

**RIZOBACTÉRIAS COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DO
ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO NO GERGELIM BRS MORENA**

ANDERSON REGES DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE – PB

SETEMBRO – 2022

RIZOBACTÉRIAS COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO NO GERGELIM BRS MORENA

ANDERSON REGES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / área de concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. LIZIANE MARIA DE LIMA

**CAMPINA GRANDE – PB
SETEMBRO – 2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237r Santos, Anderson Reges dos.
Rizobactérias como estratégia de mitigação do estresse por déficit hídrico no gergelim BRS morena [manuscrito] / Anderson Reges dos Santos. - 2022.
70 p. : il. colorido.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2022.
"Orientação : Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."
1. Bacilos. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Sesamum indicum L. 4. Déficit hídrico. I. Título

21. ed. CDD 570

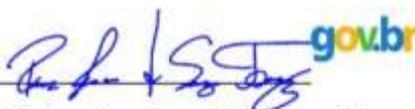
RIZOBACTÉRIAS COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO DO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO NO GERGELIM BRS MORENA

ANDERSON REGES DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / área de concentração: Biotecnologia e melhoramento vegetal.

Aprovada em 13/09/2022

Banca examinadora:



Documento assinado digitalmente
RENER LUCIANO DE SOUZA FERRAZ
Data: 25/10/2022 18:59:04-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Rener Luciano de Souza Ferraz- UFCG
Avaliador



Prof.ª Dr.ª. Nair Helena Castro Arriel – Embrapa Algodão
Avaliador



Prof.ª Dr.ª. Liziane Maria de Lima –Embrapa Algodão
Orientadora

Ao meu Senhor Deus soberano. Aos meus filhos e esposa, **DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, por ter me dado saúde, sabedoria e pela sua divina misericórdia que nunca me deixou faltar nada!

A minha esposa, que tanto amo, Louise Fernandes de O. Reges, pela paciência, amor, dedicação e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus filhos, Theo F. O. e Reges, Thomás F. O. e Reges, e ao meu anjo que está no céu, vocês são o combustível que faz a gente batalhar por dias melhores.

Aos meus pais, Geane Reges dos Santos e Roberto R. Santos, pela compreensão, confiança e educação.

À minha família, em especial a meu irmão Alisson E. R. Santos e avós por todo o apoio durante o mestrado.

À minha orientadora, Dr^a. Liziane Maria de Lima, por ter acreditado em mim, pela orientação e paciência.

Ao Dr. Tarcísio Gondim e aos técnicos e colaboradores do setor de campo da Embrapa Algodão por todas as contribuições na aérea do campo.

Ao Dr. Rener Ferraz, por toda a contribuição na estatística, com seus ensinamentos, apoio e disposição.

Ao Dr. Alberto Soares, pelo o apoio e conselhos durante minha jornada acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão: Giliard Bruno, Edson Lourenço, Maria Clara Rufino, Andreza Costa, Camila Lima e Gabriela, pela ajuda no experimento, nas análises de laboratório, companhia diária, ensinamentos e momentos de descontração em meio às dificuldades. Vocês são parte dessa vitória.

À Dra. Geisenilma Maria pela ajuda nas análises de laboratório e na estatística, que não mediu esforços em ajudar.

Às técnicas do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Fábica Suely e Terezinha Duarte, pela paciência e ajuda durante as análises.

À Embrapa Algodão, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) da UEPB e a todos os professores.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista, meu muito OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Inoculantes a base de bacilos	17
3.2 Aspectos fisiomorfológicos da cultura do gergelim	18
3.3 O gergelim e sua importância econômica.....	19
3.4 Condições de cultivo do gergelim	20
3.5 Comportamento fisiológico de plantas sob déficit hídrico	20
3.6 Genes expressos em plantas sob estresse hídrico	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Implantação e condução do experimento em casa de vegetação.....	27
4.2 Cultivo das bactérias e preparo dos inoculantes	29
4.3 Variáveis Agronômicas.....	30
4.4 Trocas gasosas	30
4.5 Análise de nitrogênio em folha.....	31
4.6. Análise de fósforo em folha.....	31

4.7 Atividades enzimáticas	32
4.8 Teor de Prolina livre total	32
4.9 Extração de RNA total e síntese de cDNA	33
4.10 Análise da expressão dos genes <i>DREB1</i> e <i>SiHDZ7</i> por RT-qPCR.....	34
4.11 Análises estatísticas	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Variáveis agronômicas.....	36
5.2 Análise de nitrogênio e fósforo no tecido vegetal	40
5.3 Respostas fisiológicas	42
5.4 Análises Bioquímicas	46
5.5 Análises moleculares	51
5.6 Análise estatística multivariada	54
6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise dos componentes físico-químicos do solo (Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, 2022).....	27
Tabela 2- Genes e sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos utilizados.....	34
Tabela 3. Resumo do quadrado da altura de plantas (ALT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e peso de mil sementes (PMS) do gergelim BRS Morena inoculado com bacilos, sob restrição hídrica.	40
Tabela 4. Resumo do quadrado do teor de nitrogênio e fósforo do gergelim BRS Morena inoculado com bacilos, sob restrição hídrica.	41
Tabela 5. Resumo do quadrado das respostas fisiológicas em plantas de gergelim, submetidas a estresse hídrico. A) concentração interna de carbono (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); B) condutância estomática (Gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); C) transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); D) fotossíntese (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E) eficiência instantânea da carboxilação (EiC) a partir da relação (E/Ci); F) eficiência do uso da água (EUA) a partir da relação entre (A/E).	45
Tabela 6. Correlação entre variáveis originais e componentes principais, autovalores, variância explicada e acumulada e probabilidade de significância do teste de hipótese nos quatro primeiros componentes de interação principais (PCs 1, 2, 3 e 4) entre níveis de irrigação e inoculantes com bacilos em plantas de gergelim.	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rotas biosintéticas que regulam os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) na célula em plantas sob condições estressantes. Fonte: JONES et al. (2013), com adaptações.....21
- Figura 2.** Exemplo de duas rotas de transdução de sinais, ativadas por estresses abióticos que usam quatro tipos de fatores de transcrição para ativar mecanismo de aclimatação. Fonte: LATA et al. (2011), com adaptações).23
- Figura 3.** Correção do solo com calcário dolomítico. Fonte: Autor (2021)28
- Figura 4.** Semeadura, emergência de plântulas e desbaste da cultivar BRS Morena em casa de vegetação. (A) Semeadura com auxílio de pinça; (B) Emergência das plântulas; (C) Plantas após 15 dias de emergência. Fonte: Autor (2021).29
- Figura 5.** Plantas de gergelim em casa de vegetação, antes (A) e após (B) serem submetidas a um período de 5 dias de estresse hídrico. Fonte: Autor (2021).29
- Figura 6.** Variáveis agronômicas: (A) Altura de planta (ALT); (B) Diâmetro do caule (DC); (C) Massa seca da parte aérea (MSPA); (D) Massa seca da raiz (MSR). Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.....37
- Figura 7.** Variáveis agronômicas: (A) Peso total de sementes (PTS); (B) Número de cápsulas (NC); (C) Peso de 1000 sementes (PMS). Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.....39
- Figura 8.** Acúmulo de nitrogênio (A) e fósforo (B) em folhas de gergelim inoculadas com bacilos, sob restrição hídrica. Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.41

Figura 9. Análises fisiológicas em plantas de gergelim, submetidas a estresse hídrico. A) concentração interna de carbono (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); B) condutância estomática (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); C) transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); D) fotossíntese (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E) eficiência instantânea da carboxilação (EiC) a partir da relação (E/Ci); F) eficiência do uso da água (EUA) a partir da relação entre (A/E). Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.45

Figura 10. Concentração de prolina livre (A), SOD- Superóxido dismutase (B), APX- Ascorbato peroxidase e catalase (CAT) em função do déficit hídrico em plantas de gergelim. Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídrico dentro de cada tratamento.48

Figura 11. Análise de pigmentos fotossintéticos clorofila a (A), b (B), clorofila total (C) e carotenoides (D) em plantas de gergelim inoculadas com bacilos e sob condição de déficit hídrico. Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídrico dentro de cada tratamento.50

Figura 12. Padrão de expressão tecido-específico dos genes DREB1D e SIHDZ7 no 5º dia de déficit hídrico em plantas de gergelim (90% de fechamento estomático), inoculadas com estirpes de bacilos. CN- com nitrogênio; SN- sem nitrogênio.51

Figura 13. PCR em tempo real do gene DREB 1D (A) e SIHDZ7 (B) em plantas de gergelim sob estresse hídrico e inoculadas com estirpes de bacilos. CN- Com nitrogênio; SN- sem nitrogênio.53

Figura 14. Resumo do comportamento das variáveis agrônômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em gergelim, inoculado com bacilos e submetidos a restrição hídrica. Os resultados foram comparados ao tratamento sem nitrogênio não irrigado. ALT- Altura de plantas, DC- Diâmetro caulinar, MSPA- Massa seca da parte aérea, MSR- massa seca raiz, NC- Número de cápsulas, PTS- Peso total de sementes, PMS- peso 1000 sementes, N- nitrogênio, P- Fósforo, Ci- Carbono interno, gs- Condutância estomática, A/E – Eficiência do uso água, A/Ci – Eficiência da carboxilação, A- Fotossíntese, E- Transpiração, SOD- Superóxido dismutase, PRO- Prolina, APX- Ascorbato peroxidase, CAT- catalase, CLa- Clorofila A, CLb- Clorofila B, CLt- Clorofila totais, CRT- Carotenóides.....54

Figura 15. Projeção bidimensional dos escores fatoriais (A e C) e variáveis (B e D) nos quatro primeiros componentes de interação principais (CPs 1, 2, 3 e 4) entre níveis de irrigação e inoculantes com bacilos em plantas de gergelim. Tratamentos irrigado (I) (azul), tratamento não irrigado (NI) (vermelho); SN- sem nitrogênio, CN- com nitrogênio, P1- pant001, E13- ESA 13, E402- ESA 402, M143; ALT- Altura de plantas, DC- Diâmetro caulinar, MST- Massa seca total, PR- Peso seco raiz, NC- Número de cápsulas, PTS- Peso total de sementes, Ci- Carbono interno, Gs- Condutância estomática, A/E – Eficiência do uso água, A/Ci – Eficiência da carboxilação, A- Fotossíntese, E- Transpiração, SOD- Superóxido dismutase, PRO- Prolina, CLa- Clorofila A, CLa- Clorofila B, CLt- Clorofila totais, CRT- Carotenóides.....58

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ALT	Altura
APX	Ascorbato peroxidase
CAT	Catalase
Ci	Carbono Interno
CN	Com nitrogênio
CPs	Componentes principais
DC	Diâmetro caulinar
DREB	Membros de ligação de elementos responsivos a desidratação
EiC	Eficiência instantânea da carboxilação
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Eficiência do uso da água
GA	Giberilinas
gs	Condutância estomática
HDZIP	Homeodomínio- leucina
IN	Inoculantes
IR	Irrigação
IRGA	Infra red gas analyzer
LGs	Grupos de ligação
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
NBT	Azul p-nitrotriazólio
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
PMS	Peso de 1000 sementes
PRO	Prolina
PTS	Peso total de sementes
PVP	Polivinilpolipirrolidona
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
SN	Sem nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
TFs	Fatores de transcrição

RESUMO

SANTOS, A. R. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, Setembro, 2022. **Rizobactérias como estratégia de mitigação do estresse por déficit hídrico no gergelim BRS Morena.** Dr^a. Liziane Maria de Lima.

Uma estratégia potencial para melhorar a tolerância ao déficit hídrico em sistemas de produção agrícola é a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas. As rizobactérias promovem vários benefícios, como a indução da tolerância da planta contra estresses abióticos. Apesar de ser considerado tolerante ao déficit hídrico, o gergelim, uma espécie dicotiledônea, herbácea e uma das mais antigas plantas oleaginosas utilizadas pela humanidade, requer precipitações pluviométricas bem distribuídas para atingir seu potencial máximo produtivo. Embora, essa característica represente uma vantagem para o cultivo em regiões semiáridas, a seca ainda é um desafio para o cultivo dessa planta por pequenos e médios produtores, sobretudo na região Nordeste. Portanto, objetiva-se com este trabalho analisar a interação de inoculantes a base de bacilos como estratégia de mitigação ao déficit hídrico em genótipo de gergelim. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Algodão (Campina Grande-PB) utilizando a cultivar BRS Morena em vasos com capacidade de 18 L. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, estabelecido por processo randômico em esquema fatorial 2 (regime hídrico- rega diária e suspensão temporária da rega) x 6 (fontes de variação), totalizando 12 tratamentos com 5 repetições. Os tratamentos foram caracterizados em: (i) manejo com nitrogênio químico (sulfato de amônio, SAM; 21% de N); e (ii) manejo com 4 inoculantes a base de bacilos (*B. subtilis* estirpe pant001, ESA 13, ESA 402 e M143). Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura de planta, diâmetro da haste, número de cápsulas, peso de 1000 sementes, massa seca de parte aérea, comprimento da raiz, massa seca de raiz, teor de nitrogênio e fósforo em folhas e variáveis fisiológicas como Ci, A, gs, E, A/E, A/ci,. Além disso, foram feitas análises de expressão dos genes *DREB1* e *SHDZ7* responsivos ao estresse hídrico, atividades de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase, Catalase e Ascorbato peroxidase), teor relativo de prolina e pigmentos fotossintéticos. Os dados do experimento foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), as médias comparadas dos tratamentos pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) e as condições hídricas foram comparadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$) Os resultados mostraram efeito positivo dos inoculantes para todas as variáveis agrônômicas e fisiológicas. A análise de nitrogênio e fósforo em folha mostrou acúmulo nos tratamentos estressados, com nitrogênio e pant001. Houve efeito significativo para prolina, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase e pigmentos fotossintéticos. Em relação a expressão gênica, os tratamentos inoculados com ESA 13, ESA 402

e com nitrogênio obtiveram uma superexpressão. Considerando a produção final, as estirpes pant001 e M143 estabeleceram uma melhor interação com incremento de 24% e 21%, respectivamente, para o peso de mil sementes, quando comparado ao tratamento sem nitrogênio, sob déficit hídrico. Logo, com os resultados foi possível identificar as melhores interações genótipo x inoculante sob estresse hídrico para os tratamentos com a estirpes pant001, M143 e ESA 402.

Palavras-chave: bacilos; bactérias diazotróficas; genes *DREB1* e *SIHDZ7*; *Sesamum indicum* L.

ABSTRACT

SANTOS, A.R. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, September, 2022. **Rhizobacteria as a strategy to mitigate water deficit stress in BRS Morena sesame.** Dr. Liziane Maria de Lima.

A potential strategy to improve water deficit tolerance in agricultural production systems is the application of plant growth-promoting bacteria. Rhizobacteria promote several benefits, such as inducing plant tolerance against abiotic stresses. Despite being considered tolerant to water deficit, sesame, a dicotyledonous, herbaceous species and one of the oldest oilseed plants used by humanity, requires well-distributed rainfall to reach its maximum productive potential. Although this characteristic represents an advantage for cultivation in semi-arid regions, drought is still a challenge for the cultivation of this plant by small and medium producers, especially in the Northeast region. Therefore, the objective of this work is to analyze the interaction of bacilli-based inoculants as a strategy to mitigate water deficit in sesame genotype. The experiment was carried out in a greenhouse at Embrapa Algodão (Campina Grande-PB) using the cultivar BRS Morena in pots with a capacity of 18 L. The experimental design was completely randomized, established by a random process in a 2 factorial scheme (water regime - daily irrigation and temporary suspension of irrigation) x 6 (sources of variation), totaling 12 treatments with 5 repetitions. The treatments were characterized in: (i) management with chemical nitrogen (ammonium sulfate, SAM; 21% N); and (ii) management with 4 bacilli-based inoculants (*B. subtilis* strain pant001, ESA 13, ESA 402 and M143). The following variables were evaluated: plant height, stem diameter, number of capsules, weight of 1000 seeds, shoot dry mass, root length, root dry mass, nitrogen and phosphorus content in leaves and physiological variables such as C_i , A , g_s , E , A/E , A/c_i . In addition, analysis of the expression of DREB1 and SHDZ7 genes responsive to water stress, activities of antioxidant enzymes (Superoxide dismutase, Catalase and Ascorbate peroxidase), relative content of proline and photosynthetic pigments were performed. The experiment data were submitted to analysis of variance ($P \leq 0.05$), the means of treatments were compared by the Tukey test ($P \leq 0.05$) and the water conditions were compared by the Student's T test ($P \leq 0.05$). The results showed a positive effect of inoculants for all agronomic and physiological variables. The analysis of nitrogen and phosphorus in leaves showed accumulation in the stressed treatments,

with nitrogen and pant001. There was a significant effect for proline, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase and photosynthetic pigments. Regarding gene expression, treatments inoculated with ESA 13, ESA 402 and with nitrogen were overexpressed. Considering the final production, the strains pant001 and M143 established a better interaction with increment of 24% and 21%, respectively, for the weight of a thousand seeds, when compared to the treatment without nitrogen, under water deficit. Therefore, with the results it was possible to identify the best genotype x inoculant interactions under water stress for treatments with strains pant001, M143 and ESA 402.

Keywords: bacilli; diazotrophic bacteria; DREB1 and SIHDZ7 genes; *Sesamum indicum* L.

1. INTRODUÇÃO

A condição de estresse hídrico associada ao uso de biofertilizantes naturais e reguladores de crescimento pode favorecer a produtividade do gergelim, especialmente no que tange a produção de grãos (BELTRÃO, 2001). As rizobactérias promovem vários benefícios, a saber: biofertilização, promoção de crescimento da planta, restrição do crescimento de patógenos e indução da tolerância da planta contra estresses abióticos (ABD ALLAH et al., 2018).

O *Bacillus subtilis* é considerado uma bactéria gram-positiva, esporulante, em condições adversas como carência nutricional, dessecação e temperaturas inibidoras do crescimento, são habitualmente encontradas no solo e na vegetação (MADIGAN, 2016). Este é um biofertilizante que ajuda no crescimento de plantas, melhorando a produção de fitohormônios como giberelinas, auxinas e citocininas (HAN et al., 2014). O *B. subtilis* não causa danos aos seres humanos e também pode produzir altas taxas de antibióticos em solos, como lipopeptídeos, polipeptídeos e fosfolipídios para controlar outras espécies prejudiciais (STEIN et al., 2002). Sendo assim, este tem um amplo alcance como modelo de pesquisa porque tem uma extensa variedade genética e é sensível a diferentes condições ambientais, ele também tem vários benefícios de propriedades aplicadas na agricultura, práticas agrícolas e controles microbiológicos (JASSIM, 2020).

Estudos anteriores com *B. subtilis* se concentraram amplamente em seus efeitos positivos em culturas de ciclo curto (LI et al., 2016; LIMA et al., 2019). De acordo com Lima et al. (2016), os resultados obtidos em suas pesquisas com a inoculação de *B. subtilis* foram benéficas em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e milho (*Zea mays*), contribuindo para importantes características fotossintéticas sob estresse hídrico. Além disso, eles descobriram que as respostas de cada espécie de planta eram diferentes à inoculação. Há também pesquisas em gergelim, com inoculação por *Bacillus* sp. para testar a eficiência simbiótica da planta com os bacilos nativos do solo em vista da melhoria no crescimento da planta e no teor de óleo. Os resultados apresentaram microorganismos atuantes de maneira favorável no desenvolvimento e crescimento das plantas,

umentando a produtividade da cultura, preservação da microflora e microfauna do solo e redução de custo na produção (NITHYAPRIYA et al., 2021).

O gergelim (*Sesamum indicum* L.), membro da família Pedaliaceae, é uma espécie dicotiledônea, herbácea, e uma das plantas oleaginosas mais antigas e usadas pela humanidade (LIMA, 2020). De acordo com Jesus et al. (2015), Lima (2020) e Kannan (2020) o gergelim se destaca por seu alto valor econômico, sendo cultivado para alimentação e uso medicinal ou empregado na produção de biodiesel. Suas sementes contêm óleo com alta qualidade nutricional devido à presença de ácidos graxos insaturados, como oleico e linoleico.

