



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE / PB
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL DE SOUSA SILVA

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

CAMPINA GRANDE – PB
DEZEMBRO 2022

GABRIEL DE SOUSA SILVA

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses

**CAMPINA GRANDE – PB
DEZEMBRO 2022**

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

S586p Silva, Gabriel de Sousa.

Perfil de memória molecular na
interação arroz/*Gluconacetobacter*
diazotrophicus, sob estresse hídrico [manuscrito] / Gabriel de
Sousa Silva. - 2023.
27 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha
Meneses, Departamento de Biologia - CCBS."

1. Arroz vermelho. 2. Déficit hídrico. 3. *G*
diazotrophicus. 4. Reprogramação molecular. I. Título

21. ed. CDD 570.7

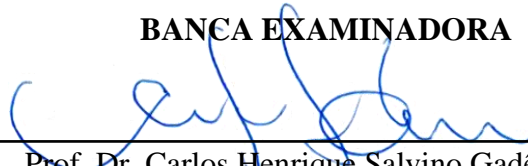
GABRIEL DE SOUSA SILVA

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Apresentada em: 15 / 12 / 2022

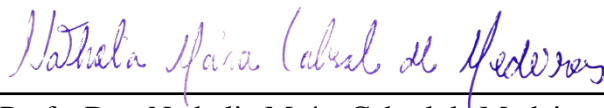
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Maria José Lima da Silva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Nathalia Maíra Cabral de Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, Sandra Maria da Silva e Adriano de Sousa Silva e a minha irmã, Alana Karinne, com eterna gratidão pelo incentivo, companheirismo, e amor, DEDICO.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação do experimento..... | 13 |
| Figura 2 – Representação metodológica do processo de inoculação..... | 14 |
| Figura 3 – Transformação por bissulfito de sódio. Na transformação apenas as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas e transcritas como adeninas durante a PCR. As citosinas metiladas permanecem inalteradas e durante a amplificação são transcritas como guaninas..... | 16 |
| Figura 4 – Valores de expressão relativa em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação..... | 19 |
| Figura 5 – Valores de porcentagem de metilação em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação... | 20 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise por qPCR, específicos para cada gene, expressos em arroz vermelho | 15 |
| Tabela 2 – Contagem realizada no inoculante produzido e nas sementes inoculadas com a estirpe <i>G. diazotrophicus</i> PAL5, utilizada no experimento. Campina Grande/PB, 2015..... | 17 |
| Tabela 3 – Estimativa do número mais provável (Log do n° células g ⁻¹) de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 presentes nas raízes e folhas de plantas de arroz vermelho coletadas nas fases de desenvolvimento vegetativo. Campina Grande/PB, 2015..... | 18 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 10 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 10 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 10 |
| 3 | METODOLOGIA..... | 10 |
| 3.1 | Caracterização da área experimental..... | 10 |
| 3.2 | Fatores em estudo e tratamentos..... | 10 |
| 3.3 | Processo de Inoculação..... | 11 |
| 3.4 | Parâmetros em estudo..... | 12 |
| 3.5 | Análises estatísticas..... | 14 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 15 |
| 4.1 | Controle de qualidade do inoculante utilizado..... | 15 |
| 4.2 | Estimativa do número mais provável (NMP) nas raízes e nas folhas..... | 15 |
| 4.3 | Análises Moleculares..... | 16 |
| 4.3.1 | <i>Expressão Gênica</i>..... | 16 |
| 4.3.2 | <i>Porcentagem de Metilação</i>..... | 18 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 19 |
| | REFERÊNCIAS..... | 19 |

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

Gabriel de Sousa Silva¹

RESUMO

O Brasil é responsável por produzir anualmente cerca de 11 a 13 milhões de toneladas de arroz (*Oryza sativa* L.), um cereal de grande importância econômica, e no Nordeste brasileiro, destaca-se a produção do arroz vermelho. Entretanto, fatores abióticos, como o déficit hídrico por seca, têm influenciado de forma negativa a produção desse grão. Para minimizar os danos e maximizar a produção, tem-se utilizado ferramentas biotecnológicas, como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e mecanismos de memória molecular. Dessa forma, o presente trabalho visou analisar a ativação dos mecanismos de memória em plantas de arroz vermelho inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob estresse hídrico recorrente. Inicialmente realizou-se a inoculação com a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* empregando a cultivar 405 EMBRAPA Meio Norte de arroz vermelho, constando duas condições, sementes não inoculadas e sementes inoculadas, após o processo foram propagadas. Posteriormente, as plantas foram submetidas a três condições de estresse hídrico: o 1º sendo irrigadas diariamente, o 2º passando por uma deficiência hídrica por 15 dias na fase vegetativa (V3) e submetidas a deficiência hídrica por mais 15 dias na fase reprodutiva (R3) e o 3º as plantas foram submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva (R3). Analisou-se as respostas bioquímicas e moleculares envolvidas no processo de defesa a seca e a interação planta-*G. diazotrophicus*, na qual a análise do padrão de metilação foi realizada utilizando a técnica da Modificação por Bissulfato de Sódio. A inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus* mostrou-se ser uma potencial ferramenta contra o estresse hídrico em arroz vermelho¹. O arroz vermelho apresenta ajustes bioquímicos e moleculares em função da disponibilidade hídrica do ambiente em que se desenvolve. No entanto, sob condições de inoculação com *G. diazotrophicus* as condições de deficiência hídrica são mitigadas. As plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* destacam-se quanto a sua memória molecular, com menores valores de metilação em genes-chaves, para respostas ao estresse hídrico.

