

MECANISMOS DE MEMÓRIA MOLECULAR NA INTERAÇÃO
ARROZ/*Gluconacetobacter diazotrophicus*, SOB ESTRESSE HÍDRICO

DAYSE FREITAS DE SOUSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE- PB

AGOSTO- 2022

MECANISMOS DE MEMÓRIA MOLECULAR NA INTERAÇÃO
ARROZ/*Gluconacetobacter diazotrophicus*, SOB ESTRESSE HÍDRICO

DAYSE FREITAS DE SOUSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/ Área de concentração: Biotecnologia e Melhoramento vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique S. Gadêlha Meneses

CAMPINA GRANDE – PB

AGOSTO – 2022

MECANISMOS DE MEMÓRIA MOLECULAR NA INTERAÇÃO
ARROZ/*Gluconacetobacter diazotrophicus*, SOB ESTRESSE HÍDRICO

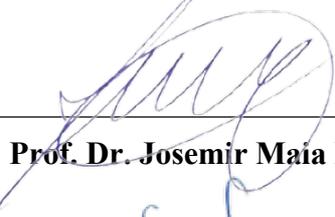
DAYSE FREITAS DE SOUSA

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

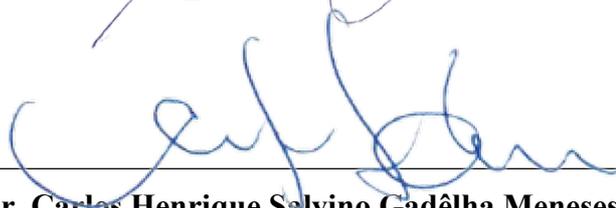
Banca examinadora:



Prof.ª. Dra. Maria Teresa Gomes Lopes



Prof. Dr. Josemir Maia Moura



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses (Orientador)

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao tamanho original”

(Albert Einstein)

A Deus, por todos os dias dar sentido a minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me capacitar e me guiar nessa trajetória.

À minha família que é meu porto seguro.

Ao meu orientador Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses por ter acreditado em mim, por todas as contribuições, paciência, compreensão e parceria ao longo de todo o caminho.

Aos amigos que conquistei na turma do mestrado: Edson, Bruno, Tybério, Ivanice, Igor, Luana, Cristiano, Alexandre.

A José Ray Martins, que estive comigo no experimento em campo, me ajudando no que foi preciso, para concluir esse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO DE LITRATURA	13
3.1 Arroz vermelho.....	13
3.2 Estresses abióticos, respostas fisiológicas e moleculares.....	15
3.3 Mitigadores do estresse hídrico	17
3.4 Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).....	19
3.5 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	19
3.6 Mecanismos de memória contra estresse hídrico em plantas	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Caracterização da área experimental.....	22
4.2 Fatores em estudo e tratamentos	22
4.3 Processo de Inoculação.....	22
4.4 Parâmetros em estudo.....	24
4.4.1 Parâmetros Bioquímicos	24
4.4.2 Parâmetros Moleculares.....	25
4.5 Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Controle de qualidade do inoculante utilizado.....	28
5.2 Pigmentos fotossintéticos.....	30
5.2.1 Teores de clorofila a e b	30
5.4 Acúmulo de malondialdeído (MDA)	32
5.5 Teor de prolina	33
5.6 Glicina betaína	36
5.7 Análises Moleculares	37
5.7.1 Expressão gênica.....	37
5.7.2 Porcentagens de Metilação	40
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise por qPCR, específicos para cada gene, expressos em arroz vermelho. 26

Tabela 2. Contagem realizada no inoculante produzido e nas sementes inoculadas com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5, utilizada no experimento. Campina Grande/PB, 2015.**Erro! não definido.**

Indicador

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de inoculação da semente com a bactéria. 23
- Figura 2.** Implantação do experimento. 23
- Figura 3.** Transformação por bissulfito de sódio. Na transformação apenas as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas e transcritas como adeninas durante a PCR. As citosinas metiladas permanecem inalteradas e durante a amplificação são transcritas como guaninas. 27
- Figura 4** Teores de clorofila a, b, total e carotenóides em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água). 30
- Figura 5.** Acúmulo de malondialdeído em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água). 32
- Figura 6.** Teor de prolina (mmol.g-1MF) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água). 34
- Figura 7.** Teor de glicina betaína (mmol.g-1MF) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$)

(disponibilidade de água). 36

Figura 8. Valores de expressão relativa em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água). 38

Figura 9. Valores de porcentagem de metilação em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água). 40

SOUSA, DAYSE FREITAS. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba/ Embrapa Algodão, agosto de 2022. **mecanismos de memória molecular na interação arroz/*Gluconacetobacter diazotrophicus*, sob estresse hídrico** Campina Grande, PB 2022. P51. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique S. Gadêlha Meneses

Resumo

O Brasil é responsável por produzir anualmente cerca de 11 a 13 milhões de toneladas de arroz (*Oryza sativa* L.), um cereal de grande importância econômica, e no Nordeste brasileiro, destaca-se a produção do arroz vermelho. Entretanto, fatores abióticos, como o déficit hídrico por seca, têm influenciado de forma negativa a produção desse grão. Para minimizar os danos e maximizar a produção, tem-se utilizados ferramentas biotecnológicas, como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e mecanismos de memória molecular. Dessa forma, o presente trabalho visou analisar a ativação dos mecanismos de memória em plantas de arroz vermelho inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob estresse hídrico recorrente. Inicialmente realizou-se a inoculação, utilizando a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* utilizando a cultivar 405 EMBRAPA Meio Norte de arroz vermelho, constando duas condições, sementes não inoculadas e sementes inoculadas, após o processo foram propagadas. Posteriormente, submeteu-se as plantas a três condições de estresse hídrico: irrigadas diariamente; deficiência hídrica por 15 dias na fase vegetativa (V3) e submetidas a deficiência hídrica por mais 15 dias na fase reprodutiva (R3); e plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva (R3). Analiou-se as respostas bioquímicas e moleculares envolvidas no processo de defesa a seca e a interação planta-*G. diazotrophicus*. A inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus*, mostrou ser uma potencial ferramenta contra o estresse hídrico em arroz vermelho. O arroz vermelho apresenta ajustes bioquímicos e moleculares em função da disponibilidade hídrica do ambiente em que se desenvolve. No entanto, sob condições de inoculação com *G. diazotrophicus* as condições de deficiência hídrica são mitigadas. As plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* destacam-se quanto a sua memória molecular, com menores valores de metilação em genes chaves, para respostas ao estresse hídrico.

Palavras-chave: Arroz vermelho. Déficit hídrico. *G. diazotrophicus*. Reprogramação Molecular.

SOUSA, DAYSE FREITAS. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba/ Embrapa Algodão, agosto de 2022. **mecanismos de memória molecular na interação arroz/*Gluconacetobacter diazotrophicus*, sob estresse hídrico** Campina Grande, PB 2022. P51. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique S. Gadêlha Meneses

Abstract

Brazil is responsible for annually producing about 11 to 13 million tons of rice (*Oryza sativa* L.), a cereal of great economic importance, and in the Brazilian Northeast, the production of red rice stands out. However, abiotic factors, such as water deficit due to drought, have negatively influenced the production of this grain. To minimize damage and maximize production, biotechnological tools have been used, such as plant growth promoting bacteria (BPCV) and molecular memory modification. Thus, the present work aimed to analyze the activation of memory controls in red rice plants inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* under recurrent water stress. Initially, inoculation was carried out using the PAL5 strain of *G. diazotrophicus* using the 405 EMBRAPA Meio Norte red rice cultivar, consisting of two conditions, non-inoculated seeds and inoculated seeds, after the process they were propagated. Subsequently, the plants were subjected to three conditions of water stress: daily irrigated; water deficit for 15 days in the vegetative phase (V3) and water deficit for another 15 days in the reproductive phase (R3); and plants cultivated under water deficit for 15 days in the reproductive phase (R3). The biochemical and molecular responses involved in the defense process against drought and the plant-G interaction were analyzed. *diazotrophicus*. Inoculation with the bacteria *G. diazotrophicus* proved to be a potential tool against water stress in red rice. Red rice presents biochemical and molecular adjustments depending on the water availability of the environment in which it grows. However, under inoculation conditions with *G. diazotrophicus* such water stress conditions are mitigated. Red rice plants inoculated with *G. diazotrophicus* stand out for their molecular memory, with lower methylation values in key genes for responses to water stress.

Keywords: Red rice. Water deficit. *G. diazotrophicus*. Molecular Reprogramming.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal de grande importância econômica, um dos mais produzidos e consumidos no mundo, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2017). É cultivado em vários países, com destaque para a China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Japão, Paquistão e Brasil (ANA, 2020), e se destaca por desempenhar um papel estratégico a nível econômico e social (GUIMARÃES; BALDANI, 2013).

O consumo aparente médio mundial de arroz beneficiado é de 54 kg/pessoa/ano, sendo que os países asiáticos, apresentam as médias mais elevadas (78 kg/pessoa/ano). Na América do Sul, são consumidos, em média, 29 kg/pessoa/ano, destacando-se o Brasil como grande consumidor (32 kg/pessoa/ ano) (SOSBAI, 2018).

O Brasil é responsável por produzir anualmente cerca de 11 a 13 milhões de toneladas de grãos de arroz, atuando como um dos componentes de grande importância na economia nacional (CEOLIN et al., 2017). Destacando-se como maiores produtores o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Tocantins, Mato Grosso, Maranhão, Paraná (CONAB, 2022). No boletim divulgado pela Conab (2022), a safra 2021/22 apresenta estimativa nacional de produção estimada em 10,78 milhões de toneladas.

Área estimada destinada à rizicultura na safra 2020/21 é na ordem de 1.704,9 hectares, 2,4% superior à safra anterior. A produção no país ocorre sob dois sistemas, em várzea (irrigado) e terras altas (sequeiro), cerca de 77,9% (1.328,1 hectares) corresponde ao cultivo irrigado e os outros 22,1% (376,8 hectares) estão relacionados ao sistema de produção em condição de sequeiro. Entretanto este último vem apresentando uma baixa produtividade nos últimos anos e a aplicação desse sistema se concentra principalmente no Nordeste (CONAB, 2021).

No Nordeste, destaca-se a produção do arroz vermelho, anualmente cerca de dez mil toneladas de grãos são produzidas, sendo grande parte na região do Nordeste, principalmente nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Ceará (EMBRAPA, 2018). A produção de arroz vermelho concentra-se na Paraíba, sendo plantado cerca de cinco mil hectares por ano (GOVERNO DA PARAÍBA, 2015). Tal cultivo é exemplo da agricultura familiar e integração do pequeno agricultor.

Entretanto, fatores abióticos, que causam estresses na planta, como o déficit hídrico por seca, característica típica da região, que apresenta longos períodos de seca, tem influenciado de forma negativa na produção desse grão, causando danos a planta, promovendo uma redução no crescimento, desenvolvimento e na produtividade (OLIVEIRA, 2017). E com isso apresentado modificações em sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes (WAHID et al., 2007). Deste modo se faz necessário o uso de ferramentas biotecnológicas, como pesquisas ligadas ao melhoramento genético, para minimizar os danos causados pelo estresse hídrico e com isso maximizar a produção.

Os níveis de estresses causados pelos fatores abióticos podem ser reduzidos através de microrganismos, como a interação planta/bactéria, que coloniza a planta, estimula o crescimento e aumenta a produtividade (SAHARAN; NEHRA, 2011), tais bactérias são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).

Entre tais bactérias destaca-se a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que proporciona o crescimento do vegetal através da biossíntese de fitormônios, produzindo auxinas, giberelinas e ácido indol acético (AIA). Além da capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio nas plantas, atuam como solubilizadoras de nutrientes no solo, produzem bacteriocina que atua no mecanismo de defesa contra fitopatógenos (REIS et al., 2000; BERTALAN et al., 2009). A presença dessas bactérias pode também levar à produção de substâncias osmorreguladoras pela planta e atuar de forma sinérgica, colaborando na tolerância à seca (FILGUEIRAS et al., 2019).

Observa-se que em resposta aos estresses abióticos as plantas modificam sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes. E com isso passam por uma reprogramação celular, com alterações na expressão e no acúmulo de transcritos de muitos genes, eventos que podem ficar fixados de forma molecular nos vegetais (WAHID et al., 2007; HASHIGUCHI et al., 2010; KAVAR et al., 2007).

Tais modificações aclimatizam as plantas, por meio de um processo adaptativo denominado memória de estresse, que é uma pré-exposição (priming) de diferentes tipos ou recorrência de estresse que altera as respostas subsequentes, exibindo uma ativação mais rápida e/ou mais forte das várias vias de resposta, preparando a planta para estresses futuros (RAMIREZ et al., 2015; LIU et al., 2014).

Nesse sentido, estudos que tem como intuito compreender os mecanismos tolerantes ao déficit hídrico, podem ser apontados como uma alternativa para aumentar a produtividade do arroz vermelho, sem aumento de custo na produção.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar a ativação dos mecanismos de memória em plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse hídrico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Testar o desempenho das respostas bioquímicas e moleculares de plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* sob déficit hídrico recorrente;
- ✓ Determinar se a tolerância do arroz vermelho ao estresse hídrico é determinada por memória molecular;
- ✓ Obter dados de parâmetros bioquímicos e moleculares das plantas, para se avaliar os efeitos dos tratamentos de inoculação, em função do manejo de deficiência hídrica;
- ✓ Avaliar a regulação da expressão dos genes chaves, envolvidos nas vias de resposta ao estresse hídrico, em plantas de arroz vermelho inoculadas por *G. diazotrophicus*.

3. REVISÃO DE LITRATURA

3.1. Arroz vermelho

Dentro da área destinada a rizicultura, destaca-se a produção de arroz vermelho, o qual pertence à divisão Angiosperma, classe monocotiledônea, ordem Poalis, família Poaceae (chamadas antes de Gramineae), subfamília Oryzoideae, tribo Oryzeae, e gênero *Oryza* (NCBI, 2022). Dependendo do grau de domesticação pode ser classificado em arroz silvestre, arroz vermelho daninho ou espontâneo e arroz vermelho (PEREIRA; MORAIS, 2014).

Classificada no grupo de plantas com sistema fotossintético C3, sendo considerado em muitas condições a principal planta daninha do arroz branco (GEALY; AGRAMA; JIA, 2012), ainda é pouco conhecido, mas é cultivado principalmente no semiárido nordestino, produz anualmente cerca de dez mil toneladas de grãos (EMBRAPA, 2018).

Destacando-se, os Estados da Paraíba (Vales do Rio Piancó e do Rio do Peixe) e Rio Grande do Norte (Vale do Rio Apodi) como maiores produtores e cultivado em menor escala por pequenos agricultores nos estados do Ceará (município de Caridade), Pernambuco (municípios de Serrita e Floresta), Bahia (Chapada Diamantina e Campo Formoso) (PEREIRA; MORAIS, 2014).

É uma cultura anual ou perene, o cultivo no país ocorre sob dois sistemas, em várzea (irrigado) e terras altas (sequeiro) (GOMES; MAGALHÃES, 2004; EMBRAPA, 2019). Segundo Barreto (2012), o plantio é normalmente realizado utilizando sementes nativas ou variedades tradicionais selecionadas ao longo do tempo, caracterizadas pela variabilidade, adaptabilidade às condições de cultivo e ampla base genética.