Para atingir seu potencial máximo produtivo, o gergelim requer precipitações pluviométricas bem distribuídas. Logo, a escassez hídrica reduz o desempenho do gergelim, causando alterações nas propriedades das membranas, aumento da respiração, inibição da fotossíntese, menor produção de matéria seca, senescência prematura e, conseqüentemente, redução da produção (BELTRÃO, 2001; TAIZ et al., 2017).

Os sinais ambientais relacionados à seca são primeiramente percebidos por receptores específicos que, após a ativação, iniciam cascatas para transferir sinais intercelulares e ativam fatores de transcrição (TFs) para ativar a expressão de conjuntos específicos de genes. Os genes *DREB1* e *SiHDZ7* são considerados reguladores da adaptação à seca em gergelim (DOSSA et al., 2016; CHEN et al., 2022), no entanto, poucos estudos com gergelim têm sido conduzidos. Logo, esses genes devem ser mais profundamente estudados em uma grande número de materiais contrastantes para elucidar o papel biológico na tolerância à seca em gergelim.

Portanto, é esperado que os resultados alcançados com esta pesquisa tragam benefícios para a cultura do gergelim, bem como seja possível identificar a melhor interação genótipo x inoculante quando submetido ao déficit hídrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as alterações fisiológicas, agronômicas, e moleculares na cultivar de gergelim BRS Morena sob déficit hídrico e inoculada com bacilos.

2.2 Específicos

- Quantificar os componentes nutricionais (nitrogênio e fósforo) e agronômicos no genótipo BRS Morena;
- Avaliar alterações fisiológicas provocadas pelo déficit hídrico no genótipo de gergelim BRS Morena;
- Quantificar a atividade de enzimas antioxidantes (CAT, APX e SOD) no genótipo BRS Morena;
- Analisar o teor do osmólito prolina no genótipo BRS Morena;
- Analisar a expressão dos genes *DREB1* e *SiHDZ7* no genótipo BRS Morena e a possível relação com a tolerância do genótipo à deficiência hídrica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Inoculantes a base de bacilos

Estratégias de manejo que otimizam a eficiência do uso da água podem mitigar os impactos negativos do estresse hídrico no desenvolvimento das plantas e minimizar os danos. Uma estratégia potencial para melhorar a tolerância ao déficit hídrico em sistemas de produção agrícola é a aplicação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR-plant growth promoting rhizobacteria) (POVEDA et al.,2020), que podem auxiliar na aquisição de nutrientes e síntese de fitohormônios, além de promover a melhoria do sistema antioxidante (POVEDA et al.,2020; PARRAY et al., 2016; LIMA et., 2019). O PGPR pode melhorar o desempenho da planta mantendo um nível de ROS compatível com o funcionamento celular (BRILLI et al., 2019).

Dentre os microrganismos, destaca-se o *B. subtilis* como benéfico para plantas, sendo bastante utilizado como biofertilizante. É uma bactéria gram-positiva, considerada não patogênica, habitualmente encontrada no solo e na vegetação. É aeróbico facultativo, sendo capaz de crescer anaerobicamente na presença de nitratos (PASCALE et al., 2013; MADIGAN, 2016). Além disso, é um agente amplamente efetivo no biocontrole de microrganismos fitopatogênicos como alguns fungos (BETTIOL; KIMATI, 1990); controle biológico de nematoides, devido à produção de endotoxinas que afetam o seu ciclo reprodutivo (ARAÚJO et al., 2012; FERNANDES et al., 2013), pela produção de enzimas hidrolíticas como glucanases ou proteases, lipopeptídeos antibióticos surfactina, fungicina e/ou iturina (CAZORLA et al., 2007); além do mais, pode ser utilizado como atenuante para plantas sob estresse hídrico (MARULANDA et al., 2007).

O *Bacillus subtilis* também exerce efeitos estimulantes e protetores do crescimento em diferentes espécies de plantas sob vários estresses ambientais, incluindo a seca (LASTOCHKINA et al., 2019) e possui grande versatilidade catabólica, o que favorece o crescimento das plantas em condições adversas (GAGNÉ et al., 2016) através da síntese de exopolissacarídeos, sideróforos e hormônios vegetais, e melhorias na disponibilidade de nutrientes (RADHAKRISHNAN et al., 2017). Além disso, pode aumentar a capacidade fotossintética das plantas, influenciando a condutância estomática e a tolerância celular à desidratação, promovendo maior eficiência no uso da água nas plantas (LI et al., 2016).

O estresse hídrico é restritivo para as relações hídricas a nível celular ou para o organismo completo das plantas seguindo-se de perdas econômicas na agricultura. A inoculação de plantas com microrganismos benéficos, como *B. subtilis*, permite o crescimento das plantas e amplia a tolerância à seca em ambientes áridos ou semiáridos (MARULANDA et al., 2007).

Os resultados em plantas de grão-de-bico sob estresse salino apresentados por Abd Allah et al. (2018) conferiram características vantajosas da inoculação com *B. subtilis*, com efeitos positivos como a estimulação do crescimento, aquisição de nutrientes, desempenho simbiótico e tolerância ao estresse de plantas de grão-de-bico em solo salino. Foi relatado também que os inoculantes bacterianos podem aliviar o dano oxidativo causado por vários estresses abióticos, incluindo seca, sal e metais pesados (VARDHARAJULA et al., 2011).

3.2 Aspectos fisiomorfológicos da cultura do gergelim

O gergelim (*Sesamum indicum* L.), é uma das plantas oleaginosas mais antigas e usadas pela humanidade, suas características morfológicas possuem grande heterogeneidade, com ciclo anual ou perene, mede de 50 cm a 3 m de altura, tem caule ereto, com ou sem ramificações, com ou sem pelo, e sistema radicular pivotante, fazendo com que apresente certa tolerância à seca (BELTRÃO et al., 2001). CITAR PARA A REALIDADE DO CENTRO OESTE

Beltrão et al. (2001) e Arriel (2007) descreveram o gergelim como sendo uma planta com folhas que podem ser alternadas ou opostas, as da parte inferior da planta adulta sendo mais largas e irregularmente dentadas ou lobadas, enquanto as da parte superior lanceoladas. As flores são completas e axilares e variáveis de 1 a 3 por axila foliar. O fruto dispõe em forma de cápsula alongada, pilosa, deiscente ou indeiscente, de 2 a 8 cm de comprimento, conforme a variedade. As sementes são pequenas – mil delas pesam de 2 a 4 g de acordo com a cultivar e do ambiente na qual foi cultivada. A cor das sementes possui tons que variam do branco ao preto.

O cultivo do gergelim está se expandindo com o aumento da demanda em regiões onde não era tradicionalmente cultivado. De acordo com Baath (2021), em sua pesquisa com gergelim em diversas condições de temperatura, constatou-se que o gergelim atingiu o estágio de floração em condições de temperatura moderada a alta, no entanto, os rendimentos reprodutivos diminuiram progressivamente acima de 25°C e nenhum rendimento de sementes foi obtido acima de 33°C. Temperaturas superiores a 40°C causam abortamento de flores e o não enchimento dos grãos. A qualidade das sementes e do óleo pode ser afetada por quedas de temperatura e por suas elevações.

A potencialização do rendimento depende de precipitações pluviométricas variáveis de 500 a 650 mm anuais. Em locais com precipitação anual inferior a 300 mm, a cultura pode produzir de

300 a 500 kg/ha de grãos (TUFAIL, 2020). A exigência hídrica do gergelim está mais diretamente relacionada à distribuição do que à quantidade total de chuvas durante o período vegetativo da planta. A cultura requer de 160 a 180 mm de água nos primeiros 30 dias após a germinação e um acúmulo superior a 250 mm até o final dos primeiros 60 dias após o plantio. O máximo de rendimento é obtido com precipitações bem distribuídas durante as diversas fases do ciclo (MAPA, 2013).

3.3 O gergelim e sua importância econômica

O gergelim se sobressai por seu alto valor econômico, sendo cultivado para alimentação e usos medicinais (JESUS, 2015). Suas sementes contêm óleo com alta qualidade nutricional devido à presença de ácidos graxos insaturados, como oleico e linoleico (LIMA, 2020). Além de ser utilizado na fabricação de massas, doces, tortas, tintas, sabonetes, cosméticos e medicamentos, reduzindo o colesterol no sangue, pressão alta e prevenindo a aterosclerose, doenças cardíacas e câncer (KUMAR; SINGH, 2015).

As gorduras do óleo de gergelim são relativamente estáveis e resistem ao processo oxidativo em comparação com outros óleos. O gergelim contém uma alta porcentagem de antioxidantes, como sesamol, sesamina, sesamolina e sesaminol sendo rico em minerais como vitamina E, cálcio, magnésio e fósforo (PUSADKAR et al., 2015; MYINT et al., 2020).

Mundialmente a produção de gergelim ocorre de maneira mais centralizada na África, uma vez que a cultura é própria dos gêneros encontrados no continente africano, seguido da Ásia que apresenta uma vasta riqueza e variedades das espécies cultivadas (ARRIEL; BELTRÃO, 2014). Trata-se de uma cultura com rentabilidade e demanda no mercado externo, mas também em expansão para outros países onde é adotada, como no caso do Brasil (LIMA, 2020).

No ano de 2017, último censo agropecuário Brasileiro, o estado de Mato Grosso ocupou o primeiro lugar com produção de 3.901 toneladas, em uma área de 7.551 hectares. Em segundo lugar ficou Mato Grosso do Sul com produção de 200 toneladas, em uma área de 202 hectares. Os estados do Pará e Ceará se destacaram em terceiro e quarto lugar com produções de 155 e 99 toneladas em áreas plantadas de 170 e 264 hectares, respectivamente (IBGE, 2017). No entanto, a produção brasileira de gergelim, na safra 2021/22, possui estimativa de área plantada equivalente à 143,5 mil hectares e produção de 78,5 mil toneladas (CONAB, 2022).

Nos últimos dez anos a cultura tem despertado o interesse de produtores do Centro-Oeste e na região semiárida do Nordeste brasileiro, que tem condições edafoclimáticas propícias ao

cultivo de gergelim, no entanto há uma redução de água disponível, o que impõe restrições às safras agrícolas da cultura (SILVA, 2014; LIMA, 2020).

3.4 Condições de cultivo do gergelim

Segundo Arriel et al. (2006), a cultura do gergelim caracteriza-se por nível razoável de resistência às condições de baixa umidade e fertilidade do solo, nas quais é possível obter produtividades acima da média mundial. Apesar de cultivável em diversos tipos de solo, a planta atinge a plenitude em solos profundos, de pelo menos 60 cm, bem drenados e de boa fertilidade natural, francos do ponto de vista textural, desde franco-arenosos até franco-argilosos, descartando-se as texturas extremas.

Em solo brasileiro, o plantio dessa cultura ocorre especialmente nas propriedades do Nordeste em condições de sequeiro. A região também dispõe de águas salinas e tratando-se de uma cultura como o gergelim, deve-se levar em consideração que não tolera o pH do solo abaixo de 5,5 ou acima de 8,0, sendo extremamente sensível a salinidade e alcalinidade (GRILO JÚNIOR; AZEVEDO, 2013).

O gergelim extrai do solo quantidades elevadas de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), que variam conforme a produção, o estado nutricional e a variedade. Em geral a planta precisa de 50 kg/ha de N, 14 kg/ha de P_2O_5 e 60 kg/ha de K_2O para produzir 1.000 kg/ha de sementes (ARRIEL; BELTRÃO, 2014).

3.5 Comportamento fisiológico de plantas sob déficit hídrico

A escassez hídrica provoca alterações nas propriedades das membranas celulares, aumento da respiração, inibição da fotossíntese, menor produção de matéria seca, senescência prematura e, conseqüentemente, redução da produção (BELTRÃO, 2001; TAIZ et al., 2017).

As respostas das plantas às condições de déficit hídrico variam de acordo com a espécie, cultivar, tempo de exposição, fatores edáficos, entre outros (CARVALHO et al., 2016). Como resposta mais comum, a redução da produtividade, causada pela inviabilização do processo fotossintético é consequência das alterações na atividade de algumas enzimas, proteínas e no crescimento da planta (FERRAZ et al., 2014; SANTOS et al., 2022). Sob restrição de água no solo, as plantas apresentam ajustamento osmótico por meio da acumulação ativa de osmólitos compatíveis como um importante mecanismo de adaptação à seca (BABITA et al., 2010; OLIVEIRA NETO et al., 2016). Esse processo faz com que o acúmulo de solutos promova a

diminuição do potencial hídrico da planta e, conseqüentemente, garante a manutenção da turgescência por meio da absorção de água do solo, além de proteger as estruturas celulares e estimular o crescimento das raízes (GONZALEZ et al., 2010; MENDES et al., 2013).

Além da restrição na aquisição de nutrientes, o estresse hídrico provoca o estresse oxidativo, pois conduz a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (figura 1). Essas espécies atuam como mensageiros de vários processos celulares, incluindo a tolerância aos diferentes estresses ambientais, as quais dependem do equilíbrio entre sua produção e sua eliminação (SHARMA et al., 2012).

Para eliminar o excesso de EROs, as plantas apresentam sistemas enzimáticos antioxidantes e não-antioxidantes que constituem importante defesa primária contra os radicais livres gerados sob condições de estresse, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX), bem como a osmoproteção por solutos compatíveis e removedores de radicais livres, como a prolina (PRO) (SZABADOS; SAVOURE, 2009; LISAR et al., 2012; YANG et al., 2015).

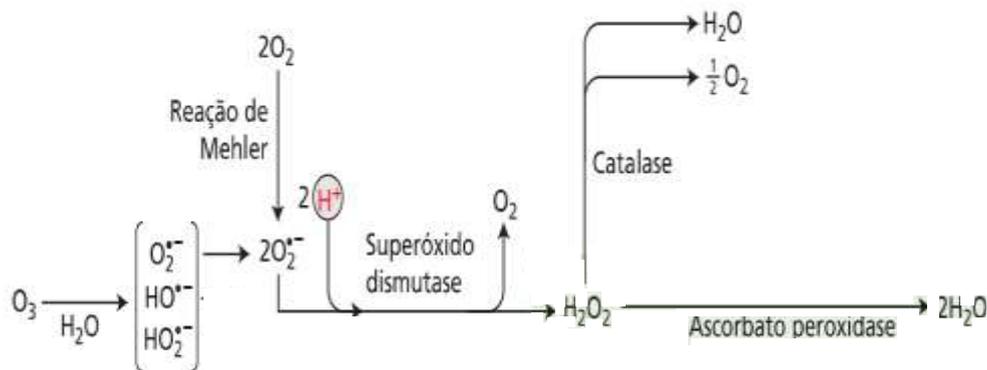


Figura 1. Rotas biosintéticas que regulam os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula em plantas sob condições estressantes. Fonte: JONES et al. (2013), com adaptações.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante intracelular onipresente em todos os organismos aeróbios e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo mediada por EROs. A SOD atua removendo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), catalisando sua dismutação à H_2O_2 . A reação mediada por esta enzima tem uma taxa mais rápida do que a dismutação espontânea, cerca de 10.000 vezes. Devido ao potencial desta enzima em catalisar a dismutação do radical superóxido à oxigênio molecular e H_2O_2 , esta enzima é considerada o antioxidante enzimático intracelular mais eficaz (GILL; TUTEJA, 2010; ZHANG et al., 2014).

A SOD promove a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 , o qual é decomposto por uma variedade de peroxidases em água, utilizando vários substratos redutores no cloroplasto

(ABOGADALLAH et al., 2010). Uma vez que as SODs são metaloproteínas, estas possuem diferentes isoformas, com base nas espécies metálicas presentes nos seus locais ativos. As isoformas mais comuns de SOD conhecidas na literatura são a superóxido dismutase contendo os seguintes elementos: cobre-zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD), ferro (Fe-SOD) e níquel (Ni-SOD) (ASHRAF, 2009). A SOD juntamente com a CAT é responsável pela inativação do radical superóxido ($O^{\bullet-2}$) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) respectivamente, e desse modo impedem a formação da configuração mais reativa de EROs, o radical hidroxila (OH.) (KAMAL et al., 2012).

As catalases têm uma função importante no sistema de defesa da planta contra o estresse oxidativo (ASHRAF, 2009). A reação típica da catalase é a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 para a água e O_2 ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (MHAMDI et al., 2010). A enzima catalase tem uma das maiores taxas de rotatividade dentre todas as enzimas: uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto. É importante na remoção de H_2O_2 gerado nos peroxissomas por oxidases envolvidos na β -oxidação dos ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo da purina (GILL; TUTEJA, 2010).

Além das catalases, o H_2O_2 pode ser desintoxicado das células por peroxidases, como por exemplo, a APX. As catalases apresentam uma menor afinidade a H_2O_2 em relação às peroxidases. Dessa forma, a CAT é sugerida por ser envolvido na eliminação em massa de H_2O_2 enquanto que as peroxidases estão envolvidas em uma regulação fina de H_2O_2 . Com base nas propriedades cinéticas da enzima, a remoção de grandes quantidades de H_2O_2 é uma função típica da CAT (ABOGADALLAH et al., 2010, MHAMDI et al., 2010). Catalases são produzidas principalmente nos peroxisomos e glioxissomos (ASHRAF, 2009). O principal local de ação CAT é conhecido por ser os peroxisomos onde o H_2O_2 ocorre, proveniente da fase da fotorrespiração (ABOGADALLAH et al., 2010). Como a CAT localiza-se predominantemente nos peroxisomos, uma atividade satisfatória desta enzima torna-se importante para metabolizar H_2O_2 proveniente da fotorrespiração, o qual, pode ser produzido em taxas mais elevadas em caso de déficit hídrico (NOCTOR et al., 2014).

Esta enzima exerce um papel vital na defesa da planta contra o estresse oxidativo por eliminação H_2O_2 em diferentes compartimentos celulares (ZHANG et al., 2014). APXs são as principais enzimas relacionadas com a eliminação de H_2O_2 no cloroplasto e citosol das células de plantas (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). São responsáveis por catalisar a oxidação do ácido ascórbico com o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$) originando o radical monodehidroascorbato (MDA) (GILL; TUTEJA, 2010). É uma enzima do ciclo ascorbato-

glutathiona, a APX reduz H_2O_2 e faz a desintoxicação utilizando ascorbato como um substrato doador de elétrons (NEHNEVAJOVA et al., 2012).

3.6 Genes expressos em plantas sob estresse hídrico

Entre vários estresses abióticos, a seca é o fator mais prevalente que limita a produção agrícola. As plantas respondem à seca por uma combinação de mudanças morfológicas, fisiológicas, celulares e bioquímicas. Os sinais ambientais relacionados à seca são primeiramente percebidos por receptores específicos que, após a ativação, iniciam cascatas para transferir sinais intercelulares para fatores de transcrição (FTs) que por sua vez ativam a expressão de conjuntos específicos de genes (Figura 2) (GUTTIKONDA et al., 2014).

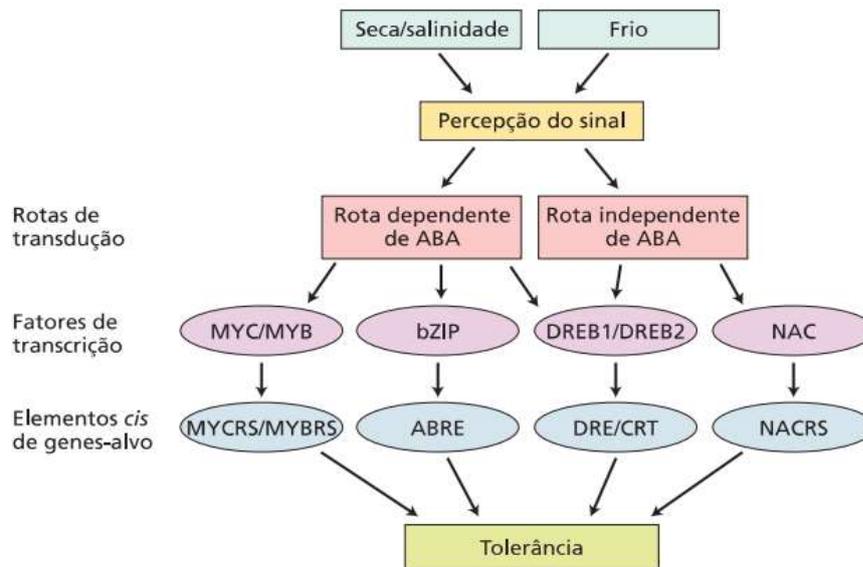


Figura 2. Exemplo de duas rotas de transdução de sinais, ativadas por estresses abióticos que usam quatro tipos de fatores de transcrição para ativar mecanismo de aclimatação. Fonte: LATA et al. (2011), com adaptações).

