

**ESTUDO COMPARATIVO DO USO DA TRANSGENIA AVP10X E DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, E RESPECTIVOS MECANISMOS DE
RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM ARROZ**

LETÍCIA CESPOM PASSOS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL - 2018**

**ESTUDO COMPARATIVO DO USO DA TRANSGENIA AVP10X E DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, E RESPECTIVOS MECANISMOS DE
RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM ARROZ**

LETÍCIA CESPOM PASSOS

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL - 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P289

Passos, Leticia Cespom.

Estudo comparativo do uso da transgenia AVP1OX e de bactérias diazotróficas, e respectivos mecanismos de resposta ao estresse hídrico em arroz / Leticia Cespom Passos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

76 f. : il.

Bibliografia: 52 - 65.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.
Orientador: Arnoldo Rocha Facanha.

1. AVP1. 2. Herbaspirillum seropedicae. 3. Estresse abiótico. 4. Bombas de Prótons. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

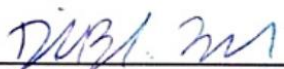
ESTUDO COMPARATIVO DO USO DA TRANSGENIA AVP10X E DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, E RESPECTIVOS MECANISMOS DE RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM ARROZ

LETÍCIA CESPOM PASSOS

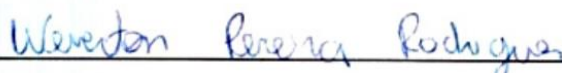
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 24 de abril de 2018

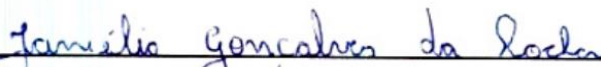
Comissão Examinadora



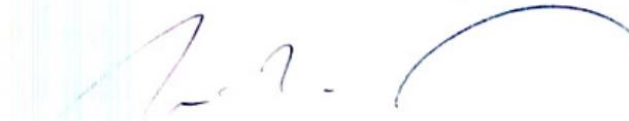
Prof. Daniel Basílio Zandonadi (D.Sc., Biotecnologia e Biociências) – UFRJ



Dr. Weverton Pereira Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Dr. Daniélio Gonçalves da Rocha (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF



Prof. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc. Química Biológica) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, minhas irmãs e meus avós, pelo amor, apoio e por sempre estarem ao meu lado acima de qualquer coisa.

À minha Tia Lena, (*in memoriam*) que se estivesse aqui, estaria muitíssimo feliz com mais essa conquista, e hoje, venho trazer esta dissertação como forma de agradecê-la por tudo que fez por mim.

Ao meu amado Hector, amigo e companheiro de vida, obrigada pelo amor, carinho e por nunca ter me deixado desanimar.

Ao amigo Sávio, que em todos os momentos esteve ao meu lado e me incentivou no decorrer deste mestrado, até mesmo quando eu acreditei que não seria possível.

Aos queridos amigos que me auxiliaram nas análises e no conhecimento científico adquirido, principalmente, Sávio, Enrico, Matheus, Letícia, Antônio, Brunna e Janiélio.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, que fizeram dessa caminhada um pouco mais fácil e mais divertida.

Aos amigos da Fisiologia Vegetal que estão nesta caminhada comigo desde a iniciação científica.

Ao meu co-orientador Fábio Olivares, que sempre acreditou no meu trabalho e sempre esteve disposto a me auxiliar na construção deste conhecimento.

Ao Professor Eliemar Campostrini, que sempre abriu as portas do seu laboratório e sempre me auxiliou quando precisei, contribuindo de forma veemente para a realização desta conquista.

Ao meu orientador Arnaldo Rocha Façanha que sempre me proporcionou todo o ambiente e ajuda possível para que esta etapa fosse concluída, além de todo o ensinamento passado, que foi de fundamental importância para o meu crescimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que torceram por essa conquista.

À FAPERJ, pela concessão da bolsa.

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A cultura do arroz	3
2.2. Estresse hídrico em plantas	4
2.3. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal	6
2.4. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	6
2.5. As Bombas de Prótons	8
2.5.1. AVP1: a H ⁺ -PPase vacuolar de plantas	9
3. OBJETIVO	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1. Local de estudo, material vegetal e condições experimentais	12
4.2. Isolado bacteriano e inoculação	14
4.3. Indução do Déficit hídrico nas plantas	14
4.4. Umidade do Solo	14
4.5. Tratamentos	15
4.6. Avaliações	16
4.6.1. Contagem de bactérias diazotróficas na raiz	16
4.6.2. Parâmetros de Crescimento	16
4.6.3. Teor Relativo de Água	17
4.6.4. Análises da Capacidade Fotossintética Foliar	17

4.6.5. Isolamento de membrana.....	18
4.6.6. Atividade H ⁺ -ATPásica e H ⁺ -pirofosfatásica.....	18
4.6.7. Conteúdo de Nutrientes Foliare.....	19
4.6.8. Análise Estatística	19
5.RESULTADOS	21
5.1. Umidade do solo.....	21
5.2. Dados Climáticos.....	22
5.3. Contagem de bactérias diazotróficas na raiz.....	23
5.4. Parâmetros de Crescimento da Planta.....	24
5.5. Análises da Capacidade Fotossintética Foliar.....	32
5.6. Teor Relativo de Água (TRA).....	38
5.7. Atividades H ⁺ -ATPásicas e H ⁺ -pirofosfatásica	39
5.8. Conteúdo de Nutrientes da Parte Aérea	42
6.DISSCUSSÃO	43
7.RESUMO E CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE SÍMBOLOS

A: Taxa fotossintética líquida

AVP1OX: Overexpression of AVP1

BPCV: Bactéria promotora do crescimento vegetal

C_i/C_a : Razão entre a concentração de CO_2 interna da folha e concentração de CO_2 do ar em torno da folha

DAS: Dias após a suspensão da irrigação

DAT: Dias após o transplante

DPV_{ar}: Déficit de pressão de vapor do ar

E: Transpiração

EUA: Eficiência no uso da água

g_s : Condutância estomática

I: Inoculado

MFPA: Massa fresca de parte aérea

MFR: Massa fresca de raiz

MSPA: Massa seca de parte aérea

NI: Não inoculado

NMP: Número mais provável

P_i: Fosfato inorgânico

PP_i: Pirofosfato inorgânico

TRA: Teor relativo de água

WT: Wild-type

RESUMO

PASSOS, Letícia Cespom; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2018; Estudo comparativo do uso da transgenia AVP1OX e de bactérias diazotróficas, e respectivos mecanismos de resposta ao estresse hídrico em arroz; Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha; Co-orientador: Prof. Fabio Lopes Olivares.

Diante de uma escassez global de recursos hídricos, a seca é um dos principais fatores que limitam a produção agrícola. Com o crescimento da população mundial e o aumento da produção de alimentos, é de importância estratégica o desenvolvimento de técnicas que reduzam a necessidade de água em períodos de estresse hídrico. Nesse sentido, o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal e de plantas transgênicas que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX), se destacam-se dentre as estratégias mais bem-sucedidas na promoção da tolerância ao estresse hídrico visando uma agricultura mais eficiente e sustentável nas próximas décadas. No presente estudo são investigados parâmetros fisiológicos, bioquímicos, e nutricionais de plantas transgênicas de arroz que superexpressam a H⁺-PPase e da inoculação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, sob estresse hídrico. Dentre as alterações apresentadas nas plantas AVP1OX em relação aos efeitos da seca, foram encontradas uma maior capacidade de assimilação de carbono, associadas a maiores aberturas estomáticas, ao conteúdo de clorofila, a biomassa da parte aérea, e uma maior eficiência no uso da água. Enquanto que plantas não transformadas quando inoculadas com *H. seropedicae* promoveram maior conteúdo relativo de água em seus tecidos foliares, mesmo

apresentando uma menor eficiência no uso da água. Durante o período de reirrigação, ambas as estratégias se mostraram eficientes na recuperação após o estresse hídrico, promovendo a formação de um sistema radicular mais robusto. Modificações nos conteúdos de macronutrientes não foram identificadas sejam no estresse, como no período de recuperação das plantas. Também não foram encontrados efeitos somatórios na melhoria dos parâmetros fisiológicos referentes a associação da inoculação com *H. seropedicae* em genótipos AVP1OX. Entretanto, na atividade hidrolítica das bombas de prótons vacuolares, que foram mais estimuladas durante o período de reirrigação parece haver uma modulação diferenciada sugerindo um possível efeito sinérgico da inoculação em plantas transgênicas. Em conclusão, tanto a inoculação com a *Herbaspirillum seropedicae* e quanto a transformação gênica AVP1OX apresentaram efeitos bastante similares na indução de tolerância ao estresse hídrico, mas efeitos aditivos ou complementares só se manifestam nas respostas de recuperação pós-estresse.

Palavras chave: AVP1, *Herbaspirillum seropedicae*, estresse abiótico, bombas de prótons.

ABSTRACT

PASSOS, Letícia Cespom; MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April 2018; Comparative study of the use of AVP1OX transgenic and diazotrophic bacteria, and mechanisms of response to water stress in rice; Advisor: Prof. Arnaldo Rocha Façanha; Co-advisor: Prof. Fabio Lopes Olivares.

Facing the global shortage of water resources, drought is one of the main factors limiting agricultural production. With the world population growth and the rise of food production, an important strategy is the development of techniques to reduce the requirement of extensive water in a period of water deficit. Therefore, the use of plant growth promoting bacteria and transgenic plants which overexpress H⁺-PPase (AVP1OX) represent the most successful strategies in promoting tolerance to drought stress, aiming a more efficient and sustainable agriculture in the coming decades. In the present study, physiological, biochemical and nutritional parameters of transgenic rice plants, that overexpress H⁺-PPase, and inoculation of the diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* under drought stress condition were investigated. Among the alterations presented in the AVP1OX plants, in relation to the effects of drought, a greater carbon assimilation capacity was found, associated with greater stomatal openings, chlorophyll content, shoot biomass, and greater water-use efficiency. While wild-type plants, when inoculated with *H. seropedicae*, promoted a higher relative water content in their foliar tissues, even though they presented a lower water-use efficiency. During the reirrigation period, both strategies proved to be efficient in the recovery after water drought, promoting

the formation of a more robust root system. Changes in macronutrient contents were not identified in stress condition either in the recovery period of the plants. Furthermore, none additional effects were found in the improvement of the physiological parameters regarding the association of the inoculation with *H. seropedicae* in AVP1OX genotypes. However, in the hydrolytic activity of the vacuolar proton pumps, which were more stimulated during the reirrigation period, there seems to be a distinct modulation suggesting a possible synergistic effect of the inoculation in transgenic plants. In conclusion, both the inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* and the gene transformation AVP1OX showed quite similar effects in the induction of tolerance to drought stress, but additive or complementary effects are only manifested in post-stress recovery responses.

Key words: AVP1, *Herbaspirillum seropedicae*, abiotic stress, proton pumps.

1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da população mundial observada nas últimas décadas, estima-se que a produção agrícola deva ser aumentada em 60% até 2050 para atender a crescente demanda alimentícia, significando que deverá ser produzido um bilhão de toneladas anuais de cereais para satisfazer esta demanda (Pingali, 2006; OECD/FAO, 2012). Nesse contexto, o arroz (*Oryza sativa* L.) desponta como o segundo cereal mais produzido no mundo com uma produção anual estimada de mais de 480 milhões de toneladas, de acordo com a USDA (2017). Estima-se que a cultura do arroz apresente melhorias de rendimento médio que chegam a 1% ao ano, entretanto, a taxa necessária para atender o aumento da demanda pelo menos nas próximas três décadas é de 2,4% ao ano (Ray et al., 2013).

O cultivo do arroz é particularmente suscetível ao estresse hídrico. Estima-se que 50% da produção mundial de arroz é drasticamente reduzida pela seca devido a chuvas imprevisíveis e insuficientes durante o período de crescimento (Crosson, 2005). Fato que é agravado pelas mudanças climáticas globais, que vêm provocando um aumento das temperaturas e uma distribuição alterada de chuvas, aumentando ainda mais a frequência e duração das secas (Clair e Lynch, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas que reduzam a necessidade de água extensiva em período de déficit hídrico, se constitui numa prioridade estratégica para viabilizar uma agricultura eficiente e sustentável nas próximas décadas. O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem se tornado uma das alternativas mais promissoras na implementação de uma agricultura sustentável, e o uso de plantas geneticamente modificadas, com o

mesmo propósito, ainda que de forma bem mais controversa, também se expande rapidamente.

Os micro-organismos promotores do crescimento proporcionam diversos benefícios às plantas hospedeiras (Babalola, 2010). Como é o caso da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* que é considerada uma BPCV, por apresentar características como fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, síntese de sideróforo, síntese de fitormônios e capacidade de reduzir os níveis de etileno prejudiciais ao crescimento das plantas sob estresse (Bastián et al., 1998; Pedrosa et al., 2011). As BPCV, além de ocasionar benefícios ao desenvolvimento das culturas, ainda demonstram apresentar um papel na melhoria dos efeitos da seca (Zaied et al., 2003; Potters et al., 2007) supondo que estes benefícios estariam relacionados ao estímulo da produção de fitohormônios (Cohen et al., 2008; Porcel et al., 2014) e da promoção da preservação de maior conteúdo de água nos tecidos vegetais (Creus et al., 2004; Aguiar et al., 2016).

Estudos demonstraram que a superexpressão de genes que codificam as bombas de H^+ em plantas também pode representar uma importante estratégia para o aumento na produtividade de várias espécies de importância agrícola (Park et al., 2005; Gaxiola et al., 2007). As bombas de H^+ constituem os sistemas de transporte primários em membranas celulares vegetais e fúngicas (Sondergaard et al., 2004) que geram uma força próton-motriz, a qual energiza transportadores secundários para o transporte de nutrientes e outros metabólitos (Shavrukov e Hirai, 2015).

A superexpressão do gene AVP1 (AVP1OX) que codifica a H^+ -PPase em plantas tem sido relacionada com a regulação do transporte de auxina, a promoção do desenvolvimento radicular, aumento da captação de nutrientes e a tolerância ao estresse hídrico (Li et al., 2005), este último devido principalmente ao maior acúmulo de solutos no vacúolo que aumentam a retenção de água na planta e a maior formação de raízes laterais (Gaxiola et al., 2001).

Dessa forma, a hipótese deste estudo é de que a superexpressão da H^+ -PPase em plantas possui efeitos miméticos com os benefícios que as plantas inoculadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal ocasionam, promovendo a ativação das bombas de H^+ , que conseqüentemente, estimulam o crescimento vegetal, a absorção de nutrientes, as trocas gasosas e a tolerância ao estresse hídrico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do arroz

O arroz é uma planta da família das gramíneas, do gênero *Oryza* e que possui em torno de vinte espécies, sendo esta a mais cultivada, a espécie *Oryza sativa* (Juliano, 1993). Estudos demonstram que esta espécie é originária da Ásia e acredita-se que a sua domesticação tenha ocorrido aproximadamente entre 10.000 e 9.000 anos atrás (Londo et al., 2006; Kawakami et al., 2007).

O arroz é um dos cereais mais consumidos mundialmente, sendo o segundo mais produzido no mundo com uma estimativa anual de mais de 480 milhões de toneladas (USDA, 2017). O Brasil é o nono maior produtor mundial, produzindo anualmente 12 milhões de toneladas, sendo a Região Sul responsável por cerca de 81,6% da produção nacional (Conab, 2017).

No Brasil, o arroz é consumido especialmente na forma de grãos, sendo conhecidos como arroz branco, arroz integral e arroz parboilizado, em função da forma de processamento pós-colheita (Vieira et al., 2006). Uma outra forma de utilização do arroz é através da produção de bebida alcoólica característica dos povos do Extremo Oriente, que é chamado de saquê (Mcgee, 2014).

O arroz, por ser uma espécie cujo processo evolutivo possibilitou se adaptar a diferentes condições do ambiente, é uma cultura que pode ser cultivada tanto em ecossistemas de várzeas, sendo irrigado por inundação controlada, ou no sistema de sequeiro, no qual a cultura pode ser conduzida sem irrigação, dependendo da

água proveniente da chuva ou com irrigação suplementar através de aspersão (Santos et al., 2006). No entanto, a disponibilidade limitada de água no futuro, agravada pelos efeitos das mudanças climáticas, pode reduzir a capacidade de irrigação dos campos, o que pode resultar em aumento da incidência do estresse hídrico da lavoura (Chauhan e Abugho, 2013).

No Brasil, essa cultura é produzida tanto através do cultivo de sequeiro, que também é chamado de “cultivo em terras altas”, como pelo cultivo de arroz irrigado (Conab, 2015). A área cultivada com arroz no Brasil é de 2,4 milhões de hectares, sendo 55,8% da área no sistema de cultivo irrigado. Os outros 44,2% da área plantada com arroz de terras altas está concentrada na região Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás), Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Pará e Rondônia) (Conab 2015). No entanto, no caso da cultura do arroz de terras altas, seu cultivo pode estar sujeito a múltiplos estresses abióticos e a sua performance é caracterizada, principalmente, em função da ocorrência, duração e intensidade da precipitação pluvial (Tuong et al., 2000) já que é cultivado em suma maioria sem o advento da irrigação, podendo afetar diretamente a sua produtividade. Devido a redução da produtividade nos cultivos de arroz de sequeiro em detrimento dos efeitos do estresse hídrico, este cultivo vem perdendo espaço com o passar das safras devido a migração dos produtores para culturas mais rentáveis (Conab, 2017).