A temperatura ótima para o desenvolvimento do arroz situa-se entre 20 e 35°C, sendo esta faixa a ideal para a germinação, de 30 a 33°C para a floração e de 20 a 25°C para a maturação. O arroz é sensível a temperaturas muito altas ou baixas, mas a sensibilidade varia de acordo com cada cultura, em função da fase fenológica (YOSHIDA, 1981; EMBRAPA, 2019).

O ciclo de crescimento e desenvolvimento do arroz vermelho tem sido dividido em três subperíodos: desenvolvimento da plântula, vegetativo e reprodutivo. Os estádios do desenvolvimento da plântula são identificados pela letra S e por um número que varia de 0 a 3, um período que vai da semente até a emergência. Já os estádios vegetativos são identificados pela letra V e por um número que varia de 1 a n, um período que vai da emergência até o aparecimento do colar da última folha (folha bandeira) do colmo principal. E por fim, os estádios reprodutivos,

identificados pela letra R associada a um número, que varia de 1 a 9, que se inicia através da diferenciação da panícula até a maturação completa dos grãos na panícula (COUNCE et al., 2000).

A planta apresenta porte alto, folhas verde-claras, decumbentes e pilosas, colmos finos, redondos e vazios, composta por nó e entrenó, possuem dois tipos de raízes, as seminais ou temporais e as secundárias, adventícias ou permanentes, alta capacidade de perfilhamento e sementes com pericarpo avermelhado, aristas longas, altas taxas de dormência e debulha natural. Os órgãos são divididos em dois grupos a) órgãos vegetativos: raízes, colmos ou caules e folhas; e b) órgãos reprodutivos: flores e sementes (FONSECA et al., 2014; CORTÉS, 2018).

O grão é formado pelo tegumento, que envolve a semente e se encontra diretamente ligado ao pericarpo, membrana que envolve o fruto. O pericarpo é envolvido pelas glumelas, pelo lema e pela pálea, que constituem a casca e são removidas durante o beneficiamento (VIEIRA; CARVALHO, 1999).

O pigmento vermelho do grão é devido à coloração avermelhada do pericarpo, ocasionada por antocioninas, proantocianidinas e carotenoides, atribuindo assim aos grãos altas propriedades nutricionais (PEREIRA-CARO et al., 2013; SUMCZYNSKI et al., 2016). Os grãos ainda apresentam altos níveis de outros bioativos, como, gama-orizanol, ácido fenólico, ácido fítico, aminoácidos e óleos essenciais (DENG et al., 2013; CHAKUTON et al., 2012).

Dos vários componentes bioativos encontrados no arroz pigmentado, as antocianinas e as proantocianidinas atuam como os antioxidantes, responsáveis pela redução dos radicais livres, que reparam o DNA e células danificadas, e aumentam as células imunocompetentes (HARTATI et al., 2017). E ainda conferem ações repelentes contra alguns patógenos e predadores da cultura do arroz (SWEENEY et al., 2006).

O arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando uma área aproximada de 163 milhões de hectares e apresentando bom potencial produtivo (ANA, 2020). É um alimento de importância econômica e cultural no Brasil, uma vez que está incluso no cardápio da população (FERREIRA et al., 2014).

Primeiro por ser um cereal que o grão sai do campo e é consumido praticamente sem processo de industrialização e segundo pelo papel social, por fazer parte da alimentação de populações com alto e baixo poder aquisitivo, devido apresentar um preço relativamente menor em relação a outros cereais e por possuir um excelente balanço nutricional, fornecendo 20% da energia (SOSBAI, 2018), É uma fonte importante de energia devido à alta concentração de amido, proteínas, minerais e vitaminas B (GUNARATNE et al., 2013; FALADE; CHRISTOPHER, 2015).

A procura por alimentos saudáveis e diferenciados tem aumentado nas últimas décadas, buscando a substituição de alguns ingredientes, e com isso os grãos de arroz vermelho vem sendo utilizado de diferentes formas como alternativa, a exemplo temos a farinha de arroz que é utilizada

como ingrediente em muitos produtos alimentares, incluindo bebidas, produtos à base de carne, pudins, molhos para saladas e dietas sem glúten, atendendo pessoas portadoras de alergias ou intolerâncias alimentares (FALADE; CHRISTOPHER, 2015; ZHOU et al., 2019; BEZERRA et al., 2020).

Menezes et al. (2012) ressalta que o arroz vermelho na forma de grão tem alto valor agregado, enquanto que a sua forragem verde é bastante rica em proteínas, e apresenta ampla adaptabilidade as diferentes condições de solo e clima.

Entretanto, fatores abióticos podem influenciar em todas as etapas do ciclo de vida da cultura do arroz, a exemplo temos a disponibilidade de água, que desempenha um papel crucial no desenvolvimento do grão (PEREIRA et al., 2009).

3.2 Estresses abióticos, respostas fisiológicas e moleculares

A cultura orizícola ocupa posição de destaque na produção mundial, entretanto fatores abióticos, que ocasionam estresses nas plantas, como o déficit hídrico, devido a distribuição irregular de chuvas, altas temperaturas, alagamento, salinidade, interferem na produtividade da mesma, fazendo com quem tal cultura apresente um baixo potencial produtivo (OLIVEIRA, 2017).

De acordo com o relatório da Conab (2021), o arroz tem perdido área ao longo dos anos. Nas últimas dez safras, a área cultivada com arroz reduziu aproximadamente 39%, sobretudo em áreas de sequeiro, uma vez que o produtor tem optado por culturas mais rentáveis. Crusciol et al. (2001), relata que a baixa produtividade pode ser atribuída a déficit hídrico, durante o desenvolvimento da cultura. Comprometendo as fases em que o suprimento adequado de água é indispensável (CRUSCIOL et al., 2013).

Especialmente nas regiões áridas e semiáridas (ARZANI; ASHRAF, 2016). Onde a escassez da água nessas regiões ocorre devido a distribuição irregular de chuvas, devido aos longos períodos de estiagem, impossibilitando assim a prática de irrigação na agricultura, uma vez que a taxa de evapotranspiração é maior que a de precipitação durante a maior parte do ano (HOLANDA et al., 2016). Segundo Bernini et al. (2020), além da seca ser uma limitação para a agricultura, é também um grande desafio para segurança alimentar mundial.

A água é essencial nos ciclos de desenvolvimento da planta, ela faz o transporte de substâncias pelo vegetal, faz as células meristemáticas crescerem de tamanho, permite que um tecido ou um órgão se sustente, é responsável pelo resfriamento vegetal, age como isolante térmico, permite que órgãos e organelas se movimentem, estabiliza as estruturas de membranas e compostos e possui importante papel nas reações químicas (CAMPOS, 2017).

Taiz e Zeiger (2009), definiram o déficit hídrico, como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta, quando todo o conteúdo de água no tecido ou na célula

vegetal está abaixo do conteúdo de máxima hidratação, e após longo prazo de estresse, a água na planta não é recuperada, causando decréscimo na produção.

Segundo Monteiro et al. (2014), a restrição hídrica é responsável por sérias disfunções nas plantas. As plantas quando submetidas a déficit hídrico, reduzem o potencial osmótico, e conseqüentemente, o hídrico das raízes, gerando um gradiente de potencial capaz de promover a absorção de água, a partir do solo ou reduzindo a transpiração, permitindo que a planta mantenha um potencial hídrico positivo (GUIMARÃES et al., 2011).

Outras respostas fisiológicas que ocorrem em plantas decorrente desse estresse é o fechamento de estômatos, enrolamento foliar, retardo na data de florescimento, sinalização via ácido abscísico, acúmulo de solutos, aceleração na senescência e abscisão das folhas, dentre outros (HADIARTO; TRAN, 2011, FERRARI et al., 2015).

A restrição hídrica na fase vegetativa reduz o crescimento, diminui a área foliar e o rendimento dos grãos, podendo também causar a morte do organismo. Os tecidos vegetais apresentam murcha e os folíolos tendem a se fechar para diminuir a exposição da área foliar, ocorrendo uma redução na taxa fotossintética (SOUZA et al., 2013; FERRARI et al., 2015).

Como forma de minimizar os efeitos do déficit hídrico, os vegetais desenvolveram várias técnicas para sobreviver, como já citado, o fechamento dos estômatos, que ocorre com o objetivo de reduzir a perda de água da planta para o ambiente externo (SOUSA; SOUSA, 2017). Resultando na baixa concentração interna de CO₂, acarretando assim a concentração de pigmentos clorofilados envolvidos no processo de fotossíntese (PRISCO; GOMES FILHO, 2010; SILVA et al., 2012).

Segundo Souza et al. (2020), a avaliação dos danos promovidos pela restrição hídrica sobre o aparato fotossintético é essencial para compreensão dos efeitos da seca sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas. Como também pode-se avaliar a tolerância dos vegetais utilizando-se análises da prolina, pois o acúmulo do aminiácido prolina é a principal resposta ao estresse abiótico (KAUR; ASTHIR, 2015).

Cada espécie responde de forma distinta aos estresses ambientais, devido a características morfológicas, fisiológicas e história evolutiva das espécies (OLIVEIRA, 2017). A cultura do arroz tem sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes modificadas por estresses abióticos (WAHID et al., 2007).

A deficiência hídrica na cultura do arroz causa reduções na altura das plantas, área foliar e produção de biomassa, aborto de perfilhos, mudanças na massa seca das raízes e na profundidade de enraizamento, atraso no desenvolvimento reprodutivo, sistema radicular mais vigoroso, acúmulo de cera nas folhas, enrolamento foliar, conforme o estresse é intensificado (LUO, 2010; GUIMARÃES et al., 2011). Já na floração reduz, de duas a três vezes, o rendimento de grãos (PEDROSO, 1985).

Devido ao déficit hídrico as plantas também produzem estresses secundários, quando submetidas a estresse hídrico, como as reações oxidativas, que é responsável por aumentar a produção de espécie reativas de oxigênio (EROs), que se apresentam com radicais livres, como na forma molecular de um não radical, sendo estas espécies o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($HO\cdot$) e oxigênio singlete (1O_2) (ALVARENGA, 2016)

Segundo Barbosa et al. (2016), o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os níveis endógenos de compostos antioxidante e compostos oxidantes, que podem causar danos as estruturas celulares, podendo acarretar a morte celular e conseqüentemente a morte do vegetal.

Entretanto, os vegetais desenvolveram vias de defesa contra os efeitos gerados durante o estresse, utilizando uma complexa rede de sinalização genético-molecular e celular que as levam a responder por diferentes vias metabólicas (NOVELLO et al., 2020). As vias são capazes de monitorar os níveis de EROs através do controle da expressão gênica, como também da atividade de diferentes enzimas ou rotas metabólicas, que amenizam a citotoxicidade (ALVARENGA, 2016).

O sistema celular de defesa antioxidante começa com uma cascata enzimática, que apresenta um grande número de compostos bioquímicos que desempenham papel fundamental na regulação e homeostase da planta, os antioxidantes endógenos, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PRXs), deidroascorbato redutase (DHAR), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) e entre outras. Além dos componentes não enzimáticos, dentre os quais se destacam o ascorbato, glutathione, β -caroteno e o α -tocoferol. Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (GILL; TUTEJA, 2010; MILLER et al., 2010).

O déficit hídrico em arroz, estimula a atividades das enzimas APX, SOD e CAT, devido à superexpressão de genes que codificam as enzimas antioxidantes (FILGUEIRAS et al., 2019). Os níveis de estresses causados pelos fatores abióticos também podem ser reduzidos por meio de microrganismos, como a interação planta/bactérias, que colonizam a planta e estimula o crescimento e aumenta a produtividade (SAHARAN; NEHRA, 2011).

3.3. Mitigadores do estresse hídrico

Para se adaptar a várias condições de estresses, como a seca, as plantas buscam formas de minimizar a exposição a tal fator determinante para a produção, como respostas adaptativas, as quais incluem expressão de genes, que estão relacionados ao estresse, como também modificações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas (SHUKLA et al., 2012).

A utilização de técnicas agrícolas tem sido utilizada para amenizar os danos causados pela seca, como o uso de bioestimulantes, que atuam nas respostas das plantas a condições estressantes

(MARIANI; FERRANTE, 2017).

A utilização dos bioestimulantes promove a planta: aumento da biomassa biológica do solo, permitindo maior decomposição e mineralização da matéria orgânica, melhorando a eficiência nutricional; maior enraizamento, o que leva a maior absorção dos nutrientes e aumenta a eficiência no uso da água; aumenta a eficiência dos mecanismos de defesa, das atividades fisiológicas, na síntese de metabolitos essenciais e promove o crescimento da parte aérea; resultando assim em maior produtividade e qualidade no produto final (DU JARDIN et al., 2015).

Para minimizar os efeitos do estresse hídrico rotas metabólicas são ativadas para estimular o aumento da produção de osmólitos, como açúcares (trealose, sacarose e frutose), polióis, aminoácidos (prolina), ácidos orgânicos, compostos de amônio (poliaminas e glicina betaína) e íons (Ca^{++} , K^{+} e Cl^{-}) (FANG; XIONG, 2015; HATZIG et al., 2014; HARSH et al., 2016). O acúmulo e o ajustamento destes osmólitos no interior do vegetal é um exemplo eficiente de resposta ao processo adaptativo de tolerância ao estresse hídrico e importantes na manutenção do turgor celular e crescimento das plantas (BLUM, 2016).

Cvikrová et al. (2013), ressalta que também ocorre o ajustamento osmótico, um processo de manutenção do potencial hídrico nas células vegetais, durante a limitação de água. A exemplo temos o aminoácido prolina, o qual está envolvido na síntese de carboidratos fibrosos, como a lignina, o que diminui as perdas de água pelos vegetais, reduzindo danos e evitando as perdas na produção (CASTRO, 2017).

Segundo Velloso et al. (2019), vários insumos biológicos vêm sendo utilizado no setor agrícola, e os mais utilizados estão os inoculantes microbianos. Os quais podem ser definidos como um produto que contém uma ou mais cepas de microrganismos que atuam no desenvolvimento das plantas, o qual se inclui, as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCVs).

Diversas bactérias promotoras de crescimento vegetal vêm sendo empregada no campo, as mais conhecidas incluem membros do gênero *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Arthrobacter* (STURZ; NOWAK, 2000; HARDOIM et al., 2008; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

A utilização de tais bactérias tem como objetivo minimizar os efeitos causados pelos estresses abióticos, promovendo adaptações as condições adversas (YANG et al., 2009; ADESEMOYE; KLOPPER, 2009). Algumas delas são encontradas na superfície das raízes, enquanto outras invadem os tecidos das plantas, conhecidas como endofíticas (DALL'ASTA, 2017).

Sousa et al. (2019), relata em suas pesquisas que são poucos os estudos sobre tais inoculantes microbianos, como eles interagem com os vegetais e quais os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento.

3.4. Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

As bactérias promotoras de crescimento de vegetal interagem com as raízes ou se alojam nos tecidos oferecendo muitos benefícios para as plantas hospedeiras, para aumentar a produtividade, como promoção do desenvolvimento das plantas, defesa contra patógenos e tolerância a estresses abióticos, incluindo o déficit hídrico, também aumentar a absorção de nutrientes, reduzindo assim a utilização de insumos químicos, e conseqüentemente reduz os custos de produção e impactos ambientais (ARAÚJO et al., 2012; YANG et al., 2009).

