



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MESTRADO E DOUTORADO EM AGRONOMIA**

MARCELA CRISTIANE FERREIRA RÊGO

**RIZOBACTÉRIAS EM PLANTAS DE ARROZ DE TERRAS ALTAS: MITIGAÇÃO
DE DÉFICIT HÍDRICO E DE ALELOPATIA**

**BELÉM
2017**

MARCELA CRISTIANE FERREIRA RÊGO

**RIZOBACTÉRIAS EM PLANTAS DE ARROZ DE TERRAS ALTAS: MITIGAÇÃO
DE DÉFICIT HÍDRICO E DE ALELOPATIA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do curso de
mestrado e doutorado em Agronomia, área de
concentração Agronomia, para obtenção do título
de Doutora.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Gisele Barata da Silva

**BELÉM
2017**

Rêgo, Marcela Cristiane Ferreira

Rizobactérias em plantas de arroz de terras altas: mitigação de déficit hídrico e de alelopatia / Marcela Cristiane Ferreira Rêgo. – Belém, 2017

116 f.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2017.

Orientadora: Gisele Barata da Silva.

1. Arroz – Déficit hídrico 2. Arroz - Alelopatia 3. *Burkholderia pyrrocinia* 4. *Pseudomonas fluorescens* 6. Rizobactéria - Arroz I. Silva, Gisele Barata da, (orient.) II. Título

CDD – 633.18

MARCELA CRISTIANE FERREIRA RÊGO

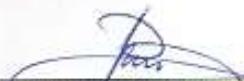
**RIZOBACTÉRIAS EM PLANTAS DE ARROZ DE TERRAS ALTAS:
MITIGAÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO E DE ALELOPATIA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado e Doutorado em Agronomia, área de concentração em Agronomia, para obtenção do título de Doutora.

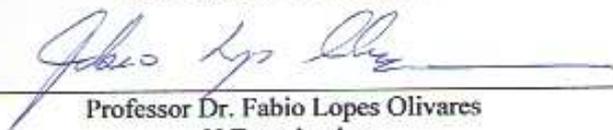
BANCA EXAMINADORA



Eng. Agrônoma, Prof^a. Dra. Gisele Barata da Silva
Presidente/Orientadora
Universidade Federal Rural da Amazônia



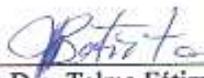
Dra. Fernanda Alkiu Borges de Souza
1^o Examinadora
Embrapa Amazônia Oriental



Professor Dr. Fabio Lopes Olivares
2^o Examinador
Universidade Estadual do Norte Fluminense



Dr. Walter Velasco Duarte Silvestre
3^o Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia



Professora Dra. Telma Fátima Vicira Batista
4^o Examinadora
Universidade Federal Rural da Amazônia

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às minhas filhas Emily,
Milene e Elen e ao meu companheiro Emerson
Gomes que tenho como meus significados de
Vida.*

Agradecimento

A CAPES pela bolsa de pesquisa, e ao CNPq por financiar o projeto de pesquisa.

A coordenação do programa de pós-graduação em agronomia, coordenadora Professora Dra. Hedjania Lima, a secretária Samanta Gomes e a todos os professores do programa que contribuíram para minha formação

A minha orientadora professora Dra. Gisele Barata da Silva, em especial, pelo tempo dedicado a orientação do trabalho e a minha formação profissional, me apoiando sempre. Auxiliando na busca do meu aperfeiçoamento profissional.

A todos os integrantes do Laboratório de Proteção de Plantas (UFRA) que me ajudaram e me apoiaram durante todo o período do curso de doutorado em agronomia em especial a graduanda Thayná Ferreira, Eng. Amarildo Silva, Eng. Gleiciane dos Santos, Eng. Sueyla Malcher, MSc. Aline Figueiredo e Msc. Gledson Castro.

A Dra. Marta de Filippi e Dra. Anna Lanna da Embrapa arroz e Feijão, Prof. Dr. Rafael Viana da Universidade Federal Rural da Amazônia pelas contribuições para execução da tese.

A Profa. Dra. Elane Guerreiro Giese, do Instituto de Saúde e Reprodução animal da Universidade Federal Rural da Amazônia pelo apoio técnico e viabilizar o uso de laboratório de microscopia de varredura.

A Dra. Fernanda Ilkiu da Embrapa Amazônia Oriental, professor Dr. Fabio Olivares da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Dr. Walter Vellasco Duarte Silvestre e professora Dra. Telma Fátima Vieira Batista Universidade Federal Rural da Amazônia

Agradeço a minha mãe Regina (*in memoriam*), ao meu pai Carlos e meu irmão Marcio, por fazerem parte da construção inicial de meus valores, ao meu companheiro Emerson, e minhas filhas: Emily, Milene e Elen, pelo apoio e compreensão durante toda a minha caminhada acadêmica.

Resumo

A perda na produtividade de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) devido aos danos causados por estresses abióticos (déficit hídrico e alelopatia) são recorrentes, o objetivo foi avaliar o comportamento de plantas de arroz através das alterações agrônômicas e morfológicas sob diferentes lâminas de água no solo (LAS) de 100%, 70 %, 50% e 30 % da capacidade de campo (CC), e identificar as modificações anatômicas e fisiológicas em planta em LAS de 100 % e 50 % da CC induzidas por PGPR (*Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111), que indiquem o efeito mitigador dos danos causados pelo déficit hídrico. E em plantios com resíduo de plantas do arroz no solo foi identificar e compreender o efeito da aplicação de rizobactérias em plantas de arroz de terras altas em plantios consecutivos. No primeiro ensaio, as PGPR foram submetidas aos estresses abióticos de temperatura (30, 35 e 40 °C), salinidade (0.5 % e 7.5%) e déficit hídrico (0, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 e -1.2 Mpa) simulado por PEG com 10 repetições e avaliado o crescimento. No segundo ensaio, as plantas de arroz inoculadas com: BRM-32111, BRM-32113 e controle, foram submetidas as LAS de: 100, 70, 50 e 30 % da CC, com três vasos por tratamento e cinco plantas por vaso. Foram avaliados: água evapotranspirada e potencial hídrico (ψ_{am}), biomassa e comprimento da planta e raiz, área foliar, teor relativo de clorofila. No terceiro ensaio, foram usadas plantas controle, inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113, submetidas a 100% e 50% da CC, e mantido até aos 28 dias, e avaliado crescimento, fisiologia e anatomia. No quarto ensaio, foram utilizados quatro tratamentos constituídos de sementes de arroz inoculados com *P. fluorescens* BRM-32111 em solo com resíduo, com *B. pyrrocinia* BRM-32113 em solo com resíduo e plantas controle em solo com resíduo (CR) e plantas controle em solo sem resíduo (SR) de raízes de plantas de arroz (resíduos de Aleloquímicos), todos os ensaios foram em DIC, e os resultados submetidos ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). No primeiro ensaio, verificou-se que as PGPR foram tolerantes aos estresses abióticos de: salinidade (80%), temperatura (96%) e seca (96%), no segundo ensaio, as plantas atingiram a LAS crítica de até 63 % da CC, as plantas com BRM-32111 tiveram os efeitos amenizador aos danos causado pelo déficit hídrico, na biomassa 30%, comprimento da raiz 88% em LAS de 30% de CC quando comparados a plantas controle. No terceiro ensaio, as sementes com BRM-32111 diferiram do controle na germinação, e com BRM 32113 diferiram do controle no IVG. As plantas inoculadas com BRM 32111 e BRM-32113 tiveram menor redução no diâmetro radicular, número de poros de protoxilema, espessura do córtex, e aumento na densidade de estômatos, e aumento em taxa de assimilação de carbono (A), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação da rubisco (A / Ci), maior acúmulo de clorofila a, prolina e redução na concentração de aldeído malônico (MDA), em relação a plantas controle submetidas a mesma LAS. No quarto ensaio, o crescimento de plântulas e plantas de arroz controle (CR) foi afetado negativamente pelos compostos alelopáticos. Em semeio com resíduo, plantas inoculadas com as rizobactérias *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 induziram aumento em 88% na biomassa, 3% na área foliar, 40% e 67% no comprimento e biomassa radicular, respectivamente, 21% na clorofila a, 50% na A, e 63% no EUA comparado as plantas controle CR. Estes resultados, evidenciam que as rizobactérias são tolerantes aos estresses de temperatura, salinidade e pressão osmótica e auxiliam na amenização do efeito danosos causados pelo déficit hídrico, e aumentam a tolerância de plantas de arroz ao estresse com aleloquímicos no arroz de terras altas

Palavras chaves: arroz, alelopatia, *Burkholderia pyrrocinia*, déficit hídrico, *Pseudomonas fluorescens*, rizobactéria.

Abstrac

The loss of rice plants (*Oryza sativa* L.) due to damage caused by abiotic stresses (water deficit and allelopathy) are recurrent, the objective was to evaluate the behavior of rice plants through agronomic and morphological changes under different layers of water in the soil (LAS) of 100%, 70%, 50% and 30% of field capacity (CC), and to identify the anatomical and physiological changes in plant in LAS 100% and 50% of CC, Induced by PGPR (*Burkholderia pyrrrocinia* BRM-32113 and *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111), that indicate the mitigating effect of the damages caused by the water deficit. And in plantings with residue of rice plants in the soil was to identify and understand the effect of the application of rhizobacteria on highland rice plants in consecutive plantations. Test one, The PGPR were subjected to temperature abiotic stresses (30, 35, 40 °C), salinity (0.5%, 7.5%), and water deficit (0, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0, -1.2 Mpa) simulated by PEG with 10 replicates and evaluated the growth. Test two, the rice plants inoculated with: BRM-32111, BRM-32113 and control, were submitted the LAS of: 100, 70, 50 and 30% of CC, with three pots per treatment and five plants per pot. were evaluated: evapotranspirated water and water potential (ψ_{am}), biomass and length of plant and root, leaf area and relative chlorophyll content. Test three, plants Control, inoculated with BRM-32111 and BRM-32113, submitted to 100% and 50% of CC, and maintained for 28 days, and evaluated growth, physiology and anatomy. Test four, were used four treatments consisting of seed rice inoculated with *P. fluorescens* BRM-32111 in soil with residue, *B. pyrrrocinia* BRM-32113 in soil with residue, plants control in soil with residue (CR) and plants control on soil without residue (SR) roots of plants rice (residues of Allelochemicals), the essay were in (DIC), and results submitted to ANOVA, Duncan's test ($p < 0.05$). Test one, It was verified that PGPR were tolerant to abiotic stresses of: salinity (80%), temperature (96%) and dry (96%), test two, plants have reached the critical LAS of up to 63% of CC, plants with BRM-32111 had the effect of reducing the damage caused by the water deficit, In biomass 30%, root length 88% in LAS of 30% CC when compared to control plants. Test three, The seeds with BRM-32111 differed from the control in germination, and with BRM 32113 differed from the control in IVG. The plants inoculated with BRM 32111 and BRM-32113 had a smaller reduction in root diameter, number of protoxilema pores, cortex thickness, and increase in density of stomata, and increase in carbon assimilation rate (A), efficiency of water use (EUA), carboxylation efficiency rubisco (A / Ci), higher accumulation of chlorophyll a, proline and reduction in the concentration of malonic aldehyde (MDA), in relation to control plants submitted to the same LAS. Test four, the growth of seedlings and plants control rice (CR) was negatively affected by allelopathic compounds. In sowing with residue, plants inoculated with rhizobacteria *P. fluorescens* BRM-32111 and *B. pyrrrocinia* BRM-32113 induced an increase of 88% in biomass, 3% in the leaf area, 40% and 67% in length and root biomass, respectively, 21% in chlorophyll a, 50% in A, and 63% in the EUA compared to CR control plants CR. These results, evidences that the rhizobacteria are tolerant to the temperature stresses, salinity and osmotic pressure and help to alleviate the harmful effect caused by the water deficit, and increase tolerance of rice plants to stress with allelochemicals in upland rice.

Keywords:, allelopathy, *Burkholderia pyrrrocinia*, *Pseudomonas fluorescens*, rice, rhizobacteria, water deficit.

Lista de ilustrações

Tolerância ao déficit hídrico de plantas de arroz de terras altas induzidas por PGPR (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211)

Figura 1. Crescimento da PGPR (*Pseudomonas fluorescens* - BRM-3211 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-3213) em condições de estresses abiótico de salinidade e temperatura (A-B), pressão osmótica (C) e teste de indicação para formação de biofilme (D). ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).....47

Figura 2. Biomassa da parte aérea (A - B), potencial hídrico foliar antemanhã (C - D), água evapotranspirada (E - F), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).....48

Figura 3. Área foliar (A - B) e conteúdo relativo de clorofila (C - D), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).....49

Figura 4. Comprimento da planta (A - B) e largura da folha (C - D), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).....50

Figura 5. Biomassa radicular (A – B) e comprimento da raiz (C – D), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).....51

Figura 6. Raízes de plantas de arroz aos 28 dias após semeadura. Tratamento controle (A), inoculada com *Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 (B), *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211 (C), submetidas a lâminas de água no solo de 100 % da capacidade de campo (1), 70% da capacidade de campo (2), 50% da capacidade de campo (3), e 30% da capacidade de campo (4).....52

Mitigação do déficit hídrico por rizobactérias (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211) em plantas de arroz de terras altas

Figura 1. Germinação de sementes com água (A) e Polietilenoglicol - 6000(PA) (-1,2 Mpa) (B), e germinação aos cinco dias após semeadura (C), comprimento da planta (D), biomassa da planta (E) e potencial hídrico antemanhã (Ψ_{am}), aos 28 dias após semeadura e provenientes de sementes inoculadas com BRM-32111, BRM-32113 e controle com água.....80

Figura 2. Eletromicrografias de raízes adventícias e estômatos de arroz obtida a partir de sementes tratadas com PGPRs, 28 dias após a germinação. Controle (não inoculado) em 100 % da capacidade de campo (CC) (A) e controle (não inoculado) em 50 % da CC (B); inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 em 100 % da CC (C), e com *P. fluorescens* BRM-32111 em 50 % da CC (D); inoculada com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 em 100 % da CC (E), e com *B. pyrrocinia* BRM-32113 em 50 % da CC (F). Estômatos (seta branca), Cilindro vascular (vc), pólos protoxilema (seta amarela), e elementos de vasos de metaxilema (seta azul), córtex (Co), e diâmetro da raiz.....82

Figure 3. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (A), condutância estomática ao vapor de água (gs) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (B), carbono intercelular (Ci) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (C), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (D), uso eficiente da água (WUE) (A / E) (E), eficiência de carboxilação da rubisco (A / Ci), aos 28 dias após a germinação, em solo com e sem déficit hídrico. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$83

Figure 4. Clorofila a (micro g / g de MF) (A), clorofila b (micro g / g de MF) (B), clorofila a + b (micro g / g de MF) (C), clorofila a / b (micro g / g de MF) (D), Prolina (E), MDA (F), aos 28 dias após a germinação, em solo com e sem déficit hídrico. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$84

Mitigação de compostos alelopáticos no arroz de terras altas por rizobactérias (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211)

Figura 1. Parte aérea (A) e raízes (B) de plantas de arroz, aos 21 dias após a germinação, de tratamento controle sem resíduo (1), controle com resíduo (2), inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 em solo com resíduo (3) e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 em solo com resíduo (4).....108

Figura 2. Germinação (A), comprimento da plântula (B), e biomassa da plântula (C), sete dias após a germinação, e biomassa de planta (D), comprimento de planta (E), área foliar (F), clorofila (SPAD) (G), biomassa radicular (H) comprimento das raízes (I), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo (NR) e com resíduo (WR) de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$109

Figura 3. Clorofila a (micro g / g de MF) (A), clorofila b (micro g / g de MF)(B), clorofila a + b (micro g / g de MF)(C), clorofila a / b (micro g / g de MF)(D), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo (NR) e com resíduo (WR) de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$111

Figura 4. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (A),condutância estomática ao vapor de água (g_s) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (B),carbono intercelular (C_i) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$)(C), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$)(D), eficiência do uso da água (EUA) (A / E)(E), eficiência de carboxilação da rubisco (A / C_i), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo (NR) e com resíduo (WR) de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$112

Figura 5. Eletromicrografia da face abaxial de folhas de arroz obtida de sementes tratadas com PGPR, 21 dias após semeadura em solo sem resíduo (SR) e com resíduo (CR). Controle SR (A), BRM-32111 CR (B), BRM-32113 CR (C), controle CR (D). Estômatos (setas vermelhas).....113

Lista de tabelas

Mitigação do déficit hídrico por rizobactérias (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211) em plantas de arroz de terras altas

Tabela 1. Anatomia de raiz e folha de plantas de arroz, diâmetro da raiz (μm), cilindro vascular (μm), polos de protoxilema (μm), e elementos de vaso de metaxilema, espessura de córtex (μm), densidade estomática, comprimento do estômato (μm), área do poro estomático (μm^2), aos 28 dias após a germinação, em lâminas de água no solo de 100 % da capacidade de campo e 50 % da capacidade de campo, plantas controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Média¹ na mesma linha seguidas de mesma letra minúscula² não diferem em plantas comparadas na mesma lâmina de água no solo (Duncan, $p < 0,05$), desvio padrão³, n=20.....81

Mitigação de compostos alelopáticos no arroz de terras altas por rizobactérias (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211)

Tabela 1. Comprimento do poro estomático (CPE), área do poro estomático (APE), densidade estomática (número de estômato / unidade de área), Densidade foliar total - DFT = (massa fresca da folha / (unidade de área foliar x espessura da folha), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo e com resíduo de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Média¹ na linha seguida de mesma letra minúscula² não diferem (Duncan, $p < 0,05$), desvio padrão³, n=20.....110

Tabela 2. Estimativa dos coeficientes de correlação linear entre as variáveis de crescimento das plantas de arroz aos 21 dias após o semeio. Biomassa total, comprimento de planta, área foliar, clorofila, biomassa radicular, comprimento radicular, taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s), carbono intercelular (C_i), taxa de transpiração (E), uso eficiente de água (WUE), eficiência da carboxilação da rubisco (A / C_i). Software Past 2.0 ($p < 0,05$).....114

Sumário

Resumo	7
1. Contextualização	18
O cultivo de arroz de terras altas	18
Principais desafios para agricultura	18
Uso estratégico das rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR).....	19
Interação inicial entre planta e PGPR.....	19
Efeito de PGPR nas plantas.....	20
Plantas sobre estresses bióticos com PGPR.....	22
Plantas sobre danos abióticos com PGPR.....	22
Referência	24
2. Tolerância ao déficit hídrico de plantas de arroz de terras altas induzidas por PGPR (<i>Burkholderia pyrrocinia</i> - BRM-3213 e <i>Pseudomonas fluorescens</i> BRM-3211) ¹	30
Introdução	32
Material e métodos.....	33
Tolerância de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (BRM-3211) e <i>Burkholderia pyrrocinia</i> (BRM-3213) aos estresses abióticos múltiplos e formação de biofilme.....	33
Salinidade e Temperatura	34
Deficiência hídrica induzida por polietilenoglicol (PEG-6000 PA).....	34
Formação de Biofilme.....	35
Tolerância à deficiência hídrica em plantas de arroz inoculadas com PGPR.....	35
Análise estatística.....	37
Resultados e Discussão	37
Tolerância de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (BRM-3211) e <i>Burkholderia pyrrocinia</i> (BRM-3213) aos estresses abióticos múltiplos e formação de biofilme.....	37
Tolerância à deficiência hídrica em plantas de arroz inoculadas com PGPR.....	38
Referências.....	44
3. Mitigação do déficit hídrico por rizobactérias (<i>Burkholderia pyrrocinia</i> - BRM-3213 e <i>Pseudomonas fluorescens</i> BRM-3211) em plantas de arroz de terras altas ²	55
Resumo	56
Introdução	57
Material e métodos.....	58
Microorganismos, material vegetal, e condição de crescimento	58
Crescimento da planta e potencial hídrico	59
Anatomia de raízes e estômatos.....	60
Trocas gasosas.....	60

Quantificação de pigmentos	60
Prolina.....	61
Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA)	62
Análise estatística.....	62
Resultados	62
Germinação, Crescimento de plantas e potencial hídrico	62
Anatomia de estômatos e raízes.....	63
Trocias gasosas.....	63
Pigmentos fotossintetizantes e osmorreguladores.....	64
Discussão	64
Germinação, Crescimento de plantas e potencial hídrico	64
Anatomia de estômatos e raízes.....	65
Trocias gasosas.....	67
Pigmentos fotossintetizantes e osmorreguladores.....	69
Conclusão.....	71
Referência	72
4. Mitigação de compostos alelopáticos no arroz de terras altas por rizobactérias (<i>Burkholderia pyrrocinia</i> - BRM-3213 e <i>Pseudomonas fluorescens</i> BRM-3211) ³	87
Resumo	88
2. Material e métodos	91
2.1. Material vegetal e microrganismos.....	91
2.2. Germinação de sementes e vigor de plântula	92
2.3. Promoção do crescimento.....	92
2.4. Estudo anatômico da folha	93
2.5. Quantificação de pigmentos	93
2.6. Trocicas gasosas.....	94
2.7. Análise estatística	94
3. Resultados	94
3.1. Germinação de sementes e vigor de plântula e promoção de crescimento em plantas	94
3.2. Quantificação de pigmentos	95
3.3. Trocicas gasosas.....	96
4. Discussão	96
4.1. Germinação de sementes, vigor de plântula e promoção de crescimento em plantas.....	96
4.2. Quantificação de pigmentos	98
4.3. Trocicas gasosas.....	99
5. Conclusão.....	101

Referência	102
4. Conclusões gerais.....	116

Capítulo 1

1. Contextualização

O cultivo de arroz de terras altas

Entre as culturas que sofrem maior pressão de produção, está a cultura do arroz (*Oryza sativa* L.), dos quais podem ser produzidos em dois sistemas diferentes, o sistema irrigado e de terras altas. O sistema de produção de arroz de terras altas tem menor produtividade, podem ter problemas no crescimento ocasionado pelo déficit hídrico com a ocorrência de veranicos, infestação de plantas daninhas, deficiência nutricional, e ocorrência de doenças como brusone, queima da bainha das folhas e escaldadura. No entanto, este sistema possui economia do uso da água o que é um fator importante diante do problema global de água na agricultura (Mishra 1999; Wade 2003).

O arroz é uma cultura consumida por um terço da população mundial, sendo os maiores produtores no mundo China e Índia, o Brasil configura com nono maior produtor mundial (AMIS, 2016), e o estado com maior produção de arroz de terras altas no Brasil é o Mato Grosso, e de irrigado o Rio Grande do Sul (Asch 2005).

Principais desafios para agricultura

O principal desafio nas ciências agrárias é desenvolver tecnologias para aumentar o rendimento das culturas, com segurança nutricional e sustentabilidade (Gepstein e Glick, 2013, Patel et al., 2015; Hamilton et al., 2016). Os problemas mais relevantes na agricultura são: o aumento da demanda nutricional ocasionado pelo crescimento populacional, mudança drásticas no clima global ocasionadas por fenômenos como El Niño e, conseqüentemente, a ocorrência de veranicos, diminuição de terras agrícolas, urbanização e uso intensivo de agroquímicos que tem afetado a produção vegetal mundial, além de acúmulo de compostos tóxicos no solo para planta (Gepstein, 2013, Rashid et al., 2016).

Uso estratégico das rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR)

Deste modo, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) na promoção de crescimento, e mitigação de danos causados por agentes bióticos e abióticos em plantios de arroz de terras altas é uma estratégia para gerir a produtividade agrícola, crescimento econômico, proteger a biodiversidade por meio de diminuição do uso de fertilizantes químicos, herbicidas e pesticidas para atender as crescentes exigências alimentares (Pereg e McMillan, 2015; Hamilton et al., 2016). Este termo foi inicialmente definido por Kloepper e Schroth (1978).

A rizosfera é a zona do solo em torno de uma raiz de planta, onde a biologia e a química do solo são influenciadas pelas raízes (Lugtenberg e Kamilova 2009). Os exsudados radiculares incluem aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, açúcares, mucilagem e proteínas. A capacidade das rizobactérias de usar ácidos orgânicos como fontes de carbono está relacionado a diversidade microbológica em torno da zona radicular, que também é determinada pela espécie de planta, pois as diferem na composição e as quantidades de exsudados da raiz, o que provavelmente afeta as populações microbianas (Droge et al., 2012). Pois os ácidos orgânicos estão envolvidos no mecanismo de solubilização de fosfato pelas bactérias, e para algumas bactérias este ácido tem efeito antibacteriano.

Interação inicial entre planta e PGPR

Estudos com *Pseudomonas fluorescens* foram capazes de indicar a sequência de eventos que ocorrem na interação bactéria planta, o início do processo de interação das bactérias com a superfície radicular ocorre através de compostos produzidos por estas, as bactérias liberam material amorfo (não interage quimicamente com as substâncias liberadas na interação planta bactéria e não se altera com intervenções físicas como alteração de temperatura e pH) em volta das células bacterianas próximo a raiz, e por sua vez as raízes liberam os exsudados radiculares

o que auxilia na formação de um biofilme (envoltório de açúcares produzido pela própria bactéria). Estudos relatam que aproximadamente entre 5 a 21% de carbono interno (*Ci*) fixado nas folhas é transportado para as raízes e liberados na rizosfera através da exsudação radicular (Marschner, 1995).

Os exsudados radiculares exercem atração das bactérias para as raízes, após esta etapa ocorre a fixação bacteriana na epiderme das raízes, e em seguida a penetração e colonização ao longo da raiz (Mazzucchi, 1983). Estes processos culminam na formação do *quorum sense*, que são agregações de microcolônias bacterianas nas junções das paredes adjacentes epidérmicas, deste modo essas áreas são sugeridas como locais preferenciais de penetração e posterior replicação. O processo de penetração inicia com hidrolização de pequenas áreas da parede celular por ação enzimática (celulases), que são produzidas pelas bactérias para enfraquecer localmente ou afrouxar a parede celular da epiderme, facilitando assim, a disseminação das bactérias nos tecidos da raiz (Campbell et al., 1987).

As características que as bactérias necessitam para serem consideradas como rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (PGPR) são ser eficientes para colonizar a superfície da raiz, deve sobreviver, multiplicar e competir com outros microorganismos da microbiota, pelo menos durante o tempo necessário para expressar a atividade de promoção de crescimento e/ou proteção das plantas (Kloepper, 1994).

