



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

BRUNA CAVALCANTE DOS SANTOS

**INOCULAÇÃO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* COMO AGENTE
MITIGADOR DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE ARROZ VERMELHO**

CAMPINA GRANDE-PB

2017

BRUNA CAVALCANTE DOS SANTOS

**INOCULAÇÃO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* COMO AGENTE
MITIGADOR DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE ARROZ VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

CAMPINA GRANDE-PB

2017

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.

S237i Santos, Bruna Cavalcante dos.

Inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* como agente mitigador do estresse hídrico em plantas de arroz vermelho [manuscrito] / Bruna Cavalcante dos Santos. - 2017.

31 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. *Oryza sativa* L.. 2. Estresse hídrico. 3. Bactéria endofítica.

21. ed. CDD 582

BRUNA CAVALCANTE DOS SANTOS

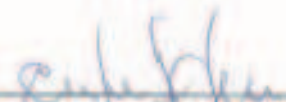
**INOCULAÇÃO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* COMO AGENTE
MITIGADOR DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE ARROZ VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso
de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como parte das exigências para
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia Vegetal

Aprovado em: Campina Grande/PB 14/12/2017.

BANCA EXAMINADORA



(Prof. Dr. Carlos Henrique Salgado Godinho Meneses
(Orientador- Universidade Estadual da Paraíba- UEPB)



(Dr.ª Simone Silva dos Santos Lopes
(Avaliador- Universidade Estadual da Paraíba- UEPB)



(Dr.ª Shirley Raquel Germano
(Avaliador- Universidade Estadual da Paraíba- UEPB)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Maria das Dores Cavalcante e José Eptácio dos Santos, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio incondicional.

A minha avó Maria Joana Cavalcante, por ter me acolhido e me dado assistência. E ao meu avô Eptácio dos Santos (*In memoriam*), por todo o amparo e por sempre acreditar no meu potencial, muitas lembranças e saudades!

Aos meus irmãos, em especial a Buana e Bruno pelo incentivo e ajuda na conclusão dos meus objetivos.

Ao meu orientador Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, pela orientação, compreensão e paciência, seus ensinamentos foram de grande importância ao longo dessa caminhada.

A todos os *professores* por terem me proporcionado o conhecimento e a educação, colaborando com meu processo de aprendizagem e alimentando meu amor pela Biologia.

A Universidade Estadual da Paraíba e ao Departamento de Biologia por me possibilitarem a conclusão do curso e o arcabouço necessário a minha *formação* profissional.

A Banca examinadora, Dra. Simone Silva dos Santos Lopes e Dra. Shirley Rangel Germano, pela disponibilidade e por aceitarem avaliar meu trabalho.

Aos meus colegas e amigos de curso, por toda força e auxílio direto ou indiretamente para que eu concluísse esse trabalho.

A todos os meus amigos que contribuíram para meu sucesso, especialmente a Jonatha Lisboa, pelo suporte tanto material quanto emocional, pois sem ele não seria possível à finalização do curso, agradeço imensamente pelas palavras de carinho e ânimo.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação, o meu MUITO OBRIGADA!

**“Descobrir consiste em olhar para o que todo
mundo está vendo e pensar uma coisa
diferente”.**

(Roger Von Oech)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de retenção de água no solo.....	15
Figura 2. Teores de prolina livre em folhas de arroz vermelho sob estresse de 15 dias e reidratação (1 hora).	22
Figura 3. Teores de Glicina-Betaína (mmol. g ⁻¹ MF) em folhas de arroz vermelho sob estresse de 15 dias e reidratação (1 hora).	24
Figura 4. Efeitos dos fatores de inoculação (In) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene P5CR.	26
Figura 5. Efeitos dos fatores de inoculação (In) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene BADH.	27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tabela de Oligonucleotídeos iniciadores específicos para P5CR e BADH utilizados nas análises de qPCR para avaliar a expressão dos genes em plantas de arroz vermelho. 19
- Tabela 2.** Tabela de contagem realizada no inoculante produzido e nas sementes inoculadas e não inoculadas com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5, utilizada no experimento.20
- Tabela 3.** Tabela da 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 reprodutivo.....21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Geral.....	13
2.2	Específicos	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Caracterização da área, clima e solo	14
3.2	Disposição do experimento	14
3.3	Processo de inoculação	15
3.4	Controle de qualidade do inoculante.....	15
3.5	Semeadura, Tratos vegetais e Adubação.....	16
3.6	Colheita e coleta do material vegetal para análise	16
3.7	Estimativa do número mais provável (NMP) nas raízes e a nas folhas.	16
3.8	Variáveis analisadas	17
3.9	Parâmetros avaliados	17
3.9.1	Teor de prolina	17
3.9.2	Teor de glicina betaína.....	17
3.9.3	Avaliação da regulação da expressão dos genes P5CR e BADH	18
3.10	Análises estatísticas	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Controle da qualidade do inoculante utilizado	20
4.2	Estimativa do número mais provável (NMP) nas raízes e nas folhas....	21
4.3	Parâmetros avaliados	22
4.3.1	Teor de prolina	22
4.3.2	Glicina betaína.....	23
4.3.3	Análises das expressões gênicas.....	25
5	CONCLUSÃO	28
	ABSTRACT	29
	REFERÊNCIAS	30

INOCULAÇÃO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* COMO AGENTE MITIGADOR DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE ARROZ VERMELHO

Bruna Cavalcante dos Santos¹

RESUMO

Os mecanismos de interação entre plantas e bactérias diazotróficas vem sendo amplamente estudados e demonstram uma potencial forma de desenvolvimento voltado para cultivares de grande importância econômica regional. Nesse aspecto tem se estudado o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) e sua interação com a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a fim de avaliar sua eficiência na mitigação do estresse hídrico. Desta forma, foram avaliados parâmetros bioquímicos como teores de prolina e de glicina betaína que são solutos osmoprotetores para o vegetal e a expressão de genes para suas rotas de biossíntese: P5CR e BADH, respectivamente. Para isso foi utilizada a inoculação com *G. diazotrophicus*, constando de duas condições de inoculação: I1 = Não inoculado e I2 = Inoculado com *G. diazotrophicus* e (b) quatro manejos de água as plantas, correspondentes aos teores de umidade do solo: U1 = 30-35%; U2 = 50-55%; U3 = 70-75% e U4 = 100% de água disponível. Fatorialmente combinados, resultando em oito tratamentos, com quatro repetições, distribuídos no delineamento inteiramente casualizado na fase reprodutiva da planta, variando os tratamentos de deficiência hídrica em função da inoculação, foram coletadas amostras de folhas e raízes, ao final do período de deficiência hídrica (antes da retomada da irrigação plena), para extração de RNA e posterior síntese de moléculas de cDNA e estudos de expressão relativa. Concluindo-se que a inoculação com *G. diazotrophicus* resultou em maiores teores de prolina e glicina betaína em plantas inoculadas sob estresse hídrico e consequentemente maior expressão dos genes de interesse.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L.; Tolerância ao estresse hídrico; bactéria endofítica.