Em troca a planta libera exsudatos pelas raízes, como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, os quais são fonte de carbono e apresentam rica fonte de energia e nutrientes para as bactérias (TURNER et al., 2013; SASSE et al., 2018).

A planta reconhece os microrganismos que podem atuar na rizosfera ou endofiticamente através da qualidade e quantidade de material excretado pelas raízes, vários fatores bioquímicos estão envolvidos para que haja a compatibilidade planta-bactéria, permitindo assim o estabelecimento molecular do microrganismo (DOORNBOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

Os efeitos observados como resultado na promoção do crescimento são: aumentos na taxa de germinação de sementes, comprimento de raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas, flores, área foliar e rendimento das culturas no campo (RODRIGUES et al., 2012).

Algumas bactérias fixam nitrogênio em plantas, processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essas bactérias podem colonizar a rizosfera e/ou toda a planta e estabelecerem-se em nichos protegidos do excesso de oxigênio ou de outros fatores, o que lhes permite expressar seu potencial para FBN (FAGOTTI et al., 2012).

Segundo Soares et al. (2014), a qualidade fisiológica de sementes de arroz quando inoculada com rizobactérias é influenciada positivamente, sendo tais efeitos significativos para percentual de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento das partes aérea e radicular.

3.5. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Entre as bactérias promotoras de crescimento vegetal, destaca-se a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, pertencente ao filo das Proteobactérias, classe α -proteobacteria, família Acetobacteraceae, do gênero *Gluconacetobacter*, é uma bactéria Gram-negativa móvel, não tem movimento espiralado, contem flagelos laterais, apresenta ótimo crescimento com pH variando entre 4,5-5,8. Crescem em alta concentração de sacarose (10% sacarose) e tem a habilidade de fixar nitrogênio em condições microaerofílicas (KERSTERS et al., 2006; MENESES et al., 2011;

CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988).

É uma bactéria endofítica, pois não é isolada a partir do solo ou rizosfera, pois é encontrada apenas colonizando tecidos internos da planta (BALDANI et al., 1997). Apresenta sensibilidade a condições de seca, mas é tolerante ao calor e concentrações de sais no meio de cultura, quando submetida a tratamento térmicos, resiste até 50 °C por 2 a 3 horas e é utilizada em outras culturas para o controle de patógenos (TEJERA et al., 2003; ORTEGA et al., 2001).

Gluconacetobacter diazotrophicus proporciona o crescimento do vegetal através da biossíntese de fitormônios, produzindo auxinas, giberelinas e ácido indol acético. Além da capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio nas plantas, atuam como solubilizadoras de nutrientes no solo, como o fosfato e o zinco, através da secreção de ácidos orgânicos bacterianos, bem como, produzem bacteriocina que atua no mecanismo de defesa contra fitopatógenos (OLIVEIRA et al., 2018).

A presença de *G. diazotrophicus* pode também levar à produção de substâncias osmorreguladoras pela planta e assim atuar de forma sinérgica, intermediar mudanças na elasticidade das paredes das células radiculares, colaborando na tolerância à seca (DIMKPA et al. 2009).

Filgueiras et al. (2019), observaram em suas pesquisas, que plantas de arroz vermelho quando submetidas a níveis de restrição hídrica apresentaram alterações fisiológicas e bioquímicas, no entanto, sob condições de inoculação com *G. diazotrophicus* as condições de deficiência hídrica foram mitigadas, com incrementos nos teores de clorofila a e b, bem como na taxa de fotossíntese líquida.

3.6. Mecanismos de memória contra estresse hídrico em plantas

O déficit hídrico, considerado um estresse abiótico mais limitante para os vegetais, se destaca por causar danos a planta, promovendo uma redução no crescimento, desenvolvimento e produtividade, já que a água é elemento vital para o bom desenvolvimento e funcionamento dos organismos (OLIVEIRA, 2017).

Em resposta aos estresses abióticos as plantas modificam sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes. E com isso passam por uma reprogramação celular, com alterações na expressão e no acúmulo de transcritos de muitos genes (WAHID et al., 2007; HASHIGUCHI et al, 2010; KAVAR et al., 2007). Tais modificações podem ser irreversíveis e apresentarem características permanentes, preparando a planta e protegendo-a para estresses que venha sofrer futuramente (RAMIREZ et al., 2015).

As plantas alteram suas respostas durante estresses recorrentes por meio de um processo adaptativo denominado memória de estresse, que é uma pré-exposição (*priming*) de diferentes tipos ou recorrência de estresse que altera as respostas subsequentes, exibindo uma ativação mais

rápido e/ou mais forte das várias vias de resposta (LIU et al., 2014).

Ding et al. (2012), observaram que as exposições a diferentes condições de estresse hídrico permitiram que as plantas respondessem a um novo estresse mais rapidamente, apresentando mudanças adaptativas de expressão de genes quando comparados com as plantas não previamente expostas a um estresse hídrico. Segundo Habu et al. (2001), essas mudanças desempenham um papel importante na modulação da expressão do gene pelo mecanismo que liga e desliga em resposta a um estímulo ambiental, ou seja, uma regulação epigenética.

O termo epigenética significa “em adição à informação genética codificada no DNA” (FEINBERG; TYCKO, 2004) e é utilizado para definir mudanças que ocorrem na expressão gênica sem ocorrer nenhuma alteração na sequência do código genético (GIBBS, 2007; JIRTLE; SKINNER, 2007; WAGGONER, 2007).

Um dos mecanismos epigenéticos mais comum é a metilação da citosina no DNA, em que ocorre a variação da base covalente no DNA das plantas (ALSDURF et al., 2016). A metilação na codificação ou regiões reguladoras impedem a expressão de genes alvo, enquanto que na desmetilação ocorre a ativação de genes no genoma eucariota e que em plantas essas alterações podem ser hereditárias (MENG et al., 2012; SHAN et al., 2013).

Tendo ambos os efeitos epigenéticos e mutagênicos, a metilação do DNA desempenha um papel importante na regulação epigenética das plantas com a expressão de genes em resposta a fatores ambientais (TAN, 2014; BECKER et al., 2011), ou seja, a memória ao estresse pode ser mantida por apenas curtos períodos de tempo, quando dependente da meia-vida de proteínas, RNA e metabolitos induzidos pelo estresse, como também pode durar mais tempo quando se tratar de reprogramação na fenologia e morfologia das plantas (HANSON; SKINNER, 2016).

Os processos epigenéticos podem induzir alterações na expressão de genes através de hipometilação ou hipermetilação do DNA (BRUCE et al., 2007, DING et al., 2012). As alterações dos tipos hiper ou hipometilação são indicadores da supressão ou expressão de genes relacionados ao estresse sob a seca (CHEN; CHEN, 2008; SHEN et al., 2012; GAYACHARAN; JOEL, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área experimental

O presente trabalho foi realizado na casa de vegetação, localizado no Campus I da UEPB, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, nas dependências do Complexo Integrado de Pesquisa Três Marias, na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB-CAMPUS I), em Campina Grande – PB, no período compreendido entre os meses de janeiro de 2021 à julho de 2021.

4.2 Fatores em estudo e tratamentos

O experimento foi realizado com a cultivar 405 EMBRAPA Meio Norte de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) constando de duas condições de inoculação com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* (I1= sementes não inoculadas e I2= sementes inoculadas) e três momentos de restrição hídrica a 50% da capacidade de campo (M1= plantas irrigadas diariamente a 100% da capacidade de campo; M2= plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase vegetativa (V3) e submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva (R3); e M3= plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva (R3). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em um fatorial 2x3, sendo 6 tratamentos com 5 repetições, onde cada repetição foi composta por 10 plantas, resultando em 30 unidades experimentais.

4.3 Processo de Inoculação

A inoculação, foi realizada utilizando a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. A estirpe foi reativada em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio DYGS (2 g de glicose; 1,5 g de Peptona; 2 g de extrato de levedura; 0,5 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; para 1L, pH 6,8 (RODRIGUEZ NETO et al., 1986), a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 48 horas. Em seguida forão semeadas em placas com meio semi-específico, LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995). Após a reativação da estirpe, verificou-se a pureza da mesma e posteriormente, ocorreu a multiplicação em tubos contendo meio DYGS nas condições citadas anteriormente. Em seguida lavou-se as estirpes com solução salina e a densidade óptica (em 600 nm) ajustada para 0,9 - 1,5 ml, e utilizou-se a ressuspensão bacteriana para inocular em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml do meio

DYGS a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 48 horas (Figura 1A). Determinou-se o número de células viáveis utilizando o método de microgota, no respectivo meio para cada bactéria (SPENCER e RAGOUT, 2001). Em seguida, adicionou 15 ml do caldo bacteriano em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa para produzir o inoculante utilizado (Figura 1B). Em seguida, o inoculante foi homogeneizado e incubado a 30 °C por um período de 24 horas (fase de maturação) (Figura 1C).

As sementes de arroz foram umedecidas com água estéril (Figura 1D) e posteriormente misturadas com a turfa numa proporção de 250 g de inoculante para cada 20 kg de sementes de arroz (FERREIRA, 2004), (5 g de turfa, 150 g de sementes e 10 ml do meio). Em seguida, colocou-se as sementes inoculadas para secar à sombra (Figura 1E).

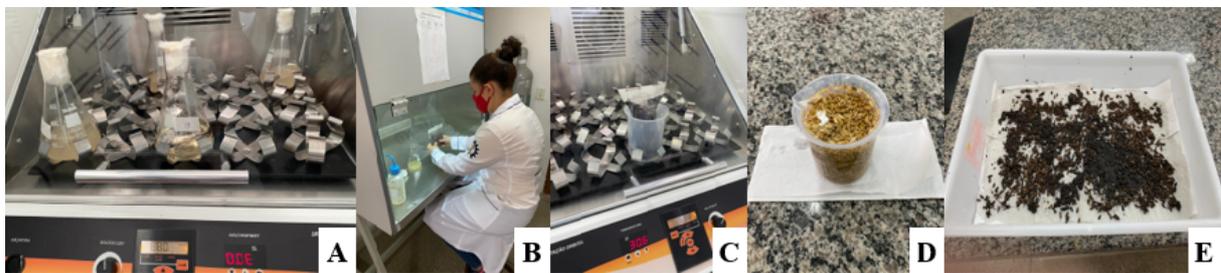


Figura 1. Processo de inoculação da semente com a bactéria.

Os vasos utilizados no experimento foram de 50 L, preenchidos com uma camada de 5 cm de brita, areia grossa e material de solo franco-arenoso. Realizou-se a adubação de fundação, baseando-se nos dados da análise de amostras do solo, inclusive, com incorporação de matéria orgânica, nas quantidades recomendadas para cultivo de arroz (FREITAS et al., 2008).

Realizou-se a cultivo das sementes (Figura 2A), 40 sementes por vasos, e após quatro dias foi possível observar o início da germinação (Figura 2B). Após 15 dias de semeadura das sementes, realizou-se o desbaste, restando apenas 10 plantas de vasos.

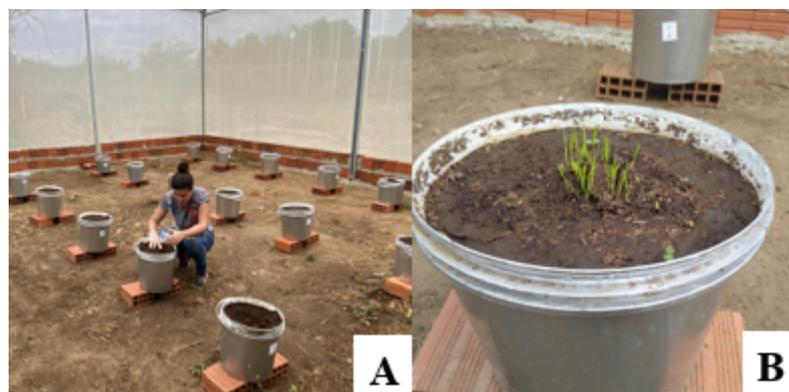


Figura 2. Implantação do experimento.

4.4 Parâmetros em estudo

4.4.1 Parâmetros Bioquímicos

Após análises fisiológicas, coletou-se amostras foliares para verificação de pigmentos fotossintéticos, as quais foram acondicionadas em nitrogênio líquido de modo a diminuir o metabolismo das folhas. Os teores de clorofila a e b (mg dm^{-2}) foram determinados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual da Paraíba seguindo o método laboratorial desenvolvido por Arnon (1949).

Determinou-se o teor de prolina utilizando o método de Bates et al. (1973). Para a realização do teste colorimétrico, pipetaram-se alíquotas de 1,0 mL do extrato bruto; 1,0 mL de ninhidrina ácida; 1,0 mL de ácido acético glacial. Após banho-maria fervente por 60 min., resfriaram-se os frascos e efetuou-se leitura do composto colorido a 520 nm. Como referência, utilizou-se uma reta padrão com L-prolina.

A peroxidação de lipídios, determinou-se estimando-se o teor de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de aldeído malônico, MDA (CAKMAK; HORST, 1991). Realizou-se a extração pela homogeneização de amostras foliares em 4 mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e o homogenato centrifugou-se a 15.000 g, por 15 min, a 4°C. Os tubos, então, foram fortemente agitados e incubados a 90°C, por 20 min. Parou-se a reação em banho de gelo e a mistura clarificada por centrifugação a 13.000 g, por 8 min a 4°C. Em seguida, a absorbância (ABS) da amostra foi registrada a 532 nm em um espectrofotômetro e a ABS inespecífica (a 600 nm) descontada.

Determinou-se a glicina betaína segundo o método de Grieve & Grattan (1983). Macerou-se as amostras em 2 mL de água destilada sob agitação constante, à temperatura ambiente, por um período de 4 horas, seguindo de centrifugação a 3.500 g por 10 minutos, a 25 °C. Coletou-se o sobrenadante e dele retirou-se uma alíquota de 250 μL para a quantificação de glicina betaína. Para isso, 250 μL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a cada amostra, seguindo de incubação em banho de gelo por 1 hora. Após esse tempo, 200 μL de iodeto de potássio (a aproximadamente 8 °C) foram adicionados e a mistura incubada por 16 horas a 0 °C. Centrifugou-se as amostras a 3.500 g, por 15 minutos a 0 °C, e o resíduo coletado. Este foi lavado por duas vezes em 2 mL de ácido sulfúrico 1 N (a aproximadamente 8 °C) e após realizou-se a centrifugação a 3.500 g, por 5 minutos a 0 °C, dissolveu-se o precipitado em 3 mL de 1,2-dicloroetano, por meio de agitação vigorosa. Após 2,5 horas de repouso, a ABS das amostras foi obtida a 365 nm e para os cálculos utilizou-se uma curva padrão de glicinabetaína. Os resultados foram expressos em $\text{mg glicina - betaína g}^{-1} \text{MS}$.

4.4.2 Parâmetros Moleculares

As variáveis moleculares avaliadas foram a expressão relativa de genes relacionados a defesa vegetal contra a seca e análise do padrão de metilação dos mesmos genes de acordo com Portinho (2015).

Para análise de expressão, amostras foliares serão coletadas, mantidas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em ultra freezer (-80 °C). Posteriormente, será realizada a extração de RNA das amostras coletadas, por meio da utilização do kit de extração Pure Link® RNA Mini Kit (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total será extraído a partir de um pool de 10 plantas, de diferentes repetições, a fim de aumentar a eficiência no isolamento de sequências expressas, mRNA, relacionadas às respostas do processo de defesa. Após as extrações do RNA total, as amostras serão quantificadas via espectrofotometria no aparelho Nano Vue Plus™ (GE Healthcare), e a análise da integridade do RNA será verificada por eletroforese em gel desnaturante com concentração de 1% de agarose. As amostras de RNA com razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 serão utilizadas na síntese do cDNA por transcrição reversa a partir de 400 ng.µl⁻¹ de RNA total, utilizando o kit SuperScript™ II RT da Invitrogen.

