

ESTRESSE HÍDRICO SIMULADO POR POLIETILENO GLICOL 6000:
UM ESTUDO SOBRE OS EFEITOS EM PLANTAS DE TOMATE,
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE E O POTENCIAL DA
INOCULAÇÃO NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE

BRUNA PINTOR DE MEDEIROS

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO, 2013

ESTRESSE HÍDRICO SIMULADO POR POLIETILENO GLICOL 6000:
UM ESTUDO SOBRE OS EFEITOS EM PLANTAS DE TOMATE,
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE E O POTENCIAL DA
INOCULAÇÃO NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE

BRUNA PINTOR DE MEDEIROS

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia,
área de concentração Biologia Celular.

Orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO, 2013

ESTRESSE HÍDRICO SIMULADO POR POLIETILENO GLICOL 6000:
UM ESTUDO SOBRE OS EFEITOS EM PLANTAS DE TOMATE,
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE E O POTENCIAL DA
INOCULAÇÃO NA RESISTÊNCIA AO ESTRESSE

BRUNA PINTOR DE MEDEIROS

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular.

Aprovada em 25 de julho de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof. José Ivo Baldani (D.Sc. Ciência do Solo) - EMBRAPA Agrobiologia

Prof. Leonardo Oliveira Medici (D.Sc. Agronomia) – UFFRJ

Prof. Inga Gonçalves de Azevedo (D.Sc. Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Fabio Lopes Olivares (Dr. Agronomia) – UENF
Orientador

"Não desista. Geralmente é a última chave no chaveiro
que abre a porta" (Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu chegar aqui, me guiando por esses longos dois anos, me dando forças, quando essas pareciam chegar ao fim. Obrigada meu Deus por essa vitória.

Ao meu maior exemplo como pessoa, minha amada mãe, eu agradeço simplesmente por sua existência, por me dar tanto orgulho e motivos para me espelhar e me tornar sempre uma pessoa melhor. Mãe, essa vitória também é sua, muito obrigada.

Aos meus padrinhos, meus avós, meu pai, tios e tias que mesmo de longe sempre torceram por mim.

A meu namorado que batalhou comigo esses dois anos, me deu forças, me encorajou, me ajudou na parte pesada de alguns experimentos, que esteve comigo nos momentos bons e ruins. Amor, obrigada pela paciência e por lutar para que eu me torne sempre uma pessoa mais otimista.

Ao meu orientador Fabio Olivares, que me recebeu no grupo de braços abertos e nunca mediu esforços para transmitir parte dos seus conhecimentos, pela sua paciência nesse tempo, por todos os auxílios nos experimentos, por todas as vezes que disse que eu não poderia ser pessimista, e que sim, eu deveria acreditar que tudo iria dar certo, e realmente deu. Obrigada Fabio, serei eternamente grata.

Ao professor Eliemar Campostrini “Mazinho” que nunca negou esforços para continuar me auxiliando, pelas inúmeras contribuições na minha vida profissional e por todo incentivo nesses anos. Agradeço também pela disponibilização do laboratório, e equipamentos de análises fisiológicas.

A Alena pelo tempo de convívio, por todos os auxílios desde a iniciação científica, por todos os momentos divertidos, e pela revisão dessa dissertação.

Aos membros da banca, Dr. Ivo Baldani e Leonardo Médici, e Dra. Inga Gonçalves pelas contribuições e elogios.

Aos companheiros do grupo e agregados pelas inúmeras colaborações, em especial Manu e Jucimara que me ensinaram os primeiros passos na microbiologia, e pelos momentos de diversão e boas risadas.

Ao grupo da fisiologia, Juliana, Tiago, Jefferson, Roberta muito obrigada por tudo.

As minhas amigas Magda, Gabi Vieira e Juana que sempre acreditaram em mim e me incentivaram sempre.

A UENF, a pós graduação em Biociências e Biotecnologia e a Capes.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para essa realização.

OBRIGADA

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Estresses abióticos	3
2.2. Fisiologia do estresse hídrico.....	5
2.2.1. Estresse simulado por PEG	9
2.3. Estresse osmótico em bactérias	10
2.4. Relação planta-microrganismos benéficos	12
2.5. Promoção de crescimento vegetal por bactérias	13
2.5.1. Biofertilização	13
2.5.2. Bioestimulação.....	16
2.5.3. Biocontrole.....	16
2.5.4. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> - uma bactéria promotora de crescimento vegetal modelo	17
2.6. Interação bactéria – planta – estresse	18
3. HIPÓTESE	22
4. OBJETIVO GERAL	23
4.1. Objetivos específicos	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1. Material vegetal.....	24
5.2. Microrganismos.....	24
5.3. Efeitos do estresse simulado por PEG 6000 sobre as plântulas de tomate	24
5.4. Efeitos do PEG 6000 sobre <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54.....	25

5.4.1. Análise de viabilidade celular.....	26
5.4.2. Contagem pelo número mais provável	26
5.5. Efeito do PEG 6000 sobre a interação <i>Herbaspirillum seropedicae</i> – plântulas de tomate	26
5.5.1. Estudo do sistema radicular.....	26
5.5.2. Estudo sobre o crescimento e fisiologia de plantas de tomate	27
5.5.2.1. Características avaliadas.....	28
5.5.3. Estudo do efeito do PEG 6000 na morfologia e anatomia radicular e no padrão de colonização da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe Ram10.	30
5.6. Análises estatísticas.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.1. Curva de resposta de plântulas de tomate cv. Santa Clara a concentrações crescentes de PEG 6000.	32
6.2. Efeitos do PEG 6000 sobre <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe HRC54	33
6.3. Efeitos do PEG 6000 sobre a interação <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe HRC54 – plantas de tomate cv. Santa Clara	37
7. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da colonização de uma planta por *Herbaspirillum seropedicae* (vermelho). (Monteiro *et al.*, 2012).

Figura 2- Estrutura montada para suporte das plantas e isolamento do sistema radicular (A, B); Análise de taxa fotossintética das plantas na câmara do analisador de gás infravermelho- IRGA 62000 (C).

Figura 3- Efeito de diferentes concentrações de PEG 6000 sobre o crescimento da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara. Cada barra representa média de vinte repetições

Figura 4- Microscopia de fluorescência de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 corada com kit LIVE/DEAD[®] Cell Viability Assays e previamente submetida a concentrações de PEG 6000 por diferentes tempos. A: Controle (água destilada esterilizada) por 24 horas; B: Controle por 72 horas; C: 210 g/L PEG 6000 por 24 horas; D: 280 g/L de PEG 6000 por 72 horas, bar = 10µm.

Figura 5- Comprimento da raiz axial de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 sob efeito do estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). Cada barra representa média de três repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 6- Número de raízes laterais de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 sob efeito do estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). Cada barra representa média de três repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 7- Taxa fotossintética líquida de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Figura 8- Taxa fotossintética líquida média de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, submetidas a estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L) ao longo de 15 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 9- Massa fresca de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Figura 10 - Massa fresca de raiz de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Figura 11 – Teor relativo de água de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Figura 12 – Teor relativo de água médio de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, submetidas a estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L) ao longo de 15 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 13 – Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara cultivadas em água. A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Nota: Região de emissão de raiz lateral (Seta). Barra: 400 µm.

Figura 14 - Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara cultivadas em solução de PEG 6000 (210 g/L). A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Barra: 400 µm.

Figura 15 - Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas água. A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Nota: Região de emissão de raiz lateral (Seta). Barra: 400 µm.

Figura 16 - Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas em solução de PEG 6000 (210 g/L). A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Barra: 200 µm.

Figura 17 - Microscopia de fluorescência da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas em água. A: Porção apical; B, C, D: Segmentos imediatamente acima da região da coifa. Nota: Coifa (estrela); Região de emissão de raiz lateral (Seta); Pelos (p). Barra: 100 µm.

Figura 18 - Microscopia de fluorescência da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas em solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Porção apical; B, C, D: Segmentos imediatamente acima da região da coifa. Nota: Coifa (estrela); Agregado microbiano (seta). Barra: 100 µm.

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Porcentagem de células vivas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 em diferentes tempos de exposição a concentrações crescentes de solução de PEG 6000. Cada valor corresponde a média de quatro repetições.

Tabela 2 - Número mais provável de células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 em diferentes tempos de exposição a concentrações crescentes de solução de PEG 6000. Cada valor corresponde a média de duas repetições, seguido pelos valores de desvio padrão.

Tabela 3 - Número mais provável de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 isolada de raízes de plantas de tomate cv. Santa Clara antes da imposição (Sem estresse) e 15 dias após o estresse hídrico simulado pela irrigação com PEG 6000 (210 g/L).

RESUMO

Polietileno glicol consiste em um polímero que reduz o potencial hídrico de uma solução nutritiva ou água de irrigação, simulando eficientemente o estresse hídrico vegetal, e refletindo em redução na taxa de fotossíntese, na eficiência no uso da água, no potencial hídrico foliar, no acúmulo de biomassa, no teor relativo de água, e alterando atividade de enzimas antioxidantes. Nos solos, rizosfera e associadas às plantas, diferentes espécies bacterianas possuem a capacidade de estimular seu crescimento, sendo então denominadas promotoras do crescimento vegetal. Essa parcela da comunidade microbiana expressa propriedades de promoção do crescimento através da fixação biológica de nitrogênio, síntese de fitohormônios e outros compostos bioativos, solubilização de fosfato, dentre outros mecanismos. Associado a este papel relevante, estudos relatam que determinadas bactérias promotoras de crescimento vegetal também são capazes de reduzir os impactos dos danos causados pelo estresse hídrico em plantas através da redução na síntese de etileno, produção de osmólitos, síntese e secreção de fitohormônios com atividade auxínica, modulação da expressão de genes de aquaporinas e enzimas antioxidantes. Baseado nesses relatos o presente trabalho objetivou analisar os efeitos do estresse simulado por polietileno glicol 6000 sobre plantas de tomate cv Santa Clara e sobre a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, verificando também o potencial da inoculação em minimizar os efeitos do estresse sobre tal espécie vegetal. Os resultados obtidos evidenciaram os danos causados pelo estresse sobre o crescimento radicular e raízes laterais, os quais foram revertidos parcialmente quando a inoculação foi realizada previamente. Melhora na fotossíntese e teor relativo de água foi evidenciado nas plantas inoculadas, seja na presença ou ausência da simulação do estresse. A colonização do sistema radicular de plantas de tomate pela bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 (estirpe marcada com o gene *gfp*) foi aparentemente afetada sob estresse hídrico simulado, com redução do espalhamento superficial da bactéria e na agregação das colônias. As alterações na estrutura e densidade dos pelos radiculares em função do PEG foram atenuadas pela presença da bactéria. Esses resultados sugerem um efeito positivo de *Herbaspirillum seropedicae* na arquitetura radicular na direção de aumentar a absorção de água em plantas de tomate, sob condições normais e principalmente sob estresse simulado por PEG, refletindo sobre as maiores taxas fotossintéticas, biomassa fresca e status hídrico, sugerindo sua utilização na atenuação dos efeitos do estresse hídrico.

Palavras chaves: Estresse hídrico, bactéria promotora de crescimento vegetal, fisiologia, anatomia radicular, associação bactéria – planta.

ABSTRACT

Polyethylene glycol is a polymer that reduces the water potential of a nutrient solution or irrigation water simulating efficiently a plant water stress, reflecting in reduction of photosynthetic rate, water use efficiency, leaf water potential, biomass accumulation, relative water content, and altering antioxidant enzymes. In the soil, different bacterias on the rhizosphere and associated to the plants, have the ability to stimulate their growth being called plant growth promoters. This portion of the microbial community expressed growth-promoting properties by biological nitrogen fixation, phytohormones and other bioactive compounds synthesis, phosphate solubilization, among other mechanisms. Associated to this, studies report that some plant growth promoting bacteria are also able to reduce the damage impacts caused by water stress in plants by reducing the ethylene synthesis, osmolytes production, phytohormones synthesis and secretion with auxin activity, modulation of gene expression of antioxidant enzymes and aquaporins. Based on these reports the present study aimed to analyze the effects of stress simulated by polyethylene glycol 6000 on tomato plants cv Santa Clara and the bacterium *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 strain, also verifying the potential of inoculation to minimize the effects of stress on such plant species. The results showed the damage caused by stress on the root growth and lateral roots, which were partially reversed when the inoculation was done previously. Inoculated plants improve photosynthesis and relative water content in either in the presence or absence of simulation of stress. The colonization of the root system of tomato plants by the bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 strain (strain marked with the *gfp* gene) was apparently affected under water stress, with reduced surface scattering and aggregation of bacteria colonies. Alterations in structure and density of root hairs as a function of PEG were attenuated by the presence of bacteria. These results suggest a positive effect of *Herbaspirillum seropedicae* in root architecture in the direction of increasing water uptake in tomato plants under normal conditions and especially under stress simulated by PEG, reflecting on the highest photosynthetic rates, fresh biomass and water status, suggesting its use in mitigating the effects of drought stress.

Keywords: drought, physiology, root anatomy, plant-bacteria association, plant growth promote bacteria

1. INTRODUÇÃO

A baixa disponibilidade hídrica no solo resulta em consequências para as plantas, como fechamento estomático, limitando a fotossíntese, o crescimento e desenvolvimento (Liu e Zhu, 1998), danos a bicamada lipídica, comprometendo a funcionalidade das organelas, integridade e seletividade da membrana plasmática (Crowe *et al.*, 1992; Hoekstra *et al.*, 2001; Mahajan e Tuteja, 2005), além de outros efeitos negativos.

O estresse hídrico pode ser simulado pela adição de solutos que reduzam o potencial osmótico da solução, reduzindo a energia livre da água, assim como ocorre no uso de polietileno glicol 6000 (PEG 6000), molécula de alto peso molecular, capaz de negatar o potencial osmótico da solução, no entanto, incapaz de entrar nas células vegetais. A irrigação com soluções de PEG 6000 da mesma forma que a seca altera o potencial hídrico, respostas bioquímicas e trocas gasosas das plantas (Zgallai *et al.*, 2005).

O solo e o próprio interior das plantas abrigam uma diversidade de microrganismos, dentre os quais podem ser citadas as bactérias promotoras do crescimento vegetal, como *Herbaspirillum seropedicae*, um endófito diazotrófico.

No genoma de *Herbaspirillum seropedicae*, publicado em 2011, constam informações sobre a capacidade de fixar nitrogênio e sintetizar fitohormônios, como o ácido indolacético, que dentre outras funções está o estímulo ao crescimento vegetal, indução de pelos radiculares e raízes laterais, finalmente, melhorando a via de absorção de água e nutrientes dos vegetais (Pedrosa *et al.*, 2011).

Em condições de estresse, apesar da ausência de trabalhos que relatem a atuação de *Herbaspirillum seropedicae* na atenuação dos efeitos deletérios da reduzida disponibilidade hídrica no desenvolvimento vegetal, alguns trabalhos relatam sobre a atividade ACC deaminase, também presente em *Herbaspirillum seropedicae*, em que a bactéria utiliza o precursor do etileno, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), exsudado pelas raízes sob estresse, como fonte de nitrogênio, representando um importante mecanismo de promoção do crescimento vegetal em condições estressantes. A redução na síntese do fitohormônio etileno pode significar uma modulação no desenvolvimento do sistema

radicular, auxiliando tanto na busca por solos mais profundos, quanto na manutenção do status hídrico. Em conjunto com essa atividade enzimática, algumas bactérias também foram descritas aumentar a expressão de genes relacionados à aquaporinas de raízes (Zawoznik *et al.*, 2011), atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase (Kohler *et al.*, 2008) e peroxidase (Saravanakumar *et al.*, 2011), e síntese de solutos osmoticamente ativos, como glicina betaína e prolina que atuam no processo de ajustamento osmótico (Dimkpa *et al.*, 2009), refletindo assim, em uma modulação dos efeitos deletérios gerados pelo estresse.

Baseado nessas evidências o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do estresse hídrico simulado por solução de PEG 6000 sobre tomateiros e bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, além de determinar o potencial dessa bactéria em reduzir os efeitos do estresse simulado em plantas de tomate, analisando efeitos sobre status hídrico, fisiologia e anatomia das plantas previamente inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* e submetidas ao estresse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresses abióticos

Como organismos sésseis, as plantas regulam seu próprio crescimento e desenvolvimento, respondendo e se adaptando aos estímulos e adversidades do meio ambiente, o que inclui uma série de mecanismos de resposta e/ou tolerância a déficit hídrico, flutuações térmicas, alta concentração de salinidade, entre outros fatores abióticos (Wolters e Jürngens, 2009).

Estresse é um termo que corresponde a qualquer fator físico-químico ou ambiental, que produz uma tensão prejudicial num organismo vivo (Levitt, 1980), sendo que definir estresse ambiental como uma força adversa ou condição que inibe o funcionamento normal de sistemas biológicos, como as plantas, também é bastante aceita (Jones e Jones, 1989). O estresse abiótico, segundo Poltronieri *et al.* (2011), é o principal responsável pela queda na produtividade mundial, podendo gerar perdas no rendimento de uma diversidade de culturas no mundo inteiro.

A água, em conjunto com a luz, temperatura, nutrientes e CO₂ constituem os principais fatores limitantes do crescimento e produtividade das plantas, devido os efeitos destes sobre o metabolismo fotossintético. Entretanto, a fotossíntese não é o único processo afetado, logo, a resposta ao estresse em plantas é um somatório de efeitos distintos sobre diferentes processos anabólicos e catabólicos (Woolhose, 1983).

As respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas a diversos estresses abióticos variam entre as espécies vegetais, apesar de haver um modelo comum de sinalização (Zhu, 2001; Mahajan e Tuteja, 2005; Shao *et al.*, 2007). Segundo este modelo, a sinalização tem início em eventos de reconhecimento de padrões molecular presentes na superfície de diferentes entidades biológicas (vírus, bactérias, fungos, insetos, herbívoros e roedores) e/ou estímulos físico-químicos (baixa e alta temperatura, salinidade, déficit hídrico, excesso de radiação, agentes poluentes) por sensores presentes na membrana plasmática ou no citoplasma. A partir desta interação molecular, ocorre a transdução do sinal e estabelecimento de uma cascata de sinalização, resultando na geração de mensageiros secundários (espécies reativas de oxigênio - ROS, íons Ca²⁺ e inositol-1,4,5-trifosfato) que irão modular o nível de Ca²⁺ intracelular. Proteínas sensíveis às alterações na

concentração de Ca^{2+} intracelular tornam-se ativas e interagem com outras proteínas iniciando uma cascata de fosforilação. Tal cascata atinge as proteínas envolvidas na proteção celular e fatores de transcrição que controlam um conjunto específico de genes de resposta a estresses bióticos e abióticos. Os produtos desses genes participam da síntese de moléculas regulatórias tais como ABA (ácido abscísico), etileno e ácido salicílico, que amplificam o sinal inicial por meio de respostas sistêmicas.

Segundo Amzallag e Lerner (1994), existem dois principais grupos de resposta ao estresse: a resposta rápida, que está relacionada a reações não específicas, que ocorrem de maneira relativamente rápida, em 48 horas a partir da exposição ao estresse. Este grupo de resposta de defesa já existente no vegetal, isto é, trata-se de uma resposta pré-adaptativa, que consiste na expressão de um conjunto gênico capacitando a sobrevivência em tais condições, mantendo todo ou quase todo, o seu programa original de desenvolvimento. O outro grupo é o de resposta adaptativa, que é o estabelecimento de um novo programa de desenvolvimento específico, em função das condições impostas pelo estresse. Este conjunto de mecanismos induzíveis é diretamente influenciado pelo tempo de exposição ao estresse, correspondendo a uma prolongada resposta, em que as plantas ajustam sua fisiologia às condições ambientais (Amzallag e Lerner, 1994).

A dinâmica de resposta de plantas submetidas a déficit hídrico envolve a indução de um grande número de genes, os quais são classificados em dois grupos de acordo com seu modo de ação. Um grupo corresponde aos genes que codificam proteínas estruturais que atuam na via de resposta ao estresse, como genes osmorregulatórios, genes de proteínas antioxidantes e de aquaporinas, enquanto o outro grupo inclui os genes que codificam para proteínas regulatórias, sendo os fatores de transcrição e proteínas quinases, as principais classes de biomoléculas (Gong *et al.*, 2010).

Estudos focando os padrões de respostas a tipos isolados de estresses são constantes, no entanto, rotineiramente, as plantas no campo são submetidas a uma combinação de diferentes estresses abióticos (Moffat, 2002). Análises transcriptômicas de plantas submetidas a diversas condições de estresse abiótico mostraram que cada condição resultou em uma resposta peculiar, havendo pouca sobreposição dos transcritos (Rizhsky *et al.*, 2004; Kreps *et al.*, 2002). Além das

diferenças que existem entre as respostas das plantas a diferentes tipos de estresses abióticos, estes quando combinados podem resultar em respostas conflitantes ou antagônicas, como por exemplo, durante o estresse térmico, por alta temperatura, em que as plantas abrem seus estômatos para reduzir a temperatura no limbo foliar pela transpiração. Nesta situação, se as altas temperaturas são combinadas com baixa disponibilidade de água no solo, resultam na manutenção dos estômatos fechados, e ausência da regulação da temperatura foliar (Rizhsky *et al.*, 2004).

O entendimento de mecanismos de respostas de plantas a diferentes condições de estresse tem se tornado constante objetivo de inúmeros trabalhos, visto que as condições ambientais no planeta estão sofrendo alterações com o passar dos anos (Hirayama e Shinozaki, 2010). Tolerância (ou susceptibilidade) a estresses abióticos é um fenômeno muito complexo, pois depende da fase do desenvolvimento vegetal e da ocorrência simultânea de outros estresses (Chinnusamy *et al.*, 2004).

2.2. Fisiologia do estresse hídrico

Como a água está presente em praticamente todos os eventos fisiológicos que acontecem na célula vegetal, sua deficiência altera negativamente o funcionamento de vários processos celulares (Taiz e Zeiger, 2009).

Ao longo de todo seu ciclo de vida as plantas são submetidas a períodos de déficit hídrico do solo ou da atmosfera (Chaves *et al.*, 2009). Declínios sazonais na disponibilidade hídrica dos solos, seca temporária, ou aumento na demanda evaporativa da atmosfera alteram com frequência o status hídrico das plantas, embora estresse hídrico esteja relacionado tanto com a baixa, quanto com excesso de disponibilidade de água. Alterações climáticas associadas com o crescimento da população mundial também podem afetar diretamente a disponibilidade de recursos hídricos para agricultura, podendo restringir o crescimento de plantas.

De duas maneiras diferentes a fotossíntese sofre interferência do estresse hídrico, sendo por efeitos estomáticos e/ou efeitos não estomáticos (Hu *et al.*, 2009). Efeitos estomáticos correspondem ao evento primário do estresse. O controle da abertura dos estômatos, expresso pela condutância estomática, é um importante componente na manutenção da turgescência celular em plantas submetidas à

deficiência hídrica. Geralmente, a primeira resposta de todas as plantas a baixa disponibilidade hídrica é o fechamento dos estômatos, com a finalidade de bloquear a perda de água via transpiração. Atribui-se reduções na condutância estomática à sinalização de ABA, fitohormônio translocado do sistema radicular para a parte aérea, via corrente transpiratória (Ribeiro, 2012). Apesar de esse hormônio possuir diversas funções no crescimento e desenvolvimento vegetal, sua função de destaque é no balanço hídrico e tolerância das plantas ao estresse osmótico (Zhu, 2002). No entanto, o fechamento estomático interfere na entrada de CO₂ atmosférico, restringindo a fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2009; Wilkinson e Davies, 2010). A eficiência no uso da água, relação existente entre o carbono assimilado pela quantidade de água consumida, é influenciada diretamente pela abertura e fechamento estomático (Chaves *et al.*, 2002). Assim, evitar o processo de desidratação no estresse hídrico é consequência do equilíbrio entre os movimentos estomáticos e absorção de água pelas raízes (Ionenko *et al.*, 2012).