Efeito de PGPR nas plantas

As PGPR estimulam o crescimento das plantas por diversos mecanismos, que incluem a melhoria da transformação e aquisição de nitrogênio, auxilia na mineralização de fósforo, estimula a produção de fitohormônios, alguns gêneros podem ter sinergismo com outras interações bactéria-planta, e mitigação de danos ocasionados por estresses em plantas (Kurepin et al., 2015; Rashid et al., 2016; Vimal et al., 2016; Bell et al., 2015) (Quadro 1), essa promoção

de crescimento pode ocorrer de forma direta (induzindo alterações fisiológicas, bioquímicas, molecularer e morfo-anatômicas) ou indireta (através de indução de resistência a estresse) deste modo os promotores de crescimento também podem proteger plantas através do controle de fitopatógenos no solo e nas sementes, indução de resistência sistêmicas e produção de compostos voláteis que podem inibir o crescimento de micróbios deletérios nos tecidos vegetais (Jain et al., 2013; Bach et al., 2016). Alguns destes efeitos foram identificados nos estudos de plantas de arroz com *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 (Filippi et al., 2011; Rêgo et al., 2014; Nascente et al., 2016; Bueno et al., 2017).

Quadro 1. Associações de planta-rizobacterias (*Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113) em estudos de promoção de crescimento em plantas e indução de resistência a patógeno de plantas arroz de terras altas nos estados do Pará e Goiás.

Rizobactérias	Traços de indutores de crescimento e resistências	Referências
<i>P. fluorescens</i> <i>B. pyrrocinia</i>	Produção de sideróforo Supressão da brusone (<i>Magnaporthe oryzae</i>) Atividade peroxidasse Atividade quitinase Atividade b-1,3-glucanase	(Filippi et al., 2011)
	Incremento de comprimento e biomassa nas plantas Compostos fenólicos totais Flavonoides Monômeros de lignina	(Rêgo et al., 2014)
	Aumento na atividade celulase Aumentos nas concentrações de N, K, Ca	(Nascente et al., 2016)
<i>P. fluorescens</i>	Supressão da escaldadura (<i>Monographella albescens</i>) Aumento na concentração de Silício nas folhas Aumento nas concentrações de Fe e Mn Solubilizador de fosfato	(Bueno et al., 2017) (Nascente et al., 2016)
	<i>B. pyrrocinia</i>	Ácido indolacético (AIA) (Nascente et al., 2016)

Plantas sobre estresses bióticos com PGPR

Em geral a competição por nutrientes, exclusão de nichos por alteração do ambiente o tornando desfavorável a patógenos, resistência e produção de metabólitos antifúngicos são modos de atividade de controle biológico induzidos pelas PGPR. Muitas rizobactérias têm sido relatadas como produtoras de metabólitos antifúngicos como, HCN, fenazinas, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pioluteorina, viscosinamida e tensin (Lugtenberg e Kamilova, 2009; Glick, 2012). Essa interação de algumas rizobactérias com as raízes das plantas pode resultar em resistência contra algumas bactérias patogênicas, fungos e vírus. Este fenômeno é chamado de resistência sistêmica induzida (ISR) (Lugtenberg e Kamilova, 2009).

Dentre as enfermidades que mais acometem a cultura do arroz no Brasil temos a brusone e a escaaldadura. A brusone é causada por *Magnaporthe oryzae* B. Couch [*Pyricularia Grisea* (Cooke) Sacc.] sendo a doença mais destrutiva em todo o mundo, e já causou perdas de rendimento de 100% em surtos no Brasil, na cultivar de arroz de terras altas, Colosso (Prabhu et al., 2009; Filippi et al., 2011), e a escaaldadura nas folhas é causada pelo fungo necrotrófico *Monographella Albescens* (= *Rhynchosporium oryzae*) e ocorre em várias partes do mundo onde o arroz é cultivado, no Brasil a doença é mais severa no norte do país (Kimati et al., 2011; Bueno et al., 2017).

Plantas sobre danos abióticos com PGPR

As rizobacterias podem contribuir para estabilidade ambiental pela produção de exopolímeros (EPS), na agregação do solos que aderem às raízes sob diferentes tensões ambientais (Nunkaew et al., 2015). O EPS microbiano liga as partículas do solo e auxiliam na manutenção de micro e macroagregados juntamente com hifas fúngicas e assim estabiliza os solos resultando em aumento da disponibilidade de água e fertilizantes (Upadhyay et al., 2011, Sandhya et al., 2009), outro problema comum no solo é o acúmulo de compostos que causam

menor crescimento e perda de produtividade, como herbicidas, pesticidas e compostos orgânicos, aleloquímicos, presentes no solo devido a intensas atividades agrícolas. Um passo chave durante a remediação com rizobactérias consiste na seleção de rizobactérias degradantes de poluentes que vivem na rizosfera e que utilizam os exsudados radiculares como fonte de energia para manutenção da atividade (Kuiper et al., 2001). Essas bactérias, além de degradar os compostos poluentes, freqüentemente auxiliam diretamente na remediação produzindo hormônios, fixando nitrogênio atmosférico, solubilizando fosfato ou secretando sideróforos ou mesmo na modulação de genes (Denton 2007, Rahman et al., 2002). Deste modo muitos estudos são necessários para elucidar a habilidade da *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 em mitigar estes danos abióticos.

Referência

- Asch, F. 2005. Drought-induced changes in rooting patterns and assimilate partitioning between root and shoot in upland rice. *Field Crops Research*, Amsterdam 93: 223-236.
- Bach E, Seger G D S, Fernandes G C, Lisboa B B, Passaglia L M P. 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Appl Soil Ecol.* 99: 141–149
- Bell C W, Asao S, Calderon F, Wolk B, Wallenstein M D. 2015. Plant nitrogen uptake drives rhizosphere bacterial community assembly during plant growth. *Soil Biol Biochem.* 85: 170–182.
- Bueno, A.C. S. O.; Castro, G. L. S.; Silva Junior, D. D.; Pinheiro, H. A.; Filippi, M. C. C.; Silva, G. B. Response of photosynthesis and chlorophyll *a* fluorescence in leaf scald-infected rice under influence of rhizobacteria and silicon fertilizer. *Plant Pathology (Print)*, v. xxx, p. x-x, 2017.
- Campbell J. N.; Cass, D. D.; Peteya, D. J. Colonization and penetration of intact canola seedling roots by an opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue. *Phytopathology.* v. 77, p.1166 1173. 1987.
- Denton B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. *MMG 445 Basic Biotechnol* 2007;3:1–5.
- Dilfuza E, S Shrivastava, A Varma *Editors*. *Plant-GrowthPromoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants.* Soil Biology. Springer. Vol 42.
- Dourado, M. N., Martins, P. F., Quecine, M. C., Piotto, F.A., Suoza, L.A., Franco M.R., Tezotto, T., Azevedo, R. A. 2013 *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces cádmium toxicity and promotes growth in tomato. *Ann. Appl. Biol*, 163, 494-507.

Drogue B, Doré H, Borland S, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res Microbiol* 2012;163:500–10.

Duan, Z.-Q., Bai, L., Zhao, Z.G., Zhang, G.P., Cheng, F.M., Jiang, L.-X., Chen, K.-M., 2009. Drought-stimulated activity of plasma membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and its catalytic properties in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 1104e1115.

Filippi, M.C.C.; Silva, G.B.; Silva-Lobo, V.L.; Côrtes, M.V.C.B.; Moraes, A.J.G.; Prabhu, A.S. 2011. Leaf blast (*Magnaportheoryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control* 58: 160–166.

Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2012. Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanism. *Environ. Exp. Bot.* 83, 33e46.

Gepstein S, Glick B R. 2013. Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Mol Biol.* 82: 623– 633

Global rice market situation and outlook for 2016/17 - FAO, Rome. <http://www.amis-AMIS>, 2016.

Hamilton C E, Bever J D, Labbé J, Yang X H, Yin H F. 2016. Mitigating climate change through managing constructed microbial communities in agriculture. *Agr Ecosyst Environ.* 216: 304–308.

Ingraham M. J.L., Ingraham C.A. 2010. Introdução a microbiologia: Uma abordagem baseada em estudos de caso, 3ª edição Norte Americana, editora CENGAGE Learning

Jain A, Singh A, Singh S, Singh H B. 2013. Microbial consortium-induced changes in oxidative stress markers in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Plant Growth Regul.* 32: 388–398.

- Joyce, D.C., Aspinall, D., Edwards, G.R., 1983. Water deficit and the growth and anatomy of the radish fleshy axis. *New Phytol.* 93, 439–446.
- Kar, R. K. 2011. Plant responses to water stress. Role of reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 6, 1741-1745.
- Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM, 2011. *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*. 5th edn. São Paulo, Brazil: Agronomica Ceres.
- Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*. Gilbert-Clarey, Tours, pp 879–882.
- Kloepper, J.W., 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum/Plant Associations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 111–118.
- Kuiper I, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Selection of a plant–bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 2001;14:1197–205.
- Kurepin L V, Park M J, Lazarovits G, Bernards M A. 2015. *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion is associated with endogenous changes in plant growth hormone levels. *Plant Growth Regul.* 75: 199–207.
- Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 2009;63:541–56.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
- Martins, M.B.G., Zieri, R., 2003. Leaf anatomy of rubber-tree clones. *Sci. Agric.* 60, 709–713.
- MAZZUCCHI, U. Recognition of bacteria by plants. In: Callow JA (ed) *Biochemical plant pathology*. John Wiley & Sons Ltd, New York, pp 299–322. 1983

- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33, 453e467
- Mishra, G.N. (1999). Strategic approaches for boosting upland rice yield. *Indian Farming*, 48(2): 9.
- Nascente, A.S.; Filippi, M.C.C.; Lanna, A.C.; Souza, A.C.A.; Silva Lobo, V.L; Silva, G.B. Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. x, p. 1-10, 2016.
- Nunkaew T, Kantachote D, Nitoda T, Kanzaki H, Ritchie R J. 2015. Characterization of exopolymeric substances from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains and their ability to adsorb sodium ions. *Carbohydr Polym.* 115: 334–341.
- Patel J S, Singh A, Singh H B, Sarma B K. 2015. Plant genotype, microbial recruitment and nutritional security. *Front Plant Sci.* 6: 1–3
- Pereg L, McMillan M. 2015. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biol Biochem.* 80: 349–358
- Prabhu, A.S., Filippi, M.C., Silva, G.B., Lobo, V.L.S., Moraes, O.P., 2009. An unprecedented outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil. In: Wang, G.L., Valente, B. (Eds.), *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer, New York, pp. 257 – 266.
- Rahman KS, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J Basic Microbiol* 2002;42:284–91.
- Rashid M A, Mujawar L H, Shahzad T, Almeelbi T, Ismail I M I, Oves M. 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol Res.* 183: 26–41.

- Rêgo, M.C.F.; Ilkiu-Borges, F., Filippi, M.C.C.; Gonçalves, L.A; SILVA, G.B. 2014. Morphoanatomical and Biochemical Changes in the Roots of Rice Plants Induced by Plant Growth-Promoting Microorganisms. *Journal of Botany* 2014: 1-10.
- Reinhardt, D. H. & Rost, T. L. "Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots," *Environmental and Experimental Botany*, vol. 35, no. 4, pp. 563–574, 1995.
- Sandhya V, Ali S K Z, Grover M, Reddy G, Venkateswarlu B. 2009. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol Fert Soils*. 46: 17–26.
- Upadhyay S K, Singh J S, Singh D P. 2011. Exopolysaccharideproducing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*. 21: 214–222.
- Vimal S R, Singh J S, Arora N K, Singh D P. 2016. PGPR—an effective bioagent in stress agriculture management. *In* Sarma B K, Jain A (eds.) *Microbial Empowerment in Agriculture: A Key to Sustainability and Crop Productivity*. Biotech Books, New Delhi. pp. 81–108.
- Wade, L.J. (2003). *Introduction to the Diverse Ecosystems of Rice cultivation*. IRRI, Los Banos, Phillipines.

Capítulo 2

2. Tolerância ao déficit hídrico de plantas de arroz de terras altas induzidas por PGPR

(*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211) ¹

Marcela Cristiane Ferreira Rêgo¹, Gledson Luiz Salgado de Castro¹, Marta Cristina Corsi de Filippi², Anna Cristina Lanna², Telma Fátima Vieira Batista¹, Gisele Barata da Silva^{1*}.

¹ Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830.Belém, Pará, Brazil.

² Phytopathology Laboratory, Brazilian Enterprise for Agricultural Research - Rice and Beans, CEP 75375-000, Goiânia, Goiás, Brazil.

* Corresponding author: <gisele.barata@ufra.edu.br>

¹ Este capítulo segue as normas de apresentação do Checklist. da Water international

Resumo

Os danos ao crescimento causado pelos veranicos agravam o problema de déficit hídrico. O arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em sistema irrigado apresenta alta demanda hídrica, o objetivo foi avaliar o comportamento de plantas de arroz através das alterações agronômicas e morfológicas induzidas por PGPR sob diferentes lâminas de água no solo (LAS) induzidas por PGPR (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211). Em LAS de 100%, 70%, 50% e 30% da capacidade de campo (CC). Ensaio 1: As PGPR foram submetidas aos estresses abióticos de: temperatura (30, 35 e 40 °C), salinidade (0.5 % e 7.5%) e déficit hídrico abrupto (0, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 e -1.2 Mpa) simulado por PEG com 10 repetições e avaliado o crescimento. Ensaio 2: E as plantas de arroz inoculadas com: BRM-3211, BRM-3213 e controle, submetidas ao LAS de: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo, com três vasos por tratamento e cinco plantas por vaso. Foram avaliados: água evapotranspirada e Potencial hídrico (ψ_{am}), biomassa, comprimento da planta, área foliar, teor relativo de clorofila (SPAD), biomassa e comprimento da raiz. As PGPR foram tolerantes aos estresses abióticos de: salinidade (80%), temperatura (96%) e seca (96%), as plantas atingiram a LAS crítica de até 63 % da capacidade de campo, as plantas com BRM-3211 tiveram os efeitos do déficit hídrico mitigados com maior biomassa, teor relativo de clorofila, biomassa 30% e comprimento da raiz 88% em LAS de 30% de CC quando comparados a plantas controle em cada LAS. As PGPR induzem tolerância a déficit hídrico nas plantas.

Palavras-chave: Planta de arroz, *Burkholderia pyrrocinia*, *Pseudomonas fluorescens*, déficit hídrico.

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.) é segundo cereal mais consumido no mundo, com produção mundial de 488,4 toneladas na safra de 2012, os países asiáticos são os maiores produtores de arroz do mundo, seguido pela América Latina, particularmente o Brasil, onde o arroz é um item da alimentação básica (Souza, et al. 2015). No mundo, o arroz é uma cultura semeada, em maioria, em áreas inundadas, e no Brasil, 31 % da área cultivada é em terras altas, que requer menor uso de água do semeio a colheita. Entretanto, os veranicos que podem ocorrer durante o desenvolvimento da cultura, limitam a produtividade das cultivares que são sensíveis a deficiência hídrica.

Para o arroz de terras altas, a seca é o estresse abiótico mais grave (Araus et al., 2002), as perdas podem atingir 30 % do rendimento. Em déficit hídrico, as plantas de arroz possuem enraizamento superficial, redução do crescimento com a diminuição da área foliar, altura da planta, biomassa, atraso no desenvolvimento reprodutivo, produtividade e na incidência de brusone (Bonhomme et al., 2012; Qian et al., 2004, Asch et al., 2005).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) são benéficas e possuem a capacidade de promover o crescimento de plantas por atuarem como bioestimulantes ou indutores de resistência à doenças (Niranjan et al., 2003), evidenciado em pesquisas com isolados de *Paenibacillus polymyxa* e *Pseudomonas thivervalensis* em plantas de *Arabidopsis*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus subtilis* em plantas de pepino (*Cucumber*), e *Pseudomonas fluorescens* em *Medicago trunculata* (Van Lonn 2007).

As PGPR (*Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) e *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211)) induzem resistência sistêmica à brusone (*Magnaporthe oryzae*) (Filippi et al., 2011), e promovem alterações anatômicas como aumento do diâmetro da raiz e do cilindro vascular, número de feixes vasculares, espessura da exoderme, endoderme, córtex e área de lacunas de

aerênquima em plantas de arroz de terras altas sem estresses bióticos ou abióticos (Rêgo et al., 2014).

Deste modo a hipótese neste estudo é que as alterações no sistema radicular, induzidas por PGPR (*B. pyrrocinia* (BRM-3213) e *P. fluorescens* (BRM-3211)), favorecem a tolerância das plantas de arroz à seca. O objetivo foi avaliar o comportamento de plantas de arroz através das alterações agronômicas e morfológicas induzidas por PGPR sob diferentes lâminas de água no solo (LAS) induzidas por PGPR (*B. pyrrocinia* - BRM-3213 e *P. fluorescens* BRM-3211).

Material e métodos

No primeiro ensaio as PGPR (*Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213)) foram testadas quanto a tolerância a estresses abióticos de salinidade, temperatura e pressão osmótica. Em seguida foi feito teste de indicação de formação de biofilme.

O segundo ensaio foi feito com plantas inoculadas e não inoculadas e submetidas a diferentes lâminas de água no solo onde se avaliou as alterações agronômicas e morfológicas.

Tolerância de *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) aos estresses abióticos múltiplos e formação de biofilme

Foram utilizados dois isolados de PGPR: *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213), previamente selecionadas como promotoras do crescimento em arroz (Filippi et al., 2011; Rêgo et al., 2014). As PGPR foram cultivadas em meio TSB (peptona de caseína [1,7 %], peptona de soja [0,3 %], glicose [0,25 %], cloreto de sódio [0,5 %], fosfato dipotássico [0,25 %], água destilada (100 mL), e incubados a 28 °C, sob agitação em 115 rpm por 6 h. Em seguida, as suspensões de bactérias foram ajustadas a 2×10^5 UFC.mL⁻¹ e utilizadas como inóculo inicial (Kumar et al., 2014).

Salinidade e Temperatura

Foram conduzidos dois ensaios, ambos em delineamento inteiramente casualizado, com duas PGPR, *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213), três temperaturas (30°, 35° e 40 °C) e duas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (0.5 e 7.5 %), em meio de cultura TBS. Cada ensaio foi composto por 10 repetições, com um tubo por repetição. Nos tubos de ensaio contendo 10 mL de TBS ou TBS + solução 7% de NaCl foi adicionada suspensão ajustada ($\text{Å} = 600 \text{ nm} = 0.01$) de cada PGPR (1 mL), incubados por 48 hs em agitador orbital a 115 rpm, nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C. Em seguida foi avaliada a densidade óptica utilizando espectrofotômetro ($\text{Å} = 600 \text{ nm} = 0.01$). As PGPR que foram consideradas tolerantes à salinidade e à temperatura apresentaram densidade óptica (DO) igual ou maior 0,1 (Kumar et al., 2014).

Deficiência hídrica induzida por polietilenoglicol (PEG-6000 PA)

Foram conduzidos dois ensaios, ambos em delineamento inteiramente casualizado, com duas PGPR, *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213), cultivadas em meio líquido TBS com PEG – 6000, em sete concentrações 0, 12, 18, 22, 26, 30 e 33 %, as quais equivalem a níveis de potencial osmótico (ψ_s) de 0, -0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0 e -1.2 MPa, respectivamente (Michel & Kaufmann, 1972). Cada ensaio foi composto por 10 repetições, com um tubo por repetição.

Nos tubos de ensaio contendo 10 mL de TBS e TBS com doses de 12, 18, 22, 26, 30 e 33 % de solução de PEG-6000 foi adicionada suspensão ajustada ($\text{Å} = 600 \text{ nm} = 0.01$) de cada PGPR (1 mL), incubados por 48 hs em agitador orbital a 115 rpm, a 30 °C. Em seguida foi avaliada a densidade óptica utilizando espectrofotômetro ($\text{Å} = 600 \text{ nm} = 0.01$). As PGPR que foram consideradas tolerantes à deficiência hídrica induzida por PEG-6000 apresentaram densidade óptica (DO) igual ou maior 0,1 (Kumar et al., 2014).

Formação de Biofilme

A caracterização das PGPR: *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213), de produção de biofilme foi feita em ágar Congo Red (CRA), após o cultivo das duas PGPR, as placas foram incubadas por 48 h a 30 °C. A avaliação feita pela coloração das colônias, sendo consideradas positivas as com cor preta e quase pretas (Mathur, 2006).

Tolerância à deficiência hídrica em plantas de arroz inoculadas com PGPR

Foram conduzidos dois ensaios em casa de vegetação onde as plantas foram mantidas a uma temperatura de 29 ± 2 °C durante o dia e 26 ± 2 °C à noite com uma humidade relativa de $85 \pm 5\%$), ambos em delineamento inteiramente casualizado, com duas PGPR, e sementes da cultivar de arroz de terras altas BRS Primavera. Sementes foram inoculadas com *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213) [DO = 0,1], e como controle foram usadas sementes não inoculadas, de acordo com metodologia descrita por Filippi et al., (2011). Foram semeadas 10 sementes por vaso, contendo 0.700 g de Latossolo amarelo distrófico, adubados com 1.17 g de N-P-K (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), 0.35 g de Ureia e 0.7 g de FTE (micronutrientes). No estágio fenológico V3, as plantas foram submetidas a quatro lâminas de água no solo (LAS): 100 % da capacidade de campo (CC) (tratamento referência), 70 % da CC, 50 % da CC e 30 % da CC e mantidas até o estágio vegetativo V6 (Counce et al., 2000). Cada tratamento foi composto por quatro repetições, sendo um vaso por repetição contendo cinco plantas.

A quantidade de água no vaso, para cada regime hídrico foi determinada através da capacidade de campo (CC) do solo determinado por curva de retenção de água pelo método gravimétrico (Silveira et al., 2015; Mello et al., 2002). Esse processo foi estabelecido e registrando a Massa máxima do Vaso (MVCC) (solo + água). Com base em CC foi possível determinado a massa máxima de água retida pelo solo foi considerado Massa de Água de

Referência (MAR), determinada pela diferença entre a Massa do Vaso na CC (MVCC) e a Massa do Vaso com Solo Seco (MVSS) ($MAR = MVCC - MVSS$) (Campos et al., 2004).

Após o início da restrição hídrica, os vasos foram pesados diariamente, se obtendo a Massa Diária do Vaso (MDV) e, por consequência, a Massa Diária de Água (MDA). Esta foi calculada pela diferença entre a MDV e MVSS ($MDA = MDV - MVSS$) (Campos et al., 2004). Os regimes hídricos pré-definidos, foram expressos como índice de deficiência hídrica (IDH) e transformados em Lâmina de água no solo (%) para a manutenção do déficit hídrico e análise dos dados, a massa diária de água foi determinado por meio da razão entre a MDA e MAR ($IDH = MDA / MAR$). Para os diferentes tratamentos, a Massa de Água equivalente a cada Restrição Hídrica imposta (MA_{RH}) foi previamente calculada se multiplicando a MAR pelo valor da Restrição Hídrica pré-estabelecida (RH) ($MAR_{RH} = MAR \times RH$). A soma da MA_{RH} e da MVSS ($MVRH = MAR_{RH} + MVSS$) foi feita para determinar a Massa do Vaso equivalente a cada Restrição Hídrica (MV_{RH}). Assim, no momento em que os vasos de um determinado tratamento atingiam a $MVRH$, a mesma era mantida constante por meio da reposição diária de Água Evapotranspirada (AE), calculada pela diferença de Massa dos Vasos entre os dias i e $i-1$ ($AE = MV_{i-1} - MV_i$) este protocolo foi adaptado de (Silveira et al., 2015; Deus et al., 2015).

O déficit hídrico iniciou ao 11º dia após semeadura (DAS) e mantido até o 28º DAS. Em seguida, foram avaliados o potencial hídrico foliar antemanhã (Ψ_{am}) realizada no intervalo de 5 a 6 horas da manhã, em uma planta por vaso; conteúdo relativo de clorofila (SPAD), e feita as avaliações morfológicas e agronômicas de área foliar (cm^2), largura da folha (cm) com paquímetro digital, comprimento da parte aérea e da raiz (cm) com auxílio de régua e biomassa da matéria seca da parte aérea e da raiz (g) com uso de balança analítica, nas demais plantas.

Análise estatística

Os ensaios de tolerância das PGPR aos estresses abióticos (salinidade, temperatura e deficiência hídrica) foram repetidos duas vezes, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de média de Duncan ($p < 0.05$).

Os ensaios de tolerância das plantas de arroz de terras altas à deficiência hídrica, após inoculação das sementes com *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213), em casa de vegetação, foram repetidos cinco vezes e os dados de potencial hídrico foliar antemanhã e taxa evapotranspiratória foram avaliados por meio da análise de regressão, para escolha do modelo mais adequado. Para comparação das PGPR em cada LAS, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de média Duncan ($p < 0.05$) e erro padrão ($p < 0.05$), foi estimada a LAS necessária para reduzir o crescimento da biomassa seca da planta em 50% (LC 50%), adaptado de (Castro, et al., 2016). Foram avaliados os valores críticos para os demais parâmetros de crescimento da planta.

Resultados e Discussão

Tolerância de *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) aos estresses abióticos múltiplos e formação de biofilme

As PGPR *P. fluorescens* (BRM-3211) e *B. pyrrocinia* (BRM-3213) apresentaram o maior crescimento a 30 °C e na ausência de NaCl. Entretanto, na presença do estresse de alta temperatura (40 °C) e de salinidade (presença de NaCl [7.5 %] no meio de cultura), somente a *P. fluorescens* foi considerada tolerante, porque apresentou densidade óptica (DO) maior que 0,1 Å (Figuras 1A e 1B). Em relação a tolerância das PGPR *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia*, crescidas em meio contendo baixa disponibilidade hídrica (presença de PEG-6000), somente a *P. fluorescens* foi tolerante à deficiência hídrica, pois a rizobactéria apresentou crescimento

adequado em meio contendo até 30 % de PEG-6000 (ψ_s igual a -1.0 MPa) (Figura 1C). A *P. fluorescens* promoveu a formação de biofilme (Figura 1D). No entanto, as duas PGPR aos 30°C, com 0.5 % de NaCl, e 0 % de PEG, diferiram em DO quando submetida as temperaturas de 35° e 40°C, e a partir de 12 % de PEG (Figura 1 A-B-C).