Avaliou-se a expressão dos genes selecionados por PCR em tempo real (qPCR) com o Kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) usando termociclador iCycler (Applied Biosystems). Cada reação de PCR continha 12,5 µL de Master mix SYBR Green 2X, 1mM de oligonucleotídeos específicos para cada gene, conforme a Tabela 1, e quantidades apropriadas de cDNA em uma reação com volume total de 25 µL. Aqueceu-se os sistemas da reação de qPCR a 95 °C por 3 min e em seguida por 40 ciclos com passos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 60 °C por 30 s. Empregou-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a quantificação relativa do cDNA e utilizou-se o gene UBQ5 (ubiquitina) como controle endógeno. Os resultados corresponderam à média de ensaios em triplicata e três repetições biológicas.

Para análise de metilação do DNA das sequencias genicas acima citadas, utilizou-se a técnica da Modificação por Bissulfito de Sódio. Onde, depois de extraído, 300 ng de gDNA foram modificados por bissulfito de sódio, utilizando Methyl SEQR™ Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Durante a reação, o bissulfito de sódio alterou seletivamente as citosinas não metiladas, convertendo-as em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permaneceram sem reagir (Figura 1). Os DNAs convertidos foram ressuspensos em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8 - 8,5, com EDTA 1 mM) em volume final de 40 µL e armazenados a 4 °C.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise por qPCR, específicos para cada gene, expressos em arroz vermelho.

Nome do gene	Sequência	Referência
<i>Sod1</i>	Senso CTGATGATCTTGGAAAGGGTGG Anti- Senso GTGCTGGGAGATGGAAGGT	Rossatto et al. (2017)
<i>Gor</i>	Senso CACCTGTTGCACTGATGGAG Anti- Senso GTTCACTCAAGCCCACTACTG	Rossatto et al. (2017)
<i>Cat</i>	Senso GACAAGGAGAACAATTTCCAACAG Anti- Senso AGTAGGAGATCCAGATGCCAC	Rossatto et al. (2017)
P5CR	Senso GTTGGTCTGGTCATCGAAGATT ACCACTTCGACCGCCACTACT Anti- Senso CATTCTCAGTAGCCATCTCCC	Rossatto et al. (2017)
BADH	Senso AAGCCATCTGAGCTTGCTTC Anti- Senso CTTCAGTGCCCAGACCAGTA	Fitzgerald et al. (2008)
PR-1	Senso CGTCTTCATCACCTGCAACTACTC Anti- Senso CATGCATAAACACGTAGCATAGCA	Qiu et al. (2007)
PR-10	Senso CCCTGCCGAATACGCCTAA Anti- Senso CTCAAACGCCACGAGAATTTG	Qiu et al. (2007)
<i>UBQ10</i>	Senso TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG Anti- Senso GCACCACAAATACTTGACGAACAG	Rossatto et al. (2017)

Fonte: FILGUEIRAS et al. (2019).

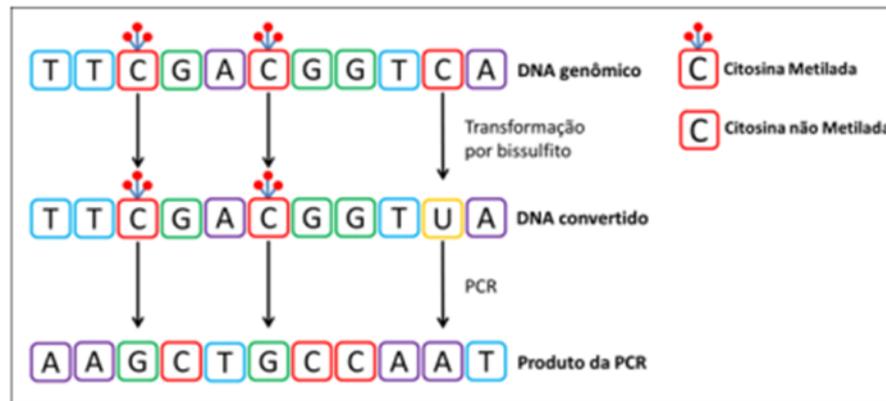


Figura 3. Transformação por bissulfite de sódio. Na transformação apenas as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas e transcritas como adeninas durante a PCR. As citosinas metiladas permanecem inalteradas e durante a amplificação são transcritas como guaninas. Fonte: PORTINHO (2015).

Analisou-se o padrão de metilação dos genes pelo sistema COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis) que combina a modificação por bissulfite, a amplificação da região de interesse por PCR e digestão por enzimas de restrição específicas (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). Realizou-se as análises em triplicata em todas as amostras. Inicialmente, 6 ng de DNA modificados por bissulfite foram amplificados em reação contendo: Go Taq Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, WI, EUA), 10 mM de cada conjunto de primers (Tabela 1) e água RNase free para completar o volume final. Os parâmetros das ciclagens estão listados acima. Posteriormente, digeriu-se metade dos produtos de amplificação por enzimas de restrições. Estas enzimas reconhecem regiões específicas do DNA clivando-o. Quando as citosinas estavam metiladas no DNA genômico não ocorreu alteração destas durante o processo de modificação por bissulfite, com isso, após a PCR, estas enzimas de restrição foram capazes de identificar estas citosinas e, conforme a enzima pôde ou não clivar estas regiões. Submeteu-se a outra parte as mesmas condições das soluções digeridas, porém sem enzima. Padrões comerciais (EpiTect® - PCR control DNA set, QIAGEN, Mississauga, ON, CA), com níveis de metilação de 0% e 100%, estiveram presentes em cada uma das reações sendo sujeitos as mesmas condições as quais as amostras foram submetidas. Incluiu-se estes controles em triplicata em cada experimento.

4.5 Análises estatísticas

Submeteu-se os dados das variáveis de resposta obtidos à análise de variância pelo teste (F) a 5% de probabilidades. Para as variáveis significativas ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de comparação de médias (Teste de Tukey). Realizou-se as análises estatísticas e preparo dos gráficos utilizando o software SIGMAPLOT 11.0 (SYSTAT SOFTWARE INC., 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade do inoculante utilizado

A contagem do número de células viáveis presentes no inoculante mostrou uma população acima de 10^8 g⁻¹ e a ausência de contaminantes (Tabela 2). Alguns trabalhos realizados na Embrapa Agrobiologia, com o intuito de selecionar o veículo de inoculação utilizando as estirpes *Herbaspirillum spp.* e *Burkholderia spp.* mostraram que, o número de células viáveis se mantém acima de 10^8 células g⁻¹ por um período de até 180 dias após a produção (FERREIRA, 2004).

Bashan (1998), recomenda que a população no inoculante seja superior a 10^8 células g⁻¹ para se obter uma inoculação bem sucedida. Por outro lado, a contagem do número de células presentes nas sementes peletizadas mostrou uma população ao redor de 10^9 células g⁻¹ na semente. É importante introduzir no solo um número suficiente de células para garantir uma população com a capacidade de competir com os microorganismos nativos e sobreviver às condições adversas no solo.

Tabela 2. Contagem realizada no inoculante produzido e nas sementes inoculadas com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5, utilizada no experimento. Campina Grande/PB, 2015.

Tratamentos	Meios de cultura	Log do nº células g ⁻¹		
		Inoculante	Semente inoculada	Semente não inoculada
PAL5	LGI-P*	9,65	9,30	N.D.

*Meio LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter spp.*). N.D. (Não detectada)

5.2 Estimativa do número mais provável (NMP) nas raízes e nas folhas

A análise sobre o número de bactérias diazotróficas presentes nas raízes e folhas lavadas, avaliadas durante o estágio de desenvolvimento reprodutivo, mostrou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos inoculados, porém não sendo detectadas nos tratamentos controle (não inoculados) (Tabela 3). Em todos os tratamentos inoculados se verificaram concentrações de *G. diazotrophicus* PAL5 maiores que 10^5 UFC g⁻¹. Punschke et al. (2005), encontraram resultados similares quando quantificaram bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz cultivadas no Uruguai, onde 69% das amostras de raízes apresentaram concentrações

maiores que 10^5 UFC g⁻¹. Por outro lado, Sabino (2007), não encontrou diferença no número de células entre os tratamentos inoculados com *B. brasilense* e *H. seropedicae* e os não inoculados em plantas de arroz avaliadas nos estádios de florescimento e maturação de grãos.

Dentre os microorganismos com capacidade de fixar nitrogênio existem diferentes procariotos, como arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dentro da microbiota do solo, particularmente na rizosfera, está uma grande parte das bactérias diazotróficas (WAKELIN et al., 2009).

Baldani (1996), sugere que em sistemas com solo, o controle não inoculado possui populações nativas de bactérias diazotróficas que alcançam o mesmo número que as inoculadas. Estes resultados mostram que as populações submetidas às mesmas condições tendem a estabilizar-se no solo. No entanto a presença de bactérias diazotróficas não necessariamente significa que a planta se beneficie da FBN ou outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Foi observada diferença na população de bactérias entre os tecidos de arroz vermelho coletados sob as condições testadas (Tabela 3). Rouws et al. (2010) também não encontraram uma tendência definida a respeito do comportamento das estirpes *H. seropedicae* ZAE94, *S. azotifigens* e *S. trueperi* testadas durante o ciclo da cultivar de arroz BRS Talento. Experimentos de inoculação de arroz com e sem adubação nitrogenada mostraram que o número de bactérias diminuiu com a idade da planta, atingindo o equilíbrio no estágio de maturação, o que corresponde à fase final do ciclo da cultura (BALDANI, 1996; FERREIRA, 2004).

Tabela 3. Estimativa do número mais provável (Log do nº células g⁻¹) de *G. diazotrophicus* PAL5 presentes nas raízes e folhas de plantas de arroz vermelho. Coletadas nas fases de desenvolvimento vegetativo. Campina Grande/PB, 2015.

Tratamento	Meio de Cultura	Reprodutivo	
		Raízes	Folhas
Não inoculado	LGI-P**	N.D.	N.D.
PAL5	LGI-P**	5.44 ± 0.24*	5.36 ± 0.34*

*Média ± desvio padrão (n=3), **Meio LGI-P (semi seletivo para *Gluconacetobacter* spp.). N.D. (Não detectada).

No estudo dos fatores de diferentes condições de restrição hídrica (100%, 70%, 50% e 30% da capacidade de campo) e as condições de inoculação (com e sem inoculação) do arroz vermelho 405 Embrapa meio norte influenciaram, significativamente, nos resultados das variáveis estudadas (Bioquímicas e moleculares) nas avaliações sob estresse recorrente, analisados a 1% de probabilidade.

5.3 Pigmentos fotossintéticos

5.3.1 Teores de clorofila a e b

Os efeitos de inoculação com *G. diazotrophicus* em plantas de arroz vermelho promoveram efeitos significativos entre todos tratamentos de disponibilidade de água para os teores de clorofila *a* e clorofila *b* (Figura 4). O mesmo comportamento não foi observado para as plantas não inoculadas. As plantas de arroz vermelho que cresceram sob estresse recorrente, obtiveram maior produção de clorofila *a* e *b*, enquanto que nos outros tratamentos foram verificadas menores concentrações de clorofila *a* e *b*, esse comportamento tanto para plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* como para as plantas não inoculadas.

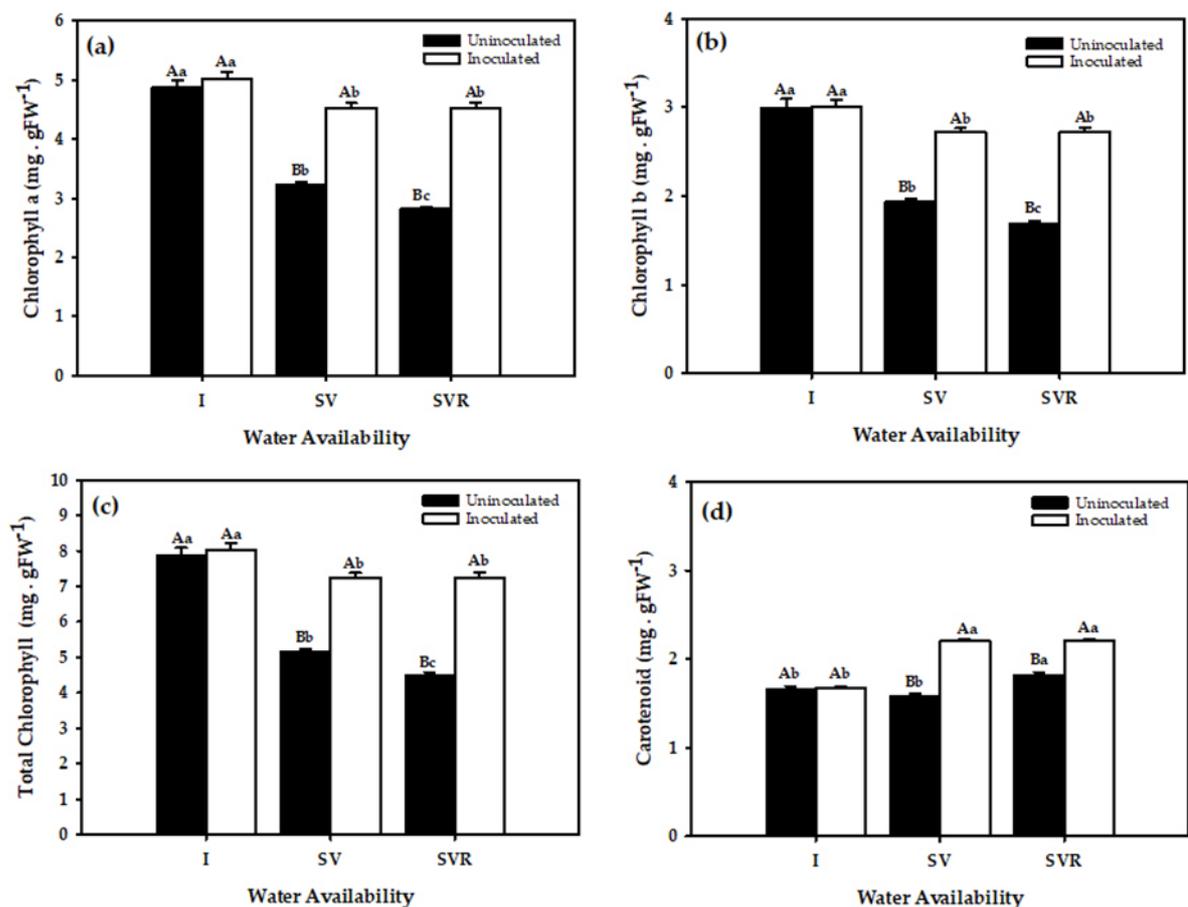


Figura 4. Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água). I = irrigação em todo o experimento, SV = estresse na fase vegetativa, SVR = estresse na fase vegetativa e reprodutiva.