¹ Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba.
Email: brunacavalcantes23@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) foi o primeiro tipo de arroz introduzido no Brasil pelos colonizadores, sendo ainda pouco conhecido, mas cultivado principalmente no Semiárido nordestino, em ordem de importância, nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, Bahia e Alagoas (FILGUEIRAS, 2015). O plantio é normalmente realizado por pequenos agricultores, utilizando sementes nativas ou variedades tradicionais selecionadas ao longo do tempo, caracterizadas pela variabilidade, adaptabilidade às condições de cultivo e ampla base genética (FIGUEIRAS, 2015).

O arroz vermelho ou arroz da terra como é mais conhecido, é de porte alto, folhas verde-claras, decumbentes e pilosas, colmos finos, alta capacidade de perfilhamento e sementes com pericarpo avermelhado, aristas longas, altas taxas de dormência e debulha natural (SOUZA et al., 2012). O pigmento vermelho do grão do arroz é uma proantocianina de grande valor para a alimentação humana, sendo introduzido no Brasil pelos portugueses no século XVI (BARBOSA, 2014), melhorando a digestibilidade, tendo ação antioxidante benéfica para o sistema cardiovascular, além de ser repelente contra patógenos.

É uma cultura anual, adaptada a solos alagados, sendo considerada uma espécie hidrófila, contudo, devido ao processo evolutivo da espécie, o arroz adquiriu ampla adaptabilidade às diferentes condições de solo e clima, desenvolvendo-se bem também em áreas com baixa disponibilidade hídrica (MENEZES et al. 2012). Desse modo, dois sistemas de produção de arroz são considerados no Brasil, o de várzea, arroz alagado irrigado por inundação, e o de terras altas, cultivado em condições de sequeiro dependente da água das chuvas ou irrigado por aspersão, tendo este último, o déficit hídrico como principal fator limitante no desenvolvimento da cultura (SILVA et al., 2016).

A habilidade do vegetal em se desenvolver em ambiente com restrição hídrica no solo pode ser determinada através da eficiência com que a planta ajusta o seu comportamento bioquímico e fisiológico, visando a maximizar a aquisição de carbono (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Outra estratégia empregada pelas plantas para sobreviver aos estresses abióticos, tais como a salinidade, temperaturas extremas, alta intensidade luminosa

e a seca inclui o sistema de osmorregulação que abrange: carboidratos, aminoácidos e compostos de amônia quaternária, que desempenham um papel importante no ajuste osmótico e na estabilização de células vegetais (CHA-UM e KIRMANEE, 2011). Os osmoprotetores são substâncias atóxicas que as plantas acumulam nas células para combater as condições ambientais adversas, tais como, glicina betaína, prolina, poliaminas, manitol, pinitol, entre outros.

Dentre algumas alterações que podem ser desenvolvidas encontram-se as relacionadas com os microrganismos denominados endofíticos, que podem produzir produtos de potencial interesse biotecnológico. Esses microrganismos utilizam diferentes mecanismos para o crescimento vegetal, como produção de hormônios de crescimento vegetal, solubilização de nutrientes do solo, proteção contra patógenos e estresses abióticos, fixação de nitrogênio entre outros (GLICK et al., 1998).

Dentre esses microrganismos está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma Proteobactéria (classe α -proteobacteria), família *Acetobacteraceae*, do gênero *Gluconacetobacter*. É uma bactéria Gram-negativa, que não tem movimento espiralado, com pH ótimo de crescimento na faixa de 4,5-5,8 e com células variando entre (0,7 a 0,8) x (2 a 4) μm , que utiliza ácido 2-ceto glucônico como uma fonte de carbono, o que favorecendo a fixação de nitrogênio (MENESES et al., 2011). Esta bactéria cresce em alta concentração de sacarose (10% sacarose) e pH muito baixo (3,0) e tem a habilidade de fixar nitrogênio em condições microaerófilas (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988., BARBOSA, 2014). O pH ótimo para crescimento está ao redor de 5,5, embora os valores de pH e taxa de respiração possam variar consideravelmente de acordo com as fontes de carbono (BARBOSA, 2014).

O ajuste osmótico é uma das principais respostas das plantas ao estresse hídrico e está correlacionado ao grau de resistência (CARLIN e SANTOS 2009) mantendo o equilíbrio hídrico e preservando a integridade celular de proteínas, enzimas e membranas, para a continuidade das atividades vitais, e constitui uma das estratégias adaptativas vegetais aos múltiplos efeitos causados pelos estresses (CARLIN e SANTOS 2009). Dentre esses osmoprotetores tem-se a prolina e a glicina betaína.

A glicina betaína protege as membranas dos tilacóides, o que mantém a eficiência fotoquímica na fotossíntese (ASHRAF e FOOLAD, 2007). Sendo um

quaternário de amônio e um soluto responsável pela estabilização da estrutura de proteínas, na atividade de enzimas e nos complexos proteicos, além de manter a integridade de membranas contra danos decorrentes do estresse osmótico.