Os FTs são, portanto, bons candidatos à engenharia genética para melhorar a tolerância das culturas à seca devido ao seu papel como reguladores mestres de agrupamentos de genes (RABARA et al., 2014; DOSSA et al., 2016).

Nos últimos anos, muitas investigações foram realizadas para melhorar a compreensão sobre a base genética da tolerância à seca usando abordagens de genômica, transcriptômica e transgênese na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (RAMIREZ et al., 2009; LATA et al., 2011;

HARSHAVARDHAN et al., 2014). Esses estudos mostraram que os principais genes envolvidos na tolerância à seca foram os FTs. Em *Arabidopsis*, cerca de 1.500 FTs foram considerados envolvidos na resposta ao estresse abiótico, relacionados a seca: foram identificados FTs pertencentes ao zíper de leucina básico (HD-ZIP), AP2/EREBP, fator de ligação ABA (ABF), MYC, MYB, NAM, ATAF1-2, NAC, dentre outros (ABE et al., 1997; BARTELS e SUNKAR, 2005; SAKUMA et al., 2006; NAKASHIMA et al., 2014; DOSSA et al., 2016).

Entre os diferentes FTs, tem-se os membros de ligação aos elementos responsivos à desidratação (DREB), os fatores de transcrição DREB1 e DREB2, que pertencem ao grupo APETELA 2/Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo ao Etileno (AP2/EREBP), se ligam ao elemento responsivo à desidratação de ação cis (DRE) na região promotora de genes induzíveis ao estresse e regulam sua expressão em resposta a diferentes estresses abióticos (DOSSA et al., 2016).

O gene *DREB1* pode aumentar significativamente a resistência à seca e ao sal no trigo monocotiledôneo (JIANG et al., 2014; ZHOU et al., 2020). Em soja, foi confirmado no estudo de Chen et al. (2022) que a superexpressão de DREB1 aumenta significativamente a resistência à seca. Seja em trigo ou soja, a superexpressão de DREB1 pode regular a expressão de genes semelhantes, incluindo genes relacionados à biossíntese de melatonina e genes relacionados à resistência ao estresse.

Segundo Dossa et al. (2016) a expressão do gene *DREB1*, responsivo ao estresse hídrico em plantas de gergelim, foi mais marcante no material tolerante à seca em comparação ao sensível. Foi também realizado uma pesquisa BLASTp contra o genoma de *Arabidopsis* mostrando que o gene *DREB1* mais expresso no trabalho é o ortólogo de *CBF4* (AT5G51990) descrito como regulador da adaptação à seca em *Arabidopsis* (HAAKE et al., 2002), sugerindo que este gene desempenha papel fundamental na tolerância à seca em gergelim. Desde então, poucos acessos de gergelim têm sido investigados, portanto, esses genes deveriam ser mais estudados em uma grande amostra de materiais contrastantes para confirmar seu papel biológico na tolerância à seca em gergelim.

O FT Zíper de homeodomínio-leucina (HD-ZIP) pertence a uma família de FT bem caracterizada, relacionada com crescimento, desenvolvimento e respostas ao estresse em plantas (SHEN et al., 2019; MEHMOOD et al., 2022). A família é composta por genes extensos, conhecidos como homeobox (HB) (MUKHERJEE et al., 2006), é caracterizada por uma região altamente conservada (~60 sequência de aminoácidos) conhecida como homeodomínio (HD) para ligação específica de DNA e motivo menos conservado, chamado zíper de leucina (LZ) para interações proteína-proteína através de homo- e/ou hetero-dimerização (EBRAHIMIAN et al., 2017).

A HD-ZIP Classe I é caracterizado por um domínio HD altamente conservado, tem papéis cruciais no crescimento das plantas, desenvolvimento e nas respostas ao estresse abiótico. Além disso, também está relacionado com a estabilidade da membrana celular e sinalização do ácido abscísico (ABA) levando à redução do crescimento das plantas, especificamente sob estresse hídrico (EBRAHIMIAN et al., 2017; SONG et al., 2016).

Já a HD-ZIP classe II está particularmente envolvida no crescimento e desenvolvimento das plantas, e na resposta de auxina a estresse por seca. Já HD ZIP Classe III está principalmente envolvida no crescimento/desenvolvimento das plantas e nos processos de sinalização redox/luz (MUKHERJEE et al., 2006). Em contraste com as classes I e II, o papel da classe III é menos compreendido no estresse abiótico como seca, estresse salino e tratamento ABA. A Classe IV não tem papel no estresse abiótico, tem importância funcional na diferenciação celular, floração e desenvolvimento da cutícula (DING et al., 2017).

Existem 48 e 49 genes HD-ZIP em *A. thaliana* e arroz (*Oryza sativa* L.), respectivamente (MUKHERJEE et al., 2009; JAIN et al., 2008; AGALOU et al., 2008). Através da análise do genoma, membros da família de genes HD-Zip também foram identificados em muitas outras espécies de plantas, incluindo uva (*Vitis vinifera*) (JIANG et al., 2015), milho (*Zea mays*) (LESPINET et al., 2011) e soja (*Glycine max*) (ALI et al., 2014).

Wei et al. (2019) estudou sistematicamente a família de genes HD-Zip em gergelim e analisou suas relações filogenéticas, motivos conservados e estrutura gênica, bem como padrões de expressão em diferentes tecidos e em resposta a estresses abióticos. Como resultado, um total de 45 genes HD-Zip foram identificados no gergelim, e eles foram designados como *SiHDZ1* - *SiHDZ45* de acordo com suas localizações cromossômicas nos grupos de ligação do gergelim (LGs). O gene *SiHDZ7*, homólogo a *AtHB7* de *Arabidopsis* foi significativamente regulado por estresse de seca, indicando que esses genes podem regular a tolerância à seca através de uma via dependente de ABA.

À luz de pesquisas anteriores, a redução no alongamento celular e no crescimento da planta pode ser inferida com a regulação positiva de *SiHDZ7* em gergelim sob estresse hídrico. Muito provavelmente, esta redução no alongamento celular e subsequente tolerância à seca no gergelim pode ser devido à inibição da biossíntese de giberilinas (GA), como *AtHB12* ou sem a inibição da biossíntese de GA como *AtHB7* em *Arabidopsis*. Além disso, como *AtHB13* (*Arabidopsis*), *SiHDZ7* pode conferir tolerância à seca no estágio inicial de plântula, atuando como regulador positivo de outros FTs como NAC (*JUB1* ou seu homólogo) no gergelim (EBRAHIMIAN et al., 2017; MEHMOOD et al., 2022).

Assim, pode-se especular que SiHDZ7 pode funcionar de forma coordenada, alterando seus níveis de expressão gênica para ajustar os processos associado ao crescimento e estresse hídrico em gergelim (CAPELLA et al., 2014). No entanto, a análise funcional do SiHDZ7 é necessário para desenhar uma imagem melhor do gene ou da(s) rede(s) metabólica(s) envolvida(s) no estresse hídrico do gergelim (MEHMOOD et al., 2022).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Implantação e condução do experimento em casa de vegetação.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Algodão, localizada em Campina Grande, PB (07°13'S; 53°31'W) no período de setembro a dezembro de 2022. Foi utilizado a cultivar de gergelim BRS Morena cultivada em vasos de plástico com capacidade para 18 L, preenchidos manualmente com substrato solo fertilizado.

O solo foi previamente analisado no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Embrapa Algodão (Tabela 1), pelo método descrito por Silva (2009), corrigido com calcário dolomítico com o PRNT de 100% (Figura 3), fertilizado com nitrogênio (N) para o tratamento nitrogenado, distribuídos em duas aplicações, a primeira aos 10 dias após a emergência (DAE) e a segunda no início da floração (30 DAE), e na fundação com fósforo (P) e potássio (K) para os demais tratamentos, conforme recomendações de Gomes e Coutinho (1998) com base na análise do solo.

Tabela 1. Análise dos componentes físico-químicos do solo (Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, 2022).

Fertilidade do solo											
pH	Complexo Sortivo (mmolc/dm ³)							%	mmolc/dm ³	mg/dm ³	g/kg
	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺	K ⁺	S	H+Al	T				
5,1	9,1	6,9	0,9	2,1	19,0	33,0	52,0	36,5	3,0	3,2	15,8

pH – Concentração de hidrogênio em solução do solo; Ca⁺² - Cálcio; Mg⁺² - Magnésio; Na⁺ - Sódio; K⁺ - Potássio; S - enxofre; H+Al - Acidez potencial ou total; T – Capacidade de troca catiônica (CTC) subtraída da soma de bases (SB) mais o alumínio (Al); Al⁺³ – Acidez trocável; P – Fósforo; M.O. – Matéria orgânica.



Figura 3. Correção do solo com calcário dolomítico. Fonte: Autor (2021)

O genótipo de gergelim BRS Morena (BRS - sigla utilizada para caracterizar materiais provenientes de melhoramento genético liderado pela EMBRAPA) possui características voltadas para um potencial de produtividade: Porte mediano, ciclo de 90 dias, hábito de crescimento ramificado, início da floração aos 30 dias após a germinação, três cápsulas deiscentes por axila foliar, sementes com coloração marrom, peso médio de mil sementes de 4,22 mg, teor de óleo variando de 50 a 52%, tolerância à murcha de macrofomina, mancha angular e cercosporiose, potencial para 1.600 kg/ha de sementes em condições ideais de solo, água e manejo da cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, estabelecido por processo randômico em esquema fatorial 2 (regime hídrico-rega diária e suspensão temporária da rega) x 6 (fontes de variação), totalizando 12 tratamentos com 5 repetições. Os tratamentos foram caracterizados em: (i) manejo com nitrogênio químico (sulfato de amônio, SAM; 21% de N) com e sem aplicação de N (CN e SN); (ii) manejo com 4 inoculantes a base de bacilos (*B. subtilis* estirpe pant001, cedido pela empresa Geoclean, ESA 13, ESA 402 e M143, estirpes cedidas pela Embrapa Semiárido, Petrolina, PE).

As sementes de gergelim foram desinfestadas com etanol 100% por 15 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e por fim lavadas 10 vezes com água destilada estéril para retirada de qualquer tipo de resíduo (VINCENT, 1970).

A semeadura foi realizada no dia 30 de setembro de 2021 e foram semeadas dez sementes por vaso, após 10 dias da emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando-se apenas duas plantas por vaso (Figura 4). No início da floração (30 DAE) (R1) suspendeu-se a rega e foi estabelecido o estresse hídrico por 5 dias (Figura 5), mediante o fechamento estomático próximo a 90%, com o auxílio de um IRGA, quando se interrompeu o estresse e as plantas foram reidratadas. No período da suspensão da rega, apenas as plantas do controle foram irrigadas, mantendo-se a umidade QUANTOS % próxima à capacidade de campo.



Figura 4. Semeadura, emergência de plântulas e desbaste da cultivar BRS Morena em casa de vegetação. (A) Semeadura com auxílio de pinça; (B) Emergência das plântulas; (C) Plantas após 15 dias de emergência. Fonte: Autor (2021).



Figura 5. Plantas de gergelim em casa de vegetação, antes (A) e após (B) serem submetidas a um período de 5 dias de estresse hídrico. Fonte: Autor (2021).

4.2 Cultivo das bactérias e preparo dos inoculantes

As estirpes (ESA 13, ESA 402 e M143) foram estriadas em meio sólido LB (Luria Bertani), composto por caseína, extrato de levedura, triptona, NaCl e ágar (EMBRAPA, 1999) e incubadas por 24 horas a 28 °C. Em seguida, coletou-se uma colônia bacteriana de cada estirpe e inoculou-se em um tubo Falcon (50 mL) esterilizado, contendo 20 mL de meio líquido LB. As estirpes foram então incubadas em Shaker a 28 °C, 180 rpm, por 72 horas.

A densidade óptica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro a 540 nm. Uma alíquota de 1 mL de cada inoculante foi utilizada para mensurar as UFC mL⁻¹ das estirpes. Em uma centrífuga as alíquotas com os inoculantes foram colocadas sob rotação constante de 6000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de água destilada

esterilizada, após a solubilização do pellet coletou-se 1 mL do solubilizado e aferiu-se os valores em espectrofotômetro. Os inoculantes ficaram padronizadas em 1×10^9 células mL^{-1} . O pH dos inoculantes também foi analisado utilizando-se uma fita teste, conferindo pH 7 (neutro) para todos.

As sementes previamente desinfestadas foram colocadas em placas de Petri e imersas nos inoculantes. Após incubação por 10 minutos, as sementes foram distribuídas em covasfeitos manualmente no solo com aproximadamente 2 cm de profundidade, com auxílio de pinças (Figura 4). Para evitar contaminação as pinças foram trocadas a cada inoculante. Vale ressaltar que o solo foi regado algumas horas antes do plantio das sementes inoculadas para evitar que a alta umidade prejudicasse a associação das estirpes com as sementes.

4.3 Variáveis Agronômicas

Foram avaliadas as seguintes variáveis de crescimento no final do ciclo fenológico (85 DAE): altura de planta (cm), medida desde a base até o ápice da haste principal da planta utilizando-se uma trena métrica; diâmetro do caule com um paquímetro, número de cápsulas por planta; massa seca da parte aérea (g) e de raízes (g), determinadas pela secagem do material em estufa com circulação de ar forçada a $65 \text{ }^\circ\text{C}$, por aproximadamente 72 horas, até atingir massa constante, e pesagem em balança de precisão; e massa de 1000 sementes.

4.4 Trocas gasosas

As plantas de gergelim foram avaliadas no período da manhã entre 8:00 e 11:00 horas, durante a fase de déficit hídrico, utilizando um analisador portátil de fotossíntese (IRGA - Infra Red Gas Analyzer, modelo LCpro-SD), sem fonte artificial de carbono e com fonte luminosa artificial de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{m}^{-1}$. Foram avaliados as seguintes variáveis: condutância estomática (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); fotossíntese (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO_2 (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$). A partir dos dados obtidos foram calculadas a eficiência instantânea da carboxilação (EiC) entre A e Ci (A/Ci) e a eficiência instantânea do uso da água entre A e E (A/E) (MAGALHÃES FILHO et al., 2008).

Foram realizadas duas avaliações no período da suspensão hídrica (1D e 5D; “D=Dias”). Uma das finalidades das avaliações foi acompanhar o fechamento estomático, quando as plantas sob estresse hídrico atingiram próximo a 90% do fechamento estomático, a rega foi retomada.

4.5 Análise de nitrogênio em folha

A análise de nitrogênio total da parte aérea das plantas foi baseada no método de digestão sulfúrica desenvolvido por Kjeldahl e descrito por Bezerra Neto e Barreto (2011). Ao final do experimento, a parte aérea das plantas foi coletada, armazenada em sacos de papel kraft e colocada em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C por 72 horas, depois triturada em moinho. Uma alíquota do material vegetal seco (2 mg), 50 mg de sulfato de sódio, 0,5 mg sulfato de cobre (5%) e 5 mL de ácido sulfúrico foram misturados para a pré-digestão a frio em temperatura ambiente durante 12 horas, em seguida a solução foi aquecida em um bloco digestor a 350 °C até que toda matéria orgânica estivesse dissolvida e a solução clara. Uma alíquota de 1 mL do extrato digerido foi adicionada em um balão volumétrico (50 mL) contendo 40 mL de água deionizada, 1 mL de hidróxido de sódio (10%), 1 mL de silicato de sódio (10%) e 2 mL do reagente de Nessler, o volume foi completado com água deionizada para 50 mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm e a partir do teor de nitrogênio foi calculado o elemento acumulado na parte aérea, multiplicando o teor de nitrogênio pela massa seca da parte aérea, de acordo com Alcantara et al. (2014).

4.6. Análise de fósforo em folha

A análise de fósforo foi baseada pelo método descrito por Silva (2009). Ao final do experimento, a parte aérea das plantas foi coletada e colocada em estufa de circulação forçada a 65°C por 72 horas e depois triturada em moinho de facas. Uma alíquota de material vegetal seco (2 mg), 50 mg de sulfato de sódio, 0,5 mg sulfato de cobre (5%) e 5 mL de ácido sulfúrico foram misturados para a pré-digestão a frio em temperatura ambiente durante 12 horas, em seguida a solução foi aquecida em um bloco digestor a 350 °C até que toda matéria orgânica fosse dissolvida e a solução clara. Uma alíquota de 1 mL do extrato digerido foi adicionada a um balão volumétrico (50 mL) contendo 40 mL de água deionizada, 1 mL de hidróxido de sódio (10%), 1 mL de silicato de sódio (10%) e 2 mL do reagente de Nessler, o volume foi completado com água deionizada para 50 mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento a 660 nm.

4.7 Atividades enzimáticas

Uma amostra de folhas frescas foi coletada no quinto dia de restrição hídrica do experimento, imediatamente imersa em N₂ líquido e em seguida armazenada a -80 °C para posterior extração proteica. Para a extração de proteínas, 0,2 g das folhas foram maceradas em N₂ líquido e adicionados 3 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 100 mM, L-ácido ascórbico 1 mM e 4% de polivinilpirrolidona (PVP). A quantificação proteica foi feita pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro a 595 nm.

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método de Giannopolitis e Ries (1977) com 40 µL de extrato proteico foliar, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8, contendo EDTA 1 mM, metionina 13 mM, azul p-nitrotriazólio (NBT) 75 mM e 460 µL de riboflavina 1 mM. A solução resultante foi realizada em triplicata de amostras, exposta a luz fluorescente (75 W) e as mesmas condições no escuro, por 40 minutos e analisadas em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em atividade UA g MF⁻¹ correspondendo a 50% da inibição da redução do NBT.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Azevedo et al. (1998). Uma alíquota de 100 µL do extrato proteico foliar foi misturada a 2,9 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 contendo H₂O₂ 40 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm.

Para determinar a atividade da ascorbato peroxidase (APX), alíquotas de 50 µL do extrato proteico foliar foram adicionadas a 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo ácido ascórbico 5 mM, 100 µL de H₂O₂ 4 mM e analisada em espectrofotômetro a 290 nm, baseada no método de Nakano e Asada (1981).

4.8 Teor de Prolina livre total

Para o teor de prolina livre foi utilizada a metodologia descrita por Bates et al. (1973). Uma curva padrão de prolina foi preparada com uma solução estoque a 10 mM e uma padrão a 1 mM, sendo a padrão uma diluição do estoque de 1:10 (v/v) (1 mL da solução estoque + 9 mL de água destilada). Para a extração, 100 mg de tecido vegetal foi pesado em balança de precisão e armazenado a -80 °C, em seguida foi macerado com auxílio de um cadinho e pistilo acrescentando-se ácido sulfossalicílico (3%), 9 g do ácido foi homogeneizado em 290 mL de água destilada completando o volume final para 300 mL. Uma alíquota de 2 mL da solução resultante foi transferida para um microtubo de 2 mL e centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm

em temperatura ambiente, coletando-se em seguida o sobrenadante. A ninhidrina ácida (2,5 mg) foi dissolvida em 60 mL de ácido acético glacial P.A (99%) e 40 mL de ácido fosfórico 6 M, em agitador magnético com auxílio de um bastão magnético sob aquecimento de 40 °C por 5 minutos. A reação foi conduzida no escuro e no momento requerido para a utilização da mesma.