A clorofila é o principal pigmento responsável pela captação da energia luminosa utilizada no processo de fotossíntese e, dessa forma, a concentração de pigmentos tem sido frequentemente

utilizada como um indicador do efeito dos estresses ambientais sobre as plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Estudando a eficiência de genótipos de arroz no uso de nitrogênio em solos de terras altas, Campestrini et al. (2014), verificaram que as cultivares de arroz, BRS-Bouanã e BRS-primavera, com alto teor de nitrogênio apresentou maiores médias de clorofila *a* e *b*.

E de acordo com Barbieri Junior (2009), o índice de clorofila nas folhas das plantas apresenta uma alta correlação com o teor de N da planta, diante disso, é considerado um método eficiente para a avaliação do estado nutricional das plantas. E sob condições de estresse, pode haver uma inibição da síntese do ácido 5-amino levulínico, molécula precursora da clorofila, ou aumentar a atividade da enzima clorofilase que degrada a clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2009) e as plantas podem sofrer alterações no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos devido à mudança na translocação do carbono e do nitrogênio (LIONETTI et al., 2012).

Bactérias endofíticas, estimulam a produção de citocininas e a síntese de pigmentos de clorofila (JELIĆ; BOGDANOVIĆ, 1989). Adicionalmente, o aumento do conteúdo de clorofila em plantas tratadas com estirpes endofíticas é devido à absorção de elementos essenciais especialmente o nitrogênio, sendo este, essencial para a síntese da clorofila, onde esse pigmento é uma molécula chave para fotossíntese. Além disso, o nitrogênio é um componente essencial dos aminoácidos, que os blocos de construção de proteínas.

De acordo com Parida e Das (2005), o estresse hídrico provoca alterações nas atividades das enzimas, responsáveis pela síntese da clorofila, resultando na perda de pigmentos. O teor de clorofila é reduzido significativamente sob estresse hídrico, devido à inibição de enzimas necessárias para a sua biossíntese (SHENG et al., 2008; MURKUTE et al., 2006) e também por captação limitada de nutrientes. Plantas inoculadas com bactérias endofíticas em resposta ao estresse hídrico aumentaram o teor de clorofila (SANNAZZARO et al., 2006; COLLA et al., 2008; ZUCCARINI, 2007), sugerindo uma menor interferência da falta de água na biossíntese de clorofila (GIRI; MUKERJI, 2004).

Na análise de carotenóides, nas plantas de arroz vermelho com estresse recorrente, observou-se que tanto as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* e as plantas não inoculadas proporcionaram um aumento significativo no teor do pigmento analisado (Figura 4). Adicionalmente, verifica-se que, ao se aumentar os níveis de restrição hídrica, apresentaram-se acréscimos nos níveis de carotenóides, tanto na presença quanto na ausência da bactéria nas plantas de arroz vermelho. Comportamento esse, contrário aos teores de clorofila.

Segundo Li et al. (2010), a determinação do teor de carotenóides é importante, uma vez que estes atuam como fotoprotetores no fotossistema II, dissipando o excesso energético incidente sobre a folha na forma de luz, evitando por meio de seu elevado potencial antioxidante, que as clorofilas sejam danificadas. E Taiz e Zeiger (2009), retratam que, além de pigmentos acessórios,

os carotenóides desempenham papel essencial na fotoproteção, protegendo o aparelho fotossintético contra o oxigênio singlete (1O_2), extremamente reativo, que danifica muitos componentes celulares, como lipídeos. Portanto, esses pigmentos são importantes na prevenção da indução de danos oxidativos causados pelo estresse (WAHID, 2007).

Liu et al. (2011) e Ghobadi et al. (2013), também constataram diminuição no conteúdo de carotenóides quando as plantas estavam sob estresse hídrico. Ressalte-se que esse pigmento desempenha um papel importante na foto-proteção (MUNNE-BOSCH; PENUELAS, 2003), onde seu aumento sob condições de déficit hídrico na planta indica uma maior foto-proteção (ELSHEERY; CAO, 2008).

Muitas plantas que interagem com bactérias endofíticas emitem carotenóides envolvidos na proteção contra vários estresses, mas a contribuição das bactérias endofíticas a produção de isoprenóides pelas plantas tem sido pouco investigado, especialmente sob estresse hídrico (RAPPARINI et al., 2008; ASENSIO et al., 2012). Raízes de plantas inoculadas produzem quantidades elevadas de isoprenóides específicos derivados carotenóides (WALTER; STRACK, 2011).

5.4 Acúmulo de malondialdeído (MDA)

O acúmulo de malondialdeído (MDA) na peroxidação lipídica sofreu influência conforme o estresse recorrente e no decorrer que aumentava o nível de estresse hídrico tanto no arroz vermelho inoculado e não inoculado com *G. diazotrophicus* (Figura 5), verificando uma maior quantidade de MDA no arroz não inoculado, principalmente sob estresse recorrente.

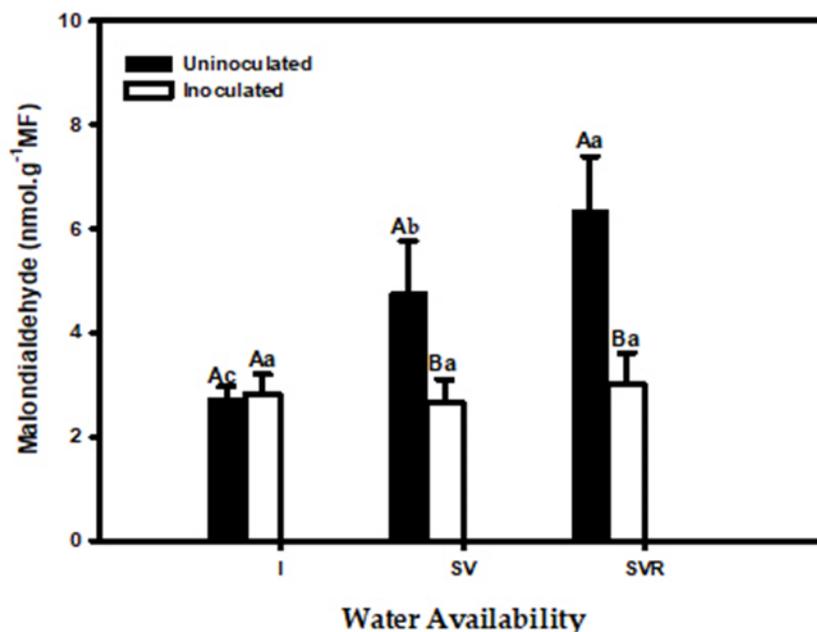


Figura 5. Acúmulo de malondialdeído em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022.

As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

Diferentemente de Zain et al. (2014), estudando o efeito do estresse hídrico no arroz com adubação potássica durante o período do estresse constatou que houve uma diminuição no teor de MDA na peroxidação lipídica nas células das plantas sob estresse, fato também observado por Shukla et al. (2012). E a tolerância do arroz à efeitos do estresse pode ser devido ao aumento de atividades das enzimas antioxidante que reduz a produção de MDA (ZAIN et al., 2014). Sendo que a peroxidação lipídica é utilizada como um dos principais indicadores da ocorrência de estresse oxidativo, uma vez que as EROs reagem com ácidos graxos insaturados e causam a peroxidação de lipídios nas membranas, levando à perda de eletrólitos e funções celulares (GRATÃO et al., 2005).

A seca é um estresse abiótico que afeta as plantas em vários aspectos, reduzindo o potencial osmótico da célula vegetal, elevando as concentrações de solutos no citoplasma (ZAIN et al., 2014), afetando também o fechamento osmótico, diminuindo a transpiração, fotossíntese (RAZAK et al., 2013). Alguns autores como Moran et al. (1994); Pinheiro et al. (2004); Molinari et al. (2007), sustentam a hipótese de que a peroxidação lipídica é induzida por déficit hídrico em sistemas vegetais que não apresentam algum mecanismo de tolerância, havendo assim aumento nos níveis de MDA. Já que o MDA é um dos produtos finais da modificação oxidativa de lipídios, e é responsável por danos na membrana celular, incluindo alterações nas propriedades intrínsecas da membrana, tais como a fluidez, transporte de íons, a perda de atividade enzimática e reticulação de proteínas (LABUDDA, 2013).

A compatibilidade de endófitos e a aptidão do hospedeiro podem ser avaliadas através da análise de alterações oxidativas em folhas. Onde, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e MDA podem ser avaliados como critérios promissores na determinação da sensibilidade do hospedeiro. O aumento de H_2O_2 e do nível de MDA em folhas são provas previstas de danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs). Espécies reativas de oxigênio provocam danos oxidativos em biomoléculas tais como lipídios e proteínas, eventualmente, levando à morte da planta (DEL RIO et al., 2003). Rizobactérias produzem enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), a peroxidase (POX), catalase (CAT) e antioxidantes não-enzimáticos, tais como o ascorbato, glutathiona, e tocoferol. Promovendo a desintoxicação de H_2O_2 e MDA celular através da atividade do ciclo de detoxificante Asada-Halliwell, onde este é um importante elemento de mecanismos de defesa da planta contra EROs (LEE; LEE, 2000).

5.5 Teor de prolina

Analisando a figura 6, nota-se que houve diferença significativa entre os tratamentos de estresse hídrico, em seus respectivos fatores, quando não inoculado e inoculado, nos teores de prolina. Por outro lado, não se diferenciando entre si nos tratamentos de SV e SVR da capacidade de campo para o arroz não inoculado.

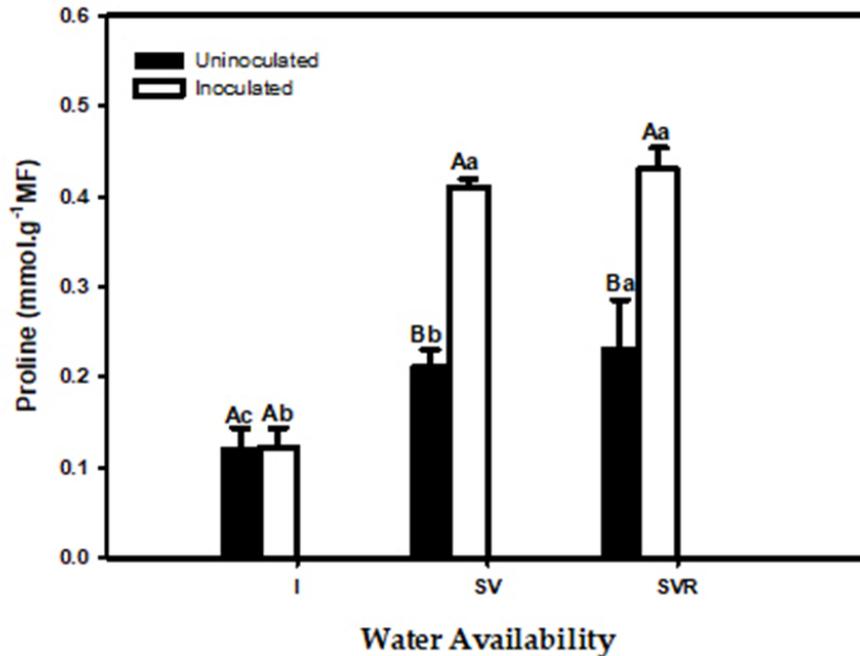


Figura 6. Teor de prolina (mmol.g⁻¹MF) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

Houve aumento linear na atividade do teor de prolina no genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação (Figura 6). A ação desse osmorregulador foi mais intensificada quando as plantas passaram por um déficit hídrico recorrente, nas plantas inoculadas.

A planta mesmo sem passar por nenhum processo de restrição hídrica produz pequenas quantidades de prolina no seu metabolismo, mas quando ocorre o estresse há um acúmulo desse osmorregulador, que atua como um adaptador de tolerância das plantas sob restrição hídrica, e aumenta também o ajuste osmótico da célula.

A *G. diazotrophicus* é uma bactéria endofítica, vive no interior da planta, não apenas nas raízes, e capaz de fixar nitrogênio atmosférico. Segundo Grover et al. (2011), as plantas podem produzir substâncias osmotolerantes, como a prolina, que pode ser estimulada na presença de bactérias nas plantas em respostas a estresses bióticos e abióticos, pode mediar o ajuste osmótico, e proteger membranas e proteínas contra efeitos adversos do aumento da concentração de íons

inorgânicos.

Trabalhos como de Abdul Jaleel et al. (2007), estudando os efeitos da prolina no arroz constatou-se sua função osmoprotetora como sendo um dos mecanismos adaptativos dos vegetais aos inúmeros efeitos causados pelos estresses abióticos, mantendo-se o equilíbrio hídrico e preservando a integridade celular de proteínas, enzimas e membranas.

Em plantas sob estresse, o conteúdo de prolina pode aumentar até 100 vezes, em comparação ao observado em plantas cultivadas sob condições normais, esse acúmulo fornece um importante parâmetro para a seleção de plantas resistentes (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008), é comum a constatação de que teores aumentados de prolina atenuam os efeitos do estresse hídrico (CVIKROVÁ et al., 2013; FILIPPOU et al., 2014).

A prolina, também pode ser considerada como um marcador do déficit hídrico, o que indica que as plantas inoculadas, caracterizada por um maior acúmulo de prolina, foram menos estressadas do que as plantas não inoculadas. Além disso, a prolina pode atuar como um eliminador eficaz de EROs na proteção contra a desnaturação e na estabilização de membranas e estruturas subcelulares (KISHOR et al., 2005).

A inoculação com *Azospirillum* leva a um teor mais elevado de prolina (KANDOWANGKO et al., 2009) e aminoácidos livres em milho sob condições de estresse hídrico (SANDHYA et al., 2010). Verbruggen e Hermans (2008), relataram que a acumulação de prolina é uma das alterações mais conhecidas induzidas pelo estresse hídrico e salino em plantas. Kandowangko et al. (2009), observaram que a inoculação do milho com *Azospirillum* provoca um aumento no teor foliar de prolina. Várias estirpes de rizobactérias tais como, *Burkholderia* (BARKA et al., 2006), *Arthrobacter*, *Bacillus* e (SZIDERICS et al., 2007), aumentam a síntese de prolina em plantas estressadas, o que ajuda na manutenção da célula, ajudando assim a planta a lidar com o estresse hídrico. Prolina pode aumentar a atividade de várias enzimas, estabilizando o pH dentro da célula e levando a uma manutenção da atividade antioxidante combatendo espécies reativas de oxigênio (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

O acúmulo de prolina é um dos meios naturais de adaptação ao estresse ambiental. A prolina é um osmólito não-tóxico e bom em manter a osmoregulação sob estresse hídrico (AHMAD; JHON, 2005; AHMAD; SHARMA, 2008; AHMAD, 2010; AHMAD et al., 2010, 2011, 2012; KATARE et al., 2012; RASOOL et al., 2013a, b). Prolina também atua como armazenamento de energia (ou seja, C e N) durante o estresse salino (GOAS et al., 1982; AGGARWAL et al., 2012). O acúmulo de prolina aprimorado pode estar ligado com o aumento da capacidade de fixação biológica de nitrogênio em plantas como demonstrado por Evelin et al., (2009) em feijão guandu.

5.6 Glicina betaína

Com relação à atividade da glicina betaína, observou-se na figura 7, o acúmulo com aumento da restrição hídrica nas plantas de arroz vermelho principalmente com estresse recorrente, isso aconteceu para as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, talvez tenha sido devido que, a síntese da glicina betaína é desencadeada a partir da falta de água no meio celular (SZABADOS et al., 2011).

