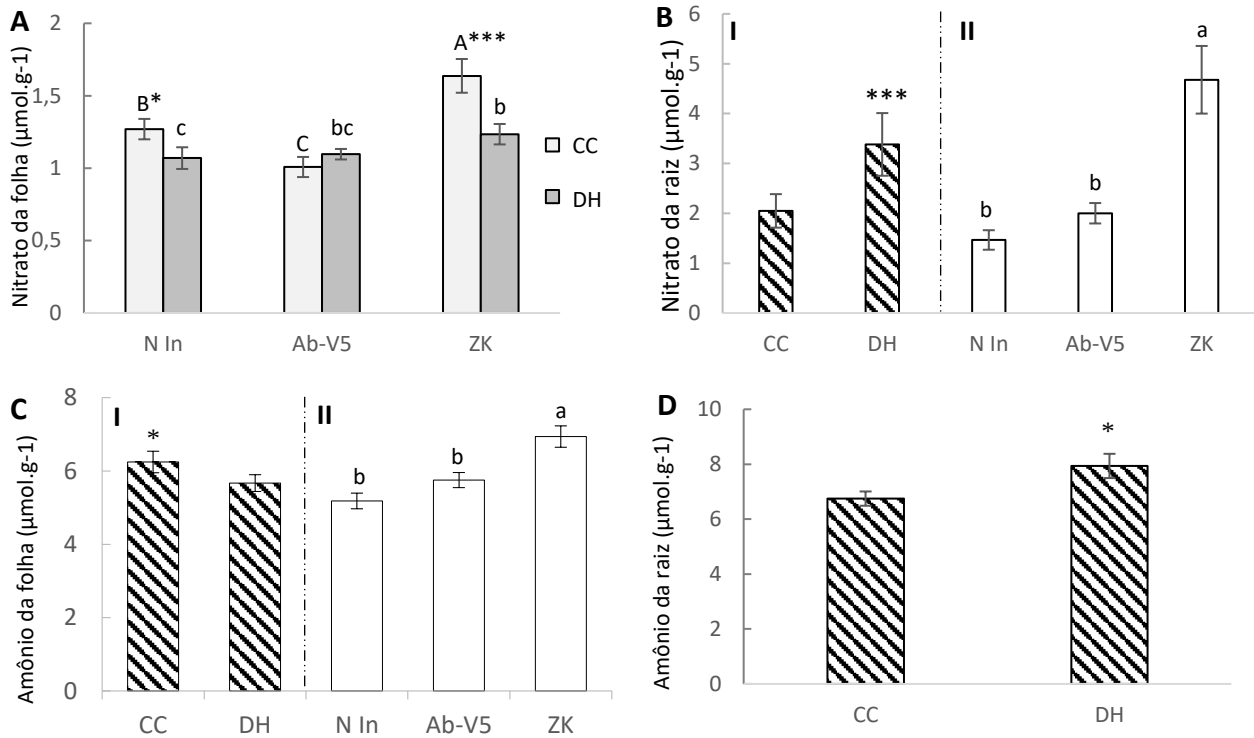
**Figura 4.** Atividade da Nitrato redutase em folhas e raízes de *Heliocarpus popayanensis* (A e B) e atividade da Nitrato redutase em folha de *Cabralea canjerana* (C) mantidas em CC ou submetidas

ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 12 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 8 e n = 10 respectivamente).

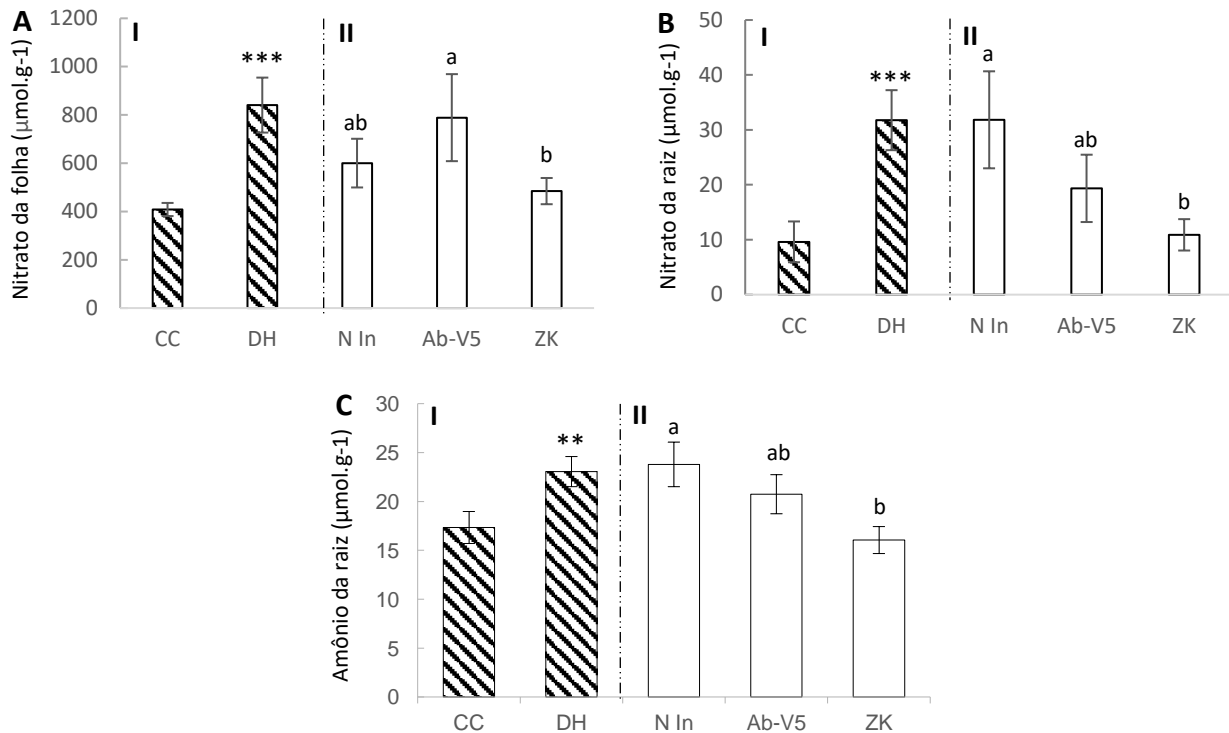
#### 4.4 NITRATO E AMÔNIO

A interação regime hídrico x inoculação afetou o acúmulo  $\text{NO}_3^-$  foliar nas mudas de *H. popayanensis*, com redução deste composto nas mudas N In e inoculadas com ZK quando submetidas ao DH, comparados com CC (Figura 5A), e houve aumento neste parâmetro em mudas inoculadas com ZK comparadas as N In e inoculadas com Ab-V5 em CC e aumento deste em mudas inoculadas com ZK, comparadas as N In em DH (Figura 5A). Para o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas e raízes de *H. popayanensis*, foram observados efeitos isolados para cada fator (Figura 5B, C e D), sendo que o  $\text{NH}_4^+$  nas raízes apresentou resultados iguais para os diferentes tratamentos de inoculação (Figura 5D). O conteúdo foliar de  $\text{NO}_3^-$  aumentou nas mudas de *H. popayanensis* quando submetidos ao DH, comparadas às mantidas em CC (Figura 5B-I), e aumentou quando inoculadas com ZK, comparadas às N In e as inoculadas com Ab-V5 (Figura 5B-II). O acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  nas folhas diminuiu quando as mudas foram submetidas ao DH, comparadas às em CC (Figura 5C-I), mas aumentou quando as mudas foram inoculadas com ZK quando comparadas às N In e às inoculadas com Ab-V5 (Figura 5C-II). Já o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes de *H. popayanensis* aumentou quando submetido ao DH (Figura 5D).

Em *C. canjerana* o conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  em folhas e raízes e o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes apresentaram efeitos isolados para o fator hídrico e o fator de inoculação (Figura 6A, B e C). O fator hídrico apresentou aumento de  $\text{NO}_3^-$  em folhas e raízes em mudas submetidas ao DH, comparados às mantidas em CC (Figura 6A-I e B-I). Quanto aos efeitos de inoculação, houve diminuição de  $\text{NO}_3^-$  em folhas quando inoculadas com ZK, comparadas às inoculadas com Ab-V5 (Figura 6A-II) e houve diminuição do  $\text{NO}_3^-$  em raiz quando inoculadas com ZK comparadas às N In (Figura 6B-II). Já o  $\text{NH}_4^+$  da raiz apresentou aumento, quando submetido ao DH, comparados aos em CC (Figura 6C-I), e diminuição quando inoculadas com ZK, comparado aos N In (Figura 6C-II). O  $\text{NH}_4^+$  foliar de *C. canjerana*, não apresentou diferença entre os diferentes regimes hídricos e inoculações.