A marcha analítica deu-se sequênciamente submetendo as amostras a 100 °C, em tubos de ensaio. Uma alíquota de 1000 µL do sobrenadante foi utilizada para reagir com 1000 µL de ninhidrina ácida e 1000 µL de ácido acético glacial em um tubo de ensaio hermeticamente fechado e aquecido durante 1 hora a 100 °C, em seguida resfriado em gelo. A leitura procedeu-se adicionando 2 mL de tolueno para suspender o material orgânico o qual foi avaliado em espectrofotômetro a 520 nm. O volume final da solução compreendeu 5 mL (1 mL da amostra + 1 mL da ninhidrina + 1 mL do ácido acético + 2 mL do tolueno).

Os teores de clorofila a, b e total (a+b) e de carotenoides foram determinados a partir do método de extração em acetona 80% (LICHTENTHALER, 1987). Todo procedimento foi realizado na presença de luz verde, evitando assim a degradação da clorofila. Nessa metodologia, 200 mg do tecido vegetal foram macerados em N₂ líquido e depois solubilizados em 10 mL de acetona 80%. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e as seguintes absorvâncias (ABS) foram determinadas : 470; 646,8; 663,2; e 710 nm.

4.9 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para as análises de expressão gênica, no quinto dia de estresse (fechamento estomático próximo a 90%), folhas foram coletadas, imersas em N₂ líquido e armazenadas em deep freezer (-80°C). O RNA total de cada tecido foi extraído utilizando o Invisorb Spin Plant RNA Mini kit (Invitec), a integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e a concentração e pureza por espectrofotometria. Uma alíquota de 1 µg de RNA foi tratado com DNase I. A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega). Primeiramente, foi adicionado 10 µL de RNA total (1 µg) e 1 µL de Oligo dT₁₅ (0,5 µg µL) em um microtubo de 1,5 mL, e incubado à 70°C por 5 minutos. Em seguida foi realizada a reação de transcrição reversa nas seguintes condições: 5 µL da reação (RNA total + Oligo dT₁₅); 4 µL de 5X Reaction Buffer; 2,4 µL de MgCl₂ (25 mMol); 1 µL de dNTP (10 mMol); 2 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U µL) e ImProm-IITM RT (25 U µL) em um volume final de 20 µL. Finalmente, as amostras foram incubadas em termociclador: 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos.

4.10 Análise da expressão dos genes *DREB1* e *SiHDZ7* por RT-qPCR

As análises quantitativas em tempo real (RT-qPCR) foram conduzidas no termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (ThermoFischer) para amplificar fragmentos com aproximadamente 180 pb e em temperatura de anelamento de 60°C. Para cada reação foram utilizados 6 µL do GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,4 µL de cada oligo (10 µM) (Tabela 1), 1,0 µL de cDNA (diluído 1:20, v/v) e água para um volume final de 12 µL. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e por fim 72°C por 15 segundos. Os gráficos, curva de Melt e Cqs foram gerados automaticamente pelo termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (ThermoFischer) baseando-se no método de normalização com genes de referência, $\Delta\Delta Cq$ (LIVAK et al., 2001) e para análise do padrão gerado foi utilizado a quantificação relativa. Reações com o gene constitutivo actina foram realizadas como controle endógeno.

Tabela 2- Genes e sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos utilizados.

Gene	Sequência 5'→3'
<i>DREB 1D</i>	F- AGGGAGCCCAACAAGA
	R- TTAGCATTCGCAGACG
<i>SIHDZ7</i>	F- TCTAAGCAAATCGAGCAAGAG
	R- TCTGTCTACCTGGGTGAGC
<i>ACTINA</i>	F- CTGTCAACAGAATTGGGTG
	R- GCAACTGGGATGATATGG

4.11 Análises estatísticas

Para a estatística univariada os dados dos experimentos foram analisados usando o programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2014), submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para os tratamentos com os bacilos e o teste de student (T) ($p \leq 0,05$), para as condições hídricas. Os dados das variáveis originais foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk (Shapiro e Wilk, 1965).

Sobre a análise multivariada, quando os postulados de normalidade foram alcançados, os dados de cada variável foram padronizados para obter a variável Z com média nula ($\bar{X} = 0,0$) e variância unitária ($s^2 = 1,0$).

Os dados padronizados foram submetidos ao procedimento exploratório de Análise de Componentes Principais (ACP). A escolha dos Componentes Principais (CPs) foi baseada em autovalores superiores a um ($\lambda > 1,0$), que explicaram um percentual superior a 10% da variância total (HAIR JUNIOR et al., 2009). Os dados originais de cada CP foram submetidos à análise de variância multivariada (MANOVA) pelo teste de Hotelling. *statistica* v. 7,0 (Statsoft Inc., 2004) foi usado para realizar as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variáveis agronômicas

Durante o período de estresse hídrico (a partir dos 30 DAE, durante 5 dias), as plantas apresentaram sinais de murcha, folhas curvadas. A seca provoca aumento na pressão osmótica, resultando em uma diminuição na pressão de turgor celular. Se a seca continuar além do limite de murcha permanente, a planta pode sofrer danos irreversíveis e morte (PAMUNGKAS et al., 2022).

Ao analisar a altura (ALT) das plantas, não houve diferença estatística na condição “não irrigada” entre os todos tratamentos (Figura 6A). As plantas sob estresse hídrico, com nitrogênio e pant001 tiveram maiores médias para ALT, 150 cm e 156 cm, respectivamente. No entanto, as plantas sem aplicação de nitrogênio foram as menores, em média 125 cm. Logo, as plantas tratadas com os bacilos demonstraram uma interação positiva para a altura de planta, quando comparadas com o manejo sem nitrogênio.

Nos tratamentos com pant001, M143 e nitrogênio, as plantas não irrigadas obtiveram maiores médias quando comparadas ao seu respectivo tratamento na condição irrigada. Todavia, não houve diferença significativa.

Rizobactérias promotoras do crescimento de planta foram responsáveis por aumento na emergência e crescimento de algodão (HAFEEZ et al., 2004), milho (SHARMA; JOHRI, 2003) e feijão (OLIVEIRA et al., 2016), após inoculação com *B. subtilis*, fato que também pode ser observado para essa variável (ALT) no presente estudo. Os autores atribuíram tal resultado ao aumento na produção de fitohormônios pelas plantas.

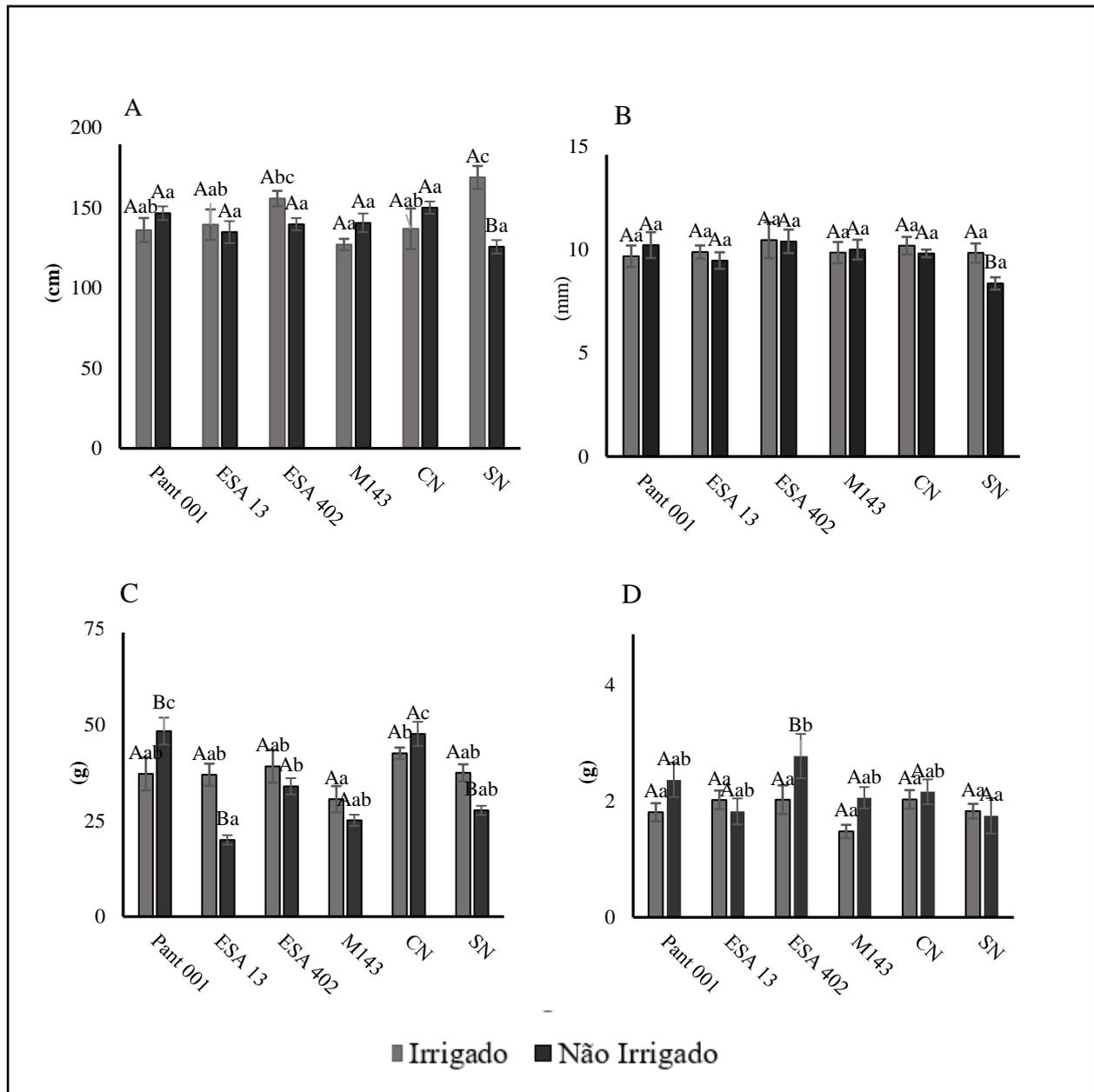


Figura 6. Variáveis agrônômicas: (A) Altura de planta (ALT); (B) Diâmetro do caule (DC); (C) Massa seca da parte aérea (MSPA); (D) Massa seca da raiz (MSR). Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.

Para o diâmetro caulinar (DC) (Figura 6B), em média todos os tratamentos tiveram plantas com 10 mm de espessura. Não houve diferença estatística entre os bacilos e o manejo com nitrogênio, nas condições irrigado e não irrigado. Todavia, as plantas sem nitrogênio e não irrigadas tiveram menor espessura, conseqüentemente diferiram estatisticamente do seu tratamento irrigado.

Em relação à massa seca da parte aérea (MSPA) (Figura 6C) na condição não irrigada, as plantas inoculadas com o pant001 tiveram a maior média (48 g). As plantas com nitrogênio, sob estresse, diferiram estatisticamente, com mais de 10% de aumento quando comparadas ao tratamento irrigado. Por outro lado, o tratamento não irrigado com ESA 13 obteve a menor MSPA com média de 20 g, o que corresponde a 50% de diminuição quando comparado ao tratamento irrigado.

Buchelt et al. (2019), avaliaram a inoculação do *B. subtilis* na cultura do milho em trabalho realizado a campo e observaram que a aplicação desse microorganismo aumentou a massa seca da parte aérea em aproximadamente 15%, dados semelhantes ao presente estudo. Isso provavelmente ocorreu devido ao maior tempo de contato do microorganismo com as raízes, aumentando a colonização, o que favoreceu o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Sobre a massa seca da raiz (MSR) (Figura 6D), o único tratamento que diferiu estatisticamente na condição de irrigação, foi com a estirpe ESA 402. Houve incremento de 27% na condição não irrigada. De modo geral, a maioria das plantas inoculadas com os bacilos aumentaram a MSR. Este resultado era esperado, já que aplicação do bacilos nas plantas provoca a indução da síntese e aumento do teor de fitohormônios, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas, o que favorece o crescimento radicular e o aumento do número de pelos radiculares, aumentando a massa radicular (ARAÚJO et al., 1999).

Quanto a produção de grãos, foram realizadas medidas de peso de 1000 sementes (PMS), número de cápsulas (NC) e peso total de sementes (PTS). No PTS, (Figura 7A) todas as plantas inoculadas com bacilos e com o nitrogênio químico, na condição não irrigado, produziram mais do que as plantas sem nenhum fertilizante. Os tratamentos ESA 402 (11 g), pant001 (12 g) e M143 (11 g) não diferiram estatisticamente entre as condições hídricas, porém na condição não irrigado obtiveram médias superiores.

Em relação ao NC (Figura 7B), os tratamentos pant001, ESA 402 e M143, obtiveram médias superiores na condição não irrigada, o que sugere que esses biofertilizantes podem ter ajudado na produção de cápsulas, mesmo a planta estando sob estresse hídrico. As plantas inoculadas com o pant001 tiveram um incremento de 21% na condição não irrigada, quando comparadas ao tratamento irrigado.

Kakhki (2020) estudou a inoculação de PGRP em sementes de gergelim e observou que a aplicação de biofertilizantes aumentou a produção de cápsulas nas plantas, o que corrobora com o nosso estudo. O autor afirmou que os micro-organismos no solo melhoram o crescimento das plantas através da produção e secreção de substâncias estimulantes do crescimento.

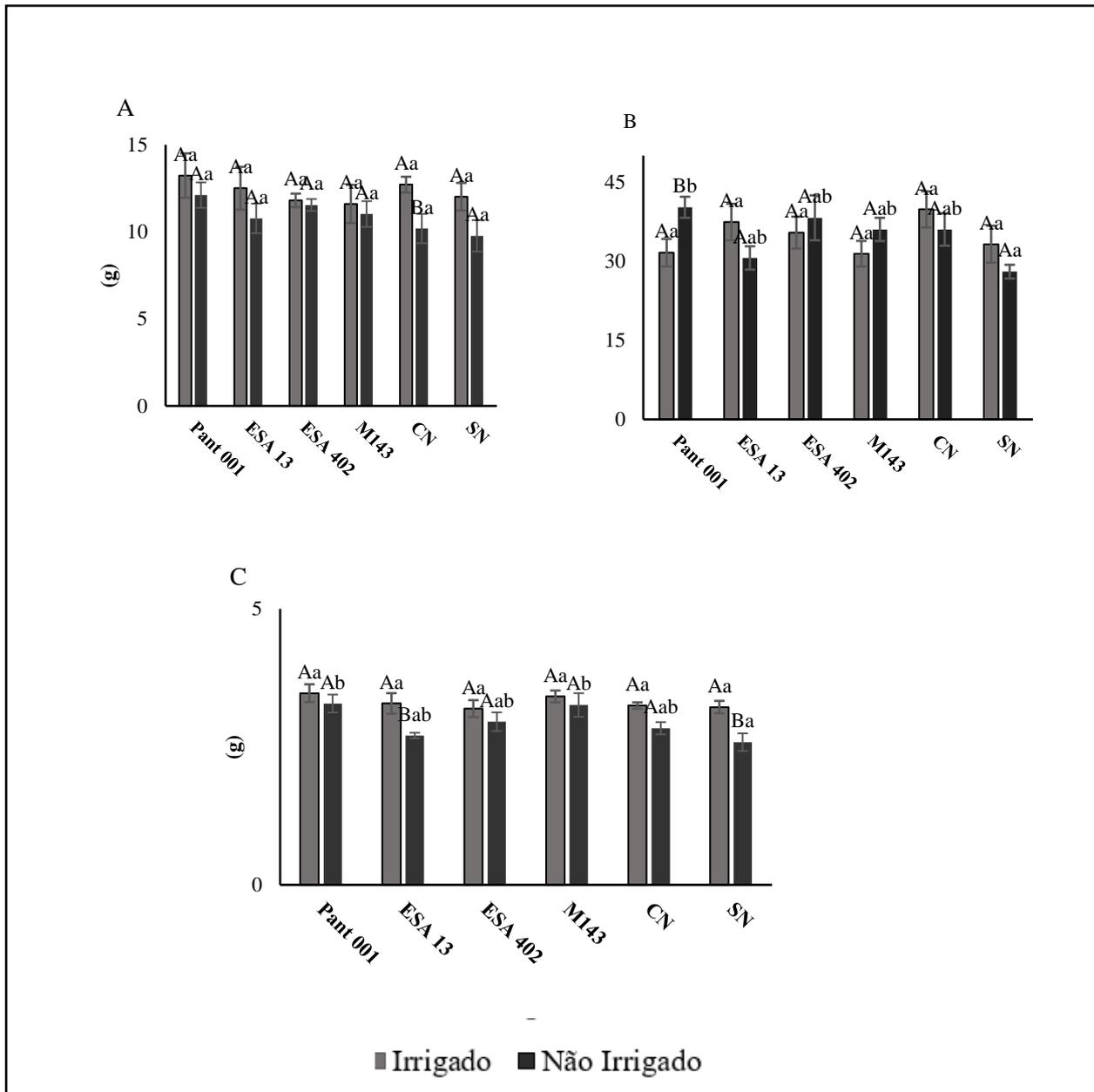


Figura 7. Variáveis agrônômicas: (A) Peso total de sementes (PTS); (B) Número de cápsulas (NC); (C) Peso de 1000 sementes (PMS). Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento

Ao analisar o peso de 1000 sementes (Figura 7C), os tratamentos com os biofertilizantes pant001, ESA 402 e M143 e com o nitrogênio químico, na condição não irrigada, não tiveram diferença estatística quando comparado a condição irrigada. Na condição não irrigada, os tratamentos tiveram os seguintes resultados: *B. Subtilis* (3,28 g); ESA 13 (2,70 g); ESA 402 (2,95 g); M143 (3,26 g); CN (2,84 g) e SN (2,58 g). Jadhav et al. (2015) avaliaram a fertilização com PGRP em gergelim e encontraram 2,87 g para a PMS. Campos et al. (2014) avaliaram as

características biométricas de plantas de gergelim e encontraram para a PMS 3,8 g. Esses resultados são indícios de que os inoculantes biológicos são capazes de manter as plantas sob condições de restrição hídrica e favorecer a produtividade de forma positiva, uma vez que as variáveis agrônômicas, além da produção, também foram favorecidas. Na tabela 3 está apresentado o resumo da análise de variância para PMS.

Tabela 3. Resumo do quadrado da altura de plantas (ALT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e peso de mil sementes (PMS) do gergelim BRS Morena inoculado com bacilos, sob restrição hídrica.

Fonte de variação	GL	Variáveis			
		ALT	MSPA	MSR	PMS
Regime Hídrico	1	290,4000	188,1864	0,5635	2,0350*
Tratamentos	5	302,0666	440,6816*	1,1639	0,3684*
Regime Hídrico X tratamentos	5	1255,4400*	176,1719*	0,1285	0,1073
Erro	48	225,7916	50,0077	0,7207	0,1053
CV (%)		10,58	19,91	18,32	10,40
Média Geral		142,03	35,51	2,15	3,12

*Significativo ($P \leq 0,01$).

5.2 Análise de nitrogênio e fósforo no tecido vegetal

Ao analisar o elemento químico, nitrogênio, em folhas (Figura 8A), no final do experimento, o tratamento com nitrogênio, em ambas as condições hídricas, foi o que teve maior concentração, diferindo estaticamente dos outros tratamentos, o que já era esperado, indicando que as plantas absorveram o elemento durante o desenvolvimento.

Outro tratamento que teve um aumento significativo do N em folhas foi o com pant001 sob condição não irrigada quando comparado à condição irrigada, esse incremento corresponde a 34%. Satapute (2012) e Hashem (2019) sugeriram que o *B. subtilis* pode ser explorado como inoculante de solo e pode ser usado para fixação de nitrogênio em solos com alta concentração de sal e em ambientes que gerem estresses abióticos.

Em relação ao elemento fósforo (Figura 8B), os tratamentos com pant001, ESA 13, ESA 402 e nitrogênio, tiveram diferença estatística quando comparada as condições hídricas. As plantas não irrigadas e inoculadas com pant001 tiveram maior concentração (0,45 dag Kg⁻¹), um aumento de 75%, comparada ao seu tratamento irrigado.

Walia et al. (2019) em estudo com tomates e aplicação de biofertilizantes contendo *B. subtilis*, observou um aumento de 57% no teor de fósforo. Para os autores o *B. subtilis* tem uma alta capacidade de melhorar o crescimento e o rendimento das plantas com base no aumento da capacidade das raízes de mobilizar e absorver nutrientes e substâncias para a aptidão reprodutiva geral das plantas.