De modo que o entendimento desse tipo de mecanismo, assim como a avaliação comparativa entre a produção de prolina e glicina-betaína em plantas submetidas ou não a estresses, garante em primeira vista a eficácia do inoculante que é de grande significância para o desenvolvimento de culturas mais adaptadas a seca. Analisando os teores desses dois osmoprotetores vegetais relacionando com os principais genes das suas respectivas vias de biossíntese é possível a prospecção de inoculantes com menor custo e, principalmente, na agricultura como auxílio no melhoramento vegetal.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Analisar os osmoprotetores prolina e glicina-betaína entre plantas de arroz vermelho inoculadas e não inoculadas com *G. diazotrophicus* sob estresse hídrico, por meio da quantificação da concentração desses compostos e da expressão dos genes envolvidos na via de biossíntese, a fim de determinar a eficácia da inoculação na mitigação da condição adversa.

1.2 Específicos

- ✓ Quantificar os teores de prolina e glicina-betaína presentes em plantas de arroz vermelho por espectrofotometria;
- ✓ Identificar a regulação na expressão dos genes P5CR e BADH por ensaios de PCR em tempo Real;
- ✓ Relacionar os resultados de PCR em Tempo Real às vias de resposta ao estresse hídrico na planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área, clima e solo

O trabalho constou de estudo de campo na área experimental do Viveiro de mudas da UEPB, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), localizado no município de Campina Grande, PB. A cidade está situada nas seguintes coordenadas: 07° 12' 42,99" de latitude Sul, 35° 54' 36,27" longitude Oeste, 521 metros altitude. No período compreendido entre Agosto de 2016 a Agosto de 2017,

O clima da região é do tipo Aw'i, segundo classificação de Köppen, caracterizando-se por ser semiárida, com duas estações distintas, uma chuvosa com precipitação irregular e outra sem precipitação. A precipitação média anual é de 870 mm, temperatura média de 27 °C com período chuvoso concentrando-se entre os meses de fevereiro e abril.

As condições edáficas do solo utilizado no experimento foram representadas por um solo classificado como NEOSSOLO FLÚVICO Eutrófico com textura arenosa (SANTOS et al., 2006).

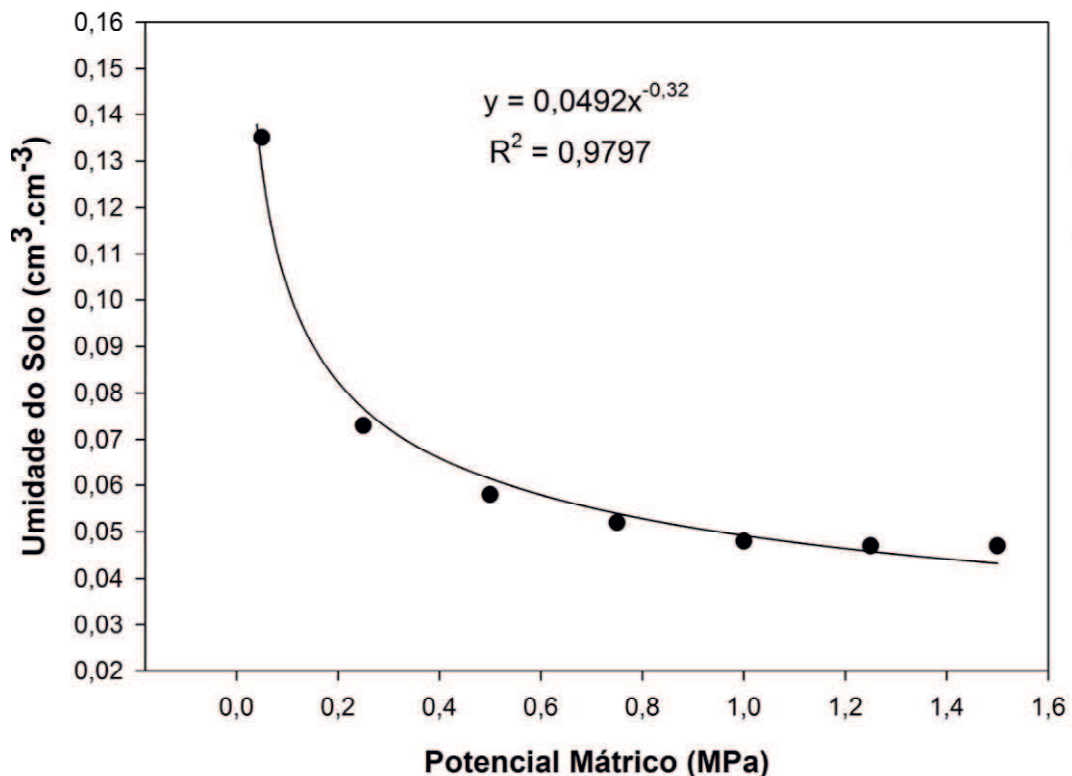
2.2 Disposição do experimento

Foram objetos de estudos - (a) inoculação com *G.diazotrophicus*, constando de duas condições de inoculação: I1 = Não inoculado e I2 = Inoculado com *G. diazotrophicus* e (b) quatro manejos de água às plantas, correspondentes aos teores de umidade do solo: U1 = 30-35%; U2 = 50-55%; U3 = 70-75% e U4 = 100% de água disponível. Fatorialmente combinados resultarão em oito tratamentos, com quatro repetições, distribuídos no delineamento inteiramente casualizado. A parcela foi constituída de um lisímetro de drenagem, onde foram semeadas 20 sementes.

Os lisímetros eram de 100 cm de comprimento, 50 cm de largura e 50 cm de profundidade, instalando-se na base um sistema de drenagem por meio de tubulação e registro; foram preenchidos com uma camada de cinco cm de brita, mais cinco cm de areia grossa e preenchendo-se o restante com material de solo.

A irrigação foi realizada a partir da semeadura, mantendo-se a umidade do solo próximo à capacidade de campo. Quando as plantas estavam na fase Reprodutiva 3, foram coletadas amostras de solo, diariamente, e medidos os potenciais hídricos do solo por psicrometria, utilizando o Dewpoint Potentia Meter (WP4-T), associada a uma curva de retenção de água no solo (figura 1).

Figura 1. Curva de retenção de água no solo, EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica – RJ.



Fonte: EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica – RJ.

2.3 Processo de inoculação

Foi utilizada uma estirpe selecionada de *G. diazotrophicus* pelas suas características de solubilizar fósforo *in vitro*, produção de AIA e redução de acetileno: *G. diazotrophicus* PAL5. A estirpe foi multiplicada em tubos contendo 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. As células posteriormente foram lavadas com solução salina e a densidade óptica (em 600 nm) ajustada para 0,9 – 1,5 ml, onde logo após esta ressuspensão bacteriana foi utilizada para inocular erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio DYGS a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 48 horas (BARBOSA et al., 2014).

