



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANGÉLICA NUNES TIEPO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO EM MUDAS DE *Trema micrantha* (L.) BLUME  
(Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae),  
SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO NO SOLO**



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



C A P E S



**m e s t r a d o**  
ciências biológicas  
ZOOLOGIA E BOTÂNICA

---

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

ANGÉLICA NUNES TIEPO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO EM MUDAS DE *Trema micrantha* (L.) BLUME  
(Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE  
(Lecythidaceae), SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO NO  
SOLO**

---

Londrina - PR

2017

ANGÉLICA NUNES TIEPO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO EM MUDAS DE *Trema micrantha* (L.) BLUME  
(Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae),  
SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO NO SOLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Renata Stolf Moreira.

Londrina  
2017

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

Tiepo, Angélica Nunes.

Efeitos da associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume (Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo / Angélica Nunes Tiepo. - Londrina, 2017.  
67 f.

Orientador: Renata Stolf Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Déficit hídrico - Tese. 2. Interação planta - microrganismo - Tese. 3. Ecofisiologia vegetal - Tese. 4. Espécie arbórea neotropical - Tese. I. Stolf Moreira, Renata . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

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

*DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO*

Discente: **Angélica Nunes Tiepo**

Título: "Efeitos da Associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de *Trema micrantha* (L) BLUME (Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo"

Data da Defesa: 23 de fevereiro de 2017 as 08:30 horas. na CCB S/10, desta Universidade.

**Banca Examinadora**

**Parecer**

Presidente:

Dr. Renata Stolf Moreira

APROVADA

Titulares:

Dr. Halley Caixeta de Oliveira

APROVADA

Dr. Marco Antonio Nogueira

APROVADA

Parecer Final APROVADA

Renata Stolf Moreira

Dr<sup>a</sup>. Renata Stolf Moreira

Halley Caixeta de Oliveira

Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Marco Antonio Nogueira

Dr. Marco Antonio Nogueira

Aos meus pais, José Liovaldo Tiepo e Iraci  
Nunes da Silva que, com simplicidade,  
apoio e dedicação, ensinaram-me tanto...

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Londrina pelo espaço disponibilizado para a realização dos experimentos e análises;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Laboratório de Bioquímica Molecular (UEL – CCE/Biotecnologia) pelo fornecimento dos inoculantes contendo as espécies de bactérias usadas no trabalho;

À Profa. Dra. Renata Stolf Moreira pela orientação, compreensão, incentivo e amizade;

Aos Profs. Drs. José Antonio Pimenta, Edmilson Bianchini e Halley Caixeta de Oliveira pelo apoio e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira pelas sugestões na qualificação;

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Vegetal: Mariana Fernandes Hertel, Ligia Maria Inocêncio, Tatiane Viegas Debiasi, Juliana Silva Rocha, Sâmela Santos Rocha e Anderson Kikuchi Calzavara por todos os momentos compartilhados, pela ajuda na desmontagem dos experimentos, pela amizade e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e paciência em todos os momentos da minha vida;

Ao meu irmão Rogério, minha cunhada Jane Carolina e às minhas sobrinhas Giovana e Mariana pelos momentos de apoio, conversas e descontração ao longo desta caminhada.

À todos os professores que participaram da minha formação acadêmica ao longo desses anos.

Muito obrigada!

TIEPO, Angélica Nunes. **Efeitos da associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume (Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo.** 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são uma alternativa para um manejo sustentável de ecossistemas e podem promover maiores sucessos na aclimação de mudas de espécies arbóreas a fatores abióticos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de quatro espécies de bactérias (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5, *Methylobacterium komagatae* - ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizopillius* sp.) sobre o metabolismo e o crescimento de raízes e folhas de mudas das espécies arbóreas neotropicais *Trema micrantha* e *Cariniana estrellensis*, sob condições de déficit hídrico (DH) no solo. E ainda, contribuir para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que auxiliem na produção de mudas mais tolerantes, e que possam ser utilizadas na recuperação de áreas onde há falta de água decorrente de eventos de desmatamento. Foram avaliados o *status* hídrico, crescimento, trocas gasosas, metabolismo do carbono e do nitrogênio e proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo das mudas. *T. micrantha* apresentou aumento no potencial de água quando inoculada com *Azorhizopillius* sp. e *C. estrellensis* quando inoculada com *Azomonas* sp. Redução de prolina foi observada em mudas de *T. micrantha* inoculadas com Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizopillius* sp., indicando maior capacidade de ajuste osmótico nessas condições. A massa seca da raiz e da parte aérea não diferiram em ambas as espécies vegetais quando inoculadas com ZM e *Azorhizopillius* sp, o que indica maior compatibilidade entre BPCP-planta favorecendo a manutenção da biomassa sob estresse. As trocas gasosas mostraram maior atividade nas mudas de ambas espécies associadas com Ab-V5, representada por maior eficiência instantânea de carboxilação. O menor dano causado pelo estresse oxidativo foi observada apenas em *T. micrantha* quando inoculada com ZM, devido à redução do conteúdo de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica. Ainda, mudas inoculadas com ZM apresentaram maior atividade da enzima nitrato redutase em ambas espécies. Em suma, múltiplos mecanismos são desenvolvidos no processo de tolerância ao DH no solo. E a inoculação 2 das BPCP às mudas de espécies arbóreas favorece a ativação de processos metabólicos que levam à melhor qualidade fisiológica e ao aumento da tolerância ao DH em mudas de *T. micrantha* e *C. estrellensis*. Esses processos favorecem o aumento do potencial de sobrevivência dessas mudas quando submetidas à situação de desafio. Em especial, para a espécie pioneira (*T. micrantha*), a melhor resposta em relação ao DH foi observada quando as mudas foram inoculadas com ZM, enquanto na espécie não pioneira (*C. estrellensis*) esses dados foram obtidos quando as mudas foram inoculadas com ZM e Ab-V5. Esses dados corroboram a evidência de compatibilidade entre as BPCP e essas espécies vegetais, e indicam quais espécies de bactérias poderiam ser usadas em trabalhos futuros associadas com essas espécies arbóreas, visando a melhor qualidade de mudas quando submetidas a condições de desafio, como o transplântio para o campo.

**Palavras-chave:** Ecofisiologia. Espécie arbórea neotropical. Interação plantamicroorganismo. Mata atlântica. Seca.

TIEPO, Angélica Nunes. **Growth promoting bacteria association effects on *Trema micrantha* (L.) Blume (Cannabaceae) and *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) seedlings, under water deficit in the soil.** 2017. 67 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Inoculants containing plant growth promoting bacteria (PGPB) are tools for sustainable management that may improve the success in the acclimation of seedlings to abiotic factors. This study aimed to evaluate the inoculation of four bacterium species (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5, *Methylobacterium komagatae* - ZM, *Azomonas* sp and *Azorhizophillus* sp.) on root and leaf metabolism of neotropical tree species *Trema micrantha* and *Cariniana estrellensis*, under drought conditions in soil (WD). Also, to contribute to the development of biotechnological tools that aid in the production of more tolerant seedlings, and that can be used in the recovery of areas where there is drought due to deforestation events. Water status, growth, gas exchange, carbon and nitrogen metabolism, and protection against oxidative stress were evaluated. *T. micrantha* showed an increase in water potential when inoculated with *Azorhizophillus* sp. and *C. estrellensis* when inoculated with *Azomonas* sp. Proline reduction was observed in *T. micrantha* seedlings inoculated with Ab-V5, *Azomonas* sp. and *Azorhizophillus* sp., indicating increase in osmotic adjustment capacity in these conditions. Root and shoot dry weights did not differ in both species when inoculated with ZM and *Azorhizophillus* sp, indicating higher compatibility between PGPB-plant favoring biomass maintenance. The gas exchange metabolism showed higher activity in seedlings of both species inoculated with Ab-V5, as indicated by higher instantaneous carboxylation efficiency. The smallest oxidative stress damage was observed only in *T. micrantha* when inoculated with ZM, it was due to the reduction of hydrogen peroxide content and lipid peroxidation. Seedlings inoculated with ZM showed increase in nitrate reductase activity in both species. Multiple mechanisms are developed in the process of drought tolerance. The PGPB association with the tree seedlings favors the activation of metabolic processes that enhanced the physiological quality and increased tolerance to drought in *Trema micrantha* and *Cariniana estrellensis* seedlings. These processes increased the survival of these seedlings when submitted to challenging situations. For the pioneer specie (*T. micrantha*), the best response to drought was observed when the seedlings were inoculated with ZM, whereas in the non-pioneer specie (*C. estrellensis*), 4 these data were obtained when the seedlings were inoculated with ZM and Ab-V5. These data corroborate the compatibility evidence in PGPB-plant, and indicate which bacterium species could be used in futures studies associated with these tree species, aiming higher quality of these seedlings when submitted to challenging conditions, such as transplanting to the field.

**Keywords:** Atlantic forest. Drought. Ecophysiology. Neotropical tree species. Plantmicroorganism interaction.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Variáveis morfológicas de mudas de <i>Trema micrantha</i> e <i>Cariniana estrellensis</i> inoculadas com quatro espécies de bactérias (ZM, Ab-V5, <i>Azomonas</i> sp. E <i>Azorhizophillus</i> sp.) e mantidas no solo em capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Os valores são médias $\pm$ erros-padrão (n=8). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) .....	37
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Assimilação de compostos nitrogenados em plantas. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrato; NR: Nitrato Redutase; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrito; NiR: Nitrito Redutase; F<sub>red</sub>: Ferredoxina reduzida; F<sub>ox</sub>: Ferredoxina oxidada; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Amônio; GS: Glutamina Sintetase; Pi: Fosfato Inorgânico; GOGAT: Glutamina:2-oxo-glutarato aminotransferase; AspAT: Aspartato Aminotransferase. Modificado de Taiz e Zeiger (2013) ..... 13
- Figura 2** - Espécies vegetais utilizadas nos experimentos montados em casa de vegetação. **A:** *Trema micrantha*. **B:** *Cariniana estrellensis*. **C:** Indivíduo de *T. micrantha* mantido em CC. **D:** Indivíduo de *T. micrantha* submetido ao DH. **E:** Indivíduo de *C. estrellensis* mantido em CC. **F:** Indivíduo de *C. estrellensis* submetido ao DH. As barras equivalem a 10 cm ..... 29
- Figura 3** - Potencial de água em folhas de *Trema micrantha* (**A**) e *Cariniana estrellensis* (**B**) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 35
- Figura 4** - Conteúdo de prolina em folhas de *Trema micrantha* (**A**) e *Cariniana estrellensis* (**B**) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está

presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH.  
Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 35

**Figura 5** - Trocas gasosas em mudas de *Trema micrantha* (A, C, E) e *Cariniana estrellensis* (B, D, F) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. A e B: Taxa fotossintética líquida. C e D: Condutância estomática. E e F: Eficiência instantânea de carboxilação. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=8). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 39

**Figura 6** - Açúcares solúveis totais (AST) em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 40

**Figura 7** - Amido em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras

minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )<sup>41</sup>

- Figura 8** - Avaliação do dano oxidativo em folhas de *Trema micrantha* (A e C) e *Cariniana estrellensis* (B e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. A e B: Peroxidação lipídica. C e D: Peróxido de hidrogênio. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 42
- Figura 9** - Atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 43
- Figura 10** - Concentração de nitrato em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras

maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 44

**Figura 11** - Concentração de amônio em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 45

**Figura 12** - Concentração de aminoácidos em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab- V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 46

**Figura 13** - Concentração de proteína em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras

minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH.

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )..... 47

**Figura 14** - Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2) em mudas de *Trema micrantha* baseado nas análises a seguir: **A:** Proteínas folha. **B:** Proteínas raiz. **C:** Amônio folha. **D:** Amônio raiz. **E:** Nitrato folha. **F:** Nitrato raiz. **G:** Peroxidação lipídica (TBARS). **H:** Peróxido de Hidrogênio. **I:** Prolina. **J:** Amido folha. **K:** Amido raiz. **L:** Atividade da enzima nitrato redutase folha. **M:** Atividade da enzima nitrato redutase raiz. **N:** Potencial de água ( $\psi_w$ ). **O:** Taxa fotossintética líquida (A). **P:** Massa seca da parte aérea. **Q:** Massa seca da raiz. Os resultados são apresentados em relação aos resultados basais (linha tracejada). A área acima de 0 indica aumento em relação ao controle, a área abaixo de 0 indica redução em relação ao controle. Análises realizadas para as mudas submetidas ao déficit hídrico ..... 48

**Figura 15** - Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2) em mudas de *Cariniana estrellensis* baseado nas análises a seguir: **A:** Proteínas folha. **B:** Proteínas raiz. **C:** Amônio folha. **D:** Amônio raiz. **E:** Nitrato folha. **F:** Nitrato raiz. **G:** Peroxidação lipídica (TBARS). **H:** Peróxido de Hidrogênio. **I:** Prolina. **J:** Amido folha. **K:** Amido raiz. **L:** Atividade da enzima nitrato redutase folha. **M:** Atividade da enzima nitrato redutase raiz. **N:** Potencial de água ( $\psi_w$ ). **O:** Taxa fotossintética líquida (A). **P:** Massa seca da parte aérea. **Q:** Massa seca da raiz. Os resultados são apresentados em relação aos resultados basais (linha tracejada). A área acima de 0 indica aumento em relação ao controle, a área abaixo de 0 indica redução em relação ao controle. Análises realizadas para as mudas submetidas ao déficit hídrico ..... 50

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.1 Uso de Espécies Arbóreas Neotropicais para Recuperação de Áreas Degradadas e Reflorestamento.....	5
1.2 Tolerância das Plantas ao Déficit Hídrico.....	7
1.3 Associação de Plantas com Bactérias Promotoras do Crescimento.....	10
2. OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
3. HIPÓTESES.....	14
4. REFERÊNCIAS.....	15
Efeitos da associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de <i>Trema micrantha</i> (L.) BLUME (Cannabaceae) e <i>Cariniana estrellensis</i> (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	27
<i>Material Vegetal e Delineamento Experimental</i> .....	27
<i>Análises Morfológicas</i> .....	30
<i>Análises Fisiológicas</i> .....	30
<i>Análises Bioquímicas</i> .....	30
<i>Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2)</i> .....	33
<i>Análises Estatísticas</i> .....	34
Resultados.....	34
Discussão.....	50
Conclusões.....	59
Referências.....	61

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Uso de Espécies Arbóreas Neotropicais para Recuperação de Áreas Degradadas e Reflorestamento

As florestas são o mais importante componente dos ecossistemas tropicais devido ao seu papel no ciclo do Carbono, reduzindo a concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera por atuarem como sumidouro desse gás e produzirem uma fonte de biomassa e bioenergia neutras; além de serem indispensáveis na preservação do *pool* gênico. No entanto, nas últimas décadas uma vasta destruição das florestas tem sido observada levando a uma redução no número de espécies e a um incremento no aquecimento global (Favaretto et al. 2011).

O Bioma Mata Atlântica compreende a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, e um dos 25 *hotspots* mundiais da biodiversidade. Este bioma abriga apenas 7,5% de sua vegetação primária, correspondendo a aproximadamente oito mil espécies de plantas endêmicas, das quais algumas estão ameaçadas de extinção (Myers et al. 2000; Tabarelli et al. 2005). E esses remanescentes encontram-se na forma de pequenos fragmentos, altamente perturbados e isolados (Viana e Pinheiro 1998). E mesmo com um considerável número de áreas de preservação integral presentes neste Bioma, estas são insuficientes e o sistema encontra-se longe de ser adequado (Tabarelli et al. 2005), sendo crescente a preocupação em relação à conservação e recuperação da Mata Atlântica.

As condições microclimáticas em ambientes com florestas maduras diferem consideravelmente das encontradas em ambientes desflorestados; nestes há declínio do conteúdo de água do solo, incremento do déficit de pressão de vapor e alta intensidade luminosa. Esses fatores abióticos levam à redução da pressão de turgor das células-guarda e consequente fechamento estomático, reduzindo a assimilação de CO<sub>2</sub> pelas plantas. Tais respostas dificultam o crescimento e a sobrevivência das mudas após o transplântio, havendo a necessidade de se produzir mudas que tenham características ecofisiológicas que favoreçam o seu estabelecimento no campo (Mattsson 1996).

Uma das alternativas que aumenta a tolerância das mudas a estresses ambientais é o processo de rustificação em viveiros, no qual as mudas são expostas a condições adversas por longos períodos; com notável capacidade de algumas espécies de plantas alterarem sua estrutura e fisiologia (Craven et al. 2011). Essa fase de

rustificação é de grande importância, pois permite a aclimatação das mudas às condições ambientais semelhantes às encontradas no campo (D'Avila et al. 2011), possibilitando seu melhor desenvolvimento e estabelecimento após o transplante.

Entre as alterações, ocorre aumento do número de tricomas, ceras epicuticulares espessas, aumento da concentração de pigmentos fotoprotetores que podem reduzir o dano ao aparelho fotossintético, incremento das taxas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, como observado em mudas de *Aegiphila integrifolia*, *Ceiba speciosa*, *Cecropia pachyatachya*, *Guazuma ulmifolia* e *Heliocarpus popayanensis* desenvolvidas sob sol pleno (Calzavara et al. 2015; Mazzanatti et al. 2015). Além disso, essas situações ambientais adversas podem aumentar a capacidade de armazenamento de carboidratos na parte aérea e ainda a distribuição de biomassa para as raízes o que contribui para a absorção de água e nutrientes (Calzavara et al. 2015).

As espécies arbóreas que são utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento podem ser classificadas de acordo com o grupo sucessional ao qual pertencem. Em geral, nas florestas tropicais a forma de aquisição do nitrogênio e a tolerância das plantas ao sombreamento são os parâmetros frequentemente avaliados para distinguir as espécies arbóreas pioneiras e não-pioneiras (Aidar et al. 2003; Favaretto et al. 2011).

As espécies pioneiras são caracterizadas pela elevada assimilação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) na parte aérea devido a alta atividade da enzima Nitrato Redutase nas folhas; por outro lado, as espécies não-pioneiras apresentam maiores taxas de assimilação do N nas raízes com uma preferência pelo amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Aidar et al. 2003). As espécies pioneiras compõem áreas de clareiras e bordas de florestas, estes locais apresentam uma elevada disponibilidade de luz, fato que favorece a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nas folhas uma vez que a energia necessária para essa rota metabólica é oriunda do transporte de elétrons da fotossíntese (Smirnoff e Stewart 1985). Todavia, espécies não-pioneiras encontram-se em ambientes sombreados; assim, devido a limitação de energia luminosa, torna-se mais eficiente para o metabolismo dessas espécies a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (Aidar et al. 2003).