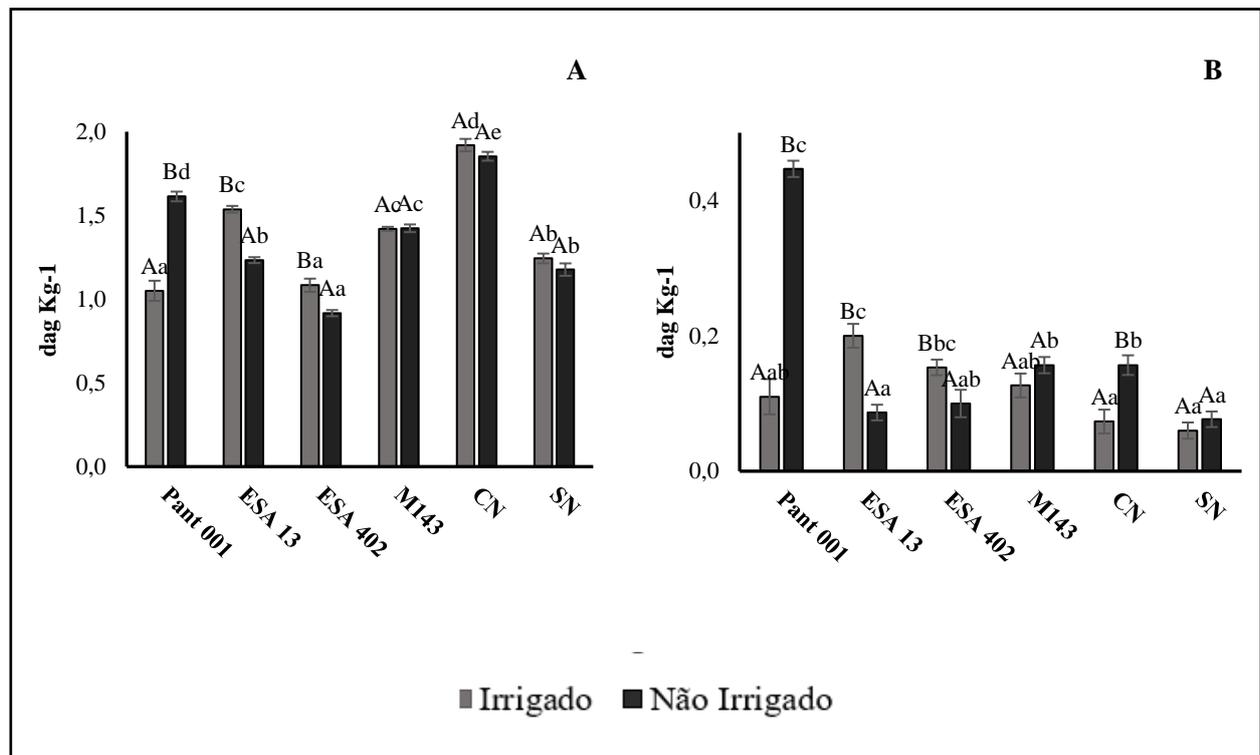


Figura 8. Acúmulo de nitrogênio (A) e fósforo (B) em folhas de gergelim inoculadas com bacilos, sob restrição hídrica. Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.

Tabela 4. Resumo do quadrado do teor de nitrogênio e fósforo do gergelim BRS Morena inoculado com bacilos, sob restrição hídrica.

Fonte de variação	GL	Variáveis	
		Teor de N	Teor de P
Regime Hídrico	1	0,0017	0,0215*
Tratamentos	5	0,5187*	0,0309*
Regime Hídrico X tratamentos	5	0,1183*	0,0355*
Erro	48	0,0030	0,0007
CV (%)		5,87	18,96
Média Geral		1,37	0,14

*Significativo ($P \leq 0,01$).

5.3 Respostas fisiológicas

Para o carbono interno (Ci) (Figura 9A), observou-se diferença significativa nos tratamentos com bacilos e com nitrogênio químico, quando comparados os regimes hídricos. Na condição não irrigada, o único tratamento que teve significância foi o ESA 402, em relação as plantas sem nitrogênio na mesma condição. Houve diminuição na Ci nas plantas não irrigadas, com pant001, ESA 13 e com nitrogênio.

Diminuições na Ci apresentam limitação estomática, pois quanto maior a abertura estomática, maior a difusão do dióxido de carbono para a câmara subestomática (TAIZ et al., 2017). Numa situação onde a taxa fotossintética é considerada menor, a concentração de CO₂ tende a ser maior, existindo uma relação inversamente proporcional entre Ci e taxa fotossintética (CONCENÇO et al., 2008). Logo, a assimilação do CO₂ é apenas um dos muitos fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento vegetal. A concentração do carbono interno (Ci) é um parâmetro que pode predizer o status fotossintético do vegetal. A maior concentração de CO₂ é um indício de que a fotossíntese está baixa ou inoperante, enquanto baixas concentrações de CO₂ sugerem o contrário.

Sob déficit hídrico, as plantas fecharam os estômatos, com redução drástica da condutância estomática para diminuir a perda de água (Figura 9B). Havendo diferença estatística em relação as condições hídricas. Este resultado foi acompanhado pela diminuição da taxa de transpiração e taxa fotossintética (Figuras 9C e D, respectivamente). Oliveira et al. (2017), ao investigarem a condutância estomática como indicador de estresse hídrico, relataram que a condutância possui estreita relação com o estágio fenológico, temperatura e transpiração. Plantas com menor condutância estomática possuem maior economia no uso da água.

No fator transpiração (Figura 9C), todas as plantas na situação não irrigada tiveram uma diminuição, quando comparadas a sua condição irrigada, diferindo estatisticamente. Mesmo sob estresse hídrico, as plantas inoculadas com o pant001 foi o que teve melhor valor, 1,42 mmol m⁻² s⁻¹. A transpiração é proporcional ao déficit de pressão de vapor de água na atmosfera e seu controle é feito pelo fechamento do poro estomático. Porém, o controle da transpiração está intimamente relacionado ao suprimento de CO₂ à folha, desse modo, a condutância pode variar ao longo do tempo de forma a garantir o mínimo de perdas de água para uma máxima assimilação de CO₂ (PIMENTEL, 2004).

Em relação a fotossíntese (Figura 9D), as plantas estressadas tiveram uma menor taxa fotossintética, o que já era esperado. No entanto, o pant001 conseguiu manter essas plantas na

mesma faixa das irrigadas, onde não houve diferença entre as condições hídricas, obtendo um maior valor (4,82) quando comparado aos outros tratamentos estressados. Na condição irrigada, o tratamento com M143, foi o que mais se destacou com valores em média de $21,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, esse valor correspondeu a 14% de incremento em relação as plantas irrigadas, sem nitrogênio.

Tiepo et al. (2018) observaram que inoculação de bacilos induziu a aumentos na taxa fotossintética e eficiência instantânea da carboxilação quando as plantas foram submetidas a seca moderada. De forma similar, Lima et al. (2019) observaram que cepas de *B. subtilis* foram capazes de atenuar o estresse hídrico em milho e feijão por meio da manutenção da taxa fotossintética similar às plantas sem déficit hídrico, uso mais eficiente da água e maior taxa de carboxilação instantânea.

A relação entre fotossíntese (A) e o carbono interno (Ci) implica na eficiência instantânea de carboxilação (EiC) (Figura 9E), pode se observar que houve diferença significativa entre todas condições hídricas, sob estresse hídrico. O tratamento com pant001 promoveu a melhor eficiência (0,02) em relação aos demais tratamentos. Já na condição irrigada, o M143, se destacou como o melhor, similar a fotossíntese. Este efeito benéfico sobre a EiC para plantas não está relacionada necessariamente a fatores estomatais, mas também a manutenção ou aumento na atividade das enzimas presentes no ciclo de Calvin, como a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RHO e KIM, 2017).

A eficiência de carboxilação, velocidade em que o CO_2 fixado é processado, é limitada principalmente pela quantidade e atividade enzimática e pela disponibilidade de CO_2 . A eficiência de carboxilação é influenciada por vários outros fatores: concentração do aceptor, temperatura, grau de hidratação do protoplasma, suprimento de substâncias minerais (especialmente fosfato) e grau de desenvolvimento e atividade da planta. Os fitohormônios, como o ácido abscísico que regula o fluxo iônico, também intervêm na eficiência de carboxilação (TAIZ et al., 2017).

Sobre a eficiência instantânea no uso da água (EUA) (Figura 9F), que é uma relação entre (A/E), apenas os tratamentos: ESA 402, M143, e sem N, diferiram estatisticamente das condições hídricas. Sob estresse hídrico, as plantas inoculadas com M143 e com pant001 foram as que tiveram melhores médias, 3,88 e 3,44, respectivamente. A EUA é de grande importância para a sobrevivência em condições de baixa disponibilidade, por ser um bom indicador para tolerância à falta de água (PIMENTEL, 2004). A diminuição EUA para a produção de massa fresca vegetativa e reprodutiva é decorrente da desproporcionalidade entre a produção de massa fresca e a quantidade de água fornecida às plantas (PEREIRA et al., 2019) e do fato da restrição hídrica diminuir a área foliar e conseqüentemente a taxa de transpiração (TAIZ et al., 2017)

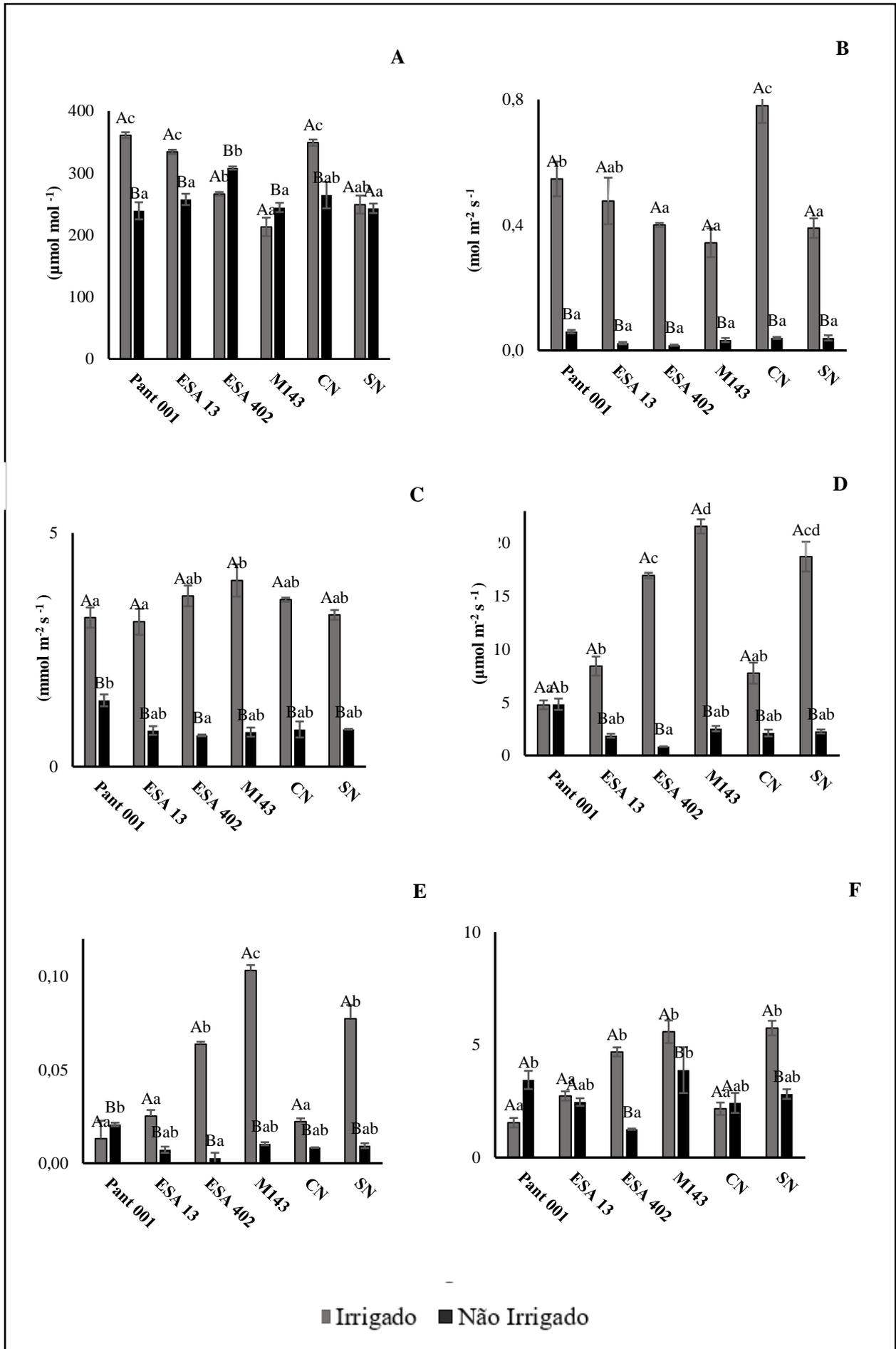


Figura 9. Análises fisiológicas em plantas de gergelim, submetidas a estresse hídrico. A) concentração interna de carbono (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); B) condutância estomática (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); C) transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); D) fotossíntese (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E) eficiência instantânea da carboxilação (EiC) a partir da relação (E/Ci); F) eficiência do uso da água (EUA) a partir da relação entre (A/E). Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídricos dentro de cada tratamento.

Todavia, os efeitos dos microrganismos sobre as trocas gasosas, em certa medida são difíceis de caracterização, tendo em vista que sua atuação na rizosfera pode gerar enzimas, hormônios, ácidos orgânicos e diversas substâncias que podem promover a bioativação do solo, alterar as comunidades microbianas e os atributos químicos do solo, os quais, em última instância pode afetar o metabolismo geral da planta (VACHERON et al., 2013; ETESAMI et al., 2017; AQUINO et al., 2019; SANTANA et al., 2020).

Tabela 5. Resumo do quadrado das respostas fisiológicas em plantas de gergelim, submetidas a estresse hídrico. A) concentração interna de carbono (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$); B) condutância estomática (Gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); C) transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); D) fotossíntese (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E) eficiência instantânea da carboxilação (EiC) a partir da relação (E/Ci); F) eficiência do uso da água (EUA) a partir da relação entre (A/E).

Fonte de variação	GL	Variáveis					
		Ci	Gs	E	A	A/Ci	A/E
Regime Hídrico	1	19548,15*	3,0962*	100,6733*	1352,35*	0,0251*	15,8826*
Tratamentos	5	10312,17*	0,0689*	0,2614	81,1601*	0,0029*	10,4941*
Regime Hídrico X tratamentos	5	11455,35*	0,0598*	0,6869	116,005*	0,0037*	10,2983*
Erro	48	562,27	0,0061	0,1534	2,7506	0,0000	0,8467
CV (%)		8,55	19,27	18,12	21,51	22,66	21,32
Média Geral		277,31	0,26	2,16	7,71	0,03	3,22

*Significativo ($P \leq 0,01$).

5.4 Análises Bioquímicas

Para a análise de prolina livre no tecido vegetal (Figura 10A), observou-se um aumento da concentração deste aminoácido em todos os tratamentos da condição não irrigada, diferindo estatisticamente da condição irrigada. A prolina é um aminoácido com importante papel no ajustamento osmótico, auxiliando na manutenção da integridade das membranas celulares contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio e na manutenção da turgescência celular (TAIZ et al., 2017), podendo ser acumulado na planta para proporcionar tolerância a estresses abióticos, principalmente o hídrico e salino (GIL; TUTEJA, 2010).

As plantas não irrigadas e tratadas com pant001 e nitrogênio químico, tiveram maior concentração de prolina, correspondendo a um incremento de 63% e 67%, respectivamente, quando comparada as plantas sem nitrogênio sob estresse hídrico. Pode-se inferir que este aumento, estimulou o mecanismo de osmorregulação, indicando que o gergelim acumula este aminoácido quando exposto a baixas quantidades de água, com o intuito de proteger as estruturas celulares dos danos provocados durante o período de estresse.

Gusain et al. (2015) investigou algumas estirpes de bacilos em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) sob diferentes níveis de estresse hídrico e relatou que a maioria das plantas inoculadas, em ambas cultivares avaliadas, apresentaram, maiores teores de prolina.

A análise bioquímica da atividade da SOD indicou uma concentração mais alta para os tratamentos sob o estresse hídrico, implicando um ajustamento das plantas ao déficit hídrico (Figura 10B), havendo também diferença significativa nessas condições hídricas. As plantas sob estresse hídrico, inoculadas com M143, obtiveram maior concentração da enzima, com um aumento de 50% quando comparada a condição irrigada. Corroborando com este resultado, Gholinezhad et al. (2020) observaram o mesmo comportamento em gergelim associado a inoculação micorrízica com restrição hídrica.

A SOD é considerada a enzima antioxidante intracelular mais eficaz, sendo onipresente em todos os organismos aeróbios e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo mediado por EROs. A SOD atua removendo o radical superóxido ($O\bullet^{-2}$) catalisando sua dismutação à H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010).

Sobre a atividade da APX (Figura 10C), apenas houve diferença estatística no tratamento ESA 13, quando comparado as condições hídricas. As plantas inoculadas com pant001 tiveram maiores médias, com incremento de 34%, comparada ao tratamento sem nitrogênio.

O aumento na atividade da APX mostrou a importância dos antioxidantes como mecanismo de defesa em resposta ao agravamento do déficit hídrico, prevenindo o estresse oxidativo

(NIKOLAEVA et al., 2017). Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam ativação de sistemas de defesa no gergelim, uma vez que as enzimas do mecanismo antioxidativo das plantas estão presentes em diferentes compartimentos celulares e contribuem efetivamente para o controle das EROs, o que confere a homeostase redox no sistema, destacando-se entre essas enzimas a APX, responsável pela remoção de peróxido de hidrogênio do sistema (GIL; TUTEJA, 2010).