2.4 Controle de qualidade do inoculante

Foi realizada a partir do método de contagem do número mais provável (NMP) nas células inoculadas e não inoculadas de acordo com (DÖBEREINER et al., 1995).

2.5 Semeadura, Tratos vegetais e Adubação

A semeadura foi realizada em novembro de 2016, com 20 sementes por lisímetro, distribuídos em duas filas na profundidade de 3 cm, deixando-se apenas 60 plântulas por lisímetro, realizando-se o desbaste 3 dias após germinação.

Os tratos culturais constaram de controle de plantas daninhas (tiririca) manualmente, na medida em que surgia no interior dos lisímetros às plantas invasoras.

A adubação foi realizada com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), como fonte de Nitrogênio (N), 18 gr. dividido em duas aplicações, a primeira foi após a germinação, e a segunda aplicação foi antes do estresse hídrico, no surgimento das panículas, diluído em água, baseando-se nos dados da análise de amostras do solo, quantidades recomendadas para cultivo de arroz (BARBOSA, 2014). A utilização de outros nutrientes não foi necessária, devido ao solo já disponibilizar essa suplementação, sendo este bastante rico em matéria orgânica.

2.6 Colheita e coleta do material vegetal para análise

A colheita foi realizada de forma manual aos 125 dias após a semeadura (DAS), realizando as operações de corte, recolhimento das plantas e os grãos de arroz vermelho encontravam-se entre 18 a 23% de umidade.

A coleta do material vegetal foi realizada depois de 15 dias que as plantas estavam sob estresse hídrico, na fase reprodutiva. Foram coletadas duas folhas e raízes, por repetição, com auxílio de luvas, tesoura e envolvidas em papel alumínio, em seguida, postas em nitrogênio líquido e imediatamente encaminhadas para um freezer à -80°C, para conservá-las. Uma hora após reidratar todas as parcelas, foram coletadas novas amostras para serem feitas análises e compará-las com as plantas no estresse, seguindo o mesmo procedimento.

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

A contagem na época do estabelecimento do déficit estresse. Foram trituradas 5 g de raiz e folhas, separadamente, lavadas no liquidificador, na presença de 45 ml de água destilada estéril e em seguida foram diluídos seriadamente até 10⁻⁶. Logo após, 100µl dos 4 extratos mais diluídas foram colocados em frascos com 5 ml dos

meios LGI-P. A contagem foi realizada após 7 dias de incubação de acordo com Silva (2016).

2.8 Variáveis analisadas

Avaliou-se as características bioquímicas, como teor de prolina e glicina-betaína das plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus*, na fase reprodutiva da planta, variando os tratamentos de deficiência hídrica em função da inoculação.

Nas plantas cultivadas foram coletadas amostras de folhas e raízes, ao final do período de deficiência hídrica (antes da retomada da irrigação plena), para extração de RNA e posterior síntese de moléculas de cDNA. As amostras vegetais foram conservadas em nitrogênio líquido. Os cDNAs sintetizados foram submetidos a experimentos de PCR em tempo real para a avaliação da regulação dos genes de interesse.

2.9 Parâmetros avaliados

2.9.1 Teor de prolina

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

2.9.2 Teor de glicina betaína

A Glicina betaína foi determinada segundo o método de Grieve e Grattan (1983). As amostras serão maceradas em 2 mL de água destilada sob agitação constante, à temperatura ambiente, por um período de 4 horas, seguindo de centrifugação a 3.500 g por 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e dele retirado uma alíquota de 250 µL para a quantificação de glicina betaína. Para isso, 250 µL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a cada amostra, seguindo

de incubação em banho de gelo por 1 hora. Após esse tempo, 200 µL de iodeto de potássio (a aproximadamente 8°C) foram adicionados e a mistura incubada por 16 horas a 0 °C. As amostras foram centrifugadas a 3.500 g, por 15 minutos a 0 °C, e o resíduo coletado. Em seguida, lavado por duas vezes em 2 mL de ácido sulfúrico 1 N (a aproximadamente 8 °C) e após centrifugação a 3.500 g, por 5 minutos a 0 °C, o precipitado foi dissolvido em 3 mL de 1,2-dicloroetano, por meio de agitação vigorosa. Após 2,5 horas de repouso, a ABS das amostras foi obtida a 365 nm, com o auxílio do espectrofotômetro de microplaca da Multiskan GO - Thermo Scientific, e para os cálculos sendo utilizada uma curva padrão de glicina betaína. Os resultados foram expressos em mg glicina betaína g⁻¹ MS.

2.9.3 Avaliação da regulação da expressão dos genes P5CR e BADH

Por meio de ensaios de PCR em Tempo Real, foram avaliados os efeitos da inoculação por *G. diazotrophicus* sobre a ativação da transcrição dos genes envolvidos nas principais vias de resposta ao estresse hídrico, em plantas de arroz vermelho expostas à tal estresse.

Para análise de transcriptoma, amostras de folhas e raízes foram coletadas na fase de deficiência hídrica, mantidas em nitrogênio líquido onde, em seguida, realizada a extração de RNA das amostras coletadas, por meio da utilização do kit de extração PureLink® RNA Mini Kit (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi extraído a partir de três plantas, de diferentes repetições, a fim de aumentar a eficiência no isolamento de sequências expressas, mRNA, relacionadas às respostas de tolerância à deficiência hídrica.

Após as extrações do RNA total da parte aérea e raiz, as amostras foram quantificadas via espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), e a análise da integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel com concentração de 1% de agarose.

Os oligonucleotídeos específicos demonstrados na tabela 1 uma tabela para cada gene em estudo foram sintetizados utilizando como molde as sequências obtidas através do genoma depositado de *Oryza sativa* Japonica, na base de sequencias do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para P5CR e BADH utilizados nas análises de qPCR para avaliar a expressão dos genes em plantas de arroz vermelho.