**Figura 5. A:** Conteúdo de Nitrato foliar; **B:** Conteúdo de Nitrato da Raiz, **C:** Conteúdo de Amônio foliar e **D:** Conteúdo de Amônio da raiz em mudas de *Helioarpus popyaneneis* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (teste F; \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 12$ ,  $n = 15$  e  $n = 15$  respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$  e  $n = 10$  respectivamente). Nas colunas cinza claro e escuro, médias com letras maiúsculas (CC) ou minúsculas (DH) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ).

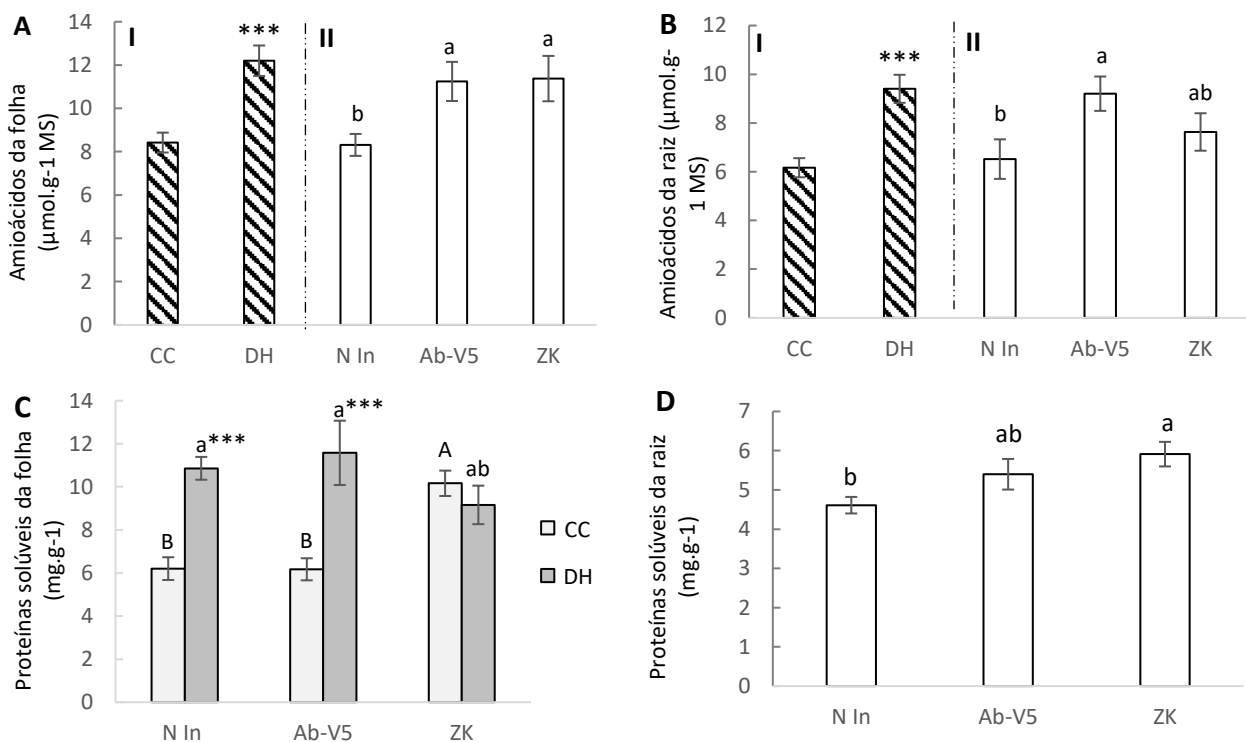


**Figura 6. A:** Conteúdo de Nitrato foliar, **B:** Conteúdo de Nitrato da Raiz e **C:** Conteúdo de Amônio da raiz em mudas de *Cabralea canjerana* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; n = 12, n = 15 e n = 15 respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD; P < 0,05; n = 8, n = 10 e n = 10 respectivamente).

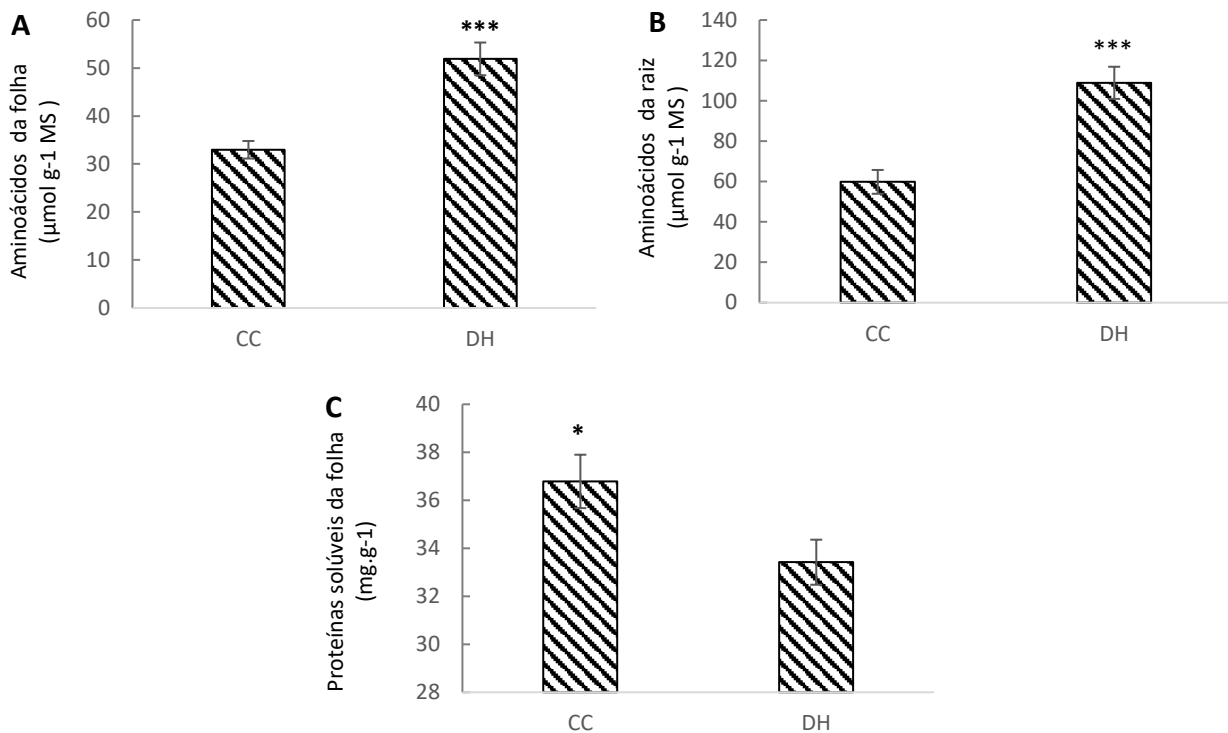
#### 4.5 AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

A interação regime hídrico x inoculação afetou o conteúdo de proteínas foliares das mudas de *H. popayanensis*, com aumento neste parâmetro em mudas N In e inoculadas com Ab-V5, quando submetidas ao DH, comparadas às em CC (Figura 7C). Para o conteúdo de aminoácidos foliares e da raiz nas mudas de *H. popayanensis* foi observado efeitos isolados para cada fator (Figura 7A e B), onde houve aumento no conteúdo de aminoácidos em folhas e raízes de mudas submetidas ao DH quando comparadas às em CC (Figura 7A-I e B-I). O conteúdo de aminoácidos foliares também foi maior quando as mudas foram inoculadas com Ab-V5 e ZK comparadas às N In (Figura 1A-II), independente da condição do solo que as mudas estavam expostas. E o conteúdo de aminoácidos na raiz aumentou em mudas inoculadas com Ab-V5, comparadas às N In (Figura 7B-II). Sobre o conteúdo de proteínas da raiz em *H. popayanensis* foi observado efeitos isolados para cada fator, onde apresentaram aumento neste parâmetro quando inoculadas com ZK, comparadas às N In, e apresentaram resultados iguais para os diferentes tipos de regime hídrico (Figura 7D).

Em *C. canjerana* o acúmulo de aminoácidos na folha e raiz e o acúmulo de proteínas da folha apresentaram efeitos isolados para cada fator, com resultados iguais para os diferentes tratamentos de inoculação (Figura 8A, B e C). O aumento no acúmulo de aminoácidos totais foi observado nas folhas e raízes quando submetidas ao DH em relação às mudas em CC (Figura 8A e B). Já o acúmulo de proteínas foliares nas mudas de *C. canjerana* foi menor quando submetidas ao DH (Figura 8C). O acúmulo de proteínas da raiz de *C. canjerana*, não apresentou diferença entre os diferentes regimes hídricos e inoculações.