A limitação à assimilação de CO₂ resulta num excesso de energia e fluxo de elétrons para o O₂, gerando as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS) em diferentes tecidos da planta (Zhou *et al.*, 2009), que incluem superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH⁻¹) (Bartels e Sunkar, 2005), originando um efeito secundário chamado estresse oxidativo. Devido as suas características químicas, ROS são extremamente reativas, podendo danificar clorofilas, proteínas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos (Jaleel *et al.*, 2009). Para combater o estresse oxidativo, as plantas possuem sistemas de detoxificação enzimática, como superóxido dismutase, catalase e peroxidase, e não enzimáticos, como carotenóides, xantofilas, glutathione, tocoferol, ascorbato, entre outros (Jagadeeswaran *et al.*, 2009). É exatamente o equilíbrio entre a produção de ROS e atividades antioxidantes enzimáticas que determina se ocorrerá sinalização oxidativa ou danos, apesar disso variar entre espécies vegetais, cultivar, intensidade e duração do estresse (Dacosta e Huang, 2007).

Uma vez que a produção de ROS é conduzida principalmente por excesso de absorção de energia no aparelho fotossintético, isto pode ser evitado através da degradação dos pigmentos de absorção (fotossintéticos) (Kumar *et al.*, 2011).

A clorofila é um dos pigmentos responsáveis por captar luz usada na fotossíntese, sendo essencial na sua conversão em energia química, estando assim,

relacionada diretamente com a eficiência fotossintética das plantas (Jesus e Marengo, 2008). Embora a queda na concentração de pigmentos foliares, como a clorofila, seja tipicamente observado e relatado em condições de estresse oxidativo, seja por sua degradação ou pela deficiência na sua síntese, tal redução também protege de certa forma o tecido vegetal, pois minimiza a absorção de energia luminosa pelos cloroplastos (Ahmed *et al.*, 2009; Pastenes *et al.*, 2005).

Enquanto o declínio da fotossíntese é muitas vezes relacionado ao fechamento dos estômatos, a redução na fixação de CO₂ também pode ser limitada por eventos não-estomáticos (Flexas *et al.*, 2006; Peguero-Pina *et al.*, 2008). Limitações não-estomáticas incluem perturbações nos processos fotoquímicos (redução no transporte e acoplamento de elétrons, decaindo a síntese de ATP e NADPH) e bioquímicos (limitações na eficiência carboxilativa e/ou na quantidade e atividade da enzima Rubisco e outras enzimas do metabolismo de carbono) (Wise *et al.*, 1991; Lu e Zhang, 1999).

Na fotossíntese, a luz é absorvida por pigmentos do complexo-antena, que quando excitados, transferem energia para os centros de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) (Young e Frank, 1996). Em caso de excesso de energia, esta pode ser dissipada na forma de fluorescência ou calor (Krause & Weis, 1991). A eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) pode variar numa faixa de 0,75 a 0,85 em plantas não submetidas a estresses (Bolhar-nordenkampf *et al.*, 1989). A diminuição da relação Fv/Fm é um bom indicador de efeito fotoinibitório, quando as plantas estão submetidas a diversos tipos de estresse mesmo antes dos sintomas aparecerem (Faria *et al.*, 1998). Sendo assim, a medição da fluorescência da clorofila *a* é uma técnica rápida, precisa e não destrutiva para detectar o desequilíbrio energético e metabólico da fotossíntese (Araus *et al.*, 1998).

Inibição de processos bioquímicos e fotoquímicos pelo estresse hídrico ocorrem devido alterações nas condições iônicas e/ou osmóticas, afetando, dentre outros exemplos, a atividade de duas enzimas chave do metabolismo do carbono, a rubisco (Lawlor, 1995) e a ATP sintase (Tezara *et al.*, 1999), comprometendo sobretudo, o ciclo de Calvin.

A transpiração foliar é uma variável afetada diretamente pela disponibilidade hídrica, como visto em três de quatro variedades de cana-de-açúcar estudadas por Gonçalves *et al.* (2010), em que houve decréscimo da taxa transpiratória em

situações de estresse severo. Reduções significativas na transpiração foliar também foram observadas em genótipos de milho (Cruz, 2006) e de cana-de-açúcar (Arias *et al.*, 1996) submetidas a deficiência hídrica. Desta forma, a desidratação resultante da baixa disponibilidade hídrica ocorre a partir de um desequilíbrio entre absorção da água via sistema radicular e perda, via transpiração nas folhas (Aroca *et al.*, 2012).

O estresse hídrico é responsável por restringir o crescimento vegetal, tanto que Aroca e Ruiz-Romano (2012) descrevem que em decorrência de um suprimento inadequado de água há um aumento na relação raiz: parte aérea podendo ser resultante de: maior acúmulo de biomassa de raiz; menor acúmulo de biomassa de parte aérea; ou menor restrição ao crescimento da raiz em relação à parte aérea. Tal acúmulo de biomassa de raiz em condições de déficit hídrico é explicado como estratégia para maior exploração de áreas mais profundas do solo.

O sistema radicular é extremamente sensível à disponibilidade de água no solo, podendo sofrer dano estrutural em virtude da maior dureza do solo; danos osmóticos, devido à desidratação celular; e danos oxidativos em decorrência do acúmulo de ROS (Kovtun *et al.* 2000). A diminuição de água nas membranas celulares, em geral causa rompimento da bicamada lipídica, criando poros na membrana plasmática, podendo resultar em desarranjo das proteínas presentes na membrana, o que contribui para a perda de sua integridade e seletividade além da perda da capacidade enzimática e modificações na compartimentalização celular (Mahajan e Tuteja, 2005).

Ainda em resposta a baixos potenciais hídricos, o mecanismo de ajustamento osmótico é de extrema importância, correspondendo ao acúmulo de solutos osmoticamente ativos (também chamados de solutos compatíveis). Os solutos compatíveis são assim referidos devido a sua compatibilidade com as funções celulares, mesmo em altas concentrações. Em geral, são moléculas altamente solúveis, sem carga no pH fisiológico e não interagem com as proteínas, facilitando seu acúmulo em altas concentrações no citoplasma, sem promover qualquer desordem nos processos celulares vitais, como reparo de DNA, interação proteína-DNA e maquinaria metabólica (Yancey *et al.*, 1982). Esse acúmulo de solutos reduz o potencial osmótico das células, portanto, mantêm o potencial de água em níveis ideais, oferecendo tolerância a tais condições (Bray, 1993; Turner 1986). Tal

mecanismo tem sido considerado uma valiosa forma de manter a turgescência celular, permitindo a manutenção da abertura estomática e fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo (Munns, 1998). Prolina, glicina betaína, açúcares são exemplos de solutos osmoticamente ativos envolvidos no ajustamento osmótico, garantindo a integridade da membrana plasmática (Bray, 1993). Os compostos compatíveis também agem na estabilização da função enzimática, promovendo proteção contra salinidade, altas temperaturas, congelamento e dessecação (Welsh *et al.*, 2000).

Salinidade e seca causam efeitos semelhantes sobre a fisiologia e desenvolvimento vegetal. Altas concentrações de sais reduzem o potencial osmótico, conseqüentemente, potencial hídrico, levando a desidratação de plantas. Além disso, a entrada de grande quantidade de íons induz a toxicidade a íons, podendo resultar num desequilíbrio da absorção de nutrientes essenciais, afetando inclusive germinação de sementes. Sendo assim, o principal dano causado por estresse salino é resultante de alterações no potencial hídrico, em virtude do acúmulo de sal em espaços celulares (Soleimani *et al.*, 2011).

O estresse hídrico também pode ser imposto/simulado através da aplicação de determinadas substâncias, como polietileno glicol (PEG), em soluções nutritivas, ou mesmo na irrigação. E este tem sido amplamente utilizado na imposição de estresse hídrico para estudos, pois reduz o potencial hídrico da solução, porém sem entrar na raiz (Zgallai *et al.*, 2005).

2.2.1. Estresse simulado por PEG

Frequentemente utilizada para simular estresse osmótico, moléculas de PEG 6000 são inertes, não iônicas e impermeável na célula, e seu tamanho é pequeno o suficiente para influenciar a pressão osmótica e grande para não ser absorvida pelas plantas (van den Berg e Zeng, 2006; Xing e Wu, 2012). Sendo assim, é capaz de auxiliar diversos estudos a respeito do padrão de respostas de diferentes espécies vegetais ao estresse hídrico/osmótico.

Concentrações definidas de PEG 6000 influenciam diversas características vegetais, como a massa fresca de parte aérea e de raiz de plantas de milho que foram inibidas pelo estresse hídrico simulado por PEG 6000 (Ψ_s : -1MPa) no trabalho de Koskeroglu e Tuna (2010). Comparando plantas de milho sob estresse por NaCl

e PEG, a atividade de enzimas antioxidantes como SOD se apresentou mais elevada sob o estresse hídrico. Ajustamento osmótico através do acúmulo de prolina também foi positivamente relacionada com a concentração de PEG.

Com a solução nutritiva sendo alterada gradualmente pela adição de PEG 6000, plantas de *Cajanus cajan* foram submetidas ao estresse hídrico moderado (-0,51 MPa) e severo simulado (-1,22 MPa) (Kumar *et al.*, 2011). Neste trabalho, o conteúdo relativo de água foi afetado pelo estresse severo, que também reduziu o teor de clorofila.

Com o mesmo modelo de estresse moderado (-0,51 MPa) e severo (-1,22 MPa) simulado por PEG na solução nutritiva, plantas de tomate em sistema hidropônico apresentaram alterações em aspectos fisiológicos e bioquímicos. Taxa fotossintética e transpiratória reduziram em resposta ao estresse, sendo esses efeitos atribuídos a possíveis danos ao tilacóide, tendo sido observado também queda no potencial hídrico foliar e aumento no conteúdo de prolina, como característica de ajustamento osmótico (Zgallai *et al.*, 2005).

O estresse hídrico induzido por PEG 6000 pode influenciar negativamente inclusive na germinação de sementes, como observado no trabalho de Moraes *et al.* (2005) em que ocorreu uma redução no vigor e na taxa de germinação de sementes de feijão sob irrigação com soluções de PEG 6000. Os mesmos autores concluíram também que os efeitos do estresse por PEG são mais danosos sobre a semente quando comparados ao estresse salino (NaCl).

2.3. Estresse osmótico em bactérias

A célula bacteriana está em contato direto com seu meio separado somente pela membrana plasmática, que além de conferir forma a célula, proporciona a base para a homeostase, em relação a íons e concentração de solutos, bem como outras características essenciais a sobrevivência da bactéria (Krämer, 2010). Condições físico-químico, como composição química, pH, temperatura e energia livre da água do ambiente dessas bactérias são capazes de afetar seu desenvolvimento.

O estresse ambiental mais frequente para as bactérias presentes no solo consiste no estresse osmótico, em virtude das variações nas condições osmóticas. Diante dessas circunstâncias, tais microrganismos desenvolveram uma série de

mecanismos de defesa, visto que nessas condições, características como volume, tamanho e fisiologia da célula são afetadas negativamente (Kramer, 2010).

Uma situação de alto potencial hídrico (estresse hiposmótico), por exemplo, em que há aumento da energia da água, pode resultar num influxo de água para o interior da célula bacteriana, elevando sua turgescência, podendo resultar inclusive na lise celular. O contrário, isto é, a redução no potencial hídrico de uma solução (estresse hiperosmótico), como ocorre no acréscimo de substâncias como o PEG, resulta na saída de água das células, podendo-se observar em situações extremas o fenômeno de plasmólise, que ocorre quando a membrana plasmática se contrai, chegando inclusive a se desprender da parede celular (Poolman *et al.*, 2002). Dessa forma, os mecanismos de percepção e respostas a variações do ambiente, devem ser ativados rapidamente, sendo eficiente o bastante para retornar às condições favoráveis ao desenvolvimento bacteriano (Poolman e Glaasker, 1998).

Como mecanismos para a manutenção da turgescência celular, as bactérias ajustam o potencial osmótico intracelular acumulando solutos compatíveis, também chamados de osmoprotetores, que correspondem a uma diversidade de moléculas de baixo peso molecular, que podem ser acumuladas no citoplasma da célula, sem interferir seu metabolismo (Wood, 1999). Dentre os solutos compatíveis encontrados em células bacterianas, Costa *et al.* (1998) citam compostos como trimetilamônio (betaína, por exemplo), aminoácidos, açúcares e heterosídeos. O acúmulo de solutos reduz o potencial osmótico intracelular, fazendo com que a água entre na célula a favor do gradiente hídrico, favorecendo inclusive a estabilidade da membrana celular (Kramer, 2010; Kogut e Russell, 1987).

Bactérias sintetizam moléculas de exopolissacarídeos (EPS) que podem desempenhar um importante papel em situações de baixo potencial hídrico, visto que estas criam uma bainha em torno das colônias bacterianas, criando um micro ambiente favorável ao desenvolvimento (Kilbertus *et al.*, 1979).

Sandhya *et al.* (2010) isolaram estirpes de *Pseudomonas* spp. de solos estressados, e observaram que tais estirpes “tolerantes” ao estresse produzem quantidades elevadas de exopolissacarídeos (EPS), aminoácidos livres, prolina e açúcar, relatando a importância desses mecanismos para a sobrevivência desses microrganismos.

2.4. Relação planta-microrganismos benéficos

No século passado, fisiologistas e anatomistas vegetais consideravam as plantas como organismos únicos e isolados, desconsiderando qualquer associação microbiana. No entanto, resultados de pesquisa acumulados nos últimos 30 anos comprovam que as plantas podem abrigar microecossistemas complexos, apresentando habitats distintos, capazes de serem explorados por uma alta diversidade bacteriana (Hallmann *et al.*, 1997). Esses habitats incluem tanto a superfície externa do vegetal (rizosfera e filosfera), onde bactérias epifíticas predominam quanto o interior vegetal, onde há presença das bactérias denominadas endofíticas (Lodewyckx *et al.*, 2002). Apesar disso, Hallmann *et al.* (1997) relatam que essa distinção não é fácil, visto que existem populações capazes de flutuar entre a colonização epifítica e endofítica.

A rizosfera, região do solo sob influência das raízes, tem características diferentes do restante do solo, sendo muito rica em nutrientes orgânicos devido à exsudação de produtos fotossintéticos pelo sistema radicular das plantas, beneficiando o desenvolvimento e crescimento de microrganismos (Cardoso *et al.*, 1992; Lynch e Whipps, 1991). O carbono fixado pela fotossíntese é parcialmente translocado para a zona da raiz e lançado como exsudato radicular (Bais *et al.*, 2006), composto por carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, além de outros compostos, que atuam como fontes de nutrientes para as bactérias associadas as raízes (Walker *et al.*, 2003). Dessa forma, a rizosfera consiste na região do solo em que ocorre o maior número de relações microrganismos-plantas (Lynch, 1982). Além da exsudação de fotoassimilados, a rizosfera sofre influência da absorção seletiva de íons e água, modificando a concentração destes, gerando gradientes necessários para o transporte via sistema radicular (Pereira, 2000).

O tamanho da região rizosférica varia com a morfologia da raiz (Cardoso *et al.*, 1992), e fatores como o cultivar, exposição a diferentes situações de estresse, estágio de desenvolvimento vegetal estão relacionados com a composição dos exsudatos, além de o tipo de solo e a disponibilidade de nutrientes influenciarem diretamente a quantidade de fotoassimilados secretados. Conseqüentemente, a composição e a quantidade de substâncias secretadas influenciam o tipo e o estabelecimento da colonização bacteriana, visto que diferentes exsudatos podem

apresentar efeitos atrativos ou repulsivos (Lugtenberg *et al.*, 2001; Krafczyk *et al.*, 1984; Compant *et al.*, 2010).

As rizobactérias mais competentes modulam seu metabolismo a fim de otimizar a aquisição de nutrientes (Hardoim *et al.*, 2008), por quimiotaxia, essencial para o sucesso da colonização rizosférica (Wish *et al.*, 2001). Algumas bactérias também são atraídas pela mucilagem da raiz, como verificado em *Azospirillum* spp. em plantas de milho (Mandimba *et al.*, 1986). Um mutante de *Pseudomonas fluorescens*, sem o gene *cheA*, responsável pela quimiotaxia, apresentou redução do movimento em direção aos exsudatos de raiz na rizosfera de tomateiro, conseqüentemente, houve uma baixa colonização no sistema radicular e inexistência de resposta positiva a inoculação (de Weert *et al.*, 2002).

Uma diversidade de bactérias promotoras de crescimento vegetal se hospedam no ambiente da rizosfera, além disso, alguns desses microrganismos podem entrar nas plantas, o que vem sendo mostrado constantemente em diversos estudos em que endófitos com origem rizosférica colonizam o interior de plantas melhorando o crescimento dessas (Sturz e Nowak, 2000; Hardoim *et al.*, 2008).

2.5. Promoção de crescimento vegetal por bactérias

2.5.1. Biofertilização

A fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de minerais (como fósforo, por exemplo), a melhoria na absorção de nutrientes através do aumento nos fluxos de íons específicos na superfície da raiz, correspondem a alguns dos efeitos diretos das bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) no desenvolvimento vegetal (Bashan, 1991; Bertrand *et al.*, 2000; Glick, 1995). Essa contribuição da inoculação de BPCV para a nutrição dos vegetais varia de acordo com o genótipo da planta, interação da planta com os diferentes gêneros bacterianos, além de fatores como precipitação pluviométrica, disponibilidade de nitrogênio mineral e tipo de solo (Oliveira *et al.*, 2002).

O nitrogênio é o elemento químico mais limitante para o crescimento das plantas em seu ambiente natural (Franco e Döbereiner, 1994), sendo constituinte fundamental na síntese de proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos e clorofila, além

de estar presente na formação de cloroplastos, por exemplo. Assim, o nitrogênio é essencial para a síntese protéica e ativação de várias enzimas, e conseqüentemente, a produção de biomassa vegetal (Abreu *et al.*, 2002). Contudo, na atmosfera, grande reservatório de nitrogênio (cerca de 78% por volume), tal elemento se encontra na forma de nitrogênio molecular (N_2), em que os dois átomos estão ligados covalentemente por uma tripla ligação, exigindo que para sua obtenção haja a quebra dessa ligação, demandando alto gasto energético.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo realizado pela enzima nitrogenase, presente nas bactérias fixadoras de nitrogênio (também chamadas de diazotróficas), em que há a transformação do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), forma assimilável pelos vegetais (Nunes *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 1999). Exatamente por essa habilidade em converter nitrogênio atmosférico em substâncias nitrogenadas utilizáveis pelas plantas, essas bactérias também são reconhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Trabalhos como de Boddey *et al.* (1995) relataram que variedades de cana-de-açúcar cultivadas em boas condições de irrigação e ausência de adubação nitrogenada, apresentaram ao final de três anos um incremento de nitrogênio, em que 60 a 80% foram originados da FBN, enquanto que Inigues *et al.* (2004) mostraram que também há fixação de nitrogênio em outras gramíneas, porém em quantidades menores. Kuss *et al.* (2007) considerando que todo nitrogênio presente no meio de cultura era proveniente da FBN, pois o cultivo das bactérias foi feito em meio de cultura com total ausência deste nutriente, verificaram que o conteúdo total de nitrogênio variou muito entre isolados de variedades de arroz, sendo que as bactérias *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* se destacaram como melhores fixadoras de nitrogênio *in vitro*.

No entanto, uma elevação no teor de nitrogênio em determinadas plantas inoculadas pode resultar não somente da FBN, como também de um aumento na absorção deste nutriente do solo (Yanni *et al.*, 1997; Prayitno *et al.*, 1999). Evidências de que plantas inoculadas com bactérias diazotróficas também têm sua nutrição beneficiada por uma melhoria na absorção de nutrientes provenientes do solo estão em diferentes publicações. Exemplificando, Sevilla *et al.* (2001) usando mutantes *nifH*⁻ (gene estrutural da enzima nitrogenase) de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar observaram crescimento da planta na presença

de nitrogênio. Além do fato em que plantas de milho, cujas sementes inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*, apresentaram rendimento maior quando o fertilizante nitrogenado foi utilizado (Riggs *et al.*, 2001).

A capacidade de solubilizar minerais é um mecanismo bem explorado na literatura baseando-se no acesso de microrganismos a nutrientes anteriormente indisponíveis, e, além disso, uma vez solubilizado tais nutrientes tornam-se disponíveis para absorção pelas plantas (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). O fósforo é um elemento essencial para a planta, mas somente quando na forma de fosfato solúvel, porém no solo é mais presente como fosfato insolúvel (Khan *et al.* 2006). O mesmo ocorre para o zinco, absorvido pela planta sob a forma de íon zinco (Zn^{+2}). Dessa forma, trabalhos que relatam a solubilização de fósforo e/ou zinco por bactérias associadas a plantas comprovam seu efeito direto no crescimento do vegetal. Por exemplo, Intorne *et al.* (2009) comprovaram a solubilização de fósforo e zinco por *Gluconacetobacter diazotrophicus* através da produção de ácido glucônico. Trabalhos de seleção de traços fenotípicos relacionados a promoção do crescimento de plantas conduzidos por Baldotto *et al.* (2010) evidenciaram que entre vinte bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas isoladas de abacaxizeiro, seis e onze apresentaram capacidade de solubilizar óxidos de zinco e fosfato de cálcio, respectivamente.

Outro mecanismo de biofertilização envolve a captação bacteriana de íon ferro presente em baixas concentrações no solo por compostos de alta afinidade. O ferro age como co-fator de muitas reações enzimáticas e, portanto, é um nutriente essencial para praticamente todos os organismos. Porém, em condições aeróbias, ferro existe predominantemente como estado férrico (Fe^{3+}) e reage para formar hidróxidos altamente insolúvel que são em sua maioria indisponíveis para as plantas e microrganismos. Para adquirir o ferro suficiente, sideróforos produzidos por bactérias podem se ligar ao Fe^{3+} com alta afinidade para solubilizar esse metal para sua captação eficiente.

Mantelin e Tourain (2004) enfatizam o fato de que BPCV também melhoram a absorção mineral por elevar a superfície radicular e estimular sistemas de absorção, resultando também no acúmulo de biomassa de parte aérea.

2.5.2. Bioestimulação

Bioestimulação consiste no mecanismo de produção de metabólitos com influência no crescimento vegetal. A síntese e secreção de *fitohormônios*, por exemplo, é uma importante característica promotora de crescimento vegetal de grande parte das bactérias associadas às plantas. Dentre os principais hormônios vegetais secretados por esses microrganismos associados às plantas estão auxinas, citocininas e giberelinas que podem estimular a germinação, crescimento e reprodução vegetal (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000; Taghavi *et al.*, 2009). Por exemplo, auxina é o *fitohormônio* secretado em maior quantidade por *Azospirillum*, sendo o principal responsável pelo crescimento vegetal. Nesse mesmo gênero são conhecidas três diferentes vias de biossíntese do ácido indolacético (Carrena *et al.*, 2000; Vandebroek *et al.*, 1999).

O ácido indolacético produzido na parte aérea das plantas e transportado para as raízes está associado com o alongamento e divisão celular, contribuindo diretamente para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Rashotte *et al.*, 2000). Além disso, essa auxina é conhecida por gerar respostas rápidas (aumento da alongação celular) e lentas (divisão e diferenciação celular) (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Alterações no sistema radicular de plantas inoculadas com BPCV estão, sobretudo, ligadas diretamente à síntese de fitohormônios pelas BPCV. Dentre as modificações radiculares que em geral ocorrem, estão: aumento das raízes laterais e do número e comprimento de pelos radiculares (Okon e Vanderleyden, 1997; Pacovsky, 1990; Tien *et al.*, 1979). Segundo Mantelin e Tourain (2004), muito provavelmente, as BPCV não alterem somente uma via, mas várias vias de síntese de *fitohormônios*, que atuam diferentemente sobre a morfologia radicular.

2.5.3. Biocontrole

Como descrito por Dimkpa *et al.* (2009), as BPCV podem estimular o crescimento de forma direta ou indireta. Os chamados efeitos indiretos são aqueles relacionados com o biocontrole, que inclui uma variedade de mecanismos pelos quais a bactéria evita danos fitopatogênicos no desenvolvimento vegetal (Sgroy *et al.*, 2009).