A diferenciação das espécies em grupos sucessionais baseada na tolerância ao sombreamento é referente a traços foliares como capacidade fotossintética, tolerância à fotoinibição e ao estresse oxidativo; assim, espécies pioneiras tendem a ter maiores taxas fotossintéticas, maior acúmulo de biomassa e menor acúmulo de carotenóides. As

espécies não-pioneiras são mais vulneráveis à fotoinibição, isto se deve ao fato de que as folhas dessas espécies apresentam maior concentração de clorofila, maior capacidade de captura de luz devido às características do complexo antena do fotossistema II (FSII), e menor ponto de saturação luminoso que é decorrente da menor quantidade de enzimas do metabolismo fotossintético, como a Rubisco (Favaretto et al. 2011).

As espécies arbóreas utilizadas no presente estudo pertencem a dois grupos sucessionais: *Trema micrantha* (L.) Blume, intolerante à sombra e encontrada nos estágios iniciais da sucessão (pioneira), conhecida popularmente como Candiúva. E *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, tolerante à sombra e encontrada em estágios mais tardios da sucessão (não-pioneira), conhecida popularmente como Jequitibá-branco. *Trema micrantha* possui importância ecológica, uma vez que seus frutos podem servir de alimento para a avifauna e suas flores são visitadas por abelhas (Amorim et al. 2006; Lorenzi 2002). É ainda importante ressaltar que o uso desta espécie é recomendada em programas de plantios florestais, restauração de áreas degradadas e de matas ciliares (AMORIM *et al.*, 2006). Pode ser encontrada em todos os estados brasileiros e prospera na maioria dos habitats, exceto aqueles muito úmidos e sombreados (Lorenzi 2002). *Cariniana estrellensis* está restrita aos estados do Acre, Bahia, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina; assim é encontrada na Floresta Ombrófila, Semidecidual, Mata Atlântica e Cerrado; é importante uma vez que suas sementes são consumidas por macacos, sendo indispensáveis nos reflorestamentos e para manejo de fauna e flora (Lorenzi 2002).

## 1.2 Tolerância das Plantas ao Déficit Hídrico

As respostas das plantas a situações de déficit hídrico 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). Os desmatamentos podem ter sido, em parte, responsáveis por eventos de seca recorrentes nas últimas décadas, sendo necessário o uso de plantas mais tolerantes à seca nos programas de restauração. Diante disso, conhecer e compreender a tolerância das plantas ao déficit hídrico é de importância ecológica, fisiológica e agrônômica; podendo ocorrer devido a mecanismos que são expressos isoladamente ou em conjunto, e que possivelmente

levam à redução dos possíveis efeitos causados pela exposição à seca (Nepomuceno et al. 2001; Chaves et al. 2003).

Dentre as estratégias que aumentam a tolerância das plantas ao déficit hídrico está o desenvolvimento de estruturas funcionais tais como: raízes que possibilitam a maior área de absorção no solo, cutícula bem desenvolvida nas folhas e maior quantidade de estômatos menores que auxiliam no controle da perda de água. Há ainda, plantas que escapam da seca reproduzindo-se antes do período seco (Alvim 1985), outras evitam a desidratação protelando seus efeitos por meio do desenvolvimento de raízes profundas ou de tecidos de acúmulo de água (Ingrouille 1992). Independente das estratégias utilizadas, durante períodos de déficit hídrico muitas mudanças ocorrem no metabolismo vegetal, evidenciando que a tolerância ao déficit hídrico é uma característica multigênica (Nepomuceno et al. 2001).

Uma das respostas fisiológicas em situações de déficit hídrico é o ajuste osmótico; este ocorre por meio do acúmulo de solutos osmoticamente ativos em resposta a condições de baixa disponibilidade hídrica no solo, resultando na redução do potencial osmótico e conseqüentemente do potencial de água das células, essencial para a manutenção da absorção de água de solos pouco hidratados e conseqüentemente do turgor celular. Esta manutenção do turgor é imprescindível para a manutenção dos processos de expansão celular (Chaves-Filho e StacciarinI-Seraphin 2001), sugerindo que o ajuste osmótico aumenta a tolerância ao déficit hídrico (Bianchi et al. 2005).

A síntese e o acúmulo de açúcares solúveis também têm sido relatados como importantes agentes na proteção contra os possíveis danos gerados pelo déficit hídrico. Estudos relatam sua importância no ajuste osmótico, uma vez que proporcionam uma rápida redução do potencial de água das células favorecendo o gradiente decrescente de potencial de água entre o solo e a planta (Pimentel 1999; Chaves-Filho e StacciarinI-Seraphin 2001).

O acúmulo do aminoácido prolina nas células também é uma resposta das plantas a situações de déficit hídrico e ocorre devido ao aumento do fluxo de glutamato, o qual é metabolizado pela enzima Pirrolina-5-Carboxilato Sintetase (P5CS) que regula a taxa de síntese de prolina (Hare et al. 1998). Esta enzima é sintetizada em maior quantidade quando há um decréscimo no potencial osmótico do citoplasma, levando a um conseqüente aumento na formação de prolina, um soluto osmoticamente ativo e compatível com o metabolismo celular (Nepomuceno et al. 2001). Além disso, a prolina tem ação protetora contra danos na membrana celular e também contra a desnaturaçã

de proteínas durante o déficit hídrico. Este aminoácido ainda pode atuar como receptor de elétrons de equivalentes redutores das células (NADPH) por meio da P5CS e da P5C redutase, auxiliando assim na manutenção do equilíbrio do potencial redox celular; e deste modo, reduzindo possíveis danos oxidativos dos fotossistemas e consequente fotoinibição (Ruíz-Sánchez et al. 2011; Hare et al. 1998; Sofo et al. 2004).

O déficit hídrico também pode levar a alterações no metabolismo fotossintético, por exemplo, a redução da condutância estomática, da transpiração e da taxa fotossintética como relatado por Melo et al. (2007). Embora o aparelho fotossintético não seja prejudicado durante o déficit hídrico moderado; o funcionamento deste ocorre em conjunto com a fotorrespiração, havendo redução da atividade de enzimas relacionadas à assimilação de CO<sub>2</sub> (Melo et al. 2007). Portanto, a redução da taxa fotossintética líquida está relacionada com a redução da condutância estomática e da concentração intracelular de CO<sub>2</sub>, além de mudanças na anatomia foliar, por exemplo, aumento na espessura foliar e células mais densas no parênquima clorofiliano reduzindo o espaço intercelular e assim aumentando a resistência à difusão do CO<sub>2</sub> (Chartzoulakis et al. 2002). Estratégias observadas nas gramíneas *Setaria anceps* e *Paspalum paniculatum*, em que houve redução no tamanho dos estômatos associado ao aumento da densidade estomática, possibilitam reduzir a perda de água sem afetar o aporte de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese (Melo et al. 2007).

Estresses ambientais também resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em plantas, e o aumento da tolerância está relacionado, além do acúmulo de solutos compatíveis, à síntese de componentes antioxidantes. De acordo com a toxicidade das ERO, as espécies vegetais necessitam de mecanismos de desintoxicação adequados que proporcionem a rápida remoção desses componentes evitando possíveis danos aos sistemas biológicos das plantas (Ruíz-Sánchez et al. 2011).

Processos metabólicos dependentes de oxigênio como a respiração aeróbia (nas mitocôndrias), fotossíntese (nos cloroplastos) e fotorrespiração (especialmente nos peroxissomos) (Barbosa et al. 2014) levam à síntese de ERO geradas a partir de reações redox. Neste processo, o O<sub>2</sub> pode receber elétrons ou energia de excitação eletrônica, de modo que são formados oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sendo o primeiro relatado como o principal causador da peroxidação lipídica nos cloroplastos (Triantaphylidès e Havaux, 2009). A geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup> nos cloroplastos pode ser induzida pela baixa concentração de CO<sub>2</sub>, ocasionada pelo fechamento estomático em razão de situações de déficit hídrico

(Dabrowska et al. 2007). A limitação da assimilação de  $\text{CO}_2$  no ciclo de Calvin leva a um excesso de NADPH; nestas condições o elétron da ferredoxina reduzida é transferido para o  $\text{O}_2$  formando o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ); o qual também é formado nos peroxissomos, citosol e apoplasto (Ahmad et al. 2008).

### 1.3 Associação de Plantas com Bactérias Promotoras do Crescimento

Alternativas que melhorem a germinação das sementes e o crescimento das plantas e minimizem os danos causados por estresses abióticos são fundamentais para a obtenção de mudas de melhor qualidade e para a redução do custo de produção. Neste sentido, o estudo das relações ecológicas naturais existentes entre a microbiota do solo e as plantas constitui uma ferramenta biotecnológica importante para influenciar positivamente o desenvolvimento inicial de espécies arbóreas neotropicais, proporcionando a formação de mudas com elevada qualidade fisiológica e baixo custo (econômico e ambiental) de produção.

Dentre as estratégias que podem ser utilizadas para a obtenção de mudas de espécies arbóreas de maior qualidade, encontra-se a inoculação com bactérias promotoras do 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 a estresses bióticos e abióticos (Ortiz-Castro et al. 2009, Oliveira et al. 2014). Apesar de possuírem potencial para minimizar os efeitos da degradação ambiental pela sua aplicação em programas de fitorremediação e de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento (Bashan et al. 2012), poucos estudos envolvendo a utilização de BPCP em espécies arbóreas neotropicais no Brasil são disponíveis na literatura.

Os efeitos promotores de crescimento das BPCP podem ser atribuídos ao fornecimento de nutrientes essenciais como nitrogênio (N), proveniente da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e da assimilação de N, fósforo (P), disponibilizado pela solubilização de fosfato do solo ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e o  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) como consequência da ação de ácidos orgânicos que são sintetizados pelas BPCP (Ahmad e Kibret 2014), e o ferro, que pode ser fornecido pela absorção de compostos quelantes (sideróforos) também produzidos pelas bactérias (Glick et al. 2012).

As BPCP podem ainda modular os níveis de hormônios da planta pela produção de auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e ácido jasmônico, podem ainda ser moduladoras da resposta ao etileno, pelo aumento da atividade da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase (Strzelczyk et al. 1994; Molina-Favero et al. 2007). Plantas inoculadas com BPCP apresentam menores níveis de etileno, uma vez que o aumento da atividade da enzima ACC desaminase cliva o precursor do etileno (ACC), reduz os níveis deste hormônio, conferindo maior tolerância às plantas inoculadas devido à manutenção nos níveis de crescimento, pois o etileno inibe o transporte de auxina e o alongamento de raízes induzindo menor crescimento. Deste modo, podem afetar a tolerância da planta a estresses abióticos e bióticos, bem como seu desenvolvimento, especialmente do sistema de raiz, proporcionando, conseqüentemente, um aumento na absorção de água e nutrientes essenciais, como P, pela planta (Glick et al. 2012; Cassán et al. 2008; Saravanakumar et al. 2010; Ruíz-Sánchez et al. 2011; Ahemad e Kibret 2014). Além disso, elas estimulam a bomba de prótons  $H^+$ ATPase proporcionando maior absorção e conseqüente maior disponibilidade de nutrientes para a planta (Yang et al. 2009).

Indiretamente, as BPCP podem estimular o crescimento das plantas pelo controle biológico de fitopatógenos por compostos antimicrobianos, enzimas líticas, bem como por competição (Glick et al. 2007). Ainda, as BPCP apresentam a capacidade de produzir moléculas sinalizadoras, como o óxido nítrico (NO). A ação do NO sobre as plantas ocorre na modulação de diferentes processos metabólicos e fisiológicos, resultando em alteração no desenvolvimento e crescimento de plantas, induzindo a expressão de mecanismos de defesa e favorecendo a aclimação de plantas sob estresses abióticos (déficit hídrico e elevadas intensidades luminosas) e bióticos (Molina-Favero et al. 2007).

Estudos realizados por Ortiz et al (2015) tornaram evidente que a associação das BPCP com mudas da espécie *Trifolium repens* (Trevo branco), nativa da Europa, sob déficit hídrico, aumentou a quantidade de pigmentos fotossintéticos e da taxa fotossintética nessas plantas. Contatou-se ainda, maior quantidade de açúcares solúveis, assim como maior conteúdo de prolina, devido à indução da regulação da via de síntese deste aminoácido, o qual auxilia na manutenção do status hídrico da planta e na proteção de membranas e proteínas contra o estresse (Sandhya et al. 2010).

Os níveis de açúcares solúveis, proteínas e aminoácidos em plantas de milho associadas à BPCP e submetidas ao déficit hídrico aumentaram, proporcionando melhor

absorção da água e íons disponíveis (Sandhya et al. 2010). Ainda, o aumento do conteúdo de açúcares solúveis nessas plantas pode estar associado com a redução das reservas de amido, uma vez que os açúcares solúveis agem como osmorreguladores das células vegetais, sendo um importante fator de proteção contra o déficit hídrico (Sandhya et al. 2010).

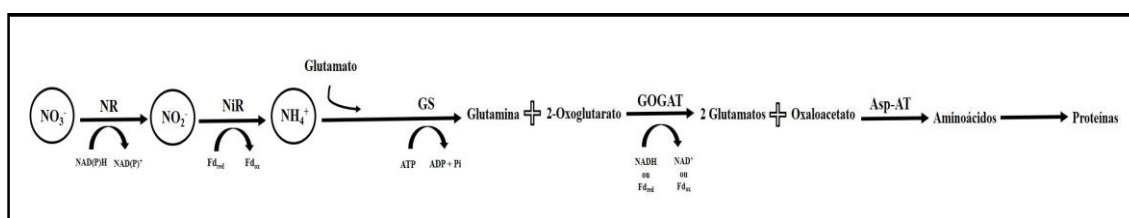
A maior atividade das enzimas catalase e peroxidase foi observada em mudas de *Vigna radiata* (Feijão-da-china) inoculadas com duas espécies de BPCP, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*, submetidas ao déficit hídrico. A maior atividade das enzimas antioxidantes é essencial para a manutenção dos processos celulares nessas plantas em situação de estresse, uma vez que essas enzimas promovem a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, protegendo contra a peroxidação lipídica das membranas e possíveis danos moleculares (Saravanakumar et al. 2010).

Plantas associadas às BPCP também se beneficiam de alterações no metabolismo de nitrogênio (N), incluindo o aumento da fixação biológica de N<sub>2</sub> (James e Baldani 2012) e da assimilação de nitrogênio. Os microrganismos que fixam nitrogênio podem ser classificados de duas maneiras: (a) bactérias simbióticas de fixação de nitrogênio, que incluem membros da família Rhizobiaceae com suas formas simbiontes em plantas leguminosas onde há a formação de nódulos e em árvores não leguminosas como as bactérias do gênero *Frankia*; neste caso as bactérias ocupam a região intracelular das raízes das plantas com as quais estão associadas; e (b) bactérias não-simbióticas de fixação de nitrogênio (vida-livre, associativas ou endofíticas) que fornecem apenas uma parte do nitrogênio necessário para a planta, elas ocupam a região da rizosfera, rizoplano e os espaços intercelulares das raízes e como exemplo as bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous* e *Pseudomonas* (Ahemad e Kibret 2014).

O processo da fixação de N<sub>2</sub> é mediado pelo complexo enzimático nitrogenase, presente nas bactérias. Este complexo é composto por uma metaloenzima de dois componentes, sendo uma dinitrogenase redutase, que é a ferro proteína, e a dinitrogenase (MoFe proteína) na qual o ferro é o co-fator. Três diferentes sistemas de fixação de N podem ser encontrados em diferentes gêneros de bactérias, sendo eles: Mo-nitrogenase, V-nitrogenase e Fe-nitrogenase; e em todos a dinitrogenase redutase fornece elétrons para a dinitrogenase a qual utiliza este poder redutor na redução do N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> (Ahemad e Kibret 2014). É importante ressaltar que a busca por microrganismos

capazes de realizar fixação assimbiótica de nitrogênio é interessante, uma vez que podem substituir fertilizantes químicos nitrogenados que seriam facilmente lixiviados causando danos aos ecossistemas devido ao aumento da eutrofização (Kavamura 2012).

Considerando os processos metabólicos de assimilação de nitrogênio, as BPCP estimulam a ação das enzimas nitrato redutase (NR), glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (Cassán et al. 2008) (Figura 1). O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as principais formas de N inorgânico assimiláveis pelas plantas (Ashton et al. 2008). Assim a associação com as BPCP influencia a reação de redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em uma reação catalisada pela enzima NR. A atividade desta enzima é regulada por processos de fosforilação/desfosforilação; sendo sua síntese influenciada pela disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$ , uma vez que o  $\text{NO}_3^-$  é o substrato e o ativador da enzima (Sodek 2004; Campos 2009). Posteriormente, o  $\text{NO}_2^-$  é reduzido a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) pela enzima Nitrito Redutase (NiR), a qual tem como doadora de elétrons a ferredoxina reduzida (Oaks e Hirel 1985; Campos 2009). Como o amônio é tóxico para as plantas, e sua rápida assimilação é catalisada pela enzima GS; esta enzima, com gasto de ATP, catalisa a união do  $\text{NH}_4^+$  com o glutamato, resultando na formação de moléculas de glutamina. Após a formação da glutamina, a enzima GOGAT catalisa a reação para a síntese de glutamato (Campos 2009). Esse sistema GS-GOGAT tem função de produção de aminoácidos para a síntese de proteínas no próprio tecido e também de sintetizar glutamato e aspartato para a formação de amidas que serão exportadas para outros tecidos (Sodek 2004). Assim, é possível observar que a associação com BPCP pode favorecer a fixação biológica de  $\text{N}_2$  e também a assimilação dos compostos nitrogenados absorvidos pela planta, uma vez que estimula a atividade de enzimas do ciclo de assimilação do  $\text{NO}_3^-$  e do  $\text{NH}_4^+$ .



**Figura 1:** Assimilação de compostos nitrogenados em plantas.  $\text{NO}_3^-$ : Nitrato; NR: Nitrato Redutase;  $\text{NO}_2^-$ : Nitrito; NiR: Nitrito Redutase;  $\text{Fd}_{\text{red}}$ : Ferredoxina reduzida;  $\text{Fd}_{\text{ox}}$ : Ferredoxina oxidada;  $\text{NH}_4^+$ : Amônio; GS: Glutamina Sintetase; Pi: Fosfato Inorgânico; GOGAT: Glutamina:2-oxo-glutarato aminotransferase; AspAT: Aspartato Aminotransferase. Modificado de Taiz e Zeiger (2013).

Diante do exposto e com base na crescente necessidade de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento, e ainda, dos poucos trabalhos disponíveis na literatura sobre os efeitos da associação de BPCP com espécies arbóreas, torna-se evidente a importância de estudos da associação de BPCP com espécies arbóreas neotropicais. Portanto, o presente estudo fornece maiores informações sobre o efeito da associação de BPCP com espécies arbóreas neotropicais sob condições de déficit hídrico no solo. Com o intuito de conhecer os mecanismos de tolerância dessa situação de desafio, buscando a obtenção de mudas de melhor qualidade fisiológica, capazes de serem utilizadas com sucesso em programas recuperação de áreas degradadas e reflorestamento.