Gene name	Tipo de Oligonucleotídeo	Sequencias
P5CR	Primer	Forward TGTGTCCCAAGAAGCTGATG Reverse GATGTTCCAGCCGAAACCAT
BADH	Primer	Forward ACGATATTCCGGTCTTCGTC Reverse CAGGTCGCGAAATTCCTG

As reações de qPCR foram realizadas com três repetições biológicas para cada tratamento. Além disso, para cada repetição biológica foram realizadas três réplicas técnicas a partir da mesma diluição de cDNA (1:50). A 10 µl de cDNA fita simples foram adicionados 4,3 µl de H₂O livre de nucleases, 2 µl de *PCR Buffer 10x* (200 mM Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM KCl), 1,2 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl de cada iniciador (10 pmol/µl), 2 µl de *SYBR Green SYBR® I nucleic acid gel stain* (Molecular Probes, Cat. No. S7563) diluído em H₂O (1:10.000) e 0,05 µl da enzima *Platinum Taq DNA polymerase* 5 u/µl (Invitrogen, Cat. No. 10966-030).

Os experimentos de qPCR foram realizados utilizando o equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems Cat. No. 275013373). Após a ativação da enzima *Platinum Taq DNA polimerase* por 5 minutos a 94°C, a reação prosseguiu por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 10 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos. Ao final de cada ciclo, os dados de fluorescência foram coletados a 60°C por 35 segundos. Controles negativos para cada iniciador foram incluídos utilizando H₂O livre de nucleases em substituição ao cDNA molde.

Para determinação da expressão relativa os valores de C_q, determinados pelo *Miner Software*, para cada amostra foram utilizados para calcular as expressões relativas através do *qBase Software v1.3.5*. Como normalizadores foram empregados os genes *FDH* (formato desidrogenase), *eF1α* (fator de alongação 1 alfa) e *Ubi* (ubiquitina) previamente selecionados.

2.10 Análises estatísticas

Os dados das variáveis respostas serão submetidos à análise de variância pelo teste F, e comparando-se as médias por meio do teste *t* e do teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se do programa SIGMAPLOT v. 11.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Controle da qualidade do inoculante utilizado

A contagem do número de células viáveis presentes no inoculante mostrou uma população acima de 10^8 g^{-1} e a ausência de contaminantes (tabela 2). Alguns trabalhos realizados na Embrapa Agrobiologia, com o intuito de selecionar o veículo de inoculação utilizando as estirpes *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. mostraram que, o número de células viáveis se mantém acima de 10^8 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 mostrou uma população ao redor de 10^9 células g^{-1} na semente, em ambas as fases de desenvolvimento analisadas. 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 e não inoculadas com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5, utilizada no experimento.

Tratamentos	Meios de cultura	Log do n° células g^{-1}		
		Inoculante	Semente inoculada	Semente não inoculada
PAL5	LGI-P*	9,55	9,12	N.D.

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

Fonte: Elaborada pela autora. SIGMAPLOT v. 11.0.

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

Na análise de todos os tratamentos inoculados foram verificadas concentrações de *G. diazotrophicus* PAL5 maiores que 10^5 UFC g^{-1} na fase reprodutiva do experimento. 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.

Dentro da microbiota do solo, particularmente na rizosfera, está uma grande parte das bactérias diazotróficas (WAKELIN et al., 2009). 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, *Sphingomonas azotifigens* e *Sphingomonas 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 (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 reprodutivo.

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

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

Fonte: Elaborada pela autora. SIGMAPLOT v. 11.0.

Os fatores de diferentes condições de restrição hídrica (100%, 70%, 50% e 30% da capacidade de campo) e as condições de inoculação (com e sem inoculação) do arroz vermelho 405 Embrapa meio norte influenciaram,

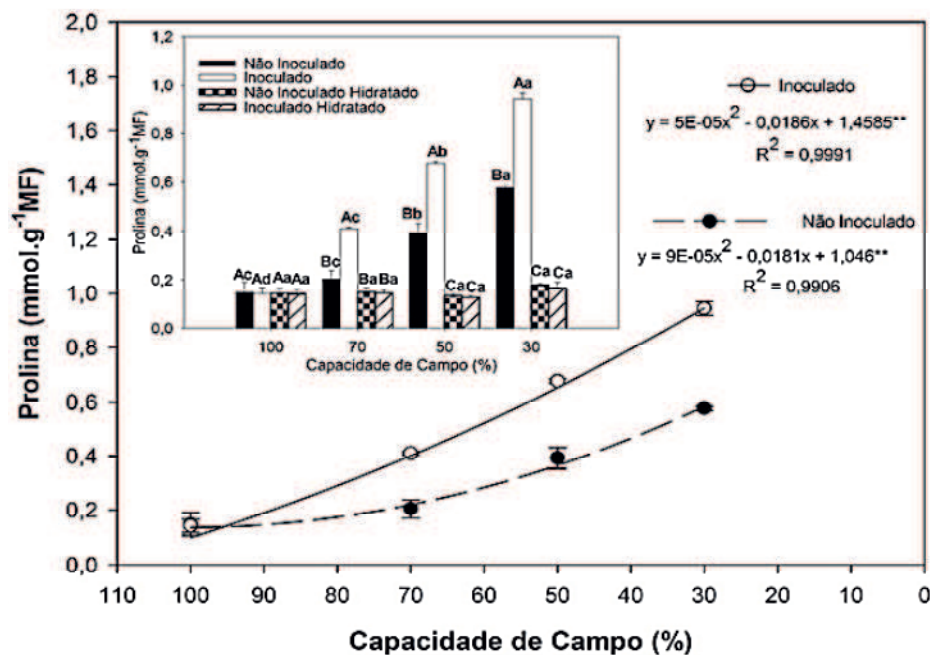
significativamente, nos resultados das variáveis estudadas nas avaliações sob estresse de 15 dias, analisados a 5% de probabilidade.

3.3 Parâmetros avaliados

3.3.1 Teor de prolina

Analisando a figura 2, nota-se que houve diferença significativa entre os tratamentos de estresse hídrico, 100%, 70%, 50% e 30%, em sua fase de crescimento, quando não inoculado e inoculado, nos teores de prolina. Por outro lado, não se diferenciando entre si nos tratamentos de 100% e 70% da capacidade de campo para o arroz não inoculado. Observou-se também, que não houve diferença significativa entre os tratamentos após as plantas serem reidratadas mesmo quando inoculado e não inoculado.