2.2. Estresse hídrico em plantas

O aumento no consumo de água, a má gestão de recursos hídricos e a poluição estão contribuindo com a escassez da água no mundo (Petit et al., 1999). As mudanças climáticas globais ainda vêm provocando um aumento das temperaturas e uma distribuição alterada de chuvas, aumentando a frequência e duração de secas que provocariam efeitos negativos na produtividade agrícola (Clair e Lynch, 2010). De todos os recursos que as plantas necessitam para crescer e se desenvolver, a água é o mais primordial (Taiz e Zeiger, 2013), podendo interferir desde o início do desenvolvimento vegetal, reduzindo o acúmulo de fitomassa, a velocidade do crescimento, e conseqüentemente reduzindo a produtividade final (Ni et al., 2000).

As respostas da planta aos efeitos do estresse hídrico variam em resposta a diversos fatores, tais como a intensidade do estresse, a velocidade de imposição e o estágio de desenvolvimento em que a planta se encontra (Kramer e Boyer, 1995).

Um dos mecanismos que a planta apresenta diante da falta de água é a regulação da condutância estomática mediante a distribuição e acumulação do hormônio ácido abscísico (ABA) nos tecidos foliares (Davies e Zhang, 1991), a fim de reduzir a perda de água por transpiração, e evitar a desidratação dos tecidos, como um recurso para a manutenção da turgescência (Larcher, 2000). Esse fechamento estomático, apesar de aumentar a eficiência do uso da água, interfere diretamente na redução da taxa fotossintética, reduzindo a fixação de carbono (Flexas et al., 2006).

O estresse hídrico não reduz a fixação do carbono mediante apenas ao efeito do fechamento estomático, mas também através de fatores chamados de não-estomáticos. Na fotossíntese, a luz é absorvida pelo pigmento clorofila, que quando excitado, transfere energia para os centros de reação dos fotossistemas I e II (Young e Frank, 1996). A redução no transporte de elétrons, que pode levar ao decréscimo na síntese de ATP e NADPH, assim como limitações bioquímicas, como a redução na eficiência carboxilativa ou na atividade de enzimas do metabolismo de carbono (Lu e Zhang, 1999).

As plantas também podem apresentar respostas celulares ao estresse, podendo incluir mudanças no ciclo de divisão celular, nas membranas celulares, na arquitetura da parede celular e no metabolismo celular (Bray et al., 2001). O estresse hídrico ainda intervém no processo fotossintético gerando modificações nos teores de clorofilas das folhas, sendo estas estudadas em determinadas plantas como indicadores fisiológicos de estresse (Mohawesh e Al-Absi, 2009).

Para as plantas de arroz, estudos têm demonstrado que estas podem apresentar diversas alterações morfológicas em diferentes estágios de crescimento em resposta ao estresse hídrico. Envolvendo muitas vezes a redução da altura de plantas, senescência foliar, fechamento estomático, diminuição do alongamento foliar, menor produção de matéria seca e redução dos teores de nutrientes da parte aérea (Crusciol et al., 2003; Farooq et al., 2010; Kumar et al., 2015). Alterações fisiológicas, como teor de clorofila, transpiração e fotossíntese, também já foram observadas em resposta ao estresse hídrico (Fukai e Cooper, 1995).

2.3. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Existe um grupo muito diversificado de bactérias que são caracterizadas por promoverem o crescimento de plantas através de influência indireta na morfologia vegetal e apresentar uma relação com um maior rendimento de diversas culturas de interesse agrícola, como por exemplo o arroz. Estas bactérias atualmente são, portanto, reconhecidas como “bactérias promotoras do crescimento vegetal” (BPCV).

Dentre alguns dos mecanismos que estas bactérias promovem estão a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato, o alívio do estresse abiótico, a produção de sideróforos, a produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC), além de produzir fitohormônios, indução de resistência sistêmica, promovendo simbioses benéficas com as plantas (Bhattacharyya, 2012) que podem auxiliar no crescimento e desenvolvimento da planta.

2.4. *Herbaspirillum seropedicae*

Em 1984, foi isolada a partir da rizosfera de plantas de milho, sorgo e arroz, a primeira bactéria que fixava nitrogênio e que vivia dentro do hospedeiro, sendo considerada assim uma bactéria endofítica diazotrófica, que primeiramente foi chamada de *Azospirillum seropedicae* (Baldani et al., 1984). No entanto, após estudos de hibridação DNA: DNA foi visto que esse grupo de bactérias, embora possuíssem características morfológicas e fisiológicas próximas ao gênero *Azospirillum*, pertenciam a um novo gênero e, portanto, a uma nova espécie, passando a ser chamada de *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani, 1986).

Dentre as características da bactéria diazotrófica, destaca-se a capacidade de colonizar o interior e a parte aérea dos tecidos vegetais (Baldani et al., 1997), colonizando principalmente as plantas gramíneas de grande interesse econômico, como as culturas de cana-de-açúcar, trigo, sorgo, milho e arroz (Olivares et al., 1996).

O início da associação entre a bactéria e a planta se dá através da exsudação de carbono pelo sistema radicular da planta que serve como fornecimento para a bactéria, ocorrendo sua ligação na superfície radicular e a infecção no tecido vegetal através dos pontos de emergência de raízes laterais

(Figura 1) (Monteiro et al., 2012). Após *H. seropedicae* entrar no sistema vegetal pelas raízes ocorre a colonização pelos espaços intercelulares e também pelos vasos do xilema (James e Olivares, 1998).

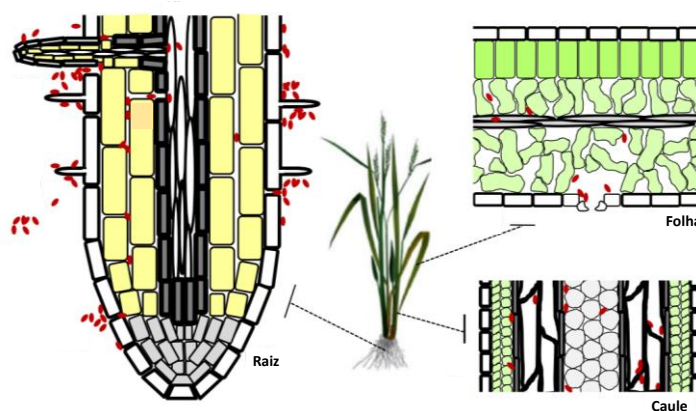


Figura 1. Adesão e colonização de tecidos vegetais por *H. seropedicae* (Monteiro et al., 2012).

A *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria considerada promotora de crescimento vegetal, por apresentar características como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, síntese de sideróforo, síntese de fitormônios como as auxinas e giberelinas e capacidade em reduzir os níveis de etileno prejudiciais ao crescimento das plantas sob estresse (Bastián et al., 1998; Pedrosa et al., 2011). Evidências sugerem que muitos dos benefícios promovidos pela bactéria *H. seropedicae* devem-se a produção de auxina (Bastian et al., 1998), a qual uma vez produzida e secretada induziria um maior volume radicular, maior número de raízes laterais e maior capacidade de absorção de nutrientes, resultando no maior crescimento da planta (Baldani et al., 2000; Canellas et al., 2013).

Devido às características citadas anteriormente, estas bactérias podem utilizar mecanismos para mitigar estresses ambientais, como por exemplo, a deficiência de água. Estudos demonstram que plantas que são inoculadas com bactérias e são expostas ao estresse hídrico continuam a acumular biomassa vegetal (Mayak et al., 2004) e, portanto, apresentam uma diminuição dos danos ocasionados pela restrição de água. Segundo Aguiar et al. (2016) plantas de cana-de-açúcar quando inoculadas com *H. seropedicae* mantiveram o potencial hídrico foliar através da redução da condutância estomática, resultando assim em maior preservação de água na planta.

Um outro mecanismo sugerido na literatura que é empregado pelas bactérias promotoras do crescimento de plantas que podem prover um contínuo crescimento das plantas sob condições de estresse é através da produção da

enzima chamada de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, que reduz os níveis de etileno da planta (Belimov et al., 2009; Zhang et al., 2018). Esta enzima é responsável pela clivagem do precursor de etileno da planta, o ACC, nos compostos amônia e α -cetobutirato (Honma e Shimomura, 1978). Ao reduzir os níveis de ACC nas plantas, os organismos produtores de ACC desaminase, respectivamente, diminuem os níveis de etileno da planta (Glick et al., 1998; 2017) levando a redução dos efeitos inibitórios do crescimento vegetal, retardando o processo de senescência da planta (Khalid et al., 2004; Pierik et al., 2006) e permitindo o seu crescimento mesmo sob condições de estresse. Assim como a produção de fitohormônios pelas bactérias e seu balanço adequado, que pode promover o aumento do volume radicular através da formação de raízes laterais associado ao aumento da atividade da H^+ -ATPase nas raízes, permitindo que se tenha uma maior absorção de nutrientes e água (Olivares et al., 2002) em solos com déficits hídricos.

2.5. As Bombas de Prótons

Os principais tipos de bombas eletrogênicas das células vegetais são as H^+ -ATPases do tipo P localizadas na membrana plasmática, as H^+ -ATPases do tipo V e H^+ -Pirofosfatases (H^+ -PPases) localizadas nos tonoplastos (Gaxiola, 2007). A ativação e o fluxo de prótons provocados pelas bombas nas membranas celulares, exercem um papel fundamental no funcionamento de diversos processos fisiológicos. Existem evidências de sua participação no controle do ciclo celular, no balanço osmótico, na absorção de nutrientes e na expansão celular (Rayle e Cleland, 1992; Kalampanayl e Wimmers, 2001).

As H^+ -ATPases do tipo P são responsáveis pelo bombeamento de prótons para fora das células de plantas e fungos, energizado pela hidrólise de ATP (Morsomme et al., 2000; Palmgren, 2001; Duby e Boutry, 2009). Dessa forma, é gerado na membrana plasmática um gradiente eletroquímico de prótons que é a força proton motriz responsável pela ativação de sistemas de transporte secundários, via membrana plasmática (Bukrinsky et al., 2001), que vão ser responsáveis pela absorção de nutrientes pela planta.

Dentre os mecanismos responsáveis pelo crescimento vegetal já descritos, tem-se a clássica teoria do crescimento ácido que diz que a ativação das H^+ -

ATPase que bombeiam prótons do citosol para o apoplasto, deixando o pH acidificado, é essencial para a ativar expansinas e outras enzimas que estão envolvidas no afrouxamento bioquímico da parede celular (Rayle e Cleland, 1992; Hager, 2003). Através desse fenômeno a rede de polímeros de celulose, hemicelulose e pectina que integra a parede celular se plasticiza, e juntamente com a entrada de água para dentro da célula, ocorre um aumento da pressão turgescência, fundamental para que ocorra a expansão da célula (Rayle e Cleland, 1992; Hager, 2003; Perrot-Rechenmann, 2010). O turgor celular é mantido em função da entrada de água e íons como o K^+ no vacúolo, processo este dependente do gradiente eletroquímico gerado por H^+ -ATPases do tipo V (V-ATPase) e da H^+ -pirofosfatase (H^+ -PPase), que mantêm o gradiente transmembranar no tonoplasto. Nesta membrana, o bombeamento de prótons pela H^+ -PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundários da membrana vacuolar, que vai atuar juntamente em sincronismo com a V-ATPase de tonoplasto e com a P-ATPase no controle da homeostase citoplasmática (Gaxiola et al., 2007).

2.5.1. AVP1: a H^+ -PPase vacuolar de plantas

As H^+ -PPases são proteínas altamente hidrofóbicas e que possuem uma única subunidade com cerca de 80 kDa. Elas utilizam a energia derivada da hidrólise do pirofosfato inorgânico citosólico (PP_i) para bombear os prótons ativamente para o interior dos vacúolos (Zhen et al., 1997; Maeshima, 2000; Duan et al., 2007).

O aumento da acidificação vacuolar ocasionada pelas H^+ -PPases vacuolares (e pelas H^+ -ATPases vacuolares) permite uma diferença de potencial eletroquímico de íons H^+ ao longo da membrana vacuolar que pode ser utilizado por outros transportadores para a entrada de íons para dentro do vacúolo, como por exemplo o antiporte Na^+/H^+ , para a entrada de Na^+ (Maeshima, 2000; Kriegel et al., 2015). O sequestro de Na^+ pelo vacúolo permite uma diminuição dos efeitos tóxicos causados por esse cátion quando localizados no citosol e ainda aumenta a retenção de água nos tecidos vegetais (Gaxiola et al., 2001).

As H^+ -PPases ainda regulam o transporte polar de auxina, aumentando a atividade das H^+ -ATPase de membrana plasmática, que através do bombeamento de prótons para o apoplasto conduzem a entrada passiva de auxina protonada

(IAAH) e maior efluxo celular de auxina desprotonada (IAA^-) através de um aumento do número de transportadores de auxina (PIN1) (Li et al., 2005).

Recentemente evidências foram mostradas que a AVP1 também está envolvida no carregamento do floema e no transporte de fotoassimilados de tecidos fonte para drenos na planta. As H^+ -PPases estariam localizadas na membrana plasmática de células companheiras e funcionariam de forma reversa, através da hidrólise de 2 Pi e formação de PPi, resultando no bombeamento de prótons. Isso reforça que a liberação de PPi em células companheiras do floema poderia aumentar a respiração e, portanto, a formação de ATP, que seria usado como energia para a atividade de H^+ -ATPases de membrana plasmática (Pizzio et al., 2015).

Diversos estudos têm demonstrado que a superexpressão da H^+ -PPase melhoram o crescimento da planta, o rendimento de biomassa vegetal, a eficiência do uso de nutrientes e a tolerância ao estresse hídrico. Estudos iniciais realizados em plantas de *Arabidopsis* que superexpressavam a H^+ -PPases, quando comparadas a selvagem, demonstraram-se tolerantes a seca. Essa tolerância foi dada e caracterizada pelo aumento da expressão da H^+ -PPase, que possibilitaria um maior acúmulo de solutos no vacúolo que aumentam a retenção de água na planta (Gaxiola et al., 2001). Em plantas transgênicas AVP1 de algodão sob condições reduzidas de irrigação foi acumulada maior biomassa na reirrigação e aumentaram tanto a parte aérea quanto o sistema radicular, quando comparadas a plantas do tipo selvagem (Pasapula et al., 2011). Possivelmente o aumento do sistema radicular é um fator primário de tolerância a seca como visto em outros trabalhos em plantas de tomate transgênicos que superexpressam a AVP1 (Park et al., 2005). Assim como em plantas de arroz AVP1, que quando cultivadas em sistema hidropônico apresentaram aumento do sistema radicular, quando comparadas ao controle (Yang et al., 2007).

Em condições de estresse, o pirofosfato pode assumir o papel do ATP, atuando como doador de energia metabólica da célula (Stitt, 1989). Nessas condições, o PPi permanece de forma estável na célula enquanto os níveis de ATP decrescem devido ao estresse (Weiner et al., 1987). Dessa forma, a H^+ -PPase passaria a ser a principal responsável por manter o gradiente de prótons no vacúolo, mantendo ativos o transporte secundário de íons e a eletrogenicidade funcional do tonoplasto em condições de estresses energéticos.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar comparativamente as alterações em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e nutricionais de plantas transgênicas de *Oryza sativa* que superexpressam a H⁺-PPase, e/ou inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, e os respectivos mecanismos induzidos em resposta ao estresse hídrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de estudo, material vegetal e condições experimentais

O experimento foi implementado em casa de vegetação do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ (21°44"47" S e 41°18"24" W e 10 m de altitude), entre o período de setembro e dezembro de 2017. Foram utilizadas sementes de *O. sativa* japônica selvagem (Wild-type - WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX), que foram disponibilizadas pela Universidade do Arizona, através do Prof. Dr. Roberto Gaxiola.

As sementes passaram pelo seguinte processo de desinfestação: emergidas em álcool 70% por três minutos, seguidas por hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, lavadas em água destilada por 5 vezes. Após este processo, as sementes foram transferidas para uma sementeira contendo areia estéril. Para a esterilização da areia utilizada na semeadura, esta foi autoclavada durante uma hora a uma temperatura de 120°C e após 24 horas do processo, foi utilizada.

Após 35 dias da semeadura, foi realizado o transplântio das mudas para vasos de 3L de polietileno envoltos de papel aluminizado contendo substrato a base de mistura de areia e latossolo-vermelho amarelo distrófico (2:1) estéreis, seguindo o mesmo protocolo de esterilização. Uma vez por semana foram aplicados 50 mL de solução nutritiva de Hoagland a 1/4 da força iônica (FI) por vaso (Hoagland & Arnon, 1950). Até o momento em que as plantas estavam dispostas na sementeira,

estas foram irrigadas manualmente e diariamente com água destilada. Após o transplântio foi implementada a irrigação por gotejamento, que consistia na distribuição de um tubo gotejador por vaso, apresentando uma vazão de 2,4 L. h⁻¹. Dessa forma, a irrigação foi dividida em três períodos do dia com a aplicação de 280 mL de água por período, totalizando uma aplicação de 840 mL de água ao dia.