## 2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da inoculação com quatro espécies de bactérias (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5, *Methylobacterium komagatae* - ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophyllus* sp.) sobre o metabolismo de raízes e folhas de mudas das espécies arbóreas neotropicais *Trema micrantha* e *Cariniana estrellensis* sob condições de déficit hídrico no solo, relacionando esses dados com aspectos do crescimento e da fisiologia desses indivíduos.

### 2.1 Objetivos Específicos

Nas espécies arbóreas neotropicais inoculadas com as diferentes espécies de BPCP:

- Analisar o *status hídrico* e o estresse oxidativo;
- Avaliar o crescimento e as alterações nas trocas;
- Mensurar o conteúdo de metabólitos primários relacionados ao metabolismo do nitrogênio e do carbono.

## 3. HIPÓTESES

I – Há mudanças no *status hídrico* das mudas inoculadas com BPCP, tornando-as mais tolerantes ao déficit hídrico.

II - Há manutenção do crescimento das mudas inoculadas com BPCP, mesmo quando submetidas ao déficit hídrico.

III - A inoculação com BPCP promove melhora nas trocas gasosas e no metabolismo do nitrogênio das mudas contribuindo com a tolerância ao déficit hídrico.

IV - Há menos danos causados pelo estresse oxidativo nas mudas inoculadas com BPCP quando submetidas ao déficit hídrico.

#### **4. REFERÊNCIAS**

Ahemad M; Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26:1-20.

Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008) Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. *Journal of Plant Biology* 51:167-173.

Aidar MPM, Schmidt S, Moss G, Stewart TGR, Joly CA (2003) Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant, Cell and Environment* 26:389-399.

Alvim PT (1985) *Theobroma cacao*. In A. H. Halevy (ed.) *Handbook of flowering*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Amorim IL, Ferreira RA, Davide AC, Chaves MM (2006) Aspectos Morfológicos de Plântulas e Mudas de *Trema*. *Revista Brasileira de Sementes* 28:86-91.

Ashton IW, Miller AE, Bowman WD, Suding KN (2008) Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. *Oecologia* 156:625-636.

Barbosa MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria 44:453-460.

Bashan Y, Kamnev AA, De-bashan LE (2012) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49:465-479.

Bianchi CAM, Bergonci JI, Bergamaschie H, Dalmago GA (2005) Ajuste osmótico em milho cultivado em diferentes sistemas de manejo de solo e disponibilidade hídrica. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília* 40:645-651.

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

Campos MMS (2009) Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas, Ubatuba, SP. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, Cap. 1.

Cassán F, Sgroy V, Perrig D, Masciarelli O, Luna V (2008) 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.

Chartzoulakis K, Patakas A, Kofidis G, Bosabalidis A, Nastou A (2002) Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. *Scientia Horticulturae* 95:39-50.

Chaves Filho JT, Stacciarini-Seraphin E (2001) 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 de Botânica* 24:199-204.

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239-264.

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

Dabrowska G, Kata A, Goc A, Szechyńska-Hebda M, Skrzypek E (2007) Characteristics of the Plant Ascorbate Peroxidase Family. *Acta Biologica Cracoviensia: Series Botanica* 49:7-17.

D'avila FS, Paiva HN, Leite HG, BarroS NF, Leite FP (2011). Efeito do potássio na fase de rustificação de mudas clonais de eucalipto. *Rev. Árvore* 35:13-19.

Favaretto FV, Martinez CA, Soriani HH, Furriel RPM (2011) Differential responses of antioxidant enzymes in pioneer and late-successional tropical tree species grown under sun and shade conditions. *Environmental and Experimental Botany* 70:20-28.

Glick RB, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, Mcconkey B (2007) Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26:227-242.

Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21:535-553.

Ingrouille M (1992) Diversity and evolution of land plants. Chapman & Hall, London, UK.

James EK, Baldani JI (2012) The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant and Soil* 356:1-3.

Kavamura VN (2012) Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção do crescimento de plantas sob estresse hídrico. 244 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

Lorenzi H (2002) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol. 1. 4ª. edição. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.

Mattsson A (1996) Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forests* 13:223-248.

Mazzanatti T, Calzavara AK, Pimenta JA, Oliveira HC, Stolf-Moreira R, Bianchini E (2015) Light acclimation in nursery: morphoanatomy and ecophysiology of seedlings of three light-demanding neotropical tree species. *Brazilian Journal of Botany* 39:19-28.

Melo HC, Castro EM, Soares AM, Melo LA, Alves JD (2007) Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea* 34:145-153.

Molina-Favero C, Creus CM, Lanteri ML, Correa-Aragunde N, Lombardo MC, Barassi CA, Lamattina, L (2007) Nitric Oxide and Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Common Features Influencing Root Growth and Development. *Advances in Botanical Research* 46:2-13.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent, J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.

Nascimento SP, Bastos EA, Araújo ECE, Freire-Filho FR, Silva EM (2011) Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 15:853-860.

Nepomuceno AL, Neumaier N, Farias JRB, Oya T (2001) Tolerância à seca em plantas: Mecanismos Fisiológicos e Moleculares. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 4:12-18.

Oaks A, Hirel B (1985) Nitrogen Metabolism in Roots. *Ann. Rev. Plant Physiol* 36:345-365.

Oliveira ALM, Costa KR, Ferreira DC, Milani KML, Santos OJAP, Silva MB, Zuluaga MY (2014) A. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. *Biochemistry and Biotechnology Reports* 3:56-77.

Ortiz N, Armad E, Duque E, Roldán A, Azcón R (2015) 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.

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

Pimentel C (1999) Relações hídricas em dois híbridos de milho sob dois ciclos de deficiência hídrica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:2021-2027.

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

Sandhya V, Ali SZ, Grover M., Reddy G, Venkateswarlu B (2010) Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul* 62:21-30.

Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, Subbian P, Samiyappan R (2010) Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:203-209.

Smirnoff N, Tood P, Stewart GR (1985) The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants, *Ann. Bot.* 54:363-374.

Sodek L (2004) Metabolismo do nitrogênio. In: G.B. Kerbauy (org.), *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp 94-113.

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

Strzelczyk E, Kamper M, Li C (1994) Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60.

Tabarelli M, Pinto LP, Silva JMC, Hirota MM, Bedê LC (2005) Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade* 1:132-138.

Taiz L, Zeiger E (2013) *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre.

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

Viana VM, Pinheiro LAFV (1998) Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. *Série Técnica Ipef* 12:25-42.

Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14:1-4.

**Efeitos da associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de *Trema micrantha* (L.) BLUME (Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo**

**ANGÉLICA NUNES TIEPO<sup>1</sup>, RENATA STOLF-MOREIRA<sup>2</sup>**

**Este artigo será submetido para a revista *Planta***

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas, 86051-990, Londrina- PR Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Animal e Vegetal - Caixa Postal 10.011, 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

**Efeitos da associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de *Trema micrantha* (L.) BLUME (Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (RADDI) KUNTZE (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo**

**Resumo**

Inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são uma alternativa para um manejo sustentável e podem promover maiores sucessos na aclimatação de mudas de espécies arbóreas a fatores abióticos. Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com quatro espécies de bactérias (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5, *Methylobacterium komagatae* - ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) sobre o crescimento e fisiologia de mudas das espécies arbóreas neotropicais *Trema micrantha* e *Cariniana estrellensis*, sob condições de déficit hídrico (DH). *T. micrantha* apresentou maior potencial de água quando inoculada com *Azorhizophillus* sp. e *C. estrellensis* quando inoculada com *Azomonas* sp. Houve redução da prolina em *T. micrantha* inoculada com Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.. A massa seca da raiz e da parte aérea não diferiram em ambas as espécies vegetais quando inoculadas com ZM e *Azorhizophillus* sp. As trocas gasosas foram melhores nas mudas de ambas espécies inoculadas com Ab-V5. Houve redução do estresse oxidativo apenas em *T. micrantha* quando inoculada com ZM. Ainda, mudas inoculadas com ZM apresentaram maior atividade da enzima nitrato redutase em ambas espécies. A associação das BPCP com as mudas das espécies arbóreas favorece a ativação de processos metabólicos em DH, especialmente quando as mudas foram inoculadas com ZM em *T. micrantha*, e ZM e Ab-V5 em *C. estrellensis*. Esses dados corroboram a evidência de compatibilidade entre BPCP-plantas, e indicam quais espécies poderiam ser usadas em trabalhos futuros associadas com essas espécies arbóreas, visando a melhor qualidade dessas mudas quando submetidas à seca.

**Palavras-chave:** Ecofisiologia, espécie arbórea neotropical, interação planta-microrganismo, mata atlântica, seca.

**Growth promoting bacteria association effects on *Trema micrantha* (L.) Blume (Cannabaceae) and *Cariniana estrellens* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae) seedlings, under water deficit in the soil.**

**Abstract**

Inoculants containing plant growth promoting bacteria (PGPB) are an alternative for sustainable management and it can promote greater successes in the acclimation of seedlings to abiotic factors. This study aimed to evaluate the inoculation effect with four bacterial strains (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5, *Methylobacterium komagatae* - ZM, *Azomonas* sp and *Azorhizophillus* sp.) on the growth and physiology metabolism of neotropical tree species seedlings *Trema micrantha* and *Cariniana estrellensis*, under drought conditions in soil. *T. micrantha* showed an increase in water potential when inoculated with *Azorhizophillus* sp. and *C. estrellensis* when inoculated with *Azomonas* sp. Proline reduction was observed in *T. micrantha* seedlings inoculated with Ab-V5, *Azomonas* sp. and *Azorhizophillus* sp. The root and shoot dry weight did not differ in both species when inoculated with ZM and *Azorhizophillus* sp. The gas exchange showed higher activity in seedlings of both species inoculated with Ab-V5. Reduction of the oxidative damage was observed only in *T. micrantha* when inoculated with ZM. Seedlings inoculated with ZM showed increase in nitrate reductase activity in both species. The PGPB association with the tree species seedlings favors the metabolic processes activation in drought, especially when *T. micrantha* seedlings were inoculated with ZM, and in the *C. estrellensis* inoculated ZM and Ab-V5. These data corroborate the compatibility evidence in PGPB-plant, and indicate which strains could be used in futures studies associated with these tree species, aiming the higher quality of these seedlings when submitted to drought.

**Key words:** Atlantic forest, drought, ecophysiology, neotropical tree species, plant-microorganism interaction.

## Introdução

O uso de espécies arbóreas neotropicais para a recuperação de áreas degradadas e reflorestamento é um requerimento da legislação brasileira, e tem como objetivo reduzir o impacto ambiental causado pelos desmatamentos e contribuir para a conservação da biodiversidade (Keller et al. 2009). O custo de programas de recuperação de áreas degradadas e de reflorestamento torna-se elevado diante da necessidade continuada de replantio de mudas, decorrente dos altos índices de mortalidade destas mudas em campo, uma vez que são submetidas muitas vezes a condições ambientais para as quais não se encontram devidamente aclimatadas. Por outro lado, quanto mais rápido for o desenvolvimento das mudas após o plantio, menor será a necessidade de manejo, minimizando os custos (Carvalho-Filho et al. 2003).

Mudanças ambientais induzidas pela degradação da cobertura vegetal podem influenciar nas alterações do sistema solo-planta e, com isso, podem ser observadas respostas associadas para tolerar às novas condições (Ortiz et al. 2015). Dentre os fatores de estresses abióticos que mais afetam o desenvolvimento das mudas no campo, encontram-se o déficit hídrico, as altas intensidades luminosas e a deficiência de nutrientes minerais, como por exemplo, o nitrogênio (Franzini et al. 2010; Kraiser et al. 2011). As florestas tropicais são, geralmente, limitadas pela disponibilidade de nitrogênio nas fases iniciais da sucessão, e nas fases mais tardias pela disponibilidade de fósforo (Menge et al. 2012), de forma que os processos de captura, alocação, ciclagem e competição por este nutriente moldam as assembleias florestais (Rastetter et al. 2013). Portanto, a economia do nitrogênio na sucessão é importante para sítios muito degradados e com dificuldade para acumular biomassa. Além disso, eventos de seca têm aumentado nas últimas décadas, os quais estão associados às mudanças climáticas decorrentes do aquecimento do planeta (Stokstad 2004). Previsões indicam que extremos climáticos tenderão a aumentar, incluindo secas mais frequentes e prolongadas, o que torna desejável o uso de plantas mais tolerantes à seca na restauração ecológica (Mendonça 2006).

Alternativas que melhorem a germinação das sementes, o crescimento das plântulas e minimizem os danos causados por esses estresses são fundamentais para a obtenção de mudas de melhor qualidade e para a redução do custo de produção. Neste sentido, o estudo das relações ecológicas naturais existentes entre a microbiota do solo e as plantas, bem como o conhecimento sobre o metabolismo das plantas em condições de

restrição hídrica, constituem ferramentas biotecnológicas importantes que podem influenciar positivamente o desenvolvimento inicial de espécies arbóreas neotropicais. Estes fatores proporcionam a formação de mudas com elevada qualidade fisiológica e baixo custo (econômico e ambiental) de produção (Kusano et al. 2011; Ortiz et al. 2015).

Dentre as estratégias que podem ser utilizadas para a obtenção de mudas de espécies arbóreas de maior qualidade, encontra-se a inoculação com bactérias promotoras do crescimento de 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 (Ortiz-Castro et al. 2009; Bulgarelli et al. 2013). Apesar de possuírem potencial para minimizar os efeitos da degradação ambiental pela sua aplicação em programas de fitorremediação e de reflorestamento de áreas degradadas (Bashan et al. 2012), poucos estudos envolvendo o uso de BPCP em espécies arbóreas nativas no Brasil são disponíveis na literatura.

Essa associação pode favorecer o metabolismo fotossintético e reduzir o estresse oxidativo nas plantas expostas ao déficit hídrico. Nesse sentido, as BPCP induzem o acúmulo de prolina (Hare e Cress 1998), levando à redução do potencial osmótico e de água das plantas, favorecendo a absorção e transporte de água e íons pelas raízes; o que resulta em consequente aumento da atividade fotossintética e da alocação de biomassa vegetal (Ortiz et al. 2015). Ainda, pode induzir o aumento da formação de antioxidantes nos tecidos vegetais, como por exemplo, aumento da atividade das enzimas catalase e peroxidase que são importantes na rota de eliminação das ERO (Ruíz-Lozano et al. 2008; Saravanakumar et al. 2010; Ruíz-Sánchez et al. 2011).

Algumas espécies de BPCP disponibilizam nitrogênio nas suas formas assimiláveis para as plantas com as quais se associam, como já foi observado em cana-de-açúcar, capim-elefante, sorgo e milho (James e Baldani 2012). Esta associação pode também influenciar as rotas de assimilação do nitrogênio por meio da maior atividade enzimática, como por exemplo da enzima nitrato redutase (NR) em mudas de alface associadas com BPCP (Kohler et al. 2008), ou ainda pela maior absorção de  $\text{NO}_3^-$  como observado por Mantelin (2003) em trigo-primavera associado a *Azospirillum brasilense*.

O grau de promoção do crescimento observado nas plantas depende da compatibilidade genótipo-genótipo entre planta e bactéria (Amaral et al., 2016). Assim, padrões de resposta distintos quanto ao acúmulo de N já foram relatados em espécies vegetais tolerantes à salinidade (*Aegiceras corniculatum*, *Bruguiera gymnoihoa*, *Casuarina equisetifolia*), quando associadas com diferentes espécies de BPCP (Xiong et al., 2016). Outro exemplo de compatibilidade é que plantas de trigo de linhagens antigas e modernas são colonizadas por rizobactérias filogeneticamente diversas, enquanto a rizosfera de cultivares modernas são dominadas por *Pseudomonas fluorescens* de crescimento rápido (Amaral et al. 2016).

A maioria dos estudos que abordam a associação com BPCP foi realizada em culturas agrícolas ou com espécies não-nativas do Bioma Mata Atlântica. Os resultados em espécies cultivadas evidenciam a promoção do crescimento vegetal, pelo do aumento de biomassa em alface e milho quando associados com *Rhizobium leguminosarum* (Chabot et al., 1996), em trigo quando associado com *Azotobacter chroococcum* (Kumar e Narula 1999), em feijão (Collavino et al. 2010) e em tomate e pimenta quando associados com *Achromobacter piechaudii* e submetidas ao déficit hídrico (Mayak et al. 2004). Em *Trifolium repens* um incremento de nutrientes, do conteúdo relativo de água e de prolina quando submetida ao déficit hídrico e associada com *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas putida* (Ortiz et al. 2015).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos sobre o crescimento e a fisiologia de folhas e raízes em duas espécies arbóreas neotropicais da Mata Atlântica submetidas ao déficit hídrico, *Trema micrantha* (L.) Blume e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze associadas com quatro espécies de bactérias (*Azospirillum brasilense* - Ab-V5, *Methylobacterium komagatae* - ZM, *Azomonas sp.* e *Azorhizophillus sp.*). Considerando que a associação com as BPCP promove alterações nas mudas de *Trema micrantha* e *Cariniana estrellensis*, as seguintes hipóteses foram testadas: I - Há mudanças no status hídrico das mudas inoculadas com BPCP, tornando-as mais tolerantes ao déficit hídrico. II - Há manutenção do crescimento das mudas inoculadas com BPCP, mesmo quando submetidas ao déficit hídrico. III - A inoculação com BPCP promove melhora nas trocas gasosas e no metabolismo do nitrogênio das mudas contribuindo com a tolerância ao déficit hídrico. IV - Há menos danos causados pelo estresse oxidativo nas mudas inoculadas com BPCP quando submetidas ao déficit hídrico.

## Material e Métodos

### *Material Vegetal e Delineamento Experimental*

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com localização geográfica a 23°08'47" de Latitude Sul e 50°52'23" a Oeste de Greenwich (Caviglione et al. 2000).