Biocontrole inclui a produção de sideróforos, a produção de enzimas líticas da parede celular, óxido nítrico, cianeto de hidrogênio, ácidos orgânicos e metabólitos antibióticos que bloqueiam o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, além da capacidade de induzir resistência sistêmica (Bloemberg, 2001; Bowen, 1999; Glick, 1995; Persello-Cartieaux, 2003; Backman e Sikora, 2008).

Os sideróforos produzidos por BPCV quelam o ferro, reduzindo sua disponibilidade para patógenos que são dependentes de ferro do solo (Rajkumar *et al.*, 2010). Alguns trabalhos relatam a presença de enzimas bacterianas como quitinase, beta-1,3 glucanase, proteases, lipases (Van Loon *et al.*, 2006). Além disso, o uso de determinadas BPCV induzem resistência sistêmica em plantas contra vários fungos, bactérias, e vírus (Indiragandhi *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2000). Também há relatos de bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal bloqueando a proliferação de nematóides em plantas (Sturz e Kimpinski, 2004).

2.5.4. *Herbaspirillum seropedicae* - uma bactéria promotora de crescimento vegetal modelo

Descrita inicialmente como *Azospirillum seropedicae* em decorrência das similaridades, *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram negativa, apresentando de 1 a 3 flagelos, com tamanho variando de 1,5 a 5 µm e com alta mobilidade quando próxima a fonte de O₂ (Baldani *et al.*, 1986).

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe Betaproteobacteria e até o momento compreende 14 espécies (Monteiro *et al.*, 2012). Bactérias do gênero *Herbaspirillum* já foram encontradas associadas com diversas espécies vegetais, sendo os membros da família Poacea os mais predominantes. Muitos dados relatam o isolamento de *Herbaspirillum* de raízes lavadas e raízes cuja superfície foi previamente esterilizada de arroz, milho e sorgo (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996), e até mesmo de folhas de cana-de-açúcar (Pimentel *et al.*, 1991). Além destes relatos de ocorrência, tais microrganismos já foram encontrados em associação endofítica com nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Valverde *et al.*, 2003) e raízes desinfestadas de soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005), apesar de não estarem relacionados com o desenvolvimento dos nódulos. No entanto, pode haver colonização epifítica por parte desses microrganismos (James *et al.*, 2002), sendo extremamente difícil distinguir em qual tipo de colonização há maior contribuição

para o crescimento vegetal, definido como resultante da soma de ambos (Monteiro *et al.*, 2012).

Nas etapas iniciais da associação com as plantas, *Herbaspirillum seropedicae* é atraída pela fonte de carbono exsudada do sistema radicular, onde ocorre a adesão superficial e subsequentemente a infecção através dos pontos de emergência de raízes laterais, como representado na figura 1 (Monteiro *et al.*, 2012), podendo também ocorrer em feridas na epiderme, como relatado por Gyaneshwar (*et al.*, 2002). Depois de internalizados no tecido vegetal, rapidamente ocorre a colonização dos microrganismos pelos espaços intercelulares e ocupação dos vasos do xilema (James e Olivares, 1998).

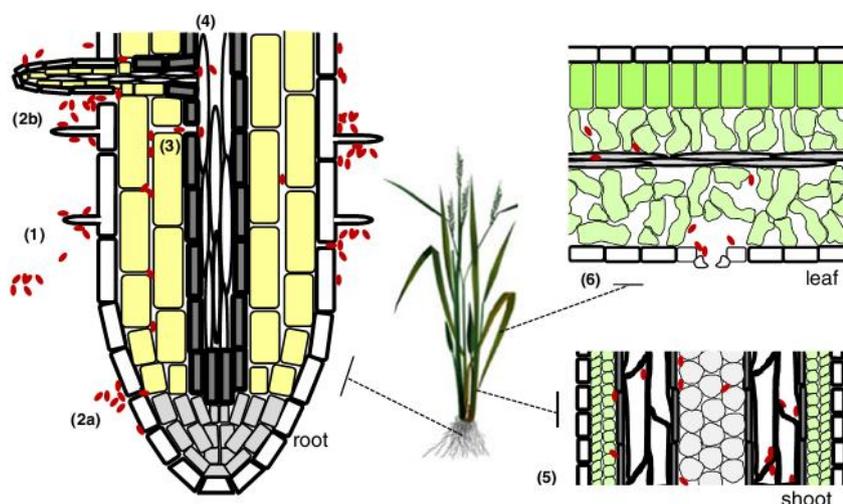


Figura 1- Esquema representativo da colonização de uma planta por *Herbaspirillum seropedicae* (vermelho). (Monteiro *et al.*, 2012).

Caracterizada como promotora de crescimento vegetal, *Herbaspirillum seropedicae* possui características como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, síntese de sideróforo, síntese de ácido indolacético e giberelinas, além de atividade ACC-deaminase (presente em algumas estirpes) capaz de reduzir os níveis de etileno prejudiciais ao desenvolvimento das plantas sob estresse (Bastián *et al.*, 1998; Pedrosa *et al.*, 2011).

2.6. Interação bactéria – planta – estresse

Atualmente existem trabalhos na literatura abordando os efeitos da inoculação de BPCV sobre plantas em diferentes condições de estresse, como: inundações

(Grichko e Glick, 2001), seca (Mayak *et al.*, 2004; Belimov *et al.*, 2009), toxicidade de metais (Belimov *et al.*, 2005) e deficiências de nutrientes (Egamberdiyeva, 2007).

No trabalho de Saravanakumar *et al.* (2011) foi relatado uma maior resistência de plantas *Vigna radiata* ao estresse hídrico quando estas foram inoculadas com cepa de *Pseudomonas fluorescens*, em que os sinais de murcha somente foram detectados a partir do oitavo dia após suspensão da irrigação, enquanto que no tratamento controle, tais sinais se iniciaram já no quarto dia.

Em resposta a uma deficiência hídrica, plantas aumentam a síntese de osmólitos, como glicina betaína e prolina, conseqüentemente, elevando o potencial osmótico dentro das células (Taiz e Zeiger, 2009), o que melhora a resistência de plantas ao estresse hídrico, mas que também protege contra o frio e salinidade (Dimkpa *et al.*, 2009). Em adição, estudos mostram que algumas BPCV também produzem osmólitos, como a glicina betaína, que pode agir de forma sinérgica com os compostos produzidos pelas plantas em resposta a estresse, intensificando ainda mais a tolerância ao estresse (Dimpka *et al.*, 2009).

Característica comum entre algumas BPCV presentes tanto na rizosfera quanto no interior das plantas (endofítica) é a atividade da enzima ACC deaminase, que hidrolisa o precursor do etileno, ACC (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico), como fonte de nitrogênio, reduzindo então os níveis deste hormônio vegetal, resultando na ausência de inibição do crescimento radicular, normalmente provocado por tal (Belimov *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2008; Dimkpa *et al.*, 2009; Glick *et al.*, 2007). Mayak *et al.* (2004) inocularam tomateiros com uma espécie de BPCV com atividade ACC deaminase (*Achromobacter piechaudii*), isolada de solos salinos, e submeteram tais plantas a tratamentos com NaCl. Oito semanas após o início do tratamento foi feita a análise de produção de etileno, onde observaram que as plantas inoculadas submetidas ao estresse apresentaram redução significativa na síntese de etileno, quando comparada com os tomateiros estressados, além de maiores pesos fresco e seco. Ainda relacionado à atividade ACC deaminase, Sergeeva *et al.* (2006) notificaram que em plantas de canola transgênicas, expressando o gene ACC deaminase bacteriano, houve uma maior resistência a altas concentrações salinas.

Como já descrito, a seca leva a produção de espécies reativas de oxigênio, havendo a necessidade de sistemas de eliminação. Analisando possíveis benefícios

da inoculação de *Vigna radiata* com BPCV, Saravanakumar *et al.* (2011) descreveram recentemente que a inoculação com *Pseudomonas fluorescens* promoveu maior atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e peroxidase durante o estresse hídrico. Resultados semelhantes também foram obtidos em plantas de alface sob condições de seca, onde a atividade da catalase foi maior na presença de *Pseudomonas mendocina* e fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices* ou *G. mosseae*) (Kohler *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem que inoculações desse tipo podem aliviar danos oxidativos resultantes da seca.

Outro importante mecanismo de redução do estresse, é a produção de fitohormônios por parte das bactérias, como foi visto por Yuwono *et al.* (2005). Ao trabalharem com plantas de arroz inoculadas e submetidas à seca, observaram uma maior proliferação radicular, conseqüentemente uma maior absorção de água. Tais fatos se deram em decorrência da produção de ácido indolacético.

Aquaporinas são proteínas de canal responsáveis pelo transporte de água, pequenos solutos neutros e gases, como o CO₂ através da membrana celular, agindo inclusive no ajustamento do fluxo de água em condições críticas da planta (Maurel *et al.*, 2008). Aquaporinas de plantas são divididas em quatro grupos com base em semelhanças na sequência de aminoácidos: proteínas da membrana plasmática intrínseco (PIPs), proteínas intrínsecas do tonoplasto (PIT), proteínas intrínsecas do tipo nodulina (PIN) e pequenas proteínas intrínsecas básicas (PIS). Alguns grupos podem ser subdivididos de novo como é o caso de proteínas PIP (dividido em PIP1 e PIP2) (Kaldenhoff e Fischer, 2006).

Déficit hídrico, salino e aumento nos níveis de ABA podem causar alterações na regulação pós-transcricional da expressão da aquaporina (Luu e Maurel, 2005). Além disso, alguns estudos relatam que determinadas BPCV associadas a plantas em situações de estresse abiótico (hídrico ou salino, por exemplo) induzem uma maior expressão de aquaporinas, beneficiando o desenvolvimento vegetal nessas condições (Zawoznik *et al.*, 2011).

Assim sendo, plantas que se desenvolvem em condições limitantes de água e nutrientes são afetadas, apresentando, no entanto, alguns mecanismos de defesa e tolerância. O mesmo ocorre com microrganismos habitantes dessas condições, como é o caso dos promotores de crescimento encontrados tanto na rizosfera quanto no interior desses vegetais, que também possuem certas adaptações a

essas condições. Dessa forma, aprofundar os conhecimentos sobre e otimizar a interação desses (microrganismos-planta) pode ser de extrema relevância, objetivando-se melhorar as estratégias de defesa frente a condições adversas (Marulanda *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESE

Ausência de efeitos na sobrevivência e viabilidade da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, com características promissoras de promoção de crescimento vegetal e resistência ao estresse, podem atenuar os efeitos do estresse simulado por PEG 6000 sobre o desenvolvimento, fisiologia e anatomia radicular de plantas de tomate cv. Santa Clara.

4. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do estresse hídrico simulado por solução de PEG 6000 sobre o desenvolvimento de plantas de tomate cv. Santa Clara, e da bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, bem como sobre a interação destes, visando desvendar um potencial da bactéria em promover tolerância ao estresse hídrico simulado nessa espécie vegetal.

4.1. Objetivos específicos

- I. Determinar a dose de PEG 6000 para simulação de estresse hídrico em plantas de tomate cv. Santa Clara;
- II. Avaliar os efeitos de soluções de PEG 6000 sobre a viabilidade e desenvolvimento da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54;
- III. Verificar o papel da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 em atenuar danos resultantes do estresse hídrico simulado por PEG 6000 em plantas de tomate cv. Santa Clara através de análises de:
 - Comprimento de raiz axial;
 - Raízes laterais;
 - Taxa fotossintética;
 - Acúmulo de biomassa fresca;
 - Teor relativo de água;
- IV. Avaliar comparativamente as modificações anatômicas no sistema radicular de plantas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10, na presença ou ausência do estresse hídrico simulado por PEG 6000;
- V. Avaliar comparativamente o perfil de colonização de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 em raiz de plantas de tomate cv. Santa Clara, submetidas ou não ao estresse hídrico simulado;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Material vegetal

Como modelo experimental para todos os ensaios foram utilizadas plantas de tomate cultivar Santa-Clara (*Solanum lycopersicum*). As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em álcool 70 % (3 minutos) e posterior imersão em hipoclorito de sódio 1% (1minuto), seguido de seis lavagens consecutivas em água destilada esterilizada.

5.2. Microrganismos

As bactérias utilizadas foram *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 (Olivares, 1997) e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 pertencentes ao estoque do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, na Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 possui inserção através de transposon Tn5 do gene *gfp* (*green fluorescent protein*), e foi gentilmente cedida pela Dra Rose Adele Monteiro (departamento bioquímica e biologia molecular, UFRP), sendo derivada originalmente da estirpe *H. seropedicae* ZA95 isolada de arroz (Baldani *et al.*, 1986). Os inóculos foram obtidos pelo cultivo de 20 µL do estoque bacteriano em meio DIGY'S líquido (Döbereiner *et al.*, 1995) por 24 horas em agitador orbital (140 rpm, 30° C).

5.3. Efeitos do estresse simulado por PEG 6000 sobre as plântulas de tomate

Para determinação da curva de resposta de plântulas de tomate a concentrações crescentes de PEG 6000, sementes de tomate desinfestadas foram semeadas em placas de petri contendo meio sólido agar-água (6 g/L) e mantidas em câmara de crescimento B.O.D. (25° C; fotoperíodo de 16 horas). Após a emissão da raiz, que ocorreu com quatro dias, foi mensurado o comprimento (comprimento inicial) com auxílio de uma régua milimetrada, e em seguida, foram selecionadas para o ensaio dose-resposta plântulas padronizadas quanto ao comprimento inicial das raízes. Estas foram transferidas para caixas gerbox, contendo papel germitest umedecidos com 8 mL de soluções de PEG 6000 (0 g/L; 70 g/L; 140 g/L; 210 g/L e

280 g/L) num esquema de cinco sementes por caixa e quatro caixas por tratamento. Essas caixas foram acondicionadas em posição vertical ($\pm 45^\circ$) em câmara de crescimento B.O.D., nas mesmas condições para germinação durante quatro dias, quando foram realizadas novas mensurações do comprimento radicular (comprimento final). Para determinação do efeito das doses de PEG 6000 sobre as taxas de crescimento longitudinal da raiz axial, foi realizado o seguinte cálculo:

$$x = \text{Comprimento final} - \text{Comprimento inicial}$$

A dose responsável por inibir 50% do crescimento da raiz axial das plântulas de tomate cv. Santa Clara (*Solanum lycopersicum*) em relação a plântulas não tratadas com PEG foi determinada como dose estressante, passando a ser utilizada nos ensaios posteriores.

5.4. Efeitos do PEG 6000 sobre *Herbaspirillum seropedicae* HRC54

Um volume inicial de 80 mL de inóculo de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 cultivada por 24 horas em meio de cultivo DIGY'S líquido, em agitador orbital (140 rpm, 30°C), foi centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm, 20° C. Sob ambiente de fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" obtido foi ressuscitado em 80 mL de solução salina (0,85% NaCl), e distribuído em microtubos (1mL) e centrifugado por 10 minutos (13000 rpm). Novamente, todo o sobrenadante foi descartado e cada "pellet" ressuscitado em 500 μ L da solução tratamento (Controle: Água esterilizada; 70 g/L; 140 g/L; 210 g/L; 280 g/L de PEG), totalizando cinco tratamentos, duas repetições e três tempos. Todos os microtubos foram vedados com Parafilm® e mantidos em câmara de crescimento B.O.D., com coleta das amostras 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos.

Em cada tempo (24, 48 e 72 horas) foram realizadas duas novas centrifugações (13000 rpm, 10 minutos), seguidas da ressuspensão em 1 mL e 400 μ L de solução salina (0,85% NaCl), respectivamente. Uma alíquota de 200 μ L da suspensão foi reservada para análise de viabilidade celular com Kit LIVE/DEAD® Cell Viability Assays, e o restante (800 μ L) utilizado para a determinação do número mais provável de células de *H. seropedicae* por unidade de volume (1 mL).

5.4.1. Análise de viabilidade celular

O volume de 200 µL da suspensão de células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 foi corado com marcadores fluorescentes utilizando o kit LIVE/DEAD® Cell Viability Assays de acordo com instruções do fabricante. Após 15 minutos de incubação no escuro, 5 µL da mistura corada com os fluorocromos SYTO 9 e iodeto de propídio foi observada em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan, de tal sorte que bactérias com membranas celulares intactas foram marcadas de verde, enquanto que bactérias com a membrana danificada foram marcadas de vermelho. Os filtros de excitação e emissão utilizados para estes corantes foram 480/500 nm para SYTO 9 e 490/635 nm para o iodeto de propídio.

5.4.2. Contagem pelo número mais provável

Para a contagem da bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54 foi utilizado o método do número mais provável, em que do volume total de 800 µL duas alíquotas foram utilizadas, sendo que cada 100 µL foram transferidos para microtubos contendo 900 µL de água esterilizada (10^{-1}) e pelo método da diluição seriada foi obtida até 10^{-7} . Um volume de 100 µL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} foi aplicado em vidros de penicilina contendo meio semi-sólido JNFb isento de nitrogênio, sendo três vidros para cada diluição. Todo esse procedimento foi realizado sob ambiente de fluxo laminar. A presença da bactéria foi confirmada pela formação de película aerotóxica esbranquiçada no meio semi-sólido alcalinizado (cor azul do azul de bromotimol), típica da bactéria, e a estimativa da população determinada com base na consulta à tabela de McCrady para três repetições por diluição (Döbereiner *et al.*, 1995).

5.5. Efeito do PEG 6000 sobre a interação *Herbaspirillum seropedicae* – plântulas de tomate

5.5.1. Estudo do sistema radicular

Sementes de tomate desinfestadas foram semeadas em placas de Petri, em meio agar-água (6 g/L), e mantidas por quatro dias em câmara de crescimento B.O.D. (fotoperíodo 16 horas, 25 ° C) até o surgimento de radícula. Após esse

período, o comprimento inicial de cada radícula foi obtido com auxílio de uma régua milimetrada.

Para realização desse ensaio, inicialmente metade das plântulas (seis) foram submetidas à inoculação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e o restante (seis) tido como controle, e após seis dias, em metade de cada um desses tratamentos (Controle e inoculado) houve a imposição do estresse simulado pela irrigação diária com solução de PEG 6000 na dose estressante (210 g/L). Para a inoculação das plântulas que tiveram o comprimento da raiz estimado foram imediatamente imersas em microtubos contendo 1 mL de inóculo de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 (10^8 células.mL⁻¹), obtido segundo Döbereiner *et al.* (1995), onde permaneceram sob leve agitação em agitador orbital (100 rpm, 30°C) durante 30 minutos, enquanto para o tratamento controle, a imersão foi realizada em água destilada esterilizada. Após tal procedimento de inoculação, cada plântula foi transferida para um tubo de ensaio de 50 mL, contendo areia previamente autoclavada duas vezes por uma hora, num intervalo de 24 horas a 120 °C, onde permaneceram por seis dias recebendo irrigação diária com água destilada para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas. Após esse tempo de seis dias, foi realizada a imposição do estresse hídrico simulado por PEG 6000 na concentração de 210 g/L para metade dos tubos, totalizando assim, quatro tratamentos (Controle: ausência de inoculação; controle + PEG; Inoculado; Inoculado + PEG) e três repetições.

Ao fim dos três dias sob estresse as plantas foram retiradas de cada tubo cuidadosamente, lavadas em água corrente, para realização da contagem do número de raízes laterais e mensuração do comprimento final da raiz axial com auxílio de uma régua milimetrada. Para calcular o efeito dos tratamentos no crescimento da raiz axial, foi realizado o seguinte cálculo:

$$x = \text{Comprimento final da raiz axial} - \text{Comprimento inicial da raiz axial}$$

5.5.2. Estudo sobre o crescimento e fisiologia de plantas de tomate

Sementes de tomate desinfestadas previamente germinadas em placas de Petri contendo agar-água (6 g/L) foram padronizadas quanto ao tamanho da radícula. Em seguida, a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54

foi realizada em metade das plântulas (168 plântulas) como descrito no tópico 5.5.1. Em seguida, cuidadosamente e com auxílio de uma pinça as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 200 mL contendo areia previamente autoclavada (duas vezes com intervalo de 24 horas, durante uma hora a 120 °C), totalizando oito plântulas por vaso, num total de 42 vasos, sendo 21 inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e 21 com plântulas sem inoculação.

O experimento foi mantido em câmara de crescimento, com média de 65 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz e temperatura média de 27°C. Durante dez dias todos os vasos receberam irrigação diária com água até a capacidade de campo, e após esse período iniciou-se o estresse hídrico simulado pela irrigação com PEG 6000 (210 g/L) em metade dos vasos correspondentes a cada tratamento, totalizando quatro tratamentos (Controle; Controle + PEG; Inoculado; Inoculado + PEG).

Em virtude do pequeno porte das plantas, diretamente relacionado com a pouca idade destas, para todas as análises foram utilizados os valores obtidos na soma de quatro plantas de cada vaso, sendo assim, cada vaso com oito plantas correspondeu a duas repetições, totalizando, seis repetições (dois grupos de quatro plantas num total de três vasos) por tratamento.

As análises foram realizadas em quatro tempos: tempo 0 (último dia que antecedeu a imposição do estresse hídrico), 5, 10 e 15 dias de estresse e nesses dias, as plantas foram lavadas cuidadosamente em água corrente e imediatamente avaliadas.

5.5.2.1. Características avaliadas

Taxa fotossintética

Para obtenção da taxa fotossintética, a fim de excluir qualquer interferência da areia, seja na liberação ou consumo de CO₂, foi montada uma estrutura de espuma (Figura 2 A) para o encaixe de quatro plantas do mesmo vaso, correspondente a uma repetição, apoiada sobre a borda de um copo contendo água destilada (Figura 2 B), e imediatamente colocada dentro da câmara do analisador de gás infravermelho (IRGA 6200, LI-COR, Lincoln, NE, USA) (Figura 2 B). Para realização das medidas houve o auxílio de luz artificial, com fluxo de fótons fotossintético ajustado para 500 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2 C). Os valores de taxa

fotossintética foram expressos em $\mu\text{mol CO}_2$ por kg massa fresca de parte aérea por segundo ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

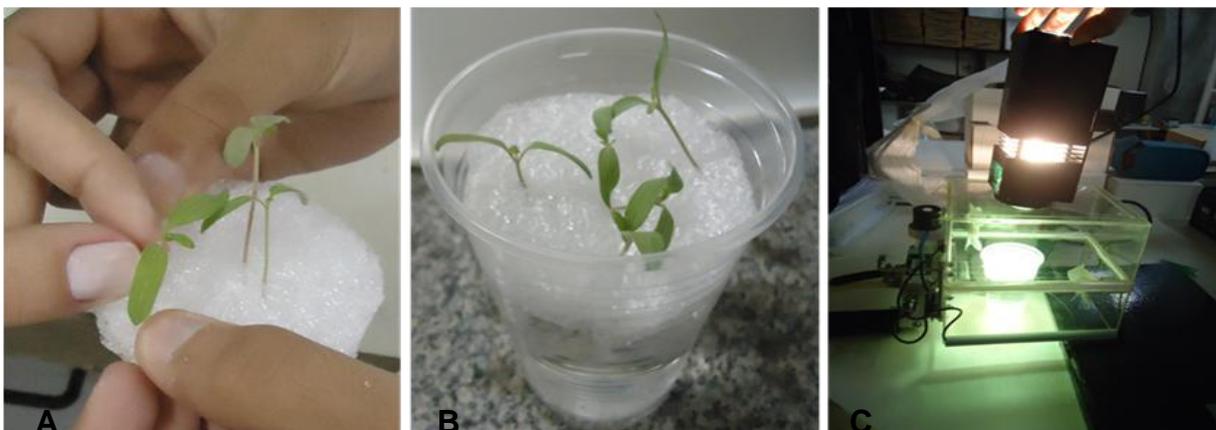


Figura 2- Estrutura montada para suporte das plantas e isolamento do sistema radicular (A, B); Análise de taxa fotossintética das plantas na câmara do analisador de gás infravermelho-IRGA 6200 (C).

Massa fresca

Após cada análise de taxa fotossíntese a massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz foram obtidas separadamente em balança analítica.