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

ABSTRACT

Brazil is responsible for annually producing about 11 to 13 million tons of rice (*Oryza sativa* L.), a cereal of great economic importance, and in the Brazilian Northeast, the production of red rice stands out. However, abiotic factors, such as water deficit due to drought, have negatively influenced the production of this grain. To minimize damage and maximize production, biotechnological tools have been used, such as plant growth promoting bacteria (BPCV) and molecular memory mechanisms. Thus, the present work aimed to analyze the activation of memory mechanisms in red rice plants inoculated with *Gluconacetobacter*

¹ Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I. E-mail: Gabriel.sousa.silva@aluno.uepb.edu.br

diazotrophicus under recurrent water stress. Initially, inoculation was performed with the PAL5 strain of *G. diazotrophicus* using the 405 EMBRAPA Meio Norte red rice cultivar, consisting of two conditions, non-inoculated seeds and inoculated seeds, after the process they were propagated. Subsequently, the plants were subjected to three conditions of water stress: the 1st being irrigated daily, the 2nd undergoing a water deficit for 15 days in the vegetative phase (V3) and subjected to water deficit for another 15 days in the reproductive phase (R3) and the 3rd the plants were subjected to water deficit for 15 days in the reproductive phase (R3). The biochemical and molecular responses involved in the defense process against drought and the plant-G interaction were analyzed. *diazotrophicus*, in which the analysis of the methylation pattern was performed using the Sodium Bisulfite Modification technique. Inoculation with the bacteria *G. diazotrophicus* proved to be a potential tool against water stress in red rice. Red rice presents biochemical and molecular adjustments depending on the water availability of the environment in which it grows. However, under conditions of inoculation with *G. diazotrophicus*, water deficit conditions are mitigated. Red rice plants inoculated with *G. diazotrophicus* stand out in terms of their molecular memory, with lower methylation values in key genes for responses to water stress.

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

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal de grande importância econômica, tornando-se um dos mais produzidos e consumidos no mundo, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2017), sendo cultivado em vários países, com destaque para a China, Índia, Tailândia, Vietnã, Estados Unidos, Brasil, Argentina e Uruguai (CONAB, 2019), destacando-se por manter um papel estratégico a nível econômico e social (GUIMARÃES e BALDANI, 2013).

O Brasil é responsável por produzir anualmente cerca de 11 a 13 milhões de toneladas de grãos de arroz, atuando como um produto de grande importância na economia nacional (CEOLIN et al., 2017). O arroz é cultivado em todo o país sob dois sistemas, em várzea (irrigado) e terras altas (sequeiro). Sabe-se que no Nordeste a aplicação do sistema de sequeiro é o mais utilizado, entretanto apresenta uma baixa produtividade. (EMBRAPA, 2014). No relatório divulgado pela Conab (2019), a safra 2018/19 apresenta estimativa nacional de área destinada à rizicultura na ordem de 1.759 hectares. Desse total, cerca de 76,6% (1.346,7 hectares) corresponde ao cultivo irrigado de arroz e os outros 23,4% (412,3 hectares) estão relacionados ao sistema de produção em condição de sequeiro.

No Nordeste, destaca-se a produção do arroz vermelho, anualmente cerca de dez mil toneladas de grãos são produzidas, principalmente nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Ceará (EMBRAPA, 2018). Seu cultivo é exemplo da agricultura familiar e integração do pequeno agricultor.

Fatores abióticos, como o déficit hídrico por seca, são uma característica típica da região que causam diversos tipos de estresses na planta. Os longos períodos de seca têm influenciado de forma negativa na produção desse grão, causando danos a planta, promovendo uma redução no crescimento, desenvolvimento e produtividade (OLIVEIRA, 2017). Como consequência ocorrem modificações em sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes (WAHID et al., 2007). Desse modo, se faz necessário o uso de ferramentas tecnológicas, como biotecnologia, para minimizar os danos causados pelo estresse hídrico e maximizar a produção. Os níveis de estresses causados pelos fatores abióticos podem ser reduzidos através de microrganismos, como a interação planta/bactéria, que coloniza a planta, estimula o crescimento e aumenta a produtividade (SAHARAN; NEHRA, 2011). Tais bactérias são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).

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

Em resposta ao estresse abiótico observa-se que as plantas modificam sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão de genes, passando por uma reprogramação celular com alterações na expressão e no acúmulo de transcritos de muitos genes, eventos que podem ficar fixados de forma molecular nos vegetais (WAHID et al., 2007; HASHIGUCHI et al., 2010; KAVAR et al., 2007). Como resposta ao estresse, o vegetal produz componentes não enzimáticos, dentre os quais se destacam o ascorbato, glutatona, β -caroteno e o α -tocoferol. Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestra-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas.