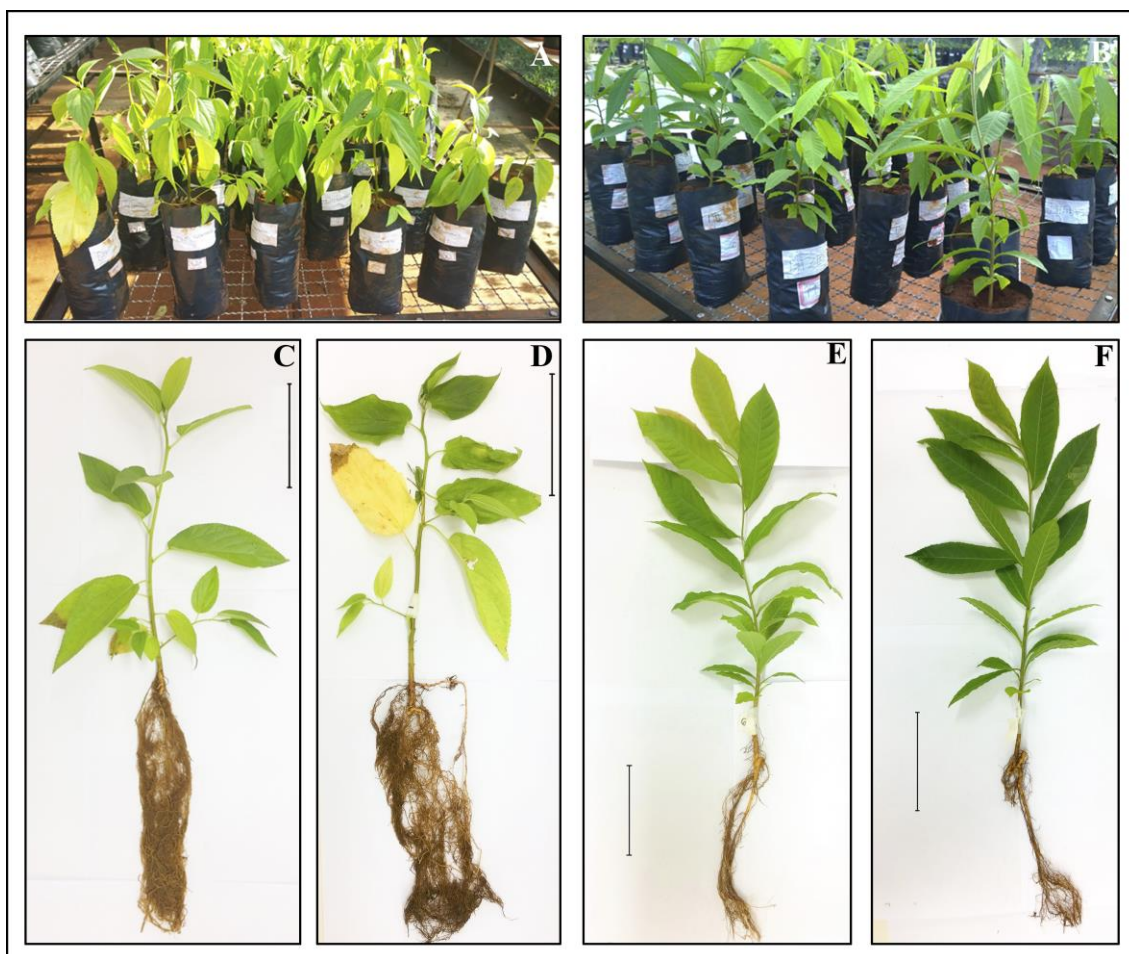
Para a montagem do experimento foram utilizados inóculos de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), *Methylobacterium komagatae* (ZM), *Azomonas* sp. e *Azorhizophyllus* sp., componentes da coleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal da Universidade Estadual de Londrina (CBPCV-UEL). Esses inoculantes foram preparados a partir de cultura pura das espécies identificadas e caracterizadas para uso como biofertilizantes, e que apresentam alto potencial como promotores do crescimento, desenvolvido pelo Núcleo de Pesquisa para o Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL.

Foram utilizadas duas espécies arbóreas neotropicais pertencentes a grupos ecológicos distintos, presentes no Bioma Mata Atlântica, *Trema micrantha* (L.) Blume, intolerante à sombra e encontrada nos estágios iniciais da sucessão (pioneira); e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, tolerante à sombra e encontrada em estágios mais tardios da sucessão (não-pioneira), ambas utilizadas em programas de reflorestamento desenvolvidos pelo Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE), da UEL. As sementes foram coletadas na região de Londrina – PR, sendo que as sementes de *T. micrantha* foram deixadas 20 minutos antes da semeadura em ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para quebra da dormência e posteriormente lavadas em água corrente.

As sementes das espécies arbóreas neotropicais foram tratadas por meio da aplicação de 200 mL de inoculante na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>-1</sup>, em bandejas plásticas de 1L contendo areia previamente esterilizada. Após a germinação, foi realizada a transferência de uma plântula por saco plástico de 2 L (10,5 cm de altura, 9,5 cm de diâmetro inferior e 14 cm de diâmetro superior) contendo solo fértil (pH 5,8; CTC 4,4 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 47,23 ppm; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 3,28 ppm) caracterizado como Latossolo Vermelho eutroférico (Embrapa, 1999) e areia na proporção de 1:1. No momento do

transplântio, foram adicionados 50 mL de inóculo por saco plástico, assim como a cada 30 dias antes do início do experimento (período de aclimatação).

Após o período de aclimatação (60 dias) que corresponde ao crescimento das mudas nos sacos, iniciou-se o tratamento de déficit hídrico. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com oito repetições para cada um dos seguintes tratamentos: 1) controle (sem inóculo), 2) com o inóculo da espécie bacteriana ZM, 3) com o inóculo da espécie bacteriana Ab-V5, 4) com o inóculo da espécie bacteriana *Azomonas* sp., 5) com o inóculo da espécie bacteriana *Azorhizophillus* sp. Um grupo de plantas (controle e inoculadas) foi mantido em capacidade de campo (30 % de umidade gravimétrica – UG - CC). O segundo grupo de plantas (controle e inoculadas) foi mantido em déficit hídrico moderado (DH), sendo para *T. micrantha* 14 % UG, enquanto para *C. estrellensis* esse mesmo nível de déficit hídrico foi alcançado em 13 % UG, visualizando-se também o ponto de murcha da parte aérea adequado para considerar como déficit hídrico moderado, totalizando-se assim dez tratamentos para cada espécie. As mudas foram mantidas por 30 dias em condição de déficit hídrico moderado e, quando necessário, as plantas foram regadas com água a fim de evitar o dessecação (Fig. 2).



**Fig. 2** Espécies vegetais utilizadas nos experimentos montados em casa de vegetação. **A:** *Trema micrantha*. **B:** *Cariniana estrellensis*. **C:** Indivíduo de *T. micrantha* mantido em CC. **D:** Indivíduo de *T. micrantha* submetido ao DH. **E:** Indivíduo de *C. estrellensis* mantido em CC. **F:** Indivíduo de *C. estrellensis* submetido ao DH. As barras equivalem a 10 cm.

### ***Análises Morfológicas***

Para a determinação da massa seca, foram separadas raiz, caule e folhas, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa (Labor, modelo SP 100-150-IN, Presidente Prudente – SP – Brasil) à temperatura de 60 °C até atingirem peso constante, e posteriormente tiveram a massa aferida em balança semi-analítica (Sauter, modelo D-7470, Suíça). As raízes, antes da secagem, foram lavadas em água com o auxílio de peneiras evitando-se desestruturar as raízes e perder material de estudo. Além disso, foi calculada a razão raiz/parte aérea para a massa seca.

### ***Análises Fisiológicas***

O potencial de água das plantas foi medido na parte aérea utilizando-se uma câmara de pressão do tipo Schölander (Soil Moisture – SAPSII, modelo 3115, Santa Barbara, CA, EUA), utilizando-se gás N<sub>2</sub>. A parte aérea com as folhas foi colocada dentro de um recipiente hermético que suporta a pressão do gás inerte, e adicionando-se o gás pode-se observar a seiva exsudando pelo caule. O valor marcado no manômetro no momento 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 as taxas de fotossíntese líquida ( $A$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ). Também foi calculada a eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ) através da razão  $A/C_i$ . Essas análises de trocas gasosas foram realizadas no período da manhã entre as 8 e 10 h, utilizando-se um analisador portátil de gás infravermelho (Irga) (Li-Cor, modelo LI 6400 XT, Biosciences, Lincoln, NE, USA) conectado a uma câmara 6 cm<sup>2</sup>. A PPFD ideal para as análises foi de 1.900 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, conforme estudo prévio e o fluxo de 400 mL min<sup>-1</sup>.

### ***Análises Bioquímicas***

A extração e determinação de prolina foram realizadas com 200 mg de massa fresca de folhas. Para a extração, as amostras foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e adicionado 2 mL de álcool etílico 70 %. A determinação foi realizada a partir da reação

com ninhidrina (1 % m/v) em meio ácido (ácido acético 60 %) em uma reação a 95°C em banho-maria por 20 minutos. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (Molecular Devices, modelo Spectra Max Plus 384, China) a 520 nm (Carillo e Gibon 2011).

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

A peroxidação lipídica foi determinada por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), seguindo a metodologia descrita por Federici et al. (2007). Foram adicionados ao sobrenadante BHT 0,02 %, tampão PBS com pH 7,4 (KCl 1,4 mM;  $KH_2PO_4$  1,4 mM; NaCl 137 mM e  $Na_2HPO_4$  10 mM), ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) em NaOH 0,3 % na presença de ácido tricloroacético (TCA 50 %), a reação ocorreu 60 °C em estufa por 60 minutos. A concentração de TBARS foi determinada por uma curva padrão de Malondialdeído, e obtida pela leitura de fluorescência em 535 nm de excitação e 590 nm de emissão.

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

Foram realizadas extrações e análise de metabólitos primários a partir das duas folhas mais jovens completamente expandidas e da porção apical das raízes. As amostras foram maceradas em  $N_2$  líquido e os compostos de baixo peso molecular (aminoácidos, açúcares solúveis,  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ ) foram extraídos com MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3, v/v/v) por 24 h (Oliveira e Sodek 2013). Após centrifugação por 30 minutos a  $1250 \times g$ , foram adicionados 1 volume de clorofórmio e 1,5 volume de água para cada 4 volumes de sobrenadante obtido. A fase aquosa foi separada após 24 h e mantida por 20 horas a 37°C para a concentração da amostra, antes de ser congelada. Proteínas foram extraídas a partir do resíduo resultante da extração com MCW, pelo tratamento por 24 horas com NaOH 0,1 M.

O amido foi extraído de uma porção de 0,05 g de tecido. Foi adicionado 0,5 mL de MCW por 24h, os tubos foram centrifugados a 13700 \* g, por 5 m e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético 10% e os tubos foram mantidos por 24h a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados a 13700 \* g por 5 m e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 0,5 mL de ácido perclórico 30 %, o sobrandante foi coletado e deixado por 24h a 37°C, esta solução foi utilizada para a dosagem do amido (Mccready et al. 1950).

O  $\text{NO}_3^-$  foi determinado através da sua redução a  $\text{NO}_2^-$  pelo catalisador cloreto de vanádio ( $\text{VCl}_3$  0,4 % em HCl 0,5 N).  $\text{NO}_2^-$  resultante foi detectado pelo reagente de Griess (sulfanilamida 1 % em HCl 1,5 N seguida da adição de N -naftil-etilenodiamina 0,02 %) e detectado pelo comprimento de onda de 540 nm (Miranda et al. 2001).

O  $\text{NH}_4^+$  foi determinado pela reação de Berthelot com o reagente 1 (fenol 1 % e nitroprussiato de sódio 0,2 mM) e com o reagente 2 (NaOH 125 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  150 mM e NaClO 0,12 %). Após a reação de 35 min a 37 °C, o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  foi determinado pela leitura da absorbância a 625 nm (McCullough 1967).

O conteúdo de aminoácidos livres totais foi determinado utilizando tampão citrato 0,2 M (pH 5), ninhidrina 5 % (em metilcelusolve) e KCN 0,01 M (em metilcelusolve). Os tubos foram mantidos fechados por 20 min a 100 °C. Ao final, foi adicionado etanol 60 % e a quantificação realizada em absorbância de 570 nm (Yemm e Cocking 1955). O conteúdo de proteínas foi determinado com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante (Bradford 1976).

Açúcares solúveis totais foram analisados após reação a 100 °C em banho-maria com antrona 0,15 % em meio ácido e determinados espectrofotometricamente em 660 nm. Amido foi analisado espectrofotometricamente em 490 nm após reação com fenol sulfúrico 5 % (Mccready et al. 1950; Graham e Smydzuk 1965).

A porção mediana das raízes e as duas folhas mais jovens completamente expandidas foram coletadas e imediatamente utilizadas para a análise enzimática. A atividade da enzima NR foi determinada *in vivo* baseando-se no método proposto por Stewart et al. (1986). Amostras de raízes e folhas (0,15 g) foram cortadas em segmentos e transferidas para seringas contendo o meio de reação ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05 M pH 7,5; propanol 1 %;  $\text{KNO}_3$  0,05 M). As seringas foram mantidas no escuro a temperatura ambiente sob vácuo (para a infiltração do meio de reação nos tecidos), após 40 minutos,

uma alíquota do meio foi coletada para a dosagem do  $\text{NO}_2^-$ , formado a partir do substrato  $\text{NO}_3^-$ , utilizando-se o reagente de Griess. A leitura foi realizada em 540 nm (Hageman e Reed 1980).

Em todas as análises espectrofotométricas referentes aos metabólitos primários, a determinação das absorbâncias foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas da Molecular Devices, modelo Spectra Max Plus 384, China. Exceto para o amido e os açúcares solúveis, em que a leitura foi realizada no espectrofotômetro da Thermo Fischer Scientific, modelo Genesys 6, EUA.

Para o cálculo do conteúdo dos metabólitos primários e atividade enzimática, foi realizada a correção da massa fresca em massa seca, uma vez que o potencial de água poderia interferir na massa coletada para as análises. Para isso, os valores da massa seca de folhas e raízes foram divididos pelos valores de suas respectivas massas frescas para cada um dos tratamentos, e o valor de correção obtido foi multiplicado pela massa fresca coletada para cada uma das análises bioquímicas. Ao fim de cada análise os valores encontrados para os dados bioquímicos foram divididos pelo fator de correção final da massa seca.

### ***Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2)***

Os resultados das análises realizadas foram aplicados no Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2), descrito por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez et al. (2013). Esta versão do IBR é baseada no princípio de desvio de referência entre um estado perturbado e um estado não perturbado (Sanchez et al. 2013). E no presente estudo foi aplicado com modificações, assim a somatória final dos índices não foi realizada; e os índices de desvio calculados para cada parâmetro foram usados apenas para a construção do gráfico de radar.

O desvio entre os resultados das análises das plantas submetidas ao déficit hídrico (DH) e inoculadas com ZM, Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. foi comparado aos resultados mensurados nas plantas do Controle (não inoculadas) em DH (resultado basal). O resultado basal de cada análise ( $T_0$ ) foi usado como valor de referência. Para cada análise, a média dos valores obtidos para cada inóculo e a média do Controle foi transformada em LOG ( $Y_i$ ). No passo seguinte, calcularam-se uma média geral ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $s$ ) para cada uma das análises em todos os inóculos e no Controle. Posteriormente, os valores de  $Y_i$  foram padronizados pela fórmula  $Z_i = (Y_i$

-  $\mu$ ) /  $s$ , e a diferença entre  $Z_i$  e  $Z_0$  ( $T_0$ ) foi utilizada para definir o índice de desvio de cada análise (biomarcador) (A).

Para obter uma resposta de biomarcadores múltiplos integrados, o valor de A para cada análise foi calculado para cada um dos tratamentos. Para cada inóculo, os valores de A calculados para cada análise foram representados em um gráfico radar, representando o desvio de referência de cada biomarcador avaliado. A área acima de 0 representa o aumento do biomarcador em relação ao Controle, e a área abaixo de 0 representa a redução do biomarcador em relação ao Controle.

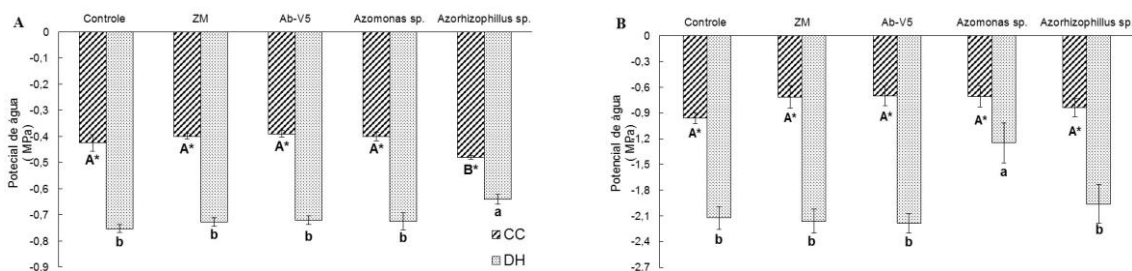
### *Análises Estatísticas*

Para as análises morfológicas e de trocas gasosas foram utilizadas oito repetições, e para as análises de potencial de água e bioquímicas foram utilizadas quatro repetições. Os dados quantitativos foram submetidos a uma análise de variância ANOVA de dois fatores (5 X 2), comparando o efeitos da inoculação dentro de cada espécie, e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando-se o pacote estatístico SAS v. 9.3 (SAS Institute, 2001).

## **Resultados**

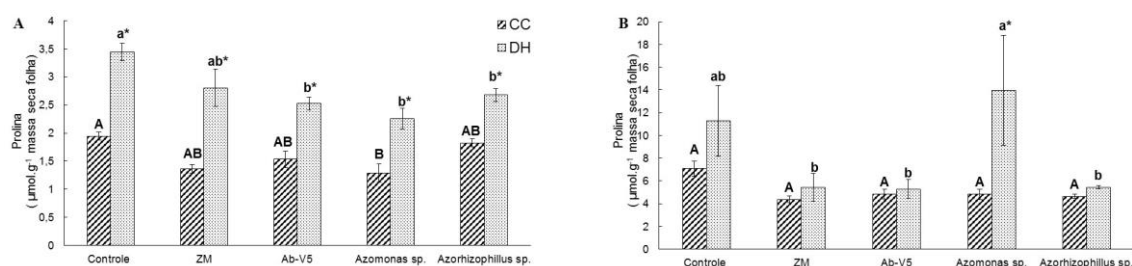
### *Status hídrico e ajuste osmótico*

Nas duas espécies arbóreas, o valor de potencial de água ( $\psi_w$ ) das mudas submetidas ao DH reduziu em relação àquelas mudas mantidas em CC em todos os tratamentos, indicando que as mudas atingiram o déficit hídrico moderado. Em mudas de *T. micrantha* inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em CC o valor de  $\psi_w$  foi menor, enquanto na condição de DH essas mudas apresentaram maior valor de  $\psi_w$ , ambas comparadas ao controle (Fig. 3 A). Em mudas de *C. estrellensis* inoculadas com *Azomonas* sp. em DH o valor de  $\psi_w$  também foi maior, comparadas ao controle (Fig. 3 B).



**Fig. 3** Potencial de água em folhas de *Trema micrantha* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Maiores quantidades de prolina foram observadas nas mudas de *T. micrantha* submetidas ao DH; e nas mudas inoculadas com *Azomonas* sp. em CC o acúmulo de prolina foi menor em relação ao controle; também houve redução nas mudas inoculadas com Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. em DH, todas em relação ao controle. (Fig. 4 A). Em *C. estrellensis* mudas inoculadas com *Azomonas* sp. submetidas ao DH apresentaram aproximadamente três vezes mais prolina, em relação àquelas mantidas em CC (Fig. 4 B).



**Fig. 4** Conteúdo de prolina em folhas de *Trema micrantha* (A) e *Cariniana estrellensis* (B) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco

está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### *Análise de crescimento*

Os valores de massa seca da raiz em *T. micrantha* não diferiram nas mudas inoculadas com ZM e *Azorhizophillus* sp. submetidas ao DH, quando comparadas com as mudas em CC. A manutenção dos valores de massa seca da parte aérea também foi observada nas mudas inoculadas com ZM. Maiores valores da razão raiz/parte aérea foram observados em todos os tratamentos submetidos ao DH (Tabela 1).