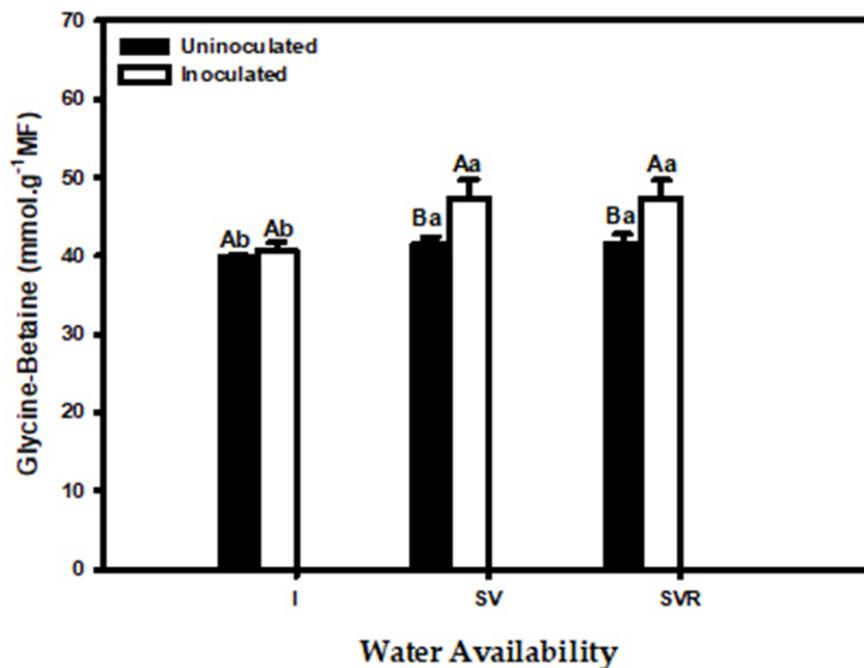


Figura 7. Teor de glicina betaína (mmol.g⁻¹MF) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

Já que a glicina betaína é um composto que pode desempenhar proteção eficaz contra o estresse (CHEN e MURATA, 2008; ASHRAF e FOOLAD, 2007), podendo ser acumulativa e não tóxica para a planta, além de equilibrar a diferença osmótica em torno da célula e do citosol (WANI et al., 2013). Segundo Ashraf e Foolad (2007), atua também como o protetor das membranas dos tilacóides que faz com que mantenha a eficiência da fotossíntese.

Constatou-se que, com estresse hídrico recorrente se obteve uma maior absorção de glicina betaína nas plantas inoculadas, diferindo estatisticamente dos não inoculados. Conclui-se então que a bactéria possa ter exportado glicina betaína para a planta, já que alguns microrganismos como a própria *G. diazotrophicus* tem a capacidade de estimular o crescimento com a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, aumento da produtividade. Por conseguinte, as bactérias também produzem substâncias osmotolerantes como a glicina betaína, que atua

juntamente com outros compostos vegetais na redução do potencial hídrico das células, ajudando assim na tolerância à seca, ao frio e a salinidade (DIMKPA et al., 2009).

Mas muitas culturas não se acumulam glicina betaína naturalmente, e o arroz é uma delas, é o único cereal que tem duas enzimas betaína aldeído desidrogenase (BADH), que estão envolvidas na biossíntese de glicina betaína, via colina, e um gene codificador mono-oxigenase de colina (OCM), ambos os quais estão localizados no estroma do cloroplasto (WANI et al., 2013), fazendo com que só ocorra acúmulo de glicina betaína quando a planta está sob estresse (SHIRASAWA et al., 2006), isso deve se explicar o fato de que as plantas de arroz vermelho teve pouca acumulação de glicina betaína sem restrição hídrica.

Em pesquisas realizadas por Carlim e Santos (2009), com indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar, verificaram que a glicina betaína contribui para o ajuste osmótico em plantas jovens de cana-de-açúcar, sob o efeito interativo dos estresses moderados de acidez ($V = 55\%$ a $V = 34,9\%$), em solos com baixo potencial hídrico.

Glicina betaína (GB) fornece provas substanciais que sustentam seu conceito como soluto osmoprotetor. Sendo sintetizada por apenas alguns microorganismos e ativamente transportada e acumulada como um osmoprotetor por uma grande variedade de células (CSONKA e HANSON, 1991). É geralmente aceito que um osmoprotetor deve ser acumulado duradouramente dentro da célula para ser eficaz. Este conceito foi estabelecido com base em estudos de membros da família Enterobacteriaceae e várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Sinorhizobium meliloti*, que catabolizam a maioria dos osmoprotetores conhecidos, incluindo GB e ectoíne (TALIBART et al., 1997).

Jha et al. (2010), relataram que o arroz em casca (*Oryza sativa L.*), inoculado com *P. Pseudomonas* mostrou-se significativamente mais elevado na concentração de compostos quaternários de GB e uma biomassa da parte aérea superior sob condições de estresse hídrico.

A glicina betaína protege as plantas contra efeitos adversos do estresse hídrico. As plantas tratadas com bactérias endofíticas acumulam glicina betaína sob estresse e, assim, evita qualquer dano a plantas. Vários relatos têm mostrado que as plantas tratadas com bactérias endofíticas aumentam a produção de glicina betaína que contribuem para o ajuste osmótico das plantas e, portanto, resulta em um processo fotossintético mais eficaz (SHENG et al., 2011).

5.7 Análises Moleculares

5.7.1 Expressão gênica

De acordo com os dados obtidos a partir da análise $2^{-\Delta\Delta CT}$, verificou-se efeito significativo para a expressão relativa dos genes: Superóxido dismutase (SOD1), Ascorbato Peroxidase (APX), Catalase (CAT) e Glutathiona redutase (GOR).

Verificou-se diferença significativa entre todos os tratamentos, para todos os genes estudados (figura 8). Analisando-se a figura, nota-se que, o tratamento das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse recorrente foram estatisticamente superiores aos demais.

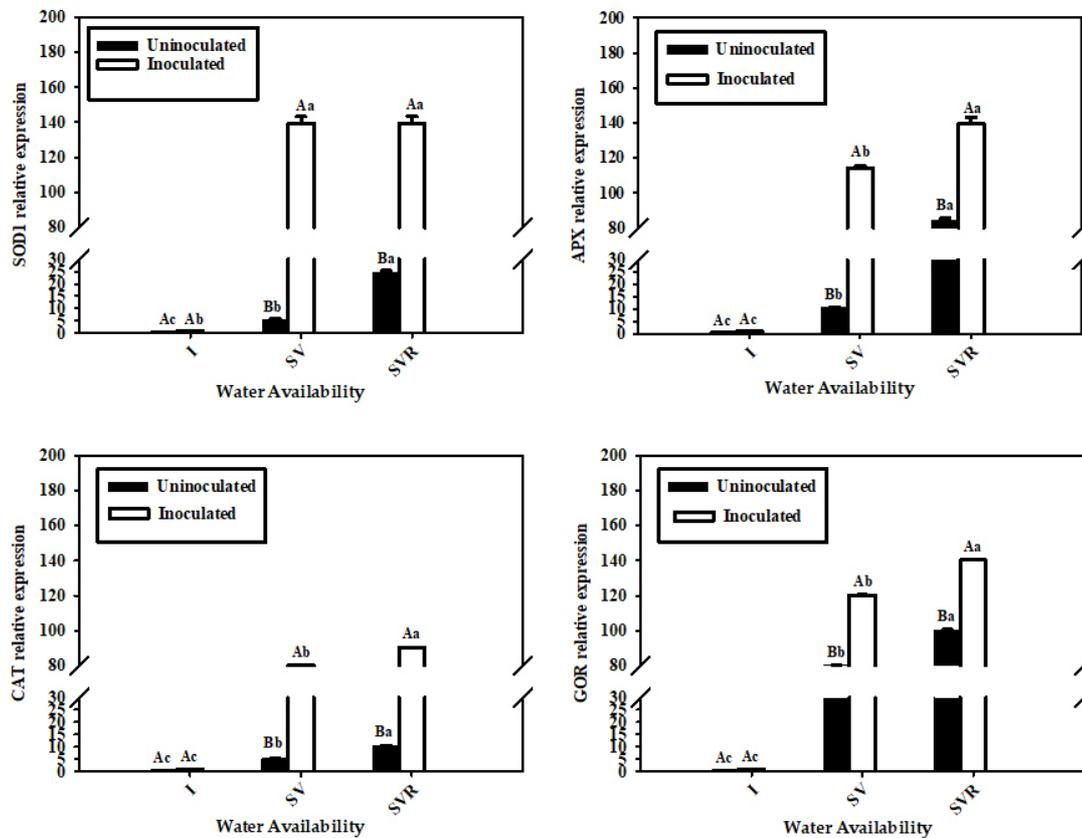


Figura 8. Valores de expressão relativa em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

O tratamento das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse recorrente promoveram incrementos de 140x na expressão relativa de SOD1, de 145x na expressão de APX, 90x na expressão de CAT e de 135x na expressão de GOR, em relação ao tratamento das totalmente irrigadas. Verificaram-se ainda aumentos de 140x, 120x, 85x e 125x (SOD1, APX, CAT e GOR), para o tratamento inoculado com *G. diazotrophicus* com estresse apenas na fase vegetativa.

O déficit hídrico induz a expressão de uma grande variedade de genes desencadeando uma complexa rede de respostas que se estende desde a percepção e reconhecimento do sinal de estresse, passando pela ativação de genes de resposta adaptativa (p. ex. fatores de transcrição induzidos em estômatos), até os genes envolvidos na resposta final (enzimas do sistema antioxidativo) (Lee et al., 2009; You et al., 2013; Singh et al., 2015; Basu et al., 2016).

Silveira et al. (2015), notou em seus estudos sobre os mecanismos genéticos envolvidos na tolerância à seca para variedades de arroz de terras altas o transcrito de duas variedades da

subespécie japonesa, contrastantes quanto à tolerância e sensibilidade ao déficit hídrico, foi analisado via RNA-seq, dos quais foram identificados centenas de genes envolvidos em rotas metabólicas associadas à produção de metabólitos secundários, genes relacionados à sinalização celular, fatores de transcrição, proteínas protetoras funcionais da célula e enzimas de detoxificação celular.

Santos (2017), observou em seus estudos sobre validação de genes candidatos de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.) para tolerância à seca, que o gene SOD apresentou o maior nível de expressão em todos os genótipos na condição de maior restrição hídrica, com maiores níveis de expressão nos genótipos menos produtivos em condição de estresse. Basu et al. (2010), utilizando arroz da variedade *Indica* induzidos à seca por polietileno glicol (PEG) foi demonstrado um aumento na atividade de SOD induzido por seca. Dessa forma, tais resultados evidenciam a ativação desse mecanismo de defesa antioxidativo quando submetido a deficiência hídrica.

Carvezan (2012), utilizando os genes de APX em arroz (*Oryza sativa* L.) com o intuito de identificar a função dos diferentes membros dessa família no controle dos níveis de EROs na planta submetida a estresses abióticos. Observou que cada gene de APX em arroz mostrou padrão diferencial de expressão nos diferentes tratamentos e estresses, sugerindo que as isoformas de ascorbato peroxidases estão amplamente relacionadas com a detoxificação de ERO produzidas sob diferentes condições de estresse. A regulação diferencial dos oito membros revela a complexidade do sistema antioxidante nas plantas.

Simova-Stoilova et al. (2010), trabalhando com estresse por seca, relataram aumento da atividade da CAT, especialmente em variedades sensíveis em plantas de trigo, mitigando o estresse. Já Vighi (2016) observou a eliminação de H₂O₂ em plantas de arroz sensíveis e tolerantes a salinidade. Pereira et al. (2015), estudando a expressão de enzimas e proteínas resistentes ao calor de linhagens elites de arroz de terras altas submetidas ao estresse hídrico, no momento do florescimento, observou que algumas variedades apresentaram maior decomposição de peróxido de hidrogênio pela SOD, necessitando da intensa atividade da CAT para manter a boa qualidade da semente.

Cardoso (2000), analisando as alterações de crescimento e bioquímicas causadas pelo efeito do Cádmio (Cd) em arroz, notou um aumento relativo aos níveis de atividade de enzimas antioxidantes, como CAT e GOR, que mostraram padrões semelhantes de resposta tanto para Catalase (CAT) como para (GOR), observando-se elevação das atividades dessas enzimas antioxidantes em folhas e raízes. Rossato (2016), analisando alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares de arroz, cv. BRS AG, em resposta ao estresse salino, observou que a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GOR parecem ser efetivas na proteção dessas plantas contra o estresse oxidativo.

5.7.2 Porcentagens de Metilação

De acordo com os dados obtidos a partir da análise COBRA e posterior sequenciamento, verificou-se efeito significativo para a porcentagem de metilação dos genes: Superóxido dismutase (SOD1), Ascorbato Peroxidase (APX), Catalase (CAT) e Glutaciona redutase (GOR).

Verificou-se diferença significativa entre todos os tratamentos, para todos os genes estudados (figura 9). Analisando-se a figura, nota-se que, o tratamento das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse recorrente foram estatisticamente hipometiladas aos demais.

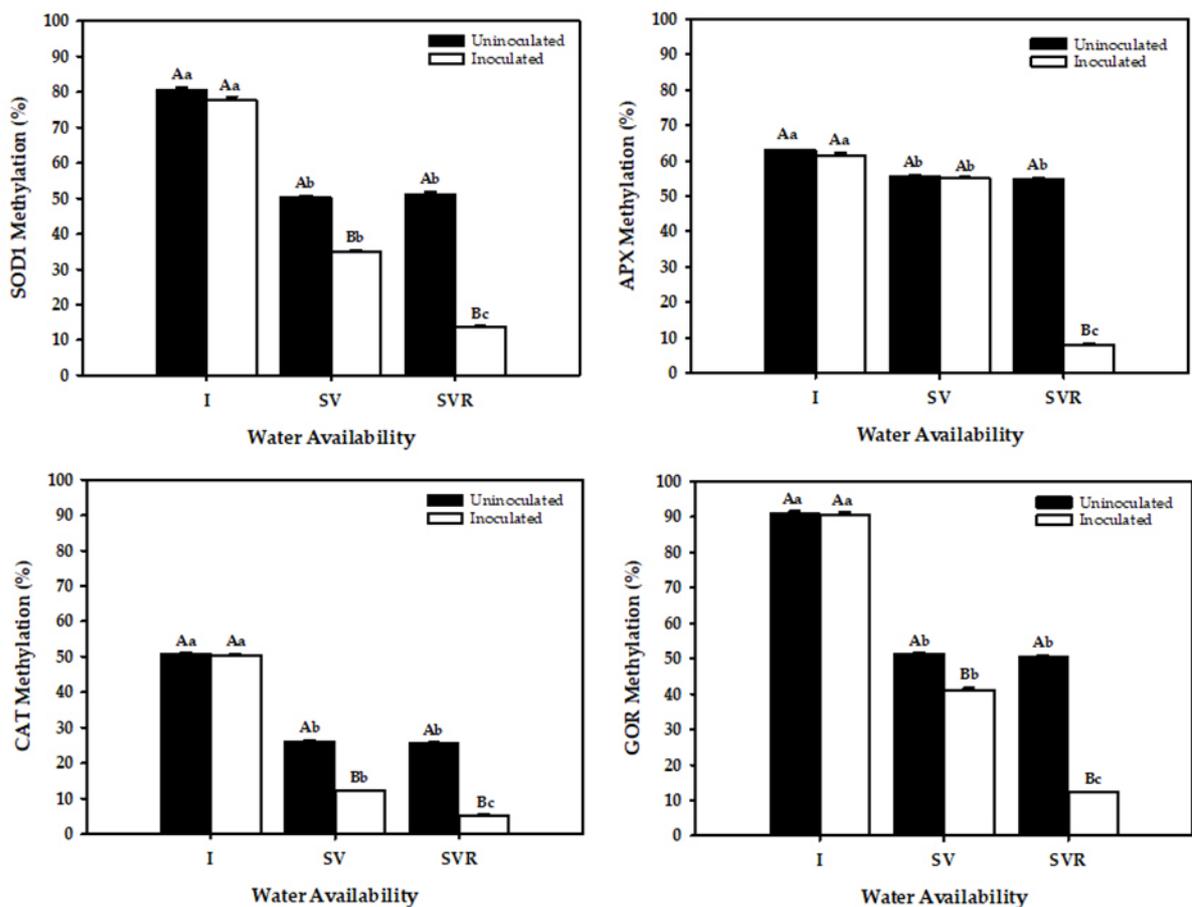


Figura 9. Valores de porcentagem de metilação em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

O tratamento das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse recorrente promoveram decréscimos de 70% na metilação de SOD1, de 50% na metilação de APX, 35% na metilação de CAT e de 80% na metilação de APX, em relação ao tratamento das plantas totalmente irrigadas.