Tolerância à deficiência hídrica em plantas de arroz inoculadas com PGPR

As plantas controle cujas sementes não foram não microbiolizadas, exibiram curvas lineares para os parâmetros potencial hídrico foliar antemanhã (ψ_{am}) e água evapotranspirada (*AE*) (mL) (Figura 2 A-B). No entanto, em plantas de arroz inoculadas com *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia* as curvas foram polinomiais para água evapotranspirada e para potencial hídrico foliar antemanhã inoculada com *B. pyrrocinia* (Figura 2 C-D).

Em LC 50% as plantas de arroz não inoculadas (controle), *B. pyrrocinia* e *P. fluorescens*, tem biomassa crítica da planta (g) de 0.062, 0.057 e 0.064 (Figura 2A) em LAS crítica (%) que correspondeu a 62, 63 e 62, que resultou em potencial hídrico crítico (ψ_{am}) (MPa) de -1.51, -1.50 e -1.28 (Figura 2C), ao volume de *AE* crítico (mL) de 12, 11 e 12 (Figura 2E), área foliar crítica (cm²) de 18, 21 e 20 (Figura 3A), conteúdo relativo de clorofila crítico (SPAD) de 21, 24 e 27 (Figura 3C), comprimento da planta crítico (cm) de 45, 49 e 47 (Figura 4A), largura da folha 0.51, 0.53 e 0.44 (Figura 4C), biomassa radicular (g) 0.042, 0.045 e 0.042 (Figura 5A), e comprimento radicular (cm) 8.6, 9.4 e 8.6 (Figura 5C), respectivamente.

As plantas inoculadas com PGPR quando comparado ao controle diferiram quanto: ao potencial hídrico (ψ_{am}) e o comprimento das plantas inoculadas com *P. fluorescens* em LAS de 50 e 30 % da CC (Figura 2D – 4B), *AE* e biomassa radicular das plantas inoculadas com *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia* em LAS de 30 % da CC (Figura 2E – 5B), a área foliar e comprimento radicular das plantas inoculadas com *B. pyrrocinia* em LAS em 30 % da CC (Figura 3B – 5D).

A espécie *Oryza sativa* é de ambiente semi-aquático e foi adaptada em terras altas por seleção no melhoramento genético. Em plantio de terras altas, a produtividade do arroz é limitada pelo déficit hídrico e por doenças como a brusone (Bonhomme et al., 2012). A falta de água no estágio inicial de desenvolvimento da planta reduz a expansão do sistema radicular nas camadas mais profundas do perfil do solo, a exploração da umidade e da fertilidade. O déficit hídrico também induz a redução da área foliar, o que está associada a redução no tamanho das folhas ou no número de folhas emitidas, que alteram a interceptação da radiação solar e poderão resultar em menor produtividade.

As PGPR (*B. pyrrocinia* e *P. fluorescens*) foram anteriormente registradas como promotoras do crescimento e supressoras de brusone em arroz (Filippi et al., 2011) e como indutoras de alterações estruturais nas raízes de plantas de arroz, promovendo aumento no comprimento, diâmetro e número de vasos condutores (Rêgo et al., 2014). E neste estudo as PGPR, quando presentes durante o crescimento de plantas de arroz de terras altas, induzem as plantas a tolerar o déficit hídrico, por meio da manutenção do potencial hídrico foliar (Figura 2D) e aumento do comprimento de raiz (Figura 5D - 6). A tolerância das plantas de arroz ao déficit hídrico, induzidas por *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia*, pode estar relacionada com a capacidade de resistirem ao aumento da: temperatura, concentração de sal e pressão osmótica (Figure 1 A-B-C). Essas características das PGPR, podem permitir a sobrevivência em condições adversas pode ser atribuída a composição da parede celular e sua produção de exopolissacarídeos (EPS). EPS são polímeros de compostos hidratados e compõem em torno de 97 % da água na matriz da parede celular, conferindo proteção contra a dessecação. O EPS também compõem o biofilme, que é produzido pela PGPR *P. fluorescens*, componente que atua na agregação microbiana e na proteção contra danos físicos e químicos à célula bacteriana (Bhaskar e Bhosle, 2005; Sandhya et al., 2009). A produção de biofilme já foi registrada em *Serratia* sp. GSD2 e correlacionada ao crescimento da bactéria em meio de cultura com elevada

salinidade, em condições de alta temperatura, resultando também no incremento de enzimas extracelulares (amilase, protease e lipase) (Hall-Stoodley et al., 2004).

A taxa média de sobrevivência das PGPR: *B. pyrrocinia* e *P. fluorescens*, submetidas aos estresses abióticos foi de 80 % em meio NaCl [7.5 %], 96 % em temperatura média (35° e 40°C) e 96 % na pressão osmótica (-1.2 MPa), evidenciando que mesmo sob condições adversas, o crescimento das PGPR foi mantido, podendo agir como fatores indutores de tolerância ao estresse hídrico em plantas de arroz (figura 1 A-B-C). O isolado *P. fluorescens* sobreviveu em -1.0 MPa, enquanto que estudos com isolados de tolerantes a seca dos gêneros *Rhizobium* sp. e *Pseudomonas* spp., sobreviveram em até -0.036 MPa induzido por PEG (Timmusk e Wagner, 1999). Deste modo, evidenciando a eficiência de sobrevivência em condições de déficit hídrico.

Em plantas inoculadas com *P. fluorescens* em LAS de 50 e 30 % da CC o potencial hídrico (ψ_{am}) diferiram do controle em 33 % e 9 % respectivamente (Figura 2D), os valores de potencial hídrico (ψ_{am}) crítico em LAS crítica foi maior em plantas inoculadas com *P. fluorescens* de -1.27 MPa e a PGPR *P. fluorescens* manteve o crescimento em pressão osmótica de -1.2 MPa, enquanto que a água evapotranspirada (AE) ao final do déficit hídrico foi menor em plantas inoculadas com *B. pyrrocinia* e *P. fluorescens* em LAS de 30% da CC com redução na perda de água de 18% e 29%, respectivamente (Figura 2F).

A menor perda de água observada em plantas inoculadas, em condições de déficit hídrico, pode estar relacionada a produção de EPS pelas PGPR, que auxiliam na retenção de água e a estrutura do solo (Chenu e Roberson 1996; Roberson e Firestone 1992). Em plantas de milho (*Zea mays*) e *Arabidopsis thaliana* inoculadas respectivamente com *Azospirillum* e *Paenibacillus polymyxa* ocorreu aumento na formação de EPS, por bactérias da rizosfera, o que auxiliou na tolerância das plantas (Sandhya et al., 2009; Sandhya et al., 2010). Este efeito benéfico também foi observado em plantas de arroz quando submetidas ao deficit hidrico,

oriundas de sementes inoculadas com as bactérias *P. fluorescens* AK1, *P. aeruginosa* AK2 e *P. aeruginosa* AF3. Essas bactérias ao penetrarem nas células das raízes auxiliaram na fixação de nutrientes para as plantas, e aumentaram a produção de EPS. Também foi reportado que induziram menor perda de água pela planta, promoveram ganho em biomassa e área foliar (Flemming e Wingender, 2001). Assim como observados em plantas de arroz inoculadas com as PGPR (*B. pyrrocinia* e *P. fluorescens*), na biomassa da parte aérea (Figura 2 B) comprimento da planta (Figura 4B).

Em plantas inoculadas com *B. pyrrocinia* em LAS de 30 % da CC, a área foliar diferiu do controle em 20 % (Figura 3B), e com *B. pyrrocinia* em LAS de 70 % o conteúdo relativo de clorofila diferiu do controle em 17 % e plantas inoculadas com *P. fluorescens* em LAS 70 % e 50% da CC diferiu do controle em 15 % e 48 % (Figura 3D). Em estudos com cultivar resistente a déficit hídrico (N22), ocorreu a redução da área foliar total (24 %), em relação a plantas irrigadas (Kadam et al., 2015). A redução de área foliar específica foi fator determinante para o aumento da utilização eficiente da água sob estresse no trigo (*Triticum aestivum*), a redução de área foliar específica ocorre em resposta ao estresse hídrico para conservar a água e tem sido documentada em diversas espécies (Kadam et al., 2015). Assim, ocorre indicativo de que os microorganismos que atuam sobre a tolerância das plantas em relação ao déficit hídrico auxiliam no retardamento da perda de área fotossintética, devido promoverem a retenção de água no solo e na planta. Em *Hyoscyamusniger niger* inoculado com *P.putida* e *P.fluorescens* ocorreu a mitigação dos efeitos do estresse hídrico sobre o crescimento da planta, da biomassa e no teor de clorofila (Ghorbanpour et al., 2013). Deste modo os bioagentes atuam nas plantas sobre o teor de clorofila de forma benéfica em plantas submetidas ao deficit hídrico.

Em plantas inoculadas com *P. fluorescens* em LAS de 50 % e 30 % da CC o comprimento da planta de arroz diferiu do controle em 14 % e 15 % respectivamente (Figura 4B). O incremento da biomassa de plantas de arroz está relacionado com a produção de

fitormônios exógenos (Kang et al., 2014). Assim como identificado que as espécies *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Promicromonospora* sp. também mitigaram os danos causados pelo déficit hídrico nas plantas, devido aos metabólitos secundário produzidos nas plantas induzidos pelos microorganismos, incluindo os fitormônios, que durante o crescimento das plantas estimulam produção de giberelinas e auxina (Rakshapal et al., 2013; Iqbal & Ashraf 2013). Em milho (*Zea mays*), inoculados com isolado de *Pseudomonas* spp. foi verificado aumento da biomassa das plantas, e do teor relativo de água nas folhas e redução da perda de água na folha (Chen e Dai 1994). Esta redução pode estar sendo estimulada pela ação das PGPR nas plantas. Novas investigações são necessárias para esclarecer as rotas metabólicas das plantas inoculadas com PGPR ativas em condições de déficit hídrico.

Em plantas inoculadas com *P. fluorescens* em LAS de 30 % da CC a biomassa radicular diferiu do controle em 16 % (Figura 5B), e plantas inoculadas com *B. pyrrocinia* em LAS de 30% da CC o comprimento radicular diferiu do controle em 88 % (Figura 5D). O aumento na biomassa radicular também foi obtido em plantas de girassol (*Helianthu annuus*) submetida ao estresse hídrico e inoculada com *Pseudomonas* spp. produtoras EPS (Alami et al., 2000). Em plantas de arroz inoculadas com PGPR (*B. pyrrocinia* BRM-3213 e *P. Fluorescens* (BRM-3211) ocorreu menor redução do comprimento da parte aérea e radicular, e área foliar quando comparado a plantas controle.

A PGPR *P. fluorescens* podem ser inserida no manejo integrado da cultura do arroz em terras altas, pois reduz a severidade de doenças do arroz, agem como promotoras do crescimento e aumentam a tolerância das plantas à deficiência hídrica. Esse conjunto de atributos associados, convergem para uma agricultura sustentável, com redução do uso de fertilizantes e agrotóxicos a serem utilizados para aumento da produtividade na cultura do arroz, além de poderem ser utilizadas no manejo integrado das doenças com sucesso, como bioindutores de crescimento de planta, auxiliando na diminuição de aplicações de fertilizantes químicos, nos ajustes

fitotécnicos para reduzir os efeitos da seca causadas pelos veranicos, que podem durar de seis a dez dias, provocando perda na produtividade e crescimento das plantas, tornando assim, o manejo na rizicultura mais sustentável e com menor impacto para o meio ambiente.

Conclusão

A PGPR *P. fluorescens* BRM-3211 foi tolerante a temperatura de até 40 °C, salinidade de 7.5% e pressão osmótica de até -1.2 Mpa. E plantas inoculadas com as PGPR (*B. pyrrocinia* - BRM-3213 e *P. fluorescens* BRM-3211) tiveram os danos amenizados através das alterações agronômicas e morfológicas sob diferentes lâminas de água no solo (LAS), por meio da amenização da perda de biomassa, comprimento radicular, e manutenção do potencial hídrico.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Pesquisas da Amazônia (Fapesp) e Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo financiamento da pesquisa. À Agência Federal Brasileira de Apoio e Avaliação da Educação Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudos de doutorado.

Referências

- Alami, Y.; Champolivier, L.; Merrien, A.; Heulin, T. 2000. The role of *Rhizobium* sp. rhizobacterium that produces exopolysaccharide in the aggregation of the rhizospheric soil of the sunflower: Effects on plant growth and resistance to hydric constraint. *Oleagineux Corps Gras Lipides* 6: 524–528.
- Araus, J.L.; Slafer, G.A.; Reynolds, M.P.; Royo, C. 2002. Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. *Annals Botany* 89: 925–940.
- Asch, F. 2005. Drought-induced changes in rooting patterns and assimilate partitioning between root and shoot in upland rice. *Field Crops Research*, Amsterdam 93: 223-236.
- Bhaskar, P.V.; Bhosle, N. B. 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science* 88: 45–53.
- Bonhomme, L.; Valot, B.; Tardieu, F.; Zivy, M. 2012. Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Molecular Cellular Proteomics* 11: 957–972.
- Burlyn e. Michel and merrill r. Kaufmann, 1972, the osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiol.* (1973) 51, 914-916.
- Campos, H.; Cooper, M.; Habben, J. E.; Edmeades, G. O.; Schussler, J. R. 2004. Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research* 90: 19 – 34.
- Castro, G. L. S.; Lemos, O. F.; Tremacoldi, C. R.; Moraes, F. K. C.; Santos, L. R. R.; Pinheiro, H. A. 2016, Susceptibility of in vitro black pepper plant to the filtrate from a *Fusarium solani* f. sp. *piperis* culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* Vol 126: 3 – 5.
- Chen, J.; Dai, J.Y. 1994. Correlation among photosynthesis, lipid peroxidation and ultrastructural changes of mesophyll cells in corn leaves under water stress. *Maize Sci. Chinese* 2: 36–40.

- Chenu, C.; Roberson, E.B. 1996. Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. *Soil Biol Biochem* 28: 877–884.
- Counce, P. A.; Keisling, T. C.; Mitchel, A. J. A. 2000. Uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Science* 40: 439 – 443.
- Deus, K., E.; Lanna, A. C.; Abreu, F. R. M.; Silveira, R. D. D.; Pereira, W. J.; Brondani, C.; Vianello, R. P. Molecular and biochemical characterization of superoxide dismutase (SOD) in upland rice under drought. *Australian Journal of Crop Science*, 9(8):744 – 753, 2015.
- Filippi, M.C.C.; Silva, G.B.; Silva-Lobo, V.L.; Côrtes, M.V.C.B.; Moraes, A.J.G.; Prabhu, A.S. 2011. Leaf blast (*Magnaportheoryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control* 58: 160–166.
- Flemming, H.C.; Wingender, J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-parts I: structural and ecological aspects. *Water Science Technology* 43: 1 – 8.
- Ghorbanpour, M.; Hatami, M.; Khavazi, K. 2013. Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamusniger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*.37: 350-360.
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Review Microbiology* 2: 95-108.
- Iqbal, M.; Ashraf, M. 2013. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. *Environmental and Experimental Botany* 86:76–85.
- Kadam, N.; Yin, X.; Bindraban, P.; Struik, P.C.; Jagadish, K.S.V. 2015. Does morphological and anatomical plasticity during the vegetative stage make wheat more tolerant of water-deficit stress than rice? *Plant physiol.* 167: 1389–1401.

- Kang, S.M.; Waqas, M.; Khan, A.L.; Lee, I.J. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria: potential candidates for gibberellins production and crop growth promotion. *Journal of Plant Interactions* 9: 1–19.
- Kumar, G. P.; Ahmed, S. K.M.H.; Desai, S.; Amalraj, E.L.D.; Rasul, A. 2014. *In vitro* Screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *International Journal of Bacteriology*. 2014: 1 – 6.
- Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T.; Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (1):25-9.
- Pozo, M.J.; Azcón-Aguilar, C. 2007. Unravelling mycorrhiza induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393–398.
- Qian, X.; Shen, Q.; Xu, G.; Wang, J.; Zhou, M. 2004. Nitrogen forms effects on yield and nitrogen uptake of rice crop grown in aerobic soil. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1061-1076.
- Rakshapal, S.; Sumit, K.S.; Rajendra, P.P.; Alok, K. 2013. Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. *Indian Crop Production* 45:m335–342.
- Rêgo, M.C.F.; Ilkiu-Borges, F., Filippi, M.C.C.; Gonçalves, L. A; Silva, G.B. 2014. Morphoanatomical and Biochemical Changes in the Roots of Rice Plants Induced by Plant Growth-Promoting Microorganisms. *Journal of Botany* 2014: 1-10.
- Roberson, E.B.; Firestone, M.K. 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in soil *Pseudomonas* spp. *Applied Environmental Microbiology* 58: 1284–1291.
- Sandhya, V.; Ali, S.K.Z.; Grover, M.; Reddy, G.; Venkateswarlu, B. 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* 62: 21–30.

- Sandhya, V.; Ali, S.Z.; Grover, M.; Kishore, N.; Venkateswarlu, B. 2009. *Pseudomonas* sp. strain P45 protects sunflowers seedlings from drought stress through improved soil structure. *Journal Oilseed Research* 26: 600–601.
- Silveira, R.D.D.; Abreu, F.R.M.; Mamidi, S.; McClean, P.E.; Vianello, R.P.; Lanna A.C.; Carneiro, N.P.; Brondani C. 2015. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). *Genetics and Molecular Research* 56: 1-20.
- Souza, W.A.R.; Martines-Filho, J.G.; Zancan, C.; Costa, A.C.S.; Queiróz, A.G.A. 2015. Analysis of the Economic Potential for a Mercosur Rice Futures Market. *Society, Accounting and Management* 10: 70-87.
- Timmusk, S.; Wagner, E.G.H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 951–959.
- Van Loon, L. C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119: 243–254.

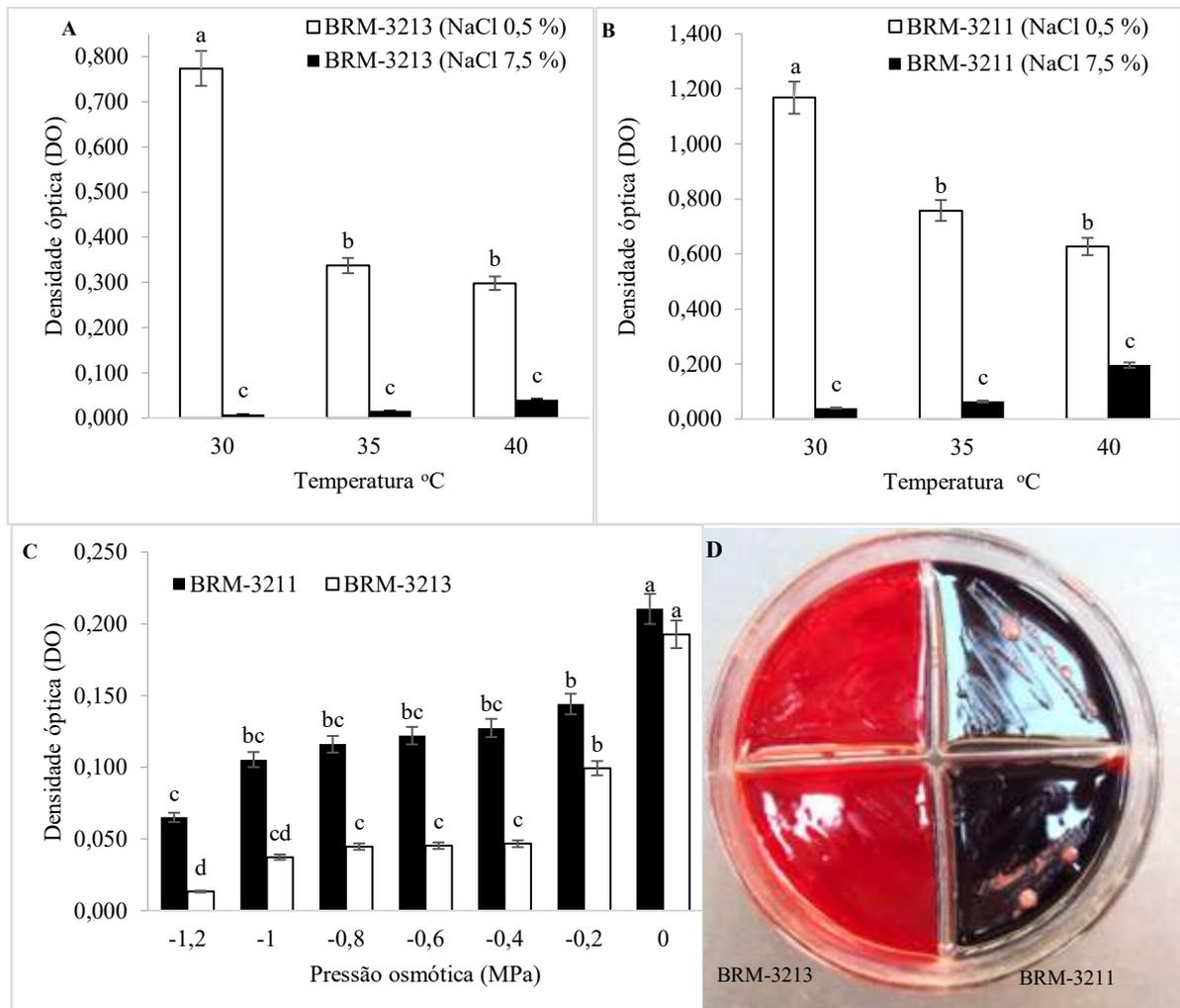


Figura 1. Crescimento da PGPR (*Pseudomonas fluorescens* - BRM-3211 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-3213) em condições de estresses abiótico de salinidade e temperatura (A-B), pressão osmótica (C) e teste de indicação para formação de biofilme (D). ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).

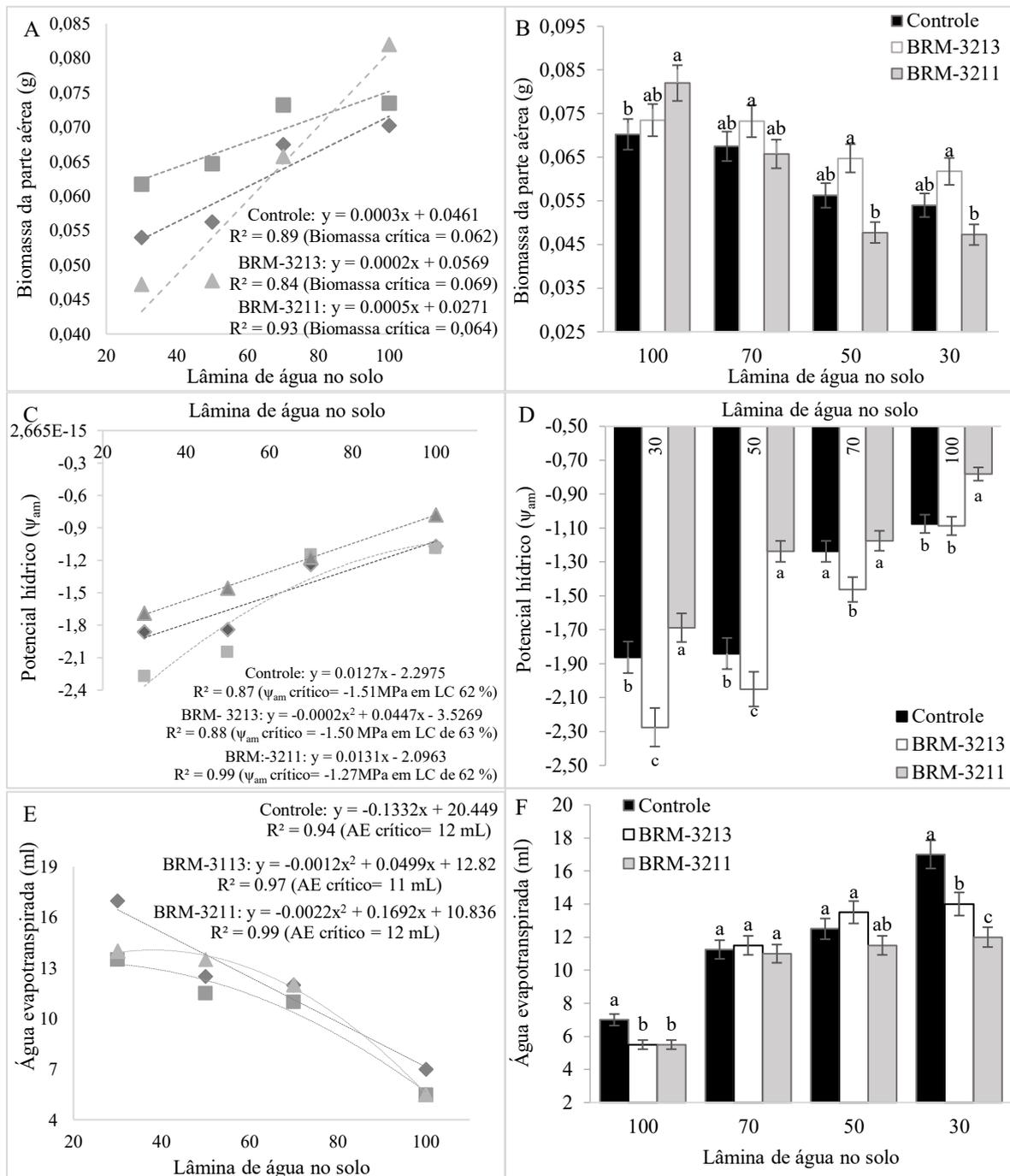


Figura 2. Biomassa da parte aérea (A - B), potencial hídrico foliar antemanhã (C - D), água evapotranspirada (E - F), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).