Tais modificações aclimatizam as plantas, por meio de um processo adaptativo denominado memória de estresse, que é uma pré-exposição (*priming*) de diferentes tipos ou

recorrência de estresse que altera as respostas subsequentes, exibindo uma ativação mais rápido e/ou mais forte das várias vias de resposta, preparando a planta para estresses futuros (RAMIREZ et al., 2015; LIU et al., 2014).

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

- Testar o desempenho das respostas moleculares de plantas de arroz vermelho inoculadas com

G. diazotrophicus sob déficit hídrico recorrente;

- Avaliar a regulação da expressão dos genes chaves, envolvidos nas vias de resposta ao estresse hídrico, em plantas de arroz vermelho inoculadas por *G. Diazotrophicus*.

3. METODOLOGIA

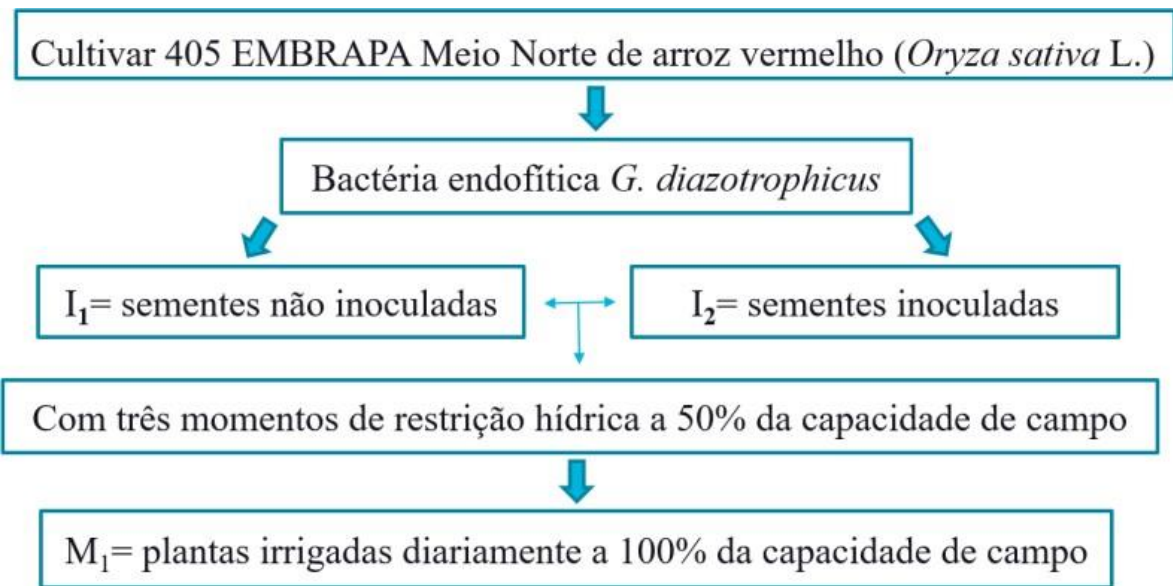
3.1 Caracterização da área experimental

O presente trabalho foi realizado na casa de vegetação, localizado no Campus I da UEPB, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal, em Campina Grande – PB, no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2021 a novembro de 2021.

3.2 Fatores em estudo e tratamentos

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

Figura 1. Representação do experimento.



Fonte: De autoria própria.

3.3 Processo de Inoculação

A inoculação foi realizada utilizando a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. A estirpe foi reativada em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio DYGS (2 g de glicose; 1,5 g de Peptona; 2 g de extrato de levedura; 0,5 g de KH₂PO₄·7H₂O; 0,5 g de MgSO₄·7H₂O; para 1L, pH 6,8 (RODRIGUEZ NETO et al., 1986), a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 48 horas. Em seguida foram semeadas em placas com meio semi-específico, LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995).