Teor relativo de água

A parte aérea de cada planta foi identificada e colocada em um dessecador contendo água o suficiente para um contato direto com a base da planta. Em seguida, uma bomba de vácuo, foi acoplada ao dessecador vedado, e permaneceu ligada por oito minutos, a fim de forçar a entrada de água no tecido da parte aérea das plantas. O peso obtido após esses oito minutos corresponde à massa saturada. Por meio da equação abaixo, o teor relativo de água (TRA) da parte aérea das plantas foi obtido (Turner, 1981):

$$\frac{\text{Massa fresca} - \text{Massa seca}}{\text{Massa saturada} - \text{massa seca}} \times 100$$

Contagem de bactérias

Ao final das análises de tempo 0 e 15 dias sob estresse simulado foi realizada contagem da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54. Para

tal, amostras de 0,1 g de raiz foram coletadas e lavadas em água corrente, para posterior maceração em 99,9 mL de água destilada esterilizada (10^{-3}). Em seguida, pelo método de diluição seriada, alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de vidro contendo 9 mL de água destilada esterilizada, processo esse que foi repetido por mais duas vezes (10^{-4} a 10^{-6}). Para frascos de penicilina contendo 5 mL de meio de cultivo semi-sólido JNFb isento de nitrogênio foram transferidas alíquotas de 100 μ L de cada diluição, totalizando três repetições por diluição. Os frascos permaneceram incubados a 30°C por sete dias. A quantificação dos níveis populacionais foi feita pela expressão do número mais provável (NMP) pela consulta a tabela de McCrady (Döbereiner *et al.*, 1995).

5.5.3. Estudo do efeito do PEG 6000 na morfologia e anatomia radicular e no padrão de colonização da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Ram10

Sementes de tomate desinfestadas semeadas em placas de Petri contendo agar - água (6 g/L) para germinação por quatro dias em câmara de crescimento B.O.D. (fotoperíodo 16 horas, 25 ° C). Após a emissão das radículas, cada plântula foi imersa em microtubos contendo 1 mL de inóculo de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 (com inserção através do transposon Tn5 do gene *gfp*- “*Green fluorescent protein*”), previamente obtido segundo Döbereiner *et al.*, (1995) ou água destilada esterilizada. As plântulas permaneceram imersas por 30 minutos sob agitação leve de 100 rpm a 30 °C em agitador orbital. Passado esse tempo, dez plântulas foram colocadas em um suporte de isopor suspenso em copos de plástico de 300 mL contendo água destilada esterilizada ou solução de PEG 6000 na dose estressante de 210 g/L, totalizando quatro tratamentos (Controle; Controle + PEG; Inoculado; Inoculado + PEG). O experimento foi mantido em câmara de crescimento B.O.D. (fotoperíodo 16 horas, 25 °C) por 24 e 48 horas, quando plântulas foram coletadas cuidadosamente, retirando-se segmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento da raiz axial a partir da coifa, montagem em água lâmina de vidro e imediata observação e análise em microscópio óptico invertido nos módulos epifluorescência (detecção da colonização bacteriana na superfície radicular) e campo claro para descrição dos atributos de geometria radicular (raízes laterais, presença de pêlos radiculares) ao longo de todo segmento. Para tal, foi utilizado um

microscópio Zeiss Axiovert acoplado com câmera digital Zeiss e software Axiovision Zeiss (versão 4.8).

Para uma visão mais detalhada da interação da bactéria marcada com *gfp* na planta, segmentos de até 1 cm foram montados em lâminas de vidro com água destilada, cobertas com lamínulas e visualizadas no microscópio ótico de fluorescência Axioplan (Zeiss) com os filtros BP (“band-pass”) com comprimento de onda de excitação entre 460 e 490nm e comprimento de onda de emissão de 510 a 550 para visualização da emissão de fluorescência verde. As imagens foram obtidas por meio de uma câmera fotográfica digital Canon Power Shot A640 acoplada ao microscópio e com auxílio do programa Zoom Browser EX.

5.6. Análises estatísticas

Com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Curva de resposta de plântulas de tomate cv. Santa Clara a concentrações crescentes de PEG 6000.

Estudos como o de Munns (1993) afirmam que o crescimento vegetal é afetado por estresse em duas fases, sendo a primeira decorrente da baixa disponibilidade hídrica no solo e a outra pelo efeito tóxico dos íons em alta concentração.

A hidratação ao longo de quatro dias do papel germitest, onde cresciam plântulas de tomate cv. Santa Clara, com diferentes concentrações de soluções de PEG 6000 (0, 70, 140, 210 e 280 g/L) em condições de câmara de crescimento do tipo B.O.D., resultou em efeitos negativos sobre o desenvolvimento do sistema radicular, evidenciando o dano causado pela molécula de PEG 6000. No entanto, tal curva de resposta objetivou a determinação da dose capaz de melhor simular o estresse hídrico em plântulas de tomate, a qual ficou previamente definida no objetivo deste trabalho como sendo a concentração de PEG 6000 capaz de reduzir 50% do comprimento da raiz axial. Como representado na figura 3, a concentração máxima utilizada (280g/L) promoveu maior redução radicular, porém, 210 g/L foi a responsável por inibir metade do crescimento da raiz axial de plântulas de tomate, sendo a concentração escolhida para a continuidade dos ensaios da interação bactéria-planta.

O polietileno glicol em solução não é capaz de entrar no apoplasto de tecidos não danificados, sendo assim responsável por retirar a água tanto da célula quanto da parede celular, simulando um solo seco ou bastante desidratado. No entanto, essa solução apresenta alta viscosidade, podendo limitar a difusão de O₂ pelo meio, causando prejuízos adicionais ao desenvolvimento vegetal (Verslues *et al.*, 1998). Tais características do PEG explicam a redução no crescimento da raiz axial das plântulas de tomate apresentada na figura 3.

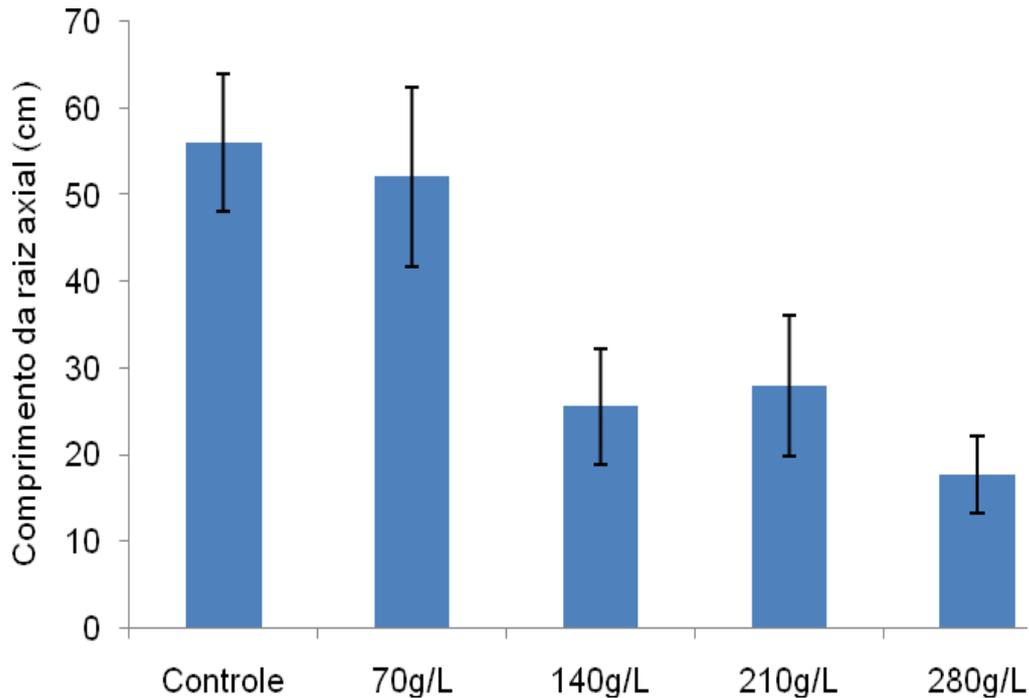


Figura 3- Efeito de diferentes concentrações de PEG 6000 sobre o crescimento da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara. Cada barra representa média de vinte repetições.

6.2. Efeitos do PEG 6000 sobre *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54

A contagem de bactérias em placas permite contabilizar somente aquelas cultiváveis, além de ser sensível às condições de cultura (temperatura, tempo de incubação, por exemplo) e o tempo para obtenção das respostas variar de um a sete dias. Um método rápido e fácil, cuja visualização em microscópio de fluorescência é realizada imediatamente é a utilização do kit LIVE/DEAD[®] Cell Viability Assays (Boulos *et al.*, 1999).

Alíquotas de cultura de *H. seropedicae* estirpe HRC54 mantidas sob baixos potenciais hídricos, impostos por diferentes concentrações solução de PEG 6000 (70, 140, 210 e 280 g/L) foram coradas com o kit LIVE/DEAD[®] Cell Viability Assays e comparadas com o crescimento na ausência de estresse. Esse kit é composto por uma mistura de dois fluorocromos ligantes: SYTO 9 e iodeto de propídio, que diferem pela habilidade de penetrar nas células. SYTO 9 marca todas as células vivas de verde, enquanto o iodeto de propídio penetra somente nas células cuja membrana está danificada, corando-a de vermelho (Molecular Probes, 1995) (Figura 4). A tabela 1 mostra em valores percentuais, a proporção de células vivas de *H.*

seropedicae após 24, 48 e 72 horas sob concentrações crescentes de solução de PEG 6000. Uma análise geral dos dados evidencia que o binômio concentração e tempo de exposição não afetou a viabilidade das bactérias, assim o período de tempo e os níveis de estresse utilizados não foram capazes de afetar a integridade da membrana das bactérias, sugerindo que neste período de exposição de estresse, essa espécie bacteriana possui mecanismos adaptativos de resposta a baixos potenciais osmótico-hídricos. A manutenção da viabilidade celular é importante quando se considera o efeito potencial de bioinoculantes na atenuação de efeitos deletérios do déficit hídrico em plantas inoculadas, já que nessas mesmas concentrações e tempo de exposição, reduções no crescimento radicular de plantas de tomate não inoculadas puderam ser observadas (ver Figura 3). Do exposto, considera-se *H. seropedicae* estirpe HRC54 adequada para estudos da interação entre bactérias promotoras do crescimento vegetal e plantas de tomate em ensaios de estresse hídrico simulado por PEG 6000, abrindo possibilidades para elucidação de mecanismos potenciais para imposição de tolerância em plantas inoculadas.

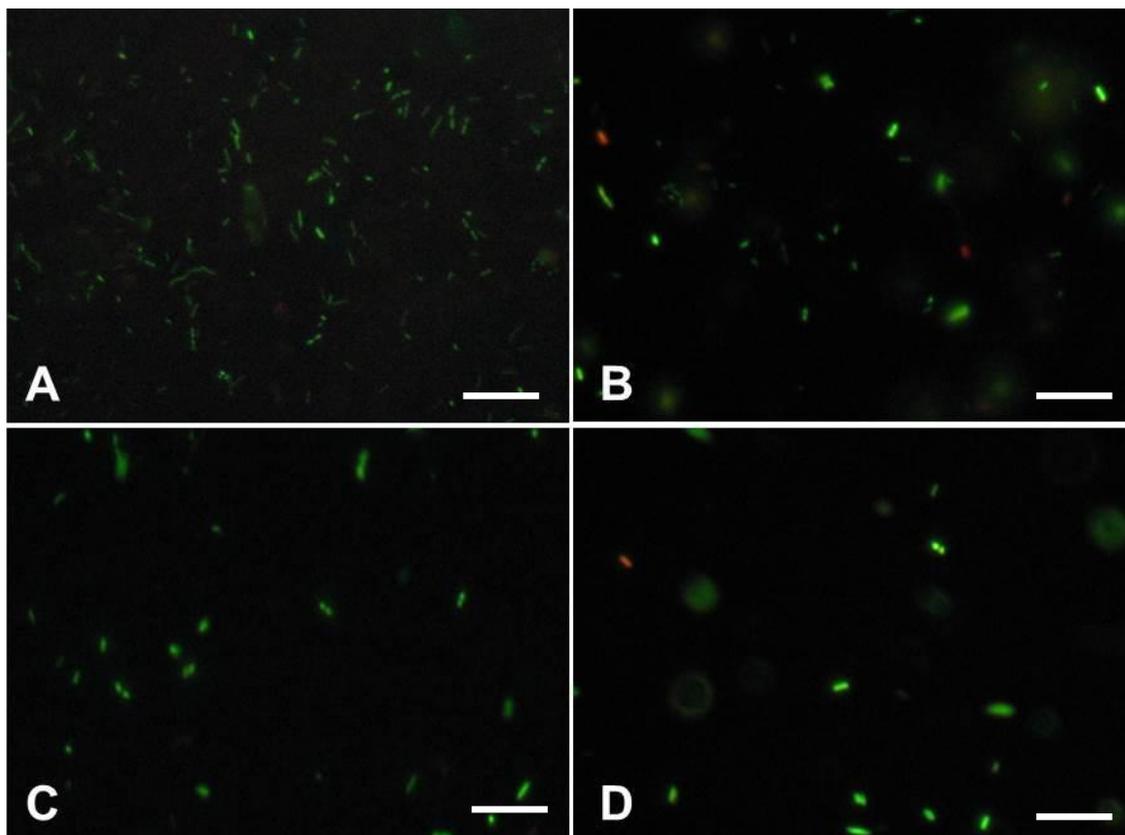


Figura 4- Microscopia de fluorescência de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 corada com kit LIVE/DEAD[®] Cell Viability Assays e previamente submetida a concentrações de PEG 6000 por diferentes tempos. A: Controle (água destilada esterilizada) por 24 horas; B: Controle por 72 horas; C: 210 g/L PEG 6000 por 24 horas; D: 280 g/L de PEG 6000 por 72 horas, Barra: 10µm.

Tabela 1 - Porcentagem de células vivas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 em diferentes tempos de exposição a concentrações crescentes de solução de PEG 6000. Cada valor representa a média de quatro repetições.

Células vivas <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe HRC54 (%)			
	24 horas	48 horas	72 horas
Tratamentos			
Controle	100,00	100,00	94,21
70g/L	100,00	100,00	100,00
140g/L	100,00	100,00	100,00
210g/L	100,00	100,00	100,00
280g/L	100,00	100,00	95,54

A análise baseada na integridade da membrana plasmática das bactérias submetidas ao PEG (concentração x tempo) foi combinada com a estimativa da

densidade populacional para uma avaliação mais precisa da viabilidade celular, combinando assim integridade celular com a capacidade de crescimento e multiplicação. Assim, diluições seriadas dos diferentes tratamentos foram realizadas e as populações *H. seropedicae* estirpe HRC54 foram estimadas em JNFb semi-sólido (Tabela 2). Os resultados evidenciam que o número de células não é afetado pelas concentrações crescentes, tampouco pelo tempo de exposição ao PEG 6000, com exceção da maior dose (280 g/L) em que há uma pequena redução na densidade populacional com relação ao controle e também nessa concentração entre 48 e 72 horas submetidas ao estresse, assim como observado no teste da viabilidade (Tabela 1). No entanto, para a dose definida para tomateiro, 210 g/L (Figura 3), não houve redução significativa na população de *H. seropedicae* estirpe HRC54.

É importante ressaltar que, com exceção da concentração de 210 g/L, em todas as outras concentrações houve um razoável aumento na população de bactérias, de 24 para 72 horas de exposição ao estresse. Isso é citado por Zhou *et al.*, (2011) relatando que como resposta a choques osmóticos, os microrganismos passam pelas fases de desidratação, regulação e reidratação e remodelação (Wood, 1999). Segundo esses mesmos autores, inicialmente pode haver um acúmulo de íons, como potássio, glutamato e solutos compatíveis, seguido pela expressão de genes osmo-responsivos, até o estabelecimento de um novo ciclo.

Tabela 2 - Número mais provável de células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 em diferentes tempos de exposição a concentrações crescentes de solução de PEG 6000. Cada valor representa a média de duas repetições, seguido pelos valores de desvio padrão.

N.M.P. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe HRC54			
(log₁₀ n^o células. mL⁻¹)			
	24 horas	48 horas	72 horas
Tratamentos			
Controle	8,59 ± 0,63	8,15 ± 0	8,15 ± 0
70g/L	7,90 ± 0,35	8,15 ± 0	8,15 ± 0
140g/L	8,15 ± 0	8,15 ± 0	8,59 ± 0,63
210g/L	7,85 ± 0,27	8,15 ± 0	7,81 ± 0,47
280g/L	7,66 ± 0,69	7,03 ± 0,89	9,04 ± 0

A resposta de bactérias a estresses osmóticos envolve uma série de eventos, como o acúmulo de solutos compatíveis, como trealose e sacarose, e síntese de exopolissacarídeos (EPS), por exemplo. Porém, antes mesmo de se entender os fenótipos, é importante analisar os transcritos nessas situações. Assim, Gulez *et al.*, (2011) descreveram alguns genes de *Pseudomonas putida* cuja expressão foi alterada após exposição a condições de estresse salino. Os autores relatam que genes da síntese de EPS relacionados ao alginato apresentaram regulação positiva, demonstrando mecanismo de proteção à bactéria devido à hidratação criada pelo alginato, além dos genes ligados a formação dos flagelos que também apresentaram maior expressão.

6.3. Efeitos do PEG 6000 sobre a interação *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 – plantas de tomate cv. Santa Clara

Raiz axial e raízes laterais

As figuras 5 e 6 demonstram os efeitos da irrigação com solução de 210 g de PEG 6000 por litro de água sobre a geometria do sistema radicular de plantas de tomate na presença e ausência da bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54.

O efeito do estresse por PEG na redução do crescimento longitudinal da raiz axial de plântulas de tomateiro (figura 5) foi novamente notado, como previamente relatado na figura 3. A bacterização não estimulou o comprimento da raiz em relação a plantas não inoculadas, no entanto, plantas inoculadas e irrigadas com PEG exibiram uma redução mais modesta no comprimento da raiz axial, resultando em média de tratamento não significativa em relação a plantas que não receberam PEG. A comparação das raízes sob estresse aponta para um efeito tênue da bacterização na redução dos impactos negativos do PEG sobre o crescimento longitudinal da raiz axial. Esses dados contrastam com os de Shakir *et al.*, (2012) em que a inoculação de plantas de trigo com duas bactérias produtoras de AIA e atividade positiva de ACC-deaminase, aumentou o comprimento radicular.

Na contagem de raízes laterais, estrutura originada a partir de divisões do periciclo e de extrema importância para absorção de água e nutrientes, ficou evidenciado o incremento significativo do número de raízes laterais em plantas inoculadas com *H. seropedicae* estirpe HRC54 relativo ao controle. O efeito positivo da bacterização contrasta com efeito negativo da aplicação do PEG, o qual causou significativa redução na indução de raízes laterais (Figura 6). Os efeitos antagônicos do PEG e da bacterização resultaram em um efeito protetor da última, de tal sorte que a inoculação com HRC54 sob estresse hídrico simulado resultou em plantas com número de raízes laterais similares a plantas controle (Figura 6). O efeito negativo do PEG 6000 sobre a indução de raízes laterais pode estar relacionado diretamente com o aumento dos níveis de etileno, fitohormônio naturalmente sintetizado pelas plantas nessas condições de baixa disponibilidade hídrica, que inibe o desenvolvimento de raízes laterais, (Taiz e Zeiger, 2009).

Auxina e etileno são dois hormônios vegetais que desempenham funções sobre o desenvolvimento da raiz, especialmente na formação de raízes laterais. Estudos já desenvolvidos com plantas de tomate mostram que auxina estimula formação de raízes laterais e adventícias (Ivanchenko *et al.*, 2006; Tyburski and Tretny, 2004), enquanto mutantes de *Arabidopsis* com a síntese de etileno aumentada exibem redução no número de raízes laterais (Huang *et al.*, 2003).

Dentre as formas de auxinas conhecidas, o ácido indolacético é o mais abundante e relevante. Análise genômica de *Herbaspirillum seropedicae* identificou quatro diferentes vias de síntese de ácido indolacético (AIA) a partir do triptofano.

Além das vias biossintéticas de AIA presentes na bactéria em estudo, também foi encontrado no genoma o gene que codifica a enzima ACC-deaminase, capaz de competir com ACC oxidase, responsável por converter ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico em etileno, bloqueando assim a biossíntese de etileno nas plantas, consequentemente, reduzindo seus efeitos sobre a planta em condições de estresse (Pedrosa *et al.*, 2011). Com base nessas características da bactéria, o aumento no número de raízes laterais nas plantas inoculadas na presença e ausência da irrigação com PEG 6000 pode ser, em parte explicado como resultante de um balanço hormonal AIA-etileno. Desta forma, esses resultados (Figura 6) demonstram uma importante atuação desta bactéria na melhoria do sistema de absorção das plantas de tomate como mecanismo de tolerância ao estresse hídrico.

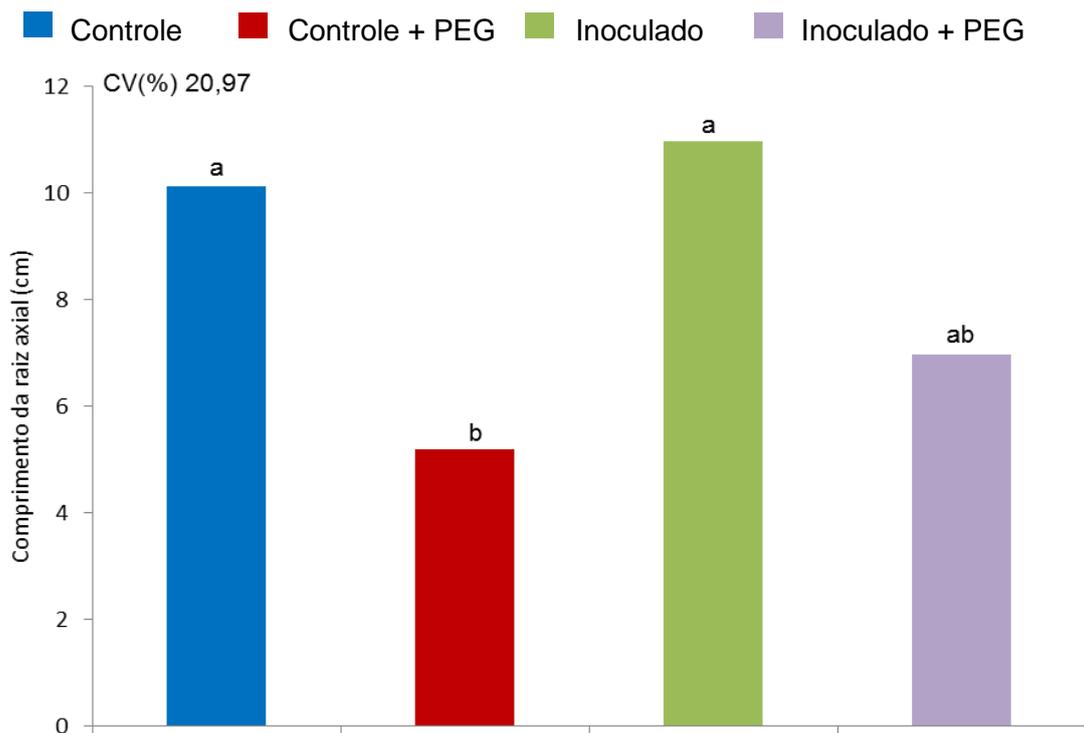


Figura 5- Comprimento da raiz axial de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 sob efeito do estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). Cada barra representa média de três repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

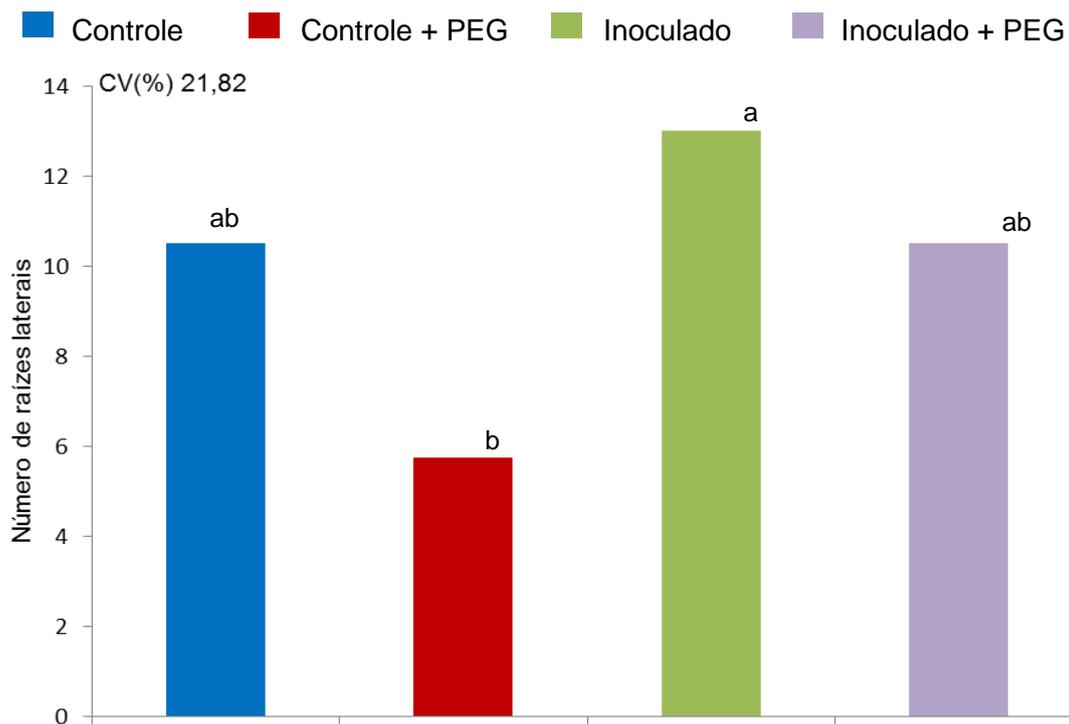


Figura 6- Número de raízes laterais de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 sob efeito do estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). Cada barra representa média de três repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fisiologia e crescimento

As variações na taxa fotossintética de plantas de tomate cultivadas em câmara de crescimento estão representadas pelas figuras 7 e 8.