**Figura 7. A:** Conteúdo de Aminoácido foliar, **B:** Conteúdo de Aminoácidos da Raiz, **C:** Proteínas totais foliares e **D:** Proteínas totais de raiz em mudas de *Helicarpus popayanensis* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 15$ ,  $n = 12$  e  $n = 15$  respectivamente). Nas colunas brancas, médias com letras iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 10$ ,  $n = 8$  e  $n = 10$  respectivamente). Nas colunas cinza claro e escuro, médias com letras maiúsculas (CC) ou minúsculas (DH) iguais não diferem significativamente entre os tratamentos de inoculação, e asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH dentro de cada tratamento de inoculação (Tukey HSD;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ).



**Figura 8. A:** Conteúdo de Aminoácido foliar, **B:** Conteúdo de Aminoácidos da Raiz e **C:** Proteínas totais foliares em mudas de *Cabralea canjerana* mantidas em CC ou submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com Ab-V5 ou ZK. As barras são médias  $\pm$  erros-padrão. Nas colunas listradas, asteriscos indicam diferença significativa entre as mudas em CC e DH, de acordo com a ANOVA (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 12$ ,  $n = 15$  e  $n = 15$  respectivamente).

#### 4.6 BIOMETRIA

Em *H. popayanensis*, a massa seca da raiz (MSR) em mudas N In e inoculadas com Ab-V5 foram menores quando submetidas ao DH em relação às em CC. Já as inoculadas com ZK apresentaram manutenção do parâmetro quando submetidas ao DH e aumento deste parâmetro quando comparadas às N In em DH (Tabela 1). Em *C. canjerana*, a MSR foi menor em mudas submetidas ao DH comparadas às em CC (Tabela 1). A massa seca da folha (MSF) em *H. popayanensis* e *C. canjerana* foi menor nas mudas submetidas ao DH comparadas às em CC (Tabela 1). Mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK apresentaram menor MSF comparadas às N In, tanto na CC quanto em DH, comparadas as N In.

A área foliar (AF) em mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* foi menor nas mudas submetidas ao DH, comparadas às em CC (Tabela 1), enquanto mudas de *H. popayanensis* inoculadas com ZK apresentaram menores valores de AF comparadas às N In, tanto em CC quanto em DH (Tabela 1). A razão raiz/parte aérea (R/PA) em *H. popayanensis* foi maior em mudas submetidas ao DH, comparadas às em CC, sendo que plantas inoculadas com ZK apresentaram maiores valores de R/PA comparadas às N In e inoculadas com Ab-V5, e

plantas inoculadas com Ab-V5 apresentaram maiores valores de R/PA quando comparadas as N In (Tabela 1).

**Tabela 1.** Massa seca da raiz (MSR), Massa seca da folha (MSF), Área foliar (AF) e Razão Raiz/Parte Aérea (R/PA) em mudas de *Heliocarpus popayanensis* e *Cabrlea canjerana* mantidas em CC e submetidas ao DH, não inoculadas (N In) ou inoculadas com ZK e Ab-V5. Os valores são médias e erros-padrão. As diferenças entre os tratamentos N In, inoculado com Ab-V5 e inoculado com ZK estão representadas pelas letras minúsculas (*Tukey HSD*;  $P < 0,05$ ;  $n = 9$ ). Os asteriscos representam a diferença entre os níveis de hidratação do solo, CC e DH ANOVA (teste *F*; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 9$ ).

Inoculação	<i>Heliocarpus popayanensis</i>			<i>Cabrlea canjerana</i>		
	CC	DH	Média	CC	DH	Média
	-----MSR-----		Média	-----MSR-----		Média
<b>N In</b>	2,73 ± 0,116 ab***	1,90 ± 0,08 b	2,31	1,69 ± 0,149	1,03 ± 0,124	1,36 a
<b>Ab-V5</b>	2,90 ± 0,106 a***	2,14 ± 0,082 ab	2,52	1,40 ± 0,236	1,14 ± 0,141	1,27 a
<b>ZK</b>	2,62 ± 0,073 b	2,27 ± 0,07 a	2,45	1,56 ± 0,224	1,08 ± 0,159	1,32 a
<b>Média</b>	2,75	2,10		1,55**	1,08	
	-----MSF-----		Média	-----MSF-----		Média
<b>N In</b>	1,05 ± 0,065	0,808 ± 0,064	0,932 a	0,913 ± 0,088	0,509 ± 0,111	0,711 a
<b>Ab-V5</b>	1,14 ± 0,061	0,686 ± 0,036	0,913 a	0,628 ± 0,131	0,552 ± 0,087	0,59 a
<b>ZK</b>	0,85 ± 0,093	0,607 ± 0,029	0,723 b	0,756 ± 0,116	0,488 ± 0,097	0,622 a
<b>Média</b>	1,01*	0,7		0,765**	0,516	
	-----AF-----		Média	-----AF-----		Média
<b>N In</b>	289 ± 20,7	221 ± 22,4	255 a	223 ± 17,4	130 ± 28,3	176 a
<b>Ab-V5</b>	295 ± 20,9	186 ± 9,41	240 a	154 ± 30,9	144 ± 26,1	149 a
<b>ZK</b>	234 ± 14,8	171 ± 9,89	202 b	184 ± 29,2	119 ± 25,1	152 a
<b>Média</b>	272***	193		187*	131	
	-----R/PA-----		Média	-----R/PA-----		Média
<b>N In</b>	0,771 ± 0,028	0,92 ± 0,052	0,845 c	0,869 ± 0,044 a	0,966 ± 0,102 a	0,917
<b>Ab-V5</b>	0,787 ± 0,03	1,16 ± 0,086	0,973 b	1 ± 0,048 a	0,994 ± 0,08 a	0,999
<b>ZK</b>	1 ± 0,072	1,18 ± 0,063	1,09 a	1,08 ± 0,117 a	1,02 ± 0,048 a	1,05
<b>Média</b>	0,855	1,08***		0,986	0,993	

## 5 DISCUSSÃO

A diminuição na disponibilidade de água do solo causou acúmulo de prolina nas mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* submetidas ao DH. Isto pode ter ocorrido, pois o aminoácido prolina é um soluto osmoticamente ativo, acumulado em resposta ao DH, contribuindo para a redução do potencial osmótico da planta, auxiliando no ajuste osmótico, através do favorecimento da absorção de água e, conseqüente manutenção do turgor celular (Nepomuceno et al., 2001; Sofo et al., 2004). Nas mudas de *H. popayanensis*, a inoculação com ZK favoreceu o aumento no acúmulo de prolina, independente da condição hídrica, o que provavelmente favoreceu o ajuste osmótico e a conseqüente redução do potencial de água das mudas dessas espécies, com isso, a bactéria ZK possivelmente proporciona maior tolerância ao DH através do maior acúmulo de prolina (Ortiz et al., 2015), mas também proporciona melhora das mudas mantidas em CC que também apresentaram aumento deste aminoácido quando inoculadas com ZK.

A redução do  $\psi_w$ , visto, também, em *H. popayanensis* e *C. canjerana* sob DH é importante, pois favorece a manutenção do gradiente decrescente de potencial de água no sistema solo-planta, contribuindo para a manutenção da absorção de água e, conseqüentemente do turgor celular (Nepomuceno et al., 2001; Sofo et al., 2004). Contudo, a inoculação com ZK nas mudas de *H. popayanensis* contribuiu para um aumento do  $\psi_w$ , devido a associação com as BPCP auxiliar no acúmulo de compostos osmoticamente ativos, como a prolina, resultando na redução do potencial osmótico, e conseqüentemente desenvolvendo estratégias de maior tolerância ao DH (Creus et al., 2004; Tiepo et al., 2018; Vardharajula et al., 2011). O mesmo ocorreu no estudo de Pedreira et al. (2007), que demonstraram diminuição do  $\psi_w$  das plantas e aumento nos níveis de prolina em plantas submetidas ao DH.

A redução dos valores de  $A_{max}$ ,  $g_s$ ,  $C_i$  e  $E$  em mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana*, indicou um comprometimento no aparelho fotossintético das plantas, causado pelo DH (Zgallaï et al., 2005). Isto pode ter ocorrido, devido à escassez de água, causada pelo DH, afetar a  $g_s$ , reduzindo assim a proporção de  $CO_2/O_2$  nas folhas (Gilbert et al. 2011; Mutava et al. 2015), pois a percepção

do estresse hídrico pelas raízes leva ao aumento dos níveis de ABA, que é transportado pelo xilema para a parte aérea, estimulando assim o fechamento estomático (Assman, 2003; Desikan et al., 2004; Wilkinson e Davies, 2010), resultando na diminuição da perda de água por  $E$  e como consequência na redução da assimilação de  $\text{CO}_2$  (Farooq et al., 2009; Kohler et al., 2008).