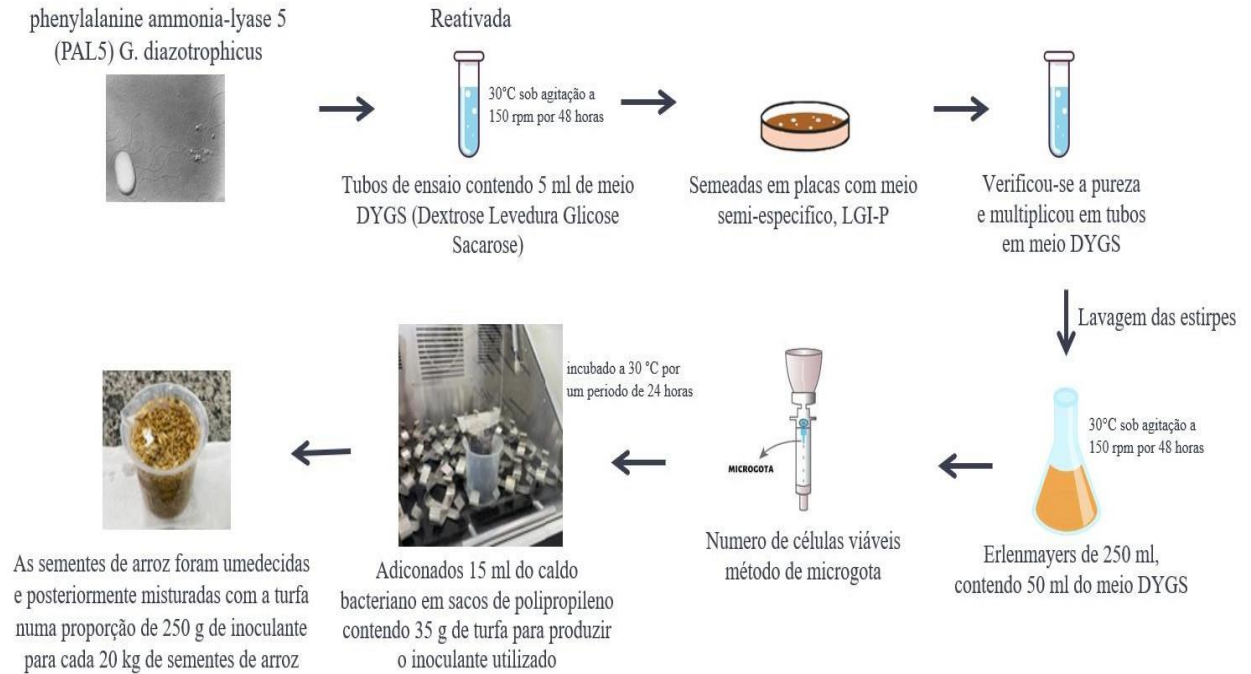
Após a reativação a estirpe passou por verificação de pureza e posteriormente, multiplicadas em tubos contendo meio DYGS nas condições citadas anteriormente. Em seguida as estirpes foram lavadas com solução salina e a densidade óptica (em 600 nm) ajustada para 0,9 – 1,5 ml, e após foi utilizado a ressuspensão bacteriana para inocular em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml do meio DYGS a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 48 horas.

Dessa forma, o número de células viáveis foi determinado utilizando método de microgota, no respectivo meio para cada bactéria (SPENCER e RAGOUT, 2001). Em seguida, foi adicionado 15 ml do caldo bacteriano em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa para produzir o inoculante utilizado. Em seguida, o inoculante foi homogeneizado e incubado a 30 °C por um período de 24 horas (fase de maturação).

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

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

Figura 2. Representação metodológica do processo de inoculação.



Fonte: De autoria própria.

3.4 Parâmetros em estudo

Parâmetros Moleculares

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

Para análise de expressão, amostras foliares foram coletadas, mantidas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em ultra freezer (-80 °C). Posteriormente, foi realizada a extração de RNA das amostras coletadas, por meio da utilização do kit de extração Pure Link[®] RNA Mini Kit (Ambion[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi extraído a partir de um pool de 10 plantas, de diferentes repetições, a fim de aumentar a eficiência no isolamento de sequências expressas, mRNA, relacionadas às respostas do processo de defesa.

Após as extrações do RNA total, as amostras foram quantificadas via espectrofotometria no aparelho Nano Vue Plus[™] (GE Healthcare), e a análise da integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel desnaturante com concentração de 1% de agarose. As amostras de RNA com razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas na síntese do cDNA por transcrição reversa a partir de 400 ng. μl^{-1} de RNA total, utilizando o kit SuperScript[™] TM II RT da Invitrogen.

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

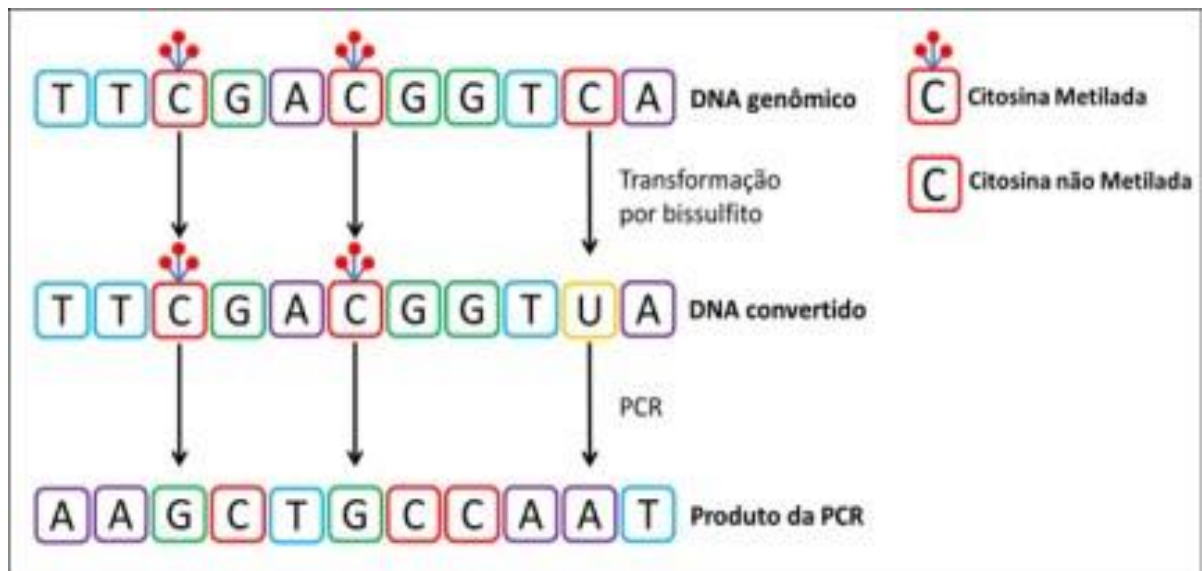
Para análise de metilação do DNA das sequencias genicas acima citadas foi utilizada a técnica da Modificação por Bissulfito de Sódio. Onde, depois de extraído, 300 ng de gDNA foram modificados por bissulfito de sódio, utilizando Methyl SEQR™ Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems, Foster City,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