A atividade da CAT (Figura 10D) foi maior nos tratamentos com pant001, com nitrogênio e sem nitrogênio, sem irrigação, diferindo estatisticamente da condição irrigada. Sob estresse, as plantas com ESA 402 foram as que tiveram menor concentração da enzima. A CAT é uma proteína que catalisa a detoxificação de H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração, a β -oxidação dos ácidos graxos das células e o catabolismo de purinas (GILL e TUTEJA, 2010; BARBOSA et al., 2014; TAIZ et al., 2017), convertendo o peróxido de hidrogênio a H_2O e O_2 sem a necessidade de um agente redutor para a remoção do H_2O_2 (SHARMA et al., 2012), o que pode favorecer maior eficiência na remoção de altas concentrações de H_2O_2 em estresse severo (DUBEY, 2011)

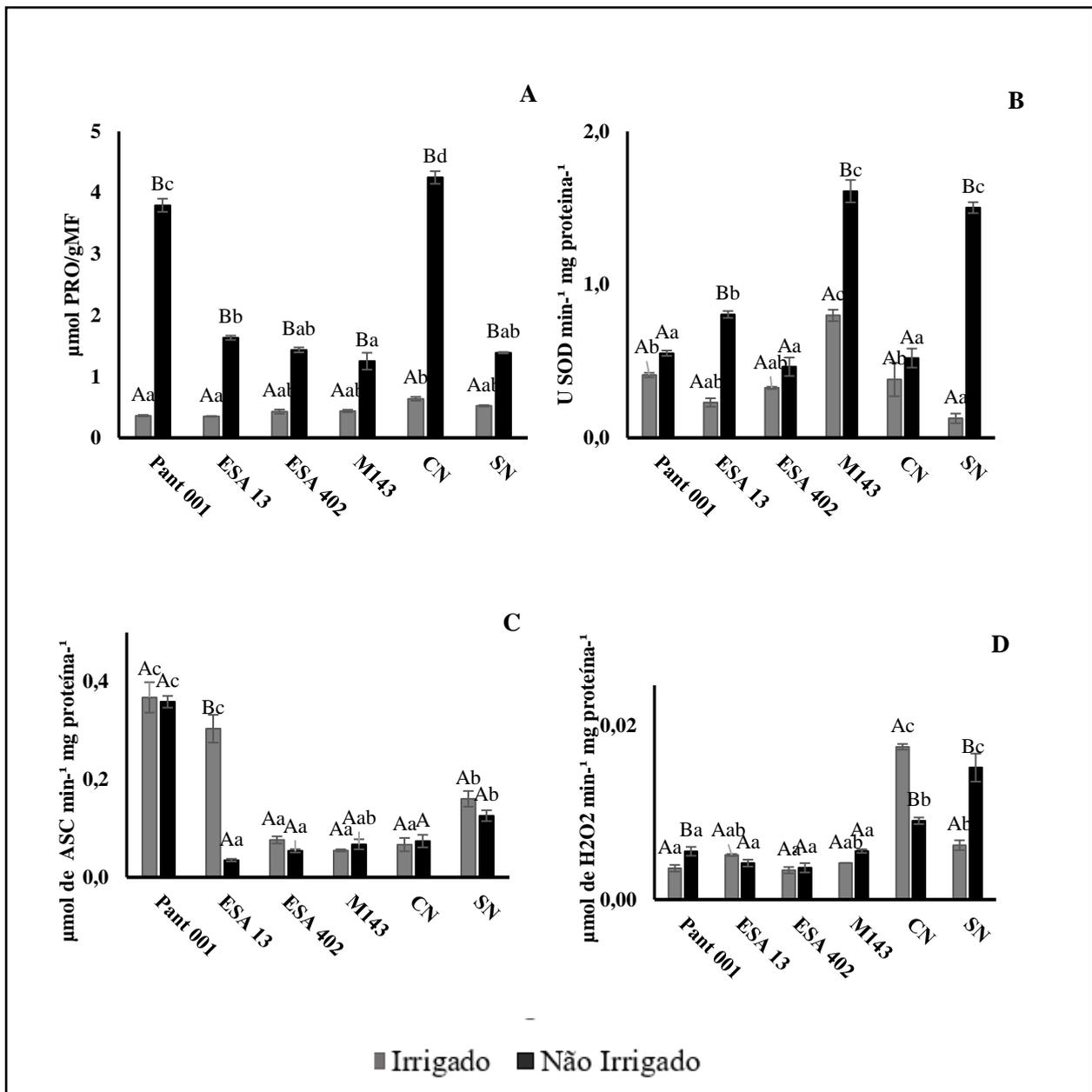


Figura 10. Concentração de prolina livre (A), SOD- Superóxido dismutase (B), APX- Ascorbato peroxidase e catalase (CAT) em função do déficit hídrico em plantas de gergelim. Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídrico dentro de cada tratamento.

Apesar da restrição hídrica, os tratamentos com pant001, M143 e com nitrogênio, mostraram uma interação positiva aumentando a concentração de clorofila *a*, *b* e totais (Figura 11A, B e C, respectivamente). Na condição irrigada, o melhor tratamento, para os três tipos de

clorofilas, foi com ESA 402, tendo um aumento em torno de 55% em relação as plantas sem nitrogênio.

As clorofilas são pigmentos verdes fundamentais no processo fotossintético, uma vez que são responsáveis pela absorção e conversão da radiação luminosa em energia (ATP e NADPH) no ciclo biológico das plantas (LARCHER, 2000). Portanto, a maior concentração desses pigmentos nas plantas submetidas ao déficit hídrico representa maior capacidade de tolerância ao estresse por causa da relação intrínseca entre clorofilas, potencial fotossintético e produtividade (O'NEILL et al., 2006).

Kim e colaboradores (2017) investigaram a interação de bacilos com plantas de soja submetidas à salinidade e observaram um aumento no teor de clorofila, o que refletiu no bom funcionamento e manutenção do aparelho fotossintético. Além disso, essa alta concentração de clorofila encontrada sugere mais centros de reação, conseqüentemente uma maior captação de luz, logo, a plastoquinona é altamente oxidada e assim seguirá o fluxo de transporte de elétrons e uma maior produção de ATP obtidos na respiração, promovendo o crescimento das plantas (SAMANIEGO-GÁMEZ et al., 2016).

Sobre a concentração de carotenóides (Figura 11D), observou-se que a maioria das plantas sob déficit hídrico aumentaram a produção deste pigmento, havendo diferença significativa entre as condições hídricas. O tratamento com pant001 foi o que teve melhor média, quando comparado aos demais tratamentos não irrigados.

No trabalho de Kumar et al. (2021), a inoculação de *Bacillus* sp. apresentou adaptação positiva e melhor desempenho de crescimento do arroz em comparação ao não inoculado em condições semelhantes. O teor de carotenóides que é considerado uma parte importante do transporte de elétrons e fotossíntese nas folhas.

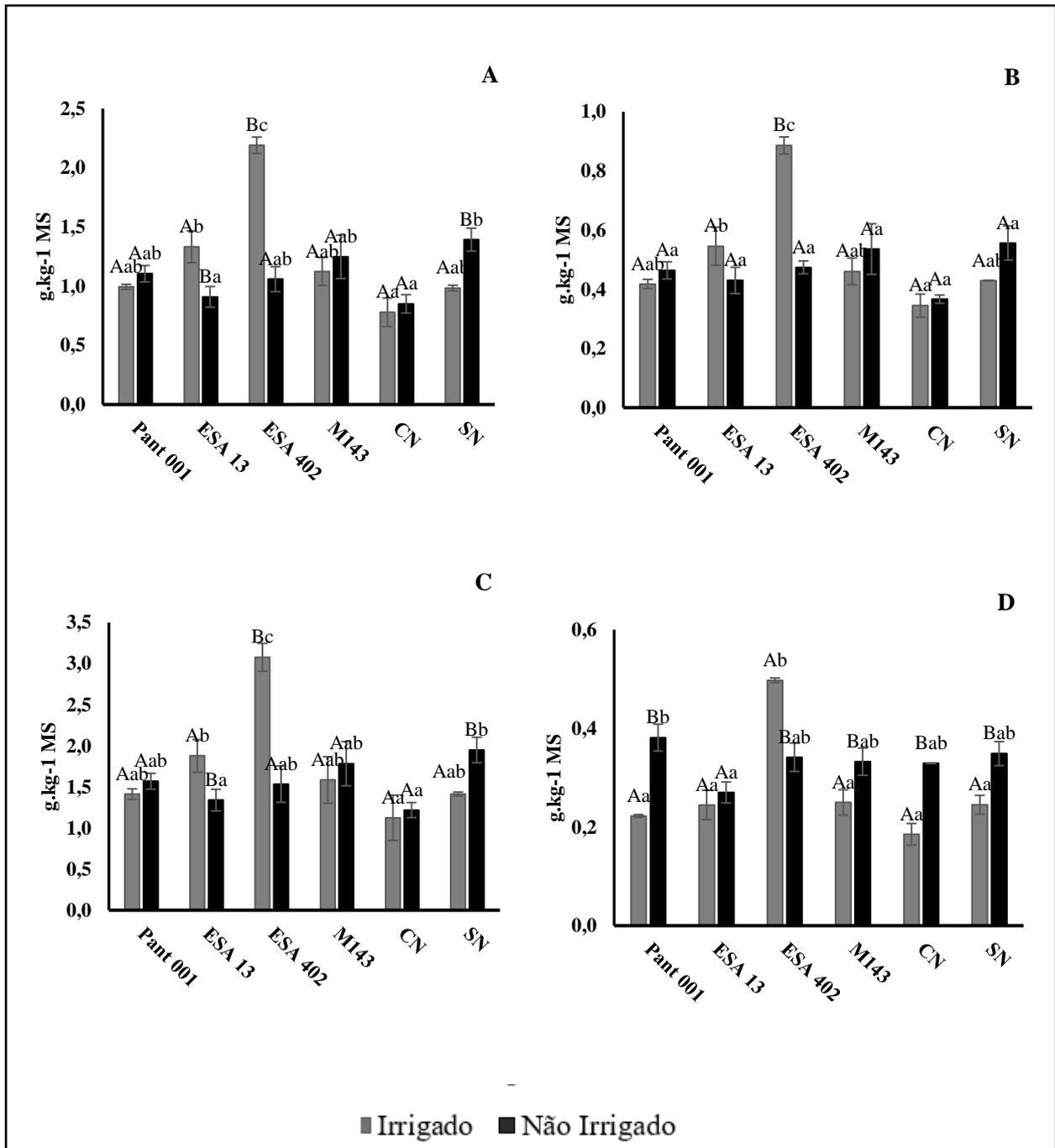


Figura 11. Análise de pigmentos fotossintéticos clorofila a (A), b (B), clorofila total (C) e carotenoides (D) em plantas de gergelim inoculadas com bacilos e sob condição de déficit hídrico. Obs.: Letras minúsculas comparam os tratamentos; letras maiúsculas comparam os regimes hídrico dentro de cada tratamento.

5.5 Análises moleculares

Durante o estresse hídrico, algumas proteínas podem ser reguladas negativa ou positivamente. Aquelas induzidas durante a seca protegem as plantas na adaptação ao estresse e aumenta a resistência. Assim, muitos estudos têm se dedicado em caracterizar e compreender esses genes, neste trabalho foram selecionados dois: *DREB1D* e *SIHDZ7* (Figura 12), ambos apresentaram alta expressão na maioria dos tratamentos sob estresse hídrico.

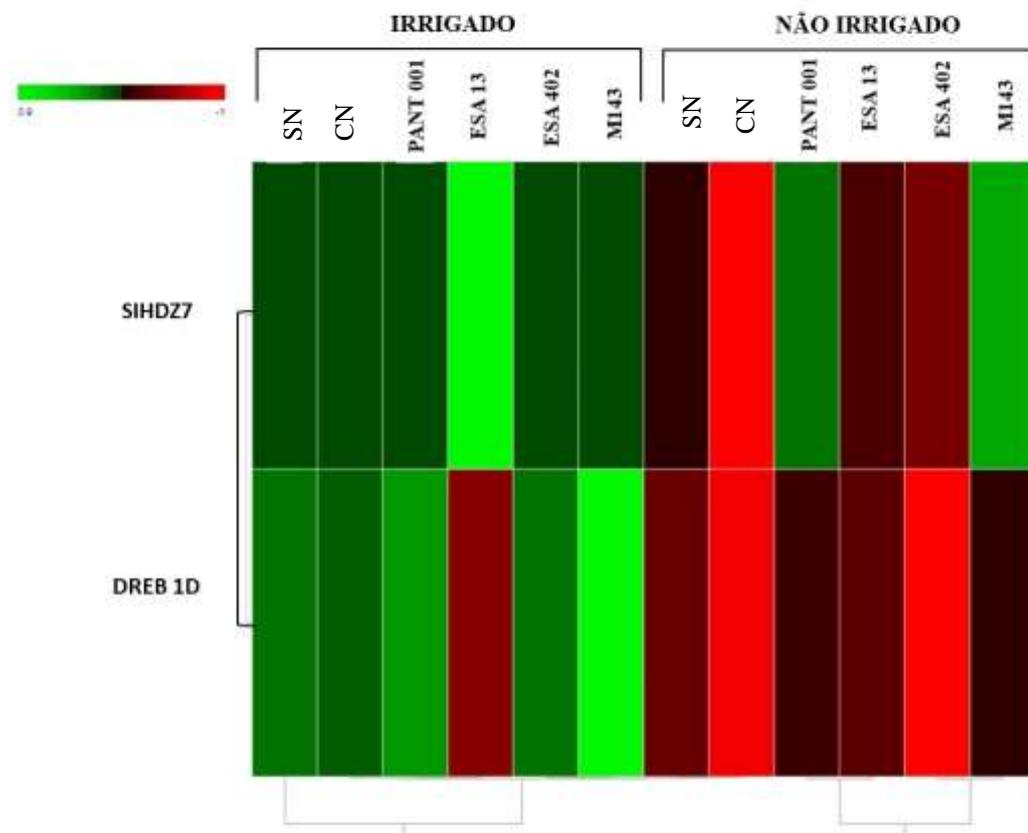


Figura 12. Padrão de expressão tecido-específico dos genes *DREB1D* e *SIHDZ7* no 5º dia de déficit hídrico em plantas de gergelim (90% de fechamento estomático), inoculadas com estirpes de bacilos. CN- com nitrogênio; SN- sem nitrogênio.

Os genes de ligação ao DRE - *DREB1* e *DREB2* - são FTs que se ligam à região promotora de genes responsivos à desidratação, desta forma induzindo sua expressão em resposta a diferentes estresses abióticos (DOSSA et al., 2016).

Todas as plantas sob condição de déficit hídrico apresentaram uma expressão significativa do gene *DREB 1D* (Figura 13A), as inoculadas com a estirpe ESA 402, foi o tratamento que obteve maior expressão, sendo oito vezes maior que o tratamento não irrigado, sem nitrogênio. Outro tratamento que teve alta expressão foi com nitrogênio químico, na condição não irrigado, apresentando uma expressão seis vezes maior que o tratamento sem nitrogênio na mesma condição.

Segundo Dossa et al. (2016) a expressão do gene *DREB1*, responsivo ao estresse hídrico em plantas de gergelim, foi mais marcante no material tolerante à seca em comparação ao sensível, sugerindo que este gene desempenha papel fundamental na tolerância à seca em gergelim. Em soja, foi confirmado no estudo de Chen et al. (2022) que a superexpressão de *DREB1* aumenta significativamente a resistência à seca.

Bandeppa et al. (2019) estudando inoculação de *Bacillus* sp., em plantas de mostarda sob condições de déficit hídrico, observou aumento na expressão de genes tolerante a seca como o *DREB 1*, logo aumentou da expressão desses genes mediado por rizobactérias, conferindo à planta tolerância à seca através do aumento da expressão de fatores de transcrição envolvidos na via de tolerância ao estresse independente de ABA.

Ambos os tratamentos ESA 402 e nitrogênio também obtiveram aumento no teor de prolina (Figura 10A) o que pode indicar que este gene também esteja associado a produção de osmoprotetores, ajudando a mitigar os estresses abióticos como a seca. Estudos anteriores em arroz demonstraram que a superexpressão de genes *DREB* resultou na melhora da tolerância a condições estressoras e também no acúmulo de osmoprotetores como a prolina (ITO et al., 2006) Isso indica possíveis novas funções deste gene que desempenha papel essencial na tolerância ao estresse abiótico em plantas e pode ser um excelente candidato para a engenharia de melhoramento de gergelim com melhor tolerância ao estresse hídrico.

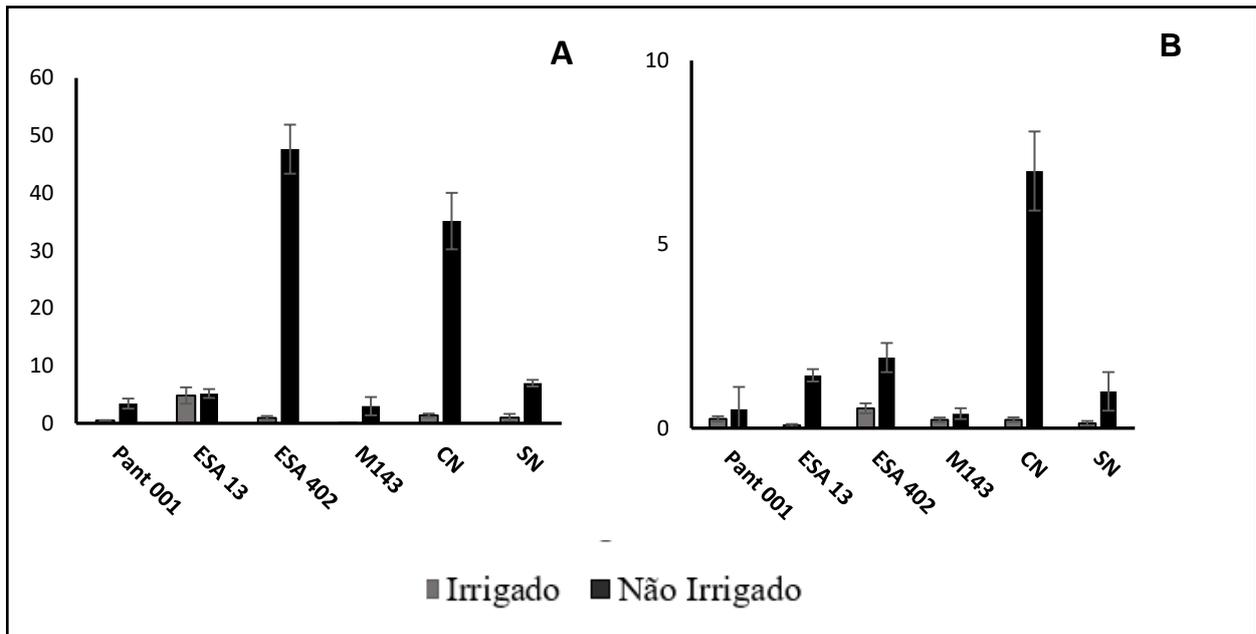


Figura 13. PCR em tempo real do gene *DREB 1D* (A) e *SiHDZ7* (B) em plantas de gergelim sob estresse hídrico e inoculadas com estirpes de bacilos. CN- Com nitrogênio; SN- sem nitrogênio.

As proteínas Homeo-Leucine Zipper (HD-Zip) são uma classe de fatores de transcrição exclusivos das plantas superiores e estão envolvidas nas respostas ao estresse das plantas e na regulação do crescimento e desenvolvimento (EBRAHIMIAN et al., 2017)

O gene *SiHDZ7*, homólogo a *AtHB7* de *Arabidopsis*, foi significativamente expresso, em todas as plantas estressadas (Figura 13B). As plantas com nitrogênio tiveram maior expressão, sendo sete vezes maior que as plantas sem nitrogênio, na condição não irrigada. O tratamento com ESA 402 e ESA 13, também obtiveram aumento significativo

Jiao et al. (2022) observaram aumento significativo na expressão do gene *HDZ7* em plantas de milho sob condição de seca, os autores afirmaram que o gene pode promover o crescimento das raízes e as atividades de uma série de enzimas de eliminação de ROS. Além disso, a superexpressão ativou a expressão de genes críticos na via de sinais de ROS e via dependente de ABA sob tolerância à seca. O que corrobora com este trabalho, no qual foi observado que a concentração de SOD (Figura 10) foi aumentada no mesmo tratamento em que o gene *SHDZ7* foi altamente expresso.

Os resultados deste trabalho mostraram-se promissores em relação aos objetivos propostos e podem ser utilizados como base para nortear outros estudos em campo, sabendo-se previamente do comportamento do genótipo de gergelim (BRS Morena) em relação a inoculação com os bacilos sob restrição hídrica. O resumo das variáveis agrônômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares está descrito na Figura 14, onde pode se observar o aumento ou diminuição da variável comparada ao tratamento sem nitrogênio não irrigado.