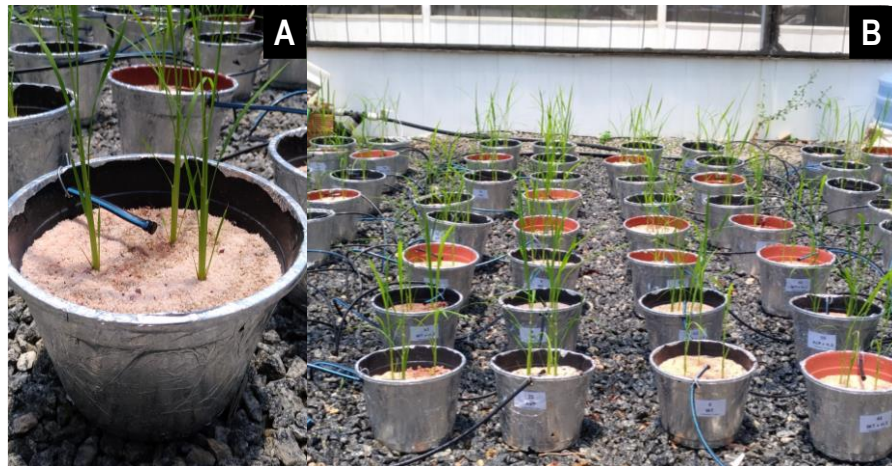


Figura 2. Irrigação por gotejamento presente em cada vaso utilizado no experimento (A) e disposição das plantas em casa de vegetação (B).

Durante o período de avaliação, foram monitoradas as condições ambientais por meio da coleta de informações realizada pelo sensor de umidade relativa e temperatura do ar Extech ® RHT10 Humidity/Temperature Datalogger instalada na área experimental. Os dados foram coletados a cada 30 minutos e, a partir destes, foram calculadas as médias diárias para as variáveis de temperatura e umidade relativa do ar.

A partir dos dados temperatura e umidade relativa do ar, também foi calculado o déficit de pressão de vapor do ar (DPV_{ar}) por meio da equação proposta por Jones (1992):

$$DPV_{ar} = 0,61137 * \exp((17,502 * T^{\circ}) / (240,97 + T^{\circ})) * (1 - (UR\% / 100)),$$

Em que:

- DPV: déficit de pressão de vapor;
- exp: exponencial;
- T°: temperatura em graus Celsius;
- UR: umidade relativa em %.

4.2. Isolado bacteriano e inoculação

Neste trabalho foi utilizada a bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54 (Olivares, 1997) proveniente da coleção de bactérias endofíticas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ.

A inoculação da bactéria *H. seropedicae* foi realizada nas sementes de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) no dia da semeadura, a partir do protocolo descrito por Baldotto et al. (2011). Em cada semente foi aplicado 1mL do inóculo da bactéria.

4.3. Indução do Déficit hídrico nas plantas

Após 75 dias em que ocorrera o transplântio das mudas, estas foram submetidas à suspensão da irrigação. As plantas foram avaliadas quanto a taxa fotossintética através do analisador de gás infravermelho modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA), e quando a primeira planta chegou a valores iguais a 0 de taxa fotossintética, foi considerado o pico de estresse hídrico (6 dias) e posteriormente as plantas foram reirrigadas por 4 dias para que fossem avaliadas suas respectivas recuperações.

4.4. Umidade do Solo

Foi realizado um acompanhamento da umidade do substrato dos vasos utilizando um medidor de umidade de solo (Extech Instruments USA, modelo número MO750), com o qual foram realizadas um total de 16 amostragens, sendo 8 delas em substratos de vasos que foram mantidos com irrigação normal e outras 8 em que estavam sob a suspensão da irrigação, totalizando 16 vasos. Esta avaliação foi realizada no período em que foi suspensa a irrigação até o ponto em que as plantas chegaram a umidade 0%. O medidor de umidade do solo utilizado fornece índices de 0 a 50%, de acordo com a umidade do substrato.

4.5. Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos de plantas controle, em que não apresentaram suspensão da irrigação e plantas sob estresse hídrico, sendo estas que passaram por um período de estresse hídrico de 6 dias. Ao final deste período de 6 dias foi considerado o pico de estresse máximo e todas as plantas foram coletadas para as devidas análises (Tabela 1).

Tabela 1. Plantas de *O. sativa* 81 dias após o transplântio para os vasos, selvagem (WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae*. Sendo tratamentos controle (manteve-se a aplicação de água nos vasos por meio da irrigação) e sob estresse hídrico (suspensão da irrigação foi implementada por 6 dias).

Controle	Sob Estresse
Plantas WT NI	Plantas WT NI
Plantas AVP1OX NI	Plantas AVP1OX NI
Plantas WT I	Plantas WT I
Plantas AVP1OX I	Plantas AVP1OX I

Para avaliar a recuperação das plantas pós-seca, aquelas que anteriormente passaram pelo estresse hídrico voltaram a ser irrigadas por 4 dias e foram comparadas com plantas que mantiveram a irrigação por todo o experimento. Após este período todas as plantas foram coletadas (Tabela 2).

Tabela 2. Plantas de *O. sativa* 85 dias após o transplântio para os vasos, selvagem (WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) inoculadas (I) e não (NI) com *H. seropedicae*. Sendo tratamentos controle, em que se manteve a aplicação de água nos vasos por meio da irrigação e o tratamento que passou por estresse de 6 dias e posteriormente foi reirrigado por 4 dias.

Controle	Re-Irrigado
Plantas WT NI	Plantas WT NI
Plantas AVP1OX NI	Plantas AVP1OX NI
Plantas WT I	Plantas WT I
Plantas AVP1OX I	Plantas AVP1OX I

4.6. Avaliações

4.6.1 Contagem de bactérias diazotróficas na raiz

A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada através da técnica do Número mais provável (NMP). O número de bactérias diazotróficas das raízes (expresso em log nº de bactérias por g de massa fresca da raiz) foram estimados através de amostras de 1 g de raiz. As amostras foram lavadas em água destilada, maceradas em solução salina e posteriormente diluídas seriadamente até 10^{-7} e inoculadas em meio JNFb semi-sólido. Posteriormente os frascos inoculados foram incubados a 30° C por 7 dias.

Após este período, foi realizada a avaliação quanto à presença de crescimento de bactérias fixadoras de N, que é caracterizado pela formação de uma película branca na superfície do meio de cultura (Döbereiner et al., 1995).

O número de bactérias foi obtido pela consulta a tabela de McCrady com três repetições por diluição, (Döbereiner et al., 1995) e os valores encontrados sofreram transformação logarítmica. Para a confirmação inicial da capacidade diazotrófica, as últimas diluições que exibiram películas brancas foram repicadas mediante a retirada de uma alçada da película colocada para crescer em meio JNFb semi-sólido e novamente incubadas em estufa a 30° C por sete dias e avaliadas novamente.

4.6.2. Parâmetros de Crescimento

Foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento nas plantas: a altura da planta, o diâmetro da base do caule, o peso fresco da parte aérea e do sistema radicular, o peso seco da parte aérea e o volume radicular.

A altura foi medida a partir da base da planta até o ápice da maior folha através de régua milimétrica. O diâmetro do caule foi medido na base do mesmo através de um paquímetro digital modelo Digimess. O peso fresco da parte aérea e do sistema radicular foram adquiridos através da pesagem imediata após a retirada da casa de vegetação. E o peso seco da parte aérea foi obtido por meio de secagem em estufa sob ventilação forçada a uma temperatura de 70°C por 72 horas e posteriormente pesados. O volume radicular foi realizado através de uma proveta graduada com um volume de água conhecido, sendo a raiz colocada dentro da

proveta, e seu volume determinado pela diferença entre o volume inicial e o final de água no recipiente.

4.6.3. Teor Relativo de Água

Após a retirada das plantas da área experimental, foram cortados discos foliares com o auxílio de um cortador circular, que apresentava um diâmetro de 1 cm. Para o teor relativo de água (TRA) da folha, foi levado em consideração o peso da amostra do disco foliar fresca, túrgida e seca. Para o peso túrgido os discos foliares ficaram em água destilada durante 24 horas, posteriormente foram secos e pesados em balança analítica. Já para o peso seco, os discos foliares foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 70°C por 72 horas e posteriormente pesados. A partir desses dados obtidos, usou-se a expressão:

$$\text{TRA: } [(P_f - P_s)/(P_t - P_s)] * 100$$

Em que:

- Pf: Peso fresco;
- Pt: Peso túrgido;
- Ps: Peso seco.

4.6.4. Análises da Capacidade Fotossintética Foliar

As análises foliares de capacidade fotossintética foram realizadas entre o período de 08:00 às 10:00 horas, na segunda folha contada do ápice para a base da planta, sendo estas consideradas maduras.

a) Trocas Gasosas: Para a medição das trocas gasosas foi utilizado o analisador de gás infravermelho modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Através desse sistema foram analisadas: a taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a razão entre a concentração de CO_2 interna da folha e concentração de CO_2 do ar em torno da folha (C_i/C_a). A taxa fotossintética líquida foi obtida a 30°C sob condições saturadas expondo as amostras foliares a irradiações constantes no interior da câmara de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

b) Intensidade de verde pelo medidor portátil de clorofila: O teor de clorofila das plantas foi estimado pela intensidade de cor verde das folhas por meio do medidor portátil de clorofila modelo SPAD-502, Minolta, Japão.

c) A eficiência do uso da água foliar (EUA) foi calculada como a razão entre A/E (taxa fotossintética líquida/transpiração), representando as unidades de CO₂ assimilado por unidade de água perdida pela transpiração.

4.6.5. Isolamento de membrana

A preparação da fração microsomal foi realizada através de raízes de arroz por meio de centrifugação diferencial, como descrito por De Michelis e Spanswich (1986) e modificado por Façanha e de Meis (1995). Para cada análise foram amostrados 10 g de tecido de raízes frescas, as quais foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração (tamponado) contendo 250 mM de sacarose, glicerol 10 % (m:v), PVP-40 0,5% (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético), BSA 0,2 % (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris-HCl [tris-(hidroximetil) aminometano] (pH 8,0).

Posteriormente, o homogenato foi filtrado e submetido a uma primeira centrifugação a 1.000 x g (força centrífuga aplicada é 1000 vezes maior que a força gravitacional da Terra) por 15 min, para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e passou por uma centrifugação a 10.000 x g por 20 min para separação de mitocôndrias e peroxissomos. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação, a 100.000 x g por 45 minutos a fim de obter finalmente o precipitado correspondentemente à fração microsomal, a qual passou pelo processo de ressuspensão em 1 mL de solução (meio de ressuspensão) com: Glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,6) e EDTA 1 mM. A dosagem de proteína foi efetuada pelo método descrito por Bradford (1976).

4.6.6. Atividade H⁺-ATPásica e H⁺-pirofosfatásica

As atividades ATPásicas e Pirofosfatásica foram determinadas colorimetricamente pelo método descrito por Fiske e Subbarow (1925), com modificações de Façanha e de Meis (1998). A reação foi iniciada após a adição da proteína e finalizada com a presença do ácido tricloroacético gelado (TCA) em uma concentração final de 10 % (v/v), após 45 minutos de reação. O meio de reação utilizado foi composto de Hepes-Tris pH 6,5 (membrana plasmática) ou 7,0

(membranas vacuolares) 50 mM, MgSO₄ 3 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM ou PPI 1 mM e 30 µg de proteína.

Foram utilizados inibidores específicos para as bombas, sendo o vanadato de sódio 0,2 mM (ATPase do tipo P) e a concanamicina A 5 nM e o nitrato (ATPase do tipo V). As atividades hidrolíticas das ATPases foram medidas com e sem inibidor, e a diferença entre as respectivas atividades foi atribuída à atividade da enzima. Já a hidrólise de PPI foi aferida através de sua dependência por K⁺.

A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de uma solução de revelação contendo Molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2% + ácido ascórbico 1%, e após 15 minutos de reação foi realizada a leitura no espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm.

4.6.7. Conteúdo de Nutrientes Foliares

Após a retirada do material foliar da área experimental, estes foram acondicionados em sacos de papel e levados para o laboratório. Primeiramente as amostras foliares foram secas em estufa de ventilação forçada de ar à uma temperatura de 70° C, durante 72 horas. Após a secagem, o material foi moído em moinho tipo Wiley com peneira de 20 mesh e armazenado em frascos hermeticamente fechados. Os nutrientes analisados foram: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, no qual o nitrogênio foi determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Os outros nutrientes P, K, Ca, Mg, foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta. Condições do ICP: gás plasma 8,0 L min⁻¹, gás auxiliar 0,70 L min⁻¹ e gás carreador 0,55 L min⁻¹ (Peters, 2005).

Com base na produção de peso seco da parte aérea e nos teores dos elementos, foi estimado o conteúdo de cada nutriente analisado multiplicando-se os teores adquiridos pelos respectivos valores de peso seco da parte aérea.

4.6.8. Análise Estatística

Neste trabalho foi adotado o Delineamento Inteiramente Casualizado no Fatorial 2x2x2, constando 3 repetições por tratamento. Para a análise das

atividades hidrolíticas das bombas de H⁺ constou-se um fatorial 2x2x3, com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) e a diferença entre os tratamentos foi avaliada através de Teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada no Programa GraphPad Prism 7.00 e a análise para as atividades hidrolíticas foram realizadas no Programa Sisvar versão 5.3 (Ferreira, 2011).

5. RESULTADOS

5.1. Umidade do solo

O monitoramento da umidade do solo indicou que um dia após a suspensão da irrigação (DAS) se iniciou a desidratação do solo contido nos vasos (Figura 3). A umidade dos vasos reduziu ao longo dos dias e atingiu a umidade de 0% cinco dias após a suspensão da irrigação (DAS). O substrato dos vasos em que se mantiveram irrigados, variaram a sua umidade entre os valores de 7,53% a 7,93%.

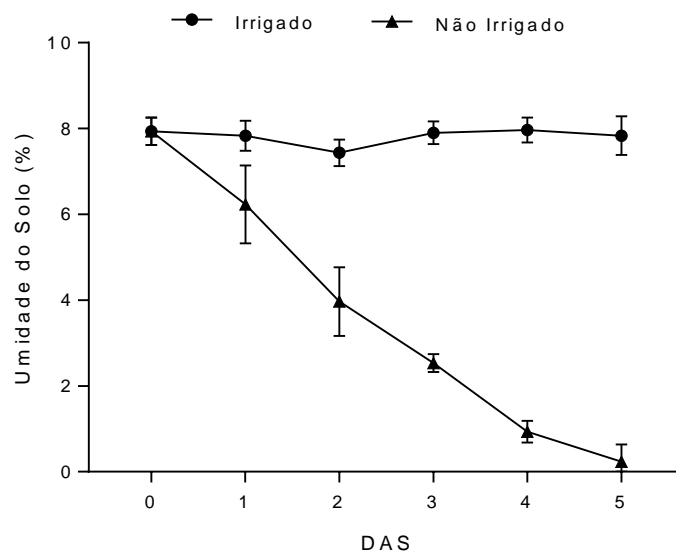


Figura 3. Umidade do solo dos vasos que mantiveram a irrigação por gotejamento (Irigado) e daqueles em que foi suspensa a irrigação (não irrigado) dias após a suspensão da irrigação (DAS).

5.2. Dados Climáticos

Durante o período de avaliação experimental a umidade relativa do ar apresentou o valor máximo em torno de 93,3% em períodos noturnos, e mínimo de até 31,3% durante o período diurno (Figura 4A). Já o valor médio da temperatura do ar verificado foi de 27 °C, com mínima de 20°C e máxima de 49,5° (Figura 4B). Quanto aos valores de DPV, os mais elevados estiveram em torno de 2,2 KPa, e os valores mínimos foram inferiores a 0,3 KPa (Figura 4C).