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

| Nome do gene | Sequência | Referência |
|--------------|--|------------------------|
| <i>Sod1</i> | Senso CTGATGATCTTGAAAGGGTGG Anti- Senso GTGCTGGGAGATGGAAGGT | Rossatto et al. (2017) |
| <i>Gor</i> | Senso CACCTGTTGCACTGATGGAG Anti- Senso GTTCACTCAAGCCCACTACTG | Rossatto et al. (2017) |
| <i>Cat</i> | Senso GACAAGGAGAACAATTTCCAACAG Anti- Senso AGTAGGAGATCCAGATGCCAC | Rossatto et al. (2017) |
| <i>Apx</i> | Senso GTTGGTCTGGTCATCGAAGATT ACCACTTCGACCGCCACTACT Anti- Senso CATTCTCAGTAGCCATCTCCC | Rossatto et al. (2017) |
| <i>UBQ10</i> | Senso TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG Anti- Senso GCACCACAAATACTTGACGAACAG | Rossatto et al. (2017) |

Fonte: FILGUEIRAS et al. (2019).

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



Fonte: PORTINHO (2015).

O padrão de metilação dos genes foi analisado pelo sistema COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis) que combina a modificação por bissulfite, a amplificação da região de interesse por PCR e digestão por enzimas de restrição específicas (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). As análises foram realizadas em triplicata em todas as amostras. Inicialmente, 6 ng de DNA modificados por bissulfite foram amplificados em reação contendo: Go Taq Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, WI, EUA), 10 mM de cada conjunto de *primers* (Tabela 1) e água RNase free para completar o volume final.

Posteriormente, metade dos produtos de amplificação foram digeridos por enzimas de restrições. Estas enzimas reconhecem regiões específicas do DNA clivando-o. Na transformação apenas as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas e transcritas como adeninas durante a PCR. As citosinas metiladas permanecem inalteradas e durante a amplificação são transcritas como guaninas. A outra parte foi submetida as mesmas condições das soluções digeridas, porém sem enzima. Padrões comerciais (EpiTect® - PCR control DNA set, QIAGEN, Mississauga, ON, CA), com níveis de metilação de 0% e 100%, estiveram presentes em cada uma das reações sendo sujeitos as mesmas condições as quais as amostras foram submetidas. Estes controles foram incluídos em triplicata em cada experimento.

3.5 Análises estatísticas

Os dados das variáveis de resposta obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste (F) a 5% de probabilidades. Para as variáveis significativas ($p < 0,05$), foi aplicado teste de comparação de médias (Teste de Tukey). As análises estatísticas e preparo dos gráficos foram realizadas utilizando o software SIGMAPLOT 11.0 (SYSTAT SOFTWARE INC., 2008).

4. Resultados e Discussão

4.1. Controle de qualidade do inoculante utilizado

A contagem do número de células viáveis presentes no inoculante mostrou uma população acima de 10^8 g^{-1} e ausência de contaminantes (Tabela 2). Alguns trabalhos realizados na Embrapa Agrobiologia, com o intuito de selecionar o veículo de inoculação utilizando as estirpes *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. mostraram que, o número de células viáveis se mantém acima de 10^8 g^{-1} por um período de até 180 dias após a produção (FERREIRA, 2004). Bashan (1998) recomenda que a população no inoculante seja superior a 10^8 células g^{-1} para se obter uma inoculação bem sucedida. Por outro lado, a contagem do número de células presentes nas sementes peletizadas mostrou uma população ao redor de 10^9 células g^{-1} na semente. É importante introduzir no solo um número suficiente de células para garantir uma população com a capacidade de competir com os microrganismos nativos e sobreviver às condições adversas no solo.

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

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

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

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

A análise sobre o número de bactérias diazotróficas - bactérias capazes de fixar azoto molecular (N_2) - presentes nas raízes e folhas lavadas, avaliadas durante o estágio de desenvolvimento reprodutivo, mostrou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos inoculados, porém não sendo detectadas nos tratamentos controle (não inoculados) (Tabela 3). Em todos os tratamentos inoculados se verificaram concentrações de *G. diazotrophicus* PA15 maiores que 10^5 UFC g^{-1} . Punschke et al. (2005), encontraram resultados similares quando quantificaram bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz cultivadas no Uruguai, onde 69% das amostras de raízes apresentaram concentrações maiores que 10^5 UFC g^{-1} . Por outro lado, Sabino (2007) não encontrou diferença no número de células entre os tratamentos inoculados com *B. brasilense* e *H. seropedicae* e os não inoculados em plantas de arroz avaliadas nos estádios de florescimento e maturação de grãos.