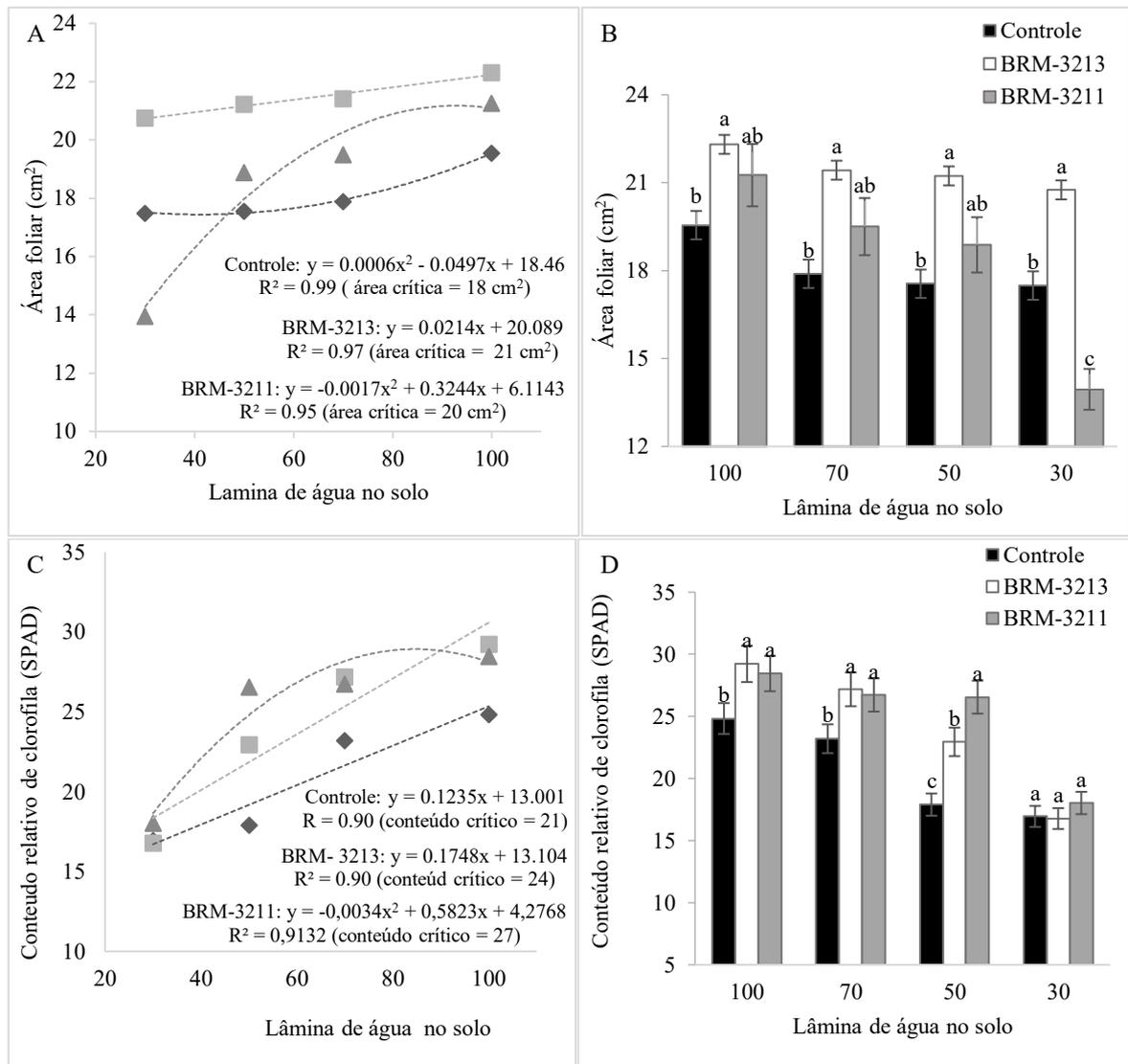


Figura 3. Área foliar (A - B) e conteúdo relativo de clorofila (C - D), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).

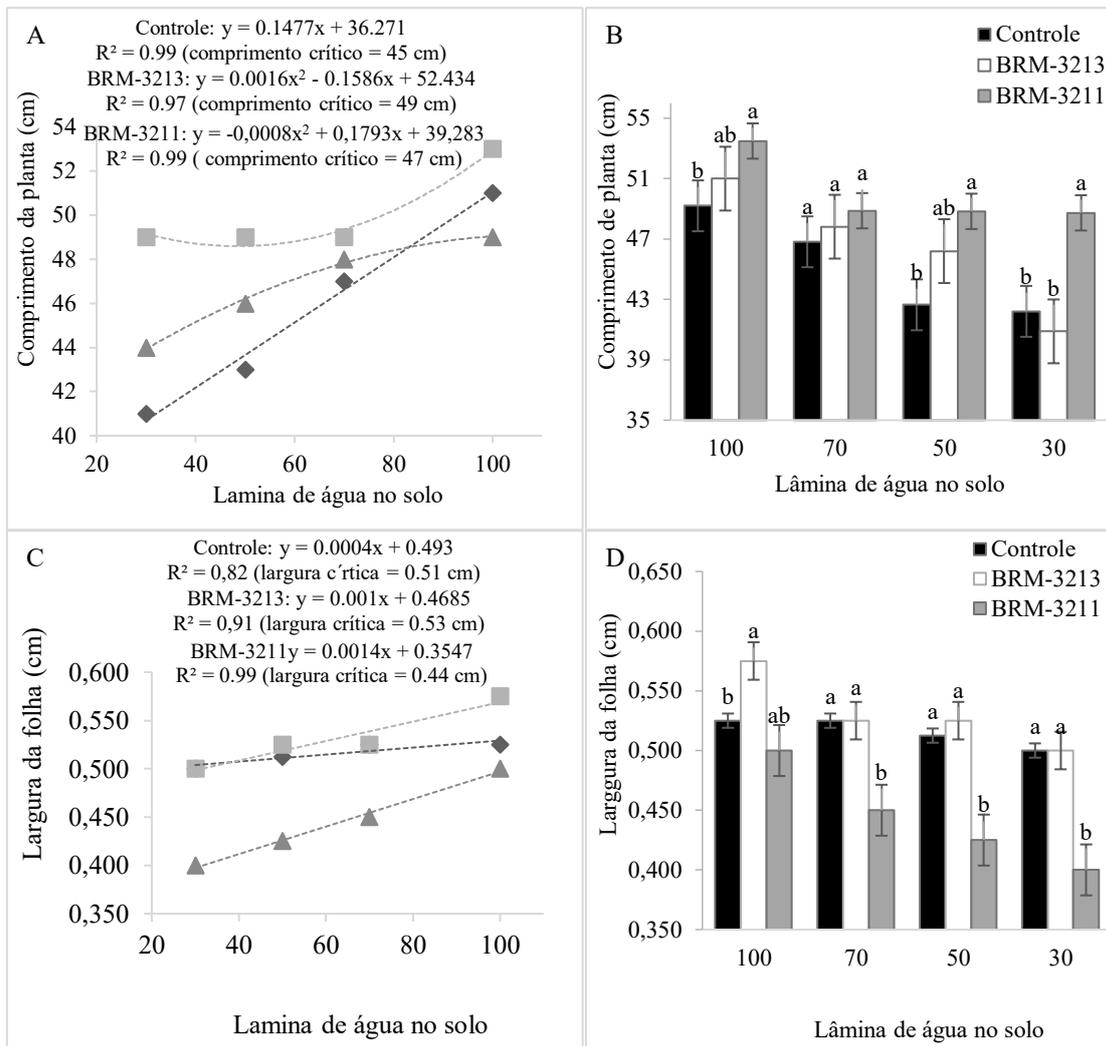


Figura 4. Comprimento da planta (A - B) e largura da folha (C - D), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0.05$). Erro padrão ($p < 0.05$).

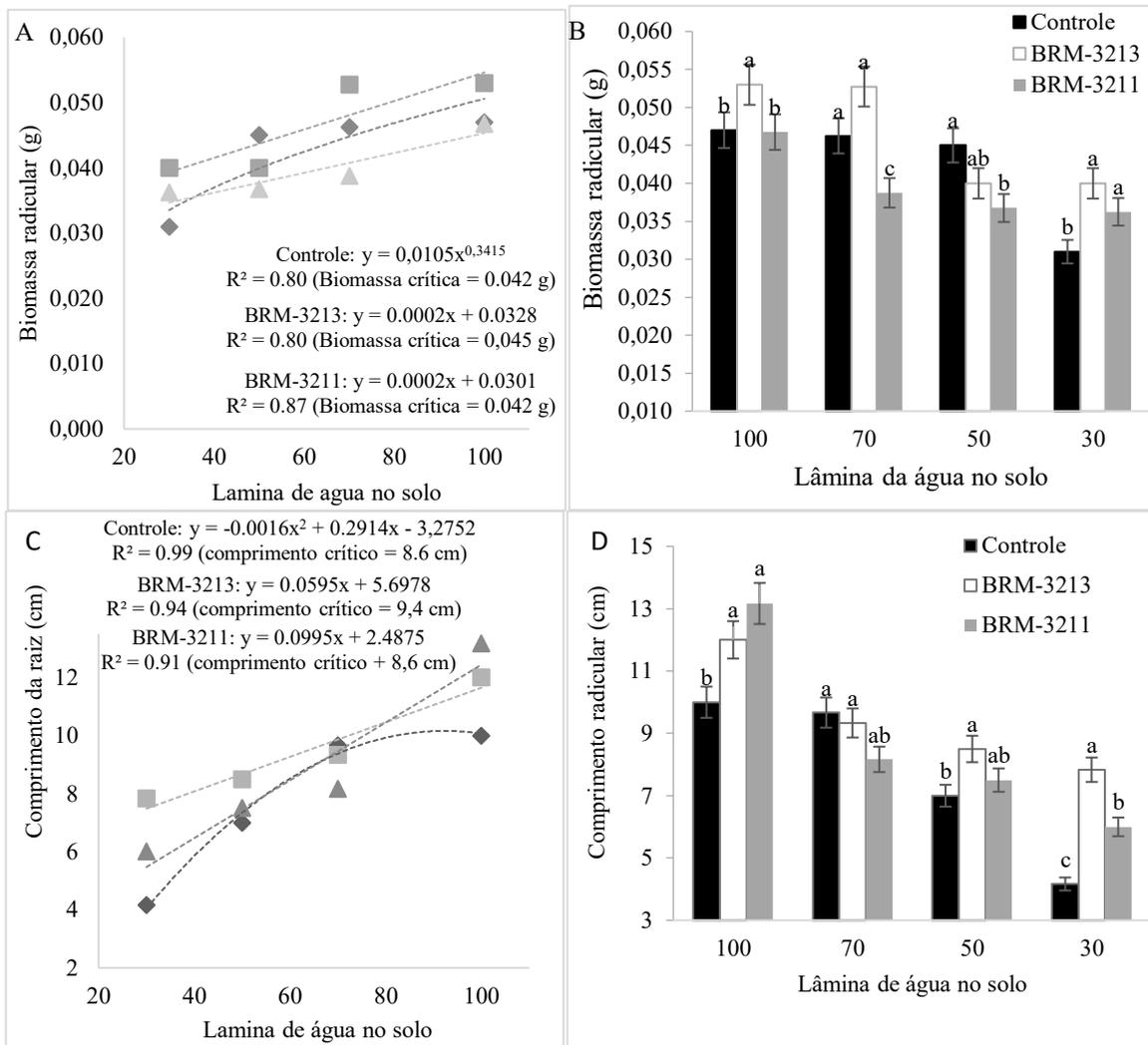


Figura 5. Biomassa radicular (A – B) e comprimento da raiz (C – D), em plantas de arroz de terras altas: controle (não inoculada) (◆) e inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* (BRM-3211) (▲) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-3213) (■), em lâminas de água no solo: 100, 70, 50 e 30 % da capacidade de campo. Análise de regressão e ANOVA, teste de Duncan ($p < 0,05$). Erro padrão ($p < 0,05$).

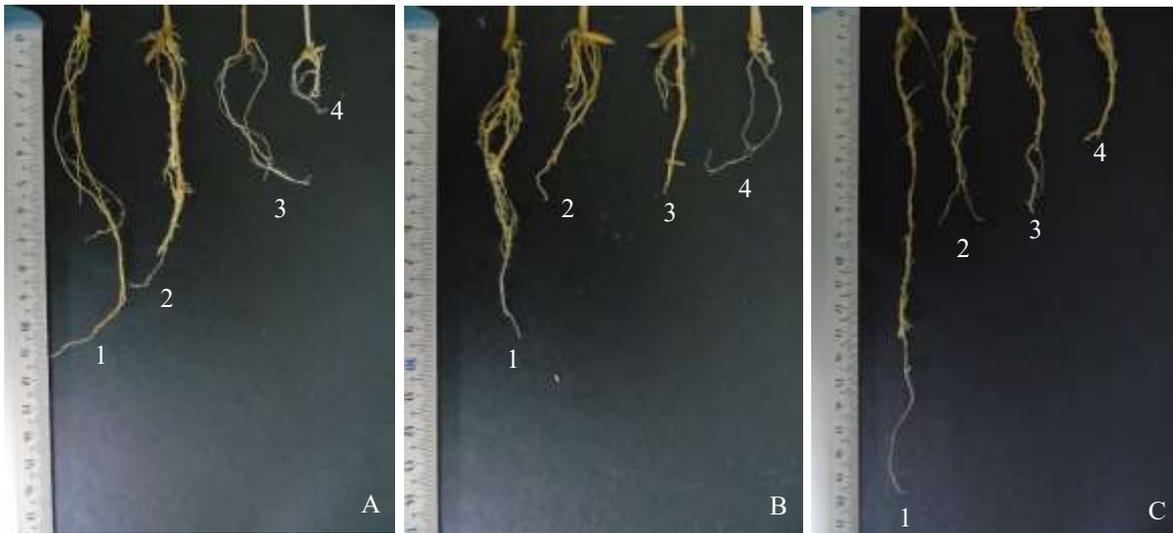


Figura 6. Raízes de plantas de arroz aos 28 dias após semeadura. Tratamento controle (A), inoculada com *Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 (B), *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211 (C), submetidas a lâminas de água no solo de 100 % da capacidade de campo (1), 70% da capacidade de campo (2), 50% da capacidade de campo (3), e 30% da capacidade de campo (4).

Capítulo 3

3. Mitigação do déficit hídrico por rizobactérias (*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211) em plantas de arroz de terras altas²

Marcela Cristiane Ferreira Rêgo¹, Gledson Luiz Salgado de Castro¹, Sueyla Malcher Bezerra¹,
Telma Fatima Vieira Batista¹, Marta Cristina Corsi de Filippi², Gisele Barata da Silva^{1*}.

¹ Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, Campus Belém, Pará, Brazil.

² Phytopathology Laboratory, Brazilian Enterprise for Agricultural Research - Rice and Beans, Goiânia, Goiás, Brazil, CEP 75375-000.

* Corresponding author: Gisele Barata da Silva. E-mail: gisele.barata@ufra.edu.br (55-91-3210-5191).

² Este capítulo segue as normas de apresentação do Checklist da Agricultural Water Management

Resumo

A elevada demanda por grão de arroz e os problemas causados pelo déficit hídrico acarretados pelas alterações climáticas, levou a necessidade de estudos de recursos que auxiliem na mitigação dos danos causados pelo estresse. O objetivo deste estudo foi identificar as modificações anatômicas e fisiológicas em planta de arroz de terras altas inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 que indiquem o efeito mitigador dos danos causados pelo déficit hídrico. Foram utilizadas sementes do cultivar BRS Primavera, inoculadas com BRM-32111, BRM-32113 e controle, em vaso, o experimento foi em DIC, com seis tratamentos e sete repetições, em casa de vegetação, submetidos a 100% e 50% da capacidade de campo, e mantido até aos 28 dias. Foi avaliado crescimento, fisiologia e anatomia. No teste de germinação foram semeadas 100 sementes por tratamento, com quatro repetição, as sementes foram inoculadas com BRM-32111, BRM-32113 e controle, o solo foi umedecido com água e solução com PEG-6000 PA, e avaliado o índice de velocidade de germinação (IVG) por cinco dias. Os tratamentos foram comparados dentro da mesma lâmina pelo teste de média. As sementes com BRM-32111 apresentaram maior a germinação, e as plantas tiveram menor redução no potencial hídrica antemanhã (Ψ_{am}) e com BRM 32113 diferiram do controle no IVG. As plantas inoculadas com BRM 32111 e BRM-32113 tiveram menor redução no diâmetro radicular, número de poros de protoxilema, espessura do córtex, número de poro estomático e aumento na densidade de estômatos, e aumento em taxa de assimilação de carbono (A), relação carbono interno na folha e carbono atmosférico (C_i / C_a), eficiência do uso da água (EUA) e eficiência de carboxilação da rubisco (A / C_i), maior acumulo de clorofila a e clorofila b, prolina e redução na concentração de aldeído malônico (MDA). Estes resultados evidenciam o efeito mitigador das PGPR aos danos causados pelo déficit hídrico

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., *Burkholderia pyrrocinia*, *Pseudomonas fluorescens*.

Introdução

O arroz (*Oryza sativa* L.), com um comportamento semiaquático, o cultivo do arroz consome cerca de 30% do total água doce disponível para as culturas agrícolas em todo o mundo, o que equivale a um consumo duas a três vezes superior a outros cereais, como trigo e milho (Peng et al., 2006). Devido à crescente preocupação com a escassez de água, foram desenvolvidas várias tecnologias de conservação da água, tais como o cultivo de arroz de terras altas, cujas cultivares tem menor produtividade, e as perdas são maiores quando ocorrem o aumento da frequência de veranicos causados por fenômenos meteorológicos como o El Niño (Bindraban et al., 2006; Costa, 2012).

O estresse hídrico nas plantas inibe a expansão das células do córtex, periciclo, câmbio e raio do parênquima, redução do número de células em todos os tecidos (Joyce et al. 1983), redução do conteúdo de clorofila a e clorofila b, carotenoides (Kano-Nakata et al., 2011), taxa de assimilação líquida de carbono (A), aumenta a taxa de transpiração (E) e condutância estomática ao vapor de água (g_s) (Machado et al. 1996). No entanto, as plantas possuem mecanismos para minimizar os efeitos danosos do déficit hídrico, deste modo, as plantas nesta situação fecham os estômatos, pois a maior parte da água é perdida através dos estômatos, que é provavelmente, a forma mais eficiente para melhorar a tolerância à seca (Jong Kukna, 2005).

O estresse hídrico no estágio vegetativo induz a redução da fotossíntese devido a redução na taxa de expansão da folha, da atividade da rubisco, produção de biomassa e volume celular (Bota, et al., 2004). O acúmulo de prolina, que atua no controle osmótico em plantas sobre déficit hídrico, contribui para a estabilização das estruturas subcelulares (por exemplo membranas e proteínas), eliminação de radicais livres e manutenção de $NADP^+$ / $NADPH$ compatíveis com o metabolismo (Hare e Cress, 1997; Ali et al., 1999; Ozturk e Demir, 2002; Hsu et Al., 2003; Kavi Kishore et al., 2005). O que permite a mitigação dos danos causados pelo déficit hídrico.

As rizobactérias são organismos que podem atuar sobre o crescimento das plantas, que está relacionada com a síntese de substâncias promotoras do crescimento (citocininas, giberelinas e auxinas), a influência na nutrição mineral de plantas (solubilizadores de fosfato e fixação biológica de nitrogênio) e na proteção de plantas contra fitopatógenos (Dardanellia, et al. 2012). Os bioagentes (*Burkholderia pyrrocinia* BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211), selecionados previamente como promotoras de crescimento e indutoras de resistência a brusone (Filippi, et al., 2011), induziram incremento radicular em biomassa, comprimento, número de elementos de vasos de metaxilema, polos de protoxilema, e diâmetro do cilindro vascular, em plantas sob condições ideais de crescimento (Rêgo et al., 2014). Deste modo, a nossa hipótese é que as rizobactérias (*Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113) mitigam os danos nas plantas de arroz de terras altas ao déficit hídrico. O objetivo foi identificar as modificações anatômicas e fisiológicas em planta de arroz de terras altas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 que indiquem o efeito mitigador dos danos causados pelo déficit hídrico.

Material e métodos

Microorganismos, material vegetal, e condição de crescimento

As rizobactérias (*Pseudomonas fluorescens*-BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113), pertencem a coleção de microorganismos do Laboratório de Proteção de Plantas Universidade Federal Rural da Amazônia (LPP / UFRA) e foram previamente selecionadas como promotoras de crescimento e indutoras de resistência (Filippi et al., 2011; Rêgo et al., 2014).

A semeadura foi feita com sementes da cultivar BRS Primavera, previamente tratadas com *P. fluorescens* BRM-32111, *B. pyrrocinia*-BRM-32113, e controle (não inoculado). Foram

semeadas dez sementes por vaso e desbaste ao 11º dia após a germinação, para cinco plantas por vaso, o experimento foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e sete repetições (vaso com cinco plantas), as sementes foram semeadas em vasos contendo 700 g de solo (Latosolo amarelo distrófico) de Paragominas – Pa, e adubados com: 1,162 g de N-P-K (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), 0,350 g de Ureia, e 0,700 g de FTE (micronutrientes), por vaso, conduzido em casa de vegetação e submetidos a duas lâminas de água no solo: 100 e 50 % da capacidade de campo, iniciando a aplicação do deficit hídrico no 11º dia após a germinação e mantidas até aos 28º dia após germinação (Silveira et al., 2015; Campos et al., 2004; Mello et al., 2002; Counce et al., 2000). O experimento foi repetido cinco vezes, para confirmação do padrão de comportamento das plantas.

Germinação

Foram semeadas 25 sementes por repetição totalizando 100 sementes / tratamento, em caixa plástica (11 x 11 x 3.5 cm), contendo 100 g de solo, as sementes foram previamente inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111, *B. pyrrocinia*-BRM-32113 e controle, conforme metodologia descritas por Filippi et al. (2011). O solo foi umedecido com 50 mL de água destilada estéril e solução com 33% de polietilenoglicol (PEG-6000 PA) que equivale ao déficit hídrico de -1.2MPa (Michel & Kaufmann, 1972). O índice de velocidade de germinação (IVG) foi avaliado por cinco dias após semeio. O ensaio foi repetido duas vezes, por ter sido realizado em ambiente com controle de temperatura e luminosidade.

Crescimento da planta e potencial hídrico

Ao completarem 28 dias após a semeadura, avaliou-se trocas gasosas, comprimento, biomassa e o potencial hídrico antemanhã foliar (Ψ_{am}), e coletado o material para análises bioquímicas.

Anatomia de raízes e estômatos

Foram coletadas raízes de arroz e preparadas para estudo morfo-anatômicos conforme (Rêgo et al., 2014), e feita as avaliações de diâmetro radicular (μm) e do cilindro vascular (μm), espessura do córtex (μm), e número de elementos de vasos de metaxilema e de polos de protoxilema. A dimensão dos estômatos foi obtida através da área equivalente do elipsóide que representa a área dos poros estomáticos (APE), pela seguinte fórmula: $(\pi \times \text{Comprimento} \times \text{largura}) / 4$, de acordo com Minnocci et al. (1995) e Bartolini et al. (1997). A densidade estomática (estômato. mm^{-2}) ($n = 20$ repetições) da face abaxial, de acordo com a metodologia de Sack et al. (2003). Em lâmina foliar com 0,5 x 0,5 cm com auxílio de ocular milimetrada, Microscópio Motic (BA-400).

Trocas gasosas

As plantas de arroz foram avaliadas quanto a trocas gasosas, com um sistema portátil de fotossíntese (LI-6400XT; LI-COR, Lincoln, NE). A taxa líquida de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E), a relação da concentração intercelular de CO_2 interno e atmosférico (C_i / C_a), estimada a eficiência do uso da água (EUA) pela relação (A / E), e eficiência de carboxilação da rubisco (A / C_i). Foram avaliados a uma concentração de CO_2 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, 50% de umidade relativa, 28 °C de temperatura, 300 $\mu\text{mol s}^{-1}$ o fluxo de ar e uma densidade de fluxo de fótons de 1200 $\mu\text{mol (m}^2\text{)}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Pigmentos fotossintetizantes e osmorreguladores

Quantificação de pigmentos

Da terceira folha foram obtidos 15 mg de tecido foliar e maceradas em 240 μL em EtOH 98 % e incubadas a 80 °C por 20 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 4 °C em 14.000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e o pellet submetido a

mais duas extrações, em EtOH de 80% e 50%, respectivamente. Os sobrenadantes foram coletados e homogeneizados. As etapas de extração dos pigmentos foram realizadas sob banho de gelo e na ausência de luz, conforme metodologia definida por Porra (1989). Posteriormente uma alíquota de 20 µL do extrato vegetal etílico de cada amostra foi adicionado em meio de reação com 120 µL de EtOH 98% e 40 µL do mix etílico. Foram submetidas a determinação da absorbância, estimada em comprimento de onda (λ) 645 nm e 665 nm. Com a absorbância obtidas, foi estimada as concentrações de clorofila a e b, a / b e total através das fórmulas 1 e 2, posteriormente normalizado pela massa fresca de cada amostra.

$$\text{(Fórmula - 1) Clorofila a} = 5.48 * \text{Abs665} - 2.16 * \text{Abs645} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{poço}} \right)$$

$$\text{(Fórmula - 2) Clorofila b} = 9.67 * \text{Abs645} - 3.04 * \text{Abs665} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{poço}} \right)$$

Prolina

A extração foi realizada com 20 mg de matéria seca fina e homogênea, e adicionado em microtubos de 2000 µL, em seguida foi adicionado 2000 µL de H₂O destilada estéril, homogeneizada e colocado em banho-maria por 30 minutos a 100°C. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram coletados e obtido o extrato, para a determinação de prolina em microtubo, foi adicionado 400 µL de mix de reação (C₂H₄O₂ puro, H₃PO₄ 6M e C₉H₆O₄ pura), 400 µL de ácido acético a 100% e 400 µL de extrato, em seguida incubado a 100°C por 60 minutos. A reação foi paralisada com choque térmico, e adicionado 800 µL de tolueno a 100 % com agitação por 30 segundo. As amostras foram mantidas por 20 minutos a 28 °C, e leitura em espectrofotômetro a 365 nm, os valores de Prolina foram expressos em (µM de Prolina / 400 µL de extrato) calculado como definido por Bates et al (1973).

Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA)

Foram macerados 80 mg de massa foliar fresca (MF) em nitrogênio líquido seguido de homogeneização em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) (0.1% p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e utilizado nas determinações das concentrações de MDA. Foram adicionados 500µL do sobrenadante em um tubo de microcentrífuga contendo 1.5mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.5%) em TCA 20%. As amostras foram incubadas por 20 minutos a 90°C em bloco-seco. A reação foi parada em banho de gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 13.000g por 4 minutos. A absorbância da mistura da reação foi determinada a 532nm em espectrofotômetro. Utilizou-se para os cálculos, o coeficiente de absorvidade molar de 155 mM cm⁻¹ e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ de MF (Cakmak e Host, 1991).

Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos de tolerância ao estresse abiótico e em casa de vegetação foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos dentro da mesma lâmina de água no solo foram comparadas pelo teste de média Duncan ($p < 0.05$) em programa SPSS 21.0 e erro padrão ($p < 0.05$). Os dados obtidos do teste de concentração de MDA foram submetidos ao teste t ($p < 0.05$) e erro padrão ($p < 0.05$).

Resultados

Germinação, Crescimento de plantas e potencial hídrico

A germinação de sementes de arroz somente foi afetada negativamente quando submetidas ao déficit hídrico (com PEG). Entretanto, em relação ao controle, sementes inoculadas com BRM 32111 apresentaram maior germinação das sementes em 61%, Ψ_{am} em 32%, comprimento total em 26% e em 40% o aumento em biomassa total comparado a plantas

controle (Fig. 1). Enquanto que, plantas com BRM 32113 diferiram do controle apenas para as variáveis comprimento de plantas e biomassa total, em 21% e 64%, respectivamente. Plantas inoculadas com as PGPR, submetidas ou não em condições de déficit, tiveram aumento na velocidade de germinação.

Anatomia de estômatos e raízes

A *P. fluorescens* BRM-32111 induziu modificações em todas as variáveis anatômicas das plantas sob déficit hídrico quando comparadas ao controle. As raízes apresentaram maior diâmetro radicular de 27%, 20% no cilindro vascular, 50% nos elementos de vaso do xilema, 25% nos poros de protoxilema, e 71% na espessura do córtex. As folhas obtiveram aumento da densidade de estômato de 56%, redução no comprimento do poro estomático 22% e na área do poro estomática de 20% (Tabela 1; Fig. 2). Plantas com BRM 32113 induziram aumento de 35% o diâmetro radicular, 33% nos poros de protoxilema, 100% espessura do córtex, 52% na densidade de estômatos e 10% na redução no comprimento do poro estomático, quando comparadas ao controle (Tabela 1; Fig. 2).

Trocas gasosas

Todas as plantas tiveram alterações nas trocas gasosas quando submetidas ao déficit hídrico. Em relação a planta controle, plantas com BRM 32111 tiveram incremento em 128% na taxa de assimilação líquida de carbono, 17% no C_i / C_a , 26% na taxa de transpiração (E), 75% na eficiência do uso da água e 17% de eficiência de carboxilação da rubisco (A / C_i). Plantas com BRM 32113, aumentou taxa de assimilação líquida de carbono em 127%, (C_i / C_a) em 18%, taxa de transpiração (E) em 33%, condutância estomática ao vapor de água (g_s) em 39% eficiência do uso da água em 66%, e 18% eficiência de carboxilação da rubisco (A/C_i) (Fig. 3).

Pigmentos fotossintetizantes e osmorreguladores

Em relação ao controle, as plantas inoculadas com BRM 32111 tiveram aumento de clorofila a de 6%, clorofila b 14%, prolina 47% e redução em 47% de MDA. Quando inoculadas com BRM 32113, as plantas tiveram aumento na clorofila a de 7%, clorofila b 23%, relação clorofila a/b 15%, clorofila total 10% e em 36% em MDA (Fig. 4).

Discussão

Germinação, Crescimento de plantas e potencial hídrico

O presente estudo demonstrou a ação positiva de PGPR BRM 32111 como regulador e indutor de tolerância a seca, atuando na promoção do crescimento, bem como o alívio do estresse ao déficit hídrico nas plantas de arroz. A germinação é um dos estágios mais críticos do ciclo de desenvolvimento de culturas que é conhecido por ser afetado pelo estresse hídrico (Sleimi et al., 2013). Nas sementes com PEG inoculadas com BRM-32111 ocorreu maior germinação e IVG (Fig. B; Fig. F), e com déficit hídrico induziu a menor redução no potencial hídrico antemanhã (Ψ_{am}) (Fig. 1F). Estudos demonstraram que as rizobactérias mediam a biossíntese de reguladores de crescimento de plantas incluindo auxinas, giberelinas e citocinina. As auxinas atuam na divisão celular e diferenciação de células e tecidos de plantas, além de estimular a germinação, aumento da taxa de desenvolvimento radicular de raízes laterais e raízes adventícias (Gamalero e Glick, 2011). A giberelina atua na síntese de enzimas hidrolíticas durante a germinação que degradam as reservas cotiledonares e que auxiliam no crescimento de embrião e plântula (Taiz e Zeiger, 2010). Em condições de déficit hídrico os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* são amplamente relatados por sua capacidade de aumentar a taxa de germinação e o IVG em gramíneas e cereais (Lucy et al., 2004; Kaymak, 2011; Sivasakthivelan e Saranraj, 2013), assim como no presente estudo, as PGPR (BRM 32111 e BRM 32113) podem ter acelerado a modulação da síntese de reguladores

de crescimento e auxiliam desde o início do processo germinativo nas sementes de arroz, mesmo em condição de déficit hídrico.

A privação de água nas plantas está intimamente relacionada com a redução no desempenho do crescimento vegetativo (Tardieu et al., 2011; Vile et al., 2012). O que não ocorreu em plantas inoculadas com as PGPR (BRM-32111 e BRM-32113) que tiveram aumento no comprimento (Fig. 1D), e acúmulo de biomassa (Fig. 1F), o que pode ser atribuído tanto a capacidade dessas rizobactérias produzirem ácido indol-3-acético (AIA) (Mohite 2013) quanto por mediar a síntese de AIA, como registrado para esses gêneros de bactérias (Patten e Glick, 1996; Vessey, 2003). Em plantas de *Phaseolus vulgaris* L. submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com *P. fluorescens* ocorreu maior acúmulo em biomassa (Ghorbanpour et al., 2013) e aumento no crescimento radicular em plantas de trigo, canola e girasol (Abbass e Okon, 1993, Vikram et al., 2007), assim como ocorreu em nossas plantas sob déficit hídrico, provavelmente as PGPR (BRM 32111 e BRM 32113) podem estar atuando na modulação hormonal, o que auxiliaria na mitigação dos danos ao crescimento da planta. A menor redução no potencial hídrico antemanhã (Ψ_{am}) em plantas com PGPR estimulou a manutenção do crescimento das raízes e folhas das plantas de arroz, como foi verificado por (Seyed et al, 2012). Deste modo, alterando a plasticidade fenotípica para manter ou aumentar o potencial hídrico.

Anatomia de estômatos e raízes

O estresse pela seca é percebido e respondido principalmente pelas raízes e a expansão no sistema radicular é uma ferramenta de gerenciamento de estresse auxiliando na manutenção do crescimento, a absorção de nutrientes do solo e aumento na condutividade hidráulica da raiz, através do aumento de comprimento e número de pêlos radiculares (Lopes et al., 2011; Miyahara et al., 2011), anatomicamente a seca induz a redução do diâmetro radicular e cilindro vascular (Uga et al., 2008). No entanto nas raízes das plantas inoculadas com BRM-32111 e

BRM-32113 o gerenciamento de resposta ao estresse ocorreu através do aumento do diâmetro radicular, número de poro de protóxilema e espessura do córtex.

Houve aumento no cilindro vascular em plantas com BRM-32111 (Tabela 1; Fig 2), o que pode ser devido ao estímulo das barreiras pré-existentes nas plantas como a presença de esclerênquima que é mais suberizada do que a exoderme e que consiste em células firmemente embaladas de menor diâmetro do que outras células da raiz (Comer et al., 1998). A expressão de aquaporina por raízes de arroz estressadas pela seca, tem sido diretamente relacionada a condutividade hidráulica na cultura sobre seca (Sakurai et al., 2005; Lian et al., 2006).

Todas as alterações podem ter promovido a manutenção do potencial hídrico e manutenção de concentrações adequadas de solutos no citosol e matriz celular que resulta no desenvolvimento celular e na manutenção do crescimento, através das alterações anatômicas radiculares que auxiliam na absorção e transporte de nutriente e água, quando essas adaptações não ocorrem estes efeitos são contrários (Seyed et al., 2012), e culminam na alteração da elasticidade da parede celular da planta com a perturbação da homeostase e distribuição iônica na célula, com o comprometimento da síntese de novas proteínas e mRNAs associada à resposta à seca (Seyed et al., 2012). Nas etapas seguintes ocorre o acúmulo de ácido abscísico (ABA) e osmólitos como a prolina e a perda de vigor e murcha, que pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e formação de compostos de remoção de radicais (ascorbato e glutatona) (Seyed et al., 2012).

As plantas mais adaptadas ao déficit hídrico possuem um número maior de estômatos por unidade de área (Merkulov et al. 1997, Gratani 2013), essas alterações anatômicas ocorreram em plantas de arroz inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113 (Tabela 1; Fig 2). Os estômatos da folha são considerados porta que controla a troca de CO₂ que atua como substrato fotossintético no espaço intercelular (Boyer et al., 1997; Buckley, 2005), e em condições de estresse hídrico induz na planta ao fechamento estomático para reduzir a perda de

água através da taxa de transpiração (E) o que estimula a redução na absorção de CO_2 que pode culminar na redução da fotossíntese (Jong Kuk Na, 2005; Terashima et al, 2001). Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram inoculadas com *Paenibacillus polymyxa* e *Rhizobium tropici* e submetidas a deficit hídrico resultaram em mudanças na regulação das trocas gasosas e foi atribuído a redução do conteúdo e biossíntese de ABA que permitiram a abertura estomática e aumento na taxa de assimilação líquida de CO_2 (A).

Em estudos com a PGPR com *Pseudomonas syringae* mostraram que são capazes de produzir uma substância chamada coronatina, que é responsável pela inibição da sinalização de ABA (Figueiredo et al., 2008, Melotto et al., 2006). Apesar da redução do poro estomático, o aumento na densidade de estômatos nas plantas inoculadas com BRM-32111, pode ter influenciado diretamente na transpiração afetando o turgor das células e manutenção do potencial, o que pode ter influenciado no aumento da taxa fotossintética e eficiência do uso da água (EUA).

Trocas gasosas

A sinalização entre raiz-folha causada pela seca, é provocada pela seca do solo através do fluxo de transpiração, resultando no fechamento estomático (Anjum et al., 2011), a concentrações mais elevadas de ABA nas folhas de plantas inoculadas pode explicar a menor taxa de transpiração resultante do fechamento estomático. Algumas bactérias têm a capacidade de modular as trocas gasosas e o metabolismo ABA (Zhang et al., 2008), é provável que o aumento na densidade de estômatos em plantas com BRM-32111 e BRM-32113 tenha induzido o aumento na taxa de assimilação líquida de carbono (A) em relação a plantas controle (Tabela 1; Fig. 3A), esse aumento na A também ocorreu em plantas inoculadas com *Bacillus subtilis* e foi associado a diminuição das concentrações de ABA em plantas de *A. thaliana*, e em plantas de videiras inoculadas com *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., e *Bacillus* sp.

(Zhang et al. 2008; Rolli et al., 2014). Esse aumento em A , está diretamente relacionado com o aumento na razão C_i / C_a (Fig. 3B), plantas nestas condições apresentam limitações estomáticas que influenciaram na fotossíntese, pela diminuição da disponibilidade de CO_2 no mesófilo e sítios de carboxilação (Rolli et al., 2014), no entanto as BRM-32111 e BRM-32113 auxiliaram a planta na resposta ao déficit hídrico mitigando os danos no aparato fotossintético e mantendo seu potencial como promotor de crescimento, melhorando a disponibilidade de $[CO_2]$, o que influenciou na transpiração e condutância estomática.

Os microorganismos benéficos podem ter a capacidade de diminuir a resistência do estômato influenciando nas trocas gasosas através do aumento do fluxo de transpiração, quando a resistência estomática baixa e induz o aumento de g_s e E (Subramanian et al., 1995), assim como ocorreu nas plantas de arroz inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113 (Fig.3C; Fig.3D), em plantas inoculadas com micorrizas arbusculares (AM) a condutância estomática foi significativamente maior (25%), e em plantas de milho tratadas com uma mistura de microorganismos houve aumento a taxa de transpiração (E) (Liu et al., 2005, Zoppellari et al., 2014). Estes estudos identificaram que as plantas com microorganismos benéficos são capazes de abrir os estômatos por mais tempo, além de induzir as modificações anatômicas de redução de tamanho e aumento de número de estômatos por unidade de área, o que é facilitado devido a plasticidade fenotípica nas plantas como resposta de adaptação para aumentar a tolerância ao déficit hídrico (Liu et al., 2005; Wang et al., 2012),

A regulação da eficiência de carboxilação da rubisco (A / C_i) está fortemente ligada à irradiância, ao nitrogênio e a eficiência de uso da água (Ainsworth & Long 2005; Leakey et al. 2009), em plantas de arroz com BRM-32111 e BRM-32113 ocorreu aumento em A / C_i e WUE (Fig. 3F). Esse comportamento pode ser devido a manutenção da atividade rubisco que catalisa a carboxilação de ribulose-1,5-Bisfosfato (RuBP), permitindo a assimilação líquida de CO_2 , as PGPR podem influenciar o EUA nas plantas através do incremento radicular em plantas em

condições de seca, assim em plantas inoculadas com *Phyllobacterium brassicacearum* ocorreu o maior acúmulo de biomassa e modificações da arquitetura da raiz, deste modo a presença de bactérias pode ter aumentado a capacidade de absorção de água, aumento do comprimento da raiz lateral e a densidade e comprimento dos pêlos radiculares (Mantelin et al., 2006; Kechid et al., 2013; Galland et al., 2012). Em plantas com BRM-32111 e BRM-32113, provavelmente o aumento de A, influenciou diretamente a A / Ci e resultou em aumento na EUA, estes resultados indicam que a sinalização raiz - folha impulsionado pela seca, é induzido pelo deficit hidrico através do fluxo de transpiração (solo-planta-atmosfera), resultando em alterações nas trocas gasosas que foram influenciados pela interação solo – planta – PGPR, mitigando danos no aparato fotossintético.

Pigmentos fotossintetizantes e osmorreguladores

A diminuição do teor de clorofila sob estresse é considerado um sintoma típico de estresse oxidativo e pode ser o resultado de foto-oxidação de pigmento e degradação da clorofila (Rahman et al., 2002). No entanto as plantas inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113 sob déficit hídrico tiveram aumento no acúmulo de clorofila a e redução das perdas na clorofila b, (Fig. 4A; Fig. 4B), assim como em nosso estudo, plantas de milho (*Zea mays* L) inoculadas com micorrizas tiveram aumento nas concentrações de clorofila a e clorofila b. Isto sugere que o incremento da concentração de pigmentos nas plantas se deve ao bioagente aplicado, o qual atua mitigando os danos sobre os pigmentos fotossintéticos presentes nos cloroplastos (Evelin et al., 2009; Rolli et al., 2012), as PGPRs podem ter induzido o aumento de carotenóides que são pigmentos acessórios que absorvem os fótons e transferem a energia de excitação para centros de reação via clorofila, e protegem a clorofila da foto-oxidação, os carotenóides também servem como antioxidantes contra os radicais livres e danos fotoquímicos (Mishra et al., 2006). A perda de teores de clorofila sob estresse hídrico é considerada uma das principais causas de

diminuição de fotossíntese. Além disso, a redução do teor de clorofila pode ser atribuída à perda das membranas de cloroplasto, através das reações de enzimas solúveis em água localizadas no estroma cloroplasto (ciclo de Calvin) ou na fronteira entre estroma e tilacóides (ATP-ase, redução de NO_2 , e redução de NADP^+) que são afetadas pelo estresse osmótico. Estudos indicam que a maior perda de clorofila em plantas em resposta a déficit hídrico ocorre nas células do mesófilo e menor nas células da bainha feixe (Kaiser et al., 1981; Guerfel et al., 2009), no entanto as PRGP tiveram efeito mitigador aos danos causados pelo déficit hídrico na manutenção do acúmulo dos pigmentos, uma vez que, o principal componente do cloroplasto é a clorofila, sendo este um dos efeitos que podem resultar na maior taxa de assimilação líquida de carbono.

O maior acúmulo de prolina nas plantas ocorre como resposta de tolerância ao déficit hídrico induzida pelas PGPR (Serraj and Sinclair, 2002), de acordo como ocorreu com plantas de arroz inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113 (Fig.4E), como mostrado por estudos com diferentes estresses (déficit hídrico, salinidade, baixa temperatura, exposição a metais pesado, radiações UV) que podem estimular o acúmulo de prolina na planta, sendo um composto orgânico, altamente solúvel, de baixo peso molecular, e geralmente não tóxico em altas concentrações celulares e atuam na proteção das plantas (no ajuste osmótico celular e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), proteção da integridade da membrana, das enzimas e estabilização das proteínas (Yancey 1994; Hare et al., 1998; Munns 2005, Rhodes et al., 2002; Naidu et al., 1991; Bassi e Sharma 1993; Sharma e Dietz 2006). Nas estruturas subcelulares (por exemplo, membranas e proteínas), ocorre a eliminação de radicais livres e buffer de potencial redox celular sob condições de estresse e pode atuar também aliviando a acidose citoplasmática e mantendo $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ compatíveis com o metabolismo. Sua acumulação normalmente ocorre no citoplasma onde ele funciona como chaperonas

moleculares estabilizando a estrutura das proteínas e seus tampões de acumulação pH citosólico e mantém o estado redox celular (Ashraf e Foolad 2007; Hare e Cress 1997).

O aumento no acúmulo de MDA é considerado indicador de dano oxidativo nas plantas em condições de estresse (Yang e Miao, 2010), em plantas inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113 houve menor acúmulo de MDA (Fig. 4F) resultando na proteção das membranas, uma vez que as altas concentração de MDA produzidos durante a peroxidação de lipídica forte indicador do dano celular causado a membrana que atua na diminuição da estabilidade da membrana que reflete na extensão da peroxidação lipídica (Liang et al., 2003). Além disso, a peroxidação lipídica é um indicador da reação de radicais livres em tecidos, onde a captação de carga de oxigênio nos tecidos gera espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente H_2O_2 que é produzido a taxas elevadas pela oxidase do glicolato nos peroxissomos na fotorrespiração (Yang e Miao, 2010; Moller et al. Al., 2007). Assim as PGPR nas plantas induzem respostas que auxiliam na mitigação dos danos de ROS e peroxidação lipídica das membranas, assim atuando na manutenção do crescimento mesmo em condições de estresse.

Conclusão

Em planta de arroz de terras altas inoculadas com *Pseudomonas fluorescens*-BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 ocorreu o aumento na densidade estomática de até 56 % e diâmetro radicular em até 35 %. Com destaque para BRM-32111 que induziu aumento na germinação de 61% em sementes com polietilenoglicol, nas plantas o potencial hídrico antemanhã (Ψ_{am}) foi 33% maior que em plantas não inoculadas, com o maior acúmulo de prolina (47%) e menor de aldeído malônico (47%). Estes resultados indicam que as plantas têm maior tolerância a seca quando inoculadas com as PGPR.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Pesquisas da Amazônia (Fapesp) e a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo financiamento da pesquisa, e a Agência Federal Brasileira de Apoio e Avaliação da Educação Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudos de doutorado.

Referência

- Abbass, Z. and Okon, Y. (1993). Plant growth promotion by in the rhizosphere. *Azotobacter paspali*. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 1075-1083
- Ainsworth E.A. & Long S.P. (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses
- Ainsworth E.A. & Long S.P. (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses
- Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M., 1999. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. *Biol. Plant.* 42, 89–95.
- Allen DJ, Ort DR (2001). Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. *Trends Plant Sci.*, 6: 36-42.
- Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 2007; 59:206-16.
- Augé R.M. (2001): Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11: 3–42.
- Bassi R, Sharma SS. Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. *Ann Bot (Lond)* 1993; 72:151-4;1993.1093.
- Bindraban PS, Hengsdijk H, Cao W, Shi Q, Thiyagarajan TM, Van der Krogt W, Wardana IP (2006) Transforming inundated rice cultivation. *Water Resources Dev* 22: 87–100

Bota, J.; Medrano, H.; Flexas, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol.* v.162, p.671-681. 2004.

Boyer JS, Wong SC, Farquhar CD. 1997. CO₂, and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology* 114, 185–191.

Buckley TN. 2005. The control of stomata by water balance. *New Phytologist* 168, 275–292.

Casati, E.; Previtali, F.; Gerbino, R.; Cei, F. P.; Borin, S.; Sorlini, C.; Zocchi, G.; Daffonchio, D. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology* (2014). 1-16: 2014.

Chaves, M.M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J.M., Santos, T., Regalado, A.P., *et al.* (2010) Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Ann Bot* 105: 661–676.

Costa, L. M. From Biological Warfare to the Brighter Side of Rice Research. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists. *Plant and Cell Physiology*.v.53(4), p.603–605, set. 2012.

Eisa, S., Hussin, S., Geissler, N., & Koyro, H. W. (2012). Effect of NaCl salinity on water relations, photosynthesis and chemical composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as a potential cash crop halophyte. *Australian Journal of Crop Science*, 6, 357–368.

Evelin H., Kapoor R., Giri B. (2009): Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany*, 104: 1263–1280.

Figueiredo MVB, Burity HA, Mart_inez CR, Chanway CP. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40: 182–188.

Filippi, M. C. C.; Silva, G. B.; Silva-Lobo, V. L.; Côrtes, M. V. C. B.; Moraes, A. J. G.; Prabhu, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*. v.58, p. 160–166. 2011

Flexas, J., Baron, M., Bota, J., Ducruet, J. M., Galle, A., Galmes, J., Medrano, H. (2012). Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter- 110 (*V. berlandierixV. rupestris*). *Journal of Experimental Botany*, 60, 2361–2377.

Genard, H., Le Saos, J., Hillard, J., Tremolieres, A., Boucaud, J., 1991. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 421–427.

Ghorbanpour, M.; Hatami, M.; Khavazi, K. Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water defiit stress. *Turkish Journal of Biology. Turk J Biol.* (2013) 37: 350-360.

Gratani. L, Catoni, R. and Varone, L., Morphological, anatomical and physiological leaf traits of *Q. ilex*, *P. latifolia*, *P. lentiscus*, and *M. communis* and their response to Mediterranean climate stress factors. *Gratani et al. Botanical Studies* 2013, 54:35

Guerfel M, Baccouri O, Boujnah D, Chaibi W, Zarrouk M (2009). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Sci. Horticult.*, 119: 257-263

Hare PD, Cress WA, Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 1998; 21:535-53.

Hare PD, Cress WA. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 1997; 21:79-102

Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biol. Plant.* 46, 73–78.

Zoppellari F.; Malusà E, Chitarra W, Lovisolò C , Spanna F , Bardi L. Improvement of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) by selected rhizospheric microorganisms.. *Italian Journal of Agrometeorology* - 1/2014.

- Jong KukNa, B.S., 2005. Genetic Approaches to Improve Drought Tolerance of Tomato and Tobacco. Ph.D. Thesis. The Ohio State University, 93.
- Joyce, D.C., Aspinall, D., Edwards, G.R., 1983. Water deficit and the growth and anatomy of the radish fleshy axis. *New Phytol.* 93, 439–446.
- Kaiser WM, Kaiser G, Schöner S, Neimanis S (1981). Photosynthesis under osmotic stress. Differential recovery of photosynthetic activities of stroma enzymes, intact chloroplasts and leaf slices after exposure to high solute concentrations. *Planta*, 153: 430-435.
- Kano-Nakata, M.; Inukai, Y.; Wade, L. J.; Siopongco, J. D. L. C.; Yamauchi, A. Root Development, Water Uptake, and Shoot Dry Matter Production under Water Deficit Conditions in Two CSSLs of Rice: Functional Roles of Root Plasticity. *Plant Prod. Sci.* v. 14(4), p.307–317, Mai. 2011.
- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88, 424–438.
- Kaymak, H. (2011). Potential of PGPR in agricultural innovations. “Plant Growth and Health In Promoting Bacteria” (D.K. Maheshwari, ed.), pp 45-79. Springer Berlin Heidelberg, Germany.
- Kaymak, H. (2011). Potential of PGPR in agricultural innovations. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Volume 18 of the series *Microbiology Monographs* pp 45-79.
- BATES, L.S.; R.P. WALDREN; I.D. TEARE. Rapid determination of free proline for water stress studies. Short communication. *Plant and Soil*, v. 39, p.205-207, 1973.
- Lawlor, D. W., & Tezara, W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: A critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*, 103, 561–579

Leakey A.D.B., Ainsworth E.A., Bernacchi C.J., Rogers A., Long S.P. & Ort D.R. (2009) Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* 60, 2859–2876.

Lian H-L, Yu X, Lane D, Sun W-N, Tang Z-C, Su W-A. 2006. Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment. *Cell Research* 16, 651–660.

LIANG, Y.C.; CHEN, Q.; LIU, Q.; ZHANG, W.H.; DING, R.X. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, v.160, p.1157-1164, 2003. PMID:14610884.

Lopes, M.S., Araus, J.L., van Heerden, P.D., Foyer, C.H., 2011. Enhancing drought tolerance in C (4) crops. *J. Exp. Bot.* 62, 3135e3153.

Lucy, M., Reed, E. and Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria., 1-Antonie Van Leeuwenhoek 86 25

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., *et al.* (2012) A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS ONE* 7: e48479.

Marguerit, E., Brendel, O., Lebon, E., Van Leeuwen, C., and Ollat, N. (2012) Rootstock control of scion transpiration and its acclimation to water deficit are controlled by different genes. *New Phytol* 194: 416–429.

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindrajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol Biochem* 44:25-37

Miyahara, M., Takenaka, C., Tomioka, R., Ohta, T., 2011. Root responses of Siberian larch to different soil water conditions. *Hydrol. Res. Lett.* 5, 93-97.

Mohanty, A., Kathuria, H., Ferjani, A., Sakamoto, A., Mohanty, P., Murata, N., Tyagi, A.K., 2002. Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. *Theor. Appl. Genet.* 106, 51–57.

Mohite, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* , 2013, 13(3), 638-649

Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58: 459-481.

Munns R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol* 2005; 167:645-63. *New Phytologist* 129, 643 –650.

Naidu BP, Paleg LG, Aspinall D, Jennings AC, Jones GP. Amino acid and glycine betaine accumulation in coldstressed wheat seedlings. *Phytochem* 1991; 30:407-9; of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165, 351–371.