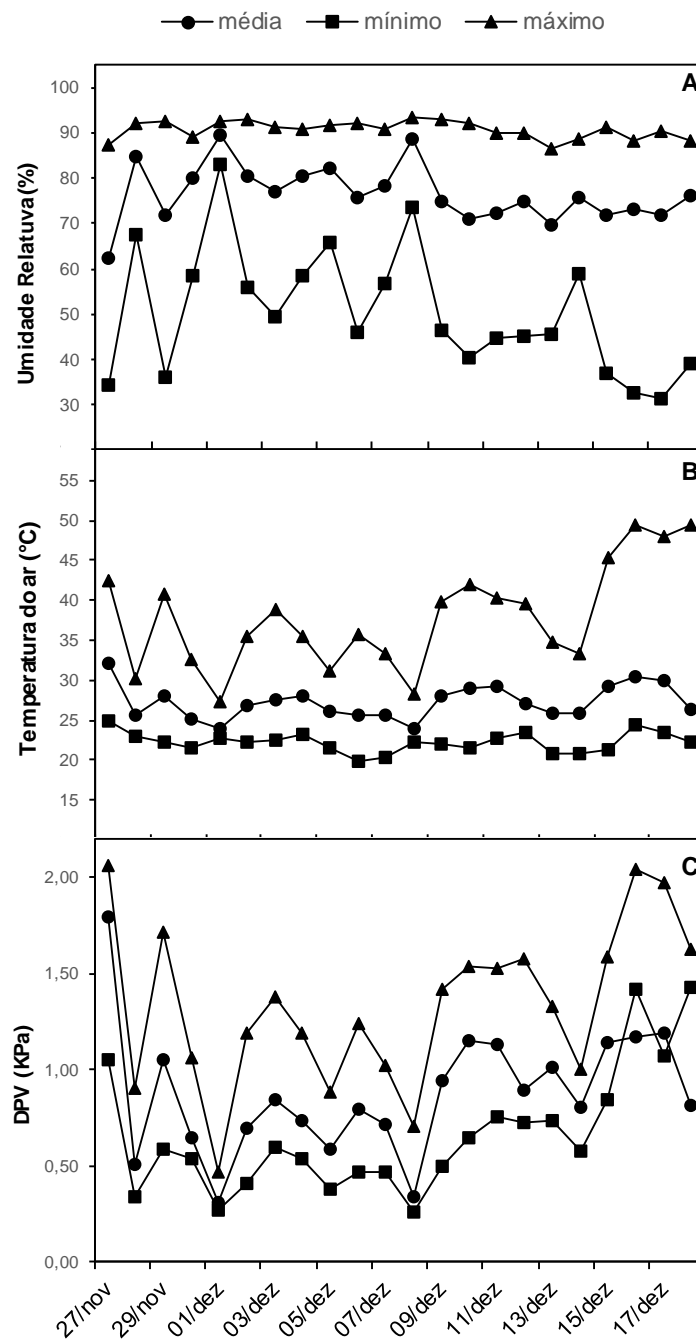


Figura 4. A média, o mínimo e o máximo de umidade relativa do ar (A), de temperatura do ar (B) e do DPV_{ar} (C) dentro da casa de vegetação durante o período de avaliações do experimento.

5.3. Contagem de bactérias diazotróficas na raiz

A Figura 5 representa o Número Mais Provável (NMP) da população total de bactérias diazotróficas associadas às raízes das plantas de arroz. De acordo com os resultados obtidos as plantas que receberam a inoculação (WT I e AVP1OX I) com a bactéria *H. seropedicae* não apresentaram um aumento na população total de diazotróficos, quando comparadas às plantas que não foram inoculadas (WT NI e AVP1OX NI) (Figuras 5A e 5B). As plantas não inoculadas apresentaram uma população elevada de diazotróficos que variou de $4,5 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^7$ (Figuras 5A e 5B), indicando que estas plantas, independente do genótipo, apresentaram uma associação natural com uma população de bactérias.

No entanto, existe uma tendência das plantas que apresentam a superexpressão da H^+ -PPase (AVP1OX) nos tratamentos controle de apresentarem maiores taxas de colonização, efeito este que não se observa sob condições de estresse hídrico ou mesmo após a reirrigação (Figuras 5A e 5B).

A fim de demonstrar a presença da bactéria *H. seropedicae* nas plantas inoculadas, verificou-se através de microscopia de contraste de fase a presença de células com a forma do *H. seropedicae*. Já nas plantas não inoculadas, não foi detectada a presença dessas células. Entretanto, outras células com diferentes formatos foram identificadas, como por exemplo células de *Azospirillum* spp.

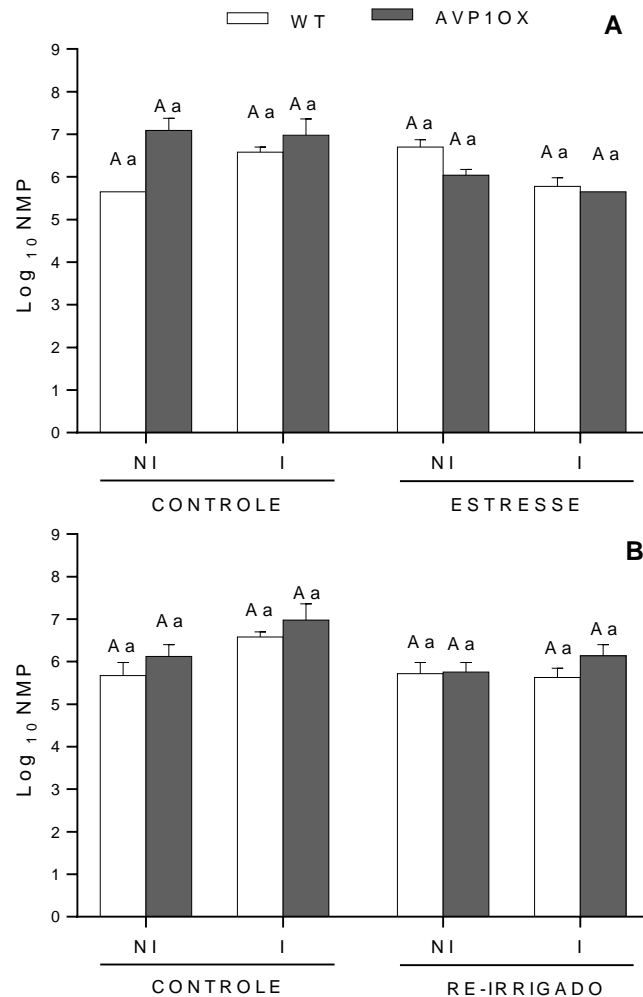


Figura 5. Contagem de bactérias diazotróficas pelo método de Número mais provável (NMP) obtidas de raízes de plantas de *O. sativa* inoculadas (I) e não (NI) com *H. seropedicae* sob os períodos de estresse hídrico (A) e após a reirrigação (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças na inoculação dentro de um mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não entre tratamentos diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

5.4. Parâmetros de Crescimento da Planta

Inicialmente, as plantas de arroz WT e AVP1OX inoculadas ou não com a bactéria endofítica foram avaliadas quanto à altura a cada 7 dias, após o transplante das mudas para os vasos, antes da suspensão da irrigação ser implementada (Figura 6). Foi possível observar que antes de as plantas passarem pelo transplante (0 dias após o transplante - DAT) a inoculação com *H. seropedicae* promoveu um incremento no crescimento em altura em ambos os genótipos, de aproximadamente 248,48% nas plantas WT e de 113% nas plantas AVP1OX, quando comparadas respectivamente aos genótipos não inoculados

(Figura 6). No entanto, no decorrer dos DAT, ambos genótipos inoculados ou não com a bactéria, apresentaram um mesmo padrão de crescimento em altura, demonstrando que a inoculação com a bactéria e o genótipo AVP1OX não promoveram maiores incrementos neste parâmetro (Figura 6).

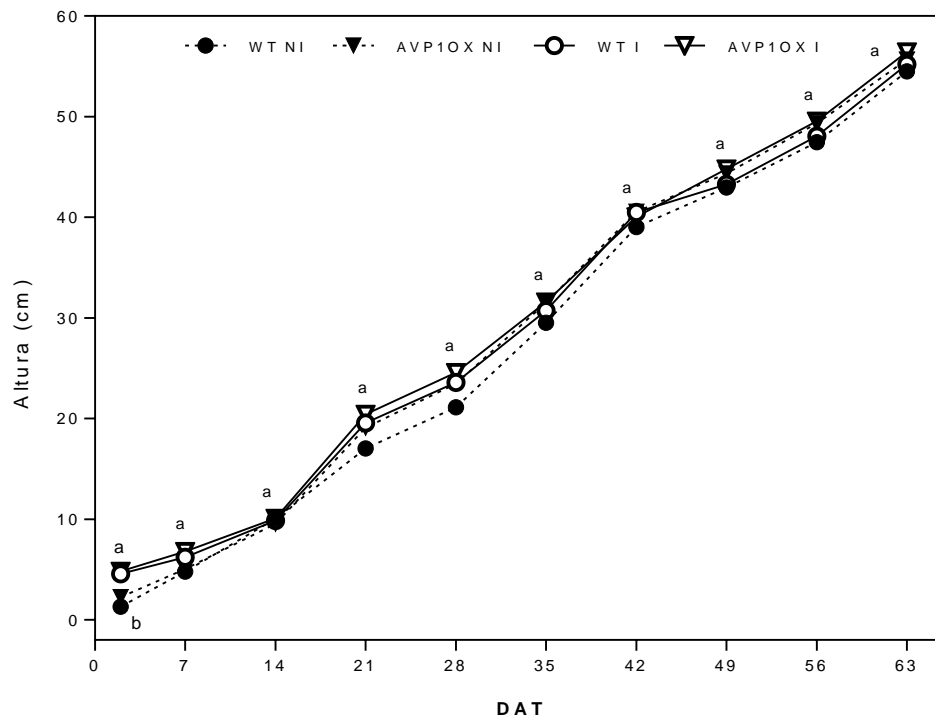


Figura 6. Altura das plantas (cm) de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) inoculadas (I) e não inoculadas (NI) com a bactéria *H. seropedicae* no período de 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 dias após o transplante das mudas (DAT). Cada ponto representa a média dos valores do tratamento (n=12). Médias seguidas por letras diferentes, apresentam diferença estatística pelo teste Tukey a 5% de probabilidade no mesmo dia.

Após a aplicação dos tratamentos hídricos, a altura das plantas não variou significativamente, independentemente do genótipo ou da inoculação com *H. seropedicae*, seja nos tratamentos sob estresse hídrico, após o período de reirrigação ou nos seus respectivos controles (Figuras 7A e 7B). O mesmo foi observado no parâmetro de diâmetro na base do caule, aos quais as plantas não apresentaram diferenças significativas quanto ao genótipo ou quanto a inoculação dentro de cada tratamento, assim como entre os tratamentos implementados (Figuras 8A e 8B).

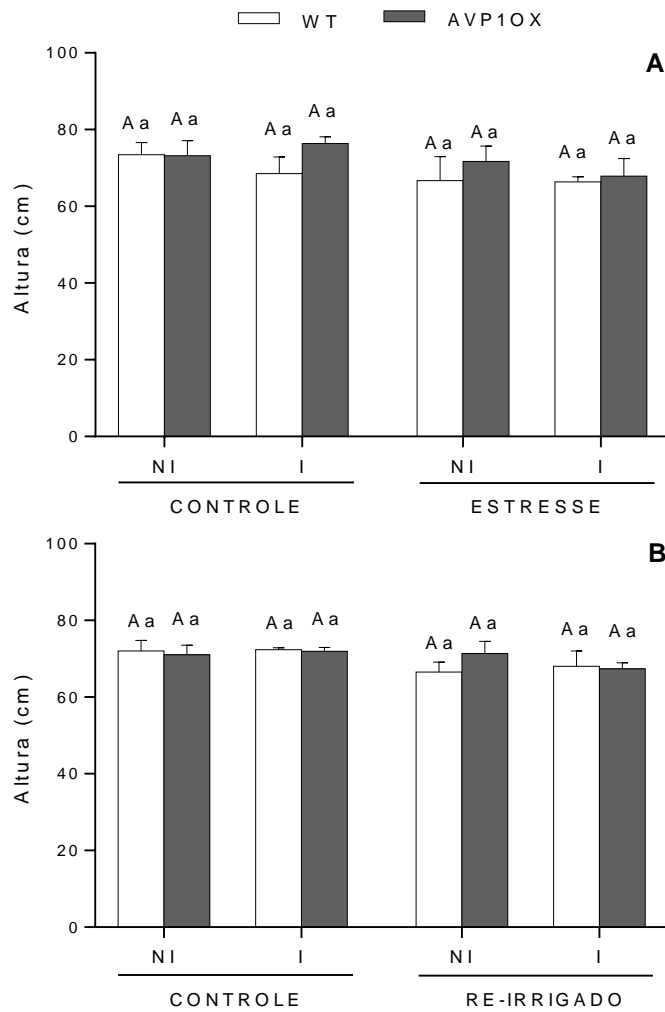


Figura 7. Altura das plantas (cm) de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) inoculadas (I) e não inoculadas (NI) com a bactéria *H. seropedicae* sob estresse hídrico (A), após o período de reirrigação (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

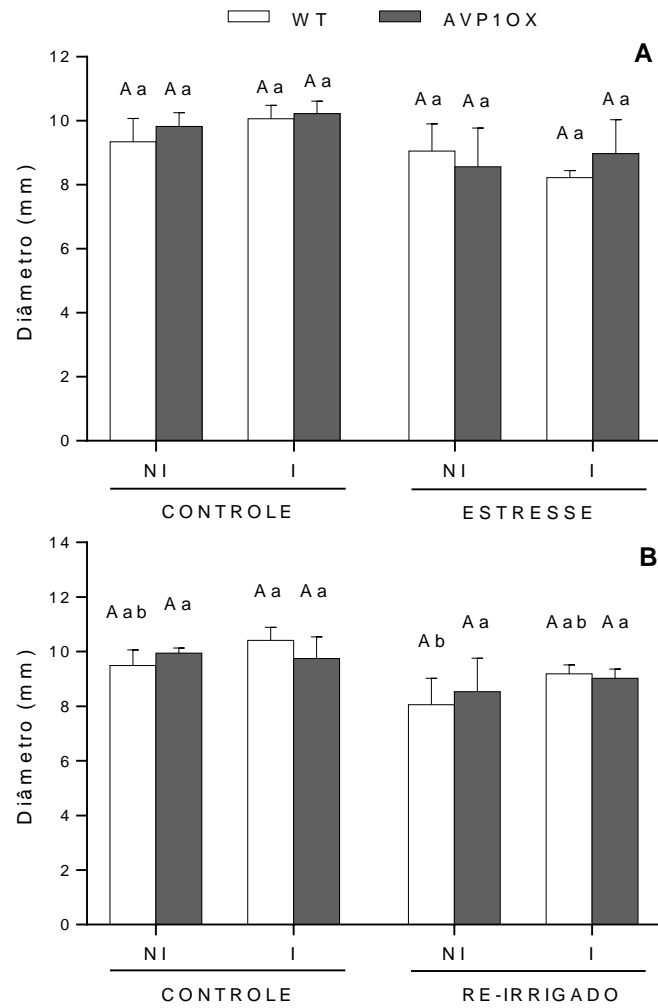


Figura 8. Diâmetro na base do caule de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob períodos de estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

Quanto ao parâmetro de massa fresca da parte aérea (MFPA), os resultados demonstram que dentro de cada tratamento avaliado, não houve diferenças significativas entre o efeito do genótipo e da inoculação com *H. seropedicae*. No entanto todas as plantas, sejam WT ou AVP1OX, NI ou I apresentaram redução da MFPA no tratamento sob estresse, quando comparado ao respectivo controle (Figura 9A). Enquanto que após o período de reirrigação as plantas que mostram maior recuperação no parâmetro de MFPA foram as plantas AVP1OX NI e I, por não apresentarem diferenças significativas quando comparadas ao controle (Figura 9B).

Para o parâmetro de massa seca da parte aérea (MSPA) nos controles, ambos os genótipos promoveram os mesmos ganhos significativos em relação a massa seca, assim como a inoculação não promoveu aumentos neste parâmetro (Figuras 9B e 9D) e sob estresse a MSPA das plantas apresentou uma redução quando comparado ao controle (Figura 9B).