Estudos demonstraram que os genes estão muito pouco metilados em tecidos onde são

ativamente expressos e muito metilados em tecidos (ou no mesmo tecido em outro estágio de desenvolvimento) onde estão silenciosos (Cedar, 1988). Então, provavelmente a metilação do DNA deverá estar envolvida na expressão gênica. A cromatina que contém genes ativamente expressos é mantida numa estrutura que a torna mais susceptível ao ataque das nucleases e, presumivelmente, mais acessível aos fatores de transcrição do que a cromatina que contém genes inativos.

6. CONCLUSÕES

A inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus*, mostrou ser uma potencial ferramenta contra o estresse hídrico em arroz vermelho;

O arroz vermelho apresenta ajustes bioquímicos e moleculares em função da disponibilidade hídrica do ambiente em que se desenvolve. No entanto, sob condições de inoculação com *G. diazotrophicus* as condições de deficiência hídrica são mitigadas;

As plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* destacam-se quanto a sua memória molecular, com menores valores de metilação em genes chaves, para respostas ao estresse hídrico.

7. REFERÊNCIAS

ABDUL JALEEL, C.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, India, v.59, n.2, p.150-157, 2007.

ADESEMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant-microbe's interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 1-12, 2009.

AGGARWAL, A.; KADIAN, N.; KARISHMA, N.; TANWAR, A.; GUPTA, K. K. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of salinity stress. *Journal of Applied and Natural Science*, India, v. 4, n. 1, p. 144-155, 2012.

AHMAD, P.; HAKEEM, K. R.; KUMAR, A.; ASHRAF, M.; AKRAM, N. A. Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). **African Journal of Biotechnology**, Bethesda, v. 11, n. 11, p. 2694-2703, 2012.

AHMAD, P.; JALEEL, C. A.; SHARMA, S. Antioxidative defence system, lipid peroxidation, proline metabolizing enzymes and biochemical activity in two genotypes of *Morus alba* L. Subjected to NaCl stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, India, v. 57, n. 4, p. 509-517, 2010.

AHMAD, P.; JHON, R. Effect of salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L. **Archives of Agronomy and Soil Science**, New Delhi, v 51, n. 6, p. 665-672, 2005.

AHMAD, P.; SHARMA, S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. **Plant Soil and Environment**, Washington, v. 54, n. 3, p. 89-99, 2008.

AHMAD, P. Growth and antioxidant responses in mustard (*Brassica juncea* L.) plants subjected to combined effect of gibberellic acid and salinity. **Archives of Agronomy and Soil Science**, Srinagar, v. 56, n. 5, p. 575-588, 2010.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Pakistan, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.

ALSDURF, J.; ANDERSON, C.; SIEMENS, D. H. Epigenetics of drought-induced trans-generational plasticity: consequences for range limit development. **AoB Plants**, v. 8, 2016, <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv146>.

ALVARENGA, D. J. M. **Caracterização de mecanismos envolvidos com a homeostase de espécies reativas de oxigênio na resposta de plantas a diferentes estresses**. 2016. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ASENSIO, D.; RAPPARINI, F.; PEÑUELAS, J. AM fungi root colonization increases the production of essential isoprenoids vs nonessential isoprenoids especially under drought stress conditions or after jasmonic acid application. **Phytochemistry**, Bethesda, v. 77, n. 1, p. 149-161, 2012.

ARAUJO, F. F.; CREMONEZI, A. C. T.; MANRIQUE, A. E. R.; GONZAGA, E. N.; OLIVEIRA, G. C.; MAZZUCHELLI, R. C. L.; Seleção de rizobactérias para promoção do crescimento de algodoeiro. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 8, n. Especial, p. 32-38, 2012.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

AZAMBUJA, I. H. V.; VERNETTI, F. J.; MAGALHÃES, A. M. Aspectos socioeconômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES, A. M. (Eds.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. 1. ED. Brasília, Brasil: EMBRAPA, p. 23-44. 2004.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 290p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 1996.

BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF wint non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 911-922, 1997.

BARBIERI JUNIOR, E. **Características estruturais, teores de clorofila e suas relações com o nitrogênio foliar e a biomassa em capim-Tifton 85**. Seropédica, 2009. 64p. Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2009.

BARÇA, E. A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 7246-7252, 2006.

BARRETO, H. B. F. **Variabilidade espacial de atributos do solo que influenciam a produção de arroz vermelho no vale do apodi-RN**. Mossoró, RN, 2012. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal Rural do Semi-árido.

BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A.; PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**. v. 5, 2016.

BASU, S.; ROYCHOUDHURY, A.; SAHA, P. P.; SENGUPTA, D. N. Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 60, n. 1, p. 51-59, 2010.

BATES, L.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D.; Rapid determination of free proline for water - stress studies. **Plant and Soil**, EUA, v.39, n.1, p. 205-207, 1973.

BECKER C.; HAGMANN J.; MÜLLER J.; KOENIG D.; STEGLE O.; BORGWARDT K.; WEIGEL D. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. **Nature**, v. 480, p. 245-249, 2011.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003.

BERTALAN et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, p. 450-483, 2009.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRECHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTOMARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; RHEL PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C.

Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, Rio de Janeiro, v. 10, n.450, p.1-17, 2009.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUCE, T. J.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; & PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, 603-608, 2007.

BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell and Environmental**, n.40, v. 1, p. 4-10, 2016. DOI: 10.1111/pce.12800

CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine Max*). **Physiologia Plantarum**, Germany, v.83, n. 3, p.463-468, 1991.

CAMPESTRINI, R.; PRATES, R. G.; SOUSA, S. A.; OLIVEIRA, T. C.; SILVA, J.; FIDELIS, R. Eficiência de genótipos de arroz no uso de nitrogênio em solos de terras altas. **Pesq. agropec. pernamb.**, Recife, v. 19, n. 1, p. 25-32, 2014. DOI: <https://doi.org/10.12661/pap.2014.005>.

CARDOSO, P. F. **Resposta de linhagens de arroz à exposição ao cádmio**. 2000. 72 p. Dissertação (Pós-graduação em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

CARLIM, S. D.; SANTOS, D. M. M. dos. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1106-1113, 2009.

CASTRO, P. R. C. Uso de Aminoácidos na Agricultura. Abisolo. Disponível em:<<http://abisolo.com.br/img/7forumpdf/1%20dia/2%20%20Efeitos%20dos%20Amino%20%C3%A1cidos%20na%20Produtividade.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2022.

CAVERZAN, A. **Inter-relações entre estresse oxidativo e estresses abióticos em arroz (*Oryza sativa* L.): o papel das ascorbato peroxidases nas respostas de defesa**. 2012. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988.

CEOLIN, W. C.; SCHREIBER, F.; ANDRES, A.; CONCENCO, G.; MOISINHO, I. S.; CORADINI, M. C.; MARTINS, M. B.; BEHENCK, J. P. Efeito do herbicida imazapyr+imazapic

em diferentes doses no controle de arroz vermelho e capim arroz. In: **Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, 2017, Gramado. Intensificação sustentável. Porto Alegre: IRGA, 2017.

CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell**. v. 53, n. 3, p. 4. 1988.

CHEN L., CHEN J. Changes of cytosine methylation induced by wide hybridization and allopolyploidy in Cucumis. **Genome**, v. 51, n. 10, p. 789-799, 2008.

CHEN T. H. H.; MURATA, N. Glycine betaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends in Plant Science**, USA, v. 13, n. 9, p. 499-505, 2008.

COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. Spirulina platensis Effects on the Levels of Total Cholesterol, HDL and Triacylglycerols in Rabbits Fed with a Hypercholesterolemic Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Passo Fundo, v. 51, n. 2, p. 405-11, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 6, n. 4, SAFRA 2018/19 – Quinto levantamento: Fevereiro 2019. Brasília, CONAB, 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-arroz>> . Acesso em: 30 de out. 2019.

CORTÉS, D. C. L. **Tolerância ao alumínio em cultivares de arroz (Oryza sativa L.) colombinos e brasileiros**. 2018. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A uniform, objective and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, Stuttgart, v.40, n.1, p.436-443, 2000.

CSONKA, L. N.; HANSON, A. D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Review of Microbiology**, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 569-606, 1991.

CRUSCIOL, C. A. C. et al. Produção e qualidade fisiológica de sementes de arroz de terras altas em função da disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 287-293, 2001.

CRUSCIOL, C. A. C.; SORATTO, R. P.; NASCENTE, A. S.; ARF, O. Root distribution, nutrient uptake, and yield of two upland Rice cultivars under two water regimes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 105, n.1, p. 237-247, 2013.

CVIKROVÁ, M.; GEMPERLOVÁ, L.; MARTINCOVÁ, O.; VANKOVÁ, R. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline over producing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Czech Republic, v.73, n.1, p.7-15, 2013.

DALL'ASTA, P. **Interação entre o milho (*Zea mays*), a bactéria benéfica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* e o fungo patogênico *Colletotrichum graminicola***. 2017. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; ALTOMARE, D. A.; ZILINSKAS, B. A. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Bethesda, v. 54, n. 384, p. 923-933, 2003.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell and Environment, Germany**, v.32, n.1, p.1682–1694, 2009.

DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought 'train' transcriptional responses in Arabidopsis. **Nature Communications**, v. 3, p. 740, 2012.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p.227-243, 2012.

DU JARDIN, P. Plant bioestimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**. v. 196, p. 3-14, 2015.

EVELIN, H.; KAPOOR, R.; GIRI, B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 7, p. 1263-1280, 2009.

ELSHEERY, N.; CAO, K. F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiologies Plantarum**, China, v. 30, n. 6, p. 769-777, 2008.

EMBRAPA - ARROZ E FEIJÃO. **Sistemas de Produção**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#arroz>>. Acesso em: 31 de out 2019.

EMBRAPA. **Lançada primeira cultivar de arroz vermelho desenvolvida no Brasil**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39540267/lancada-primeira-cultivar-de-arroz-vermelho-desenvolvida-no-brasil>>. Acesso em: 29 de out. 2019.

FAGOTTI, D. S. L.; CERZINI, P.; DELAMUTA, L. R. M.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas de Milho em Cultivos Convencional e Agroecológico. In: **Fertbio**, 2012. Macéio. *Anais...* Macéio, AL: SBCS, 2012.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: 29/10/2019.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews**, London, v. 4, p. 143 -153, 2004.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.

FERREIRA, J. S. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**, Seropédica, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

FILGUEIRAS, L.; SILVA, R.; ALMEIDA, I.; VIDAL, M.; BALDINI, J. I.; MENESES, C. H. S. G. *Gluconacetobacter diazotrophicus* mitigates drought stress in *Oryza sativa* L. **Plant Soil**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04163-1>

FILIPPOU, P.; BOUCHAGIER, P.; SKOTTI, E.; FOTOPOULOS, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, Greece, v.97, n.1, p.1-10, 2014.

FONSECA, J. R.; PEREIRA, J. A.; SILVA, S. C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C. **Resgate de arroz vermelho (oryza sativa l.) nos estados da Paraíba e Ceará**. Disponível em: <www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_196/trabalhos/CBC-TRAB 5-2.pdf>. Acesso em: 30 de out. 2019.

GAYACHARAN, A.; JOEL, J. Epigenetic responses to drought stress in Rice (*Oryza sativa* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, p. 379–387, 2013.

GEALY, D. R.; AGRAMA, H.; JIA, M. H. Genetic analysis of atypical U.S. red rice phenotypes: indications of prior gene flow in rice fields? **Weed Science**, v.60, n.3, p.451-461, 2012.

- GIBBS, W. W. Além do DNA. Genoma: o código da vida. **Scientific American**, São Paulo, n. 16, p. 44-51, 2007.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GIRI, B.; MUKERJI, K. G. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. **Mycorrhiza**, Bethesda, v. 14, n. 5, p. 307-312, 2004.
- GOAS, G.; GOAS, M.; LARHER, F. Accumulation of free proline and glycine betaine in *Aster tripolium* subjected to a saline shock: a kinetic study related to light period. **Plant Physiology**, Malden, v. 55, n. 3, p. 83-388, 1982.
- GHOBADI, M.; TAHERABADI, S.; GHOBADI, M. E.; MOHAMMADI, G. R.; JALALIHONARMAND, S. Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. **Industrial Crops and Products**, Kermanshah, v. 50, n. 1, p. 29-38, 2013.
- GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Australia, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.
- GRIEVE, C. M.; GRATTAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, EUA, v.70, n.2, p.303-307, 1983.
- GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, India, v.27, n.1, p.1231-1240, 2011.
- GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; OLIVEIRA, J. P.; RANGEL, P. H. N.; RODRIGUES, C. A. P. Sistema radicular do arroz de terras altas sob deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.41, n.1, p.126-134, 2011.
- GUIMARAES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. **Revista Ciência Rural**, Belém, v.56, n.1, p. 125-132, 2013.
- HABU, Y.; KAKUTANI, T.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. **Current opinion in genetics & development**, v. 11, n. 2, p. 215-220, 2001.