Figura 2. Teor de prolina ($\text{mmol.g}^{-1}\text{MF}$) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2015. As barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação em cada porcentagem de água do solo).



Fonte: Elaborada pela autora. SIGMAPLOT v. 11.0.

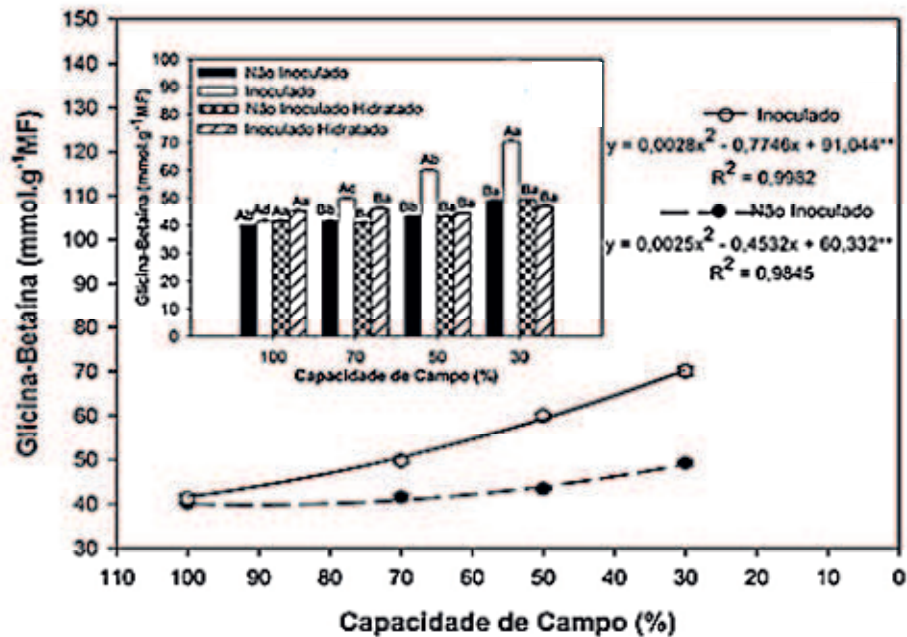
Havendo um aumento linear na atividade do teor de prolina no genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Sendo mais intensificada quando as plantas passaram por um déficit hídrico maior, com 30% de capacidade de campo, tanto as não inoculadas como inoculadas, com o aumento gradativo na capacidade de campo, não se diferenciando entre si nos tratamentos de 100% e 70% da capacidade de campo para o arroz não inoculado. No entanto, houve diferença significativa entre os fatores inoculados, não inoculados, inoculados hidratados e não inoculado hidratado para 70% da capacidade de campo, havendo insignificância para não inoculados, não inoculados hidratados e inoculados hidratados.

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

3.3.2 Glicina betaína

Analisando a figura 3, observou-se acúmulo com aumento da restrição hídrica nas plantas de arroz vermelho principalmente com 30% da capacidade de campo, isso aconteceu para as plantas inoculadas e não inoculadas com *G. diazotrophicus*, na fase reprodutiva, talvez tenha sido devido que, a síntese da glicina betaína é desencadeada a partir da falta de água no meio celular (SZABADOS et al., 2011).

Figura 3. Teor de glicina betaína ($\text{mmol.g}^{-1}\text{MF}$) em folhas do genótipo de arroz vermelho sob diferentes condições de restrição hídrica e diferentes condições de inoculação. Campina Grande/PB, 2015. As barras indicam o desvio padrão da média de vinte plantas. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (condição de inoculação em cada porcentagem de água do solo).



Fonte: Elaborada pela autora. SIGMAPLOT v. 11.0.

As plantas não inoculadas principalmente aos níveis de 100%, 70% e 50% de CC não se diferenciaram estatisticamente, comparando com as inoculadas. O conteúdo deste osmoprotetor foi reduzido quando a disponibilidade hídrica do solo foi aumentada. A glicina betaína é um composto que pode desempenhar proteção eficaz contra o estresse (ASHRAF e FOOLAD, 2007), podendo ser acumulativa e não tóxica para a planta, além de equilibrar a diferença osmótica em torno da célula e do citosol (WANI et al., 2013).

Com o aumento de estresse hídrico se obteve uma maior absorção de glicina betaína nas plantas inoculadas, diferindo estatisticamente dos não inoculados, inoculados hidratados e não inoculados hidratados. No entanto, após uma hora da reidratação das plantas de arroz vermelho foi possível observar que houve uma estabilização no teor de glicina betaína tanto nas plantas inoculadas e não inoculadas com *G. diazotrophicus*, havendo assim uma proteção na estrutura celular

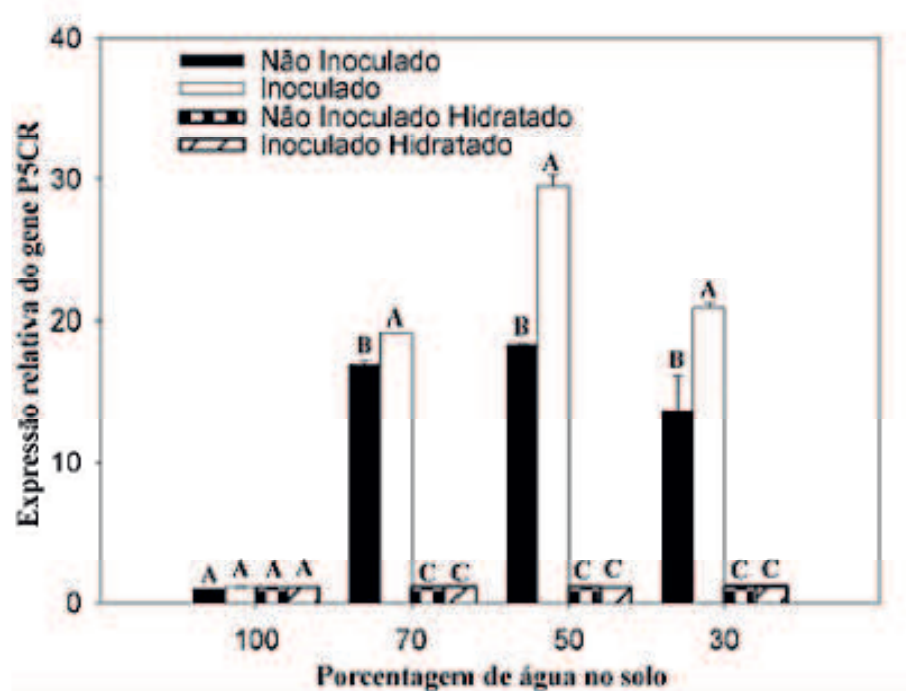
nas plantas, de modo que a bactéria possa ter exportado glicina betaína para a planta, já que alguns microrganismos como a própria *G. diazotrophicus* tem essa capacidade, as bactérias também produzem substâncias osmotolerantes como a glicina betaína.