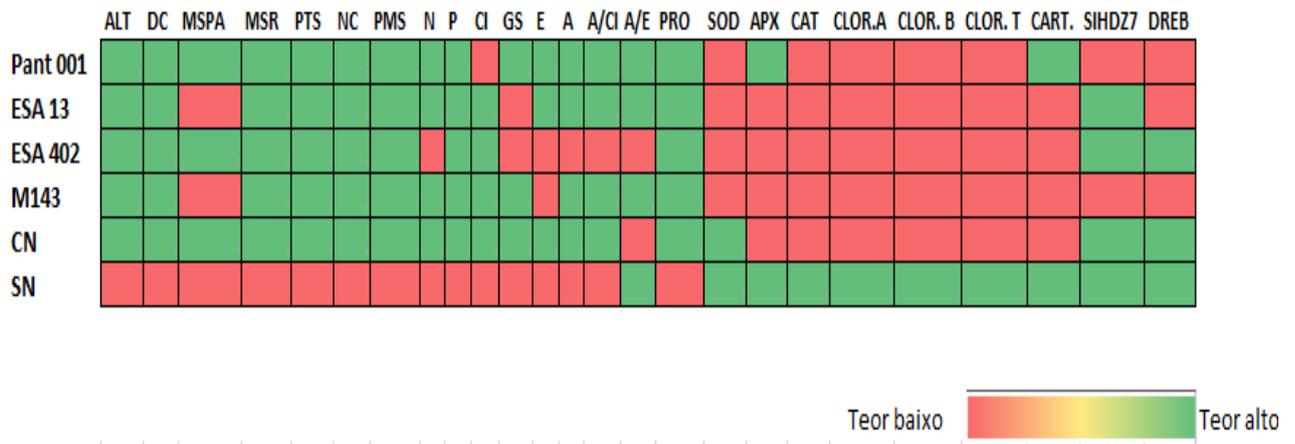


Figura 14. Resumo do comportamento das variáveis agrônômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em gergelim, inoculado com bacilos e submetidos a restrição hídrica. Os resultados foram comparados ao tratamento sem nitrogênio não irrigado. ALT- Altura de plantas, DC- Diâmetro caulinar, MSPA- Massa seca da parte aérea, MSR- massa seca raiz, NC- Número de cápsulas, PTS- Peso total de sementes, PMS- peso 1000 sementes, N- nitrogênio, P- Fósforo, Ci- Carbono interno, gs- Condutância estomática, A/E – Eficiência do uso água, A/Ci – Eficiência da carboxilação, A- Fotossíntese, E- Transpiração, SOD- Superóxido dismutase, PRO- Prolina, APX- Ascorbato peroxidase, CAT- catalase, CLa- Clorofila A, CLb- Clorofila B, CLt- Clorofila totais, CRT- Carotenóides.

5.6 Análise estatística multivariada

Quatro CPs (componentes principais) com $\lambda > 1$ e $\sigma^2 > 10\%$ foram formados a partir da combinação linear das 18 variáveis originais devido à frequência de irrigação (IR) e inoculantes (IN) com 78,74% do total de σ^2 . CP₁ representa 26,81% de σ^2 , composto pela combinação de Clb, Clb, Clt, A/E, A/ci, A, E, PRO. CP₂ representa 22,86% de σ^2 , formado por ALT, PTS, Ci, gs, SOD, CRT. PC₃ representa 16,61% de σ^2 composto DC, MST, PSR, NC, CRT. PC₄ representa 11,40% composto apenas por Ci. As variáveis PMS, CAT, APX, N e P não coincidiram em nenhum CP e, portanto, foram excluídas da APC para serem avaliadas por uma análise univariada. Houve interação significativa entre os fatores IR, IN e a interação IR x IN nos quatro CPs (resultados da MANOVA) (Tabela 4).

Na projeção bidimensional dos dois primeiros CPs (Figuras 15A-B), pode se observar que às condições de irrigação diferiram estaticamente. Para o CP₁ houve diferença nos tratamentos não irrigado com nitrogênio (NI-CN), e não irrigado com ESA 402 (NI-E402), quando comparados ao

tratamento não irrigado sem nitrogênio (NI-SN). Entretanto, todos os tratamentos da condição não irrigada, desencadearam processos bioquímicos como o aumento do teor de prolina (PRO). Para a condição irrigada, as plantas inoculadas com a estirpe ESA 402, proporcionaram um aumento nos pigmentos fotossintéticos (Cla, Clb, Clt) e também um incremento na eficiência do uso da água (A/E).

O aumento de prolina estimula o mecanismo de osmorregulação, indicando que o gergelim acumula este aminoácido quando exposto a baixas quantidades de água, com o intuito de proteger as estruturas celulares contra danos provocados durante o período de estresse. Gusain et al. (2015) investigou algumas estirpes de bacilos em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) sob diferentes níveis de estresse hídrico e relatou que a maioria das plantas inoculadas, em ambas cultivares avaliadas, apresentaram maiores teores de prolina.

A alta concentração de pigmentos fotossintéticos encontrada neste trabalho sugere mais centros de reação, conseqüentemente uma maior captação de luz, logo, uma maior produção de ATP obtidos na respiração, promovendo o crescimento das plantas (SAMANIEGO-GÁMEZ et al., 2016).

Para o CP₂, (Figura 15A, B) observou-se que para as plantas não irrigadas inoculadas com o pant001 (NI-P1) e ESA 402 (NI-E402) diferiram do tratamento NI-SN. Nas plantas não irrigadas com a estirpe M143 (NI-M43) e NI-P1 houve incremento na concentração de carotenoides. Entretanto, nas plantas estressadas, o tratamento NI-P1 foi o que obteve maiores médias nas variáveis agronômicas (ALT, DC, NC, PTS, PR e MST) quando comparado ao tratamento NI-SN. Para a condição irrigada o tratamento com nitrogênio (I-CN), proporcionou as plantas uma maior produção de sementes (PTS).

Segundo Samaniego-gámez et al. (2016) os carotenoides são menos sensíveis a queda de valores sob estresse hídrico que as clorofilas, o que corrobora com o presente trabalho. A menor suscetibilidade dos carotenoides ao estresse hídrico pode estar ligada a função protetora nos centros de reação do PSI e PSII. Além de absorver a energia luminosa em excesso para direcionar para os centros de reação, eles protegem contra danos causados pela luz e pelo oxigênio, diminuindo a formação das EROS (TAIZ et al., 2017).

Para o CP₃, (Figura 15C, D), pode se observar que os tratamentos NI-P1 e NI-CN diferiram dos demais tratamentos da condição não irrigada, essas plantas tiveram incrementos significativos nas variáveis NC, ALT, MST, PR, proporcionando um melhor incremento do inoculante no aspecto agronômico para as plantas estressadas.

A inoculação de PGPR em sementes de gergelim aumenta a produção de cápsulas nas plantas, os micro-organismos no solo melhoram o crescimento das plantas através da produção e

secreção de substâncias estimulantes do crescimento (KAKHKI et al., 2020). Em culturas como o milho, Sharma & Johri (2003) observaram que a aplicação desses microrganismos aumentou a massa seca da parte aérea e altura das plantas em aproximadamente 15%. Os autores atribuíram tal resultado ao aumento na produção de fitohormônios pelas plantas.

Tabela 6. Correlação entre variáveis originais e componentes principais, autovalores, variância explicada e acumulada e probabilidade de significância do teste de hipótese nos quatro primeiros componentes de interação principais (PCs 1, 2, 3 e 4) entre níveis de irrigação e inoculantes com bacilos em plantas de gergelim.

Variáveis analisadas	Componentes Principais			
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄
ALT- Altura de plantas	-0,18	-0,28*	0,56	-0,33
DC- Diâmetro caulinar	-0,13	-0,32	0,54*	-0,09
MST- Massa seca total	-0,00	-0,48	0,57*	-0,28
PR- Peso seco raiz	0,30	-0,19	0,71*	-0,09
NC- Número de cápsulas	0,09	-0,43	0,66*	-0,12
PTS- Peso total de sementes	-0,17	-0,59*	0,27	0,16
Ci- Carbono interno	0,22	-0,66*	0,08	0,67*
gs- Condutância estomática	-0,44	-0,75*	-0,19	0,32
A/E – Eficiência do uso água	-0,70*	0,19	-0,11	-0,58
A/Ci – Eficiência da carboxilação	-0,81*	-0,11	-0,28	-0,45
A- Fotossíntese	-0,87*	-0,23	-0,22	-0,35
E- Transpiração	-0,72*	-0,60	-0,21	0,09
SOD- Superóxido dismutase	0,27	0,69*	-0,19	0,06
PRO- Prolina	0,57*	0,28	0,36	-0,44
CLa- Clorofila A	-0,71*	0,48	0,36	0,36
CLa- Clorofila B	-0,69*	0,49	0,37	0,37
CLt- Clorofila totais	-0,71*	0,48	0,36	0,36
CRT- Carotenóides	-0,30	0,66*	0,63*	0,05
λ – Autovalores	4,83	4,11	3,13	2,05
S ² (%) – Variância explicada	26,81	22,86	17,41	11,40
S ² (%) – Variância acumulada	26,81	49,67	67,08	78,48
MANOVA	Probabilidade de significância (p)			
Teste de Hotelling para fator irrigação (IR)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Teste de Hotelling para fator inoculantes (IN)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Teste de Hotelling para interação (IR X IN)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

*Variáveis consideradas na formação do PC.

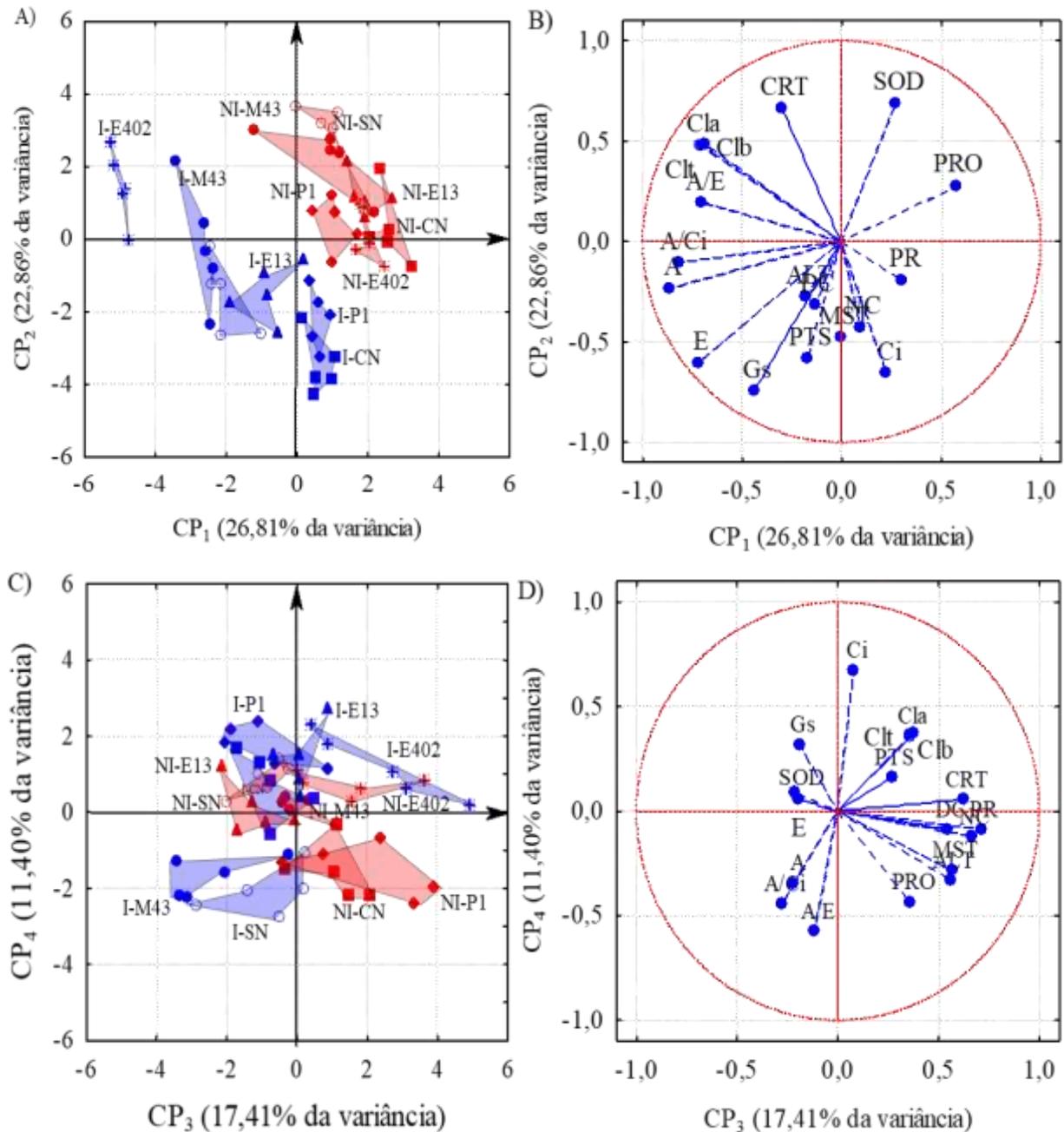


Figura 15. Projeção bidimensional dos escores fatoriais (A e C) e variáveis (B e D) nos quatro primeiros componentes de interação principais (CPs 1, 2, 3 e 4) entre níveis de irrigação e inoculantes com bacilos em plantas de gergelim. Tratamentos irrigado (I) (azul), tratamento não irrigado (NI) (vermelho); SN- sem nitrogênio, CN- com nitrogênio, P1- pant001, E13- ESA 13, E402- ESA 402, M143; ALT- Altura de plantas, DC- Diâmetro caulinar, MST- Massa seca total, PR- Peso seco raiz, NC- Número de cápsulas, PTS- Peso total de sementes, Ci- Carbono interno, Gs- Condutância estomática, A/E – Eficiência do uso água, A/Ci – Eficiência da carboxilação, A- Fotossíntese, E- Transpiração, SOD- Superóxido dismutase, PRO- Prolina, CLa- Clorofila A, CLa- Clorofila B, CLt- Clorofila totais, CRT- Carotenóides.

6. CONCLUSÕES

O genótipo BRS Morena foi semi-tolerante ao déficit hídrico, uma vez que foi possível observar um ajustamento morfofisiológico e bioquímico, sendo a inoculação com estirpes um fator relevante para os resultados obtidos.

Considerando a análise bioquímica, a SOD foi a enzima que mais respondeu em vários tratamentos com inoculantes e o teor de prolina livre total aumentou em todos os tratamentos sob estresse hídrico.

Os tratamentos inoculados com pant001, ESA 402, e o manejo nitrogenado favoreceram o aumento dos pigmentos fotossintéticos no genótipo durante o estresse hídrico.

Em relação a expressão dos genes de tolerância à seca, os tratamentos inoculados com ESA 13, ESA 402 e com nitrogênio, obtiveram uma superexpressão dos genes *DREB 1D* e *SIHDZ7*.

Considerando a produção final, a estirpe pant001 e M143 estabeleceu uma melhor interação com incremento de 24% e 21%, respectivamente, para o peso de mil sementes, quando comparado ao tratamento sem nitrogênio, sob déficit hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; HASHEM, A., RADHAKRISHNAN, R., AL-HUQAIL, A. A., AL-OTIBI, F. O. N., EGAMBERDIEVA, D. Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 37-44, 2018.
- ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, IWASAKI T, HOSOKAWA D, SHINOZAKI K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell**, v.9, p.1859-1868, 1997.
- ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, v.5, n.4, p.369-374. 2010.
- AGALOU, A.; PURWANTOMO, S; OVERNAS, E.; JOHANNESSEN, H. A genome-wide survey of HD-zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. **Plant Molecular Biology**, v.66, n.1, p.87–103,2008.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.
- ALI, J.; CHEN, X.; CHEN, Z.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; CHENG, B.; XIANG, Y. Genome-wide analysis of soybean HD-zip gene family and expression profiling under salinity and drought treatments. **Plos one**, v.9, n.2, p.87,2014.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). **Official methods of analysis of AOAC international**. 12. ed., Washington: AOAC International, 1094p. 1975.
- APHA (American Public Health Association). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: APHA, 546p, 1992.
- AQUINO, J.P.A. Bactérias endofíticas promotoras de crescimento de plantas em milho e sorgo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.49, p.1-9, 2019.
- ARAÚJO, F.F., HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1633-1643,1999.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.
- ARRIEL, N. H. C.; BELTRÃO, E. M. N. Cultivo do gergelim. Sistema de Produção, **Embrapa Algodão**. ISSN 1678-8710 6. Versão Eletrônica 2ª edição, 2014.

ARRIEL, N. H. C.; FIRMINO, P. de T.; BELTRÃO, N. E. de M.; SOARES, J. J.; ARAÚJO, A. E. de; SILVA, A. C.; FERREIRA, G. B. A cultura do gergelim. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2007. 72 p.: il. – (Coleção Plantar, 50)

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1, 2009/2, p.84-93. 2009.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J; LEA, P.J. Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild type and catalase- deficient mutant of barley. **Plant Physiology**, v. 104, p. 280-292, 1998..

BAATH, GURJINDER S. Quantifying and Modeling the Influence of Temperature on Growth and Reproductive Development of Sesame. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-10, 2021.

BABITA, M.; MAHESWARI, M.; RAOA, L. M.; SHANKERB, A. K.; GANGADHAR, R. D. Osmotic adjustment, drought tolerance and yield in castor (*Ricinus communis* L.) hybrids. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, n.3, p.243-249, 2010.

BANDEPPA, S.; PAUL, S.; THAKUR, J. K.; AGGARWAL, C.; ASHA, A. D. Antioxidant, physiological and biochemical responses of drought susceptible and drought tolerant mustard (*Brassica juncea* L.) genotypes to rhizobacterial inoculation under water deficit stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, p. 19-28, 2019.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.24, p.23-58, 2005.

BATES, L.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 8, p. 1165-1174, 1990.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. Análises químicas e bioquímicas em plantas. **Imprensa Universitária da UFRPE**, p. 261, 2011.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>. Acesso em 23 de Janeiro 2022.

BRILLI, F.; POLLASTRI, S.; RAI0, A.; BARALDI, R.; NERI, L.; BARTOLINI, P.; PODDA, A.; LORETO, F.; MASERTI, B.E.; BALESTRINI, R. Root colonization by *Pseudomonas chlororaphis* primes tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants for enhanced tolerance to water stress. **Journal of Plant Physiology**. v. 232,p. 82–93, 2019.

BUCHELT, A. C.; METZLER, C. R.; CASTIGLIONI, J.L.; DASSOLLER, T. F.; LUBIAN, M. S. Aplicação de bioestimulantes e *Bacillus subtilis* na germinação e desenvolvimento inicial da cultura do milho. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 6, n. 4, p.69-74, out./dez. 2019.

CAMPOS, L.N.; GUILHERME, M.F.S.; OLIVEIRA, H.M.; COSTA, V.F.; SILVA, E. Avaliação biométrica de sementes de *Sesamum indicum* L. In: Congresso Nordestino de Biólogos, 4, 2014, João Pessoa. Anais... João Pessoa: **CONGREBIO**, p.145-147, 2014.

CAPELLA, M.; BONAVENTURE, G.; CHAN, RL. Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 1–14, 2014.

CARVALHO, D. F.; OLIVEIRA NETO, D. H.; FELIX, L. F.; GUERRA, J. G. M.; SALVADOR, C. A. Yield, water use efficiency, and yield response factor in carrot crop under different irrigation depths. **Ciência Rural**, v.56, n.7, p.1145-1150, 2016.

CAZORLA, F. M.; ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; LUGTENBERG, B. J.; VICENTE, A. D.; BLOEMBERG, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.5, p.1950-9, 2007.

CHEN, KAI. O fator de transcrição AP2/ERF GmDREB1 confere tolerância à seca em soja transgênica interagindo com GmERFs. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 170, p. 287-295, 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, v. 9, safra 2021/22, n. 6, sexto levantamento, Brasília, DF, mar. 2022.

CONCENCO, G. Fotossíntese de biótipos de azevém sob condição de competição. **Planta Daninha**, v.26, p.595-600, 2008.

DING, Z.; FU, L.; YAN, Y. Genome-wide characterization and expression profiling of HD-Zip gene family related to abiotic stress in cassava. **Plos one**. v.2, p.1–20, 2017

DOSSA, K.; NIANG, M.; ASSOGBADJO, AE.; CISSÉ, N.; DIOUF, D. Identificação baseada em homologia de genoma completo de genes candidatos para tolerância à seca em gergelim (*Sesamum indicum* L.). **Jornal Africano de Biotecnologia** , v.15, n.27, p. 1464-1475, 2016.

EBRAHIMIAN-MOTLAGH. S;RIBONE,PA; THIRUMALAIKUMAR, VP; JUNGBRUNNEN1 confers drought tolerance downstream of the HD-Zip I Transcription factor AtHB13. **Frontiers in Plant Science**. v.8, p.1–12, 2017.

ETESAMI, H. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.17, p. 897-911, 2017.

FAZELI, K.; SEYED, F.; ESKANDARI, D.; JAHANFAR, E. Evaluation of the effect of inoculation of plant growth promoting bacteria (PGPR) on morphological characteristics, yield and yield components of sesame plant. **Agricultural Researches of Iran**, v. 18, no. 3, p. 279-295, 2016.