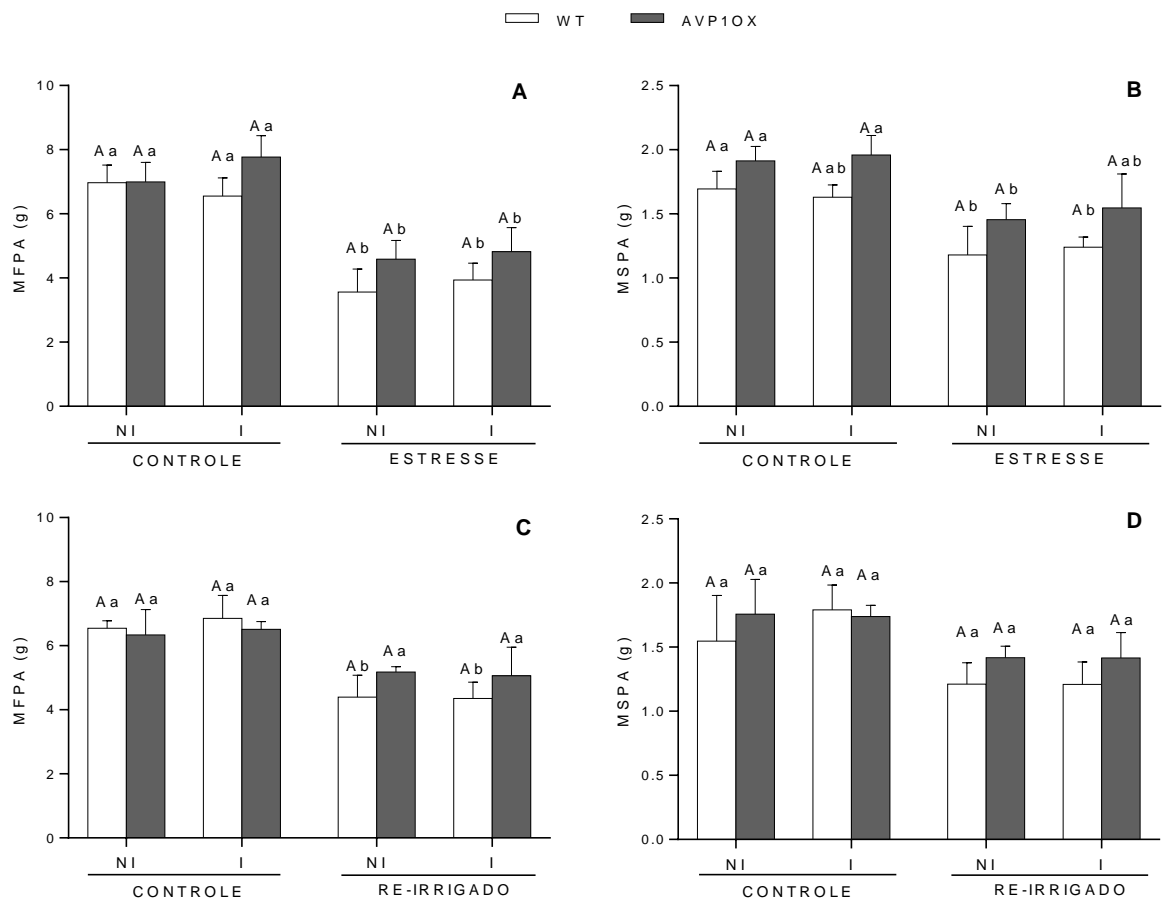


Figura 9. Massa fresca da parte aérea (MFWA – A, B) e massa seca da parte aérea (MSPA – C, D) de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob estresse hídrico (A, B) e após o período de reirrigação (B, D). Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

Após o período de reirrigação as plantas avaliadas mantiveram-se como as do respectivo controle, sem apresentar diferenças significativas, ou seja, a inoculação com a bactéria e o genótipo que superexpressa a H⁺-PPase, assim como as plantas WT apresentaram estatisticamente uma mesma biomassa da parte aérea. (Figura 9B). Entretanto, em todos os parâmetros avaliados nota-se

uma tendência de maior acúmulo de biomassa da parte aérea das plantas AVP1OX quando comparadas às WT (Figuras 9A, 9B, 9C e 9D).

Para a massa fresca da raiz (MFR), não houve diferença entre genótipos e inoculação dentro dos tratamentos sob estresse e seus controles (Figura 10A). Assim como a aplicação do estresse hídrico não promoveu mudanças no padrão de MFR de todas as plantas avaliadas (Figura 10A). Curiosamente, após o período de reirrigação, plantas WT NI apresentaram redução da MFR (Figura 10B), demonstrando que após a reirrigação o genótipo AVP1OX NI apresentou maior MFR que o genótipo WT NI, e que a inoculação com *H. seropedicae* em plantas WT I promoveu aumentos significativos da MFR, no entanto, manteve o mesmo padrão para as plantas AVP1OX I (Figura 10B).

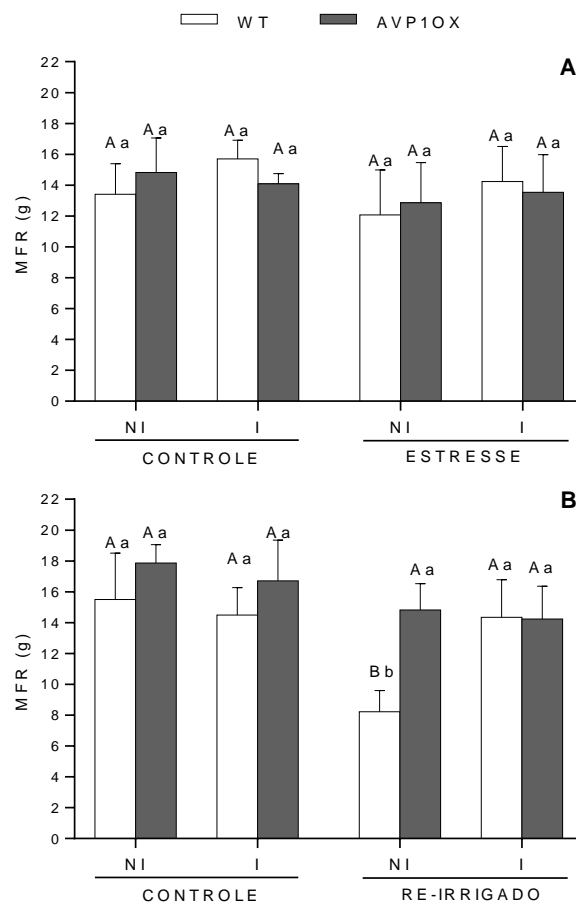


Figura 10. Massa fresca de raiz (MFR) de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação (B). Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento (A,B) e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos (a, ab, b) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao volume radicular analisado, observa-se que no controle os valores médios de volume radicular em ambos os genótipos não inoculados ou inoculados se situaram entre os valores de 18 a 21,6 cm³ (Figura 11A). Constatou-se nesse trabalho que o estresse hídrico imposto não provocou mudanças significativas nos valores de volume radicular avaliados para todos os genótipos, sejam estes inoculados ou não, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 11A). No entanto, após o período de reirrigação, as plantas WT NI apresentaram uma redução do volume radicular de 52,93% quando comparado ao respectivo controle (Figura 11B). Enquanto que as demais plantas avaliadas (AVP1OX NI, WT I e AVP1OX I) apresentaram um mesmo padrão de volume radicular (Figura 11B), demonstrando que assim como para os dados de MFR, na reirrigação o genótipo AVP1OX NI promoveu um aumento do volume radicular de 37,82% quando comparado ao genótipo WT NI, assim como a inoculação em plantas WT I, que apresentou um aumento de 38,7% (Figura 11B). Dados estes que também podem ser visualizados através da imagem do sistema radicular das raízes após o período de reirrigação, podendo ser associados diretamente aos parâmetros de volume radicular e MFR (Figura 12).

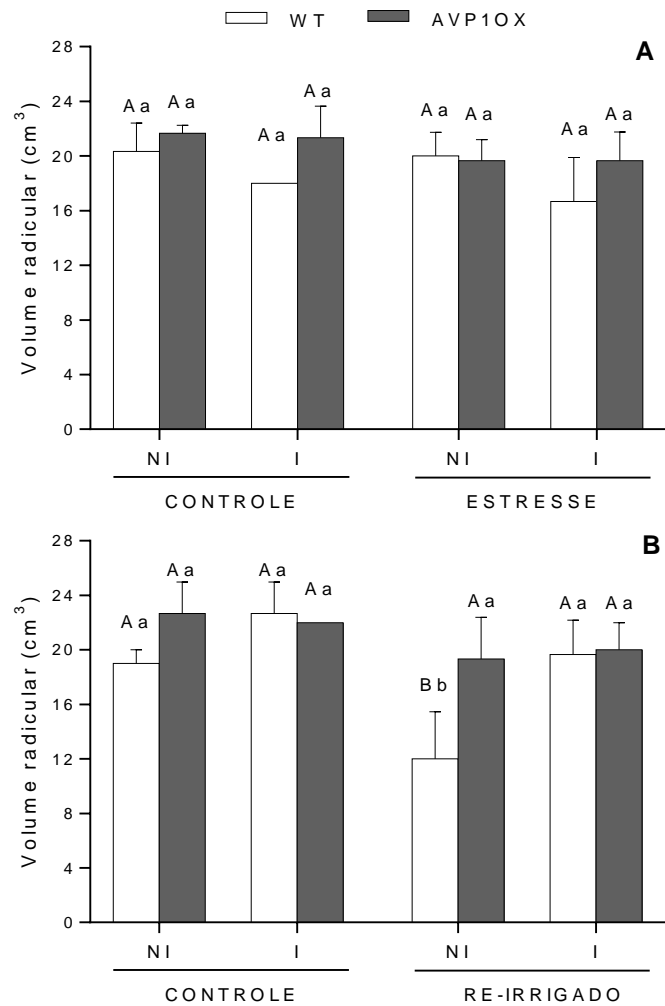


Figura 11. Volume radicular (cm^3) de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação (B). Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n=3$).



Figura 12. Sistema radicular de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae*, 4 dias após serem reirrigados.

5.5. Análises da Capacidade Fotossintética Foliar

Tanto o genótipo WT quanto o AVP1OX, sejam estes inoculados ou não com *H. seropedicae*, apresentaram níveis similares de taxa fotossintética (A), de condutância estomática (g_s) e de transpiração (E) nos tratamentos controle, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 13). Já sob estresse hídrico, todas as plantas apresentaram um decréscimo nos parâmetros de A, que foram acompanhados pela redução valores de g_s e de E, quando comparados aos respectivos controles (Figuras 13A, 13C e 13E). Sendo que para as plantas WT NI este decréscimo foi mais acentuado quando comparado ao genótipo AVP1OX NI, chegando a reduções de 98,7% na A (Figura 13A), de 76,5% na g_s (Figura 13C) e de 70,7% na E (Figura 13E). Em contrapartida, o genótipo AVP1OX apresentou reduções de 69% em A (Fig. 13A), 45,5% em g_s (Fig. 13C) e de 50% em E (Figura 13E) quando comparado às plantas controle. Nesse sentido, sob estresse hídrico as plantas com transgenia (AVP1OX NI) apresentaram os maiores parâmetros de trocas gasosas (A, g_s e E) quando comparadas as plantas WT NI. Assim, é possível visualizar uma tendência da inoculação nas plantas WT I induzir uma elevação nas trocas gasosas quando comparadas as plantas WT NI, mas os resultados não apresentam diferenças significativas (Figuras 13A, 13C e 13E), diferente do observado no genótipo AVP1OX I (Figuras 13A, 13C e 13E).

Após a reirrigação das plantas, todas demonstraram apresentar uma tendência a igualar a taxa fotossintética quando comparadas às plantas controle (Figura 13D). Entretanto, as que apresentaram maior recuperação de A e alcançaram valores mais próximos do controle, não demonstrando diferença significativa, foram as plantas WT NI, AVP1OX NI e WT I (Figura 13B). Enquanto que para a condutância estomática e transpiração o único genótipo que não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle foi o AVP1OX NI (Figuras 13D e 13F).

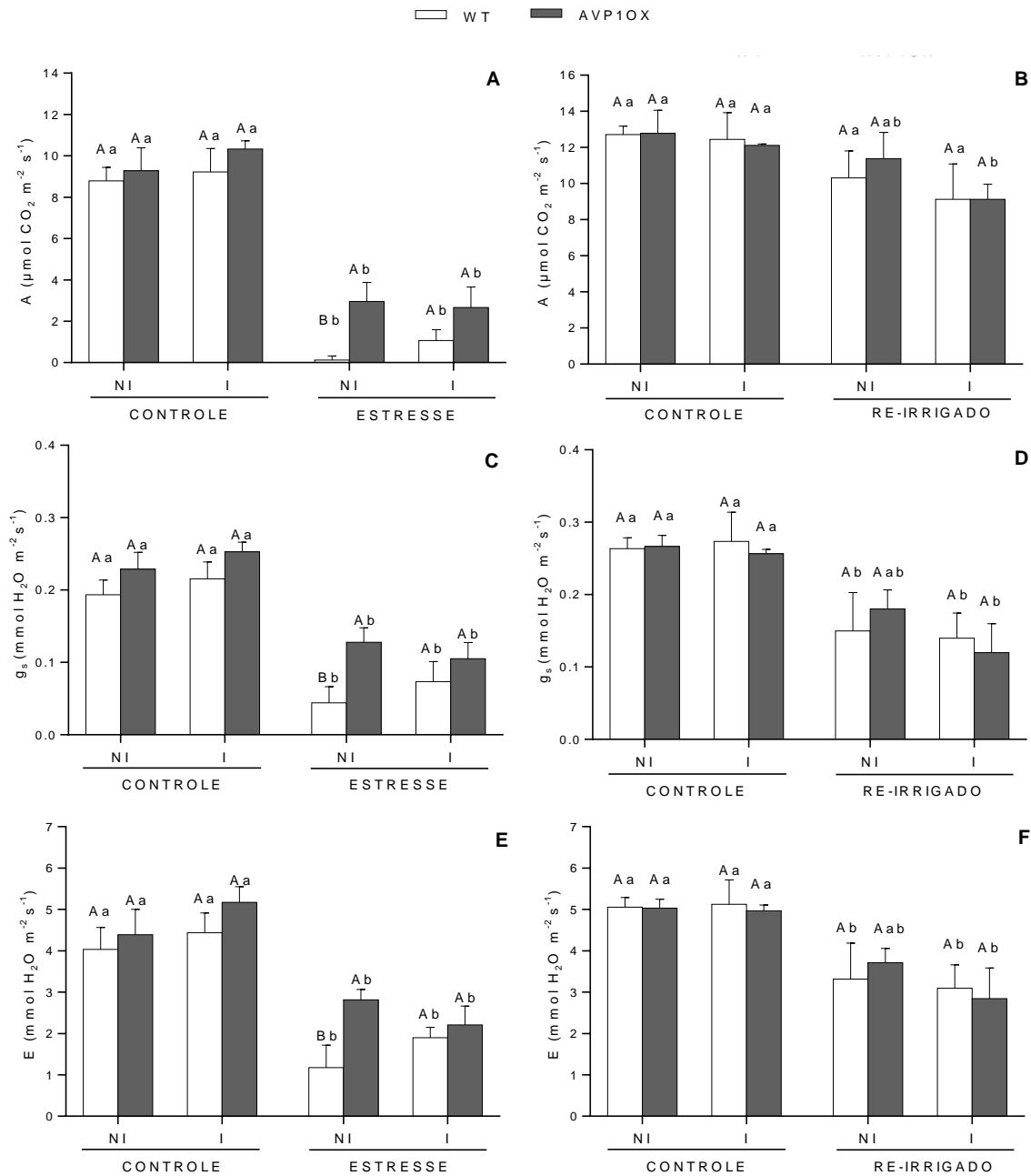


Figura 13. Comparação da taxa fotossintética, A (A, B), da condutância estomática, g_s (C, D) e da transpiração, E, (E, F) em folhas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob período de estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n=3$).

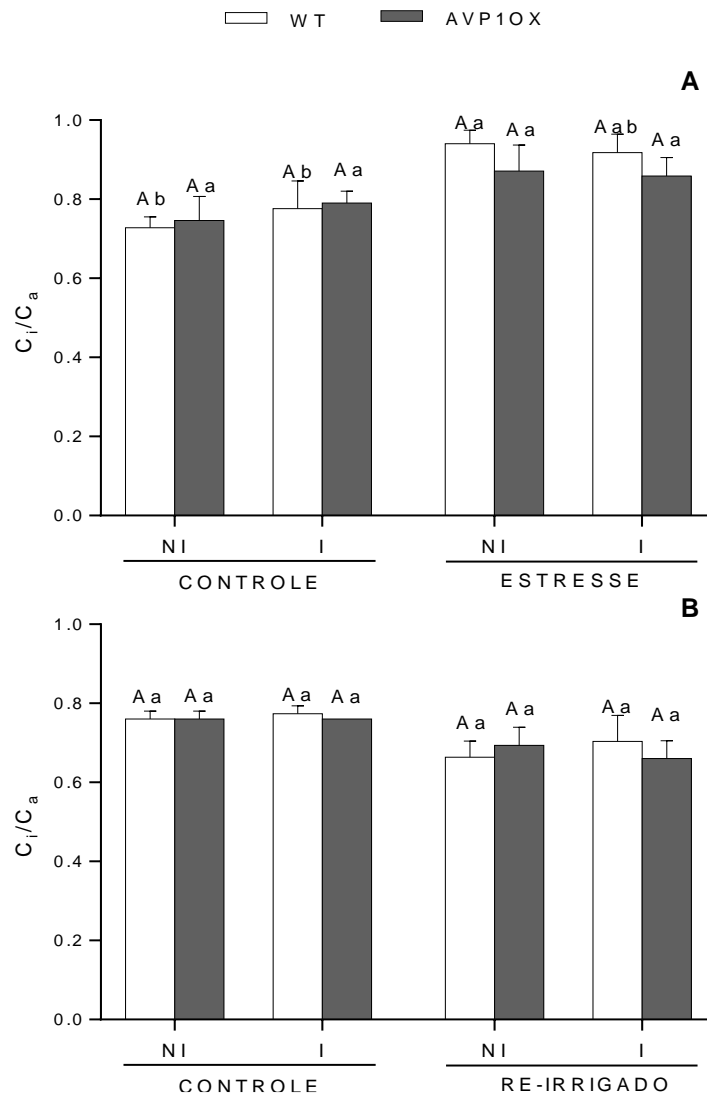


Figura 14. Relação C_i/C_a em folhas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob período de estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($n=3$).