Em *C. estrellensis*, os valores de massa seca da raiz não diferiram nas mudas inoculadas com ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. submetidas ao DH, comparadas com aquelas em CC; enquanto mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em CC apresentaram menores valores da massa seca da raiz, comparadas ao controle. Os valores de massa seca da parte aérea não diferiram em mudas inoculadas com ZM e *Azorhizophillus* sp. submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Menores valores da razão raiz/parte aérea foram observados em mudas inoculadas com ZM e submetidas ao DH; enquanto maiores valores dessa razão foram observados em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. e submetidas ao DH, ambas comparadas com aquelas em CC (Tabela 1).

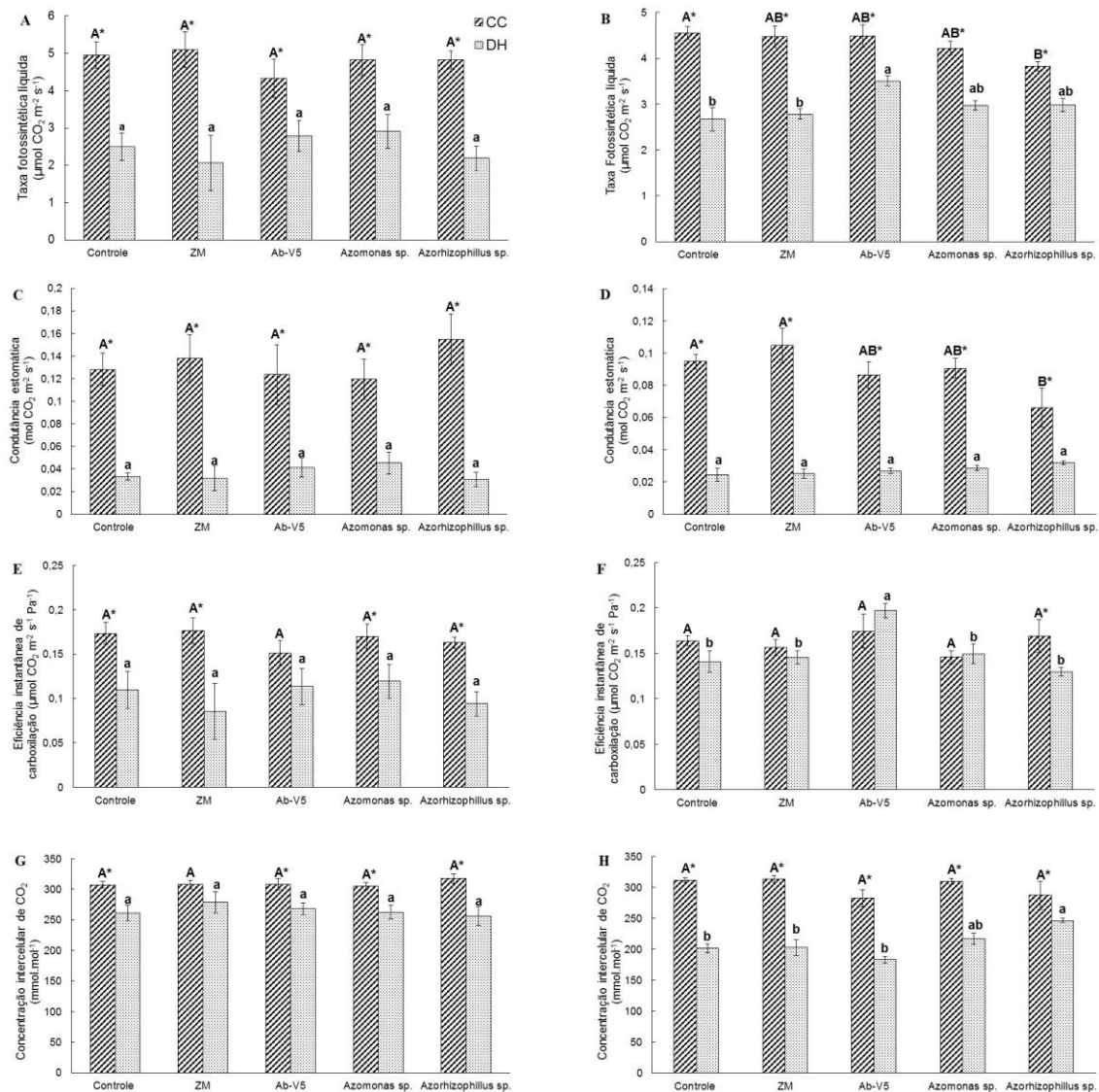
**Tabela 1:** Variáveis morfológicas de mudas de *Trema micrantha* e *Cariniana estrellensis* inoculadas com quatro espécies de bactérias (ZM, Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Os valores são médias  $\pm$  erros-padrão (n=8). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Espécie Arbórea	Parâmetros Morfológicos		Controle	ZM	Ab-V5	<i>Azomonas</i> sp.	<i>Azorhizophillus</i> sp.
<i>Trema micrantha</i>	Massa seca da raiz (g)	CC	1,58 $\pm$ 0,11 AB*	1,20 $\pm$ 0,12 B	1,44 $\pm$ 0,10 AB*	1,85 $\pm$ 0,15 A*	1,19 $\pm$ 0,15 B
		DH	1,05 $\pm$ 0,07 a	1,16 $\pm$ 0,12 a	1,10 $\pm$ 0,14 a	1,28 $\pm$ 0,07 a	1,04 $\pm$ 0,04 a
<i>Trema micrantha</i>	Massa seca da parte aérea (g)	CC	1,24 $\pm$ 0,09 AB*	1,09 $\pm$ 0,14 AB	1,26 $\pm$ 0,09 AB*	1,38 $\pm$ 0,13 A*	0,94 $\pm$ 0,13 B*
		DH	0,64 $\pm$ 0,05 a	0,86 $\pm$ 0,08 a	0,70 $\pm$ 0,10 a	0,67 $\pm$ 0,08 a	0,61 $\pm$ 0,06 a
<i>Trema micrantha</i>	Razão Raiz/Parte aérea	CC	1,34 $\pm$ 0,10 A	1,11 $\pm$ 0,09 A	1,05 $\pm$ 0,06 A	1,30 $\pm$ 0,06 A	1,23 $\pm$ 0,03 A
		DH	1,89 $\pm$ 0,14 a*	1,46 $\pm$ 0,05 ab*	1,37 $\pm$ 0,10 b*	1,96 $\pm$ 0,27 a*	1,80 $\pm$ 0,18 ab*
<i>Cariniana estrellensis</i>	Massa seca da raiz (g)	CC	2,00 $\pm$ 0,16 A*	1,73 $\pm$ 0,10 AB	2,02 $\pm$ 0,12 A*	1,68 $\pm$ 0,08 AB	1,58 $\pm$ 0,05 B
		DH	1,42 $\pm$ 0,11 a	1,41 $\pm$ 0,08 a	1,46 $\pm$ 0,06 a	1,52 $\pm$ 0,12 a	1,53 $\pm$ 0,07 a
<i>Cariniana estrellensis</i>	Massa seca da parte aérea (g)	CC	1,77 $\pm$ 0,12 AB*	1,57 $\pm$ 0,10 B	1,80 $\pm$ 0,14 AB*	1,98 $\pm$ 0,11 A*	1,50 $\pm$ 0,08 B
		DH	1,40 $\pm$ 0,05 a	1,38 $\pm$ 0,10 a	1,35 $\pm$ 0,10 a	1,48 $\pm$ 0,06 a	1,34 $\pm$ 0,06 a
<i>Cariniana estrellensis</i>	Razão Raiz/Parte aérea	CC	0,95 $\pm$ 0,02 B	1,25 $\pm$ 0,05 A*	1,15 $\pm$ 0,07 AB	0,94 $\pm$ 0,06 B	0,96 $\pm$ 0,04 B
		DH	0,96 $\pm$ 0,06 b	1,075 $\pm$ 0,068 ab	1,11 $\pm$ 0,04 ab	0,93 $\pm$ 0,06 b	1,23 $\pm$ 0,05 a*

### *Fotossíntese*

Em *T. micrantha*, menores valores da taxa fotossintética ( $A$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) foram observados em mudas submetidas ao DH (Fig. 5 A e C). Os valores da eficiência instantânea de carboxilação ( $k$ ) não diferiram nas mudas inoculadas com Ab-V5 e submetidas ao DH, comparadas com aquelas mantidas em CC, enquanto nos demais tratamentos com as espécies de bactérias menores valores foram observados nas mudas submetidas ao DH (Fig. 5 E). A concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (Fig. 5 G) foi maior em todas as mudas mantidas em CC, exceto na inoculação com ZM, na qual não houve diferença entre CC e DH.

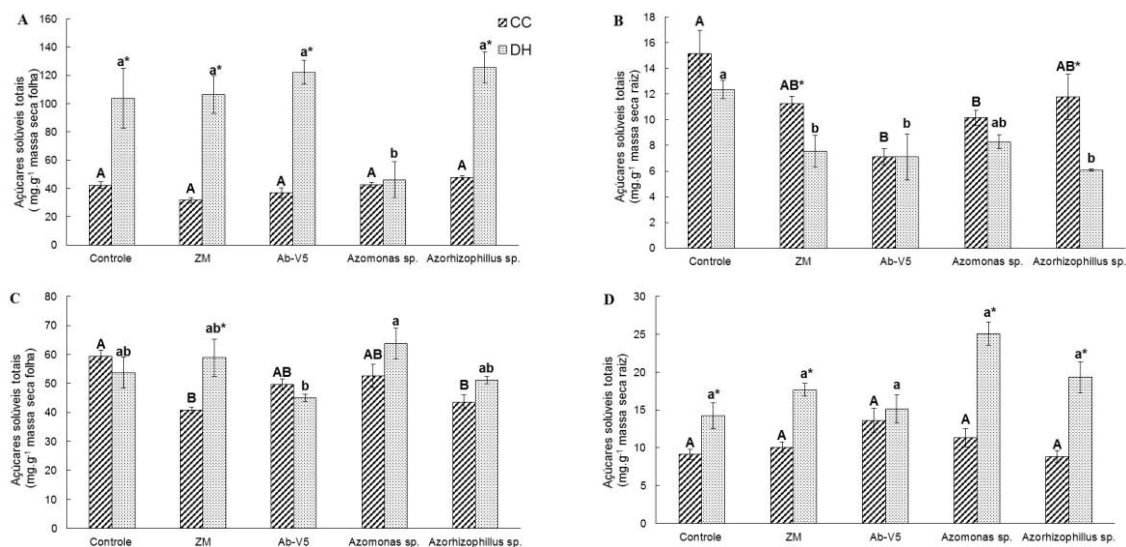
Em *C. estrellensis* menores valores de  $A$  e  $g_s$  foram observados nas mudas submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Ainda, menores valores de  $A$  foram observados em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em CC, e maiores valores de  $A$  foram observados em mudas inoculadas com Ab-V5 em DH, ambas comparadas com os respectivos controles (Fig. 5 B). Valores de  $g_s$  foram menores em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em CC, comparadas com o controle (Fig. 5 D). Menores valores de  $k$  foram observados em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. e submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC, enquanto mudas inoculadas com Ab-V5 em DH apresentaram maiores valores de  $k$ , comparadas ao controle (Fig. 5 F). A  $C_i$  (Fig. 5 H) foi maior em todas as mudas mantidas em CC em relação àquelas submetidas ao DH. E entre as mudas submetidas ao DH, aquelas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. apresentaram o maior valor neste parâmetro.



**Fig. 5** Trocas gasosas em mudas de *Trema micrantha* (A, C, E, G) e *Cariniana estrellensis* (B, D, F, H) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. A e B: Taxa fotossintética líquida. C e D: Condutância estomática. E e F: Eficiência instantânea de carboxilação. G e H: Concentração intercelular de  $\text{CO}_2$ . Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão ( $n=8$ ). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

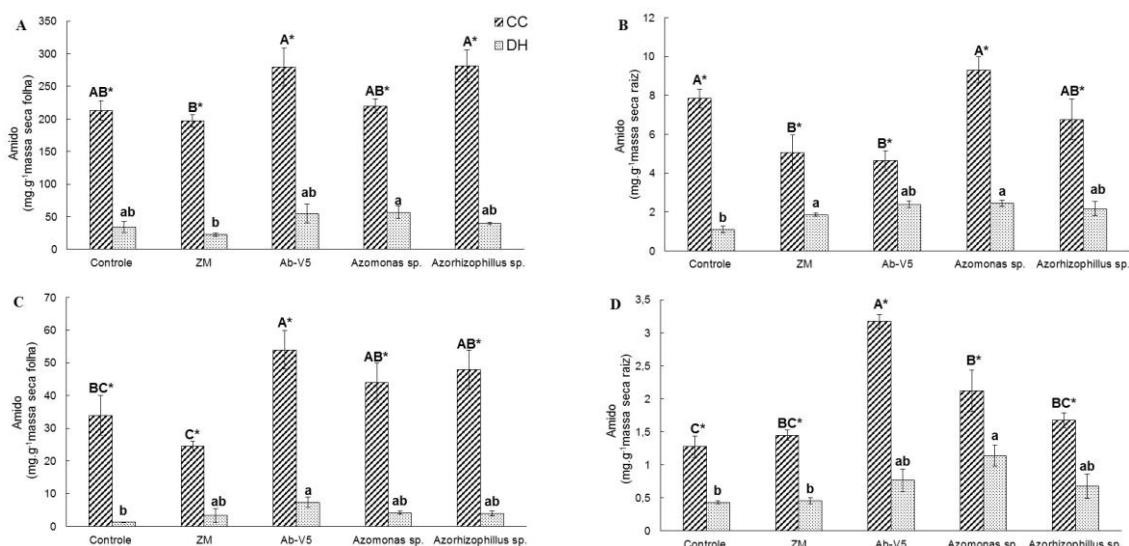
Foi observada maior quantidade de açúcares solúveis totais (AST) em folhas de *T. micrantha* submetidas ao DH, exceto nas mudas inoculadas com *Azomonas* sp., nas quais não foi observada diferença quando comparadas àquelas em CC. Ainda, estas mudas em DH apresentaram aproximadamente duas vezes menos AST quando

comparadas com o controle (Fig. 6 A). Nas raízes das mudas inoculadas com ZM e *Azorhizophillus* sp. submetidas ao DH, menores quantidades de AST foram observadas, em relação àquelas mantidas na CC, enquanto nos demais tratamentos não foram observadas diferenças. Nas raízes das mudas inoculadas com Ab-V5 e *Azomonas* sp. em CC, foi observado aproximadamente uma vez e meia menos AST em relação ao controle; enquanto naquelas em condição de DH a quantidade de AST foi aproximadamente a metade nas mudas inoculadas com ZM, Ab-V5 e *Azorhizophillus* sp., comparadas ao controle (Fig. 6 B). Em *C. estrellensis* apenas nas folhas das mudas inoculadas com ZM e submetidas ao DH foi observada maior quantidade de AST, comparadas àquelas em CC. Porém, houve redução nas folhas das mudas inoculadas com ZM e *Azorhizophillus* sp. em CC, comparadas ao controle (Fig. 6 C). Nas raízes das mudas de *C. estrellensis* a maioria dos tratamentos apresentou maior quantidade de AST quando submetidas ao DH, exceto nas mudas inoculadas com Ab-V5, comparadas àquelas em CC (Fig. 6 D).



**Fig. 6** Açúcares solúveis totais (AST) em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

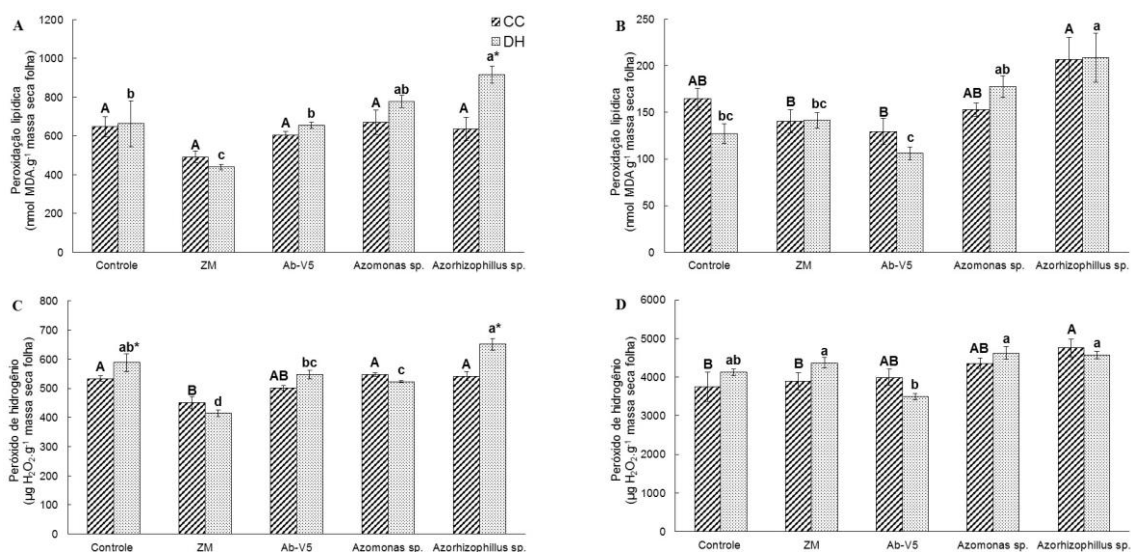
Houve redução da quantidade de amido nas folhas e nas raízes de *T. micrantha* e *C. estrellensis* submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC, sendo que para as folhas de *T. micrantha* a redução foi de aproximadamente cinco vezes, e para as folhas de *C. estrellensis* a redução foi de aproximadamente dez vezes. Ainda, menores quantidades de amido foram observadas nas raízes das mudas de *T. micrantha* inoculadas com ZM e Ab-V5 em CC; enquanto maiores quantidades foram observadas nas raízes de mudas inoculadas com ZM e *Azomonas* sp. em DH, ambas comparadas aos respectivos controles (Fig. 7 A e B). Maior quantidade de amido foi observada em folhas das mudas de *C. estrellensis* inoculadas com Ab-V5 em CC e em DH, comparadas aos respectivos controles. Essa maior quantidade de amido também foi observada nas raízes das mudas inoculadas com Ab-V5 e *Azomonas* sp. em CC, assim como nas mudas inoculadas com *Azomonas* sp. em DH, ambas comparadas aos respectivos controles (Fig. 7 C e D).