FERNANDES, R. H.; VIEIRA, B. S.; FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, 2013.

FERRAZ, R. L. S.; BELTRÃO, N. E. M.; MELO, A. S.; MAGALHÃES, I. D.; FERNANDES, P. D.; ROCHA, M. S. Trocas gasosas e eficiência fotoquímica de cultivares de algodoeiro herbáceo sob aplicação de silício foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.2, p.735-748, 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, p. 109-112, 2014.

GAGNÉ-BOURQUE, F.; BERTRAND, A.; CLAESSENS, A.; ALIFERIS, K.A.; JABAJI, S. Alleviation of Drought Stress and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum pratense* L.) Colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Front. Plant Sci.*, v.7, p.584. 2016.

GHOLINEZHAD, E.; DARVISHZADEH, R.; MOGHADDAM, S.S.; POPOVIĆDJORDJEVIĆ, J. Effect of mycorrhizal inoculation in reducing water stress in sesame (*Sesamum indicum* L.): The assessment of agrobiological traits and enzymatic antioxidant activity. *Agricultural Water Management*. v. 238, p. 106-234, 2020.

GIANNOPOLITIS, C. N; RIES, S.K. Superoxide desmutases occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, p.14-309, 1977.

GOMES, R. V.; COUTINHO, J. L. B. Gergelim. In: CAVALCANTI, F. J. A.; SANTOS, J. C. P.; PEREIRA, J. R.; LEITE, J. P.; SILVA, M. C. L.; FREIRE, F. J.; SILVA, D. J.; SOUSA, A. R.; MESSIAS, A. S.; FARIA, C. M. B.; BURGOS, N.; LIMA JÚNIOR, M. A; GOMES, R.V.; CAVALCANTI, A. C.; LIMA, J. F. W. F. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco** (2ª aproximação). 2.ed. Recife, IPA, p. 144, 1998.

GONZALEZ, A.; BERMEJO, V.; GIMENO, B. S. Effect of different physiological traits on grain yield in barley grown under irrigated and terminal water deficit conditions. *Journal Agricultural Science*, v.148, p.319-328, 2010.

GRILO JÚNIOR, J. A. S.; AZEVEDO, P. V. Crescimento, desenvolvimento e produtividade do gergelim 'BRS Seda' na agrovila de Canudos, em Ceará Mirim (RN). *Revista Holos*, Natal, v. 2, p. 19-33, 2013.

GUSAIN, Y. S.; SINGH, U. S.; SHARMA, A. K. Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*, v.14, n.9, p.764-773. 2015.

GUTTIKONDA, SK.; VALLIYODAN, B.; NEELAKANDAN, AK.; TRAN, LSP.; KUMAR, R.; QUACH, TN.; NGUYEN, HT. Overexpression of AtDREB1D transcription factor improves drought tolerance in soybean. *Molecular Biology Reports*, v. 41, n. 12, p. 7995-8008, 2014.

HAAKE, V.; COOK, D.; RIECHMANN, J.; PINEDA, O.; THOMASHOW, MF.; ZHANG, JZ. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology*. v. 130, p. 639-648, 2002.

HAFEEZ, F.Y.; SAFDAR, M.E.; CHAUDHRY, A.U.; MALIK, K.A. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Collingwood, v. 44, n. 6, p. 617-622, 2004.

HAN, Q.; LUX, P.; BAI, P.; QIAO, Y.; PARE, W. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. *Front Plant Science*, v. 5, p. 19-28, 2014.

HARSHAVARDHAN, V.T.; SON L.V.; SEILER, C.; JUNKER, A.; WEIGELT-FISCHER, K.; KLUKAS, C.; ALTMANN, T.; SREENIVASULU, N.; BÄUMLEIN, H.; KUHLMANN, M. AtRD22 and AtUSPL1, members of the plant-specific BURP domain family involved in *Arabidopsis thaliana* drought tolerance. **Plos one**, v.9, n.10, p.1065, 2014.

HASHEM, ABEER.; TABASSUM, BABY.; ABDALLAH.; ELSAYED, FATHI. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v. 1, 352p, 1976.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice DREB1/CBF type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology**, v. 47, p. 141-153. 2006.

JADHAV, S.R.; NAIKNAWARE, M.D.; PAWAR, G.R. Effect of nitrogen, phosphorus and biofertilizers on growth, yield and quality of summer sesamum (*Sesamum indicum* L.). **International Journal of Tropical Agriculture**. v.33, p. 475-480, 2015.

JAIN, M.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Genome-wide identification, classification, evolutionary expansion and expression analyses of homeobox genes in rice. **Plant Physiology J**, v.275, n.11, p.2845–2861,2008.

JASSIM, N. S.; MUNTAHA ABD-A, A.; ALHAMD, A. D. Effect of biological agent *Bacillus subtilis* on chemical composition and antioxidant enzymes of date palm plantlets (*Phoenix dactylifera* L.) Under salt stress conditions. **Biology. Cell. Arch**. v.20, n. 1, p. 02-08, 2020.

JESUS, L. L. Teste de tetrazólio para sementes de *Sesamum indicum*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, p.422-428, 2015.

JIANG, H.; JIN, J.; LIU, H.; DONG,Q.; YAN, H.; GAN, D.; ZHANG, W.; ZHU, S. Genome-wide analysis of HD-zip genes in grape (*Vitis vinifera*) **Tree Genet Genomes**, v.11, n.1, p.82-92,2015.

JIANG, Q.Y.; HU, Z.; ZHANG, H.; MA, Y.Z. 2014. Overexpression of GmDREB1 improves salt tolerance in transgenic wheat and leaf protein response to high salinity. **Crop Journal**. v.1, p. 120–131, 2014.

JIAO, P.; JIANG, Z.; WEI, X.; LIU, S.; QU, J.; GUAN, S.; MA,Y. A superexpressão da proteína de zíper homeobox-leucina ATHB-6 melhora a tolerância à seca do milho (*Zea mays* L.). **Plant Science**. v.3, p16, 2022.

JONES, R.; OUGHAM, H.; THOMAS,H.; AND, WAALAND, S. **The Molecular Life of Plants**. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK, p.568. 2013

KAMAL, A. H. M.; CHO, K.; KIM D. E.; UOZUMI, N.; CHUNG, K.Y.; LEE, S.Y.; CHOI, J. S.; CHO, S. W.; SHIN, C. S.; WOO, S. H. Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. **Molecular Biology Reports**, v.39, n.9, p.9059-9074. 2012.

KANNAN, R.; KUMARI, S. MERINA PREM; BINODH, ASISH K. Induced genetic variability in sesame (*Sesamum indicum*): a comparative study on the mutagenic effects of radiation and ems in seed germination, pollen viability and chlorophyll mutants. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.8, n.6, p.774 – 788, 2020.

KARUPPANAPANDIAN, T., MOON, J. C., KIM, C., MANOHARAN, K., KIMW. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6, p.709. 2011.

KIM, M. Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 23, n. 3, p. 571-580, 2017.

KUMAR, C.M.; SINGH, S.A. Bioactive lignans from sesame (*Sesamum indicum* L.): evaluation of their antioxidant and antibacterial effects for food applications. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.1, p. 2934-2941, 2015.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: Rimas artes, 2000. 531 p.

LASTOCHKINA, O.; ISLAM, M.T.; RAHMAN, M.M.; PANDEY, P.; BOEHME, M.H; HAESAERT, G. *Bacillus subtilis*-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. In *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*, v. 2, n. 6, p. 97–133, 2019.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal Experimental Botany**.v.62, n.14, p.31-48, 2011.

LATA, C.; PRASAD, M. **Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance, abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives**, Prof. Arun Shanker (Ed.), 2011.

LESPINET, O.; ZHAO, Y.; ZHOU, Y.; JIANG, H.; LI, X.; GAN, D.; PENG, X.; ZHU, S.; CHENG, B. Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-zip gene family in maize. **Plos one**.v.6, n.12, p.84-88,2011.

LI, M.Y.; LIU, J.X.; HAO, J.N.; FENG, K.; DUAN, A.Q.; YANG, Q.Q.; XU, Z.S.; XIONG, A.S. Genomic identification of AP2/ERF transcription factors and functional characterization of two cold resistance-related AP2/ERF genes in celery (*Apium graveolens* L.). **Plant** v.250, n. 1265–1280, 2019.

LI, Y.; XU, S.; GAO, J.; PAN, S.; WANG, G. *Bacillus subtilis*-regulation of stomatal movement and instantaneous water use efficiency in *Vicia faba*. **Plant Growth Regul**.v.78,p. 43–55, 2016.

LICAUSI, F.; GIORGI, F.M.; ZENONI, S.; OSTI, F.; PEZZOTTI, M.; PERATA, P. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. **BMC Genomics** v.11,p.719, 2010

LIMA, B.C.; MORO, A.L.; SANTOS, A.C.P.; BONIFACIO, A.; ARAUJO, A.S.F.; DE ARAUJO, F.F. *Bacillus subtilis* ameliorates water stress tolerance in maize and common bean. **Journal. Plant Interactions**, v.14, p. 432–439,2019.

- LIMA, G. S. D.; LACERDA, C. N. D.; SOARES, L. A. D. A.; GHEYI, H. R.; ARAÚJO, R. H. C. R. Production characteristics of sesame genotypes under different strategies of saline water application. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 2, p. 490-499, 2020.
- LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. Water stress in plants: causes, effects and responses. **Water Stress, Rijeka: INTECH**, v.1, n.1, p. 1-14, 2012.
- LIVAR, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analyses of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2(-\Delta\Delta c(T))$ method. **Methods**
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STHAL, D. A. **Microbiologia de Brock**, 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de política agrícola. **Portaria Nº 95**, de 11 de julho, 2013.
- MARULANDA, A.; PORCEL, R.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive. **Microbial Ecology**. v.1, n.1, p.54:543, 2007.
- MEHMOOD, M.; KHAN, M. J.; KHAN, M. J.; AKHTAR, N.; MUGHAL, F.; SHAH, S. T. A. Systematic analysis of HD-ZIP transcription factors in sesame genome and gene expression profiling of SiHD-ZIP class I entailing drought stress responses at early seedling stage. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 3, p. 2059-2071, 2022.
- MENDES, H. S. J.; PAULA, N. F. de; SCARPINATTI, E. A.; PAULA, R. C. de. Respostas fisiológicas de cultivares de eucalyptus grandis x europhylla à disponibilidade hídrica e adubação potássica. **Cerne**, v.19, n.3, p.603-611, 2013.
- MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n. 15, 2010, p. 4197-4220. 2010.
- MUKHERJEE, K.; BROCCIERI, L.; BURGLIN, T.R. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. **Mol Biol Evol** v.26, n.12, p.2775–2794, 2009.
- MUKHERJEE, K.; BÜRGLIN, T.R.; MEKHL. A novel domain with similarity to PAS domains, is fused to plant homeodomain-leucine zipper III proteins. **Plant Physiology**. v.140, p.1142–1150, 2006.
- MYINT, D.; GILANI, S.A.; KAWASE, M.; WATANABE, K.N. Sustainable Sesame (*Sesamum indicum* L.) Production through Improved Technology: An Overview of Production, Challenges, and Opportunities in Myanmar. **Sustainability** v.1, n.2, p.3515, 2020.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Front. Plant Science**. v.5, p.170, 2014.

NEHNEVAJOVA, E.; LYUBENOVA, L.; HERZIG, R.; SCHRÖDER, P.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; SCHMÜLLING, T. Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adult sunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, v.76, n.0, p.39-48. 2012

NIKOLAEVA, M. K.; MAEVSKAYA, S. N.; VORONIN, P. Y. Photosynthetic CO₂ /H₂O gas exchange and dynamics of carbohydrates content in maize leaves under drought. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 64, p. 536-542, 2017.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, v.144, p.1636-1648. 2014.

O'NEILL, P. M.; SHANAHAN, J. F.; SCHEPERS, J. S. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. **Crop Science**, v. 46, n. 2, p. 681-687, 2006.

OLIVEIRA NETO, C. F. DE; OLIVEIRA, T. B. DE; SILVA, K. R. S.; NOGUEIRA, G. A. DOS S.; MALTAROLO, B. M.; COSTA, T. C.; CARDOSO, K. P. S.; SOUZA, L. C. DE; SILVA, R. T. L. DA; SIQUEIRA, J. A. M. Nitrogen compounds and enzyme activity in young muruçi (*Byrsonima crassifolia* L.) plant subjected to water stress. **Australian Journal of Crop Science**, v.10, n.1, p. 111-117, 2016

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; MARCIANO, T. Y. F.; PROENÇA, M. E. S. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v.10, n.4 p.439-448, 2016.

OLIVEIRA, H.P. Respostas fisiológicas de forrageiras ao déficit hídrico e baixas temperaturas. **Revista Eletrônica Nutri Time**, v. 14, n. 5, p. 7008-14, set./out. 2017.

PAMUNGKAS, SAKTIYONO.; SIGIT, TRI.; NOOR, FARID. Drought Stress: Responses and Mechanism in Plants. **Reviews in Agricultural Science**, v. 10, p. 168-185, 2022.

PARRAY, J.A.; JAN, S.; KAMILI, A.N.; QADRI, R.A.; EGAMBERDIEVA, D.; AHMAD, P. Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. **Journal Plant Growth** v.35, p.877-902, 2016.

PASCALE B. B.; YUNRONG, C.; HERA, V.; RICHARD, L.; ROBERTO, K. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.17, p.1621-1630, 2013.

PEARSON, D. The Chemical Analysis of Foods. 6 ed. New York: **Chemical Public**, 604p. 1971.

PEREIRA, L.S. Watermelon yield and efficiency of use of water and nitrogen. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 3, p. 769 -777, 2019.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004.

POVEDA, J. *Trichoderma parareesei* Favors the Tolerance of Rapeseed (*Brassica napus* L.) to Salinity and Drought Due to a Chorismate Mutase. **Agronomy**, v.10, p118, 2020.

- PUSADKAR, P.; KOKILADEVI, E.; BONDE, S.; MOHITE, N. Sesame (*Sesamum indicum L.*) importance and its high quality seed oil: a review. **Trends in Biosciences** v.8, n.1, p. 3900-3906, 2015.
- RABARA, R.C.; TRIPATHI, P.; RUSHTON, P.J. The Potential of transcription factor-based genetic engineering in improving crop tolerance to drought. **Omics**, v.18, n.10, p.601-614,2014.
- RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E.F. Bacillus: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. **Front. Physiology.**, v.8, p.667,2017.
- RAMIREZ, V.; COEGO, A.; LOPEZ, A.; AGORIO, A.; FLORS.; V, VERA. Drought tolerance in Arabidopsis is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. **Plant Journal**. v.58, p.578-591. 2009.
- RHO, H. Effects on photosynthesis and water use of plant hosts: a metaanalysis. Functional Importance of the Plant Microbiome. **Washington, Springer**,.p. 43-69, 2017.
- SAKUMA, Y.; MARUYAMA, K.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SEKI.; M, SHINOZAKIK.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of na Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought responsive gene expression. **Plant Cell** v.18, p.1292-1309, 2006.
- SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.290, p. 998–1009, 2002.
- SAMANIEGO-GÁMEZ, B. Y.Bacillus spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 4, p. 409-416, 2016.
- SANTANA, S.R.A. Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on sorghum. **Archives of microbiology**, v.202, n.5, p.1015-1024, 2020.
- SANTOS, A. R.; MELO, Y. L.; DE OLIVEIRA, L. F.; CAVALCANTE, I. E.; DE SOUZA FERRAZ, R. L.; DA SILVA SÁ, F. V.; DE MELO, A. S. Exogenous silicon and proline modulate osmoprotection and antioxidant activity in cowpea under drought stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, p. 1-8, 2022.
- SATAPUTE, P.P.; OLEKAR, HS.; SHETTI, A.A.; KULKARNI, A.G.; HIREMATH, G.B.; PATAGUNDI, B.I.; KALIWAL, B.B. Isolation and characterization of nitrogen fixing Bacillus subtilis strain as-4 from agricultural soil. **International Journal of Recent Scientific Research**., v. 3, n. 9, pág. 762-765, 2012.
- SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing Pseudomonas strains GRP3A and PRS9 inmaize (*Zea mays L.*) under iron limiting conditions. **Microbiological Research, Heidelberg**, v. 158,n. 3, p. 243-248, 2003.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.12, n.1, p.1-26, 2012.

SHEN, W.; LI, H.; TENG, R. Genomic and transcriptomic analyses of HD-Zip family transcription factors and their responses to abiotic stress in tea plant (*Camellia sinensis*). **Genomics**, v. 111, p.1142–1151, 2019.

SILVA, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. - 2. ed. rev. ampl. - Brasília, Distrito Federal: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 627, 2009.

SILVA, J. L.A.; MEDEIROS, J. F.; ALVES, S.S.V.; OLIVEIRA, A. Uso de águas salinas como alternativa na irrigação e produção de forragem no semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.S66–S72, 2014.

SONG, A.; LI, P.; XIN, J. Transcriptome-wide survey and expression profile analysis of putative chrysanthemum HD-Zip I and II Genes. **Genes**. v.1, p.7, 2016.

STEIN, T.; BORCHERT, S.; CONRAD, B.; FEESCHE, J. Two different antibiotic like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. **Journal Bacteriol.** v.184, p. 1703–1711, 2002

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: A Multifunctional Amino Acid. Trends in **Plant Sciences**, v.15, n.1, p. 89-97, 2009.

TAIZ, L. ZEIGER, E.; MØLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.858 p.

TIEPO, A.N. et al. Enhanced drought tolerance in seedlings of Neotropical tree species inoculated with plant growth promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.130, p. 277-288, 2018.

TUFAIL, T.; RIAZ, M.; ARSHAD, M.U.; GILANI, S.A.; AIN, H.B.; KHURSHEED, T.; ISLAM Z.; IMRAN, M.; BASHIR, S.; SHAHID, M.Z.; KAZMI, M. Functional and nutraceutical scenario of flaxseed and sesame: A. **International Journal of Biosciences** v.17, p.173-190, 2020.

VACHERON, J. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.356, p.1-19, 2013.

VARDHARAJULA, S.; ZULFIKAR, L.I.; GROVER, M.; REDDY, G.; BANDI, V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp., effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **J Plant Inter.** v.6, p.1–14. 2011

VICENT, J. M. A manual for the practical study of nodule bacteria. **Oxford: Blackwell Science Publication**, 1970.

WALIA, A.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences, **India Section B: Biological Sciences**, v. 84, n. 1, p. 145-155, 2014.

WEI, M.; LIU, A.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; LI, D.; DOSSA, K.; YOU, J. Genome-wide characterization and expression analysis of the HD-Zip gene family in response to drought and salinity stresses in sesame. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2019.

YAKAR, Y.; ARSLAN, H.; ÖZÇINAR, A.B. Determination of fatty acid composition of some sesame (*Sesamum indicum*, L.) Genotypes grown as second crop in Siirt ecological conditions. Gumushane **Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, v. 11, n. 1, p. 27-33.2021.

YAN, Y.; WANG, P.; WEI, Y.; BAI, Y.; LU, Y.; ZENG, H.; LIU, G.; REITER, R.J.; HE, C.; SHI, H. The dual interplay of RAV5 in activating nitrate reductases and repressing catalase activity to improve disease resistance in cassava. **Plant Biotechnol. J.**, v.19,p.785–800. 2021.

YANG, S. L.; CHEN, K.; WANG, S. S.; GONG, M. Osmoregulation as a key factor in drought hardening-induced drought tolerance in *Jatropha curcas*. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 529-536, 2015

ZHANG, L.; MA, H.; CHEN, T.; PEN, J.; YU, S.; ZHAO, X. Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity. **Plos one**, v.9, n.11, p.112, 2014.

ZHOU, Y.; CHEN, M.; GUO, J.; WANG, Y.; MIN, D.;JIANG, Q.;JI, H.; HUANG, C.; WEI, W.; XU, H.; CHEN, X.; LI, L.; XU, Z.; CHENG, X.; WANG, C.; WANG, C.; MA, Y. Overexpression of soybean DREB1 enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field. **Journal Experimental Botany**, v. 71, p. 1842–1857, 2020.