Na análise que antecede a imposição do estresse (Figura 7 A), não foram identificadas diferenças significativas na taxa fotossintética entre as plantas não inoculadas e inoculadas. Após cinco dias de imposição de estresse com PEG (Figura 7 B), no tratamento inoculado a taxa fotossintética foi maior que no controle + PEG (plantas estressadas), não diferindo estatisticamente do controle, enquanto ambas as plantas irrigadas com PEG permaneceram com baixa fotossíntese. No entanto, decorridos mais cinco dias, isto é, com dez dias de estresse (Figura 7 C), o valor da taxa fotossintética das plantas inoculadas + PEG passou a ser inferior somente ao tratamento inoculado sem estresse, evidenciando uma modulação positiva da bacterização na manutenção das trocas gasosas das plantas de tomate. Ao final dos quinze dias de estresse (Figura 7 D), os dois tratamentos irrigados com solução de PEG 6000 apresentaram taxa de emissão de CO₂, ou seja, a respiração

sobressaiu em relação a fotossíntese, em decorrência provavelmente de um fechamento estomático resultante da baixa disponibilidade hídrica no solo, apesar de ser notável que a taxa respiratória tenha sido maior no tratamento controle estressado, indicando mesmo nesta situação, um efeito compensatório da aplicação da bactéria na mitigação do estresse hídrico imposto por PEG nas trocas gasosas.

Baixo potencial hídrico do solo induz a síntese de ABA pelas raízes, que via fluxo transpiratório é transportado até a parte aérea, onde estimula o fechamento estomático, visando reduzir perda de água via transpiração, constituindo-se uma das principais linhas de defesa na conservação de água na planta (Kang e Zhang, 2004).

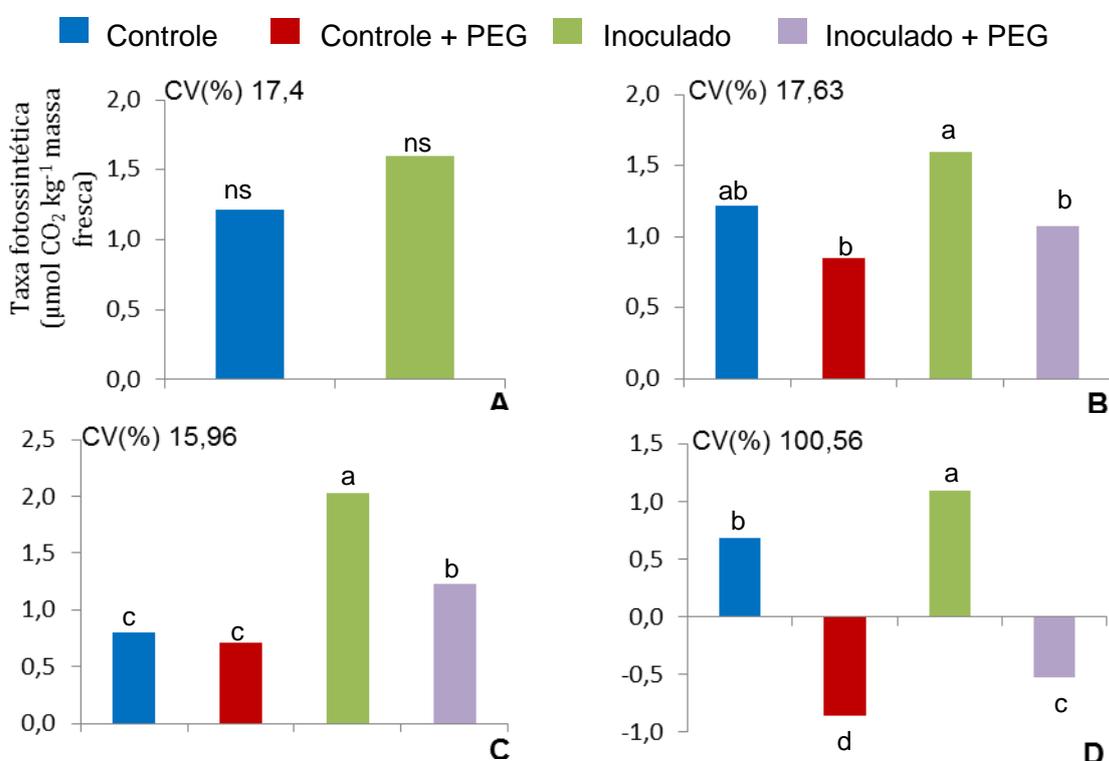


Figura 7- Taxa fotossintética líquida de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

A figura 8 representa os valores médios de cada tratamento obtidos ao longo de todas as avaliações. A inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 elevou significativamente a fotossíntese das plantas em relação a todos os outros tratamentos, havendo também uma elevação nas plantas inoculadas e sob

estresse, evidenciando um benefício no metabolismo fotossintético das plantas de tomate. Ainda na mesma figura, é evidente a interferência do PEG na assimilação de CO₂ pelas plantas de tomate, resultando nos menores valores médios.

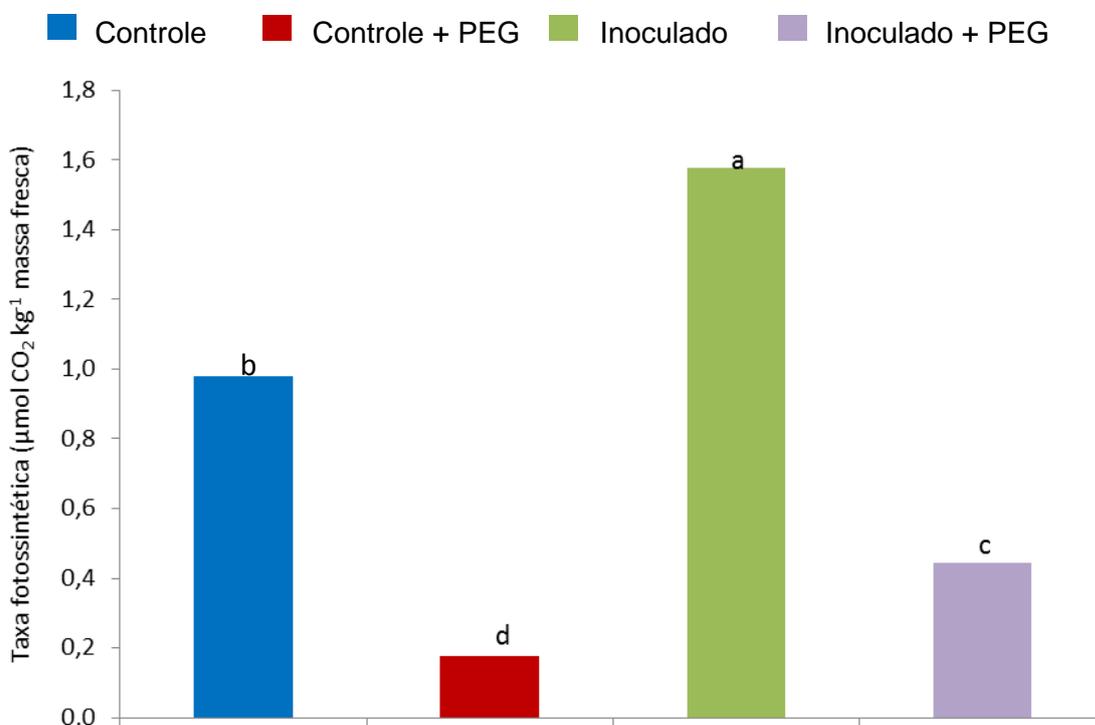


Figura 8- Taxa fotossintética líquida média de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, submetidas a estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L) ao longo de 15 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Efeitos sobre a fotossíntese são muito comuns em situações em que as plantas são expostas a condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento, como no presente trabalho. A limitação fotossintética ocorre em função de fatores estomáticos, não estomáticos, ou de ambos (Hu *et al.*, 2009). A queda na fotossíntese observada nas figuras 7 e 8 no tratamento controle + PEG relata exatamente o dano causado pelo baixo potencial hídrico provocado pelo polímero PEG 6000 na água. Porém, com base em todas as análises realizadas, não foi possível determinar se a inibição da fotossíntese se deu em decorrência de fatores estomáticos, expresso pela condutância estomática, ou por danos fotoquímicos, fluorescência da clorofila *a*, ou ainda, estresse oxidativo, com a síntese de espécies reativas de oxigênio. O pequeno porte das plantas foi o impeditivo para a não

realização de tais avaliações, visto que para mensurar a condutância estomática e a fluorescência da clorofila *a*, por exemplo, exigem-se folhas maiores, para adaptação na câmara do analisador de gás infravermelho acoplada com termopar e sensor de umidade, e nas pinças do fluorímetro para adaptação ao escuro, respectivamente.

O estabelecimento e sobrevivência de grande parte dos microrganismos do solo são dependentes do crescimento e produtividade da comunidade vegetal (Zhang *et al.*, 2008), que através da matéria orgânica e dos fotoassimilados produzidos sustentam comunidades de fungos e bactérias (Jones *et al.*, 2003). Com base nessa relação de dependência dos microrganismos pelos produtos gerados pelas plantas, o aumento na fotossíntese observado nas plantas de tomate inoculadas com a bactéria pode estar relacionado a uma regulação positiva na transcrição de genes cujos produtos estão relacionados com a melhoria no desenvolvimento do aparato fotossintético, bem como proteínas/enzimas da via, otimizando a assimilação do carbono. Um incremento na taxa fotossintética das plantas de tomate, com as quais a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 estabelece uma relação, significa maior assimilação de carbono, ou seja, maior síntese de fotoassimilados, que ao serem, em parte exsudados pelo sistema radicular das plantas, beneficiam o desenvolvimento e sustentação de suas populações associadas ao compartimento solo/rizosfera, ou mesmo na superfície radicular e interior das plantas em relações descritas como endofíticas.

Elevação na taxa de fotossíntese de plantas inoculadas já foi descrita por trabalhos como de Zhang *et al.* (2008) com *Arabidopsis* inoculadas com *Bacillus subtilis* estirpe GB03, espécie citada como promotora de crescimento vegetal. Esses autores relatam que na presença da bactéria houve um aumento na fotossíntese, no número de cloroplastos, na eficiência do fotossistema II, conteúdo de clorofila total, além da regulação positiva na transcrição de genes correlacionados com proteínas de cloroplastos. Nesse trabalho, Zhang *et al.* (2008) sugerem que um mecanismo modulado pela bactéria *B. subtilis* estirpe GB03 para elevar a taxa de fotossíntese corresponde ao acúmulo de açúcar / sinalização de ABA, desempenhando papel regulatório no processo de aquisição de energia pelas plantas de *Arabidopsis*. Também no trabalho de Chi *et al.* (2005), a inoculação com estirpes de *Rhizobium* melhoraram o metabolismo fotossintético de plantas de arroz, aumentando inclusive, condutância estomática e eficiência no uso da água.

Maior taxa fotossintética nas plantas inoculadas submetidas ao déficit hídrico em relação ao controle também sob déficit hídrico, significa que através de determinados mecanismos, ativados nos microrganismos ou na planta, houve uma manutenção de condições ideais ou menos deletérias para o desenvolvimento e assimilação de carbono. Sugere-se que esses mecanismos possam estar relacionados com uma diversidade de eventos, como: expressão de genes relacionados ao status hídrico como canais de água (aquaporinas); ajustamento osmótico, abertura e fechamento estomático e desenvolvimento radicular; sistema antioxidante, como atividade de catalase e mecanismos hormonais, como balanço auxina- etileno.

Sistemas antioxidantes são necessários para eliminação de espécies reativas de oxigênio que tem sua produção intensificada em situações de estresse. Estudos revelam que a inoculação com determinadas bactérias promotoras de crescimento vegetal aumentam atividade de enzimas antioxidantes vegetais como a catalase (Kohler *et al.*, 2008) e peroxidase (Saravanakumar *et al.*, 2011), aliviando assim danos oxidativos.

Estudos relatando as características promotoras de crescimento vegetal por bactérias isoladas do interior da planta, ou da superfície radicular, ou mesmo da rizosfera são inúmeros. No genoma da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, publicado em 2011 (Pedrosa *et al.*, 2011) constam informações que afirmam que essa bactéria consiste em uma promotora de crescimento vegetal, devido a características como fixação biológica do nitrogênio, síntese AIA, solubilização de fósforo, por exemplo. Sendo assim, a fim de estudar se a interação *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 com plantas de tomate resulta em promoção do crescimento vegetal, e juntamente analisar os efeitos do estresse na produção de biomassa destas mesmas plantas, ao final de cada tempo (0, 5, 10 e 15) foram obtidos os valores de biomassa fresca.

A figura 9 ilustra os valores médios de massa fresca da planta obtidos, sob efeito ou não da inoculação e do estresse. Analisando-se tempo a tempo, é evidente que a presença da bactéria nas plantas irrigadas normalmente com água, aumentou o valor de massa fresca da planta, o que condiz com os resultados apresentados na figura 7, visto que a produção de biomassa é uma conseqüência de mais carbono assimilado via fotossíntese (Figura 9 C, D). No entanto, em relação às plantas

inoculadas sob estresse, a figura 7 demonstra uma maior taxa fotossintética, em relação aos controles, o que não refletiu em um maior acúmulo de biomassa fresca da planta (Figura 9). Isso pode ser explicado, segundo Bolouri-Moghaddam *et al.*, (2010) que relatam que a inibição do crescimento associado com a manutenção da atividade fotossintética resulta em um acúmulo de açúcares solúveis na célula, podendo gerar impactos no metabolismo vegetal, visto que os açúcares além de desempenhar papéis nutricionais, também atuam na sinalização e na proteção de moléculas. Dessa forma, é possível que a relação bactéria - planta sob estresse tenha direcionado os produtos da fotossíntese para geração de energia voltada para rotas catabólicas relacionadas à redução dos impactos do estresse, como por exemplo, o papel do açúcar como protetor ou sinalizador de vias de respostas ao estresse, ao invés de sustentar o acúmulo de biomassa das plantas.

No tratamento controle + PEG as plantas não foram consideravelmente afetadas por 10 dias em baixo potencial hídrico, apresentando alterações significativas na massa fresca da planta somente após 15 dias, evidenciando mais uma vez que a baixa disponibilidade hídrica compromete o desenvolvimento das plantas.

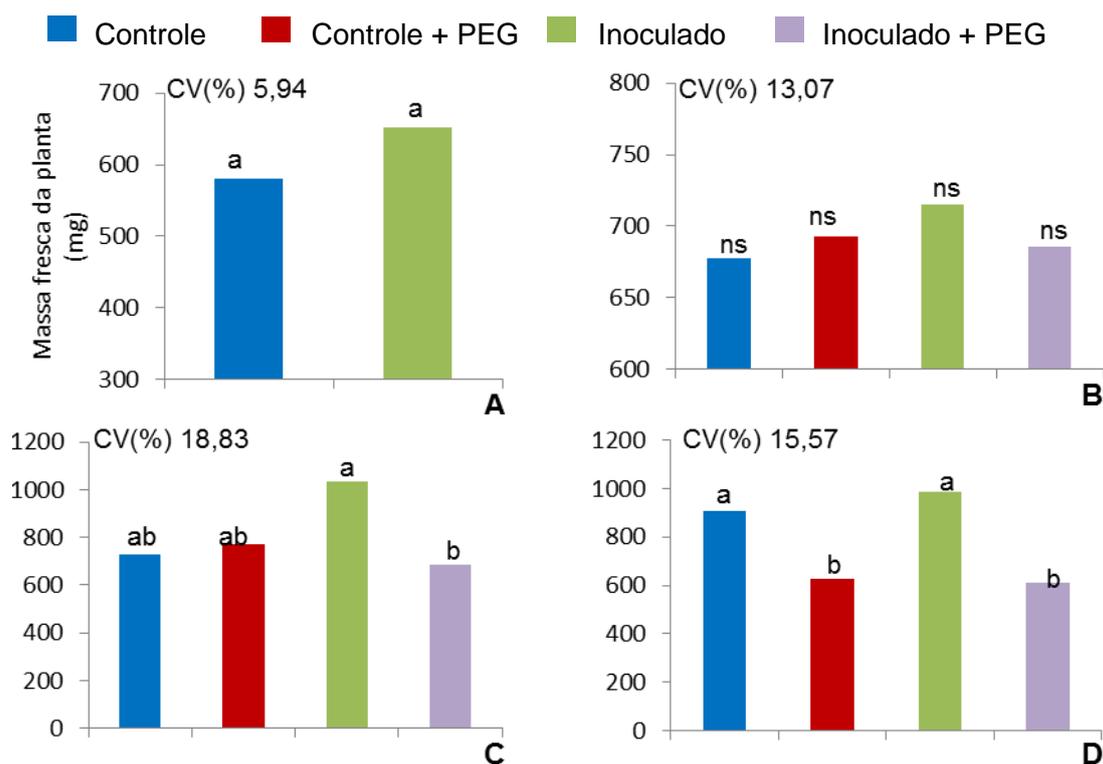


Figura 9- Massa fresca de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Dentre os principais atributos de promoção do crescimento vegetal descritos para bactérias como *Herbaspirillum seropedicae* encontra-se o estímulo ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas com as quais as bactérias estão associadas, como relatado por Canellas *et al.* (2012), que observaram que a inoculação de plantas de milho com essa espécie elevou a área radicular. Bastián *et al.* (1998) afirmam que *Herbaspirillum seropedicae* tem na sua capacidade de síntese e secreção de fitohormônios, o principal atributo fenotípico associado a promoção do crescimento vegetal.

Na figura 10 tal efeito é demonstrado ao longo de todo o experimento nas plantas inoculadas, no entanto, esse aumento na massa fresca da raiz não ocorreu nas condições de estresse. Com a presença do gene que codifica a enzima ACC-deaminase em *H. seropedicae* (Pedrosa *et al.*, 2011), esperava-se que nas plantas inoculadas e submetidas a condições de seca simulada pelo PEG 6000 ocorresse a modulação dos níveis de etileno, através da hidrólise do seu precursor, o que

impediria seu efeito inibidor sobre o crescimento radicular. No entanto, como ficou demonstrado previamente neste trabalho, a bactéria não foi capaz de reduzir os impactos do PEG na redução do comprimento da raiz axial, e conseqüentemente o acúmulo de biomassa radicular. Ademais, como explicado acima, presumivelmente plantas sob estresse dirigem seu metabolismo para energização dos sistemas de defesa em detrimento do acúmulo de massa radicular. Diferente do observado neste estudo, para *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 (isolada de *Catharanthus roseus*) caracterizada como promotora de crescimento vegetal, por suas características de fixação biológica do nitrogênio e síntese de AIA, além da atividade ACC-deaminase, quando inoculada em plantas crescidas em região de solo muito salino (150 mM NaCl), foi eficaz na redução dos níveis de etileno da planta, aumentando inclusive os valores de massa seca de raiz (Karthikeyan *et al.*, 2012). No entanto, ao comparar essas plantas com o controle + PEG, verificou-se ausência de diferença na massa fresca de raiz, ambas apresentando os menores acúmulos de massa fresca da raiz.

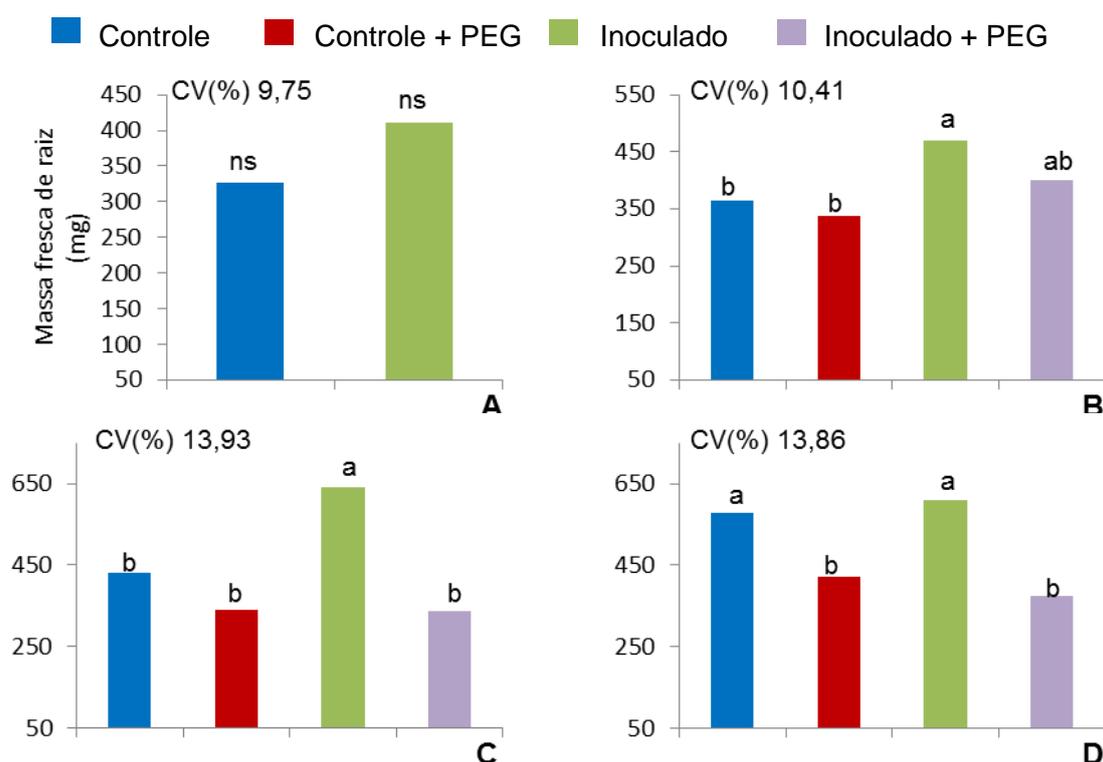


Figura 10 - Massa fresca de raiz de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Além da promoção do crescimento das plantas de tomate promovida por *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, os maiores valores de massa fresca da planta e da raiz (Figuras 9 e 10, respectivamente) podem estar relacionados com mecanismos de estímulo a expressão de genes de aquaporinas, permitindo maior entrada de água. Esse mecanismo supracitado já foi relatado por Marulanda *et al.* (2010) em que plantas de arroz inoculadas com *Bacillus megaterium*, isolada de solos degradados e caracterizadas como promotoras de crescimento vegetal, apresentaram maior condutância hidráulica e maior quantidade de aquaporinas.