**Fig. 7** Amido em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Estresse oxidativo

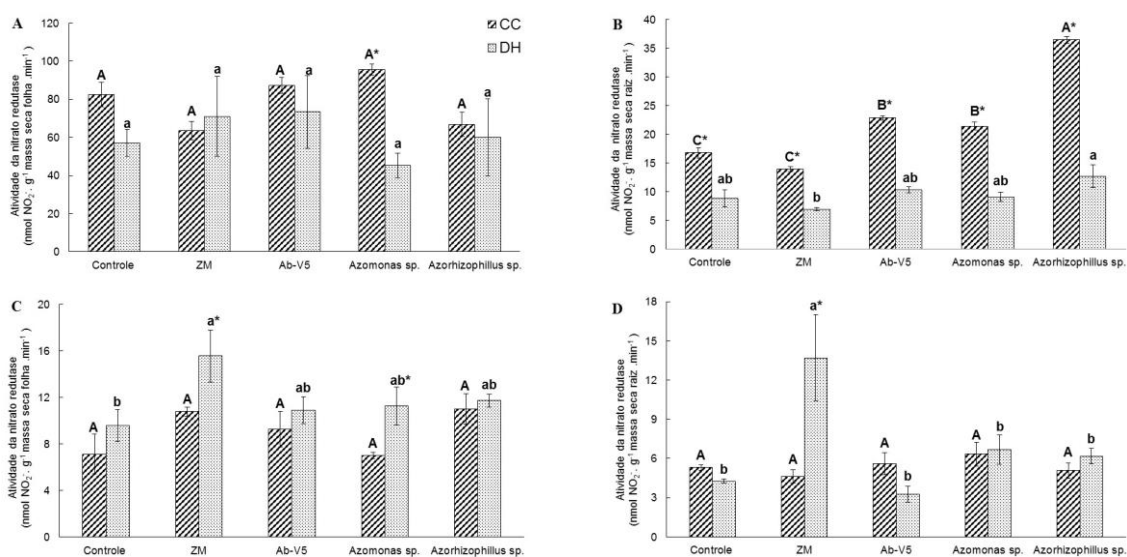
As mudas de *T. micrantha* inoculadas com *Azorhizophillus* sp. e submetidas ao DH apresentaram maiores valores de peroxidação lipídica e de peróxido de hidrogênio quando comparadas àquelas mantidas em CC (Fig. 8 A e C). Menores valores de peroxidação lipídica foram observados em mudas inoculadas com ZM, e maiores valores em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp., ambas em DH, comparadas ao controle (Fig. 8 A). Ainda, menores valores de peróxido de hidrogênio foram observados em mudas inoculadas com ZM em CC; e em mudas inoculadas com ZM e *Azomonas* sp. em DH, todas comparadas aos respectivos controles. Em *C. estrellensis* houve aumento da peroxidação lipídica em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em DH e do peróxido de hidrogênio em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em CC, comparadas aos respectivos controles (Fig. 8 B e D).



**Fig. 8** Avaliação do dano oxidativo em folhas de *Trema micrantha* (A e C) e *Cariniana estrellensis* (B e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. A e B: Peroxidação lipídica. C e D: Peróxido de hidrogênio. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

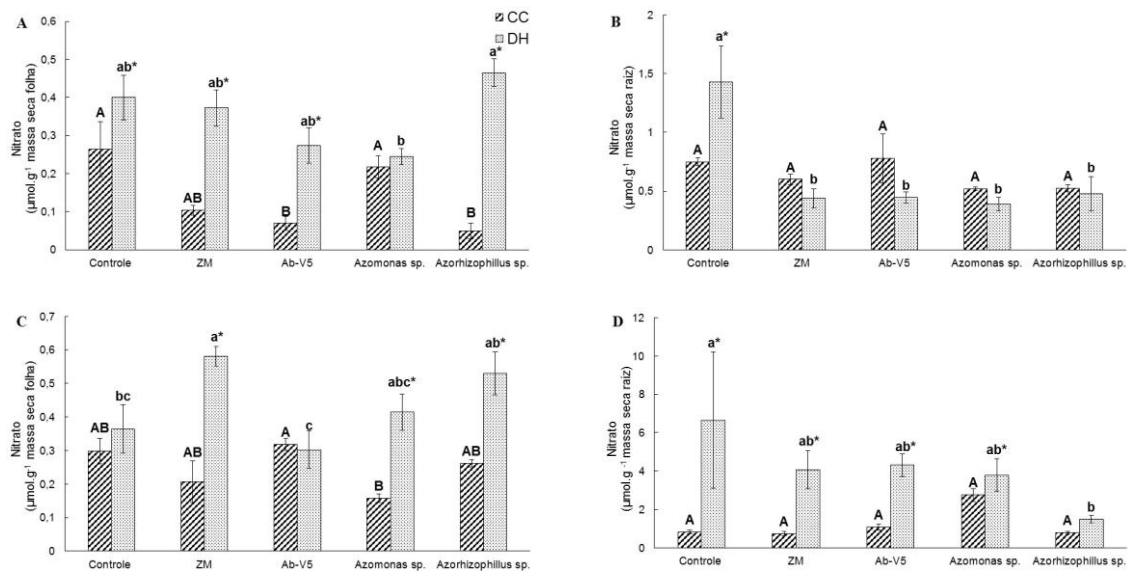
## Metabolismo do nitrogênio

A atividade da enzima nitrato redutase (NR) foi menor apenas nas folhas de *T. micrantha* inoculadas com *Azomonas* sp. e submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Em raízes foi observada redução da atividade da NR em todas as mudas submetidas ao DH; porém, mudas inoculadas com Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. em CC apresentaram maior atividade da NR, comparadas ao controle (Fig. 9 A e B). Em *C. estrellensis* foi observado aumento da atividade da NR nas folhas das mudas inoculadas com ZM e *Azomonas* sp. em DH, comparadas àquelas em CC, assim como nas mudas inoculadas com ZM em DH, comparadas ao controle. Nas raízes, as mudas inoculadas com ZM em DH apresentaram um aumento de aproximadamente três vezes da atividade da NR, tanto comparadas àquelas em CC quanto com o controle (Fig. 9 C e D).



**Fig. 9** Atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

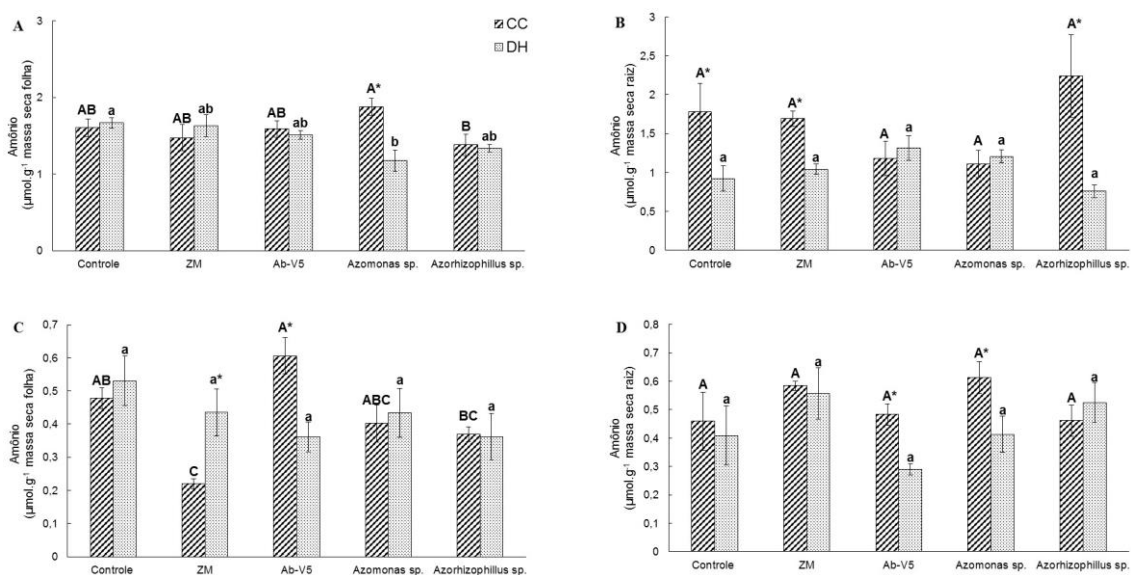
Maior concentração de nitrato foi observada em folhas de *T. micrantha* submetidas ao DH, exceto nas mudas inoculadas com *Azomonas* sp., comparadas àquelas em CC. Menores teores de nitrato foram observados em folhas de mudas inoculadas com Ab-V5 e *Azorhizophillus* sp. em CC, comparadas ao controle. Houve diminuição do nitrato nas raízes das mudas inoculadas e submetidas ao DH em relação ao controle (Fig. 10 A e B). Em folhas de *C. estrellensis* foi observado aumento do teor do nitrato nas mudas inoculadas com ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Ainda, maiores teores de nitrato foram observados nas folhas de mudas inoculadas com ZM em DH, comparadas ao controle. Nas raízes foi observado menor teor de nitrato nas mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. e submetidas ao DH, comparadas ao controle (Fig. 10 C e D).



**Fig. 10** Concentração de nitrato em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão ( $n=4$ ). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Menor teor de amônio nas folhas de *T. micrantha* foi observado nas mudas inoculadas com *Azomonas* sp. e submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Nas

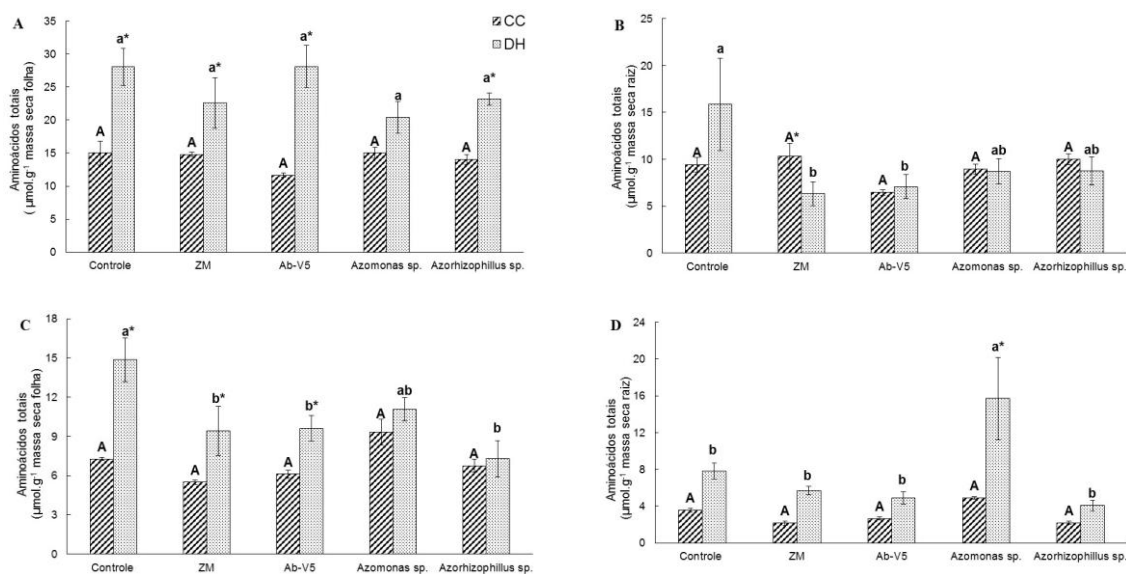
raízes, não houve diferença na quantidade de amônio das mudas inoculadas com Ab-V5 e com *Azomonas* sp. submetidas ao DH em relação às que foram mantidas em CC (Fig. 11 A e B). Aproximadamente o dobro do teor de amônio foi observado nas folhas de *C. estrellensis* das mudas inoculadas com ZM e submetidas ao DH, em relação àquelas em CC. Enquanto menor teor foi observado nas mudas inoculadas com Ab-V5 submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. As mudas inoculadas com ZM em CC também apresentaram o menor teor de amônio, comparadas ao controle. Nas raízes o menor teor de amônio foi observado em mudas inoculadas com Ab-V5 e *Azomonas* sp. submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC (Fig. 11 C e D).



**Fig. 11** Concentração de amônio em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em folhas das mudas de *T. micrantha* inoculadas com *Azomonas* sp. não houve diferença na quantidade de aminoácidos totais entre DH e CC. Nas raízes das mudas inoculadas com ZM e submetidas ao DH foi observada menor quantidade de aminoácidos totais, quando comparadas àquelas em CC. Nas raízes das mudas

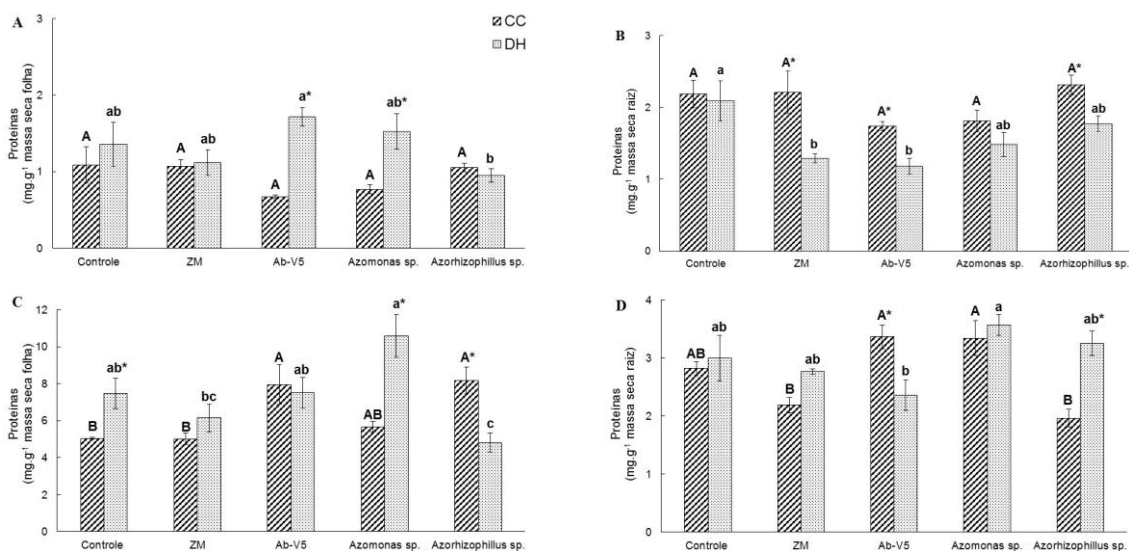
inoculadas com ZM e Ab-V5 em condições de DH houve redução de aproximadamente metade da quantidade de aminoácidos totais, comparadas ao controle (Fig. 12 A e B). Em *C. estrellensis*, maior quantidade de aminoácidos totais foi observada nas folhas das mudas inoculadas com ZM e Ab-V5 submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Ainda, menor quantidade de aminoácidos totais foi observada nas folhas de mudas inoculadas com ZM, Ab-V5 e *Azorhizophillus* sp. em DH, comparadas ao controle. Nas raízes maior quantidade de aminoácidos totais foi observada nas mudas inoculadas com *Azomonas* sp. e submetidas ao DH, comparadas tanto àquelas em CC como com o controle (Fig. 12 C e D).



**Fig. 12** Concentração de aminoácidos em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A quantidade de proteínas foi aproximadamente duas vezes maior nas folhas de *T. micrantha* das mudas inoculadas com Ab-V5 e *Azomonas* sp. submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC. Nas raízes menor quantidade de proteínas foi observada nas mudas inoculadas com ZM, Ab-V5 e *Azorhizophillus* sp. submetidas ao DH, comparadas àquelas em CC; assim como menor quantidade de proteínas também foi

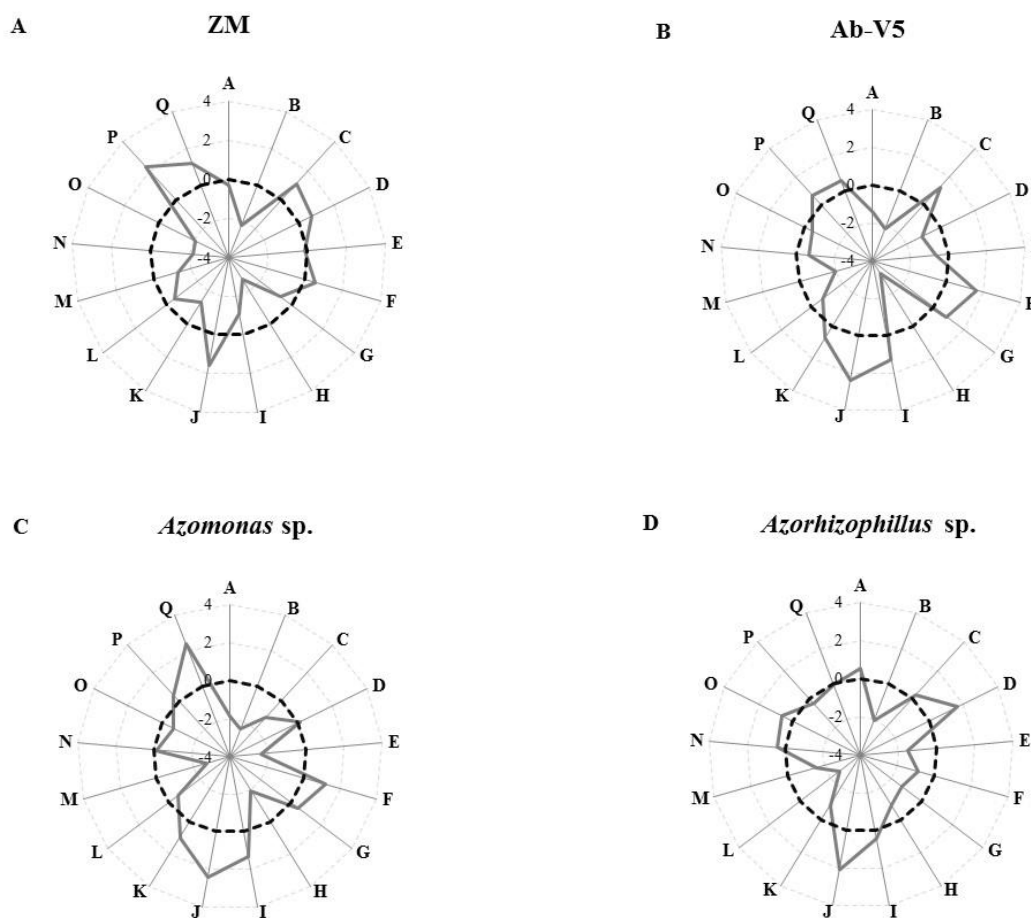
observada nas mudas inoculadas com ZM e Ab-V5 em DH, comparadas ao controle (Fig. 13 A e B). Nas folhas de *C. estrellensis*, maior quantidade de proteínas foi observada em mudas inoculadas com *Azomonas* sp.; enquanto menor quantidade foi observada nas mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp., ambas submetidas ao DH e comparadas àquelas em CC. Mudanças inoculadas com Ab-V5 e *Azorhizophillus* sp. em CC apresentaram aproximadamente uma vez e meia mais proteínas nas folhas, comparadas ao controle; enquanto em mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. em DH menor quantidade de proteínas foi observada, comparadas ao controle. Nas raízes das mudas inoculadas com Ab-V5 e submetidas ao DH menor quantidade de proteínas foi observada; enquanto nas mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. e submetidas ao DH a quantidade de proteínas foi maior, comparadas àquelas em CC (Fig. 13 C e D).