Oren, R.; Sperry, J.S.; Katul, G.G.; Pataki, D.E.; Ewers, B.E.; Phillips, N.; Schafer, K.V.R. 1999. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant, Cell and Environment*, 22(12): 1515-1526.

Ozturk, L., Demir, Y., 2002. In vivo and in vitro protective role of proline. *Plant Growth Regul.* 38, 259–264.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975: 384- 394.

Rahman SML, Mackay WA, Quebedaux B, Nawata E, Sakuratani T (2002) Superoxide dismutase, leaf water potential, relative water content, growth and yield of a drought-sensitive tomato cultivars. *Subtrop Plant Sci* 54:16-22

Raines C.A. (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research* 75, 1–10. Parry M.A.J., Andralojc P.J., Khan S., Lea P.J. & Keys A.J. (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89, 833–839.

Rêgo, M.C.F.; Ilkiu-Borges, F., Filippi, M.C.C.; Gonçalves, L.A; Silva, G.B. 2014. Morphoanatomical and Biochemical Changes in the Roots of Rice Plants Induced by Plant Growth-Promoting Microorganisms. *Journal of Botany* 2014: 1-10.

Reinhardt, D. H. & Rost, T. L. “Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots,” *Environmental and Experimental Botany*, vol. 35, no. 4, pp. 563–574, 1995.

Rhodes D, Nadolska-Orczyk A, Rich PJ. Salinity, osmolytes and compatible solutes In: Lauchli A, Luttge U, eds. *Salinity, Environment, Plant, Molecules*. Netherlands: Al-Kluwer Academic Publishers, 2002:181-204.

Rhodes, D., Hanson, A.D., 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 357–384

Rolli, E.; Marasco, R.; Vigani, G.; Ettoumi, B.; Mapelli, F., Deangelis, M. L.; Gandolfi, C.; Zhu, X.C.; Song, F.B.; Liu, S.Q.; Liu, T.D. X. Zhou. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant soil environmental.*, 58, 2012 (4): 186–191.

S.A. Anjum, X. Xie, L. Wang, M.F. Saleem, C. Man, W. Lei. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr J Agric Res*, 6 (9) (2011), pp. 2026–2032

- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M. 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology* 46, 1568–1577.
- Salvucci M.E. (1989) Regulation of Rubisco activity *in vivo*. *Physiologia Plantarum* 77, 164–171.
- Serraj R, Sinclair TR. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ* 2002; 25:333-41.
- Sharma SS, Dietz KJ. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot*
- Sivasakthivelan, P. and Saranraj, P. (2013). Azospirillum and its Formulations: A Review. *International Journal of Microbiological Research* 4, 275-287.
- Subramanian KS, Charest C, Dwyer LM, Hamilton RI. 1995. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at Tasseling. *New Phytologist* 129 , 643 –650.
- Tardieu F, Granier C, Muller B. 2011. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology* 14: 283 -289.
- Tezara W., Mitchell V., Driscoll S.P. & Lawlor D.W. (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany* 53, 1781–1791.
- Uga Y, Okuno K, Yano M. 2008. QTLs underlying natural variation in stele and xylem structures of rice root. *Breeding Science* 58, 7–14.
- Vikram, A., Hamzehzarghani, H., Alagawadi, A. R., Krishnaraj, P. U. and Chandrashekar, B. S. (2007). Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols. *Journal of Plant Sciences* 2, 326-333.

- Vikram, A., Hamzehzarghani, H., Alagawadi, A. R., Krishnaraj, P. U. and Chandrashekar, B. S. (2007). Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols. *Journal of Plant Sciences* 2, 326-333.
- Vile D, Pervent M, Belluau M, Vasseur F, Bresson J, Muller B, Granier C, Simonneau T. 2012. *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant, Cell & Environment* 35: 702-718.
- Yancey PH. Compatible and counteracting solutes In: Strange K ed. *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. Boca Raton, FL: CRC Press,
- Yang F, Miao LF (2010). Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Silva Fennica*, 44: 23-37.
- Yang, W.-J., Rich, P.J., Axtell, J.D., Wood, K.V., Bonham, C.C., Ejeta, G., Mickelbart, M.V., Rhodes, D., 2003. Genotypic variation for glycine betaine in sorghum. *Crop Sci.* 43, 162–169.
- Zhang H, Xie X, Kim MS, Korniyev DA, Holaday S, Pare PW. 2008. Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *Plant Journal* 56: 264–273.

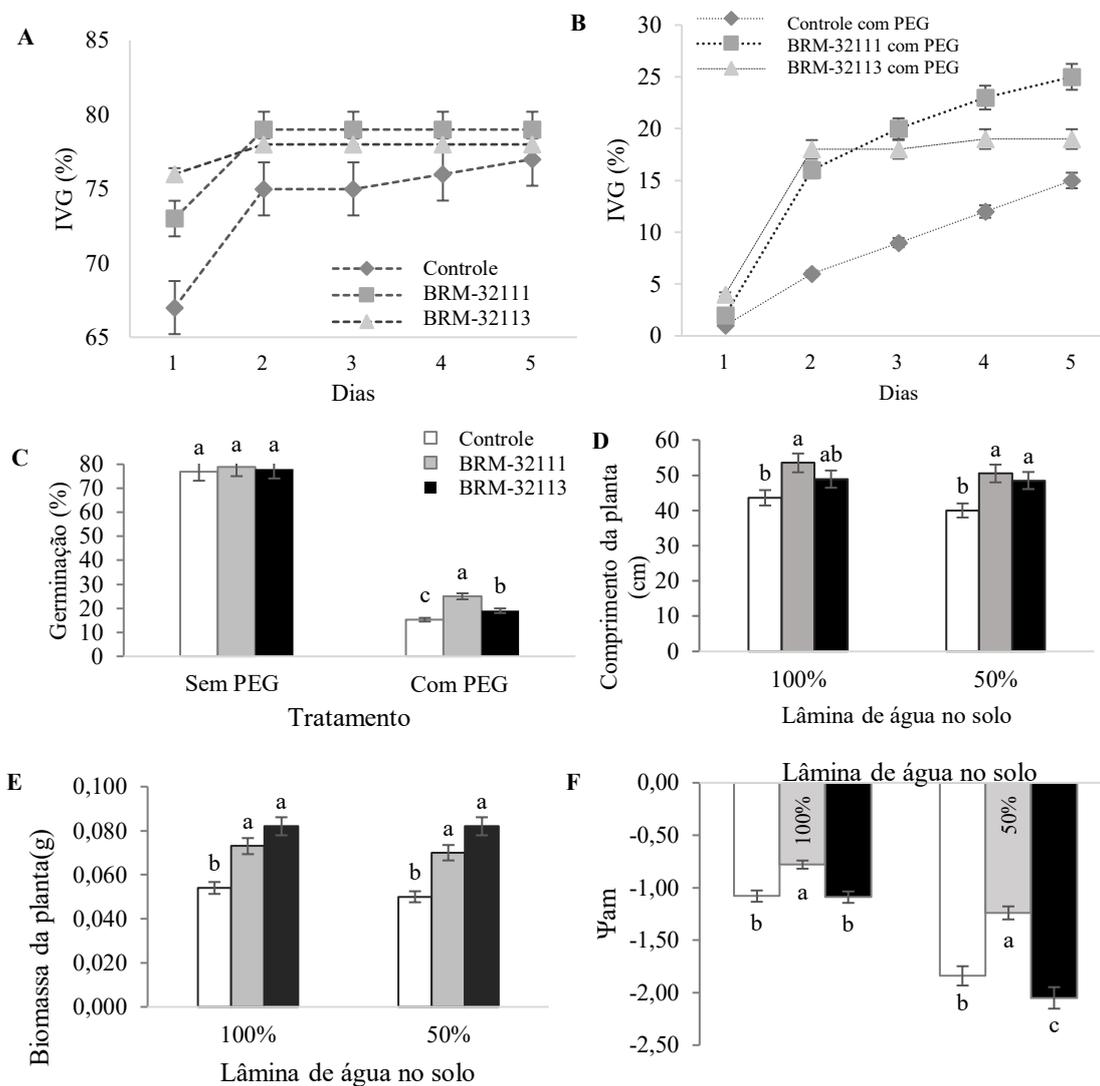


Figura 1. Germinação de sementes com água (A) e Polietilenoglicol - 6000(PA) (-1,2 Mpa) (B), e germinação aos cinco dias após semeadura (C), comprimento da planta (D), biomassa da planta (E) e potencial hídrico antemanhã (Ψ_{am}), aos 28 dias após semeadura e provenientes de sementes inoculadas com BRM-32111, BRM-32113 e controle com água. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$.

Tabela 1. Anatomia de raiz e folha de plantas de arroz, diâmetro da raiz (μm), cilindro vascular (μm), polos de protoxilema (μm), e elementos de vaso de metaxilema, espessura de córtex (μm), densidade estomática, comprimento do estômato (μm), área do poro estomático (μm^2), aos 28 dias após a germinação, em lâminas de água no solo de 100 % da capacidade de campo e 50 % da capacidade de campo, plantas controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111.

	Solo com 100 % da capacidade de campo			Solo com 50 % da capacidade de campo		
	Controle	<i>P. fluorescens</i> BRM-32111	<i>B. pyrrocinia</i> BRM-32113	Controle	<i>P. fluorescens</i> BRM-32111	<i>B. pyrrocinia</i> BRM-32113
Diâmetro da Raiz (μm)	50.3 ¹ ± 4.08 b ²	57.6 ± 3.82 a	60.4 ± 0.80 a	41.7 ± 0.81 b	53 ± 1.23 a	56.4 ± 2.46 a
Diâmetro do cilindro vascular (μm)	20 ± 1.62 ³ b	25 ± 2.68 a	26 ± 1.83 a	16 ± 1.83 b	20 ± 1.47 a	17 ± 1.33 b
Número de elementos de vaso de metaxilema	3 ± 0.471 b	4 ± 0.578 a	4 ± 0.816 a	2 ± 0.500 c	4 ± 0.471 a	3 ± 0.471 b
Número de poros de protoxilema	17 ± 1.63 b	21 ± 1.274 a	21 ± 0.745 a	12 ± 0.500 b	15 ± 0.471 a	1.6 ± 0.816 a
Espessura do córtex (μm)	14 ± 1.75 b	17 ± 1.40 a	18 ± 0.73 a	7 ± 0.40 b	12 ± 1.68 a	14 ± 0.46 a
Densidade de estômatos	15 ± 1.23 b	37 ± 1.65 a	18 ± 1.08 b	46 ± 1.65 b	72 ± 2.02 a	70 ± 1.56 a
Comprimento do poro estomático (μm)	3.4 ± 0.642 a	3.5 ± 0.743 a	3.4 ± 0.641 a	3.1 ± 0.064 a	2.4 ± 0.050 c	2.8 ± 0.053 b
Área do poro estomático (μm^2)	7.8 ± 0.064 b	5 ± 0.650 c	9.2 ± 0.670 a	5 ± 0.731 b	4 ± 0.058 c	5.8 ± 0.065 a

Média¹ na mesma linha seguidas de mesma letra minúscula² não diferem em plantas comparadas na mesma lâmina de água no solo (Duncan, $p < 0,05$), desvio padrão³, n=20.

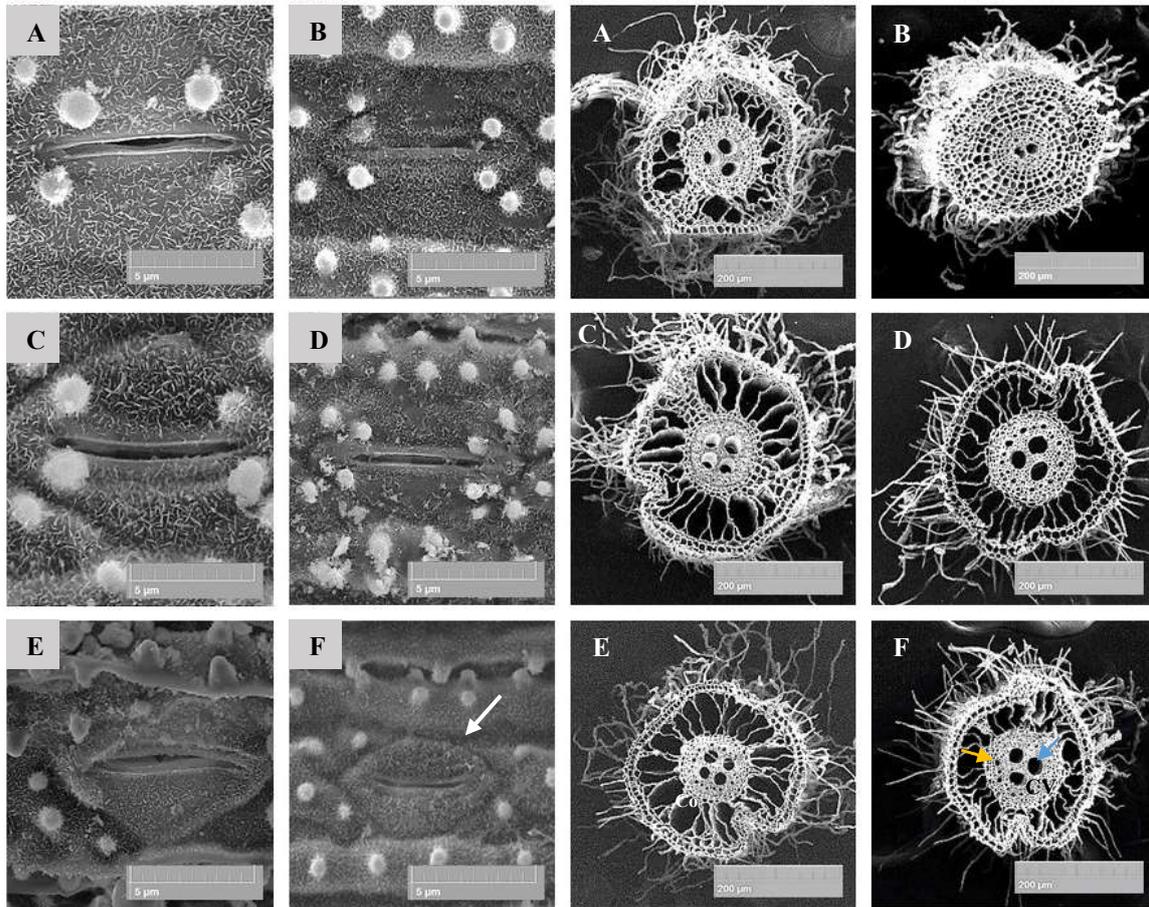


Figura 2. Eletromicrografias de raízes adventícias e estômatos de arroz obtida a partir de sementes tratadas com PGPRs, 28 dias após a germinação. Controle (não inoculado) em 100 % da capacidade de campo (CC) (A) e controle (não inoculado) em 50 % da CC (B); inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 em 100 % da CC (C), e com *P. fluorescens* BRM-32111 em 50 % da CC (D); inoculada com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 em 100 % da CC (E), e com *B. pyrrocinia* BRM-32113 em 50 % da CC (F). Estômatos (seta branca), Cilindro vascular (vc), pólos protoxilema (seta amarela), e elementos de vasos de metaxilema (seta azul), córtex (Co), e diâmetro da raiz.

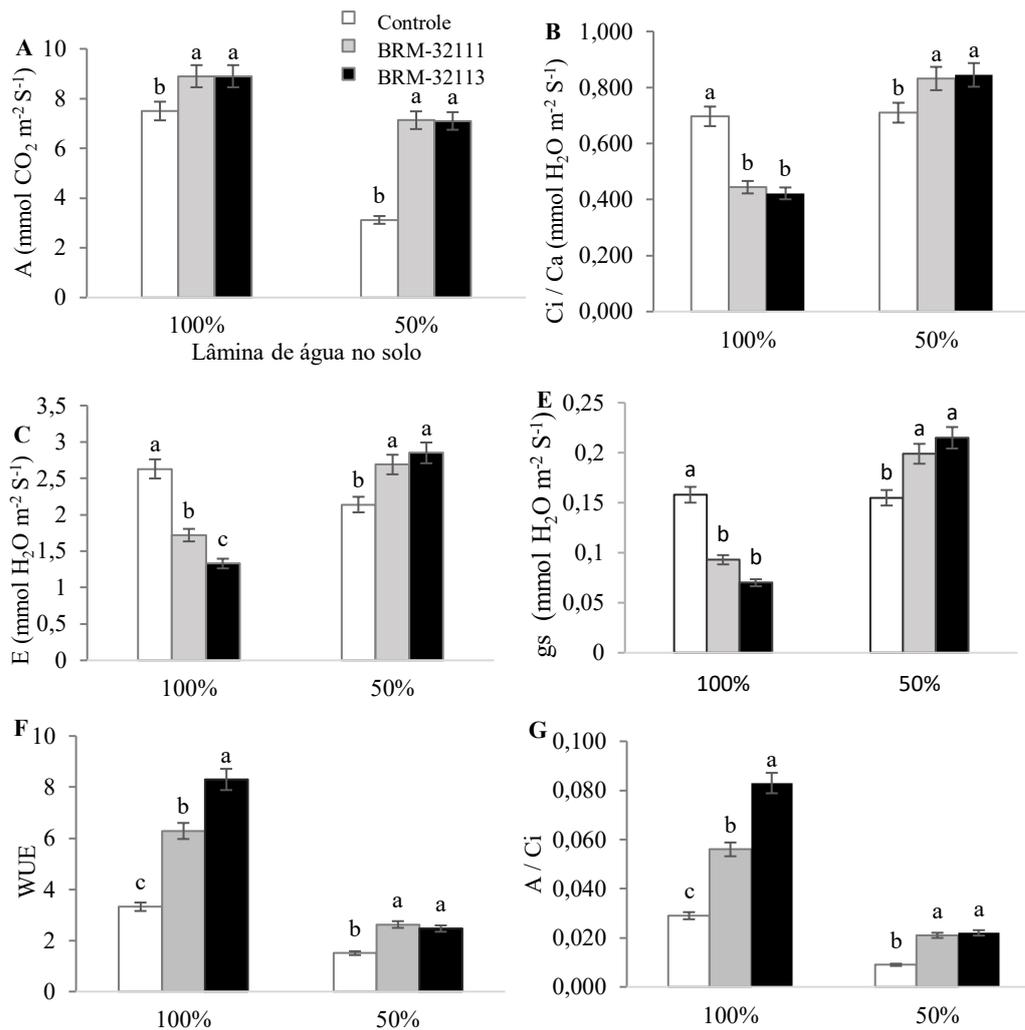


Figure 3. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (B), carbono intercelular (C_i) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (C), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (D), uso eficiente da água (WUE) (A / E) (E), eficiência de carboxilação da rubisco (A / C_i), aos 28 dias após a germinação, em solo com e sem déficit hídrico. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$.

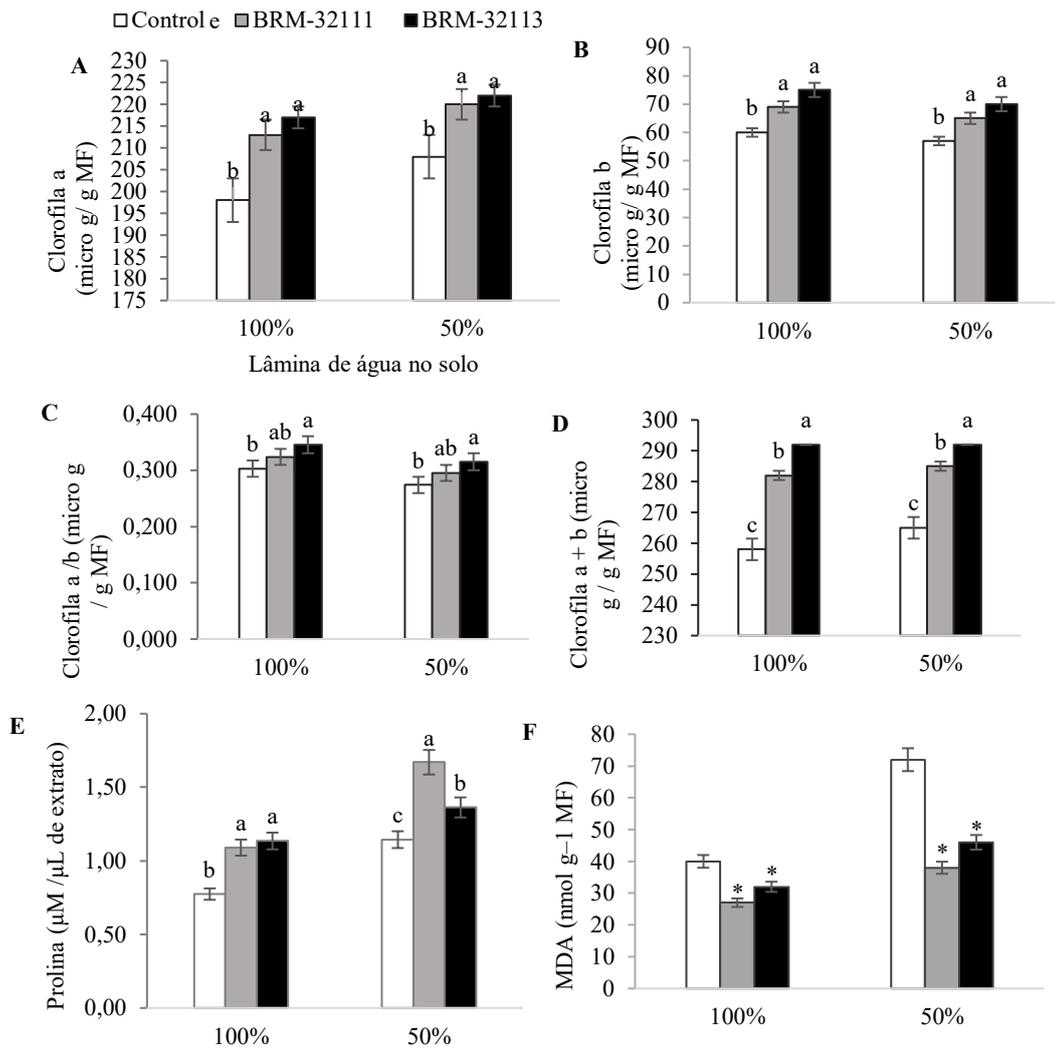


Figure 4. Clorofila a (micro g / g de MF) (A), clorofila b (micro g / g de MF)(B), clorofila a + b (micro g / g de MF)(C), clorofila a / b (micro g / g de MF)(D), Prolina (E), MDA (F), aos 28 dias após a germinação, em solo com e sem déficit hídrico. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$.

Capítulo 4

4. Mitigação de compostos alelopáticos no arroz de terras altas por rizobactérias

(*Burkholderia pyrrocinia* - BRM-3213 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-3211)³

Marcela Cristiane Ferreira Rêgo^a; Aline Figueiredo Cardoso^b, Taina da Cruz Ferreira^c, Marta Cristina Corsi de Filippi^d, Telma Fátima Vieira Batista^e, Rafael Gomes Viana^f, Gisele Barata da Silva^{g*}.

^a Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830.Belém, Pará, Brazil. E-mail: marcela.rego@ufra.edu.br

^b Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830.Belém, Pará, Brazil. E-mail: aline_f_cardoso@hotmail.com

^c Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830.Belém, Pará, Brazil. E-mail: thayna_ferreira_9@hotmail.com

^d Phytopathology Laboratory, Brazilian Enterprise for Agricultural Research - Rice and Beans, CEP 75375-000, Goiânia, Goiás, Brazil: E-mail: cristina.filippi@embrapa.br

^e Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830.Belém, Pará, Brazil. E-mail: telmabatistacoelho@yahoo.com.br

^f Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830. Belém, Pará, Brazil. E-mail: rafael.gomes@ufra.edu.br

^{g*} Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon, CEP.066.077-830. Belém, Pará, Brazil. E-mail: gisele.barata@ufra.edu.br

³ Este capítulo segue as normas de apresentação do Checklist. da AOB Plants

Resumo

Os compostos alelopáticos reduzem o crescimento e a produtividade das plantas de arroz em plantios consecutivos, principalmente, em terras altas. As rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 foram registradas como promotoras do crescimento em arroz. Este estudo foi desenvolvido para compreender o efeito da aplicação de rizobactérias em plantas de arroz de terras altas em plantios consecutivos. Os experimentos foram em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições e quatro tratamentos constituídos de sementes de arroz inoculados com *P. fluorescens* BRM-32111 em solo com resíduo, com *B. pyrrocinia* BRM-32113 em solo com resíduo e plantas não inoculadas (controle) semeadas em solo com resíduo (CR) e plantas não inoculadas em solo sem resíduo (SR) de raízes de plantas de arroz. O crescimento de plântulas e plantas de arroz controle (CR) foi afetado negativamente pelos compostos alelopáticos. Em semeio com resíduo, plantas inoculadas com as rizobactérias *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 induziram aumento em 88% na biomassa, 3% na área foliar, 40% e 67% no comprimento e biomassa radicular, respectivamente, 21% na clorofila *a* e 53% na clorofila *a + b*, 50% na *A*, 227% na *A / Ci* e 63% no EUA comparado as plantas controle CR. Esses resultados indicam que as rizobactérias *P. fluorescens* BRM 32111 e *B. pyrrocinia* BRM 32113 aumentam a tolerância de plantas de arroz ao estresse com aleloquímicos, com possíveis aplicações práticas agrícolas sobre o efeito da aleloquímica ambiental no arroz de terras altas.

Palavras-chave: Arroz, *B. pyrrocinia*, *P. fluorescens*, alelopatia, rizobacteria

1. Introdução

Os plantios consecutivos de arroz em terras altas apresentam redução de crescimento e produtividade em até 65% em cinco anos de cultivo (Fageria and Baligar 2003, Pinheiro et al 2006), o mesmo efeito alelopático ocorre em plantas de milho e sorgo (Amb & Ahluwalia 2016), provavelmente devido a degradação dos resíduos de plantas no solo que liberam aleloquímicos e por acúmulo de metabólitos oriundos de exsudados radiculares presentes no solo, dentre os metabólitos que produzem efeitos alelopáticos em arroz estão os terpenóides, esteróides, fenóis, cumarinas, flavonóides, taninos, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e outros compostos (Putnam, 1988; Rice 1984).