O teor relativo de água das plantas controle submetidas ao estresse apresentou-se menor que o controle irrigado com água, e de maneira interessante a presença da bactéria nas condições de estresse elevou o teor relativo de água das plantas ao longo de todo o período de avaliações, sendo essa diferença notada visualmente, pois as plantas encontravam-se mais rígidas e túrgidas apesar do estresse (Figura 11). Dados similares foram encontrados por Marulanda *et al.* (2010) que mostraram que as condições de estresse salino aplicadas não interferiram no teor relativo de água das plantas inoculadas com *Bacillus megaterium*.

Analisando os valores médios obtidos para cada tratamento ao longo de todos os tempos, como representado na figura 12, a inoculação com a bactéria no tratamento com irrigação diária de solução de PEG 6000 auxiliou na manutenção do status hídrico das plantas em relação ao tratamento controle sob estresse, sendo inferior somente aos tratamentos em boas condições hídricas. Esses resultados relatam que apesar das condições favoráveis a desidratação das plantas de tomate, quando há associação destas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 há uma redução nos efeitos deletérios do baixo potencial hídrico. Zawoznik *et al.* (2011) demonstraram expressão aumentada do gene de aquaporina (HvPIP2;1) em plantas de cevada inoculadas com *Azospirillum brasilense* Az39 sob estresse salino. Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho e representados nas figura 11 e 12 podem estar relacionados com fatores como relatados por Zawoznik *et al.* (2011), ou seja, é possível que *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 tenha modulado a expressão de genes relacionados a aquaporinas, beneficiando assim a absorção de água e a conservação de água nos vacúolos, conseqüentemente, aumentando o teor relativo de água das plantas de tomate. E ainda, é sugerido que a inoculação induza o processo chamado ajustamento

osmótico, em que há acúmulo de solutos osmoticamente ativos nas células vegetais, como a prolina e glicina betaína, reduzindo seu potencial osmótico, favorecendo a entrada de água por gradiente de concentração. Por vezes, algumas bactérias promotoras de crescimento vegetal sintetizam esses solutos, intensificando ainda mais a tolerância ao estresse (Dimpka *et al.*, 2009). Um exemplo é o trabalho de Mohamed e Gomaa (2012) que relata um aumento no teor de prolina em plantas de *Raphanus sativus* submetidas a estresse salino, quando inoculadas com *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Porém, estudos futuros deverão ser desenvolvidos a fim de investigar a fundo mecanismos pelos quais a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* melhora o status hídrico das plantas de tomate.

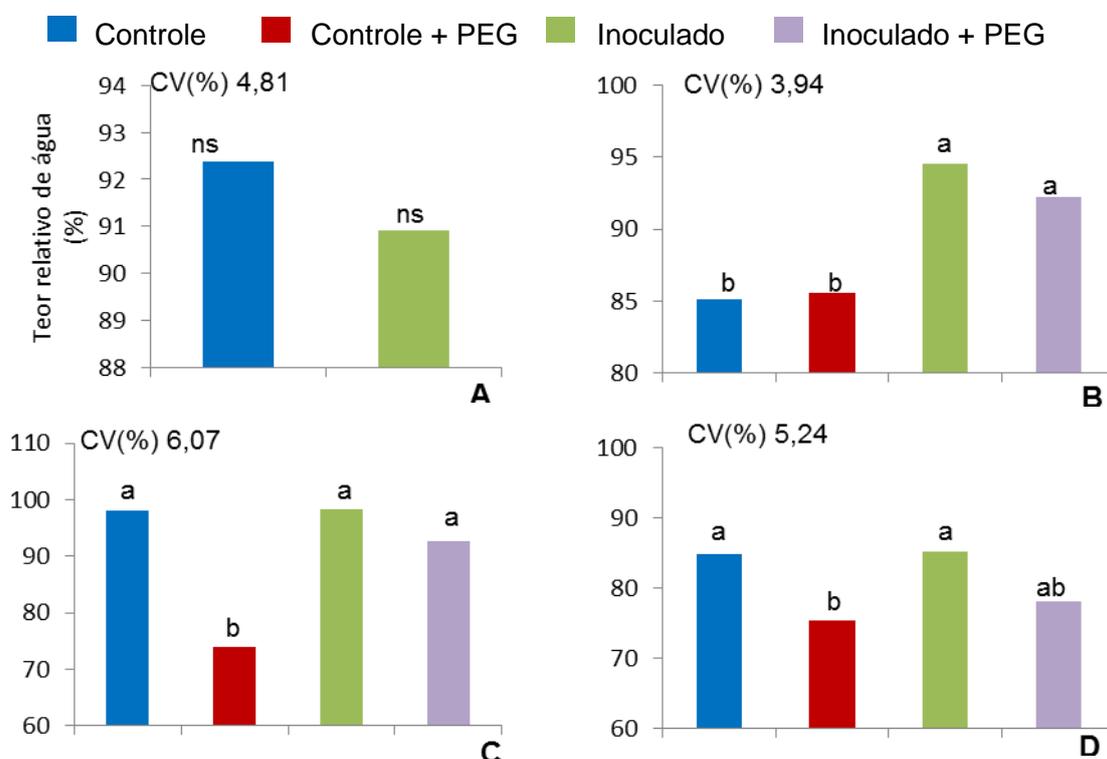


Figura 11 – Teor relativo de água de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, sob estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Anterior à imposição do estresse; B: 5 dias sob estresse; C: 10 dias sob estresse; D: 15 dias sob estresse. Cada barra representa média de quatro repetições. Médias seguidas por letras iguais dentro do mesmo quadrante não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

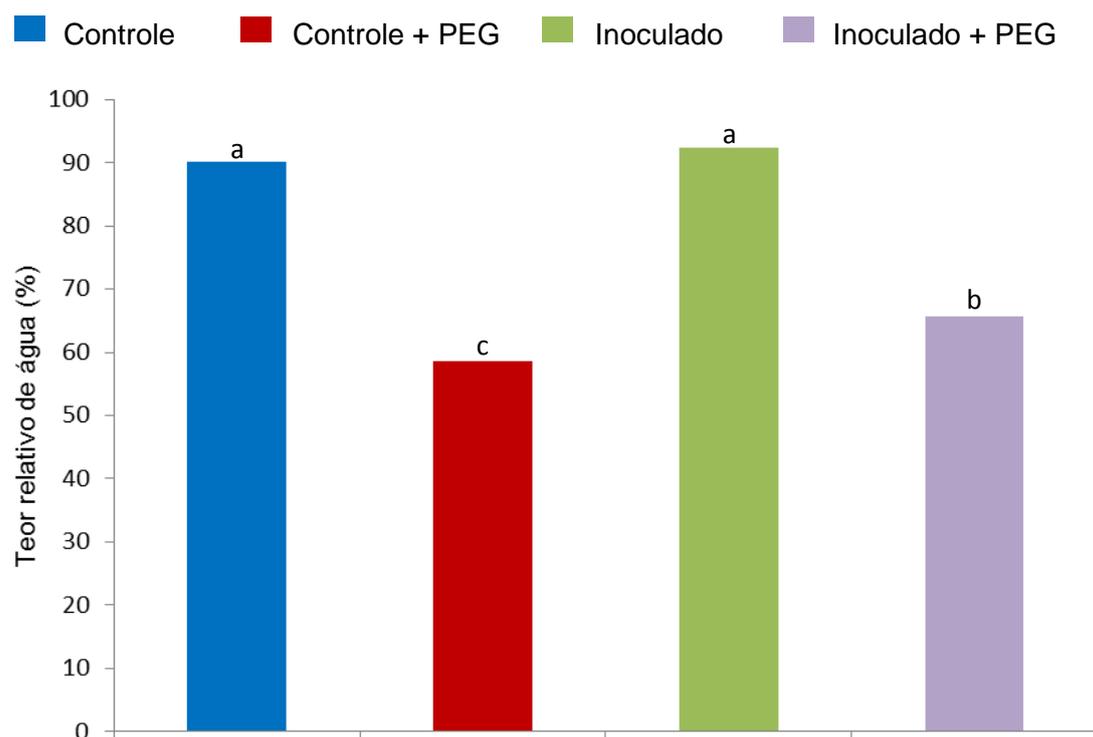


Figura 12 – Teor relativo de água médio de plantas de tomate cv. Santa Clara na presença ou ausência da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54, submetidas a estresse hídrico simulado pela irrigação com solução de PEG 6000 (210 g/L) ao longo de 15 dias. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A contagem do número mais provável de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 isolada das raízes das plantas de tomate, cujas características fotossintéticas, acúmulo de biomassa e teor relativo de água foram avaliadas, está representada na tabela 1.

Tabela 3 - Número mais provável de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 isolada de raízes de plantas de tomate cv. Santa Clara antes da imposição (Sem estresse) e 15 dias após o estresse hídrico simulado pela irrigação com PEG 6000 (210 g/L).

Sem estresse	
Tratamento	N.M.P. g ⁻¹ de raiz (log ₁₀)
Controle	nd
Inoculado	5,65
15 dias sob estresse	
Tratamento	N.M.P. g ⁻¹ de raiz (log ₁₀)
Controle	nd
Controle + PEG	nd
Inoculado	4,61
Inoculado + PEG	4,66

nd: não detectado

Anatomia e colonização radicular

A importância de estudar processos que afetem o sistema radicular advém do papel das raízes na absorção, seja de água ou nutrientes, refletindo diretamente no crescimento e bom desenvolvimento das plantas. Estruturas como os pelos radiculares aumentam a área de contato das raízes com o substrato, elevando a área a ser explorada para obtenção de água e nutrientes (Gilroy e Jones, 2000).

A partir de um curto ensaio em condições hidropônicas, em que as raízes das plântulas, inoculadas ou não com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 (marcada com proteína verde fluorescente), mantidas em água ou solução de PEG 6000 (210 g/L), segmentos radiculares foram observadas em microscópio óptico para determinação dos efeitos do estresse sobre a arquitetura radicular (Figuras 13, 14, 15 e 16) e perfil de colonização (Figuras 16 e 17).

Na figura 13, observa-se uma boa densidade de pelos radiculares com preservação estrutural, distribuídos ao longo de todo o eixo radicular do segmento da raiz axial das plantas crescidas em água (Controle). Ainda na figura 13, nota-se um sítio de emergência de raiz lateral evidenciando a boa condição estrutural e fisiológica da raiz dessas plantas nas condições do ensaio.

O crescimento da raiz pode ser limitado por propriedades biológicas, físicas e químicas do solo, incluindo estresse hídrico, hipoxia e restrição mecânica (Schnall e

Quatrano, 1992) e na mesma medida pode ser estimulado por microrganismos com alterações nas taxas e na arquitetura radicular. Embora nesse ensaio qualquer dano mecânico tenha sido excluído devido as condições hidropônicas de cultivo, a simulação do estresse hídrico com a solução de 210 g/L de PEG 6000 resultou em alterações estruturais notáveis ao eixo radicular das plantas de tomate não inoculadas, como demonstrado na figura 14. A queda na densidade e distribuição de pelos foi bastante evidente na presença de PEG, além do fato de que os poucos pelos que se desenvolveram tiveram sua integridade estrutural afetada, apresentando-se ainda mais curtos e finos, por vezes deformados, quando comparados ao tratamento controle (Figura 13), por exemplo.

Os pelos consistem em estruturas unicelulares extremamente sensíveis, tornando-se anormalmente curtos, e por vezes bulbosos ou ausentes sob estresse hídrico severo (Vartanian, 1981; Zahran e Sprent, 1986), o que nos permite inferir que a dose utilizada como estressante para as plântulas de tomate gerou um alto nível de estresse hídrico para este atributo anatômico.

O ácido abscísico medeia respostas vegetais a condições de estresse, resultando no fechamento estomático, e alterações no sistema radicular. Esse último mecanismo foi demonstrado por Schnall e Quatrano (1992), em que aplicações exógenas de ABA em plantas de *Arabidopsis thaliana* resultaram no encurtamento e “inchaço” dos pelos já existentes, e desenvolvimento de novos pelos com parede celular muito fina tornando-os quase invisíveis, enquanto nas plantas mutantes insensíveis ao ABA tal resposta não foi observada. A correlação entre estresse hídrico e alterações nos pelos radiculares foi observada no presente trabalho (Figura 14), podendo hipoteticamente ser atribuída aos efeitos dos níveis endógenos de ABA no sistema radicular sob estresse.

Assim como previamente demonstrado na figura 6, a emissão de raízes laterais também foi prejudicada pelas baixas condições hídricas de desenvolvimento dessas plantas impostas pela solução de PEG 6000, visto que ao longo das raízes analisadas não foi possível detectar nenhum ponto de emissão de raiz lateral (Figura 14). Essa redução é facilmente explicada pelo efeito inibidor do etileno nesse tipo de situação (Ligero *et al.*, 1991).

As imagens apresentadas na figura 15 demonstram claramente o efeito da inoculação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 na estrutura

do sistema radicular, apesar do curto tempo entre a inoculação e o desenvolvimento das plantas de tomate. Em um segmento de aproximadamente dois centímetros de comprimento, é possível observar três regiões de emergência de raiz lateral, além da alta densidade de pelos por todo eixo radicular dessas plantas de tomate desenvolvidas em água. Outra evidência do benefício da inoculação consiste na estrutura dos pelos, os quais são longos elevando assim, a superfície de absorção dessas raízes. Esse efeito relatado pela figura 15 é característico da inoculação de plantas com bactérias promotoras do crescimento vegetal produtoras de AIA, como é o caso da *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria endofítica, capaz de estimular o crescimento vegetal através de características como a fixação biológica do nitrogênio e a síntese de fitohormônios (AIA e giberelina), por exemplo (Bastián *et al.*, 1998). A modulação de hormônios vegetais é uma estratégia utilizada por organismos, patogênicos ou não, para otimizar a colonização da planta (Verhage *et al.*, 2010). Brusamarello-Santos *et al.* (2012) analisando a expressão gênica diferenciada em raízes de plantas de arroz, inoculadas ou não com *Herbaspirillum seropedicae*, detectaram vários genes relacionados a atividade hormonal, com destaque para etileno e AIA.

Os resultados obtidos e apresentados na figura 15 corroboram com os de Mattos *et al.* (2008), que observaram aumento no número de raízes laterais e densidade de pelos em raízes de arroz inoculadas com o sobrenadante filtrado de uma cultura de *Burkholderia kururiensis*, correspondente a 5 µg de composto indol, segundo a estimativa pelo reagente de Salkowski.

As raízes das plantas do tratamento inoculado e sob efeito do PEG demonstraram melhor desenvolvimento e estrutura quando comparadas com do tratamento controle + PEG, apresentando maior densidade de pelos, os quais em sua maioria são longos e menos danificados pelo estresse (Figura 16). Esse efeito da inoculação consiste num dado promissor, refletindo um benefício da inoculação com uma bactéria promotora de crescimento vegetal no sistema de absorção das plantas com as quais se encontram associadas. Essa melhoria no desenvolvimento da raiz e dos pelos radiculares observada na figura 16 pode ser sustentada hipoteticamente pela modulação do efeito do hormônio etileno.

O etileno é sintetizado pelas plantas em respostas a estresses abióticos e bióticos, inibindo o crescimento vegetal, induzindo senescência foliar, bem como amadurecimento de frutos. Dessa forma, uma redução nos níveis de etileno representa um benefício para o desenvolvimento de plantas sob tais condições, o que tem sido testado e observado em plantas inoculadas com bactérias com atividade enzimática ACC-deaminase, em que o precursor direto do etileno é hidrolisado como fonte de nitrogênio. Karthikeyan *et al.* (2012) detectaram menores índices de emissão de etileno por plantas de *Catharanthus roseus* submetidas a estresse salino devido a inoculação com a bactéria *Achromobacter xylosoxidans* estirpe AUM54, que possui atividade ACC-deaminase.

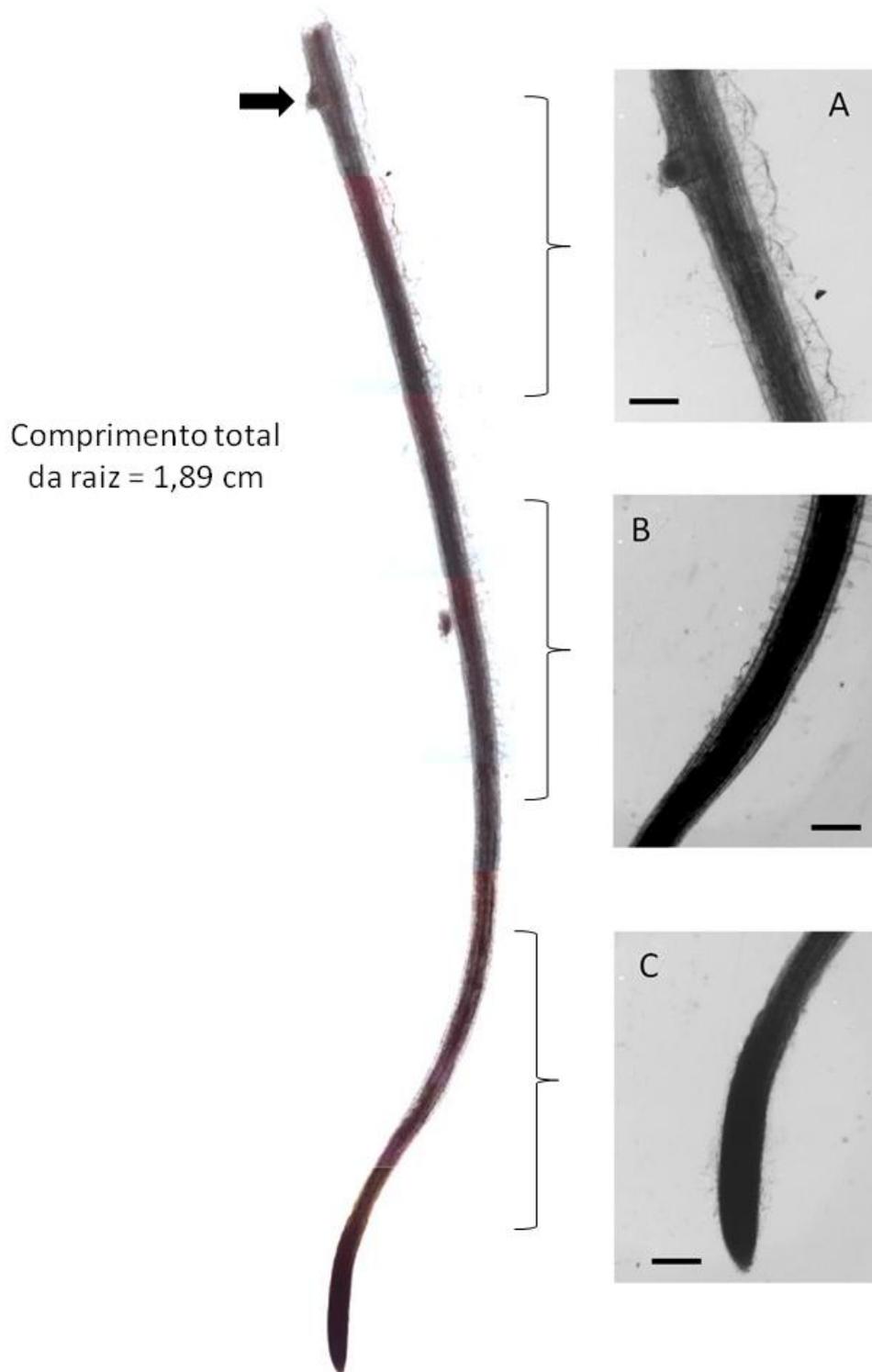


Figura 13 – Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara cultivadas em água. A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Nota: Região de emissão de raiz lateral (Seta). Barra: 400 μ m.

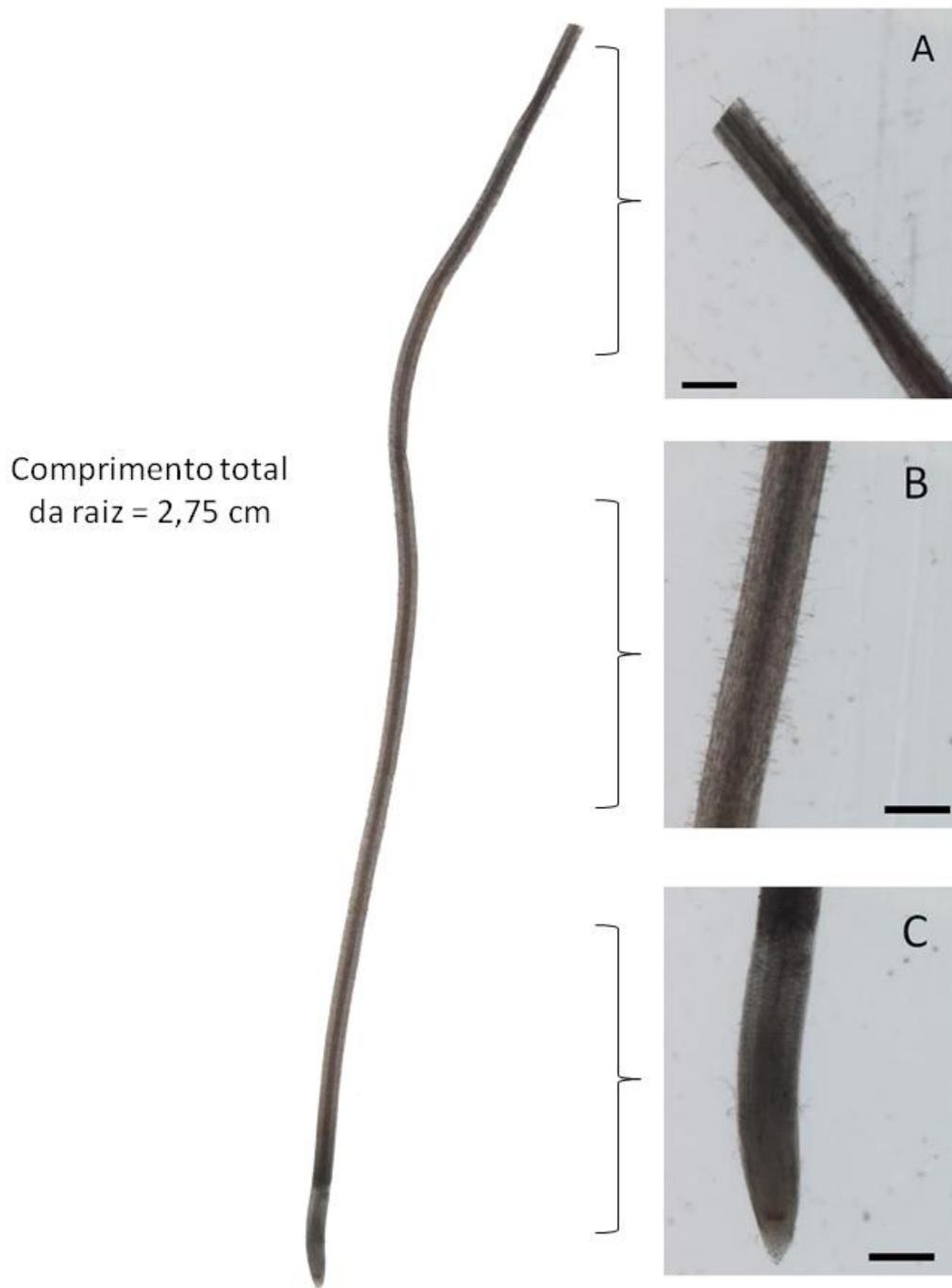


Figura 14 - Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara cultivadas em solução de PEG 6000 (210 g/L). A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Barra: 400 µm.