Na relação C_i/C_a , quando comparamos dentro de um mesmo tratamento, seja ele sob estresse, reirrigado, ou seus respectivos controles, ambos os genótipos sejam eles inoculados ou não, não apresentam diferenças estatísticas (Figuras 14A e 14B). No entanto, no tratamento sob estresse hídrico, as plantas WT NI apresentaram um aumento significativo na relação C_i/C_a de aproximadamente 30,5% quando comparadas ao seu controle (Figura 14A). As demais plantas AVP1OX NI, WT I e AVP1OX I, também apresentaram aumentos

na relação C_i/C_a de 17,5%, 18,2% e de 7,5% respectivamente, no entanto estes dados não apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos referentes controles (Figura 14A). Após a reirrigação todas as plantas apresentaram valores médios da relação C_i/C_a iguais estatisticamente, quando comparadas aos das plantas controles.

De acordo com os dados obtidos de EUA, nos tratamentos controle, o genótipo AVP1OX não promoveu diferenças significativas quando comparados ao WT, assim como a inoculação também não modificou as médias dos valores de EUA (Tabelas 3A e 3B). No entanto, sob estresse hídrico, as plantas WT NI e I apresentaram uma redução da EUA, de 92,7% e 90% respectivamente. Enquanto as plantas AVP1OX mantiveram EUA sob estresse quando comparadas ao controle, sejam estas AVP1OX NI, como AVP1OX I (Tabela 3A). As plantas AVP1OX NI apresentaram uma tendência no aumento da 36% da EUA sob estresse hídrico, no entanto, sem apresentar diferença significativa quando comparado ao controle (Tabela 3A).

Quando as plantas foram reirrigadas, sejam estas WT e AVP1OX inoculadas ou não com *H. seropedicae* apresentaram um mesmo padrão de EUA (Tabela 3B).

Tabela 3. Eficiência no uso da água – EUA ($\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$) de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação das plantas (B) e seus respectivos controles.

A	Controle				Estresse				CV%
	WT NI	AVP1OX NI	WT I	AVP1OX I	WT NI	AVP1OX NI	WT I	AVP1OX I	
EUA	2.19 Aa	2.12 Aab	2.09 Aa	2.00 Aab	0.16 Bb	2.97 Aa	0.21 Bb	1.47 Ab	59,64

B	Controle				Re-Irrigado				CV%
	WT NI	AVP1OX NI	WT I	AVP1OX I	WT NI	AVP1OX NI	WT I	AVP1OX I	
EUA	2.52 Aa	2.53 Aa	2.43 Aa	2.43 Aa	3.17 Aa	3.07 Aa	2.94 Aa	3.31 Aa	12,91

Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

A Figura 15 representa a Intensidade de Verde Foliar - índice SPAD das plantas de arroz do genótipo WT e AVP1OX inoculadas ou não com a bactéria *H. seropedicae* sob os diferentes tratamentos hídricos. De acordo com os resultados

obtidos, todas as plantas apresentaram uma tendência na redução do índice SPAD sob estresse hídrico, quando comparados aos respectivos controles. As plantas WT NI apresentaram uma redução de 33,11%, diferindo estatisticamente do controle. Já as plantas AVP1OX NI e WT I apresentaram reduções de 15,44% e 30,92%, respectivamente, no entanto sem apresentar diferenças significativas e as AVP1OX I chegou a uma redução de 32,7% (Figura 15A). Para as plantas reirrigadas, observa-se que independente do genótipo e da inoculação com a bactéria, todas possuíram uma recuperação do índice SPAD, já que apresentaram valores iguais estatisticamente aos do controle (Figura 15B).

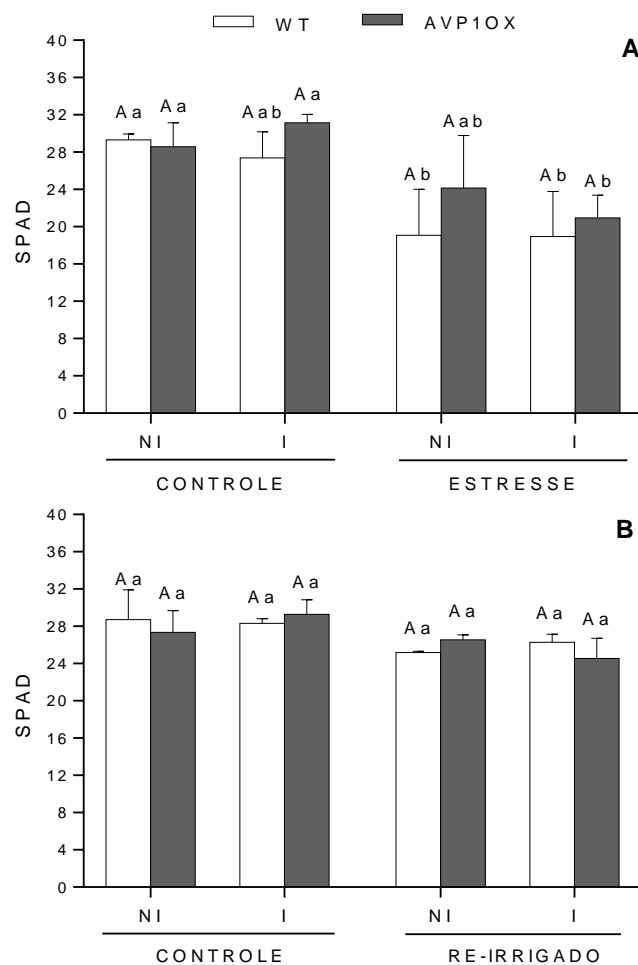


Figura 15. O índice SPAD de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação das plantas (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

5.6. Teor Relativo de Água (TRA)

Quanto ao TRA não houve diferença significativa entre os genótipos avaliados dentro de cada tratamento (Figuras 16A e 16B). Entretanto, nos tratamentos controle, as plantas não inoculadas mostraram ser mais eficientes no acúmulo de água no tecido foliar e apresentaram um maior TRA quando comparadas às inoculadas (Figuras 16A e 16B).

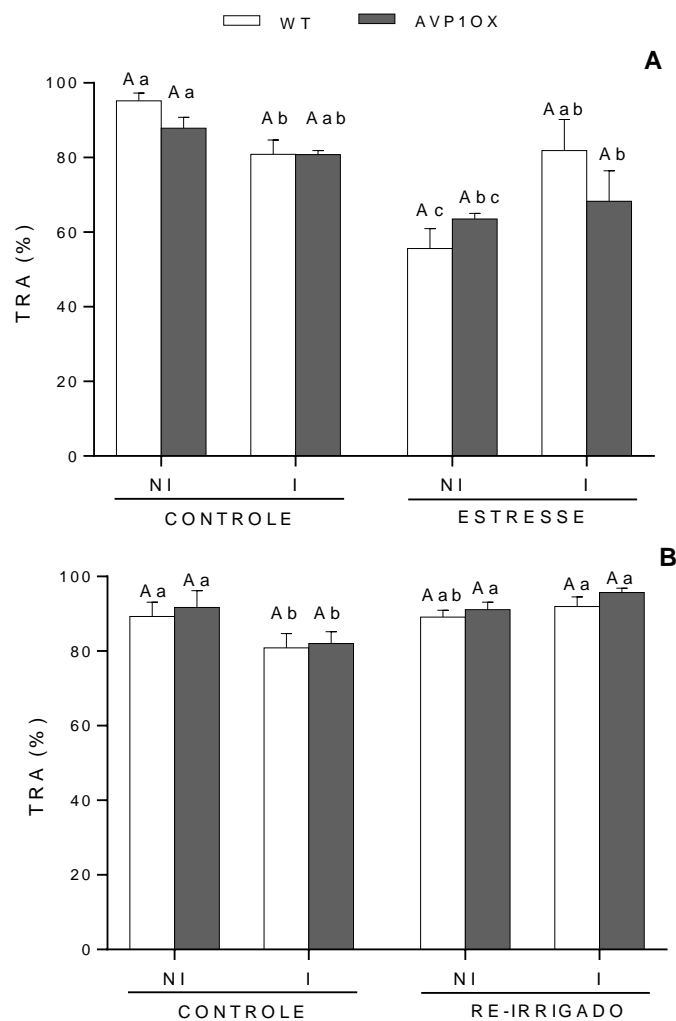


Figura 16. Teor relativo de água (%) em discos foliares de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H^+ -PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae* sob período de estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação (B) e seus respectivos controles. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

Já sob estresse hídrico, o genótipo WT NI foi aquele que apresentou um maior decréscimo no TRA, com uma redução de 41,6%, seguido das plantas AVP1OX NI (26,6%) e por último as plantas AVP1OX I (15,4%), quando comparadas aos respectivos controles (Figura 16A). No entanto, as plantas WT I sob estresse apresentaram um aumento de 1,2% do TRA quando comparadas ao controle, não apresentando diferença estatística. Demonstrando que no estresse, a inoculação em plantas WT foi responsável pelo aumento do TRA nos tecidos foliares. Já após a reirrigação as plantas inoculadas, sejam do genótipo WT como do AVP1OX, apresentaram um aumento do teor relativo de água, quando comparados ao controle, chegando a valores de 91,09% e de 95,69% respectivamente (Figura 16B).

5.7. Atividades H⁺-ATPásicas e H⁺-pirofosfatásica

A atividade hidrolítica da P-ATPase em plantas controle não inoculadas AVP1OX foi 250% maior quando comparada à atividade aferida em plantas WT (Figura 17A). Já a inoculação com a bactéria endofítica em plantas WT no mesmo tratamento controle não estimulou a atividade dessa bomba, enquanto a inoculação nas plantas AVP1OX apresentou valores de atividade de P-ATPase ainda mais reduzidos (Figura 17A). Sob o tratamento de estresse hídrico houve um aumento da atividade da P-ATPase em ambos os genótipos, sejam estes inoculados ou não. Quando comparado o efeito do genótipo, as plantas AVP1OX NI apresentaram maior atividade que as plantas WT NI, assim como as plantas AVP1OX NI também apresentaram maior atividade que as plantas WT I. No entanto, a inoculação com a bactéria *H. seropedica* reduziu as atividades de ambos os genótipos no estresse hídrico (Figura 17A). Após o período de reirrigação, as plantas inoculadas apresentaram incrementos similares de atividade da P-ATPase, sendo de 34% para as plantas WT I e de 33% para as plantas AVP1OX I.

Já as atividades das bombas V-ATPase e H⁺-PPase mantiveram um mesmo padrão de hidrólise de seus respectivos substratos (ATP e PPi), entre os genótipos WT e AVP1OX nos tratamentos controle e sob estresse hídrico, não apresentando diferenças significativas, sejam estes inoculados ou não com a *H. seropedicae* (Figuras 17B e 17C). Porém, as atividades da V-ATPase no período de reirrigação apresentaram aumentos significativos em todas as plantas avaliadas quando comparadas aos controles. No entanto, as plantas que apresentaram maior

incremento de atividade foram as AVP1OX I, que chegaram a promover um aumento de 569% na atividade hidrolítica, seguidos das plantas WT NI (460%), das AVP1OX NI (433%) e das WT I (382%) (Figura 17B) quando comparados aos controles. Sendo que dentro do tratamento reirrigado a inoculação em plantas WT I promoveu decréscimo na atividade da V-ATPase, chegando a uma redução de 34,78%, quando comparado ao WT NI.

A reirrigação também estimulou a atividade da H⁺-PPase em todos genótipos avaliados, sejam estes inoculados ou não. Plantas WT NI e AVP1OX NI apresentaram um incremento de 304% e 408%, respectivamente, quando comparados aos respectivos controles, enquanto que os genótipos WT I e AVP1OX I apresentaram um aumento de 1641% e 1256% (Figura 17C). Demonstrando que no tratamento reirrigado, a inoculação apresentou efeito no aumento da atividade hidrolítica da H⁺-PPase em ambos os genótipos (Figura 17C).

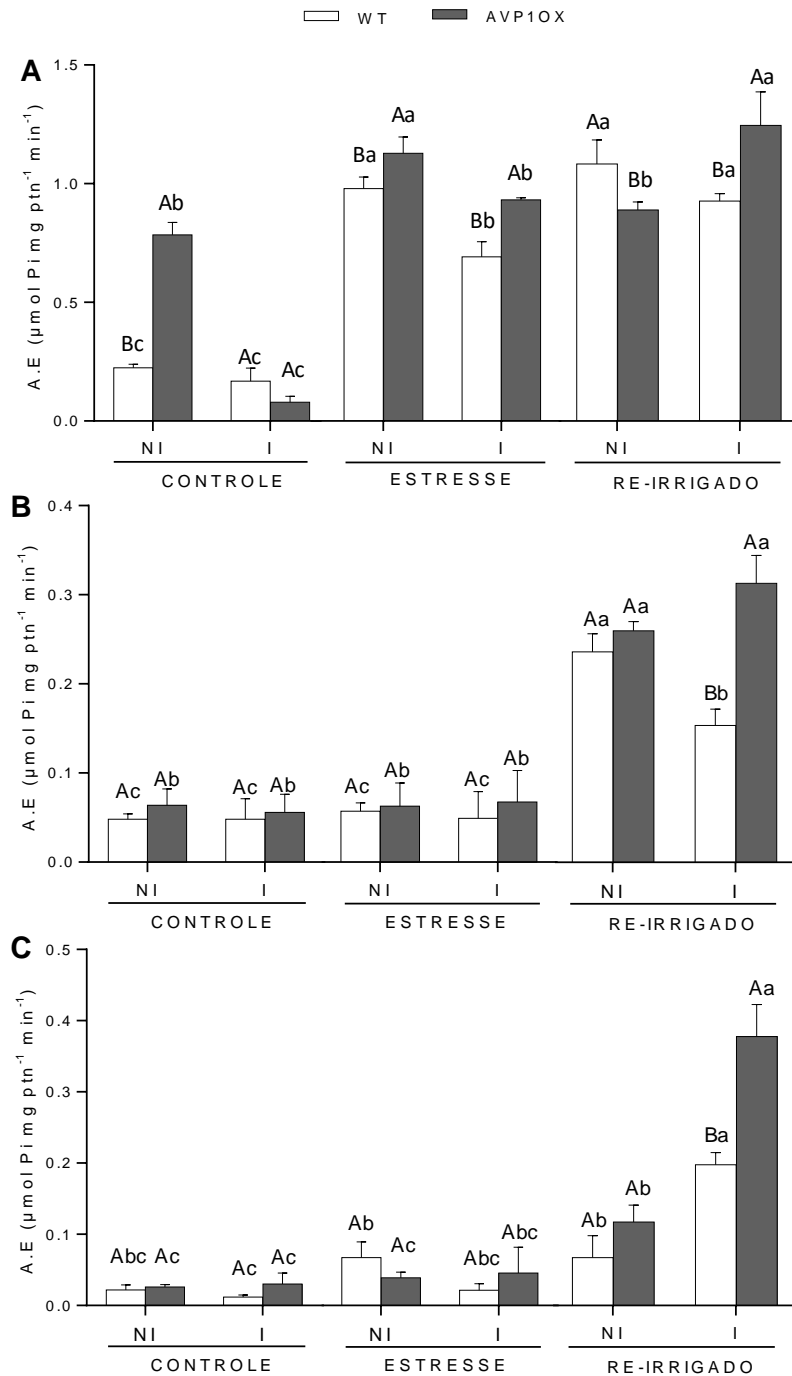


Figura 17. Atividade Hidrolítica da P-ATPase (A), da V-ATPase (B) e da H⁺-PPase (C) de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam e H⁺-PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae*, dispostas em tratamentos controle, sob estresse hídrico e após o período de reirrigação. Os dados representam as atividades P-ATPásicas sensíveis ao vanadato, as atividades V-ATPásicas sensíveis a concanamicina e as atividade H⁺-Pirofosfatásica dependente de KCl. As médias dos tratamentos demonstrados são representativas de três atividades hidrolíticas independentes. Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

5.8. Conteúdo de Nutrientes da Parte Aérea

A tabela 4 abaixo representa o conteúdo dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg da parte aérea das plantas de arroz. Sob o tratamento de estresse hídrico apenas as plantas WT NI apresentaram um maior conteúdo de K, quando comparado ao respectivo controle (Tabela 4A). Para os demais macronutrientes avaliados o estresse hídrico e o período de reirrigação das plantas não promoveu modificação nos conteúdos destes macronutrientes. Assim como o genótipo AVP1OX e a inoculação com a bactéria *H. seropedicae* não alterou aumentos nestes conteúdos.

Tabela 4. Conteúdo de macronutrientes (N, P, K Ca e Mg) na parte aérea de plantas de *O. sativa* selvagem (WT) e que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com a bactéria *H. seropedicae*, sob estresse hídrico (A) e após o período de reirrigação das plantas (B) e seus respectivos controles.