**Fig. 13** Concentração de proteína em folhas e raízes de *Trema micrantha* (A e B) e *Cariniana estrellensis* (C e D) inoculadas com quatro espécies de bactérias (Ab-V5, ZM, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.) e mantidas no solo na capacidade de campo (CC) ou submetidas ao déficit hídrico moderado (DH) durante 30 dias. Colunas hachuradas correspondem às plantas em CC e colunas sombreadas correspondem às plantas em DH. Barras em cima das colunas correspondem ao erro padrão (n=4). Letras maiúsculas comparam os tratamentos mantidos em CC, e letras minúsculas comparam os tratamentos mantidos em DH. O asterisco está presente quando há diferença em um mesmo tratamento entre CC e DH. Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

*Respostas integradas da associação de BPCP com mudas de espécies arbóreas em déficit hídrico*

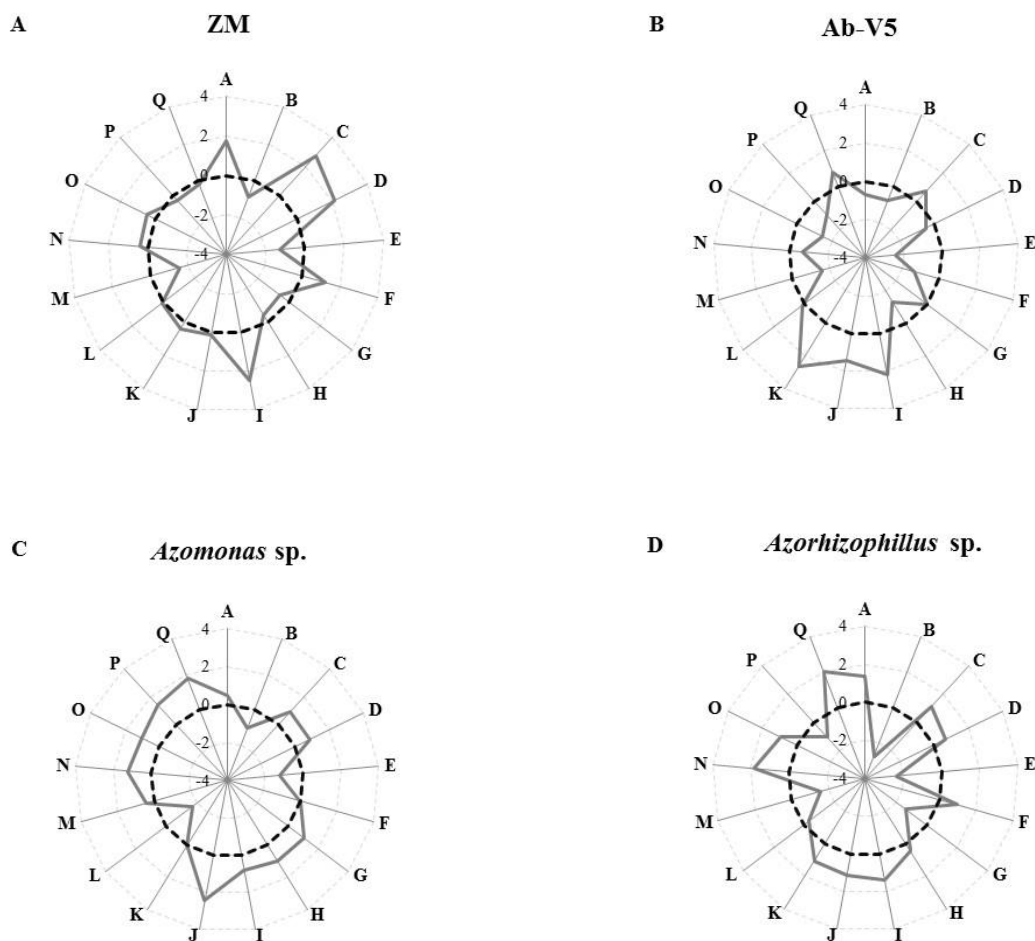
Para *Trema micrantha* os gráficos de radar plotados a partir do cálculo dos valores de desvio entre cada inóculo e o controle estão mostrados na Figura 14. Entre *Azomonas* sp. (Fig. 14 A) e ZM (Fig. 14 B) as análises que mais influenciaram o resultado obtido foram a atividade da enzima nitrato redutase de folhas (C) e de raízes (D), e a quantidade amido nas folhas (I). Além disso, os valores de peroxidação lipídica (N) e do peróxido de hidrogênio (O) são claramente menores nas mudas inoculadas com ZM. Nestas mudas foi, também, possível observar o maior incremento de massa seca na parte aérea (P). Para as mudas inoculadas com Ab-V5 (Fig. 14 B) e com *Azorhizophillus* sp. (Fig. 14 D), os valores dos biomarcadores plotados no gráfico indicam que menos diferenças nas análises foram observadas em relação ao Controle.



**Fig. 14** Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2) em mudas de *Trema micrantha* baseado nas análises a seguir: **A:** Nitrato folha. **B:** Nitrato raiz. **C:** Atividade da enzima nitrato redutase folha. **D:**

Atividade da enzima nitrato redutase raiz. **E**: Amônio folha. **F**: Amônio raiz. **G**: Proteínas folha. **H**: Proteínas raiz. **I**: Amido folha. **J**: Amido raiz. **K**: Taxa fotossintética líquida (A). **L**: Potencial de água ( $\psi_w$ ). **M**: Prolina. **N**: Peroxidação lipídica (TBARS). **O**: Peróxido de hidrogênio **P**: Massa seca da parte aérea. **Q**: Massa seca da raiz. Os resultados são apresentados em relação aos resultados basais (linha tracejada). A área acima de 0 indica aumento em relação ao controle, a área abaixo de 0 indica redução em relação ao controle. Análises realizadas para as mudas submetidas ao déficit hídrico.

Em *Cariniana estrellensis* (Figura 15) associada a *Azorhizophyllus* sp. (Fig. 15 D) pode-se observar ao aumento dos parâmetros de peroxidação lipídica (N) e do peróxido de hidrogênio (O) e esses parâmetros são claramente menores nas mudas associadas com Ab-V5 (Fig. 15 B). Além disso a taxa fotossintética líquida (K) foi maior nas mudas inoculadas com Ab-V5. Os biomarcadores plotados no gráfico em ZM (Fig. 15 A) indicam que para este estirpe menos diferenças foram observadas em relação ao controle, porém é importante ressaltar que esta estirpe foi a que mais influenciou positivamente a atividade da enzima nitrato redutase de folhas (C) e de raízes (D). O amido nas folhas (I) foi maior em ZM e em Ab-V5. Para *Azomonas* sp. (Fig. 15 C) os resultados diferiram menos em relação ao Controle.



**Fig. 15** Índice de Resposta de Biomarcador Integrado (IBRv2) em mudas de *Cariniana estrellensis* baseado nas análises a seguir: **A:** Nitrato folha. **B:** Nitrato raiz. **C:** Atividade da enzima nitrato redutase folha. **D:** Atividade da enzima nitrato redutase raiz. **E:** Amônio folha. **F:** Amônio raiz. **G:** Proteínas folha. **H:** Proteínas raiz. **I:** Amido folha. **J:** Amido raiz. **K:** Taxa fotossintética líquida (A). **L:** Potencial de água ( $\Psi_w$ ). **M:** Prolina. **N:** Peroxidação lipídica (TBARS). **O:** Peróxido de hidrogênio **P:** Massa seca da parte aérea. **Q:** Massa seca da raiz. Os resultados são apresentados em relação aos resultados basais (linha tracejada). A área acima de 0 indica aumento em relação ao controle, a área abaixo de 0 indica redução em relação ao controle. Análises realizadas para as mudas submetidas ao déficit hídrico.

## Discussão

### *Status hídrico e ajuste osmótico*

As plantas estão constantemente expostas a estresses abióticos, como o déficit hídrico, o qual é um dos mais sérios problemas que afeta a manutenção dos habitats. A inoculação de plantas com BPCP tem mostrado resultados promissores para a mitigação dos danos causados por esse estresse. Na maioria das espécies vegetais, as BPCP são ubíquas, colonizando tanto local quanto sistemicamente, e influenciando a

homeostase das plantas pela supressão de doenças, degradação de contaminantes no solo, tolerância a estresses abióticos e a promoção do crescimento vegetal (Kuklinsky-Sobral et al. 2005).

Os dados obtidos pelo  $\psi_w$  confirmam a condição de déficit hídrico moderado no solo, evidenciado pela redução do potencial de água nas mudas de ambas as espécies em DH, comparadas àquelas em CC.

Uma das respostas fisiológicas que são desencadeadas no metabolismo vegetal em situação de DH é o ajuste osmótico; este ocorre por meio do aumento na concentração de solutos nas células os quais resultam na redução do potencial osmótico e conseqüentemente no potencial de água e, assim, possibilita a absorção de água em solos pouco hidratados e a manutenção do turgor celular nas espécies vegetais (Bianchi et al. 2005). Em *T. micrantha*, o maior valor de  $\psi_w$  nas mudas inoculadas com *Azorhizophillus* sp. pode indicar uma associação compatível, somado à redução do conteúdo de prolina (Fig. 3 A e Fig. 4 A), de modo que a interação microrganismo-planta pode ter acarretado em mudanças metabólicas que aumentem a tolerância dessas mudas ao DH e possam favorecer seu estabelecimento em ambientes com baixa disponibilidade hídrica.

A prolina é importante na proteção contra possíveis danos causados pelo estresse, no entanto já foi relatado que o menor acúmulo deste aminoácido ocorre em plantas que são menos afetadas (Sandhya et al. 2010). Diante disso, o menor conteúdo de prolina nas mudas de *T. micrantha* associadas com *Ab-V5*, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. em DH pode ter sido pelo fato de que as BPCP contribuíram com a proteção contra os possíveis danos causados pelo DH (Fig. 4 A) (Ruíz-Sánchez et al. 2011).

Outro fator evidente é a diferença entre os mecanismos de ajuste osmótico nas espécies vegetais, uma vez que, em *C. estrellensis* o maior  $\psi_w$  em mudas associadas com *Azomonas* sp. (Fig. 3 B) pode estar relacionado a outros mecanismos de ajuste que não seja a síntese de prolina. Assim, neste caso há aumento na quantidade deste aminoácido e também aumento do  $\psi_w$ , que está associado a outros mecanismos de ajuste osmótico, diferentes daqueles observados em *T. micrantha*.

### *Análise de crescimento*

Após o ajuste osmótico e consequente manutenção do turgor celular, um dos primeiros mecanismos de defesa para aumentar a tolerância das plantas ao déficit hídrico é o maior desenvolvimento de raízes de modo que possibilite uma maior absorção de água. Interações compatíveis entre microrganismo-planta possibilitam respostas sinérgicas, favorecendo a mudança na arquitetura da raiz, levando ao aumento de biomassa, através do crescimento das raízes, desenvolvimento de raízes secundárias e pelos radicias; induzidos, principalmente, pela síntese de Ácido Indol-3-Acético (AIA) pelos microrganismos que estão associados às plantas; além disso, esse fitormônio pode influenciar também o crescimento da parte aérea (Marulanda et al. 2006 e 2009).

Os resultados da massa seca da raiz e da parte aérea de *T. micrantha* e *C. estrellensis* (Tabela 1) mostram que a interação com ZM, *Azomonas* sp. (apenas em *C. estrellensis*) e *Azorhizophillus* sp. acarretou em efeitos positivos, uma vez que não houve diferenças entre as mudas em DH, comparadas àquelas em CC. Estes resultados indicam compatibilidade desses inóculos com a espécie vegetal. De acordo com Moreira et al. (2010), as BPCP produzem os componentes responsáveis pelo estímulo ao crescimento em raízes, incluindo Ácido Indol-3-Acético (AIA), giberelinas e citocininas. Além disso, o aumento da razão raiz/parte aérea em mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH e associadas com *Azorhizophillus* sp. também indica compatibilidade entre bactéria-planta, e pode auxiliar na tolerância ao DH.

Um desenvolvimento mais eficiente de raízes proporciona muitos benefícios, como a melhor aquisição de nutrientes e a maior tolerância ao déficit hídrico devido a maior área para absorção de água e íons (Bashan et al. 2004; Correa et al. 2008). Conforme proposto por Marulanda et al. (2009), as interações devem ser compatíveis para proporcionar efeitos que aumentem a tolerância das plantas ao estresse ambiental. Assim, as bactérias proporcionaram provavelmente maior desenvolvimento de raízes laterais e pelos absorventes, que favorecem maior absorção de água e íons, com consequente manutenção no incremento da massa seca da raiz e da parte aérea, como observado por Marulanda et al. (2006).

Esses resultados em mudas de *T. micrantha* inoculadas com *Azorhizophillus* sp. e em mudas de *C. estrellensis* inoculadas *Azomonas* sp. podem ter levado a uma maior absorção de água, uma vez que o  $\psi_w$  nessas mudas foi maior, favorecendo o *status* hídrico das plantas de modo a contribuir para a manutenção da homeostase e

consequentemente para a redução dos efeitos negativos ocasionados pelo DH, favorecendo o incremento de massa, como já relatado por Mayak et al. (2004).

### *Metabolismo fotossintético*

A redução nos parâmetros de trocas gasosas, como observado nas duas espécies arbóreas submetidas ao DH (Fig. 5 A e B), já foi relatada em outros estudos e se deve ao conjunto de respostas metabólicas que a planta exhibe em situação de estresse, assim como à restrição de CO<sub>2</sub> intercelular pela menor condutância estomática e a possíveis danos no aparelho fotossintético (Zgallaï et al. 2005; Oliveira et al. 2002). A manutenção da *k* (Fig. 5 E) nas mudas de *T. micrantha* inoculadas com Ab-V5 mostra um efeito benéfico nesta interação, de modo que *Azospirillum brasilense* pode ter mecanismos sinérgicos que auxiliam na mitigação dos danos causados pelo déficit hídrico e influenciam positivamente a atividade do aparelho fotossintético, especialmente nos processos de assimilação do CO<sub>2</sub>, uma vez que a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) foi menor nas mudas inoculadas com Ab-V5 e submetidas ao DH (Fig. 5 G)

Em *C. estrellensis*, assim como observado em *T. micrantha*, a associação com *Azospirillum brasilense* resultou em efeitos positivos na proteção contra os possíveis danos causados pelo déficit hídrico, visto que mesmo com uma menor *C<sub>i</sub>* (Fig. 5 H) a *A* e *k* (Fig. 5 B e F) foram maiores nas mudas inoculadas com Ab-V5 em DH. Esta influência na *k* para ambas as espécies vegetais, e na *A* para *C. estrellensis* quando associadas com Ab-V5, pode ser devido a fatores não-estomáticos, como a manutenção ou aumento da atividade de enzimas presentes no ciclo de assimilação do C, como por exemplo a enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco).

Sabe-se que o déficit hídrico causa danos ao aparelho fotossintético e ainda reduz a atividade das enzimas do Ciclo de Calvin (Farooq et al. 2009). E, visto que a condutância estomática (Fig. 5 C e D) e a *C<sub>i</sub>* (Fig. 5 G e H) foram menores em todos os tratamentos em DH, porém apenas nas mudas de ambas as espécies vegetais inoculadas com Ab-V5 houve aumento ou manutenção da *k*. Deste modo, estes efeitos danosos podem ter sido menos severos nas mudas inoculadas com Ab-V5, proporcionando assim maior tolerância ao DH, manutenção ou até mesmo melhora no metabolismo fotossintético sob estresse.

Além disso, os resultados obtidos para *T. micrantha* e para *C. estrellensis* submetidas ao DH e inoculadas com Ab-V5 indicam que a associação com esta espécie de bactéria influenciou benéficamente todo o metabolismo fotossintético, atenuando os danos que poderiam ser gerados pelo estresse. O déficit hídrico pode levar ao fechamento estomático e conseqüente redução no aporte de CO<sub>2</sub>. Além disso, o excesso de elétrons da cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese é direcionado para a formação de ERO, as quais são prejudiciais ao aparato fotossintético. Isto leva a um rápido declínio da fotossíntese sob déficit hídrico, que é acompanhado da redução da função de carboxilação de Rubisco, assim como da redução da eficiência máxima do FSII (Farooq et al. 2009).

Em muitas plantas a indisponibilidade hídrica no solo já foi demonstrada como fator influente na partição de carboidratos e no metabolismo, levando à síntese de novos compostos (Kohler et al. 2008). A redução de açúcares solúveis e de amido observada em folhas e raízes de *T. micrantha* em alguns tratamentos pode estar relacionada com as diferentes taxas de partição de carboidratos em situação de DH, e ainda a menor taxa fotossintética líquida nas mudas em DH pode ter acarretado em menores taxas de carbono assimilado (Kohler et al. 2008).

Para *C. estrellensis* o aumento de amido nas raízes de mudas associadas com Ab-V5 em CC, e nas folhas e raízes das mudas associadas com *Azomonas* sp. mostra um efeito benéfico dessa associação, uma vez que, para estes tratamentos não foram observadas diferenças nos parâmetros de trocas gasosas  $A$  e  $k$ , indicando que houve uso mais eficiente do carbono ou ainda, uma redução da taxa metabólica. Os menores teores de amido observados nas raízes quando submetidas ao DH pode ser devido à partição de carboidratos uma vez que para as mudas de *C. estrellensis* em DH maiores quantidades de AST foram observadas, e a menor quantidade de amido em todas as mudas submetidas ao DH se deve ao mesmo motivo observado em *T. micrantha*, estando relacionado aos menores valores de  $A$  e  $g_s$  das mudas que foram expostas ao estresse. Assim, essas taxas entre as fontes e os drenos das mudas dependem da taxa fotossintética líquida e da concentração de sacarose nas folhas, já que o déficit hídrico leva à redução das taxas fotossintéticas e conseqüentemente prejudica o metabolismo de carboidratos (Farooq et al. 2009).

### *Estresse oxidativo*

Para avaliar a influência das ERO no metabolismo vegetal sob déficit hídrico foram mensurados a peroxidação lipídica e o peróxido de hidrogênio. Em *T. micrantha* (Fig. 8 A e C) o inóculo ZM promoveu mecanismos para mitigar os possíveis danos oxidativos causados pelo déficit hídrico tanto pela diminuição da peroxidação lipídica quanto pelo menos teor de peróxido de hidrogênio. Já as mudas inoculadas com *Azomonas* sp. apresentaram redução apenas na quantidade de peróxido de hidrogênio. Em ambos os casos torna-se evidente a redução do estresse oxidativo nas mudas associadas aos inóculos citados, uma vez que as ERO podem também afetar a integridade das membranas celulares e de enzimas relacionadas ao metabolismo fotossintético (Triantaphylidès e Havaux 2009).