- HADIARTO, T.; TRAN, L. P. Progress studies of drought-responsive genes in rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 297-310, 2011.
- HANSON, M. A.; SKINNER, M. K. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. **Environmental epigenetics**, v. 2, n. 1, 2016.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Netherlands, v.16, n.10, p. 463-471, 2008.
- HARSH, A., SHARMA, Y. K., JOSHI, U., RAMPURIA, S., SINGH, G., KUMAR, S., SHARMA, R. Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*). **Annals of Agricultura Sciences**, v. 61, n. 1, p. 57-64, 2016.
- HASHIGUCHI, A.; AHSAN, N.; KOMATSU, S. Proteomics application of crops in the context of climatic changes. **Food Research International**, v.43, p.1803-1813, 2010.
- HATZIG, S., ZAHARIA, L. I., ABRAMS, S., HOHMANN, M., LEGOAHEC, L., BOUCHEREAU, A., SNOWDON, R. J. Early osmotic adjustment responses in drought-resistant and drought-sensitive oilseed rape. **Journal of integrative plant biology**, v. 56, n. 8, p. 797-809, 2014.
- HISCOX, J. D.; ISRAELTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, Canadá, v. 57, n.12, p. 1332-1334, 1979.
- JÉLIC, G.; BOGDANOVIC, M. Antagonism between abscisic acid and cytokinin in chlorophyll synthesis in pine seedlings. **Plant Science**, Yugoslávia, v. 61, n. 2, p. 197-202, 1989.
- JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 253-262, 2007.
- JHA, Y.; SUBRAMANIAN, R. B.; PATEL, S. Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Gujarat, v. 33, n. 3, p. 797-802, 2010.
- KANDOWANGKO, N. Y.; SURYATMANA, G.; NURLAENY, N.; SIMANUNGKALIT, R. D. M. Proline and abscisic acid content in droughted corn plant inoculated with *Azospirillum* sp. and arbuscular mycorrhizae fungi. Hayati. **Journal Bioscience**, Indonésia, v. 16, n. 1, p. 15-20, 2009.
- KATARE, D. P.; NABI, G.; AZOOZ, M. M.; AERI, V.; AHMAD, P. Biochemical modifications and enhancement of psoralen content in salt-stressed seedlings of *Psoralea corylifolia* Linn. **Environmental and Experimental Botany**, India, v. 2, n. 1, p. 65-74, 2012.

KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress, **Molecular Breeding**, v. 21, p. 159-172, 2007.

KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The family Acetobacteraceae: the genera Acetobacter, Aciodomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. In: **DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E.** (Eds.). *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Alpha and beta ub classes*. New York: Springer, v. 5, p.163-200, 2006.

KISHOR, P. K. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; LAXMI, P. S.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASALUNU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, India, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

LABUDDA, M. **Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought**. An effective tool for plant breeding, 2013. Disponível em:<<http://www.ewydawnictwo.eu/Document/DocumentPreview/3342>>. Acesso em: 10 Jul. 2022.

LEE, S. C., LAN, W., BUCHANAN, B. B., LUAN, S. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 15, n. 106, p. 50, 2009.

LEE, D. H.; LEE, C. B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Bethesda, v. 159, n. 1, p. 75-85, 2000.

LI, R.; SHI, F.; FUKUDA, K.; YANG, Y. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Soil Science & Plant Nutrition**, v.56, p.725-733, 2010. doi: 10.1111/j.1747-0765.2010.00506.x.

LIONETTI, V.; CERVONE, F.; BELLINCAMPI, D. Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. **Journal of Plant Physiology**, Roma, v. 169, n. 16, p. 1623-1630, 2012

LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. **Mol Plant**, v. 7, n. 3, p. 502-513, 2014. doi: 10.1093/mp/ssu001

LIU, C.; LIU, Y.; GUO, K.; FAN, D.; LI, G.; ZHENG, Y.; YU, L.; YANG, R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst

- habitats of southwestern. **Environmental and Experimental Botany**, China, v. 71, n. 2, p. 174-183, 2011.
- LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n.13, p. 3509-3517, 2010.
- MARIANI, L.; FERRANTE, A. Agronomic Management for Enhancing Plant Tolerance to Abiotic Stresses - Drought, Salinity, Hypoxia, and Lodging. **Horticulturae**, v. 52, 2017.
- MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; ARAÚJO, J. L. S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 1448-1458, 2011.
- MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; PEREIRA, M. B.; LOPES, H. M.; COSTA, E. M.; CURTI, A. T. M. Características morfoagronômicas de dois genótipos de arroz vermelho em cultivo inundado. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. Recife, v.7, n.3, p. 394-401, 2012.
- MENG, F.; GLASER, S. S.; FRANCIS, H.; YANG, F.; HAN, Y.; STOKES, A.; ZHAO, H. Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 3, p. 804-817. 2012.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.
- MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F; CARVALHO, J. F. P. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stressinducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.
- MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.49, n.1, p.18-25, 2014.
- MORAN, J. F.; BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRECHILLA, S.; KLUCAS, R. V.; APARICIO-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, Plampona, v. 194, n. 3, p. 346-352, 1994.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p. 2006.

MURKUTE, A. A.; SHARMA, S.; SINGH, S. K. Studies on salt stress tolerance of citrus rootstock genotypes with arbuscular mycorrhizal fungi. **Horticultural Science**, Prague, v. 33, n. 2, p. 70-76, 2006.

MUNNE-BOSCH, S.; PENUELAS, J. Photo-and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. **Annals Botany**, Bethesda, v. 92, n.3, p. 385-391, 2003.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4530>>. Acesso em: 29 de out 2019.

NEVES, M. J.; TERENCEZI, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalases from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal Microbiology. Biotechnology**.v.10, p. 17-19, 1994.

OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M.; SANTOS, O. J. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and biotechnology Reports**, v. 3, n.1, p. 56-57. 2014.

OLIVEIRA, C. **Mudanças fisiológicas e moleculares na cultura do arroz e em plantas daninhas C3 e C4 submetidas a estresses abióticos**. 2017. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

OLIVEIRA, M. M.; RAMOS, E. T. A.; DRECHSEL, M. M.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I. Gluconacion from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1812-1826, 2018.

ORTEGA, N.; BUSTO, M.D.; PEREZ-MATEO, M. Kinetics of cellulose saccharification by *trichoderma reesei* cellulases. **International, Biodeterioration & Biodegradation**, Spain, v.47, n. 1, p. 7-14, 2001.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.324-349, 2005.

PEDROSO, B. A. Arroz irrigado no projeto Rio Formoso-Goiás. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.38, n. 361, p.8-14, 1985.

PEREIRA, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; CUTRIM, V. A.; RIBEIRO, V. Q. Comparação entre características agrônômicas, culinárias e nutricionais em variedades de arroz branco e vermelho. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.1, p. 243-248, 2009.

- PEREIRA, J. A.; MORAIS, O. P. **As variedades de arroz vermelho brasileiras**. Embrapa Meio-Norte, Documentos 229, Piauí: Teresina, 39 p. 2014.
- PEREIRA, G. C.; SANTOS, L. R.; VILLELA, G. M.; RIBEIRO, D. C.; NETO, A. R.; BOTELHO, F. B. S. Avaliação de linhagens de arroz de terras altas para tolerância à deficit hídrico por meio de expressão enzimática. In: CBMP – 8º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2015. Goiânia. *Anais...*Goiânia: WIN EVENTOS, 2015.
- PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; FONTES, E. P. B.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, Reino Unido, v. 167, n. 6, p. 1307-1314, 2004.
- PORTINHO, D. **Análise do padrão de metilação de dna de sequências LINE1 e dos genes SFRP1, SFRP2 e TP73 na inflamação crônica periodontal e câncer de boca**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Bucal) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba-SP.
- PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. 1. ed. Fortaleza, INCT Sal, 2010, p.472.
- RAPPARINI, F.; LLUSIÀ, J.; PEÑUELAS, J. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua*. **Plant Biology**, Bethesda, v.10, n. 1, p. 108-122, 2008.
- RAMIREZ, D. A.; ROLANDO, J. L.; YACTAYO, W.; MONNEVEUX, P.; MARES, V.; QUIROZ, R. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Sci**, n. 238, p. 26-32, 2015.
- RASOOL, R.; HAMEED, A.; AZOOZ, M. M.; REHMAN, M.; SIDDIQI, T. O.; AHMAD, P. Salt stress: causes, types and responses of plants. **Ecophysiology and responses of plants under salt stress**. Springer, New York, p. 497, 2013a.
- RASOOL, S.; AHMAD, A.; SIDDIQI, T. O.; AHMAD, P. Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. **Acta Physiol Plant**, Índia, v. 35, n. 4, p. 1039-1050, 2013b.
- RAZAK, M. A. A.; HOETTGES, K. F.; FATOYINBO, H. O.; LABEED, F. H.; HUGHES, M. P. Efficient dielectrophoretic cell enrichment using a dielectrophoresis-well based system, **AIP Scitation**, Estados Unidos, v. 7, n. 6, p. 064110,1- 064110,10, 2013.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p. 227-247, 2000.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A. VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.12, n.1, p.16-22, 1986.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V.B. Resposta da co-inoculação de bacterias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, Supplement1, p. 196-202, 2012.

ROUWS, L. F. M.; MENESES, C. H. S. G.; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; BALDANI J. I.; SCHWAB S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, p. 325–330, 2010.

ROSSATTO, T. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares de arroz, cv. BRS AG, em resposta ao estresse salino**. 2016. 116f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

ROUWS, L.F.M.; MENESES, C.H.S.G.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, p. 325–330, 2010.

SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. 2007. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SANDHYA, V.; ALI, S. K.Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, India, v.62, n.1, p. 21-30, 2010.

SANNAZZARO, A. I.; RUIZ, O. A.; ALBERTO, E. O.; MENÉNDEZ, A. B. Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus intraradices*. **Plant and Soil**, San Martin, v. 285, n. 1, p. 279-287, 2006.

SANTOS, B. C.; CARVALHO, F. T. A.; MENESES, C. H. S. G. Efeitos da inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no arroz vermelho, em função do manejo de deficiência hídrica na fase vegetativa. In: **CONIDIS - II Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido**, v. 1, 2017, Campina Grande. *Anais...* Campina Grande: REALIZE, 2017.

SANTOS, F. F. **Validação de genes candidatos de arroz de terras altas (*Oryza sativa* L.) para tolerância à seca**. 2017. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome?. **Trends in Plant Science**, v. 23, n.1, p. 25-41, 2018.

SHAN, X.; WANG, X.; YANG, G.; WU, Y.; SU, S.; LI, S.; LIU, H; YUAN, Y. Analysis of the DNA methylation of maize (*Zea mays* L.) in response to cold stress based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. **Journal of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 32-38, 2013.

SHARMA, S. D. Domestication and diaspora of rice. In: SHARMA, S. D. (Ed.). Rice: origin, antiquity and history. Boca Raton: CRC Press; New Hampshire: **Science Publishers**, 2010. cap. 1, p. 1-24.

SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. **Mycorrhiza**, Bethesda, v. 18, n. 6-7, p. 287-296, 2008.

SHENG, M.; TANG, M.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of Arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. **Mycorrhiza**, Bethesda, v. 21, n. 5, p. 423-430, 2011.

SHIRASAWA, K.; TAKABE, T.; TAKABE, T.; KISHITANI, S. Accumulation of glycine betaine in Rice plants that over express choline mooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. **Annals of Botany**, Japan, v. 98, n. 3, p. 565-571, 2006.

SIGMAPLOT. For windows, version 11.0. **Systat Software**, 2008.

SILVA, F. G.; **Comportamento fisiológico da berinjela cultivada em ambiente protegido sob taxas de reposição hídrica**. Catolé do Rocha, 2012. 48p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Licenciatura em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba.

SILVEIRA, R. D.; ABREU, F. R.; MAMIDI, S.; MCCLEAN, P. E.; VIANELLO, R. P.; LANNA, A. C.; CARNEIRO, N. P.; BRONDANI, C. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). **Genet Mol Res**. v. 14, n.3, p. 8181-200, 2015.

SIMOVA-STOILOVA, L.; VASEVA, I.; GRIGOROVA, B.; DEMIREVSKA, K.; FELLER, U. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 48, p. 200-206, 2010.

SINGH, D.; LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**. v. 6, n. 695, 2015.

SOARES, V. N.; RADKE, A. K.; TILLMANN, M. A. A.; MOURA, A.B.; SCHUCH, L. O. B. Desempenho fisiológico de sementes de arroz tratadas com rizobactérias e tiametoxam submetidas a diferentes temperaturas. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 186-193, 2014.

SPENCER, J.; RAGOUT, A. **Métodos microbiológicos**. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA, 2001.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Canadá, v. 15, n.1, p. 183-190, 2000.

SHUKLA, D.; KRISHNAMURTHY, S.; SAHI, S. V. Genome wide transcriptome analysis reveals ABA mediated response in Arabidopsis during gold (AuCl₄) treatment. **Plant Cell Reports**, USA, v. 5, n. 2, p. 1687-1699, 2012.

SWEENEY, M. T.; THOMSON, M. J.; PFEIL, B. E.; MCCOUCH, S. Caught red-handed: Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 283-294, 2006.

SZABADOS, L.; KOVÁCS, H.; ZIBERSTEIN, A.; BOUCHEREAU, A. Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. *Advances in Botanical Research*, France, v. 57, n. 1, p. 105-150, 2011.

SZIDERICS, A. H.; RASCHE, F.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A.; WILHELM, E. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Bethesda, v. 53, n. 11, p. 1195-1202, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TALIBART, R.; JEBBAR, M.; GOUFFI, K.; PICHEREAU, V.; GOUESBET, G.; BLANCO, C.; BERNARD, T.; POCARD, J. A. Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in saltstressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Bethesda, v. 63, n. 12, p. 4657-4663, 1997.

TANG, X. M.; TAO, X.; WANG, Y.; MA, D. W.; LI, D.; YANG, H.; MA, X. R. Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 6, p. 1075-1084, 2014.

TEJERA, N. A.; ORTEGA, E.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, Cuba, v. 95, n. 3, p. 528-535, 2003.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 10, 2013.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, Belgiun, v.35, n.1, p.753-759, 2008.

VELLOSO, C. C. V.; CARVELHO, C. G.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; PASTINA, M. M.; GUIMARAES, L. J. M.; TINICO, S. M. S. **Resposta Diferencial de genótipos de milho à inoculação com bactérias promotoras do crescimento de plantas**. Embrapa Milho e Sorgo, 2019, p. 27.

VIEIRA, N. R. A.; CARVALHO, J. L. V. Qualidade Tecnológica. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. cap. 21, p. 582-604.

VIGHI, I. L. **Estresses abióticos em arroz: respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas**. 2016. Tese (Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, Philadelphia, v. 14, p. 7-14, 2007.

WAKELIN, S. A.; GREGG, A.; SIMPSON, R. J.; LI, G. D.; RILEY, I. T.; MCKAY, A. C. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and Ncycling bacteria. **Pedobiologia**, v.52, p.237-251, 2009.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, v.61, p. 199-223, 2007.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heatstress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of Plant Research**, Faisalabad, v. 120, n. 2, p. 219- 228, 2007.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: Composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p.1184-1192, 2008.

WALTER, M. H.; STRACK, D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. **Natural Product Reports**, Bethesda, v. 28, n. 4, p. 663-692, 2011.

WANI, S. H.; SINGH, N. B.; HARIBHUSHAN, A.; MIR, J. I. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance - Role of glycine betaine. **Current genomics**, India, v. 14, n. 3, p. 157-165, 2013.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, USA, v.14, n.1, p. 1-4, 2009.

YOU, J.; ZONG, W.; LI, X. et al. The SNAC1-targeted gene OsSRO1c modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice. **Journal of Experimental Botany**. v. 64, n. 2, p.569-583, Jan. 2013.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: IRRI, 1981. 269 p.

ZAIN, M. E.; AWAAD, A. S.; OTHMAN, M. R. A.; AL-DOSARY. Antibacterial, antifungal activity and phytochemical analysis of some desert plants against human pathogenic bacteria and fungi. **Life Science Journal**, KSA, v. 11, n. 7, p. 343-349, 2014.

ZUCCARINI, P. Mycorrhizal infection ameliorates chlorophyll content and nutrient uptake of lettuce exposed to saline irrigation. **Plant, Soil and Environment**, San Martin, v. 53, n.3, p. 283-289, 2007.