Dentre os microrganismos com capacidade de fixar nitrogênio existem diferentes procariotos, como arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética

(MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dentro da microbiota do solo, particularmente na rizosfera, está uma grande parte das bactérias diazotróficas (WAKELIN et al., 2009). Baldani (1996) sugere que em sistemas com solo, o controle não inoculado possui populações nativas de bactérias diazotróficas que alcançam o mesmo número que as inoculadas. Estes resultados mostram que as populações submetidas às mesmas condições tendem a estabilizar-se no solo. No entanto a presença de bactérias diazotróficas não necessariamente significa que a planta se beneficie da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) ou outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

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

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

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

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

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

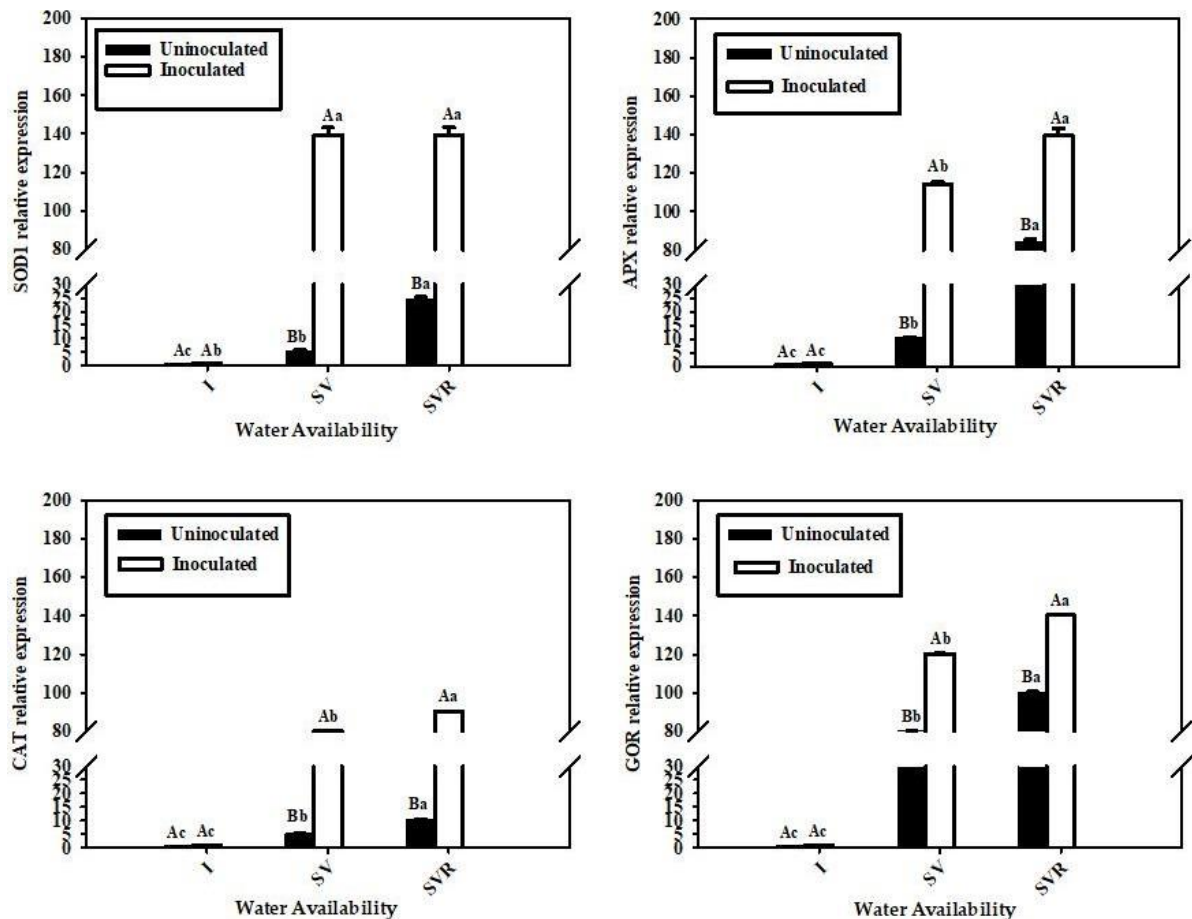
4.3. Análises Moleculares

4.3.1. Expressão gênica

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

Verificou-se diferença significativa entre todos os tratamentos, para todos os genes estudados (figura 4). Analisando-se a figura, nota-se que, o tratamento das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse recorrente foram estatisticamente superiores aos demais.

Figura 4. Valores de expressão relativa em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação.