As mudas de *H. popayanensis* foram favorecidas pela inoculação com ZK tanto em CC quanto em DH quando considerada a  $A_{max}$ . Isso pode ter ocorrido devido à manutenção ou aumento da atividade das enzimas presentes no ciclo de Calvin, como a Rubisco (Rho e Kim, 2017). Somado ao acúmulo de aminoácidos e proteínas, em mudas inoculadas, que pode ter sido direcionado para a síntese de enzimas responsáveis pela assimilação de  $\text{CO}_2$ , havendo otimização da assimilação mesmo com a diminuição da entrada de  $\text{CO}_2$ . Isto também foi observado por Tiepo et al. (2018), em mudas de *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze inoculadas com Ab-V5 sob DH, em que apresentaram maiores valores de  $A_{max}$ , indicando que a inoculação com BPCP favorece a assimilação de  $\text{CO}_2$ .

Outra possível explicação para o aumento da  $A_{max}$  seria que as BPCP induzem a produção de hormônios vegetais, como por exemplo citocininas. Shao et al. (2010) observaram que as citocininas possuem potencial para diminuir o dano ou substituir os centros de reação inativados do FSII, protegendo as plantas contra os possíveis danos causados pelo DH. E também observaram que o aumento das citocininas foi capaz de regular a quantidade de luz que chega aos centros de reação, podendo auxiliar no aumento da eficiência da cadeia de transporte de elétrons, sendo que a energia produzida poderia estar sendo usada para a fixação de  $\text{CO}_2$ , auxiliando as plantas na maior capacidade fotoprotetora sob DH (Shao et al., 2010).

Houve diminuição na  $A_{max}$  em mudas de *C. canjerana* inoculadas com ZK. O mesmo foi visto por Li et al. (2016), que verificaram diminuição na avaliação de parâmetros da fotossíntese,  $g_s$  e  $E$  em mudas de *Vicia faba* L. inoculadas com *Bacillus subtilis*. A queda da  $A_{max}$  pode ter ocorrido, em parte, devido ao aumento da fotorrespiração, que é importante na proteção a danos oxidativos que podem ocorrer em mudas submetidas ao DH, porém aumentando a atividade oxigenasse da rubisco e diminuindo a carboxilase (Zhu et al., 2000; Zhou et al., 2011). Assim a diminuição da  $A_{max}$  tem como consequência a diminuição na

produção de amido e sacarose que por sua vez auxiliariam no aumento da produção de biomassa da planta (Lawson e Violet-Chabrand, 2019).

A  $EUA_{int}$  otimiza as trocas gasosas, pois relaciona a perda de água que ocorreu nas mudas, devido ao fechamento estomático, ao ganho de C das plantas neste período de estresse (Taiz et al., 2017). Além disso, maiores valores de  $EUA_{int}$  em DH, como ocorreu nas mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* demonstra favorecimento no transporte de água pelas plantas, podendo também auxiliar no transporte de nutrientes, e maior tolerância à seca (Romero et al., 2014). Assim, maiores valores de  $EUA_{int}$  estão associados ao decréscimo da  $g_s$  ao mesmo tempo em que ocorre a manutenção ou aumento da  $A_{max}$ , assim um aumento desse parâmetro, pode significar que as plantas são tolerantes à menor disponibilidade de água no solo (MA et al., 2004).

A baixa disponibilidade de água pode reduzir a absorção do N disponível e inativar a síntese e a atividade de enzimas que atuam no metabolismo do N (Foyer et al., 1998; Garg et al., 2001; Correia et al., 2005; Fresneau et al., 2007), como visto nas folhas das mudas de *C. canjerana* que apresentaram diminuição na atividade da NR quando submetidas ao DH. O mesmo foi visto por Xu e Zhou (2006) e Fresneau et al. (2007) em mudas de *Leymus chinensis* e trigo sob DH, atribuindo esta ocorrência ao declínio na concentração interna de  $CO_2$  foliar e com isto uma queda no fornecimento de nitrato. Porém houve aumento na atividade da NR em raízes de *H. popayanensis* submetidas ao DH, junto com aumento na assimilação de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ , também nas raízes sob DH dessas mudas, indicando uma maior assimilação de N, que pode auxiliar na melhora da muda em situação de estresse, pois induz a síntese de componentes como aminoácidos, proteínas, coenzimas, clorofila e ácidos nucleicos (Meng et al. 2016a), importantes para o aumento da tolerância da planta à seca.

A inoculação com Ab-V5 em mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* aumentou a atividade da NR em folhas, tanto em CC quanto em DH, pois as BPCPs podem auxiliar no aumento da atividade de enzimas responsáveis pela assimilação e incorporação de N a aminoácidos, como as enzimas NR, GS e GOGAT (Cassán et al., 2008), demonstrando que essa associação pode alterar positivamente o metabolismo de N contribuindo, assim, para a maior assimilação deste em mudas inoculadas (García de Salomone e Döbereiner, 1996). Contudo folhas de mudas de *C. canjerana* apresentaram diminuição na atividade da NR

quando inoculadas com ZK em relação às N In e as inoculadas com Ab-V5, podendo ter relação com a diminuição do  $\text{NO}_3^-$ , também em folhas de mudas inoculadas com ZK. Ao mesmo tempo, houve aumento na atividade da NR em *C. canjerana* quando inoculadas com Ab-V5, junto com aumento no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  também nas folhas dessas mudas quando inoculadas com Ab-V5. Isto pode ter ocorrido, devido ao  $\text{NO}_3^-$  ser substrato e ativador da NR (Correia et al., 2005), assim uma diminuição no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  pode causar diminuição na ativação das enzimas NR e o contrário, pois a expressão dos genes que codificam a síntese e atividade dessas enzimas são dependentes dos substratos e do fluxo de compostos orgânicos (Meng et al. 2016a; Hung et al. 2018).

Sobre o  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em raízes de mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* houve aumento quando submetidas ao DH. Em contraste, houve diminuição do  $\text{NO}_3^-$  em folhas de mudas de *H. popayanensis*, N In e inoculadas com ZK, submetidas ao DH, e também, de  $\text{NH}_4^+$  em folhas de mudas de *H. popayanensis* submetidas ao DH. Isto pode ter ocorrido devido à diminuição na absorção de N, que ocorre sob DH, causar redução na taxa de transpiração, limitando, principalmente, o transporte de N da raiz para a parte aérea (Alami, 2000). Porém, o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  em folhas de mudas de *C. canjerana* quando submetidas ao DH pode ter ocorrido em razão da inibição/redução da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio, causadas pelo DH, diminuindo a capacidade da planta em reduzir o  $\text{NO}_3^-$  (Correia et al., 2005).

A inoculação com BPCP pode favorecer o aporte e transporte de N pela planta (El-Komy et al., 2003) e também promover mudanças morfológicas nas raízes, estimuladas pela síntese de hormônios, auxiliando a absorção de água e nutrientes (Vejan et al., 2016). Isto foi visto em mudas de *H. popayanensis* em que houve aumento no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  em raízes de mudas inoculadas com ZK e aumento de  $\text{NH}_4^+$  em folhas, também inoculadas com ZK, independente da condição hídrica, mostrando que a inoculação com essas bactérias pode auxiliar no aumento da tolerância das mudas ao DH e também mudas em condição de CC.

As BPCPs também auxiliaram no aumento do acúmulo de aminoácidos em mudas de *H. popayanensis*, tanto em raízes quanto em folhas, independente da condição hídrica. Tiepo (2020) também verificou aumento no conteúdo de aminoácidos em mudas de *Cecropia pachystachya* Trécul e *Cariniana*

*estrellensis* inoculadas com Ab-V5 e ZK. Este aumento pode ser explicado devido às BPCP auxiliarem no aumento da assimilação de N e como consequência acúmulo de aminoácidos, principalmente os responsáveis pelo aumento da tolerância da planta ao DH (Glick, 2012), como a prolina, que também aumentou em mudas inoculadas. Isto ocorre, pois a inoculação com BPCPs auxilia na via bioquímica de assimilação do N, beneficiando mudas sob situações estressantes por meio de alterações na síntese de enzimas responsáveis pela assimilação de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  (GagnéBourque et al., 2016; Tiepo et al., 2018; Vílchez et al., 2018), como a NR, que aumentou nas folhas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* quando inoculadas com Ab-V5.