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

3.3.3 Análises das expressões gênicas

Verificou-se efeito significativo para a expressão relativa dos genes: Δ 1-pirroline-5-redutase de carboxilato (*P5CR*) e betaína aldeído desidrogenase (*BADH*). Houve uma diferença significativa dos tratamentos com 70, 50 e 30% da capacidade de campo disponível, no que diz respeito as plantas quando inoculadas com *G. diazotrophicus*, em relação aos demais tratamentos, para a expressão relativa do o gene P5CR (Figura 4).

Figura 4. A interação InxDHS foi significativa ($p < 0,01$). Os efeitos dos fatores de inoculação (In) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene P5CR. Para cada disponibilidade hídrica no solo, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si na expressão relativa do gene nas condições controle e seca ($p > 0,05$).



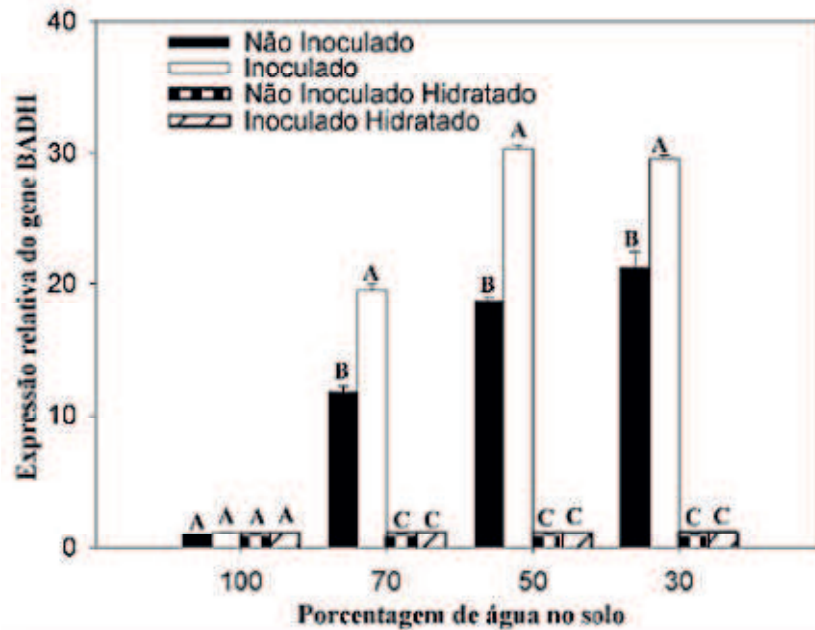
Fonte: Elaborada pela autora. SIGMAPLOT v. 11.0.

Onde o tratamento com plantas inoculadas e expostas a 50% da capacidade de campo promoveram incrementos de 30x na expressão de P5CR na fase reprodutiva, em relação a amostra de plantas não inoculadas expostas a capacidade de campo. A planta pode apresentar um pequeno aumento no teor de prolina sob estresse, mas quando ocorre o estresse há um acúmulo desse osmorregulador, que atua como um adaptador de tolerância das plantas sob restrição hídrica, e aumenta também o ajuste osmótico da célula estimulado em presença de bactérias nas plantas em respostas a estresses bióticos e abióticos, pode mediar o ajuste osmótico, e proteger membranas e proteínas contra efeitos adversos.

Por isso, constatou-se que a bactéria tenha influenciado o aumento da produção de prolina quando as plantas passavam por estresse hídrico, principalmente nos níveis mais elevados como 30%, 50% e 70% de CC. Mas ainda existe controvérsia se o acúmulo de prolina é uma consequência do estresse ou proporciona benefícios às plantas sob condições adversas (ASHRAF e FOOLAD, 2007).

Na expressão relativa do gene BADH em plântulas de arroz vermelho, novamente os tratamentos 70, 50 e 30 % da capacidade de campo se diferenciaram, entretanto, promoveram diferenças mais significativas quando as plantas estavam inoculadas (Figura 5).

Figura 5. A interação InxDHS foi significativa ($p < 0,01$). Os efeitos dos fatores de inoculação (In) e disponibilidade hídrica no solo (DHS) agem de modo dependente sobre a expressão gênica relativa do gene BADH. Para cada disponibilidade hídrica no solo, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si na expressão relativa do gene nas condições controle e seca ($p > 0,05$).



Fonte: Elaborada pela autora. SIGMAPLOT v. 11.0.

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

FIGUEIRAS (2015) relatou que o arroz em casca (*Oryza sativa* L.), inoculado com *Pseudomonas* mostrou-se significativamente mais elevado na concentração de compostos quaternários de GB e uma biomassa da parte aérea superior sob condições de estresse hídrico. A glicina betaína protege as plantas contra efeitos

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

4 CONCLUSÃO

Os osmoprotetores prolina e glicina-betaína nas plantas de arroz vermelho inoculadas com *G. diazotrophicus* apresentam aumento sob estresse hídrico, a concentração desses compostos e da expressão dos genes envolvidos na via de biossíntese diferem de acordo com os níveis de água presentes no solo, provando a eficácia da inoculação na mitigação da condição adversa.

A expressão dos genes P5CR e BADH relacionados com às vias de resposta ao estresse hídrico na planta são até o presente estudo e mediante as características abordadas proporcionais as variações dos teores de prolina e glicina betaína presentes na planta, mostrando-se mais significativos as concentrações de 70%. 50% e 30% de água no solo plantado em relação com a de 100% (solo totalmente irrigado).