A alelopatia é definida como qualquer processo que envolva os metabólitos secundários produzidos por plantas, microorganismos, vírus, e fungos, e que influenciam o crescimento e desenvolvimento da produção agrícola e sistema biológico (Torres et al , 1996). E esses compostos podem atuar inibindo germinação, crescimento, redução da profundidade radicular das plantas, o efeito danoso pode variar de acordo com a cultivar e a concentração e combinação de metabólitos (McPherson et al., 1971; Chou et ai. 1991).

O desenvolvimento de tecnologias para mitigar os danos dos aleloquímicos em plantios consecutivos de arroz tornam-se importantes no contexto da pesquisa em condições de terras altas. Como alternativas mitigadoras têm-se a seleção de culturas de arroz tolerantes aos aleloquímicos (Wathugala 2015), a rotação de cultura com espécies da família Fabaceae como *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Crotalaria paulina* Schrank e *Mucuna aterrima* Piper & Tracy (Marenco and Santos, 1999) e o uso dos microorganismos como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) (Helme 1999; Major 2010).

As PGPR são bactérias benéficas capazes de induzir crescimento e aumentar a tolerância das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Kloepper et al., 1980, 2004; Kremer, 2006; Mishra

and Nautiyal, 2012). O uso de microorganismo para o aumento da tolerância de aleloquímicos é uma opção sustentável, por melhorar a tolerância das plantas e, assim, permitir o cultivo de um solo sem excessos de fertilizantes. Uma das ações dos aleloquímicos sobre as plantas é a alteração da atividade mitótica de células jovens e diminuição no número de células ou alongamento celular ou ambos, essa ação resulta na inibição de atividades metabólicas e menor taxa de crescimento nas plantas (Rice, 1984), a inibição no crescimento também pode ser devido a diminuição na germinação, podendo ser atribuída à alteração da atividade enzimática que afeta a mobilização de compostos de armazenamento na germinação, que causa uma resposta de inchaço e aumento do nível de peroxidase em plantas de arroz.

A aplicação de FMA e PGPR aumentaram a tolerância das plantas a compostos aleloquímicos (Helme 1999; Major 2010). Os FMA atuam nas plantas alterando a absorção de água (Egerton-Warburton, et al. 2007), nitrogênio, fósforo e metais (Barto et al. 2011), e os sinais de aleloquímicos presentes no solo inibindo o efeito sobre as plantas (Barto et al. 2012).

A tecnologia que modifica os aleloquímicos transformando-os em reguladores do crescimento de plantas em sorgo, permite a gestão eficaz da produção agrícola, devido à degradação dos aleloquímicos no solo (Bhadoria 2011; Ihsan et al., 2015; Uddin et al., 2014). O *Sorghum bicolor* (L) libera um exudado radicular, a sorgoleona, que pode inibir o crescimento de plantas daninhas. No entanto, a planta de sorgo torna-se tolerante quando tratada com microorganismos capazes de usar sorgoleona como fonte de carbono e mineralizá-lo através de degradação completa de CO₂ no solo (Gimsing et al., 2009).

No entanto, tem-se a hipótese de que PGPR, além de induzir crescimento em plantas de arroz (Rêgo et al., 2014), induz também aumento da tolerância do arroz aos compostos aleloquímicos deixados pela cultura no solo. Este mecanismo não foi demonstrado em arroz de terras altas. Neste trabalho, objetivou-se investigar a aplicação de PGPR (*Pseudomonas*

fluorescens BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113) sobre plantas de arroz cultivadas em solo com resíduos aleloquímicos de plantas de arroz.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e microrganismos

Os experimentos foram em delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições (um vaso com cinco plantas) e quatro tratamentos constituídos de duas rizobactérias ambas inoculadas nas sementes em solo com resíduo (*Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113) e dois controles (sementes com água em solo com resíduo (CR) e em solo sem resíduo (SR)). Sementes de arroz do cultivar Primavera foram inoculadas com a suspensão de *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 e *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 feita de acordo com metodologia descrita por FILLIPI et al., (2011) e o controle sementes submersas em água destilada e esterilizada. Para o solo com resíduo foi adicionado 23 mg das raízes de arroz conforme descrito por Ranagalage (2014). O Conteúdo de compostos alelopáticos produzido pelos resíduos (quadro 1). O solo utilizado foi de uma área não cultivada no Pará, Brasil, e caracterizado como: pH H₂O 5.4; 589 g argila kg⁻¹; 66 g silt kg⁻¹; 144 g areia kg⁻¹; 63 mg K⁺ dm⁻³; 4 mg P dm⁻³; 0.4 mg Ca²⁺ dm⁻³; 0.2 cmolc Mg²⁺ dm⁻³; 0.1 cmolc Al³⁺ dm⁻³; e 3 mg Si kg⁻¹.

Quadro 1. Compostos alelopáticos, contidos em raízes de plantas de arroz (por vaso), aos 21 dias após a semeadura.

	Biomassa radicular	Compostos fenólicos totais	Flavonóides
Controle	0.015	0.340	0.339
BRM-32111	0.017	0.446	0.403
BRM-32113	0.016	0.456	0.408

Valores médios expresso em (mg / g Ms), e obtidos em estudos prévios por Rêgo et al., (2014).

2.2. Germinação de sementes e vigor de plântula

Em caixa plástica (11 x 11 x 3.5 cm), contendo 100 g de solo CR foram colocadas sementes inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111, *B. pyrrocinia* BRM-32113 e controle (não inoculado), e SR sementes controle (não inoculado), o solo foi umedecido com 50 mL de água destilada estéril e semeadas 25 sementes por repetição, totalizando 100 sementes / tratamento. Aos sete dias após semeio foram avaliados a germinação (%), e o índice de velocidade de germinação foi calculado por $IVG = \Sigma (n / t)$, onde: t = número de dias da semeadura contado a cada dia e n = número de plântulas normais germinadas contada a cada dia, e massa fresca da plântula, o ensaio foi repetido duas vezes.

2.3. Promoção do crescimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) – Belém/Pa, com vasos contendo 750 g de solo de latossolo amarelo distrófico, e adubados com 1.17 g de N – P - K (Nitrogênio, Fósforo e Potássio), 0.35 g de uréia e 0.7 g de FTE (micronutrientes) por vaso. Foram semeadas 10 sementes inoculadas por vaso e aos 11 dias após germinação foi feito o desbaste para cinco plantas por vaso. Aos 21 dias após o semeio foram avaliados: biomassa total (mg), altura da planta (cm), área foliar (cm²),

conteúdo relativo de clorofila (SPAD), biomassa radicular (g) e comprimento radicular (cm), trocas gasosas e quantificação de pigmentos fotossintéticos. O ensaio foi repetido quatro vezes.

2.4. Estudo anatômico da folha

A dimensão dos estômatos foi obtida através da área equivalente do elipsóide que representa a área dos poros estomáticos (APE) pela seguinte fórmula: $(\pi \times \text{Comprimento} \times \text{largura}) / 4$, de acordo com Minnocci et al. (1995) e Bartolini et al. (1997). A densidade estomática (estomato mm^{-2}) ($n = 20$) para face abaxial, de acordo com Sack et al. (2003). A densidade de tecidos foliares (DFT, mg cm^{-3}) foi calculada pela razão massa foliar por unidade de área foliar (mg cm^2) e espessura foliar (Wright e Westoby 2002). Em lâmina foliar com 0,5 x 0,5 cm com auxílio de ocular milimetrada, Microscópio Motic (BA-400).

2.5. Quantificação de pigmentos

Da terceira folha foram obtidos 15 mg de tecido foliar e maceradas em 240 μL em EtOH 98 % e incubadas a 80 °C por 20 minutos, e em seguida centrifugadas a 4 °C em 14.000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e o pellet submetido a mais duas extrações, em EtOH de 80% e 50%, respectivamente. Os sobrenadantes foram coletados e homogeneizados. As etapas de extração dos pigmentos foram realizadas sob banho de gelo e na ausência de luz, conforme metodologia definida por Porra (1989). Posteriormente uma alíquota de 20 μL do extrato vegetal etílico de cada amostra foi adicionado em um meio de reação com 120 μL de EtOH 98% e 40 μL do mix etílico. E submetidas a determinação da absorvância, estimada em comprimento de onda (λ) 645 nm e 665 nm. Com a absorvância obtidas, foi estimada as concentrações de clorofila a e b, a / b e total através das fórmulas 1 e 2, posteriormente normalizado pela massa fresca de cada amostra.

$$\text{(Fórmula - 1) Clorofila a} = 5.48 * \text{Abs665} - 2.16 * \text{Abs645} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{poço}} \right)$$

$$\text{(Fórmula - 2) Clorofila b} = 9.67 * \text{Abs645} - 3.04 * \text{Abs665} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{poço}} \right)$$

2.6. Trocas gasosas

As plantas de arroz foram avaliadas quanto as trocas gasosas, com um sistema portátil de fotossíntese (LI-6400XT; LI-COR, Lincoln, NE). A taxa líquida de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*), e estimado uso eficiente da água (WUE) (*A/E*) e eficiência de carboxilação da rubisco (*A / C_i*), foram avaliados a uma concentração de CO₂ 400 umol mol⁻¹, 50% de umidade relativa, 28 °C de temperatura, 300 umol s⁻¹ o fluxo de ar e densidade de fluxo de fótons de 1200 umol (m²) 1s⁻¹. O instrumento foi estabilizado de acordo com a orientações do fabricante.

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan (*p* < 0.05) em programa SPSS 21.0 e erro padrão (*p* < 0,05). Posteriormente, foi estimado o coeficiente de correlação linear entre as variáveis de crescimento das plantas de arroz aos 21 dias após o semeio em Software Past 2.0 (*p* < 0,05).

3. Resultados

3.1. Germinação de sementes e vigor de plântula e promoção de crescimento em plantas

Sementes controle WR tiveram redução em 2% na germinação quando comparadas as sementes controle NR, no entanto as sementes inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 tiveram aumento na germinação em 2% em relação ao controle WR (Figura 2 A). Em solo com resíduo (WR), o comprimento da plântula em todos os tratamentos teve redução média de 22%

(Figura 2 B) em relação ao controle NR, a biomassa das plântulas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 foi 27 % maior em relação ao controle WR (Figura 2 C).

As plantas controle WR apresentaram redução em todas as variáveis relacionadas a promoção de crescimento (Figura 2). A biomassa das plantas inoculadas com as rizobactérias aumentou 88 % quando comparada ao controle WR (Figura 2 D). O comprimento das plantas com *B. pyrrocinia* BRM-32113 aumentou em 25% e 22 %, em relação ao controle NR e controle WR, respectivamente (Figura 2 E). Plantas inoculadas com as rizobactérias tiveram aumento em 3% na área foliar, em 30% no conteúdo relativo de clorofila (SPAD), em 40% na biomassa radicular e 67% no comprimento radicular em relação ao controle WR, respectivamente (Figura 2 H).

O estômato nas plantas de arroz tem formato de haltere, anfiestomática (estômatos nas duas faces). No entanto, diferiram apenas na face abaxial nas plantas submetidas a solo com resíduo, onde ocorreu aumento do comprimento do poro estomático nas plantas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 de 19% e 91% em relação aos controle NR e controle WR respectivamente (Tabela 1 – Figura 5), a área do poro estomático e densidade estomática foram maiores em 102% e 83% nas plantas tratadas com *P. fluorescens* BRM-32111 quando comparadas ao controle WR, respectivamente (Tabela 1 – Figura 5), e DFT foi maior nas plantas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 em 18% e 8% em relação aos controle NR e controle WR, respectivamente (Tabela 1).

3.2. Quantificação de pigmentos

A concentração de pigmentos reduziu nas plantas controle WR quando comparado com controle NR. E plantas inoculadas com as rizobactérias tiveram aumento em 21% na clorofila a e em 53% na soma das clorofilas a +b (Figura 3). Para clorofila b e a razão clorofila a / b ocorreu incremento em 22% e 25% nas plantas inoculadas *P. fluorescens* BRM-32111 em

relação ao controle NR, e em 21 % e 28 % em relação ao controle WR, respectivamente (Figura 3 B – D).

3.3. Trocas gasosas

Todos os parâmetros de trocas gasosas foram afetados em plantas controle WR quando comparadas ao controle NR e em solo com resíduo (WR). As plantas inoculadas com as rizobactérias tiveram aumento em *A* de 37% e 50% em relação ao controle NR e controle WR, respectivamente (Figura 4 A). Para WUE o aumento foi em 128 % e 63 % em relação ao controle NR e controle WR, respectivamente (Figura 4 E). No entanto, houve aumento na eficiência da carboxilação da rubisco em 227% incluindo plantas com rizobactérias e controle WR comparado ao controle NR (Figura 4 F). Enquanto que, plantas controle SR tiveram incremento em 47% no *gs*, 42% no *Ci* e em 60% no *E* comparadas as plantas inoculadas com rizobacterias (Figura 4 B-C-D).

4. Discussão

4.1. Germinação de sementes, vigor de plântula e promoção de crescimento em plantas

No presente estudo, os resíduos de arroz adicionados no solo reduziram a germinação, o comprimento e a biomassa das plântulas de arroz de terras altas. Entretanto, em plântulas de arroz provenientes de sementes inoculadas com a rizobactéria *P. fluorescens* BRM-32111 (WR), foram mitigados os danos na germinação, na biomassa e no comprimento quando comparadas a plantas não inoculadas (WR) crescidas em solo com resíduo, indicando que a rizobactéria induziu a proteção aos efeitos danosos dos aleloquímicos no estágio de plântula. Em plantios subsequentes de arroz de terras altas, há redução em até 50% de produtividade, a qual é atribuída a vários fatores, entre eles a liberação de aleloquímicos provenientes dos resíduos do arroz no solo (Chou, 1991). Os principais compostos aleloquímicos incluem ácidos

fenólicos, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido benzóico, ácido siringídico e ácido salicílico (Chou e Lin, 1976; Putnam, 1988; Rice 1984). Esses compostos de resíduos de arroz no solo reduzem a germinação, retardam o vigor de plântulas, crescimento de plantas, a expansão foliar, e alongamento de raízes como mostrado no presente estudo (Figura 1 – 2). Também já foram registrados esses efeitos negativos para a cultura do milho cultivado sobre resíduos de sorgo e arroz (Amb & Ahluwalia 2016). Esses danos são atribuídos a uma cadeia de sinais percebidos pelas radículas que absorvem as substâncias alelopáticas liberadas no solo, depois da decomposição das raízes de arroz, e que quando em contato com a membrana celular da nova raiz ocasionam a despolarização, alteração no efluxo de íons e a redução de condutividade hidrolítica, resultando em menor absorção de água e nutrientes pelas raízes interferindo no desenvolvimento da planta (Baziramakenga et al, 1995; Lehman e Blum, 1999).

As plantas de arroz inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 tiveram aumento de germinação, comprimento e biomassa em relação as plantas controle crescida em solo com resíduo (WR) (Figura 2). Estudos demonstraram que há relação entre o crescimento das plantas e os microrganismos no solo na presença de compostos alelopáticos, por múltiplos mecanismos. No presente estudo, as PGPR *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 induziram aumento no crescimento e biomassa de raízes, que pode ser decorrente da melhoria no processo de crosstalk entre solo-planta-microrganismo, os exsudados radiculares estimulam a formação do *quorum sensing* bacteriano, com aumento na liberação de polissacarídeos que combinados com partículas de argila induziram a formação de mucigel (Guckert et al., 1975), substância que facilita o crescimento radicular e protege as PGPRs na rizosfera (Kiers & Denison 2008; Venturi & Keel, 2016; Van Dam & Bouwmeester, 2016). Outra capacidade das bactérias da rizosfera é a degradação dos aleloquímicos através da ação enzimática, que podem alterar a toxidez do composto aleloquímico transformando-os em forma não tóxica (Bais et al., 2006; Mishra et al., 2013; Bhadoria 2011; Macias et al., 2003; Inderjit

et al., 2011; Zou et al., 2014; Wu et al., 2015). Os compostos aleloquímicos (fitotoxinas, 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4DAPG), phenazine, Cianeto de Hidrogênio (HCN), antibióticos e enzimas de degradação da parede celular das raízes das plantas) liberados por gramíneas podem ter sido degradado pelas PGPR *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 no presente estudo, e transformado os compostos em uma forma não tóxica, o que favoreceu o crescimento das plantas de arroz em solo WR.

Alem dos microorganismos promoverem o crescimento também atuam na modulação do gene responsivo ao estresse, e na inibição das enzimas antioxidantes e da secreção de aleloquímicos no solo (Barazani e Friedman, 1999; Bais et al., 2006; Mishra et al., 2013). O maior desenvolvimento do sistema radicular, parte aérea, biomassa, densidade estomática, foliar e massa foliar, área foliar e poro estomático foram obtidos em plantas de arroz inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111. Essas adaptações morfológicas das plantas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 em solo com resíduo, favoreceram a aquisição de CO₂, o que auxilia a planta a desenvolver seu potencial no aumento sua biomassa para crescimento (Galmés et al., 2007; Millar et al. 2011).

4.2. Quantificação de pigmentos

Em solos com resíduos, as plantas de arroz (WR) tiveram redução na concentração dos pigmentos fotossintéticos, enquanto que, em plantas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 houve aumento na concentração das clorofilas. No controle WR, as plantas apresentaram uma drástica redução de clorofila a, a qual pode estar relacionada com a perda da capacidade das células em sintetizar clorofila, quando exposta ao composto aleloquímico, como ocorreu em algas verdes (*Chlorella vulgaris*) expostas ao aleloquímico N-fenil-2-naftilamina (Bornman e Vogelmann, 1991; Haifeng et al., 2009).

Quanto a clorofila b e a razão a / b, houve aumento nas plantas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 e semeadas em CR, indicando aumento na eficiência no centro dos complexos de reação fotossintética do sistemas de antena de FSII PSI. Esses sistemas podem ser divididos nos complexos de antenas interiores contendo clorofila b e os complexos de captação, transmissão e dissipação do excedente de luz (NPQ,qP, Fv/Fm) (Björkman, 1981; Haifeng et al., 2009). O composto alelopático N-fenil-2-naftilamina, em alga verde, alterou a função do transporte de elétrons fotossintéticos, corrente do PSII para PSI, formando complexos elétrons doadores-receptores com a filoquinona e naftoquinona (Dwivedi e Rao, 1972; Haifeng et al., 2009). A rizobactéria *P. fluorescens* BRM-32111 pode ter estimulado as plantas a tolerar o estresse através da manutenção do complexo antena e / ou manutenção do transporte de elétrons.

4.3. Trocas gasosas

Um dos mecanismos caracterizados fitotóxicos induzidas por aleloquímico é a inibição da fotossíntese e da evolução do oxigênio através da interação com componentes do fotossistema II (PSII) (Einhelling, 1995). No presente estudo, as plantas de arroz controle (CR) tiveram o aparato fotossintético afetado negativamente pelo resíduo (CR), entretanto, os danos foram mitigados quando as plantas foram inoculadas com as rizobactérias *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113. Os aleloquímicos reduzem a fotossíntese por causar redução na transferência de elétrons ou por reduzir e inibir a síntese de ATP e NADPH, reduzir a condutância estomática e a transpiração (Yu et al., 2003; Wu et al., 2004). Como observado nesse estudo, em plantas de arroz cultivada em solo com resíduo (CR) tiveram redução drástica significativas na condutância estomática (gs) e na transpiração (E), assim como já foi observado em plantas de outras culturas. Esse efeito foi atribuído aos aleloquímicos dos grupos do fenóis, composto alelopático decorrente da decomposição de gramínea, que causam perturbação nas

membranas celulares que pode culminar na morte celular, a manutenção da integridade de membranas celulares, em resposta ao ataque de radicais livres, está relacionada ao balanço entre citocinina que leva ao aumento da atividade das enzimas do estresse oxidativo como catalase e peroxidase e aumento de concentrações de ácido abscísico (ABA) nas folhas, e do cálcio que tem o papel de atuar sobre a redução do extravasamento de eletrólito, (Yan et al. 2006; Nishiyama et al., 2011; Gidrol et al., 1994). (Einhellig, 1996; Weir et ai., 2004).

O aumento nos parâmetros de trocas gasosas em A, EUA e A/Ci em plantas de arroz inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 e semeadas em solo com resíduo foram resultantes do estímulo ao crescimento das plantas, as quais tiveram maior área foliar e pigmentos fotossintéticos e esses estão diretamente ligados ao aumento da taxa fotossintética, o que auxiliou no acúmulo em biomassa nas plantas de arroz inoculadas com as rizobacterias (Galmés et al., 2007; Millar et ai. 2011) (Tabela 2). Os resultados de plantas não inoculadas NR e WR, foram semelhantes com os obtidos em plantas de milho e soja, submetidas a compostos aleloquímicos liberados por noqueira preta (*Juglas nigra* L.), que apresentaram redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ (Shibu & Gillespie 1998), no entanto as plantas de arroz inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113 tiveram aumento na taxa de assimilação de CO₂ e maior condutância estomática (gs) e carbono interno (Ci) em comparação a plantas não inoculadas CR, indicando que alteram o comportamento fisiológico das plantas, aumentando a tolerância aos aleloquímicos. Estudos com estirpes de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, e outras espécies, que se associam com as raízes de plantas foram capazes de proporcionar tolerância a alelopatia e de degradar os aleloquímicos liberados de planta de *Gmelina arborea* (Barazani e Friedman, 2001; Hauser, 1993). As plantas inoculadas com *P. fluorescens* BRM-32111 tiveram comportamento semelhantes as de plantas consideradas tolerantes aos efeitos dos aleloquímicos, com maior área foliar, DTF, e biomassa

radicular o que indica a ocorrência do espessamento das paredes celulares o que contribui para aumentar a eficiência nas trocas gasosas e EUA (Niinemets, 2001).

A rotação de culturas é indicada como uma forma de diminuir os efeitos alelopáticos nas plantas, em estudos de rotação de culturas com arroz de terras altas e trigo no Paquistão, as culturas tiveram redução na produção nos plantios sucessivos, mesmo com a adoção de boas práticas culturais. Essas perdas poderão ser mitigadas com o uso de microorganismos (*P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113) que induzam aumento de tolerância às plantas de arroz de terras altas aos resíduos alelopáticos.

As rizobactérias (*P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113) registradas como promotoras de crescimento e supressoras de brusone em arroz de terras altas (Filippi et al., 2011 ; Rêgo et al., 2014), induziram o aumento da tolerância das plantas aos compostos alelopáticos e deverão ser avaliadas em campo para confirmar mais esse atributo positivo no manejo de arroz de terras altas, para aumento de produtividade na mesma área e em anos consecutivos de plantios e redução de aberturas de novas áreas para a rizicultura.

5. Conclusão

Todas as plantas tiveram alteração no crescimento na presença de resíduo de raízes de arroz no solo. No entanto, em plantas inoculadas com as rizobactérias (*P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113), ocorreu a mitigação dos danos fisiológicos e alterações agronômicas e morfológicas como resposta a tolerância aos compostos aleloquímicos em plantas de arroz de terras altas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Pesquisas da Amazônia (Fapesp) e a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pelo financiamento da pesquisa, e a Agência Federal Brasileira de Apoio e Avaliação da Educação Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudos de doutorado.

Referência

Al-Johani N S, Aytah A A, Boutraa T. 2012. Allelopathic impact of two weeds, *Chenopodium murale* and *Malva parviflora* on growth and photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 44, 1865–1872.

AMB, M. K.; AHLUWALIA, A. S. Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation. *Rice Science*, 2016, 23(4): 165-183.

Azcón-Aguilar C, Barea JM: Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens — an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 1996, 6:457-464.

Bais, H. P.; Weir, T. L.; Perry,.; Gilroy, L. G. S.; Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 57, 233 -266.

Barazani, O.; Friedman, J. 1999. Allelopathic bacteria and their impact on higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 741 – 755.

Barto, E.K., Hilker, M., Mueller, F., Mohny, B.K., Weidenhamer, J.D. & Rillig, M.C. (2011) The fungal fast lane: common mycorrhizal networks extend bioactive zones of allelochemicals in soils. *PLoS ONE*, 6, e27195.

Barto, E.K., Weidenhamer, J.D., Cipollini, D. & Rillig, M.C. (2012) Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication? *Trends in Plant Science*, 17, 633–637.

- Baziramakenga, R., Leroux, G.D. and Simard, R.R. (1995) Effects of Benzoic and Cinnamic Acids on Membrane Permeability of Soybean Roots. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 1271 - 1285.
- Benoit, R. E. and Sterkey, R. L. 1968. Enzyme inactivation as a factor in the inhibition of decomposition of organic matter by tannins. *Soil Sci.*, 105: 203- 208
- Bhadoria, P. (2011). Allelopathy: a natural way towards weed management. *Am. J. Exp. Agric.* 1, 7 – 20.
- Björkman, O., 1981. Responses to different quantum flux densities. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Physiological Plant Ecology I. Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Blum U, Rebbeck J. 1999. Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. *J Chem Ecol*, 15(3): 917–928.
- Bornman, J.F., Vogelmann, T.C., 1991. Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fiber optics. *J. Exp. Bot.* 42, 547–554.
- Chou C H, Chang F J, Oka H I. 1991. Allelopathic potential of wild rice *Oryza perennis*. *Taiwania*, 36: 201–210
- Chou C H, Lin H J. 1976. Autoinhibition mechanism of *Oryza sativa*: 1. Phytotoxic effect of decomposing rice residue in soil. *J Chem Ecol*, 2(3): 253–367.
- Chou C H, Lin T J, Kao C I. 1977. Phytotoxins produced during decomposition of rice stubbles in paddy soil and their effect on leachable nitrogen. *Bot Bull Acad Sin*, 18: 45–60
- Dwivedi, P.C., Rao, K.G., 1972. Electron donor–acceptor complexes of N-phenyl-2-naphthylamine with quinones. *Indian J. Chem.* 10, 944–945.
- Egerton-Warburton, L.M., Querejeta, J.I. & Allen, M.F. (2007) Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1473–1483

- Einhellig F A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agron J*, 88(6): 886–893
- Fageria NK, Baligar VC. 2003. Upland rice and allelopathy. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34:1313-1329.
- Filippi, M. C. C., Silva, G. B. Da; Silva-Lobo, V., Côrtes, M. V. C. B., Moraes, A. J. G., and Prabhu A. S., 2011. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *B. Control.* 58, 160-166.
- GIDROL, X.; LIN, W.S.; DEGOUSEE, N.; YIP, S.F.; KUSH, A. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *European Journal of Biochemistry*, v.224, p.21-28, 1994.
- Gimsing, A. L., Baelum, J., Dayan, F. E., Locke, M. A., Sejero, L. H., and Jacobsen, C. S. (2009). Mineralization of the allelochemical sorgoleone in soil. *Chemosphere* 76, 104 – 1047.
- Guckert A, Breisch H, Reisinger O: Electron-microscopic study on interrelation of mucigel, clay ans microorganisms. *Soil Biol Biochem* 1975, 7:241-250.
- Haifeng, Q.; Xiaoyan, X.; Wei, C.; Hong, J.; Yuanxiang, J.; Weiping, L.; Zhengwei, F.. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 75 (2009) 368–375.
- Holappa, L.D. and Blum, U. (1991) Effects of Exogenously Applied Ferulic Acid, a Potential Allelopathic Compound, on Leaf Growth, Water Utilization, and Endogenous Abscisic Acid Levels of Tomato, Cucumber, and Beans. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 865-886.
- Hussain MI, Reigosa MJ (2011). Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C3 perennial species. *J. Exp. Bot.* 62:4533-4545.