O acúmulo de aminoácidos, também foi visto nas mudas de *H. popayanensis* e *C. canjerana* quando submetidas ao DH, tanto em folhas quanto em raízes. Em *H. popayanensis*, isto pode estar relacionado, com a toxicidade do acúmulo de  $\text{NH}_4^+$ , que é assimilado e incorporado a aminoácidos, ácidos nucleicos e outros compostos orgânicos (Bloom et al., 2010), pois houve acúmulo de aminoácidos em mudas sob DH e em mudas inoculados com Ab-V5, ao mesmo tempo que houve diminuição no acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  em folhas de mudas sob DH e folhas de mudas inoculadas com Ab-V5. Hertel (2020) também verificou acúmulo de aminoácidos em plantas em DH e este aumento pode estar relacionado à prevenção de danos oxidativos (Bowne et al., 2012).

Os aminoácidos possuem papel na constituição das proteínas, que influenciam algumas características fisiológicas das plantas, como o crescimento, aumento na assimilação de  $\text{CO}_2$  e resistência a estresses (Hildebrandt et al., 2015). Uma queda no acúmulo de proteínas em mudas sob DH, como ocorreu em *C. canjerana*, pode estar relacionada ao aumento no acúmulo de aminoácidos podendo auxiliar no aumento da tolerância dessas ao DH, visto que esse aumento auxilia no ajuste osmótico (Khan et al., 2018).

Porém o aumento no acúmulo de aminoácidos, visto em ambas as espécies deste estudo sob DH, pode acarretar, também, no aumento da síntese de proteínas, como visto em folhas de mudas de *H. popayanensis* tanto N In quanto inoculadas com Ab-V5 sob DH. Isto pode ter ocorrido, possivelmente, devido à maior assimilação de nitrogênio que estas mudas apresentaram, pois houve aumento no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  nas raízes e de aminoácidos tanto nas folhas quanto nas raízes em DH.

A inoculação com BPCP auxiliou também no acúmulo de proteínas, como ocorreu em raízes de *H. popayanensis* inoculadas com ZK, tanto em CC quanto em DH. Este acúmulo, em DH, pode auxiliar na proteção osmótica e detoxificação de ERO, pois em situações de estresse as proteínas podem ser alteradas devido a mudanças na expressão gênica, levando ao aumento na síntese de proteínas responsáveis pela maior tolerância a seca (Hildebrandt et al., 2015). Considerando que quase metade das proteínas solúveis foliares em plantas C3 correspondem à Rubisco (Ellis, 1979; Parry et al., 2003) o aumento no acúmulo de proteínas, observado nas mudas de *H. popayanensis* inoculadas, também pode significar maior produção de fotossintatos (Das et al. 2017), e com isto auxiliar no maior crescimento e na maior capacidade competitiva destas mudas no campo.

A queda da MSF e da AF em ambas as espécies arbóreas submetidas ao DH, foi também observado por Hertel (2020), em mudas de *Hymenaea courbaril* L. Esta ocorrência pode ser explicada devido à inibição do crescimento e à abscisão foliar, que são causadas pelo DH, acarretando em diminuição no investimento de biomassa que pode resultar em economia de água e C (Hsiao et al., 1976; Amthor e McCree, 1990).

Em *H. popayanensis* houve queda de MSF e AF em mudas inoculadas com ZK, tanto em CC quanto em DH. Em contraste, a inoculação com ZK em mudas de *H. popayanensis* favoreceu o aumento da MSR e da R/PA. Estes resultados podem estar relacionados ao aumento na  $A_{max}$ , também em mudas inoculadas com ZK, por aumentar a produção de sacarose e amido que são utilizados pelas plantas durante o desenvolvimento e crescimento (Lawson e Vialet-Chabrand, 2019). O mesmo foi observado por Tiepo et al. (2018) em *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze inoculadas com Ab-V5 e ZK, indicando uma compatibilidade desses inóculos com a espécie vegetal. Moreira et al. (2010), também observaram maior MSR em mudas inoculadas, e explicou que esta ocorrência se deve ao fato das BPCPs modularem os níveis de hormônio das plantas, responsáveis pelo estímulo ao crescimento em raízes, incluindo Ácido Indol-3-Acético (AIA), giberelinas e citocininas, pois estes hormônios atuam no desenvolvimento de raízes laterais; estimulam a divisão e o alongamento celular e atuam como reguladores de crescimento, respectivamente (Taiz et al., 2017). Essa interação planta/bactéria resulta, então,

em respostas sinérgicas sobre o crescimento e metabolismo da planta, podendo favorecer mudanças na arquitetura da raiz através do aumento do crescimento da raiz e do desenvolvimento de raízes secundárias, auxiliando na maior absorção de água pela planta (Marulanda et al., 2006, 2009) e favorecendo, também, a diminuição da produção de parte aérea, resultando em diminuição da perda de água por esta e com isso maior economia de água e C (Taiz et al., 2017).

Já em *C. canjerana* ocorreu o mesmo observado por Hertel (2020) onde o DH reduziu a MSR das mudas de *H. courbaril*. Isto pode ter ocorrido, pois a restrição hídrica acompanhada da diminuição nos parâmetros fisiológicos gera diminuição na produção de biomassa da planta (Lawson e Vialet-Chabrand, 2019).

Como a parte aérea possui um ajuste osmótico mais lento em relação as raízes (Hsiao e Xu, 2000), as mudanças no crescimento de raiz foram mais evidentes em *H. popayanensis*, principalmente quando inoculadas com ZK. Nessas mudas a maior MSR e R/PA podem estar relacionadas ao fato da inoculação com ZK ser eficaz na melhora das mudas sob condições favoráveis e no aumento da tolerância das mudas à seca, contribuindo para que os mecanismos fisiológicos e bioquímicos sejam ajustados em condições de DH, visto que esse aumento pode indicar também uma resposta hormonal (Saab et al., 1990; Sharp et al., 1994), podendo auxiliar no aumento da área de absorção de água pelas raízes em razão da superfície transpirante.

## 6 CONCLUSÃO

As mudas da espécie *H. popayanensis* responderam melhor à inoculação com as BPCPs, o que resultou em alterações morfofisiológicas que indicam favorecimento a uma maior tolerância ao DH. Enquanto as mudas da espécie *C. canjerana*, apresentaram poucas respostas morfofisiológicas relacionadas com a tolerância ao DH quando inoculadas com as duas espécies de BPCPs. Esses resultados corroboram outros estudos do mesmo grupo de trabalho do laboratório de Ecofisiologia vegetal (LEFIV) da Universidade Estadual de Londrina em que outras espécies pioneiras, como *Trema micranta* e *Cecropia pachystachya*, responderam melhor à inoculação com BPCPs em relação às não pioneiras.

Os resultados obtidos indicaram que a inoculação com BPCPs em mudas de *H. popayanensis* exerce influência sobre o acúmulo de prolina, sobre o  $\psi_w$  e sobre o metabolismo de N, através do maior conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  em raízes, de  $\text{NH}_4^+$  em folhas, no acúmulo de aminoácidos e também no aumento de proteínas. Houve, ainda, manutenção da MSR e aumento na R/PA, mostrando que essas bactérias auxiliaram também no crescimento das plantas. Em *C. canjerana* a inoculação auxiliou na maior atividade da NR em folhas, e causou diminuição no  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  da raiz, na atividade da NR foliar e na  $A_{max}$ .

A maior qualidade morfofisiológica das mudas, especialmente *H. popayanensis* quando inoculadas com as BPCP favoreceu o aumento da tolerância ao DH, indicando a eficácia dessas bactérias, principalmente ZK. Portanto, a inoculação com bactérias associativas possui potencial para obtenção de mudas mais tolerantes à seca, podendo diminuir os custos causados pela mortalidade dessas mudas quando utilizadas em áreas de restauração florestal. Porém mais estudos são necessários com enfoque na ação das BPCP em diferentes espécies dos diferentes estádios de sucessão.

## REFERÊNCIAS

Ahmad K, Kambiz B, Seyed AZ, Mohammad RN, Hassanali NB. **Evaluation of alliin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes.** Scientia Horticulturae 103: 155-166. 2005.

Ainsworth EA, Rogers A. **The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO<sub>2</sub>]: mechanisms and environmental interactions.** Plant, Cell & Environment 30: 258-270. 2007.

Ainsworth EA, Long SP. **What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>.** New Phytologist 165: 351-372. 2005.

Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T. **Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing *Rhizobium* sp. Strain Isolated from Sunflower Roots.** Applied and Environmental Microbiology 66: 3393- 3398. 2000.

Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. **Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism.** Annals of Botany 97: 883–893. 2006.

Alves AC, Setter TL. **Response of Cassava Leaf Area Expansion to Water Deficit: Cell Proliferation, Cell Expansion and Delayed Development.** Annals of Botany 94: 605–613. 2004.

Amthor JS, McCree KJ. **Carbon balance of stressed plants: a conceptual model for integrating research results.** New York. NY. USA: Wiley-Liss. 1990.

Armada E, Leite MFA, Medina A, Azcón R, Kuramae EE. **Native bacteria promote plant growth under drought stress condition without impacting the rhizomicrobiome.** FEMS Microbiology Ecology 94, fiy092. 2018.

Assman SM. **OPEN STOMATA opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells.** *Trend in Plant Science* 8: 151-153. 2003.

Barbosa DEF, Basílio GA, Silva FR, Neto LM. **Vascular epiphytes in a remnant of seasonal semideciduous forest in zona da mata of Minas Gerais, Brazil.** *Bioscience journal* 31:1981-3163. 2014.

Bashan Y, de-Bashan LE. **How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment.** *Advances in Agronomy* 108: 77-136. 2010.

Bellard C, Leclerc C, Leroy B, Bakkenes M, Veloz S, Thuiller W, Courchamp F. **Vulnerability of biodiversity hotspots to global change.** *Global Ecology and Biogeography*, v. 23, n. 12, p. 1376–1386, 2014.

Belimov AA, Safronova VI, Mimura T. **Response of spring rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant.** *Canadian Journal of Microbiology* 48. 2002.

Bista DR, Heckathorn SA, Jayawardena DM, Mishra S, Boldt JK. **Effects of Drought on Nutrient Uptake and the Levels of Nutrient-Uptake Proteins in Roots of Drought-Sensitive and -Tolerant Grasses.** *Plants* 7, 28. 2018.

Bloom AJ, Burger M, Asensio JSR, Cousins AB. **Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*.** *Science* 328: 899-903. 2010.

Bothe H, Korsgen H, Lehmacher T, Hundeshagen B. **Differential Effects of *Azospirillum*, Auxin and Combined Nitrogen on the Growth of the Roots of Wheat.** *Symbiosis* 13: 167-179. 1992.

Bowne JB, Erwin TA, Juttner J, Schnurbusch T, Langridge P, Basic A, Roessner V. **Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolic level.** *Molecular Plant* 5: 418-429. 2012.

Bradford MM. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72: 248-254. 1976.

Brançalion PHS, Niamir A, Broadbent E, Crouzeilles R, Barros FSM, Almeyda Zambrano AM, Baccini A, Aronson J, Goetz S, Reid JL, Strassburg BBN, Wilson S, Chazdon RL. **Global restoration opportunities in tropical rainforest landscapes.** *Sci. Adv.* 5, eaav3223. 2019.

Bustamante MMC, Silva JS, Scariot A, Sampaio AB, Mascia DL, Garcia E, Sano E, Fernandes GW, Durigan G, Roitman I, Figueiredo I, Rodrigues RR, D. Pillar V, Oliveira AO, Malhado AC, Alencar A, Vendramini A, Padovezi A, Carrascosa H, Freitas J, Siqueira JA, Shimbo J, Generoso LG, Tabarelli M, Biderman R, Salomão RP, Valle R, Junior B, Nobre C. **Ecological restoration as a strategy for mitigating and adapting to climate change: lessons and challenges from Brazil.** *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 24: 1249-1270. 2019.

Calzavara AK, Bianchini E, Mazzanatti T, Oliveira HC, Stolf-Moreira R, Pimenta JA. **Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery.** *Photosynthetica* 53: 597-608. 2015.

Carillo P & Gibon. **PROTOCOL: Extraction and determination of proline.** *PrometheusWiki.* 2011.

Carvalho-Filho JLS, Arrigoni-Blank MF, Blank AF, Rangel MAS. **Produção de mudas de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composição de substratos.** *Cerne* 9:109-118. 2003.

Cassán F, Sgroy V, Perrig D, Masciarelli O, Luna V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. **Aspectos fisiológicos y tecnológicos de La promoción del crecimiento vegetal.** In: Cassán FD, Garcia de Salamone, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, pp 61-86. 2008.

Chaves-Filho JT, 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.** Revista brasileira Bot 2: 199-204. 2001.

Chaves JH, Reis GG, Reis MGF, Neves JCL, Pezzopane JEM, Polli HQ. **Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo: relações hídricas de plantas em tubetes.** Sociedade de Investigações Florestais 3: 333-341. 2003.

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. **Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell.** Annals of Botany 103: 551-560. 2009.

Correia MJ, Fonseca F, Azedo-Silva J, Dias C, David MM, Barrote I, Osório ML, Osório J. **Effects of water deficit on the activity of nitrate reductase and content of sugars, nitrate and free amino acids in the leaves and roots of sunflower and white lupin plants growing under two nutrient supply regimes.** Physiologia Plantarum 124:61-70. 2005.

Craven D, Dent D, Braden D, Ashton MS, Berlyn GP, Hall JS. **Seasonal variability of photosynthetic characteristics influences growth of eight tropical tree species at two sites with contrasting precipitation in Panama.** Forest Ecol. Manag. 261: 1643- 1653. 2011.

Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. **Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato.** *Planta* 221: 297-303. 2005.

Das A, Rushton PJ, Rohila JS. **Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress.** *Plants* 6: 199–208. 2017.

Das K, Roychoudhury A. **Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants.** *Frontiers in Environmental Science* 2:1–13. 2014.

De Bashan LE, Hernandez JP, Bashan Y. **The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation.** *Applied Soil Ecology* 61: 171-189. 2012.

Dean W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira / The fire and sword: the story and the devastation of the Brazilian Atlantic Forest.** 1996.

Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Niel SJ. **ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells.** *Journal of Experimental Botany* 55: 205- 212. 2004.

de Souza NL, Rocha SS, Narezzi NT, Tiepo AN, Oliveira ALM, Oliveira HC, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R. **Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of Neotropical tree species with contrasting tolerance to shade.** *Trees* 34: 121-132. 2020.

Dodd IC, Belimov AA, Sobeih WY, Safronova VI, Grierson D, Davies WJ. **Will modifying plant ethylene status improve plant productivity in water-limited environments?.** 4th International Crop Science Congress. 2004.

El-Komy HM, Hamdia MA, ABD El-Baki GK. **Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum spp.*** *Biologia Plantarum* 46:281-287. 2003.

Ellis RJ. **The most abundant protein in the world.** *Trends in Biochemical Science* 4: 241-244. 1979.

Ellison D, Morris CE, Locatelli B, Sheil D, Cohen J, Murdiyarso D, Gutierrez V, vanNoordwijk M, Creed IF, Pokorny J, Gaveau D, Spracklen DV, Tobella AB, Ilstedt U, Teuling AJ, et al. **Trees, forests and water: Cool insights for a hot world.** *Global Environment Change* 43: 51-61. 2017.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. **Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management.** *Sustainable Agriculture* 153-188. 2009.

Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H. **Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration.** *New Phytologist* 172, 73–82. 2006.

Freitas WK, Gois G, Prereira Junior ER, Oliveira Junior JF, Magalhães LMS, Brasil FC, Sobral BS. **Influence of fire foci on forest cover in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro, Brazil.** *Ecological Indicators* 115. 2020.

Fresneau C, Ghashgaie J, Cornic G. **Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO<sub>2</sub>.** *Journal of Experimental Botany* 58: 2983-2992. 2007.

Foyer CH, Valadier MH, Migge A, Becker TA. **Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves.** *Plant Physiology* 117: 283-292. 1998.

Fukami J, Abrantes JLF, del Cerro P, Nogueira MA, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. **Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6.** Arch. Microbiol. 200: 47–56. 2018 a.

Gadelha CG, Miranda RS, Alencar NLM, Costa JH, Prisco JT, Gomes-Filho E. **Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation.** Journal of Plant Physiology 212: 69–79. 2017.

Gagné-Bourque F, Bertrand A, Claessens A, Aliferis KA, Jabaji S. **Alleviation of drought stress and metabolic changes in timothy (*Phleum 81retense* L.) colonized with *Bacillus subtilis* B26.** Frontiers in Plant Science 7. 2016.

Gan Wu X, Zhong Y. **Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in *Hulless barley*.** Plant Production Science 91, 52–56. 2015.

García e Solamone I, Dobereiner J. **Mayze genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation.** Biology and Fertility of Soils 21: 193-196. 1996.

Garg BK, Kathju S, Burman U. **Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes.** Biologia Plantarum 44: 289-292. 2001.