Na figura acima observa-se os valores de expressão relativa em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação, sendo **I** para plantas irrigadas diariamente a 100% da capacidade de campo, **SV** para plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva e **SVR** para plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase vegetativa e submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

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

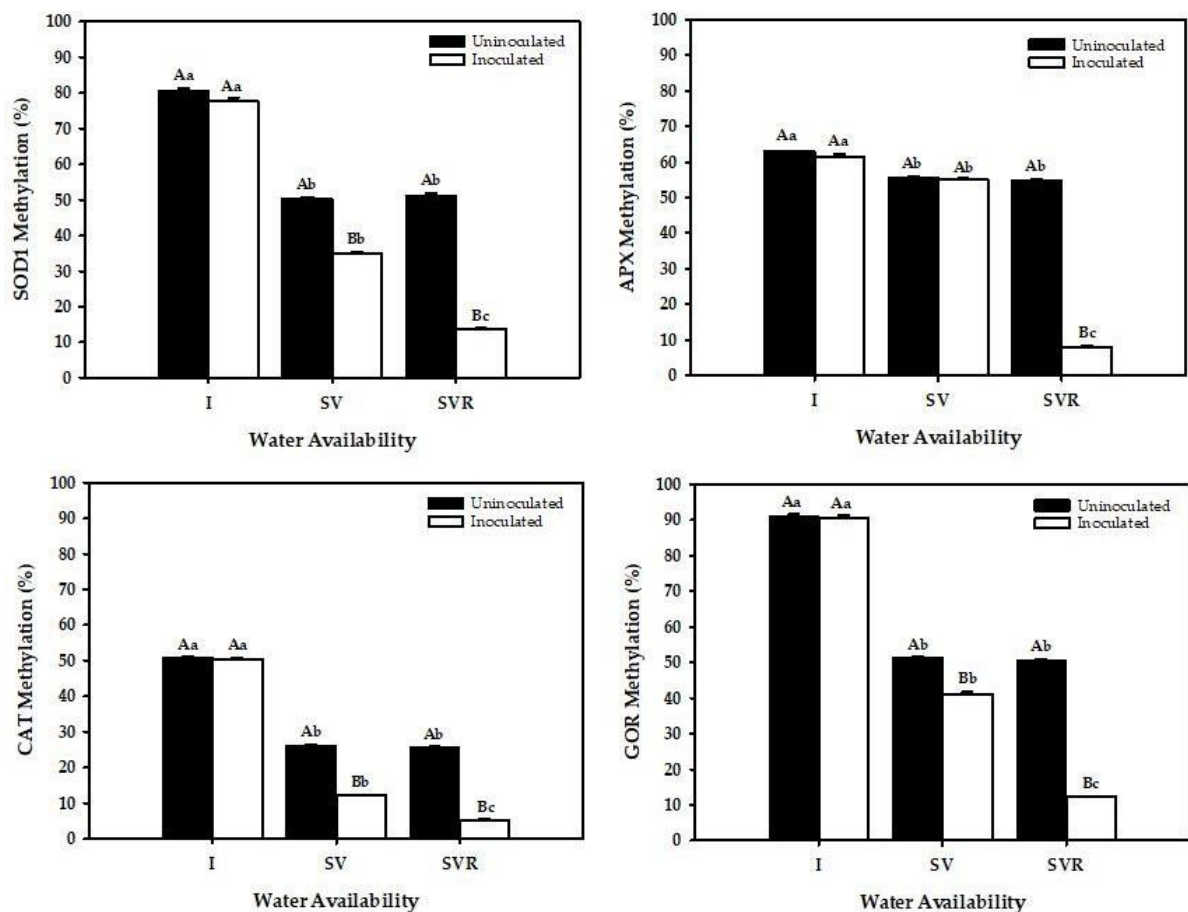
CAT e GOR), para o tratamento inoculado com *G. diazotrophicus* com estresse apenas na fase vegetativa.

4.3.2. Porcentagens de Metilação

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

Verificou-se diferença significativa entre todos os tratamentos, para todos os genes estudados (figura 3). Analisando-se a figura, nota-se que, o tratamento das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse recorrente foi estatisticamente hipometilada aos demais.

Figura 5. Valores de porcentagem de metilação em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação.



Observa-se na figura 5, valores de porcentagem de metilação em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação, sendo **I** para plantas irrigadas diariamente a 100% da capacidade de campo, **SV**

para plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva e **SVR** para plantas submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase vegetativa e submetidas a deficiência hídrica por 15 dias na fase reprodutiva. Campina Grande/PB, 2022. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras minúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação) e médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de F ($p \leq 0,05$) (disponibilidade de água).

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

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

5. CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAÚJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRECHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTOMARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; RAELE PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, Rio de Janeiro, v. 10, n.450, p.1-17, 2009.

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

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

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

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

CEOLIN, W. C.; SCHREIBER, F.; ANDRES, A.; CONCENCO, G.; MOISINHO, I. S.; CORADINI, M. C.; MARTINS, M. B.; BEHENCK, J. P. Efeito do herbicida imazapyr+imazapic em diferentes doses no controle de arroz vermelho e capim arroz. In: **Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, 2017, Gramado. Intensificação sustentável. Porto Alegre: IRGA, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FERREIRA, J. S. **Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado**, Seropédica, 2004, 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência do solo) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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

FONSECA, J. R.; PEREIRA, J. A.; SILVA, S. C.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, C. **Resgate de arroz vermelho (oryza sativa l.) nos estados da Paraíba e Ceará**. Disponível em: <[www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_196/trabalhos/CBC-TRAB 5-2. pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/doc_196/trabalhos/CBC-TRAB%205-2.pdf)> Acesso em: 30 de out. 2019.