A	Controle				Estresse				CV%
	WT NI	AVP1OXNI	WT I	AVP1OXI	WT NI	AVP1OXNI	WT I	AVP1OXI	
Macronutriente (mg planta ⁻¹)									
N	16,85 Aa	19,57 Aa	19,67 Aa	18,17 Aa	13,83 Aa	17,29 Aa	14,93 Aa	16,56 Aa	12,82
P	1,98 Aa	2,70 Aa	1,56 Aa	2,42 Aa	2,93 Aa	2,93 Aa	2,76 Aa	3,50 Aa	33,34
K	24,89 Ab	31,40 Aa	25,00 Ab	32,60 Aa	40,40 Aa	43,00 Aa	32,80 Aab	46,03 Aa	26,14
Ca	3,68 Aa	4,20 Aa	3,58 Aa	4,48 Aa	4,20 Aa	5,30 Aa	3,73 Aa	6,00 Aa	21,00
Mg	1,52 Aa	2,07 Aa	1,76 Aa	2,18 Aa	2,30 Aa	2,60 Aa	1,70 Aa	2,80 Aa	22,86

B	Controle				Re-Irrigado				CV%
	WT NI	AVP1OXNI	WT I	AVP1OXI	WT NI	AVP1OXNI	WT I	AVP1OXI	
Macronutriente (mg planta ⁻¹)									
N	19,16 Aa	20,86 Aa	19,67 Aa	18,17 Aa	13,16 Aa	13,93 Aa	14,57 Aa	15,95 Aa	17,17
P	2,19 Aa	2,37 Aa	1,91 Aa	2,84 Aa	2,03 Aa	3,00 Aa	2,40 Aa	2,48 Aa	15,59
K	30,00 Aa	33,73 Aa	32,13 Aa	39,27 Aa	35,83 Aa	41,08 Aa	45,56 Aa	40,74 Aa	14,09
Ca	2,64 Aa	3,84 Aa	3,24 Aa	3,34 Aa	4,58 Aa	4,30 Aa	5,10 Aa	4,70 Aa	21,32
Mg	1,65 Aa	1,93 Aa	1,74 Aa	1,96 Aa	1,98 Aa	3,13 Aa	2,15 Aa	2,17 Aa	21,88

Médias seguidas por letras maiúsculas expressam diferenças significativas entre os genótipos no mesmo tratamento e letras minúsculas expressam diferenças entre o efeito da inoculação no mesmo tratamento e do genótipo inoculado ou não inoculado entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

6. DISCUSSÃO

Plantas transgênicas que superexpressam a H⁺-PPase (AVP1OX) vem demonstrando apresentar maior tolerância ao estresse hídrico relacionada a ativação dos sistemas primários e secundários de transporte de prótons (Gaxiola et al., 2001; Park et al., 2005; Yang et al., 2007; Pasapula et al., 2011). Todavia, o uso da transformação gênica como estratégia de melhoramento vegetal enfrenta resistências de aceitação tanto no público leigo quanto em parcelas da comunidade acadêmica, principalmente devido aos possíveis efeitos colaterais sobre o próprio metabolismo ou nas interações ecológicas (Devos et al., 2014). Assim, torna-se evidente a necessidade de aprofundamento dos efeitos da transgenia AVP1 no que tange aos parâmetros fisiológicos e bioquímicos mais relacionados com as funções da H⁺-PPase. Neste trabalho, procedemos a tal análise de forma comparativa com o que ocorre com outra estratégia, com apelos mais ecológicos, como é o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal, que além de promover benefícios às plantas por apresentarem a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, síntese de fitormônios, dentre outros, (Bastián et al., 1998; Pedrosa et al., 2011), também tem sido relatada como alternativa para mitigar efeitos do estresse hídrico (Porcel et al., 2014; Aguiar et al., 2016).

Sob nossas condições experimentais, não houve incrementos nos parâmetros de altura e de diâmetro da base do caule independente do tratamento hídrico, da inoculação ou genótipo avaliado. Isso contrasta com o que fora relatado em plantas de *Camellia sinensis*, que quando inoculadas com *H. seropedicae*

apresentaram aumentos significativos na altura e no diâmetro da base do caule (Zhan et al., 2016). Entretanto, resultados semelhantes com o do presente trabalho foram obtidos por Giro (2011), em que a inoculação com bactérias em plantas de abacaxizeiro não promoveu efeitos significativos no aumento da altura e do diâmetro da base do caule da parte aérea das plantas. De acordo com o autor, o substrato usado que continha vermicomposto pode ter apresentado populações de bactérias que entraram em contato com plantas controle, não inoculadas. Fato análogo pode ter ocorrido neste estudo, onde elementos inerentes ao ambiente da casa de vegetação onde foi mantido o experimento possa ter contribuído para associação natural de populações de bactérias diazotróficas nas plantas que não foram inoculadas. Tal hipótese é corroborada pelos resultados encontrados, que demonstraram que as plantas que não foram inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram contagens de população de bactérias diazotróficas estatisticamente iguais às das plantas inoculadas. De fato, é muito difícil cultivar plantas controle completamente isentas de bactérias, mas é comum verificar que a aplicação do inoculante promove um aumento da população total de bactérias diazotróficas (Baldotto, 2009; Aguiar et al., 2016). No entanto, sabe-se que plantas de arroz desenvolvem mutualismo associativo com bactérias diazotróficas com grande eficiência (Baldani et al., 1984; Elbeltagy et al., 2001; Muthukumarasamy et al., 2007), o que pode explicar a associação espontânea com populações de bactérias diazotróficas, possivelmente correlacionada com a não alteração dos parâmetros de altura e diâmetro da base do caule ao longo do experimento.

Após o período de reirrigação, as plantas de arroz WT não inoculadas apresentaram o menor volume radicular quando comparadas às demais avaliadas. Constatando com os resultados obtidos no genótipo AVP1OX e de ambos os genótipos (WT e AVP1OX) inoculados com a bactéria *H. seropedicae* em que apresentaram volumes radiculares similares entre si, mas significativamente maiores que o das plantas WT, em concordância com os dados de massa fresca de raiz (MFR).

De acordo com Park et al., (2005), um dos fenótipos atribuídos às plantas tolerantes ao estresse hídrico é justamente o aumento do volume do sistema radicular, característica esta relacionada com a maior capacidade de captação de água do solo. A similaridade do volume radicular entre plantas inoculadas possivelmente indica um efeito padrão do inoculante em mitigar os efeitos do

estresse hídrico através do incremento na formação de raízes laterais e pelos radiculares.

As raízes, quando colonizadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal, podem apresentar um padrão alterado de formação radicular e induzido pela inoculação bacteriana (Long et al., 2008). Em resposta à presença de triptofano e outras pequenas moléculas nos exsudados radiculares das plantas, as bactérias associadas a rizosfera, podem sintetizar e secretar o ácido indol-3-acético (AIA), que vai promover o crescimento de raízes laterais, aumentando o volume radicular (Bastián et al., 1998; Glick, 2017), efeito esse já descrito em outros trabalhos para a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (Aguiar et al., 2016; Da Piedade Melo et al., 2017).

Outro mecanismo que poderia estar atuando no aumento do volume destas raízes, que demonstra manter o crescimento radicular mesmo durante períodos de estresse hídrico, é a ação da enzima ACC deaminase presente na bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, a qual impede que haja a produção de etileno nas raízes das plantas (Belimov et al., 2009; Zhang et al., 2018). O etileno, quando encontrado em grandes concentrações pode levar à inibição do crescimento radicular, e esta enzima, é responsável pela clivagem do precursor de etileno, ACC, em amônia e α -cetobutirato (Honma e Shimomura, 1978). Ao reduzir os níveis de ACC nas plantas, estas bactérias produtoras de ACC desaminase, como no caso da bactéria *H. seropedicae*, diminuem os níveis de etileno (Glick et al., 2017) promovendo um maior incremento na formação de raízes, compatível com o aumento do volume radicular aqui observado.

Tal efeito também corrobora dados de outros autores que demonstram o aumento do volume radicular em plantas que superexpressam a H^+ -PPase sobre estresse hídrico (Li et al., 2005; Park et al., 2005; Gaxiola, 2007; Pasapula et al., 2011; Qin et al., 2013). Plantas transgênicas AVP1OX além de superexpressarem a H^+ -PPase, apresentaram maior atividade das P-ATPases de membrana plasmática, o que também está de acordo com os trabalhos supracitados, assim como maior expressão de proteínas PIN, proteínas essas responsáveis pelo carregamento de AIA entre as células (Li et al., 2005; Gaxiola et al., 2007) que culminam no aumento do volume radicular e auxilia na maior absorção da água do solo sob condições de seca (Pasapula et al., 2011).

O estresse hídrico é conhecido por afetar drasticamente a fotossíntese das plantas (Zhang et al., 2012). Neste trabalho, os resultados de trocas gasosas demonstraram que, com a implementação do estresse, todas as plantas apresentaram uma redução da condutância estomática, da transpiração foliar, e decréscimos na assimilação fotossintética do carbono. Estudos fisiológicos anteriores já demonstraram tal redução da abertura estomática sob o efeito de estresse hídrico (Flexas et al., 2002; Sukla et al., 2012; Chastain et al., 2014; Wang et al., 2016). Este fechamento antecipado dos estômatos é um mecanismo que evita a perda d'gua para o ambiente, inicialmente através da síntese de ABA nas raízes e consequente transporte para as folhas, que reduz a difusão do dióxido de carbono (CO_2) requerido para as enzimas fotossintéticas e para o fotossistema II, servindo a produção de ATP (Flexas et al., 2002).

As plantas WT sob o estresse apresentaram as maiores porcentagens de redução da taxa fotossintética, condutância estomática e dos níveis de SPAD, associadas ao aumento da relação C_i/C_a . Isto sugere que além da redução da taxa fotossintética por efeitos estomáticos (redução da condutância estomática), outros efeitos não-estomáticos poderiam estar atuando na redução da fotossíntese. Isso porque além da relação C_i/C_a ser um bom indicador da limitação estomática da fotossíntese, o seu aumento também pode sugerir um acúmulo de CO_2 no mesófilo foliar, em função da não fixação nas reações da fase carboxilativa da fotossíntese (Farquhar e Sharkey, 1982; Everard et al., 1994; Ehleringer e Cerling, 1995) ou da redução dos teores de clorofila, diretamente relacionados aos dados de intensidade de verde. Já que este pigmento, por ser responsável pela captura de luz na fase fotoquímica da fotossíntese, é essencial na conversão da energia luminosa em energia química para a formação de ATP e NADPH (Jesus e Marengo, 2008) e sua degradação pode comprometer seriamente a assimilação de CO_2 .

Contudo, as plantas AVP1OX sob estresse hídrico apresentaram taxas de assimilação fotossintética do carbono superiores quando comparadas às plantas WT. Fato este que pode ser atribuído a uma maior abertura dos estômatos, que responderia pelos efeitos de aumento na difusão e assimilação de CO_2 (Lv et al., 2008). É possível que esta maior abertura estomática neste genótipo esteja direta ou indiretamente relacionada a maior expressão das H^+ -PPase, que promoveriam um aumento da pressão de turgor vacuolar requerida para a abertura dos estômatos. Este genótipo ainda apresentou uma manutenção dos níveis de

intensidade de verde, indicando maior presença do pigmento clorofila, outro fato que poderia explicar o por que das plantas com a transgenia apresentarem maiores taxas fotossintéticas sob estresse hídrico. Tal efeito também pode ter contribuído para o desenvolvimento de um sistema radicular mais robusto e para a manutenção da biomassa da parte aérea. Qin et al. (2013), demonstraram os mesmos efeitos de manutenção de biomassa e índice de verde em plantas de amendoim superexpressando a H⁺-PPase sob efeito de estresse hídrico. Os resultados obtidos demonstram que em paralelo com uma alta assimilação fotossintética do carbono, as plantas AVP1OX também apresentaram maior eficiência no uso da água (EUA), indicando uma maior eficiência na assimilação de CO₂ acoplada a menores perdas de água pela transpiração. O aumento do parâmetro de EUA demonstra ser um bom determinante do rendimento da cultura sob estresse, além de ser um componente usado para definir a resistência de uma cultura a seca. Outros trabalhos também demonstraram que genótipos do tipo AVP1OX são mais tolerantes ao estresse hídrico (Gaxiola, 2007; Pasapula et al., 2011; Qin et al., 2013).

A inoculação com a bactéria *H. seropedicae* demonstrou uma tendência de aumento nas trocas gasosas foliares nas plantas WT. No entanto, estas também apresentaram uma menor EUA, pela reduzida assimilação de CO₂ no processo fotossintético em função do aumento da transpiração via abertura estomática. Por mais que estas plantas apresentassem menor EUA, o efeito da inoculação com *H. seropedicae* promoveu um maior teor relativo de água (TRA) nos tecidos foliares, demonstrando representar um aumento da preservação do conteúdo de água na planta. Estes dados contrastam com os efeitos encontrados por Aguiar et al. (2016), em cana-de-açúcar, em que mesmo que a inoculação com *H. seropedicae* tenha promovido um aumento do teor de água foliar, este foi associado ao fechamento estomático. Isso pode indicar que as plantas inoculadas com a bactéria no presente estudo possam apresentar um maior poder de vacuolação, retendo maior conteúdo de água vacuolar em função de maiores gradientes eletroquímicos gerados tanto na membrana plasmática pelas P-ATPases, quanto no vacúolo por V-ATPases e por H⁺-PPases.

As bombas de H⁺ constituem os sistemas de transporte primários em membranas celulares vegetais (Sondergaard et al., 2004; Shavrukov e Hirai, 2015). Nesses organismos, a absorção de nutrientes ocorre, via transportadores

secundários os quais necessitam do aporte de energia que é fornecido pelos sistemas de transporte primários (Gaxiola, 2007). Desse modo, as H⁺-ATPases do tipo P e V, e as H⁺-PPases geram a força próton-motora que energiza os transportadores secundários, sendo a atividade dessas bombas de crucial importância para que a planta se adapte às constantes mudanças do ambiente, incluindo o estresse hídrico (Sze et al., 1999; Shavrukov e Hirai, 2015). Existem controvérsias na literatura sobre o real comportamento das bombas de H⁺ durante este estresse (Qiu e Zhang, 2000, Du et al., 2015). No presente trabalho foi demonstrada uma ativação da P-ATPase durante o estresse hídrico mantendo-se alta também durante o processo de reirrigação, principalmente nas plantas AVP1OX, corroborando com o que fora descrito por Li et al. (2005), os quais já relataram uma maior atividade dessa bomba em resposta a esta transgenia. Já em relação às bombas vacuolares, durante o processo de reirrigação das plantas, houve um aumento da atividade hidrolítica em ambos os genótipos, fossem estes inoculados ou não, o que parece demonstrar uma ativação aditiva ou até mesmo sinérgica das bombas para o reesbalecimento das funções celulares após o período de estresse hídrico.

Plantas AVP1OX inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram as maiores atividades hidrolíticas das três bombas descritas, dado este sugestivo de um efeito somatório do genótipo AVP1OX com o da inoculação com a bactéria, o que, no entanto, não fora observado nos demais parâmetros avaliados. Claramente, são necessários estudos complementares para averiguar os possíveis fatores que podem influenciar este processo.

Sabe-se que o genótipo AVP1OX superexpressa o gene AVP1, que codifica a H⁺-PPase (Gaxiola, 2001). No entanto, as plantas AVP1OX apresentaram um mesmo padrão na atividade hidrolítica das H⁺-PPase em relação às plantas WT nos tratamentos controle e sob estresse hídrico, sendo esse um resultado controverso, uma vez que Park et al. (2005), estudando os efeitos do estresse hídrico em plantas de tomate AVP1OX, identificaram uma atividade significativamente maior das H⁺-PPases nestas plantas, se comparadas às plantas WT. Entretanto, sabe-se pelo parâmetro de contagem de bactérias diazotróficas da raiz, que todas as plantas avaliadas apresentaram significativa colonização por bactérias fixadoras de N, o que teoricamente poderia mascarar a modulação da atividade das H⁺-PPases que só seria revelada quando comparada a um controle de fato não colonizado.

Diferentemente da manutenção do volume radicular e da ativação das bombas de prótons no período de reirrigação, no que tange aos demais parâmetros, não houve uma diferença no efeito da inoculação e do genótipo AVP1OX no poder de recuperação dessas plantas. De fato, as plantas WT foram capazes de se recuperar do estresse logo após serem reirrigadas. Diversos trabalhos têm demonstrado um efeito mais pronunciado da recuperação do estresse hídrico com plantas que superexpressam o gene AVP1 e a inoculação com BPCV em períodos de reirrigação de aproximadamente 2 dias (Pasapula et al., 2011; Quin et al., 2013; Aguiar et al., 2016). No presente trabalho o tempo de recuperação das plantas fora de 4 dias, o que pelos dados menos significativos obtidos poderia indicar que o pico do efeito sobre plantas AVP1OX e WT colonizadas com a bactéria *H. seropedicae* fora perdido neste desenho experimental.

7. RESUMO E CONCLUSÕES

As plantas de arroz que superexpressam a H⁺-PPase e a inoculação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* não apresentaram modificações significativas na maioria dos parâmetros fisiológicos estudados, tanto plantas crescidas em condições ideais, quanto sob estresse hídrico.

A associação natural de populações de bactérias diazotróficas nas plantas não inoculadas com *H. seropedicae* interferiu no controle experimental, prejudicando a evidenciação das alterações induzidas especificamente pela inoculação ou pela transgenia sobre estes parâmetros.