INOCULATION OF *Gluconacetobacter diazotrophicus* AS A HYDRICAL STRESS MITIGATOR AGENT IN RED RICE PLANTS

ABSTRACT

The processes of interaction between plants and diazotrophic bacteria have been extensively studied and demonstrate a potential form of development aimed at cultivars of great regional economic importance. In this respect, red rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with *Gluconacetobacter diazotrophicus* were studied to evaluate its efficiency in the mitigation of water stress. In this way, biochemical parameters such as proline and glycine betaine that are osmoprotective compounds of the plant and the expression of their respective P5CR and BADH genes were evaluated. For this purpose, *G.diazotrophicus* inoculation was used, consisting of two inoculation conditions: I1 = Not inoculated and I2 = Inoculated with *G. diazotrophicus* and (b) four treatments of water in the plants, corresponding to soil moisture content: U1 = 30 -35%; U2 = 50-55%; U3 = 70-75% and U4 = 100% available water. Factorially combined, resulting in eight treatments, with four replications, distributed in the completely randomized design in the reproductive phase of the plant, varying the water deficit treatments as a function of the inoculation, leaf and root samples were collected at the end of the period. Water deficit period (before full recovery of irrigation), for extraction of RNA and subsequent synthesis of cDNA molecules. It was concluded that inoculation with *G.diazotrophicus* resulted in higher levels of proline and glycine betaine in plants inoculated under water stress and, consequently, greater expression of the genes of interest.

Keywords: *Oryza sativa* L .; Tolerance to water stress; Endophitic bacteria

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, A.; KADIAN, N.; KARISHMA, N.; TANWAR, A.; GUPTA, K. K. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of salinity stress. **Journal of Applied and Natural Science**, India, v. 4, n. 1, p. 144–155, 2012.
- AHMAD, P.; JHON, R. Effect of salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L. **Archives of Agronomy and Soil Science**, New Delhi, v 51, n. 6, p. 665–672, 2005.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Pakistan, v.59, n.2, p.206-216, 2007.
- BARBOSA, F.M. **Inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e seu efeito do desenvolvimento de plantas de arroz vermelho**. 21ed. CDD 631.4. 2016.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, La Paz, v. 16, n. 2, p. 729–770, 1998.
- 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.
- CARLIM, S. D.; SANTOS, D. M. M. dos. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.9, p.1106-1113, 2009.
- 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.
- CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Remediation of salt-affected soil by the addition of organic matter: an investigation into improving glutinous rice productivity. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 4, p. 406-410, 2011.
- CSONKA, L. N.; HANSON, A. D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Review of Microbiology**, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 569–606, 1991.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995.
- EVELIN, H.; KAPOOR, R.; GIRI, B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 7, p. 1263–1280, 2009.

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. M.B. Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento da tolerância de arroz vermelho à deficiência hídrica durante a fase reprodutiva. 2015 125f. **Dissertação** (Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Campina Grande, PB, 2015.

GLICK, B. R.; LIU, C.; GHOSH, S.; DUMBROF, E. B. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Soil Biology & Biochemistry**, Canadá, v. 29, n. 8, p. 1233–1239, 1997.

GRIEVE, C. M.; GRATTAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, EUA, v.70, n.2, p.303-307, 1983.

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. DA S.; MOREIRA, L.B.; PEREIRA, M.B.; LOPES, H.M.; COSTA, E.M.; CURTI, A.T.M. Características morfoagronômicas de dois genótipos arroz vermelho em cultivo inundado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, p.394-401, 2012.

PUNSCHKE, K.; CARLO-MAGNO, M.; LA BANDERA, C. Potencial agronómico de bactérias fijadoras de nitrógeno endófitas de arroz. Actas Uruguay, 2005. In: V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe: **Anais**. Actas Uruguay, 2005.

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.

ROUWS, L. F. M.; MENESES, C. H. S. G.; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; BALDANI J. I.; SCHWAB S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gus A reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, Munique, v.51, n.3, p. 325–330, 2010.

- SABINO, D. C. C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. Seropédica, 2007. 71p. Tese (Doutorado em Ciência do solo) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SANTOS, M. G.; RIBEIRO, R. V.; OLIVEIRA, R. F.; MACHADO, E. C.; PIMENTEL, C. The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. **Plant Science**, São Paulo, v. 170, n.3, p.659–664, 2006.
- SHENG, M.; TANG, M.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of Arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. **Mycorrhiza**, Bethesda, v. 21, n. 5, p. 423–430, 2011.
- SHIRASAWA, K.; TAKABE, T.; TAKABE, T.; KISHITANI, S. Accumulation of glycine betaine in Rice plants that over express choline mooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. **Annals of Botany**, Japan, v. 98, n. 3, p. 565-571, 2006.
- SILVA, R. P. A. **Eficiência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no aumento da tolerância de arroz vermelho à deficiência hídrica na fase inicial de desenvolvimento**. 2016, 115f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Campina Grande, PB. 2016.
- SOUSA JÚNIOR, I. F. **A influência da urbanização no clima da cidade de Campina Grande-PB**. Campina Grande, PB, 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Meteorologia)- Curso de Pós-Graduação em Meteorologia, Universidade Federal de Campina Grande/UFCG.
- SZABADOS, L.; KOVÁCS, H.; ZIBERSTEIN, A.; BOUCHEREAU, A. Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. **Advances in Botanical Research**, France, v. 57, n.1, p. 105–150, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TALIBART, R.; JEBBAR, M.; GOUFFI, K.; PICHEREAU, V.; GOUESBET, G.; BLANCO, C.; BERNARD, T.; POCARD, J. A. Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in saltstressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Bethesda, v. 63, n. 12, p. 4657–4663, 1997.
- WAKELIN, S. A.; GREGG, A. L.; SIMPSON, R. J.; LI, G. D.; RILEY, I. T.; MCKAY A.C. Pasture management directly affects soil microbial community structure and Ncycling bacteria. **Pedobiologia**, Austrália, v.52, n. 4, p.237–251, 2009.
- WANI, S. H.; SINGH, N. B.; HARIBHUSHAN, A.; MIR, J. I. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance – Role of glycine betaine. **Current genomics**, India, v. 14, n. 3, p. 157-165, 2013.