Os mecanismos de aumento da proteção ao estresse oxidativo podem estar relacionados com a síntese de enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e peroxidases como a Ascorbato Peroxidase (APX) e a Guaiacol Peroxidase (GPX), as quais têm sua atividade associada com a tolerância das plantas do déficit hídrico e são responsáveis pela neutralização das ERO (Kohler et al. 2008). Uma maior atividade de catalases e peroxidases foi relatada por Saravanakumar et al. (2010) em mudas de *Vigna radiata* tratadas com BPCP. Estas enzimas são importantes na remoção das ERO e conseqüentemente na prevenção dos possíveis danos à membrana e ao DNA; e ainda Kohler et al. (2008) sugeriram que inóculos contendo BPCP podem mitigar os danos oxidativos causados pela seca, e isto provavelmente ocorreu em *T. micrantha* quando inoculada com ZM, embora a atividade enzimática não tenha sido mensurada, os resultados para a o peróxido de hidrogênio indicam que houve aumento da atividade enzimática, ou um aumento da proteção decorrente da redução da síntese deste composto.

Os resultados observados em *C. estrellensis* evidenciam a menor sensibilidade que as espécies tolerantes à sombra possuem em desencadear respostas de eliminação das ERO (Fig. 8 B e D), uma vez que o metabolismo dessas espécies está associado a uma menor disponibilidade luminosa fato que pode influenciar nas taxas de expressão gênica, reduzindo a síntese de enzimas antioxidantes. Portanto, mais estudos são necessários para medir a atividade dessas enzimas e também a expressão dos genes que as codificam.

### *Metabolismo do nitrogênio*

Aspectos relacionados com a assimilação de nitrogênio foram avaliados, uma vez que a absorção e a assimilação podem ser comprometidas em situações de DH e, que a utilização de BPCP diazotróficas pode favorecer as plantas nessa situação de estresse (Bashan e Levanony 1990; Bashan et al. 2004). Os resultados da maior atividade da NR de *T. micrantha* indicam que a inoculação com Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp. propiciou um aumento na assimilação de nitrogênio nas raízes das mudas mantidas em CC. Da mesma forma, mudas de *C. estrellensis* inoculadas com ZM e *Azomonas* sp. possivelmente possuem maior sinergia nos processos metabólicos acarretando no aumento da atividade desta enzima em folhas (ambos) e raízes (apenas ZM) das mudas em DH e também no aporte de nitrogênio. Conforme relatado por James e Baldani, (2012), a interação com *Azospirillum* favoreceu o aporte de nitrogênio em arroz e outros cereais, assim como no estudo de Kohler et al. (2008), em que a interação com microrganismos estimulou a atividade da enzima NR em mudas de alface submetidas ao DH.

Ademais, outros componentes bioquímicos que fazem parte da rota metabólica do nitrogênio no vegetal, são importantes para a avaliação da aquisição de nitrogênio, dentre eles o nitrato, o amônio, os aminoácidos e as proteínas (Lambers et al. 2008). A redução do teor de nitrato nas folhas de *T. micrantha* inoculadas com Ab-V5 e *Azorhizophillus* sp. em CC indica que houve maior aquisição e assimilação de nitrogênio nas plantas inoculadas em relação às do controle. Assim, o  $\text{NO}_3^-$  absorvido pelas raízes pode ter sido utilizado em maiores quantidades para os processos biológicos por meio de mecanismos de compatibilidade na relação microrganismo-planta (James e Baldani 2012; Amaral et al. 2016), visto que as BPCP podem influenciar positivamente a atividade de outras enzimas do ciclo de assimilação do nitrogênio como a Glutamina Sintetase (GS) e a Glutamato Sintase (GOGAT) (Cassán et al. 2008; Ahemad; Kibret, 2014).

Nas mudas de *C. estrellensis*, a maior concentração de nitrato nas folhas das mudas inoculadas com ZM e *Azomonas* sp., em DH, está relacionada com a maior atividade da enzima NR. Como o  $\text{NO}_3^-$  é substrato e ativador para a enzima NR, a maior aquisição desse nutriente está associada a maior atividade enzimática e maior assimilação de nitrogênio, conseqüentemente. Esta maior atividade da NR em *C.*

*estrellensis* pode ainda estar relacionada com a proteção contra o dano oxidativo em situação de DH, já que a maior assimilação de  $\text{NO}_3^-$  nesta espécie não pioneira pode ser uma maneira de drenar o excesso de poder redutor, que é produzido em situações de estresse, possivelmente estimulada pela associação com as BPCP.

Nas raízes das mudas de *T. micrantha* os efeitos do DH foram mais severos quando inoculadas com Ab-V5 e *Azomonas* sp., pois as plantas submetidas ao DH não reduziram o conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  quando associadas com essas BPCP. Em *C. estrellensis* a menor quantidade de amônio observada nas folhas das mudas inoculadas com ZM em CC e a Ab-V5 em DH pode ser devido à maior taxa de incorporação do amônio em aminoácidos por meio da ação de enzimas como GS e GOGAT. Assim sendo, a associação com BPCP pode gerar um aumento na atividade dessas enzimas, ou diminuir a absorção de  $\text{NH}_4^+$ , uma vez que o  $\text{NO}_3^-$  encontrava-se disponível no solo e a sua maior absorção pode estar relacionada à dissipação do excesso de poder redutor (Bredemeier e Mundstock 2000, Cassán et al. 2008).

A quantidade de aminoácidos totais nas folhas em *T. micrantha* pode ser atribuída ao aumento na assimilação de N dessas mudas quando associadas com todos os inóculos, exceto *Azomonas* sp., assim como observado por Fukami et al. (2016) em que a associação de mudas de *Zea mays* e de Trigo com *Azospirillum* levou ao maior acúmulo de compostos nitrogenados na parte aérea. Esses efeitos têm sido atribuídos à alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes, as quais proporcionam melhor absorção de água e nutrientes pelas plantas. Em *C. estrellensis* o dado observado para as raízes corrobora a ideia de que a menor quantidade de  $\text{NH}_4^+$  nas plantas inoculadas com *Azomonas* sp. é devido ao aumento da incorporação deste íon, acarretando em maior quantidade de aminoácidos. E também na síntese de prolina, uma vez que o conteúdo deste aminoácido foi maior nas mudas de *C. estrellensis* submetidas ao DH em relação àquelas em CC inoculadas com *Azomonas* sp., este fato pode ser importante na manutenção do *status* hídrico e na proteção contra o estresse oxidativo nessas mudas.

A associação de *T. micrantha* com Ab-V5 e *Azomonas* sp. sob DH proporcionou melhora na assimilação de nitrogênio nas folhas, levando ao aumento do conteúdo de proteínas, assim como observado em mudas de trigo e milho associadas à *Azospirillum*, nas quais a associação levou ao incremento de compostos nitrogenados na parte aérea (Hungria et al. 2010). Mudanças de *C. estrellensis* mostraram aumento no conteúdo de proteínas quando associadas a Ab-V5 e com *Azorhizophyllus* sp. em CC, caracterizando mais um efeito benéfico da associação com BPCP em mudas de

*Cariniana estrellensis*. Conforme Kohler et al. (2008), a associação com BPCP em plantas submetidas ao DH moderado pode aumentar os níveis de nitrogênio assimilado. Ferreira et al. (2013), também observaram que a associação de mudas de milho com *Azospirillum* acarretou na absorção de nutrientes de forma mais eficiente e ainda em maior disponibilidade de nitrogênio assimilável que é decorrente da fixação do N pelas BPCP.

### *Respostas integradas da associação de BPCP com mudas de espécies arbóreas em déficit hídrico*

Em *Trema micrantha* os resultados que indicam maior tolerância ao DH foram observados nas mudas inoculadas com ZM (Fig. 14 A). Este inóculo proporcionou aumento da atividade da enzima NR tanto em folhas quanto em raízes, e ainda um aumento da massa seca da parte aérea. Além disso, foi possível observar as menores taxas de danos oxidativos, a partir da redução do conteúdo de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Em contrapartida, na associação com *Azomonas* sp. (Fig. 14 C), houve aumento dos parâmetros que indicam dano oxidativo, representados pelo conteúdo de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica.

Em *Cariniana estrellensis* os resultados que indicam maior tolerância ao DH foram observados nas mudas inoculadas com Ab-V5 (Fig. 15 B). Nestas mudas foram observados maiores valores da taxa fotossintética líquida, maior quantidade de amido nas folhas e menores conteúdos de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, indicando além de aumento da assimilação de CO<sub>2</sub>, também proteção aos danos oxidativos. Mudas de *C. estrellensis* inoculadas com ZM também apresentaram boas respostas ao DH, entre elas maior atividade da enzima NR em folhas e raízes (Fig. 15 A), acarretando em maior atividade do metabolismo de nitrogênio. Por outro lado, mudas de *C. estrellensis* inoculadas com *Azorhizophillus* sp. (Fig. 15 D) apresentaram aumento dos parâmetros associados com os danos causados pelo estresse oxidativo, tornando claro que neste caso a interação não gerou respostas que aumentassem a tolerância ao DH.

Os resultados encontrados indicam que os efeitos promotores do crescimento vegetal variam de acordo com a espécie de planta e a estirpe de bactéria utilizada, caracterizando a interação espécie-específica conforme proposto por Xiong et

al. (2016). Assim, a inoculação em três espécies vegetais tolerantes à salinidade: *Aegiceras corniculatum*, *Bruguiera gymnoihiza* e *Casuarina equisetifolia*, com bactérias promotoras do crescimento consideradas diazotróficas e solubilizadoras de fosfato gerou resultados diferentes no crescimento e no acúmulo de N e P nos tecidos. Resultados similares foram observado no presente estudo, em que diferentes padrões de resposta foram encontrados de acordo com a associação planta-bactéria. Portanto, o genótipo vegetal desempenha um papel importante na resposta da planta à inoculação com BPCP, de modo que, a compatibilidade genótipo-genótipo é crucial para determinar o padrão de respostas observado (Amaral et al. 2016).

## Conclusões

A associação com BPCP influenciou respostas metabólicas que foram responsáveis pelo aumento da tolerância ao déficit hídrico nas espécies vegetais estudadas. Em relação as hipóteses pode-se concluir que:

I - Há mudanças no *status hídrico* das mudas inoculadas com BPCP, tornando-as mais tolerantes ao déficit hídrico. Aceita-se esta hipótese. As mudas de ambas as espécies arbóreas apresentaram mudanças no *status hídrico* que indicaram aumento da tolerância ao DH. Em *T. micrantha* houve aumento no potencial de água quando inoculada com *Azorhizophillus* sp. e *C. estrellensis* quando inoculada com *Azomonas* sp. E ainda, redução da prolina em *T. micrantha* inoculada com Ab-V5, *Azomonas* sp. e *Azorhizophillus* sp.

II - Há manutenção do crescimento das mudas inoculadas com BPCP, mesmo quando submetidas ao déficit hídrico. Aceita-se esta hipótese. As mudas de ambas as espécies arbóreas submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com ZM e com *Azorhizophillus* sp. apresentaram manutenção da massa seca da raiz e parte aérea, quando comparadas àquelas mantidas em CC.

III - A inoculação com BPCP promove melhora nas trocas gasosas e no metabolismo do nitrogênio das mudas contribuindo com a tolerância ao déficit hídrico. Aceita-se esta hipótese. Em *T. micrantha* inoculada com Ab-V5 houve manutenção da eficiência instantânea de carboxilação e em *C. estrellensis* foi observado aumento deste parâmetro. E ainda, a maior atividade da enzima NR em folhas e raízes de ambas as espécies vegetais associadas com ZM indica aumento da assimilação de  $\text{NO}_3^-$ .

IV - Há menos danos causados pelo estresse oxidativo nas mudas inoculadas com BPCP quando submetidas ao déficit hídrico. A hipótese foi aceita. A proteção contra o estresse oxidativo foi observada em ambas as espécies, sendo nas mudas de *T. micrantha* inoculadas com ZM e de *C. estrellensis* inoculadas com Ab-V5, em que houve redução da peroxidação lipídica e do peróxido de hidrogênio.

Os resultados do presente estudo evidenciam que para a espécie pioneira (*T. micrantha*) a associação com ZM ocasionou mudanças metabólicas em diversas rotas bioquímicas, favorecendo maior aquisição de nitrogênio, ajuste osmótico e proteção contra o estresse oxidativo. Para a espécie não pioneira (*C. estrellensis*), a associação com ZM também ocasionou mudanças, principalmente relacionadas ao metabolismo de N e crescimento. Contudo, a inoculação com Ab-V5 favoreceu o metabolismo fotossintético e a proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Dessa forma, essas espécies de bactérias podem representar maior compatibilidade com essas espécies arbóreas: ZM para *T. micrantha* e ZM e Ab-V5 para *C. estrellensis*.

Múltiplos mecanismos são desenvolvidos no processo de tolerância ao DH no solo. A associação das BPCP com as mudas de espécies arbóreas favorece a ativação de processos metabólicos que levam à melhor qualidade fisiológica e ao aumento da tolerância ao DH em mudas de *Trema micrantha* e *Cariniana estrellensis*, aumentando o potencial de sobrevivência dessas mudas quando submetidas à situação de desafio. Em especial, para a espécie pioneira, a melhor resposta em relação ao DH foi observada quando as mudas foram inoculadas com ZM, enquanto na espécie não pioneira esses resultados foram obtidos quando houve a inoculação das mudas com ZM e Ab-V5. Isto evidencia a compatibilidade entre essas BPCP e as espécies vegetais, e indica quais espécies de bactérias poderiam ser usadas em trabalhos futuros associadas com essas espécies arbóreas, visando a melhor qualidade de mudas quando submetidas a condições de desafio, como por exemplo o transplante para o campo.

## Referências

Ahemad M; Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26:1-20.

Amaral FP, Pankiewicz VCS, Arisi ACM, Souza EM, Pedrosa F, Stacey G (2016) Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Molecular Biology* 90:689-697.

Bashan Y, Holguin G, De-bashan L (2004) *Azospirillum* -plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577.

Bashan Y, Kamnev AA, De-bashan LE (2012) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49:465-479.

Bashan Y, Levanony H (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol* 36:591-608.

Bianchi CAM, Bergonci JI, Bergamaschie H, Dalmago GA (2005) Ajuste osmótico em milho cultivado em diferentes sistemas de manejo de solo e disponibilidade hídrica. *Pesq. Agropec. Bras.* 40:645-651.

Bradford MM (1976) 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.

Bredemeier C, Mundstock CM (2000) Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural* 30:365-372.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Themaat EVL, Schulze-Lefert P (2013) Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:807:838.

Carillo P & Gibon Y (2011). PROTOCOL: Extraction and determination of proline. PrometheusWiki.

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

Cassán F, Sgroy V, Perrig D, Masciarelli O, Luna V (2008) 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.

Caviglione JH, Kiihl LRB, Caramori PH, Oliveira D (2000) Cartas climáticas do Paraná. Londrina : IAPAR.

Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil* 184:311-321.

Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (2010) Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fert. Soils* 46:727-738.

Correa OS, Romero AM, Soria MA, De Estrada M (2008) *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: Cassán, F.D.; Garcia De Salamone, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, pp 87-95.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999) Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília. 412 p.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29:185-212.

Federici G, Shaw BJ, Handy RD (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol* 84:415-430.

Ferreira AS, Pires RR, Rabelo PG, Oliveira RC, Luz JMQ, Brito CH (2013) Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. *Applied Soil Ecology* 72:103-108.

Franzini VI, Azcón R, Mendes FL, Aroca R (2010) Interactions between *Glomus* species and *Rhizobium* strains affect the nutritional physiology of drought-stressed legume hosts. *Journal of Plant Physiology* 167: 614-619.

Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M (2016) Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *Amb Express* 6:1-13.

Graham D, Smydzuc J (1965) Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. *Anal. Biochem* 11: 246-255.

Hageman RH, Reed AJ (1980) Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol* 69:270-280.

Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21:535-553.

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

James EK, Baldani JI (2012) The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant and Soil* 356:1-3.

Keller L, Leles PSS, Oliveira Neto SN (2009) Sistema de blocos prensados para produção de mudas de três espécies arbóreas nativas. *Rev. Árvore* 33:305-314.

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

Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J. Exp. Bot.* 62: 1455-1466.

Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2005) Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil, Dordrecht* 273:91-99.

Kumar V, Narula N (1999): Solubilization of inorganic phosphates by *Azotobacter chroococcum* mutants and their effect on seed emergence of wheat. *Biol. Fertil. Soil* 28:301–305.

Kusano M, Fukushima A, Redestig H (2011) Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot* 62:1439-1453.

Lambers H, Chapin F, Stuart P, Thijs L (2008) *Plant Physiological Ecology*. 2. ed. Springer.

Mantelin S (2003) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* 55:27-34.

Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2006) 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.

Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2009) 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* 28:115-124.

Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science* 166:525-530.

Mccready RM, Guggols J, Silveira V, Owens HS (1950) Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. *Anal. Chem.* 22:1156-1158.

Mccullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 17:297-304.

Mendonça F (2006) Aquecimento Global e suas Manifestações Regionais e Locais: Alguns Indicadores da Região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Climatologia* 2:71-86.

Menge DNL, Lars OH, Pacala SW (2012) Nitrogen and Phosphorus Limitation over Long-Term Ecosystem Development in Terrestrial Ecosystems. *PloS One* 7:e42045.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62-71

Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA, Carvalho F (2010) Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1:74-99.

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

Oliveira MAJ, Bovi MLA, Machado EC, Gomes MMA, Habermann G, Rodrigues JD (2002) Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. *Scientia Agricola* 59:59-63.

Ortiz N, Armad E, Duque E, Roldán A, Azcón R (2015) 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.

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

Rastetter EB, Yanai RQ, Thomas MA, Vadeboncoeur TJ, Fahey MC, Fisk BL, Hamburg SP (2013) Recovery from disturbance requires synchronization of ecosystem nutrient cycles. *Ecol. App* 23:621-642.

Ruíz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R (2008) Evaluation of the possible participation of drought-induced genes in the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit. In: Varma A, editor. *Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, pp 185–207.

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

Sanchez W, Burgeot T, Porcher JM (2013) A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ Sci Pollut Res* 20:2721-2725.

Sandhya V, Ali SZ, Grover M., Reddy G, Venkateswarlu B (2010) Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul* 62:21-30.

Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, Subbian P, Samiyappan R (2010) Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:203-209.

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

Stokstad E (2004) States sue over global warming. *Science* 305-590.

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

Xiong Y, Zhang X, He X, Li M, Liao B (2016) Species-specific effects of P-solubilizing and N<sub>2</sub>-fixing bacteria on seedling growth of three salt-tolerant trees. *Russian Journal of Ecology* 47:259-265.

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

Zgallai H, Steppe K, Lemeur R (2005) Photosynthetic, Physiological and Biochemical Responses of Tomato Plants to Polyethylene Glycol-Induced Water Deficit. *Journal of Integrative Plant Biology* 47:1470-1478.