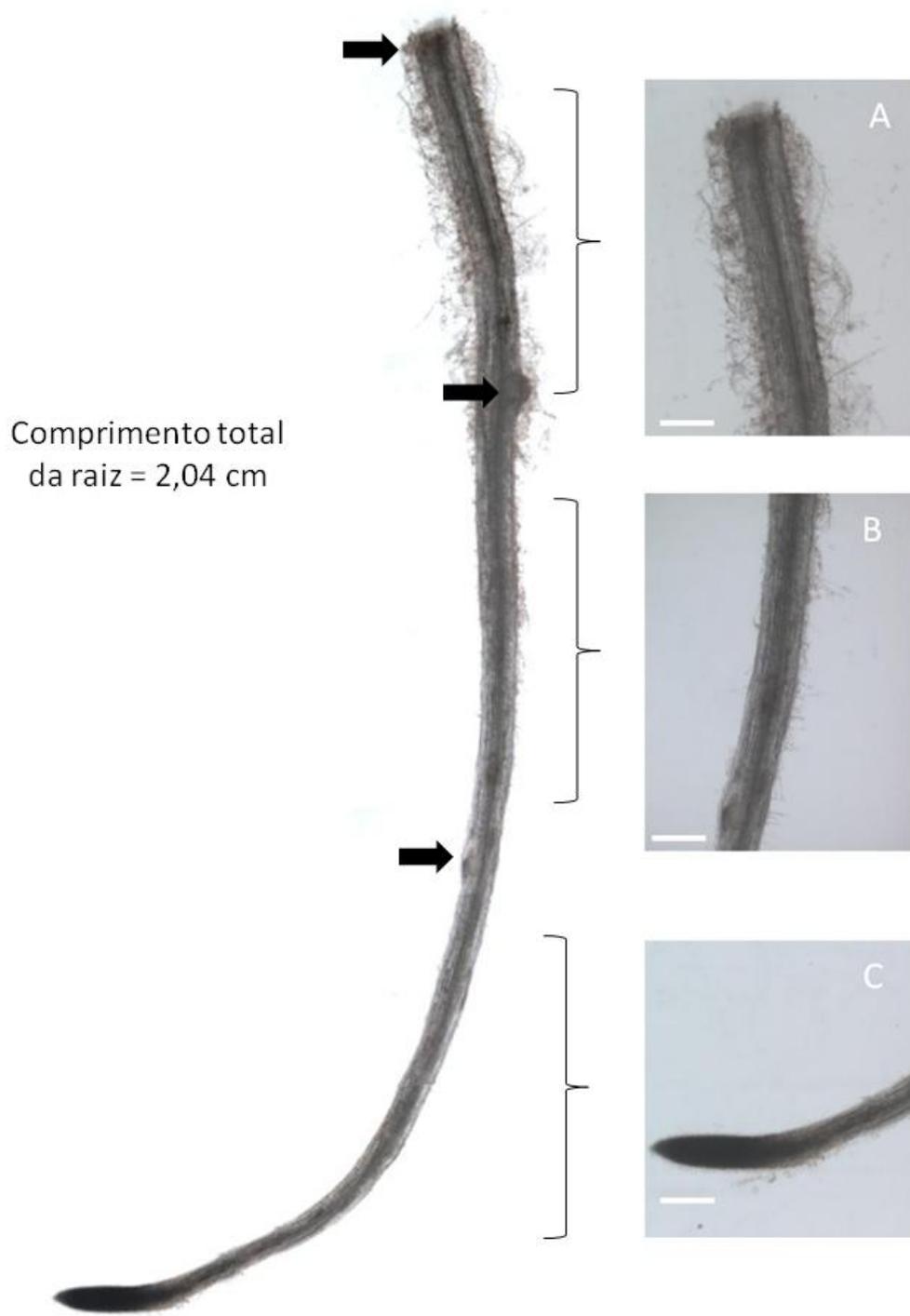


Figura 15 - Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas água. A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Nota: Região de emissão de raiz lateral (Seta). Barra: 400 μm .

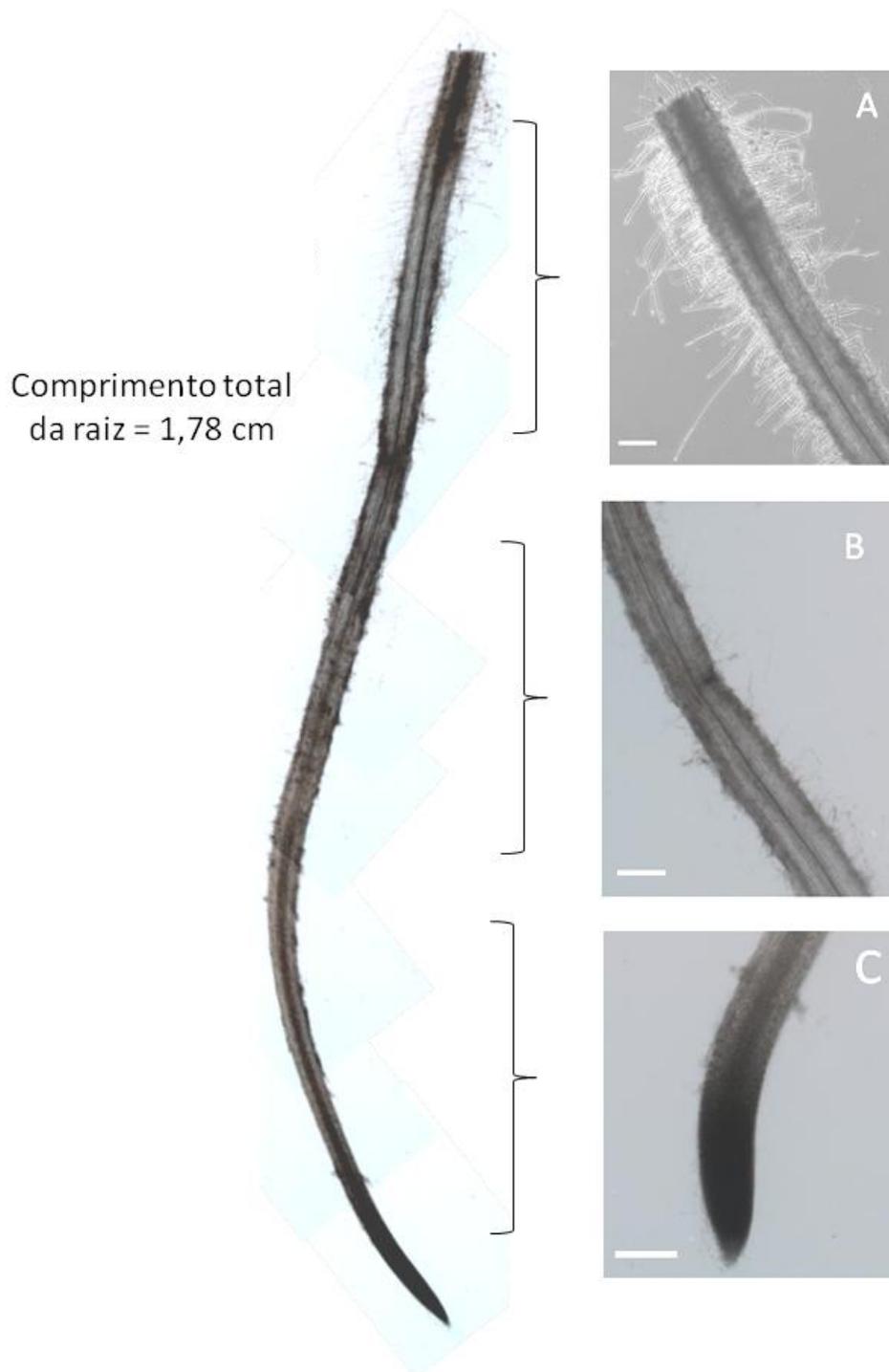


Figura 16 - Microscopia óptica da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas em solução de PEG 6000 (210 g/L). A-B: Segmento imediatamente acima da região da coifa; C: Porção apical. Barra: 200 µm.

O potencial de *Herbaspirillum seropedicae* em promover o crescimento e atenuar os efeitos do estresse hídrico em plantas de tomate cv. Santa Clara já foi apresentado neste trabalho, no entanto, descrever a interação estrutural entre a bactéria e a planta hospedeira é importante, e ainda, revelar se em condições de baixo potencial hídrico simulado por solução de PEG 6000 a interação sofre alguma modificação.

Técnicas de biologia molecular tem tornado possível a modificação genética de bactérias, através da inserção de gene de proteínas autofluorescentes, que são capazes de emitir fluorescência após iluminação em comprimento de onda dentro de uma faixa de valor específico (Larrainzar *et al.*, 2005). A proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, gfp), primeira autofluorescente descoberta, é formada por 238 aminoácidos (Prasher *et al.*, 1992), sintetizada naturalmente pelo cnidário *Aequorea victoria*.

A bactéria utilizada neste ensaio, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10, possui inserção do gene gfp através de transposon. Genes repórteres como de gfp tem sido amplamente utilizados para estudar as interações microrganismos-planta, por fornecer resolução rápida em tempo real, possibilitando inclusive, a distinção entre bactérias inoculadas e contaminantes (Rouws *et al.*, 2010). E ainda, uma das principais vantagens da gfp é a ausência da necessidade de substrato exógeno ou cofatores para produzir a molécula ativa, além de ser uma análise não destrutiva (Chalfie *et al.*, 1994).

A distinção entre a fluorescência verde emitida pela bactéria e a autofluorescência amarela, emitida pela incrustação da parede celular vegetal com lignina foi possível por meio da microscopia óptica de epifluorescência.

A figura 17 ilustra a raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara colonizada pela bactéria marcada com gfp, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10, em condições hidropônicas na ausência do estresse após 24 horas de inoculação. É possível observar que a bactéria foi capaz de colonizar todo o eixo radicular emitindo alto sinal de fluorescência, dispostas em pequenos agregados ou mesmo solitárias, com exceção da região mais nova da raiz, que corresponde à coifa onde não foi possível observar colonização (Figuras 17 A, B). Os pelos radiculares, estruturalmente mais alongados e cuja densidade foi significativamente maior nas plantas inoculadas (Figura 15), correspondem às regiões mais

densamente colonizadas (Figura 17 C, D). Assim como, também representado na figura 15, a presença de sítio de emergência de raiz lateral foi observada (Figura 17 C), correspondendo a um local de intensa colonização. Dados como esse corroboram com os obtidos por Baldotto *et al.*, (2011) utilizando a mesma bactéria em plantas de abacaxizeiros. Os autores descreveram que 6 horas após a inoculação, as bactérias eram visualizadas em toda a extensão da raiz, predominando na região pilífera, em forma de agregados ou individuais, e ao completar 24 horas após inoculação a multiplicação das bactérias era notável, ainda predominando nas regiões dos pelos radiculares e junções das paredes periclinais externas das células epidérmicas.

Rouws (*et al.*, 2010) descrevem a colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* marcada com *gfp* em raízes de plantas de arroz, relatando a colonização da superfície radicular pelas bactérias brilhantes fluorescentes, em forma de agregados ou individuais, havendo uma preferência pelas regiões de emergência de raízes laterais e pelos radiculares.

Nas raízes de plântulas de tomate inoculadas e mantidas em solução de PEG 6000, houve uma considerável redução no sinal da fluorescência da bactéria (Figura 19). Esta observação indica que a aplicação do PEG reduz o espalhamento sistêmico superficial da bactéria, afetando sua colonização ao longo do eixo radicular, na medida em que a raiz cresce longitudinalmente pela atividade de divisão celular no ápice radicular. Esta aparente redução na capacidade de colonização radicular pela bactéria deve ser considerada com critério, pois não significa que as bactérias não colonizaram as raízes ou perderam a viabilidade, visto que após fragmentos dessas raízes serem transferidos para meio JNFb semi-sólido, houve a formação da película aerotóxica, característica da espécie, bem como o retorno do sinal da *gfp*.

A redução ou perda do sinal da fluorescência da *gfp* das bactérias cuja raiz foi mantida em solução de PEG 6000 (210 g/L) pode ser explicada pela possível baixa concentração de oxigênio presente nessa solução, devido a sua viscosidade. Considerando que a formação final do fluoróforo da *gfp* é uma modificação pós-traducional resultante da ciclização e oxidação espontânea dos aminoácidos Ser-Tyr-Gly da proteína nas posições 65-67 (Heim *et al.*, 1994), a emissão do sinal da

gfp é dependente de oxigênio, justificando assim, a não observação das bactérias pela técnica de microscopia óptica de fluorescência.

Na figura 18 A é possível observar um pequeno agregado de bactérias na região que antecede a coifa, que ao ser comparada com a figura 16 C fica claro que consiste em uma região com a presença de pelos. O mesmo pode ser observado e comparado com as outras imagens (Figuras 18 B, C, D). Esses agregados consistem em biofilmes bacterianos, isto é, populações numerosas de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 aderidas umas às outras e à superfície vegetal, assim como também observado por Baldotto *et al.* (2011).

Biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos associados a superfícies sólidas e em contato íntimo com outras células microbianas. A aderência dessas células com a superfície ou entre si ocorre através de uma matriz complexa formada por uma variedade de substâncias, incluindo exopolissacarídeos (EPS), proteínas e DNA. As células presentes no biofilme são fisiologicamente distintas das mesmas células dispersas cultivadas em meio de cultivo (Webb *et al.*, 2003; Stoodley *et al.*, 2002) e o uso de bactérias marcadas com genes repórter tem auxiliado no estudo do metabolismo, fisiologia e dinâmica dessas comunidades (Larrainzar *et al.*, 2005).

Na figura 18 D parece evidente que a solução de PEG 6000 reduziu a estabilidade dos agregados de *Herbaspirillum* já que quando os segmentos de raízes foram montados em água entre lâmina e lamínula, ficou evidente o desprendimento de células isoladas ao redor da raiz para o meio de montagem, fato não ocorrido no tratamento inoculado na ausência de PEG. Apesar do efeito causado pelo PEG, as bactérias se beneficiam da conformação em biofilme tanto para sua persistência no corpo vegetal (Beattie e Lindow, 1999), como na própria resistência a baixa umidade (Monier e Lindow, 2003).

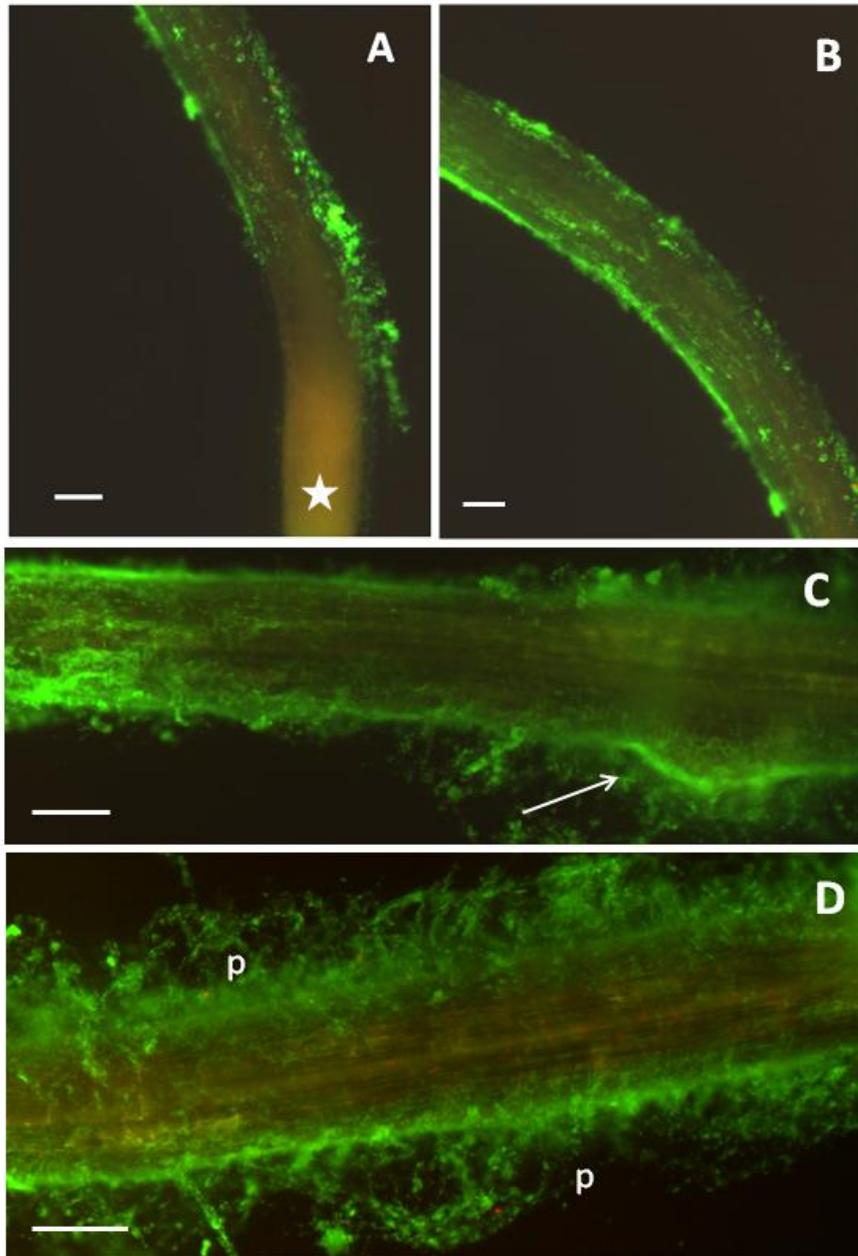


Figura 17 - Microscopia de fluorescência da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas em água. A: Porção apical; B, C, D: Segmentos imediatamente acima da região da coifa. Nota: Coifa (estrela); Região de emissão de raiz lateral (Seta); Pelos (p). Barra: 100 μ m.

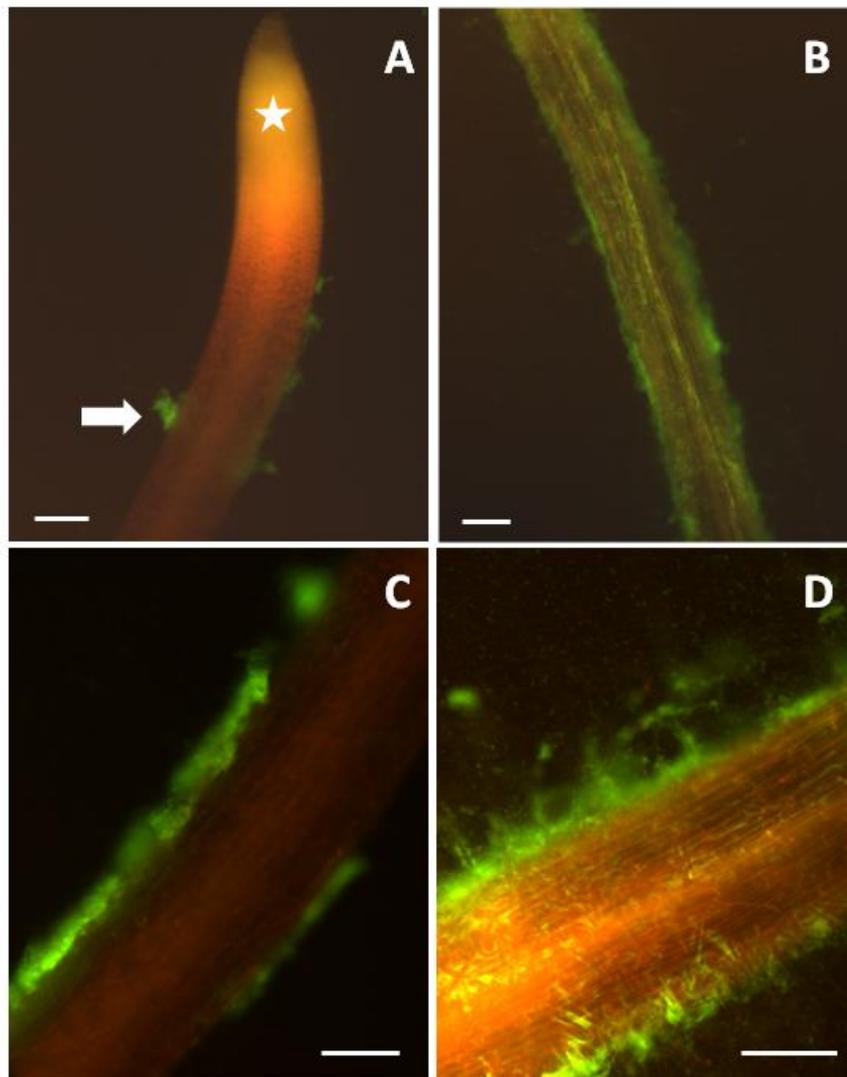


Figura 18 - Microscopia de fluorescência da raiz axial de plântulas de tomate cv. Santa Clara inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM 10 cultivadas em solução de PEG 6000 (210 g/L). A: Porção apical; B, C, D: Segmentos imediatamente acima da região da coifa. Nota: Coifa (estrela); Agregado microbiano (seta). Barra: 100 μ m.

7. CONCLUSÃO

Baixa disponibilidade hídrica afeta consideravelmente o desenvolvimento vegetal, e focando num sistema agrícola sustentável, em que há uma maior eficiência no uso da água pelas plantas, há um interesse por ferramentas que visem o bom desenvolvimento vegetal e produtividade utilizando água de forma racional, além de uma melhora no metabolismo vegetal, ao ponto que em situações de curto estresse, essas plantas não tenham seu metabolismo drasticamente afetado.

Os resultados apresentados no presente trabalho nos permitem concluir que apesar do estresse causado por soluções de PEG 6000 em plantas de tomate, as mesmas, no período de ensaio, não afetam o desenvolvimento e viabilidade da bactéria promotora de crescimento vegetal, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54. Com base nisso, o potencial da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* em induzir tolerância ao estresse hídrico simulado por PEG 6000 em plantas de tomate foi avaliado, obtendo as seguintes conclusões:

1. A inoculação de plantas de tomate com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 reduziu os impactos negativos da imposição do estresse, beneficiando o crescimento da raiz axial, bem como induzindo maior número de raízes laterais na comparação com plantas não inoculadas estressadas;
2. A taxa fotossintética de plantas de tomate inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 foi significativamente maior ao longo de 15 dias, e quando irrigadas com solução de PEG 6000, a presença da bactéria auxiliou na manutenção de uma taxa fotossintética maior que das plantas sob estresse na ausência de inoculação;
3. A massa fresca da planta e da raiz somente foi beneficiada pela inoculação quando na ausência do estresse;
4. A inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 beneficiou o status hídrico (teor relativo de água) das plantas de tomate, tanto nas condições controle, quanto na presença do PEG 6000;
5. Em análises em microscópio de fluorescência, a colonização de uma estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* marcada com gfp foi afetada pela presença de solução com PEG 6000 na raiz de plântulas de tomate, resultando em um menor

espalhamento superficial e alterações na força de agregação das células da bactéria. No entanto, deve-se considerar que o sinal da fluorescência reduzido pode ser função da menor pressão parcial de O₂ condicionado pela viscosidade da solução. No entanto, a inoculação beneficiou a formação de pelos radiculares, os quais se apresentaram mais longos e com estrutura mais íntegra, em relação ao mesmo tratamento sob estresse sem inoculação.