Gilbert ME, Holbrook NM, Zwieniecki MA, Sadok W, Sinclair TR. **Field confirmation of genetic variation in soybean transpiration response to vapor pressure deficit and photosynthetic compensation.** Field Crops Research 124: 85-92. 2011.

Gill SS, Tuteja E. **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.** Plant Physiology and Biochemistry. 48: 909-930. 2010.

Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B. **Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. Critical reviews in plant science.** 26: 227-242. 2007.

Glick BR. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications.** Scientifica 2012.

Goes KCGP, Fisher MLC, Cattelan AJ, Nogueira MA, Carvalho CGP, Oliveira ALM. **Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower.** Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 437–447. 2012.

Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Segura-Carretero A, et al. **Phenolic compounds and saponins in plants grown under different irrigation regimes. In: Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation.** Elsevier Inc., pp 37–52. 2014.

Großkinsky DK, Tafner R, Moreno MV, Stenglein SA, Salamone IEG, Nelson LM, Novák O, Strnad M, van der Graaff E, Roitsch T. **Cytokinin production by Pseudomonas fluorescens G20-18 determines biocontrol activity against Pseudomonas syringae in Arabidopsis.** Scientific Reports 6: 23310. 2016.

Hacke, U.G., Stiller, V., Sperry, J.S., Pittermann, J. & McCulloh, K. **Cavitation fatigue: embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem.** Plant Physiology, 125: 779–786. 2001 a.

Hall JS, Ashton MS, Garen EJ, Jose S. **The ecology and ecosystem services of native trees: Implications for reforestation and land restoration in Mesoamerica.** Forest Ecology and Management 261:1553–1557. 2011.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Nahar K, Hossain MS, Mahmud JA, Hossen MS, Madus AAC, Moumita, Fujita M. **Potassium: A Vital Regulator of Plant Responses and Tolerance to Abiotic Stress.** 8:31. 2018

Heldt HW, Piechulla B. **Nitrate assimilation in is essential for the synthesis of organic matter**. In: Plant biochemistry. Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press; 2005.

Hertel MF, Pimenta JA, Stolf RM. **Bactérias associativas aumentam a tolerância ao déficit hídrico de duas espécies de Fabaceae da Mata Atlântica**. 2020.

Hertel MF, Solf RM, Pimenta JA. **Bactérias associativas e óxido nítrico aumentam a tolerância à seca de duas espécies arbóreas neotropicais**. 2020.

Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun HP. **Amino acid catabolism in plants**. Molecular Plant 8:1563–1579. 2015.

Hoffmann WA, Adasme R, Haridasan M, Carvalho MT, Geiger EL, Pereira MAB, Gotsch SG, Franco AC. **Tree topkill, not mortality, governs the dynamics of savanna-forest boundaries under frequent fire in Central Brazil**. Ecology 90, 1326–1337. 2009.

Hossain MA, Wani SH, Bhattacharjee S, Burritt DJ, Tran LP. **Drought stress tolerance in plants**. In *Salehi-Lisar SY and Bakhshayeshan-Agdam H (ed) Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance*, 1st edn. Switzerland, pp 1-16. 2016.

Hsiao TC, Acevedo E, Fereres E, Henderson DW. **Water stress, growth, and osmotic adjustment**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 273:479–500. 1976.

Hsiao TC, Xu LK. **Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analyses and relation to water transport**. Journal of Experimental Botany 51: 1595-1616. 2000.

Huang L, Li M, Zhou K, et al. **Uptake and metabolism of ammonium and nitrate in response to drought stress in *Malus prunifolia***. Plant Physiology and Biochemistry 127:185– 193. 2018.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. **Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil**. Plant Soil 331, 413–425. 2010.

Jatav KS, Agarwal RM, Singh RP, Madhup S. **Growth and yield responses of wheat *Triticum aestivum* L to suboptimal water supply and different potassium doses**. Journal of Functional and Environmental Botany 2:39-51. 2012.

Khan N, Bano A, Babar MA. **The root growth of wheat plants, the water conservation and fertility status of sandy soils influenced by plant growth promoting rhizobacteria**. Symbiosis 72: 195–205. 2016.

Khan N, Bano A, Shahid MA, Babar AMD. **Interaction between PGPR and PGR for water conservation and plant growth attributes under drought condition**. Biologia 73: 1083– 1098. 2018.

Kohler J, Hernández JA, Caravaca F, Roldan A. **Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants**. Functional Plant Biology 35: 141-151. 2008.

Kong D, Wang J, Zeng H, Liu M, Miao Y, Wu H, Kardol P. **The nutrient absorption–transportation hypothesis: Optimizing structural traits in absorptive roots**. The New Phytologist 213: 1569-1572. 2014.

Lawson T, Violet-Chabrand S. **Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency**. New Phytologist 221: 93–98. 2019.

Li Y, Xu S, Gao J, Pan S, Wang G. **Bacillus subtilis-regulation of stomatal movement and instantaneous water use efficiency in *Vicia faba***. Plant Growth Regulation 78: 43-55. 2016.

Loper JE, Schroth MN. **Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet**. Phytopathology 76: 386-389. 1986.

López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farías-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E. **Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana***. Mol Plant-Microbe Interact 20: 207-17. 2007.

Lugtengerd B, Kamilova F. **Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria**. Annual Review of Microbiology 63: 541-556. 2009.

Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ. Aux/IAA gene family in plants: **Molecular structure, regulation and function**. International Journal of Molecular Sciences 19: 259. 2018.

MacDonald MJ, D'Cunha GB. **A modern view of phenylalanine ammonia lyase**. Biochemistry and Cell Biology 85. 2007.

Mange DNL, Hedin LO, Pacala SW. **Nitrogen and Phosphorus Limitation over Long-Term Ecosystem Development in Terrestrial Ecosystems**. Ecosystem Development Model 7(8): e42045. 2012.

Marulanda A, Barea JM, Azcón. **An Indigenous Drought-Tolerant Strain of *Glomus intraradices* Associated with a Native Bacterium Improves Water Transport and Root Development in *Retama sphaerocarpa***. Microb Ecol 52: 670-678. 2006.

Marulanda A, Barea JM, 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 28: 155-124. 2009.

Mayak S, Tirosh T, Glick BR. **Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper.** Plant Sci 166: 525–530. 2004.

MA JF. **Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses.** Soil Science and Plant Nutrition 50: 11-18. 2004.

Mayer AM. **Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places?.** Phytochemistry 67: 2318-2331. 2006.

McCullough H. **The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method.** Clinica Chimica Acta 17, 297-304. 1967.

Melo HC. **Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico.** Hoehnea, São Paulo, 34: 145-153. 2007.

Meng S, Zhang C, Su L, et al. **Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress.** Environmental and Experimental Botany 123:78–87. 2016 a.

Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. **Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasiliense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato.** APS Journals 21(7): 1001-1009. 2007.

Moreira FMS, Silva K, Nobrega RSA, Carvalho F. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações.** Comum. Sei 1:74-99. 2010.

Mutava RN, Prince SJK, Syed NH, Song L, Valliyodan B, Chen W, Nguyen HT. **Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress.** *Plant Physiology and Biochemistry* 86: 109-120. 2015.

Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun BG, Yun BW. **Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress.** *Environmental and Experimental Botany* 161:120–133. 2019.

Narendra T, Sopory SK. **Chemical signaling under abiotic stress environment in plants.** *Plant Signaling & Behavior*, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 525-536, mai. 2008.

Nascimento SP, Bastos EA, Araújo ECE, Filho FRF, Silva EM. **Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 8: 853–860. 2011.

Nepomuceno AL, Farias JRBF, Assad ED, Almeida IR, Evangelista BA, Lazzarotto C, Neumaier N. **Caracterização de risco de déficit hídrico nas regiões produtoras de soja no Brasil.** *Revista Brasileira de Agrometeorologia* 3: 415-421. 2001.

Nogués S, Baker NR. **Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation.** *Journal of Experimental Botany* 51:1309-1317. 2000.

Oliveira ALM, Costa KR, Ferreira FC, Milani KML, dos Santos OJAP, Silva MB, Zuluaga MYA. **Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura.** *Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture.* 2014.

Oliveira HC, Sodek L. **Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism by soybean root segments.** *Amino Acids* 44:743-755. 2013.

Oliveira HC, Gomes BCR, Pelegrino MT, Seabra AB. **Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants.** Nitric Oxide 61: 10-19. 2016.

Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. **The role of microbial signals in plant growth and development.** Plant Signaling & Behavior 4:8, 701-712. 2009.

Ortiz N, Armad E, Duque E, Roldán A, Azcón R. **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 174:87-96. 2015.