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

GEALY, D. R.; AGRAMA, H.; JIA, M. H. Genetic analysis of atypical U.S. red rice

- phenotypes: indications of prior gene flow in rice fields? **Weed Science**, v.60, n.3, p.451-461, 2012
- GIBBS, W. W. Além do DNA. Genoma: o código da vida. **Scientific American**, São Paulo, n. 16, p. 44-51, 2007.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GRIEVE, C. M.; GRATAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, EUA, v.70, n.2, p.303-307, 1983.
- GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; OLIVEIRA, J. P.; RANGEL, P. H. N.; RODRIGUES, C. A. P. Sistema radicular do arroz de terras altas sob deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.41, n.1, p.126-134, 2011.
- GUIMARAES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. **Revista Ciência Rural**, Belém, v.56, n.1, p. 125-132, 2013.
- HABU, Y.; KAKUTANI, T.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. **Current opinion in genetics & development**, v. 11, n. 2, p. 215-220, 2001.
- HADIARTO, T.; TRAN, L. P. Progress studies of drought-responsive genes in rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 297-310, 2011.
- HANSON, M. A.; SKINNER, M. K. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. **Environmental epigenetics**, v. 2, n. 1, 2016.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Netherlands, v.16, n.10, p. 463-471, 2008.
- HASHIGUCHI, A.; AHSAN, N.; KOMATSU, S. Proteomics application of crops in the context of climatic changes. **Food Research International**, v.43, p.1803-1813, 2010.
- HISCOX, J. D.; ISRAELTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, Canadá, v. 57, n.12, p. 1332-1334, 1979.
- JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 253-262, 2007.
- KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress, **Molecular Breeding**, v. 21, p. 159-172, 2007.
- KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*,

- Gluconobacter, and Kozakia. In: **DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E.** (Eds.). *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Alpha and beta ub classes*. New York: Springer, v. 5, p.163-200, 2006.
- LIU, N.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. H3K27me3 and H3K4me3 chromatin environment at super-induced dehydration stress memory genes of *Arabidopsis thaliana*. **Mol Plant**, v. 7, n.3, p. 502-513, 2014. doi: 10.1093/mp/ssu001
- LUO, L. J. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n.13, p. 3509-3517, 2010.
- MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; ARAÚJO, J. L. S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 1448–1458, 2011.
- MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; PEREIRA, M. B.; LOPES, H. M.; COSTA, E. M.; CURTI, A. T. M. Características morfoagronômicas de dois genótipos de arroz vermelho em cultivo inundado. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. Recife, v.7, n.3, p. 394-401, 2012.
- MENG, F.; GLASER, S. S.; FRANCIS, H.; YANG, F.; HAN, Y.; STOKES, A.; ZHAO, H. Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 3, p. 804-817. 2012.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.
- MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.49, n.1, p.18-25, 2014.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4530>>. Acesso em: 29 de out 2019.
- NEVES, M. J.; TERENCEZI, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalases from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal Microbiology. Biotechnology**.v.10, p. 17-19, 1994.
- OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M.; SANTOS, O. J. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and biotechnology Reports**, v. 3, n.1, p. 56-57. 2014.
- OLIVEIRA, C. **Mudanças fisiológicas e moleculares na cultura do arroz e em plantas daninhas C3 e C4 submetidas a estresses abióticos**. 2017. Tese (Programa de PósGraduação em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- OLIVEIRA, M. M.; RAMOS, E. T. A.; DRECHSEL, M. M.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.;

BALDANI, J. I. Gluconacion from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 is an active bacteriocin against phytopathogenic and beneficial sugarcane bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1812-1826, 2018.

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

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

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

PEREIRA, J. A.; MORAIS, O. P. **As variedades de arroz vermelho brasileiras**. Embrapa Meio-Norte, Documentos 229, PiauÍ: Teresina, 39 p. 2014.

PORTINHO, D. **Análise do padrão de metilação de dna de sequências LINE1 e dos genes SFRP1, SFRP2 e TP73 na inflamação crônica periodontal e câncer de boca**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Bucal) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba-SP.

PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. 1. ed. Fortaleza, INCT Sal, 2010, p.472.

RAMIREZ, D. A.; ROLANDO, J. L.; YACTAYO, W.; MONNEVEUX, P.; MARES, V.; QUIROZ, R. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Sci**, n. 238, p. 26-32, 2015.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p. 227-247, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, F. G.; **Comportamento fisiológico da berinjela cultivada em ambiente protegido sob taxas de reposição hídrica**. Catolé do Rocha, 2012. 48p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso), Licenciatura em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba. SOARES, V. N.; RADKE, A. K.; TILLMANN, M. A. A.; MOURA, A.B.; SCHUCH, L. O. B. Desempenho fisiológico de sementes de arroz tratadas com rizobactérias e tiametoxam submetidas a diferentes temperaturas. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 186-193, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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