- Ihsan, M. Z., Khaliq, A., Mahmood, A., Naeem, M., El-Nakhalawy, F., and Alghabari, F. (2015). Field evaluation of allelopathic plant extracts alongside herbicides on weed management indices and weed – crop regression analysis in maize. *Weed Biol. Manag.* 15, 78 – 86.
- Inderjit, Wardle, D. A., Karban, R., and Callaway, R. M. (2011). The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends Ecol. Evol.* 26, 655 – 662.
- Inderjit, Weston LA: Root exudates: an overview. In *Root Ecology*. Edited by Kroon H, Visser EJW. Springer Berlin Heidelberg; 2003:235-255.
- Kiers ET, Denison RF: Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2008, 39:215-236.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schrot, M.N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth – promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885 – 886.
- Kremer, R. J. (2006). “The role of allelopathic bacteria in weed management”, in *Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases*, eds X. Inderjit and K. G. Mukerji (Dordrecht: Springer Netherlands Press). 143 – 155.
- Lehman ME, Blum U (1999). Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose: effective concentration. *J. Chem. Ecol.* 25:2585-2600.
- Lokajová V, Bačkorová M, Bačkor M. 2014. Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany*, **93**, 86–91.
- Macias, F. A. Marin, D., Oliveros – Bastidas, A., Varela, R. M., Simonet, A. M., Carrera, C et al., (2003). Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development . *Biol. Sci. space* 17, 18 – 23.
- Major, J., Rondon, M., Molina, D., Riha, S. J., and Lehmann, J. 2010. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. *Plant Soil.* 333, 117 – 128.

MARENCO, R.A.; SANTOS, A. M. B. Crop rotation reduces weed competition and increases chlorophyll concentration and yield of rice. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, v.34, n. 10, p.1881 - 1887, (1999).

McPherson, J. K., Chou, C. H. and Muller, C. H. 1971. Allelopathic constituents of the chaparral shrub (*Adenostoma fasciculatum*). *Phytochemistry* 10: 2925–2933

Mishra, S., and Nautiyal, C. S. (2012). Reducing the allelopathic effect of *Parthenium hysterophorus* L. on wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Pseudomonas putida*. *Plant growth regul.* 66, 155 – 165.

Mishra, S., Upadhyay, R. S., and Nautiyal, C. S. (2013) Unravelling the beneficial role of microbial contributors in reducing the allelopathic effects of weeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5659 – 5668.

Niinemets Ü (2001) Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology* 82(2):453–469.

Nishiyama, R.; Watanabe, Y.; Fujita, Y.; Le, D.T.; Kojima, M.; Werner, T.; Vankova, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; Kakimoto, T.; Sakakibara, H.; Schmulling, T.; Tran, L.P. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*, v.23, p.2169-2183, 2011.

Patterson DT (1981). Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). *Weed Sci.* 29:53- 59.

Pinheiro B da S, Castro E da M de, Guimaraes CM. 2006. Sustainability and profitability of aerobic rice production in Brazil. *Field Crops Res.* 97:34-42.

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem Biophys Acta* 975: 384- 394.

Putnam A R. 1988. Allelochemicals from plants as herbicides. *Weed Technol*, 2(4): 510–518

RANAGALAGE, A.S.; JAYAKODY, T.S.D. AND WATHUGALA, D.L. Allelopathic Potential of Rice Residues of Selected Rice Varieties (*Oryza sativa* L.) Against *Echinochloa crus-galli*. *Journal of Tropical Forestry and Environment Vol. 4. No 02 (2014) 24-30*.

Rêgo, M.C.F.; Ilkiu-Borges, F., Filippi, M.C.C.; Gonçalves, L.A; SILVA, G.B. 2014. Morphoanatomical and Biochemical Changes in the Roots of Rice Plants Induced by Plant Growth-Promoting Microorganisms. *Journal of Botany* 2014: 1-10.

Rice, E. L. 1984. *Allelopathy* 2ndEdn. Orlando, Florida: Academic Press Inc. P 422.

Shibu, J.; Andrew R. G.1998. Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. *Plant and Soil* 203: 199–205.

Sodaeizadeh H, Rafiiohossaini M, Havlík J, Van Damme P. 2009. Allelopathic activity of different plant parts of *Peganum harmala* L. and identification of their growth inhibitors substances. *Plant Growth Regulation*, **59**, 227–236.

Torres A, Olivia R M, Castellano D, Cross P. 1996. A science of the future. *In: Proceedings of the 1st World Congress on Allelopathy*. Cadiz, Spain: University of Cadiz: 278

Uddin, M. R., Park, S. U., Dayan, F. E., and Pyon, J. Y. (2014). Herbicidal activity of formulated sorgoleone, a natural product of sorghum root exudate. *Pest. Manag. Sci.* 70, -252 – 257.

Van Dam NM, Bouwmeester HJ: Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends Plant Sci* 2016, 21 :256-265.

Venturi V, Keel C: Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci* 2016, 21 :187-198.

Wathugala, D.L.; Ranagalage. A.S. Comparison of Allelopathic Potential of Sri Lankan Varieties (*Oryza sativa* L.) using *sativus* L.) as an Indicator Plant. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. Vol 3, 1473-2319 (2015).

- Wu, H., Pratley, J., Lemerled, D. and Haig, T. (1999). Crop Cultivars with allelopathic capability. *Weed Research* 39: 171-180.26.
- Wu, Z., Yang, L., Wang, R., Zhang, Y., Shang, Q., Wang, L., et al. (2015). In vitro study of the growth, development and pathogenicity responses of *Fusarium oxysporum* to phthalic acid, an autotoxin from Lanzhou lily. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1227 – 1234.
- Xiao DQ, Zhang HY, Spiertz JHJ, Yu J, Xie GH, Bouman BAM. 2010. Crop response of aerobic rice and winter wheat to nitrogen, phosphorus and potassium in a double cropping system. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 86:301- 315.
- Yan, X., Lynch, J.P. and Beebe, S.E. (1995). Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types. I. Vegetative response. *Crop Science* 35: 1086-1093.
- YAN, Y.; WEI, C.L.; ZHANG, W.R.; CHENG, H.; LIU, J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.27, p.821-826, 2006.
- Yang CM, Lee CN, Chou CH (2007). Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice seedlings by inhibition of supply orientation. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 43:299-304.
- Zhou Y, Yu J. 2006. Allelochemicals and photosynthesis. In: *Allelopathy*. Springer, The Netherlands. pp. 127–139.
- Zou, S. P., Li, X. W., Ma, Y. Q., and Yang, S. Y. (2014). Soil microbes are linked to the allelopathic potential of different wheat genotypes. *Plant Soil* 378, 49 – 58.



Figura 1. Parte aérea (A) e raízes (B) de plantas de arroz, aos 21 dias após a germinação, de tratamento controle sem resíduo (1), controle com resíduo (2), inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 em solo com resíduo (3) e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111 em solo com resíduo (4).

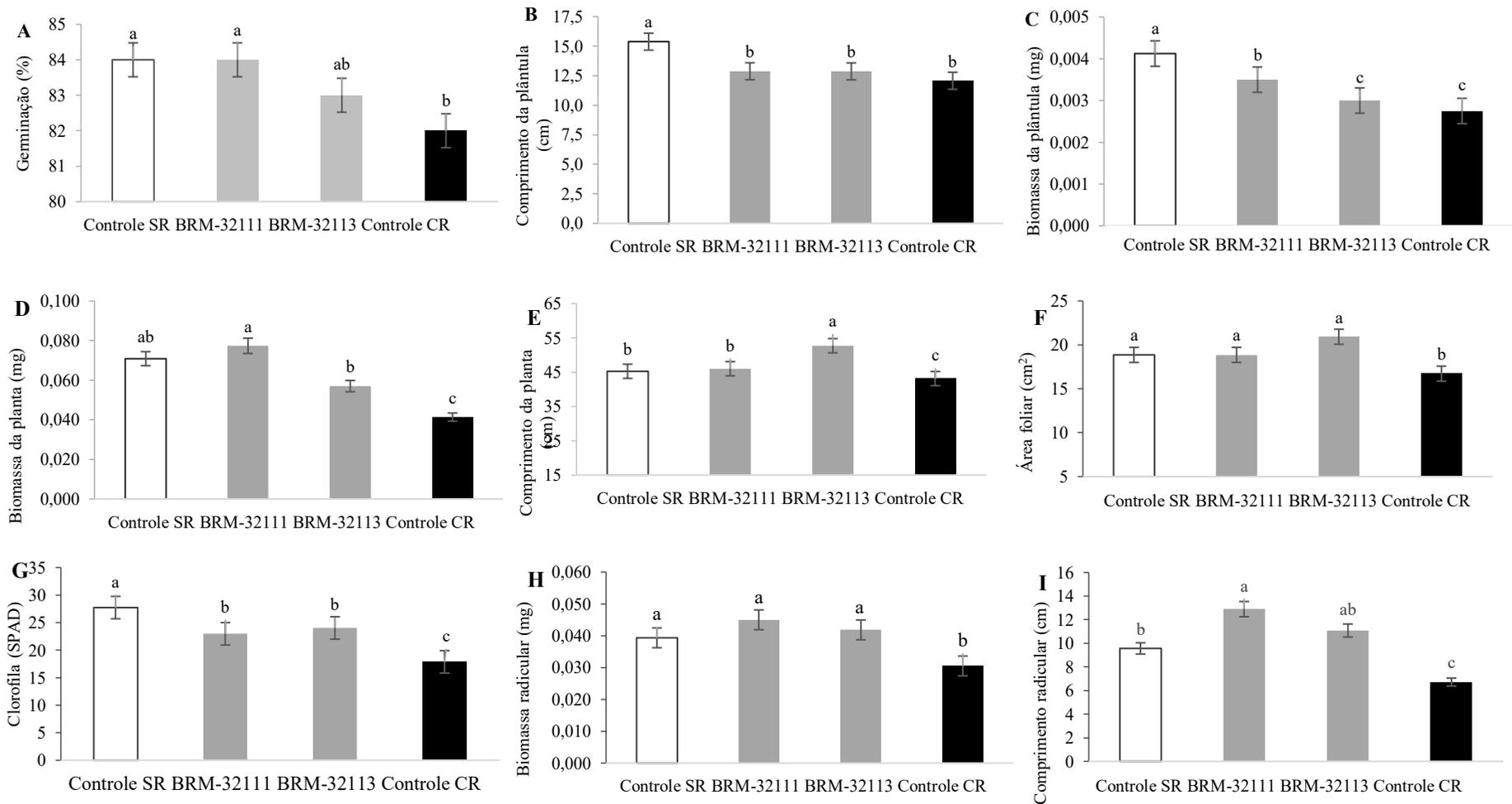


Figura 2. Germinação (A), comprimento da plântula (B), e biomassa da plântula (C), sete dias após a germinação, e biomassa de planta (D), comprimento de planta (E), área foliar (F), clorofila (SPAD) (G), biomassa radicular (H) comprimento das raízes (I), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo (CR) e com resíduo (SR) de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$.

Tabela 1. Comprimento do poro estomático (CPE), área do poro estomático (APE), densidade estomática (número de estômato / unidade de área), Desidade foliar total - DFT = (massa fresca da folha / (unidade de área foliar x espessura da folha), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo e com resíduo de plantas de arroz.

Tratamento	Densidade de			
	CPE (μm)	APE (μm)	estômatos	DFT
Controle (sem resíduo)	4.33 ¹ ± 0.642 b ²	8.76 ± 0.640 a	14.0 ± 1.08 a	0.389 ± 0.058 b
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> BRM-32113 (com resíduo)	2.94 ± 0.641 ³ c	6.81 ± 0.731 b	9.3 ± 1.06 b	0.328 ± 0.064 c
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BRM-32111 (com resíduo)	5.16 ± 0.743 a	9.13 ± 0.650 a	14.7 ± 1.23 a	0.459 ± 0.065 a
Controle (com resíduo)	2.69 ± 0.530 c	4.52 ± 0.670 c	8.0 ± 1.65 b	0.307 ± 0.037 c

Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia* BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Média¹ na linha seguida de mesma letra minúscula² não diferem (Duncan, $p < 0,05$), desvio padrão³, n=20.

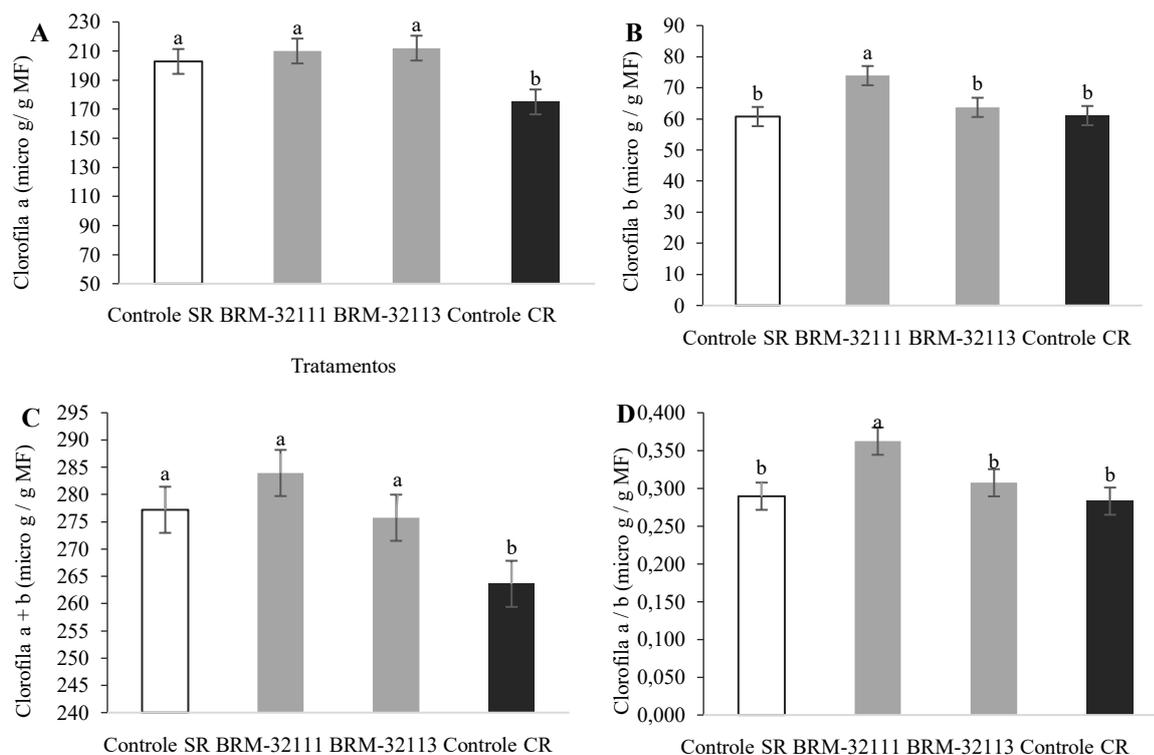


Figura 3. Clorofila a (micro g / g de MF) (A), clorofila b (micro g / g de MF) (B), clorofila a + b (micro g / g de MF) (C), clorofila a / b (micro g / g de MF) (D), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo (NR) e com resíduo (WR) de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$.

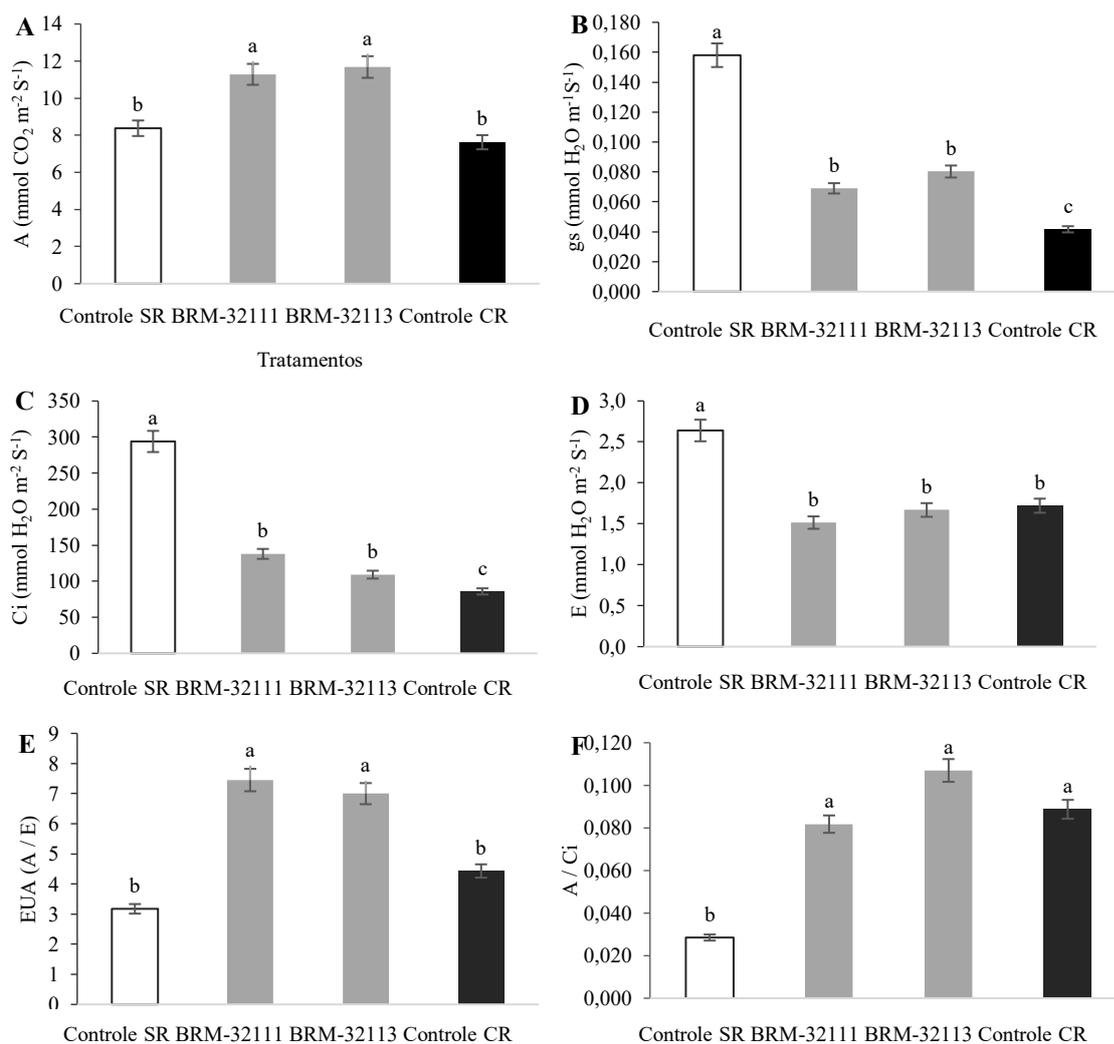


Figura 4. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) ($\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (B), carbono intercelular (C_i) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (C), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) (D), eficiência do uso da água (EUA) (A/E) (E), eficiência de carboxilação da rubisco (A/C_i), aos 21 dias após a germinação, em solo sem resíduo (NR) e com resíduo (WR) de plantas de arroz. Tratamento controle (não inoculado), e plantas inoculadas com *Burkholderia pyrocinia*-BRM-32113 e *Pseudomonas fluorescens* BRM-32111. Barras seguidas de mesma letra minúscula não diferem (Duncan, $p < 0,05$), $n=20$.

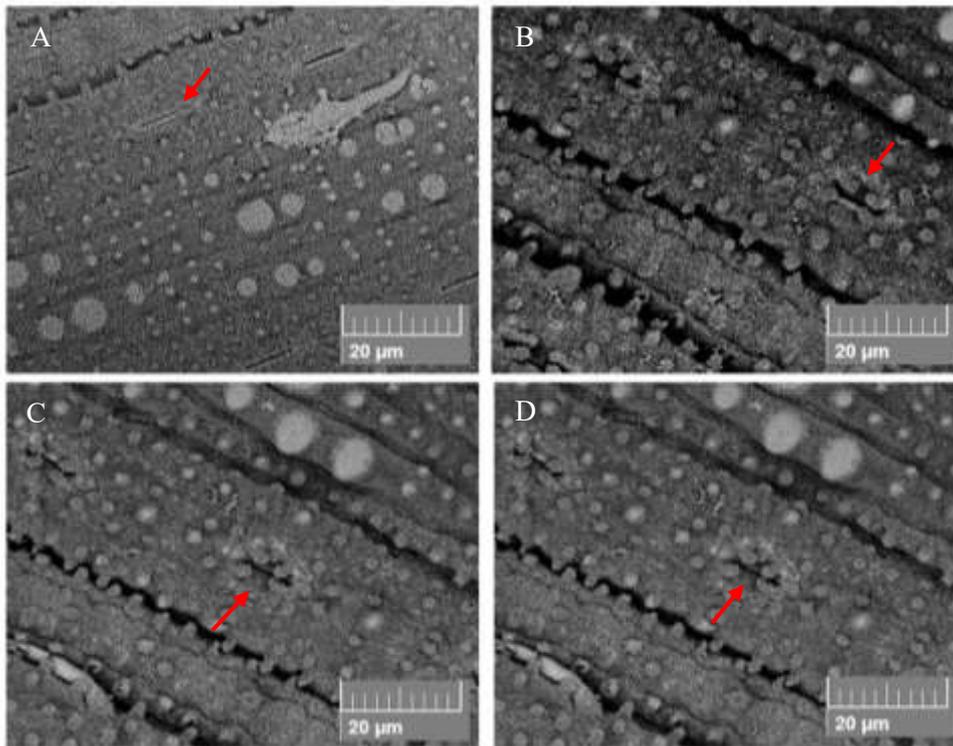


Figura 5. Eletromicrografia da face abaxial de folhas de arroz obtida de sementes tratadas com PGPR, 21 dias após semeadura em solo sem resíduo (SR) e com resíduo (CR). Controle SR (A), BRM-32111 CR (B), BRM-32113 CR (C), controle CR (D). Estômatos (setas vermelhas).

Tabela 2. Estimativa dos coeficientes de correlação linear entre as variáveis de crescimento das plantas de arroz aos 21 dias após o semeio.

	BT	CF	AF	BR	CR	Chl a	Chl b	Chl a+b	Chl a/b	A	gs	Ci	E	WUE	A / Ci
BT	-	0,931	0,259	0,182	0,429	0,633	0,216	0,500	0,125	0,040	0,430	0,749	0,282	0,328	0,869
CF		-	0,000	0,908	0,000	0,180	0,661	0,075	0,828	0,752	0,420	0,640	0,449	0,592	0,305
AF			-	0,938	0,185	0,137	0,652	0,086	0,771	0,886	0,604	0,532	0,599	0,540	0,293
BR				-	0,951	0,446	0,001	0,648	0,000	0,148	0,042	0,042	0,078	0,095	0,963
CR					-	0,879	0,777	0,792	0,949	0,530	0,124	0,185	0,137	0,174	0,750
Chl a						-	0,365	0,000	0,031	0,247	0,489	0,568	0,542	0,485	0,586
Chl b							-	0,763	0,000	0,018	0,435	0,478	0,721	0,878	0,324
Chl a+b								-	0,109	0,241	0,179	0,251	0,246	0,222	0,614
Chl a/b									-	0,062	0,584	0,574	0,842	0,995	0,325
A										-	0,838	0,742	0,334	0,496	0,890
Gs											-	0,000	0,000	0,000	0,052
Ci												-	0,000	0,000	0,002
E													-	0,000	0,045
WUE														-	0,003
A / Ci															-

Biomassa total (BT), comprimento da folha (CF), área foliar (AF), biomassa radicular (BR), comprimento da raiz (CR), clorofila (Chl), taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática ao vapor de água (gs), carbono intercelular (Ci), taxa de transpiração (E), eficiência do uso de água (EUA), eficiência da carboxilação da rubisco (A / Ci). Software Past 2.0 ($p < 0,05$).

4. Conclusões gerais

A PGPR *P. fluorescens* BRM-32111 foi tolerante a temperatura, salinidade e pressão osmótica e quando testadas nas sementes de arroz aumentaram o IVG nas sementes sobre pressão osmótica simulada. E plantas inoculadas com as PGPR (*B. pyrrocinia* - BRM-32113 e *P. fluorescens* BRM-32111) tiveram os danos amenizados através das alterações agronômicas e morfológicas sob diferentes LAS, por meio da amenização da perda de biomassa, comprimento radicular, e manutenção do potencial hídrico, aumento na densidade estomática de até 56 % e diâmetro radicular em até 35 %. Com destaque para plantas com BRM-32111 que tiveram o maior acúmulo de prolina (47%) e menor de MDA (47%). E nos ensaios com resíduos de arroz solo as plantas controle tiveram alteração no crescimento em todos os parâmetros avaliados. No entanto, em plantas inoculadas com as rizobactérias (*P. fluorescens* BRM-32111 e *B. pyrrocinia* BRM-32113), ocorreu a mitigação dos danos fisiológicos e alterações agronômicas e morfológicas como resposta a tolerância aos compostos aleloquímicos em plantas de arroz de terras altas. Estudos de campo devem ser realizados para auxiliar no manejo da cultura com uso de PGPR no cultivo de arroz de terras altas.