6. O estímulo ao desenvolvimento de estruturas de absorção em resposta a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (pelos radiculares e raízes laterais), mesmo em estresse simulado por PEG 6000 representa uma importante atuação da bactéria, explicando a manutenção do status hídrico, bem como fotossíntese.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, I.N.; Pinto, J.E.B.P.; Furtini Neto, A.E. (2002) Influence of nitrogen and phosphorus in the biomass production and induction of mucilage in “insulin” plants. *Horticultura brasileira*, v.20, n.4, p. 536-540.
- Ahmed, C.B., Rouina, B.B., Sensoy, S., Boukhris, M., Abdallah, F.B. (2009) Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes, *Environmental and Experimental Botany*, 67, 345–352.
- Amzallag, G.N.; Lerner, H.R. (1994) Adaptation versus pre-existing resistance: an intergenotype analysis of the response of *Sorghum bicolor* to salinity. *Journal of Plant Science*. 42,125-141.
- Araus, J.L.; Amaro, T.; Voltas, J.; Natkoul, H.; Nachit, M.M. (1998) Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 55: 209-223.
- Arias, M.I.B.; Delgado, E.O.; Carmenate, R.V. (1996) Cambios fisiológicos de la caña de azúcar ante el déficit hídrico. 1.ed. México: Universidad Autónoma Chapingo, 135p.
- Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M. (2012) Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, Vol.63, n.1, 43–57.
- Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M. (2012) Regulation of root water uptake under drought stress conditions. *Plant Responses to Drought Stress*, Chapter 4.
- Backman, P.A.; Sikora, R.A. (2008) Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control*, 26:1–3.
- Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Dobereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 36:86–93.
- Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R. (2011) Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* ram10 and pineapple plantlets ‘vitória’. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 114-125.
- Baldotto, L.E.B.; Baldotto, M.A.; Olivares, F.L.; Viana, A.P.; Bressan-Smith, R. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34: 349-360.
- Bartels, D., Sunkar, R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24:23–58.
- Bashan, Y.; Levanony, H. (1991) Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 137:99-103.
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, *et al.* (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul*, 24: 7–11.
- Beattie, G.A., Lindow, S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopatol.*, 89: 353-359.
- Belimov A.A.; Dodd I.C.; Hontzeas N.; Theobald J.C.; Safronova V.I.; Davies W.J. (2009) Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

- increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytologist* 181, 413–423.
- Belimov A.A.; Hontzeas N.; Safronova V.I.; Demchinskaya S.V.; Piluzza G.; Bullitta S.; Glick B.R. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry* 37, 241–250.
- Bertrand, H.; Plassard, C.; Pinochet, X.; Toraine, B.; Normand, P.; Cleyet-Marel, J.C. (2000) Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*. 46:229-236.
- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 4:343-350.
- Boddey, R.M.; Oliveira, O.C.D.; Urquiaga, S.; Reis, V.M.; Olivares, F.L.; Baldani, V.L.D.; Döbereiner, J. (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*, 174:195 –209.
- Bolhàr-Nordenkampf, H.R.; Long, S.P.; Baker, N.R.; Öquist, G.; Schreiber, U.; Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497 - 514.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Rolland, F., Van den Ende, W. (2010) Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal*, 277,202–207.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. (1999) LIVE / DEAD BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37, 77 – 86.
- Bowen, G. D.; Rovira, A. D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. 66:1-102.
- Bray, E.A. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, v.103, p.1035-1040.
- Brusamarello-Santos, L.C.C., Pacheco, F., Aljanabi, M.M., Monteiro, R.A., Cruz, L.M., Baura, V.A., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Wasseem, R. (2012) Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil*, 356:113–125.
- Canellas, L.P., Balmori, D.M., Médiçi, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.C.C., Olivares, F.L. (2012) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil*.
- Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. (1992) *Microbiologia do solo*, Campinas, São Paulo, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Carrena-lopez, R.N.; Campos-Reales, C.; Elmerich, C.; Baca, B.E. (2000) Physiological evidence for differently regulated tryptophan dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular and general genetics*. 264:521-530, N 4, V. 264.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (Wash. DC)*, 263: 802– 805.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551 – 560.
- Chaves, M.M.; Pereira, J.S.; Rodrigues, M.L.; Ricardo, C.P.P.; Osório, M.L.; Carvalho, I.; Faria, T.; Pinheiro, C. (2002) How plants cope with water.

- Chi, F., Shen, S.H., Cheng, H.P., Jing, Y.X., Yanni, Y.G., Dazzo, F. (2005) Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 11, p. 7271–7278.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J-K. (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55:225–236.
- Compant, S.; Clément, C.; Sessitsch, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 669-678.
- Costa, M.S., Santos, H., Galinski, E.A. (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Biotechnology of Extremophiles advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 61, 117-153.
- Crowe J.H.; Hoekstra F.A.; Crowe L.M. (1992) Anhydrobiosis. *The Annual Review of Physiology*. 54: 579–599.
- Cruz, R.F.D. (2006) Indução e recuperação do stresse hídrico em variedades portuguesas de milho. Braga: Universidade do Minho.182p. Dissertação Mestrado.
- DaCosta, M.; Huang, B. (2007) Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for bentgrass species in responses to drought stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132, 319–326.
- de Weert, S.; Vermeiren, H.; Mulders, I.H.M.; Kuiper, I.; Hendrickx, N.; Bloemberg, G.V.; Vanderleyden, J.; De Mot, R.; Lugtenberg, B.J.J. (2002) Flagella -driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 1173-1180.
- Dimkpa, C.; Weinand, T.; Asch, F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*. 32, 1682–1694.
- Dimkpa, C.; Weinand, T.; Asch, F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*. 32, 1682–1694.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, p.107-149.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. *EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro*.
- Egamberdiyeva D. (2007) The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36, 184–189.
- Faria, T., Silverio, D., Breia, E., Cabral, R., Abadia, A., Abadia, J., Pereira, J.S., Chaves, M.M. (1998) Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum* 102 (3): 419-428.
- Ferreira, D.F. (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. CD-ROOM dos Anais da Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos.
- Flexas, J.; Ribas-Carbó, M.; Bota, J.; Galmés, J.; Henkle, M.; Martínez- Cañellas, S.; Medrano, H. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *The New Phytologist* 172, 73–82.
- Franco, A.A.; Döbereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica*. São Paulo, v.20, n.1, p.68-74.
- Gilroy, S., Jones, D.L. (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *February*, v.5, n.2.

- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:109-117.
- Gonçalves, E.R.; Ferreira, V.M.; Silva, J.V.; Endres, L.; Barbosa, T.P.; Duarte, W. G. (2010) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.4, p. 378-386.
- Gong, P., Zhang, J., Li, H., Yang, C., Zhang, C., Zhang, X., Khurram, Z., Zhang, Y., Wang, T., Fei, Z., Ye, Z. (2010) Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, n.13, 3563–3575.
- Grichko V.P.; Glick B.R. (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 11–17.
- Gulez, G., Dechesne, A., Workman, C.T., Smets, B.F. (2011) Transcriptome dynamics of *Pseudomonas putida* KT2440 under water stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 676–683.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Reddy, P.M., Ladha, J.K. (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytol* 154:131–145.
- Hallmann J.; Quadt Hallmann A.; Mahaffee W.F.; Kloepper J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 895–914.
- Hardoim P.R.; Van Overbeek L.S.; Van Elsas J.D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16; 463–471.
- Heim, R., Prasher, D.C., Tsine, R.Y. (1994) Wavelength mutations and post translational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, 12501-12504.
- Hirayama, T., Shinozaki, K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*, 61, 1041–1052.
- Hoekstra F.A.; Golovina E.A.; Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Science* 6: 431–438.
- Hu, L.X., Wang, Z.L., Huang, B.R. (2009) Photosynthetic responses of Bermudagrass to drought stress associated with stomatal and metabolic limitations. *Crop Sci* 49:1902–1909.
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J. Kieber, J.J.(2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*.33, 221–233.
- Indiragandhi, P.; Anandham, R.; Kim, K.A.; Yim, W.J.; Madhaiyan, M.; Sa, T.M. (2008) Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24:1037–45.
- Iniguez A.L.; Dong Y.; Triplett E.W. (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17:1078–1085.
- Intorne, A.C.; Oliveira, M.V.V.; Lima, M.L.; Silva, J.F.; Olivares, F.L.; Souza Filho, G.A. (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiology*, 191: 477-483.

- Ionenko, I.F., Dautova, N.R., Anisimov, A.V. (2012) Early changes of water diffusional transfer in maize roots under the influence of water stress. *Environ Exp Bot* 76:16–23.
- Ivanchenko, M.G., Coffeen, W.C., Lomax, T.L. Dubrovsky, J.G. (2006) Mutations in the *Diageotropica* (dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J* 46, 436–447.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A., Sunkar, R. (2009) Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*, 229:1009–1014.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Riadh, R., Gopi, O., Manivannan, J., Inês, H.J., Al-Juburi, Z., Chang-Xing, S., Panneerselvam, R. (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints, *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 427–436.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N. (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906.
- James, E.K., Olivares, F.L. (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *CRC Crit Rev Plant Sci* 17:77–119.
- Jesus, S.V., Marengo, R.J. (2008) O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta amazônica*. v. 38, p. 815-818.
- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G. and van Hees, P.A.W. (2003) Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil*, 248, 31–41.
- Jones, H.G.; Jones, M.B. (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms, in: H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (Eds.), *Plants Under Stress*, Cambridge university Press, Cambridge, pp. 1–10.
- Kaldenhoff, R.; Fischer, M. (2006) Review: Aquaporins in plants. *Acta Physiologica*, 187: 169-176.
- Kang, S., Zhang, J. (2004) Controlled alternate partial root zone irrigation: its physiological consequences and impact on water use efficiency. *J. Exp. Bot.* 55, p. 2437–2446.
- Karthikeyan, B., Joe, M.M., Islam, Md.R., Sa, T. (2012) ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis*, 56:77–86.
- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Wani, P.A. (2006) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Sustainable agriculture*, 26:1–15.
- Kilbertus, G., Proth, J., Vervier, B. (1979) Effects de la dessiccation sur les bacteries Gram-negatives d'un sol. *Soil Biol Biochem* 11:109– 114.
- Kogut, M., Russell, N.J. (1987) Life at the limits: considerations on how bacteria can grow at extremes of temperature and pressure, or with high concentrations of ions and solutes. *Sci Progr*, 71:381– 399.
- Kohler, J.; Hernández, J.A.; Caravaca, F.; Roldán, A. (2008) Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*. 35, 141–151.
- Kohler, J.; Hernández, J.A.; Caravaca, F.; Roldán, A. (2008) Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*. 35, 141–151.
- Koskeroglu, S., Tuna, A.L. (2010) The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2940-2945.

- Krafczyk, I.; Trolldenier, G.; Beringer, H. (1984) Soluble exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology Biochemistry*, 16, 315-322.
- Krämer, R. (2010) Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *The Chemical Record*, Vol. 10, 217–229.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
- Kreps, J.A.; Wu, Y.; Chang, H.S.; Zhu, T.; Wang, X.; Harper, J.F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*. 130, 2129–2141.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. (2005) Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil*, 273:91–99.
- Kuklinsky-Sobral, J.; Araújo, W.L.; Mendes, R.; Geraldi, I.O.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 12:1244–1251.
- Kumar, R.R., Karajol, K., Naik, G.R. (2011) Effect of polyethylene glycol induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Recent Research in Science and Technology*, 3(1): 148-152.
- Kuss, A.V.; Kuss, V.V.; Lovato, T.; Flôres, M.L. (2007) Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465.
- Larrainzar, E., O’Gara, F., Morrissey, J.P. (2005) Applications of autofluorescent proteins for *in situ* studies in microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol*, 59:257–77.
- Lawlor, D.W. (1995) The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 129–160.
- Levitt, J. (1980) Responses of plants to environmental stress, 2ª edição, Academic Press, New York, 365-434.
- Ligero, F., J.M. Caba, C. Lluch and J. Olivares. (1991) Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinyl glycine. *Plant Physiology*, 97: 1221-1225.
- Liu, J.; Zhu, J.K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance, *Science*, 280 1943–1945.
- Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E.R.B.; Taghavi, S.; Mezgeay, M.; Van der Lelie, D. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (6): 583-606.
- Lu, C.; Zhang, J. (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany*, 50:336, p. 1199-1206.
- Lugtenberg, B.J.J.; Dekkers, L.; Bloemberg, G.V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 461-490.
- Luu, D.T.; Maurel, C. (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment*, 28: 85 -96.
- Lynch, J. M. (1982) Interaction between bacteria and plants in the root environment. In: RHODESROBERT, M. E.; SKINNER, F. A. (eds.) *Bacteria and plants*. London: Academic, p. 1-23.

- Lynch, J. M., Whipps, J. M. (1991) Substrate flow in the rhizosphere. Pages 15 -24 in: The rhizosphere and plant growth. D. L. Keister and B. Cregan, eds. Beltsville Sympos. in Agric. Res. 14. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Mahajan S.; Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444:139–158.
- Mandimba, G.; Heulin, T.; Bally, R.; Guckert, A.; Balandreau, J. (1986) Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. Plant and Soil, 90, 129-139.
- Mantelin, S.; Touraine, B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. Journal of Experimental Botany, v. 55, n. 394, p. 27-34.
- Marin, V.A.; Baldani, V.L.D.; Teixeira, K.R.S.; Baldani, J.I. (1999) Fixação biológica de nitrogênio de importância para agricultura tropical. EMBRAPA, p. 4.
- Marulanda, A., Azcón, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R. (2010) Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. Planta, 232:533–543.
- Marulanda, A., Barea, J.M., 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 Plant Growth Regulation 28:115–124.
- Mattos, K.A., Pádua, V.L.M., Romeiro, A., Hallack, L.F., Neves, B.C., Ulisses, T.M.U., Barros, C.F., Todeschini, A.R., Previato, J., Previato-Mendonça, L. (2008) Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 80(3): 477-493.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T., Santoni, V. (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. Ann Rev Plant Biol 59:595–624.
- Mayak S.; Tirosh T.; Glick B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 42, 565–572.
- Moffat, A.S. (2002) Finding new ways to protect drought-stricken plants. Science, 296, 1226–1229.
- Mohamed, H.I., Gomaa, E.Z. (2012) Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. Photosynthetica, 50 (2): 263-272.
- Molecular Probes Live / Dead BacLight™ bacteria viability kit technical sheet. Molecular Probes Inc. (1995).
- Monier, J.M., Lindow, S.E. (2003) Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregated formations on leaf surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci, 100: 15977-15982.
- Monteiro, R.A., Balsanelli, E., Wasseem, R., Marin, A.M., Brusamarello-Santos, L.C.C., Schmidt, M.A., Tadra-Sfeir, M.Z., Pankievicz, V.C.C., Cruz, L.M., Chubatsu, L.S., Pedrosa, F.O., Souza, E.M. (2012) *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. Plant Soil, 356:175–196.
- Moraes, G.A.F., Menezes, N.L., Pasqualli, L.L. (2005) Comportamento de sementes de feijão sob diferentes potenciais osmóticos. Ciência Rural, v.35, n.4, jul-ago.
- Munns, R. (1988). Why measure osmotic adjustment? Australian Journal of Plant Physiology, 15:717-726.
- Munns, R. (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. Plant Cell Environ, 16:15–24.

- Murphy, J.F.; Zehnder, G.W.; Schuster, D.J.; Sikora, E.J.; Polstan, J.E.; Kloepper, J.W. (2000) Plant growth promoting rhizobacteria mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Disease*;84:779–84.
- Nunes, F.S.; Raimondi, A.C.; Niedwieski, A.C. (2003) Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Revista Química Nova*, v.26, n.6, p.872.
- Okon, Y.; Vanderleyden, J. (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News*, 63, 366-370.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Dobereiner, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21,197-200.
- Oliveira, A.L.M.; Urquiaga, S.; Dobereiner, J.; Baldani, J.I. (2002). The effect of inoculating endophytic N₂ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*. v. 242, p. 205 - 215.
- Pacovsky, R.S. (1990) Development and growth effects in the Sorghum *Azospirillum* association. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 555-563.
- Pastenes, C., Pimentel, P., Lillo, J. (2005) Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans. *Journal of Experimental Botany*, 56, 425–433.
- Pedrosa, F.O., Monteiro, R.A., Wassem, R., Cruz, L.M. *et al.* (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, May,vol.7, 5.
- Peguero-Pina, J.J.; Morales, F.; Flexas, J.; Gil-Pelegrín, E.; Moya, I. (2008) Photochemistry, remotely sensed physiological reflectance index and de-epoxidation state of the xanthophyll cycle in *Quercus coccifera* under intense drought. *Oecologia* 156, 1–11.
- Pereira, J.C. (2000) Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros organismos na Rizosfera. *EMBRAPA Agrobiologia*, 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., and Robaglia, C. (2003) Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment*. 26:189-199.
- Pimentel, J.P., Olivares, F.L., Pitard, R., Urquiaga, S., Akiba, F., Döbereiner, J. (1991) Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil*, 137:61–65.
- Poltronieri, P., Bonsegna, S., Domenico, S., Santino, A. (2011) Molecular mechanisms in plant abiotic stress response. *Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res.* 48, 15-24.
- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H.A., Friesen, R.H.E., Moe, P.C., Heide, T.V.D. (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Molecular Microbiology*, 44(4), 889–902.
- Poolman, B., Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology*, v.29, 397-407.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., Bokman, S.H. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111:229–33.
- Prayitno, J.; Stefaniak, J.; Mclver, J.; Weinmen, J.J.; Dazzo, F.B.; Ladha, J.K.; Barraquio, W.; Yanni, Y.G.; Rolfe B.G. (1999) Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. *Australian Journal of Plant Physiology*. 26:521 –535.
- Rajkumar, M.; Ae, N.; Prasad, M.N.V.; Freitas, H. (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnology*; 28:142–9.

- Rashotte, A.M.; Brady, S.R.; Reed, R.C.; Ante, S.J.; Muday, G.K. (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122:481–90.
- Ribeiro, M.S. (2012) Efeitos da aplicação diferencial de água no substrato sobre a capacidade fotossintética, relações hídricas e crescimento inicial em cana-de-açúcar. Dissertação mestrado Produção Vegetal, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Riggs, P.J.; Chelius M.K.; Iniguez A.L.; Kaeppler S.M.; Triplett E.W. (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28:829–836.
- Rizhsky, L.; Liang, H.; Shuman, J.; Shulaev, V.; Davletova, S.; Mittler, R. (2004) When defense pathways collide: the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*. 134, 1683–1696.
- Rouws, L.F.M., Meneses, C.H.S.G., Guedes, H.V., Vidal, M.S., Baldani, J.I., Schwab, S. (2010) Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 325–330.
- Sandhya, V., Ali, Sk.Z., Venkateswarlu, B., Reddy, G., Grover, M. (2010). Effect of osmotic stress on plant growth promoting *Pseudomonas* spp.
- Saravanakumar, D., Kavino, M., Raguchander, T., Subbian, P., Samiyappan, R. (2011) Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiol Plant*, 33:203–209.
- Schnall, J.A., Quatrano, R.S. (1992) Abscisic acid elicits the water-stress response in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 100, 216-218.
- Sergeeva, E.; Shah, S.; Glick, B.R. (2006) Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22, 277–282.
- Sevilla M.; Gunapala N.; Burris R.H.; Kennedy C. (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*-mutant strains. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 14:358–366.
- Sgroy, V.; Cassán, F.; Masciarelli, O.; Del Papa, M.F.; Lagares, A.; Luna, V. (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth -promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology Biotechnonology*, 85: 371-381.
- Shakir, M.A., Bano, A., Arshad, M. (2012) Rhizosphere bacteria containing ACC-deaminase conferred drought tolerance in wheat grown under semi-arid climate. *Soil Environ*, 31(1): 108-112.
- Shao, H.B.; Guo, Q.J.; Chu, L.Y.; Zhao, X.N.; Su, Z.L.; Hu, Y.C.; Cheng, J.F. (2007) Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54: 37-45.
- Soleimani, H., Rashidfar, M., Malekian, A. (2011) Effect of Salinity and Drought by Using NaCl 99.99 % and PEG 6000 on Some Growth Factors on *Anabasis aphylla*. 2nd International Conference on Environmental Engineering and Applications IPCBEE vol.17.
- Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:487-506.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56:187-209.
- Sturz, A.V.; Kimpinski, J. (2004) Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of rootlesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* 262:241-249.
- Sturz, A.V.; Nowak, J. (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 15, 183-190.
- Taghavi, S.; Garafola, C.; Monchy, S.; Newman, L.; Hoffman, A.; Weyens, N.; Barac, T.; Vangronsveld, J.; Van der Lelie, D. (2009) Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar. *Applied and Environmental Microbiology*;75:748–57.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2009). *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre. Artmed. 848p.
- Tezara, W.; Mitchell, V.J.; Driscoll, S.D.; Lawlor D.W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401, 914–917.
- Tien, T.M.; Gaskins, M.H.; Hubbell, D.H. (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 1016-1024.
- Turner, N.C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil*, 58:339-366.
- Turner, N.C. (1986) Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13:175-190.
- Tyburnski, J. Tretyn, A. (2004) The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Regul*, 42, 39–48.
- Valverde, A., Velázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., Igual, J.M. (2003) *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1979–1983.
- van den Berg, L., Zeng, Y.J. (2006) Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. *S Afr J Bot* 72:284–284.
- Van Loon, L.C.; Geraats, B.P.; Linthorst, H.J. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Science*, 11: 184-191.
- Vande Broek, A.; Lambrecht, M.; Eggermont, K.; Vanderleyden, J. (1999) Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*. 181, 1338–1342.
- Vartanian, N. (1981) Some aspects of structural and functional modifications induced by drought in root systems. In R Brouwer, Gasparikova, J Kolek, BC Loughman, eds, *Structure and Function of Plant Roots*. Martinus Nijhoff/Dr W Junk, The Hague, The Netherlands, 309-318.
- Verhage, A., van Wees, S.C., Pieterse, C.M. (2010) Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol*, 154:536–540.
- Verslues, P.E., Ober, E.S., Sharp, R.E. (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions.
- Walker, T.S.; Bais, H.P.; Grotewold, E.; Vivanco, J.M. (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132, 44-51.
- Walsh, U.F.; Morrissey, J.P.; O'Gara, F. (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 289-295.

- Webb, J.S., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr Opin Microbiol*, 6:578-585.
- Welsh, D.T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS microbiology review*. v.24. n.3, p.263-290.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment*, 33:510-525.
- Wise, R.R.; Sparrow, D.H.; Ortiz-Lopez, A.; Ort, D.R. (1991) Biochemical regulation during the midday decline of photosynthesis in field-grown sunflower. *Plant Science*, 74, p. 45-52.
- Wolters, H., Jurgens, G. (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*, 10:305-317.
- Wood, J. M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63, 230-262.
- Woolhose, H.W. (1983) The effect of stress on photosynthesis In: *Effects of stress on photosynthesis*. Edited by R. Marcelle. Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers.
- Xing, D., Wu, Y. (2012) Photosynthetic response of three climber plant species to osmotic stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. *Acta Physiol Plant*, 34:1659 – 1668.
- Yanni Y.G.; Rizk R.Y.; Corich V.; Squartini A.; Ninke K.; Philip-Hollingsworth S.; Orgambide G.; de Bruinj F.; Stoltzfus J.; Buckley D.; Schmidt T.M.; Mateos P.F.; Ladha J.K.; Dazzo F.B. (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194:99–114.
- Young, A. L.; Frank, H. A. (1996) Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 36, n. 1, p. 3-15.
- Yuwono T.; Handayani D.; Soedarsono J. (2005) The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* 56, 715–721.
- Zahran, H.H., Sprent, J.I. (1986) Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309.
- Zawosnik, M.S., Ameneiros, M., Benavides, M.P., Vázquez, S., Groppa, M.D. (2011) Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90:1389–1397.
- 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 (Formerly Acta Botanica Sinica)*, 47 (12): 1470 – 1478.
- Zhang, H., Xie, X., Kim, M.S., Korniyev, D.A., Holaday, S. Pare, P.W. (2008) Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal*, 56, 264–273.
- Zhou, K., George, S.M., Métris, A., Li, P.L., Baranyi, J. (2011) Lag phase of *Salmonella enterica* under osmotic stress conditions. *Applied and environmental microbiology*, Mar, v.77, n.5, 1758–1762.
- Zhou, Y., Zhou, J., Huang, L., Ding, X., Shi, K., Yo, J. (2009) Grafting of *Cucumis sativus* onto *Cucurbita ficifolia* leads to improve plant growth, increased light utilization and

- reduced accumulation of reactive oxygen species in chilled plants, *Journal of Plant Research*, 122, 529–540.
- Zhu, J-K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Science*, 6:66-71.
- Zhu, J-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53:247–73.