Em resposta ao estresse hídrico, tanto o genótipo AVP1OX quanto a inoculação com a bactéria apresentaram mecanismos que são identificados por mitigar os danos causados pela seca. Enquanto o genótipo AVP1OX apresentou um aumento das trocas gasosas, da manutenção da estimativa do conteúdo de clorofila foliar e de biomassa da parte aérea e maior eficiência no uso da água. Enquanto que a inoculação com *H. seropedicae* demonstrou promover um aumento no teor relativo de água nos tecidos foliares, mesmo apresentando aberturas estomáticas consideráveis.

O aumento da atividade das bombas vacuolares no período de reirrigação das plantas, demonstra um papel das bombas vacuolares nas respostas adaptativas ao estresse hídrico, apresentando efeitos aditivos nos genótipos AVP1OX inoculados com *H. seropedicae*.

O período de reirrigação das plantas demonstrou promover uma eficiência de recuperação para todas as plantas avaliadas, entretanto as plantas AVP1OX e plantas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram maiores incrementos no volume radicular, efeito este muito atribuído à plantas tolerantes ao estresse hídrico que permite que essas plantas consigam absorver mais água do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr, M.E. (1992) *Ethylene in plant biology*. 2. ed. Academic Press. New York, 444p.

Aguiar, N.O., Medici, L.O., Olivares, F.L., Dobbss, L.B., Torres-Netto, A., Silva, S. F., Novotny, E.H., Canellas, L.P. (2016) Metabolic profile and antioxidant response during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Ann. Appl. Biol.* 168:203–213.

Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M., Amancio, S. (2012) The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Rep.* 31:757–769.

Ashraf, M. (2010) Inducing drought tolerance in plants: Some recent advances. *Biotechnol. Adv.* 28:169–183.

Babalola, O.O. (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett.* 32: 1559-1570.

Baldani, J.I. (1984) *Ocorrência e caracterização de Azospirillum amazonense em comparação com outras espécies deste gênero em raízes de milho, sorgo e arroz.*

Tese (Mestrado em Agronomia) - Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 110p.

Baldani, J.I., Baldani, V.L.D, Seldin, L., Dobereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:86-93.

Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Dobereiner, J. (1997) Recent advances in FBN with non-legume plants. *Soil Biol.* 29 (5):911–922.

Baldani, V.D., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fert. Soils*, 30 (5-6):485-491.

Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R. (2011) Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets' Vitória'. *Brazil. J. Microbiol.* 42:114-125.

Belimov, A.A., Dodd, I.C., Hontzeas, N., Theobald, J.C., Safronova, V.I., Davies, W.J. (2009) Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytol.* 181:413–423.

Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012) Plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *W. J. Microb. Biotechnol.* 28:1327-1350.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bukrinsky, J.T., Buch-Pedersen, M.J., Larsen, S., Palmgren, M.G. (2001) A putative proton binding site of plasma membrane H⁺-ATPase identified through homology modelling. *FEBS letters*, 494 (1):6-10.

Canellas, L.P., Balmori, D.M., Médici, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.C., Olivares, F.L. (2013) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, 366(1-2):119-132.

Cantarella, H., Duarte, A.P. (2004) Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: Galvão, J.C.C., Miranda, G.V. *Tecnologias de Produção do milho*. Viçosa, MG: UFV, 182p.

Castro, A.M.G., Lima S.M.V., Lopes, M.A., Machado, M.S., Martins, M.A.G. (2006) *O futuro do melhoramento genético vegetal no Brasil: impactos da biotecnologia e das leis de proteção de conhecimento*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 506p.

Chauhan, B.S., Abugho, S.B. (2013) Effect of water stress on the growth and development of *Amaranthus spinosus*, *Leptochloa chinensis* and rice. *Am. J. Plant Sci.* 4:989-998.

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103(4):551–560.

Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30:239-264.

Chauhan, B.S., Abugho, S.B. (2013) Effects of water regime, nitrogen fertilization, and rice plant density on growth and reproduction of lowland weed *Echinochloa crus-galli*. *Crop Prot.* 54:142-147.

Cohen, A.C., Bottini, R., Piccoli, P.N. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *J. Plant Growth Regul.* 54:97–103.

Conab - Companhia nacional de abastecimento (2015). Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2014/2015. Décimo primeiro levantamento, Brasília - DF.

Creus, C.M., Sueldo, R.J., Barassi, C.A. (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canad. J. Bot.* 82:273–281.

Crosson P. (2005) *Natural resource and environmental consequences of rice production. Fragile Lives in Fragile Ecosystems*. Los Banos: International Rice Research Institute, 100p.

Crusciol, C.A.C., Arf, O., Soratto, R.P., Machado, J.R. (2003) Influência de lâminas de água e adubação mineral na nutrição e produtividade de arroz de terras altas. *Rev. Bras. Cienc. Solo*, 27:647-654.

Da Piedade Melo, A., Olivares, F.L., Médici., L.O., Torres-Neto, A., Dobbss L.B., Canellas L.P. (2017) Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4(6):1-10.

Davies, W.J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42:55 -76.

De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺ pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.* 81:542-547.

Devos, Y., Aguilera, J., Diveki, Z., Gomes, A., Liu, Y., Paoletti, C., du Jardin, P., Herman, L., Perry, J.N., Waigmann, E. (2014) EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMO) during its first decade of existence: looking back and ahead. *Transgenic Res.* 23:1–25.

Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa - SPI, 60p.

- Du, H.Y., Zhou, X. G., Yang, Q. H., Liu, H. P., Kurtenbach, R. (2015) Changes in H⁺-ATPase activity and conjugated polyamine contents in plasma membrane purified from developing wheat embryos under short-time drought stress. *Plant Growth Regul.* 75:1–10.
- Duan, X.G., Yang, A.F., Gao, F., Zhang, S.L., Zhang J.R (2007) Heterologous expression of vacuolar H⁺-PPase enhances the electrochemical gradient across the vacuolar membrane and improves tobacco cell salt tolerance. *Protoplasma*, 232:87–95.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pfluger Arch. Eur. J. Physiol.* 457(3):645-655.
- Duvick, D. N. (2005) The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Adv. Agron.* 86: 83-145.
- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E. (1995) Atmospheric CO₂ and the ratio of intercellular to ambient CO₂ concentrations in plants. *Tree Physiol.* 15(2):105–11.
- Elbeltagy, A., Nishioki, K., Sato, T., Suzuki, H.Y.B., Hamada, T., Isawa, T. Mitsui, H., Minamisawa, K. (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5285-5293.
- Everard, J.D., Gucci, R., Kann, S.C., Flore, J.A., Loescher, W.H. (1994) Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.* 106(1):281–292.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.* 116:1487–1495.

- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiol.* 108(1):241-246.
- Farooq, M., Kobayashi, N., Ito, O., Wahid, A., Serraj, R. (2010) Broader leaves result in better performance of indica rice under drought stress. *J. Plant Physiol.* 167(13): 1066-1075.
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Phys.* 33:317-345.
- Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35(6):1039-1042.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 (2):375-400.
- Flexas, J., Bota, J., Galmes, J., Medrano, H., Ribas-Carbó, M. (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol. Plant.* 127(3):343-352.
- Fukai, S., Cooper, M. (1995) Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice. *Field Crops Res.* 40(2):67-86.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:11444–11449.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581(12):2204-2214.
- Giro, V.B. (2011) *Crescimento do abacaxizeiro vitória' em resposta à aplicação de vermicomposto, ácidos húmicos e bactérias promotoras de crescimento*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.

Glick, B.R., Cheng, J.Z., Zarny, C., Duan, J. (2017) Promotion of plant growth by ACC deaminase-containing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329-339.

Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J. (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63-68.

Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺ in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.* 116:483-505.

Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185:527–537.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn.* 347:1–32.

Honma, M., Shimomura, T. (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* 43:1825-1831.

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

James, E.K., Olivares, F.L (1998) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:77–119.

Jesus, S.V., Marengo R.J. (2008) O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta Amazon.* 38:815-818.

Jones, H.G. (1992) *Plant and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology.* Cambridge: University Press, 428p.

Jones, H.G., Jones, M.B. (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms. *In*: H.G., Jones, T.J., Flowers, M.B., Jones. *Plants Under Stress: biochemistry, physiology and ecology and their application to plant improvement*. Cambridge: University Press, p. 1-10.

Kawakami, S., Ebana, K., Nishikawa, T., Sato, Y., Vaughan, D.A., Kadowaki, K. (2007) Genetic variation in the chloroplast genome suggests multiple domestication of cultivated Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 50:180-187.

Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., Kecskés, M.L. (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36:1229–1244.

Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A. (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96:473-480.

Kim, E.J., Zhen, R.G., Rea, P.A. (1994) Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the sub-strate binding subunit for proton transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6128–6132.

Kramer, P.J., Boyer, J.S. (1995) *Water relation of plants and soils*. London: Academic Press, 223p.

Kriegel, A., Andrés, Z., Medzihradszky, A., Krüger, F., Scholl, S., Delang, S., Patir-Nebioglu, M.G., Gute, G., Yang, H., Murphy, A.S., Peer W.A., Pfeiffer, A., Krebs, M., Lohmann, J.U., Schumacher, K. (2015). Job sharing in the endomembrane system: vacuolar acidification requires the combined activity of V-ATPase and V-PPase. *Plant Cell*, 27:3383–3396.

Kumar, R., Sreenu, K., Singh, N., Jain, N., Singh, N. K., Rai, V. (2015). Effect of drought stress on contrasting cultivars of rice. *Int. J. Trop. Agric.* 33(2):1559-1564.

Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RIMA, 531p.

Li, J.S., Yang, H., Peer, W.A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, E., Richards, L., Krizek, B. (2005). Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310:121–125.

Londo, J.P., Chiang, Y.C., Hung, K.H., Chiang, T.Y., Schaal, B.A. (2006) Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(25):9578-9583.

Lu, G.H., Ren, D.L., Wang, X.Q., Wu, J.K., Zhao, M.S. (2010) Evaluation on drought tolerance of maize hybrids in China. *J. Maize Sci.* 3:20–24.

Lu, C., Zhang, J. (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J. Exp. Bot.* 50(336):1199-1206.

Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R. (2004) Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Anton. Van Leeuw.* 86:1–25.

Lv, S.L., Zhang, K.W., Gao, Q., Lian, L.J., Song, Y., Zhang, J. (2008) Overexpression of na H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* (TsVP) in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant Cell Physiol.* 49:1150-116.

Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465, 37–51.

Marques Júnior, R.B., Canellas, L.P., Silva, L.G., Olivares, F.L. (2008) Rooting of micro seed pieces by combined use of humic substances and endophytic diazotrophic bacteria in sugar cane. *Rev. Bras. Cienc. Solo*, 32:1121–1128.

Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* 166:525-30.

Monteiro, R.A., Balsanelli, E., Wassem, R., Marin, A.M., Brusamarello-Santos, L.C.C., Schmidt, M.A., Tadra-Sfeir, M.Z., Pankievicz, V.C.C., Cruz, L.M., Chubatsu, L.S., Pedrosa, F.O., Souza, E.M. (2012) *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil*, 356:175–196.

Morsomme, P., Slayman, C.W., Goffeau, A. (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1469(3):133-157.

Muthukumarasamy, R., Kang, U.G., Park, K.D., Jeon, W.T., Cho, Y.S.; Kwon, S.W., Song, J.; Roh, D.H., Revathi, G. (2007) Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *J. Appl. Microbiol.* 102:981-991.

Ni, H., Moody, K., Robles, R.P. (2000). *Oryza sativa* plant traits conferring ability against weeds. *Weed Sci.* 48:200-204.

OECD/FAO (2012). OECD-FAO Agricultural Outlook 2012–2021. Roma: OECD Publishing and FAO.

Ogut, S., Kucukoner, E., Gultekin, F., Gurbuz, N. (2014) A Study of Long-Term Pesticide Application Amongst Agricultural Workers: Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status and Acetylcholinesterase Activity in Blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Section B: Biol. Sci.* 85(1):155–159.

Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils*, 21:197–200.

Olivares, F.L., Reis, V. M., Façanha, A.R.; Baldani, J.I.; Baldani, V.L., Ferreira, F.P., Batista, Q.R., Barreto, B.R., Silva, L.G.; Azevedo, I.G., Brasil, F.C., Rossiello, R.O.P., Miguens, F.C., James, E. K. (2002) *The role of endophytic diazotrophs in*

sugarcane root morphogenesis and development. Hamilton: Nitrogen Fixation - Global Perspectives - Abstract Book Proceedings, 477p.

Palmgren, M.G. (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:817–845.

Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D, Gaxiola, R.A. (2005) Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:18830–18835.

Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., Payton, P. (2011) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 9:88–99.

Pedrosa F.O., Monteiro R.A., Wasseem R., et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses, *PLoS Genet.* 7(5), e1002064.

Perrot-Rechenmann, C. (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(5), a001446.

Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J. M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V.M., Legrand, M., Lipenkov, V.Y., Lorius C.L., Pepin, C., Ritz, E., Saltzman, M. (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399:429-436.

Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J., Voeselek, L.A. (2006) The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11:176-183.

Pingali, P. (2006) Westernization of Asian diets and the transformation of food systems: Implications for research and policy. *Food Policy*, 32:281–298.

Pizzio, G.A., Paez-Valencia, J., Khadilkar, A.S., Regmi, K., Patron-Soberano, A., Zhang, S., Sanchez-Lares, J., Furstenau, T., Li, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Yadav, U.P., Ayre, B.G., Gaxiola, R.A (2015). Arabidopsis type I proton-pumping pyrophosphatase expresses strongly in phloem, where it is required for pyrophosphate metabolism and photosynthate partitioning. *Plant Physiol.* 167:1541-1553.

Porcel, R., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M., Aroca, R. (2014) Involvement of plant endogenous ABA in Bacillus megaterium PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biol.* 14(36):1-12.

Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J., Jansen, M.A.K. (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12:98–105.

Qin, H., Gu, Q., Kuppu, S., Sun, L., Zhu, X., Mishra, N., Hu, R., Shen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Zhu, L., Zhang, X., Burow, M., Payton, P., Zhang, H. (2013) Expression of the *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene *AVP1* in peanut to improve drought and salt tolerance. *Plant Biotechnol. Rep.* 7:345-355.

Qiu, Q.S., Zhang, N. (2000) Water stress inhibits P-nitrophenyl phosphate hydrolysis activity of the plasma membrane H⁺-ATPase from soybean hypocotyls. *Aust. J. Plant Physiol.* 27(7):717–721.

Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., Foley, J.A. (2013) Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One*, 8(6):e 66428.

Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation in saline and well. *Plant Physiol.* (4):1271-1274.

Saha, S., Strazisar, T.M., Mendes, E.S., Ellsworth, P., Sternberg, L. (2008) Linking the patterns in soil moisture to leaf water potential, stomatal conductance, growth, and mortality of dominant shrubs in the Florida scrub ecosystem. *Plant Soil*, 313:113–127.

Santos, A.B., Stone, L.F., Vieira, N.R.A. (2006) *A cultura do arroz no Brasil*. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 561p.

Schilling, R.K., Tester, M., Marschner, P., Plett, D.C., Roy S.J. (2016) *AVP1*: one protein, many roles. *Trends Plant Sci.* 22(2):154-162.

Shavrukov, Y., Hirai, Y. (2015) Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* 67:15-30.

St Clair, S.B., Lynch, J.P. (2010) The opening of Pandora's Box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. *Plant and Soil*, 335:101–115.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 690p.

Tawatsin, A. (2015) Pesticides used in Thailand and toxic effects to human health. *Med. Res. Arch.* 3:1–10.

Tuong, T.P., Kam, S.P., Pandey, S., Bouman, B.A.M., Hardy, B. (2000) *Characterizing and understanding rainfed environments*. Los Baños: International Rice Research Institute, 488p.

Vaughan Lu, B., Tomooka, N. (2008) The evolving story of rice evolution. *Plant Science*, 174:394-408.

Vieira, N.R.A., Rabelo, R.R., Santos, A.B., Stone, L.F. (2006) *A cultura do arroz no Brasil*. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 900p.

Vaughan, D. A., Ge, S., Kaga, A., Tomooka, N. (1997) Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryza*. Science of the rice plant genetics. *Rice Biol. Gen. Era.* 62: 219-234.

Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L.K., Murphy, A., Gaxiola, R.A. (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnol. J.* 5(6):735-745.

Zaied, K.A., El-Hady, A.H., Afify, A.H., Nassef, M.A. (2003) Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. *Pakist. J. Biol. Sci.* 4:344-358.

Zhan, G., Cheng, W., Liu, W., Li, Y., Ding, K., Rao, H., Wang, X. (2016). Infection, colonization and growth-promoting effects of tea plant (*Camellia sinensis* L.) by the endophytic bacterium *Herbaspirillum* sp. WT00C. *Afr. J. Agric. Res.* 11(3):130-138.

Zhang, L., Gao, M., Hu, J Zhang, X., Wang, K., Ashraf, M. (2012) Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth: water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13:3189-3202.

Zhen, R.G., Kim, E.J., Rea, P.A. (1997) The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized proton translocation at the vacuolar membrane. *Adv. Bot. Res.* 25:297-337.