Pallardy SG. **Nitrogen Metabolism.** In: **Physiology of Woody Plants.** Academic Press, Cambridge, pp 233-253. 2008.

Pedreira AC, Maia PSP, Neto CFO, Castro DS, Freitas JMN, Lobato AKS, Costa RCL. **Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas ao estresse hídrico.** Revista Brasileira de Biociências 5 (S2) 918-920. 2007.

Per TS, Khan NA, Reddy PS, Massod A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA. **Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics.** Plant Physiology and Biochemistry 115: 126-140. 2017.

Perry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Madgwilelc PJ, Keys AJ. **Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation.** Journal of Experimental Botany 54: 1321-1333. 2003.

Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. **Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions.** Trends in Plant Science 12: 29-36. 2007.

Probanza A, García LJA, Palomino RM, Ramos B, Mañero GFJ. ***Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105).** Applied Soil Ecology 20: 75-84. 2002.

Rezende CL, Scarano FR, Assad ED, Joly CA, Metzger JP, Strassburg BBN, Tabarelli M, Fonseca GA, Mittermeier RA. **From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest.** Perspectives in Ecology and Conservation 16: 208-214. 2018.

Rho H, Kim SIL. **Effects on photosynthesis and water use of plant hosts: a metanalysis.** In: Doty, S. (Ed.), **Functional Importance of the Plant Microbiome.** Springer Washington, pp. 43-69. 2017.

Robakowski P, Wyka TP, Kowalkowski W, Barzdajn W, Pers-Kamczyc E, Janowski A, Politycka B. **Practical Implications of Different Phenotypic and Molecular Responses of Evergreen Conifer and Broadleaf Deciduous Forest Tree Species to Regulated Water Deficit in a Container Nursery.** Forests 11:1011. 2020.

Romero AM, Vega D, Correa OS. ***Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato.** Applied Soil Ecology 82:38-43. 2014.

Rouphael Y, Cardarelli M, Schwarz D, Franken P, Colla G. **Effects of Drought on Nutrient Uptake and Assimilation in Vegetable Crops.** In: Aroca R. (eds) **Plant Responses to Drought Stress.** Springer, Berlin, Heidelberg, P.171-195. 2012.

Ruíz-Sánchez M, Armada E, Muñoz Y, Salamone IEG, Aroca R, Ruíz-Lozano JM, Azcón R. ***Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions.** Journal of Plant Physiology 168:1031-1037. 2011.

Saab IN, Sharp RE, Pritchard J, Voetberg GS. *Plant Physiology* 93: 1329-1336. 1990.

Scarano FR, Ceotto P. **Brazilian Atlantic forest: impact, vulnerability, and adaptation to climate change.** *Biodivers. Conserv.* 24, 2319–2331. 2015

Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. **Sap Pressure in Vascular Plants.** *Science* 148: 339-346. 1965.

Serraj R, Sinclair TR. **Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?.** *Plant Cell & Environment* 25: 333–341. 2002.

Shao R, Wang K, Shangguan Z. **Cytokinin-induced photosynthetic adaptability of *Zea mays* L. to drought stress associated with nitric oxide signal: Probed by ESR spectroscopy and fast OJIP fluorescence rise.** *Journal of Plant Physiology* 167: 472-479. 2010.

Sharp RE, Wu Y, Voetberg GS, Saab IN, LeNoble ME. **Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials.** *Journal of Experimental Botany* 45: 1743-1751. 1994.

Shoo LP, Freebody K, Kanowski J, Catterall CP. **Slow recovery of tropical old-field rainforest regrowth and the value and limitations of active restoration.** *Conservation Biology* 30, 121-132. 2015.

Silveira NM, Frungillo L, Marcos FCC, Pelegrino MT, Miranda MT, Seabra AB, Salgado I, Machado EC, Ribeiro RV. **Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit.** *Planta* 181–190. 2016.

Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A. **Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress.** *Physiologia Plantarum* 121: 58-65. 2004.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2020. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica.

SOS Mata Atlântica, INPE, 2018. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2016-2017. SOS Mata Atlântica and INPE, São Paulo.

Stewart GR, Popp M, Holzapfel I, Stewart JJ, Dickie-Eskew A. **Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics.** New Phytol 104:373-384. 1986.

Souza NL, Rocha SS, Narezzi NT, Tiepo AN, Oliveira ALM, Oliveira HC, Pimenta JA, Stolf-Moreira R. **Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of neotropical tree species with contrasting tolerance to shade.** Trees - Structure and Function 34:121–132. 2020.

Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. **Fisiologia Vegetal.** 6° edição, Porto Alegre: Artmed 2017.

Tiepo AN, Constantino LV, Madeira TB, Gonçalves LSA, Pimenta JA, Bianchini E, Oliveira ALM, Oliveira HC, Stolf-Moreira R. **Plant growth-promoting bacteria improve leaf antioxidant metabolism of drought-stressed Neotropical trees.** Planta 251: 83. 2020.

Tiepo AN, Hertel MF, Rocha SS, Calzavara AK, Oliveira ALM, Pimenta JA, Oliveira HC, Bianchini E, Moreira RS. **Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth-promoting bacteria.** Plant Physiology and Biochemistry 130: 277-288. 2018.

Triantaphylidès C, Havaux M. **Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling.** Trends in Plant Science 14: 219-228. 2009.

Vardharajula S, Alis Z, Grover M, Reddy G, Bandi V. **Drought tolerance plant growth promotion *Bacillus sp.*: effect on growth, osmolytes and antioxidant**

**status of maize under drought stress.** Journal of Plant Interactions 6:1-14. 2011.

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN. **Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability, a review.** Molecules 21: 573-597. 2016.

Vílchez JI, Niehaus K, Dowling DN, et al. **Protection of pepper plants from drought by *Microbacterium* sp. 3J1 by modulation of the plant's glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate content: A comparative metabolomics approach.** Frontiers in Microbiology 9: 284. 2018.

Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A. **Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria.** Microbiological Research 184:13–24. 2016.

Wall GW, Brooks TJ, Adam NR, Cousins AB, Kimball BA, Pinter PJ, LaMorte RL, Triggs JM, Ottman MJ, Leavitt SW, Matthias AD, Williams DG, Webber AN. **Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> improved *Sorghum* plant water status by ameliorating the adverse effects of drought.** New Phytologist 152: 231– 248. 2001.

Wang Q, Wang Z, Awasthi MK, Jiang Y, Li R, Ren X, Zhao J, Shen F, Wang M, Zhang Z. **Evaluation of medical stone amendment for the reduction of nitrogen loss and bioavailability of heavy metals during pig manure composting.** Bioresource Technology 220: 297-304. 2016.

Wang H, Yang Z, Yu Y, Chen S, He Z, Wang Y, Jizan L, Wang G, Yang C, Liu B, Zhang Z. **Drought enhances Nitrogen uptake and assimilation in maize roots.** Agronomy Journal 109: 39–46. 2017.

Wilkinson S, Davies WJ. **Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community plant.** Cell and Environment 33: 510-525. 2010.

Xu ZZ, Zhou GS. **Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*.** 224: 1080-1090. 2006.

Yahalom E, Okon Y, Dovrat A. **Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*).** Canadian Journal of Microbiology 36. 1990.

Yemm EW, Cocking EC. **The determination of amino acid with ninhydrin.** Analyst 80: 209-213. 1955.

Young, C.E.F., Junior, M.A., 2017. **Custos e Benefícios da Implementação de um Mercado de Cotas de Reserva Ambiental (CRA) no Brasil.** XII Encontro Nacional da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, Uberlândia.

Zgallai H, Steppe K, Lemeur R. Photosynthetic, physiological and biochemical responses of tomato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. J. Integr. Plant Biol. 47, 1470–1478. 2005.

Zhang W, Xie Z, Zhang X, Lang D, Zhang X. **Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status.** Journal of Plant Interactions 14: 580-589. 2019.

Zhou Y, Zhang YL, Wang X, Cui J, Xia X, Shi K, Yu J. **Effects of nitrogen form on growth, CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants.** J. Zhejiang Univ.-Sci. B 12: 126–134. 2011.

Zhu Z, Gerendás J, Bendixen R, Schinner K, Tabrizi H, Sattelmacher B, Hansen UP. **Different tolerance to light stress in NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-grown *Phaseolus vulgaris* L.** Plant Biol. 2:558–570. 2000.

Ziska LH, Bunce JA, Shimono H, Gealy DR, Baker JT, Newton PC, Reynolds MP, Jagadish KS, Zhu CW, Howden M, Wilson LT. **Food security and climate change: on the potential to adapt global crop production by active selection to rising atmospheric carbon dioxide.** Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences 279: 4097–4105. 2012.