



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos

**RESPOSTAS DO FEIJÃO-CAUPI INOCULADO COM BACTÉRIAS
SIMBIÓTICAS E SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO**

Sulamita Santos Correa



RIO DE JANEIRO, 2019

SULAMITA SANTOS CORREA

RESPOSTAS DO FEIJÃO-CAUPI INOCULADO COM BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS E
SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos).

Orientador
JEAN LUIZ SIMÕES DE ARAÚJO

Co-orientador
GUSTAVO RIBEIRO XAVIER

RIO DE JANEIRO
AGOSTO, 2019

Floresça

AGRADECIMENTOS

Apesar de acreditar aciduamente na ciência e seus resultados sobre a não existência de um ser superior, algo interno relacionado ao bem-estar em saber que existe um ser supremo capaz de olhar por nós, se mantém vivo em mim. Por isso, agradeço ao supremo Deus e a Meishu Sama que através de seus ensinamentos vem me ajudando a levar uma vida na busca do paraíso interior e na terra. Agradeço aos meus pais Filomena da Silva Santos e Aguinaldo Santiago Correa, a minha segunda mãe Elen da Silva Santos Guimarães, minhas irmãs Kely, Evelyn e Keverly e meus cunhados em especial o Adriano Guimarães Pimentel por apoiarem a continuidade da minha carreira acadêmica e por estarem sempre me rodeando de amor. Agradeço meus orientadores Jean Araújo e Gustavo Xavier pela aprendizagem e a confiança depositada em mim nesses dois anos, e meus amigos de laboratório Rafael Pacheco, Lumi Shiose, Tatiana Maia, Jéssica Ferreira, Francine Otsuka e Isabel Alves pela ajuda e trocas. Agradeço aos pesquisadores José Ivo Baldani e Márcia Vidal, e as analistas Patricia Gitahy e Carolina Nachi por se mostrarem sempre solícitos e por toda a ajuda. Também expresso aqui minha gratidão aos técnicos Cláudio, Roberto e Ernani por toda a ajuda durante os experimentos. Aos meus amigos que fazem parte da minha vida por me ouvirem e me proporcionarem momentos fora da vida acadêmica. À Universidade Federal do Rio de Janeiro. À Embrapa Agrobiologia. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ceder os aparelhos: clorofilog e porômetro; os quais foram utilizados nas minhas análises. E por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV).

Gratidão.

RESUMO

A água é fundamental para a agricultura e, cada vez mais, tem se tornado um fator limitante para a produção vegetal. Em geral, estresses abióticos, especialmente a seca, são as principais causas de perda de produtividade em todo o mundo. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma planta rústica, e apesar de ser considerada uma cultura com potencial de cultivo em regiões com limitações hídricas, o déficit hídrico é um dos fatores que limitam a cultura. Diversos estudos têm mostrado que os efeitos do déficit hídrico podem ser amenizados através da inoculação com bactérias simbióticas pré-selecionadas. O presente trabalho avaliou a resposta do feijão-caupi inoculado com as bactérias simbióticas *Microvirga vignae* (estirpes BR 3296 e BR 3299) e *Bradyrhizobium* sp. (estirpe BR 3301) sob dois regimes hídricos: plenamente irrigado ou déficit hídrico. Foram conduzidos dois experimentos em casa-de-vegetação e os seguintes parâmetros fisiológicos foram analisados: teor de clorofilas; condutância estomática; conteúdo relativo de água (CRA), produção de biomassa de parte aérea, raiz e nódulos, o número de nódulos e o acúmulo de nitrogênio. Além disso, a expressão de genes pertencentes às categorias funcionais: metabolismo antioxidante da célula e biossíntese de ácido abscísico (ABA), responsivos ao déficit hídrico foi avaliada em nódulos de feijão-caupi submetido aos dois regimes hídricos. Além disso, foram realizados testes *in vitro* com as estirpes bacterianas a fim de avaliar a capacidade de produção de ácido-indol-acético (AIA), exopolissacarídeos (EPS), formação de biofilme e a capacidade de crescimento bacteriano sob estresse hídrico induzido por PEG-6000. Todas as estirpes foram capazes de sobreviver em meio de cultura com os potenciais osmóticos de -0,2 MPa e -1 MPa, e a formação de biofilme foi observada nos potenciais osmóticos de 0 MPa e -0,2 MPa. As estirpes também foram capazes de produzir AIA em diferentes concentrações de triptofano e produzir EPS na presença de glicose, sacarose e sorbitol. O estresse hídrico reduziu a produção de massa seca de parte aérea e acúmulo de N (nitrogênio), porém não afetou significativamente a massa seca de raiz e de nódulos. O nível de expressão dos genes *VuCPRD12*, *VuCPRD65* e *VuNCED1* foi avaliado por RT-qPCR e mostrou aumento nos nódulos sob estresse hídrico, indicando sua participação nos processos relacionados à proteção dos nódulos ao estresse abiótico. Os resultados obtidos sugerem que a inoculação com as bactérias *Microvirga vignae* (estirpes BR 3296 e BR 3299) e *Bradyrhizobium* sp. (estirpe BR 3301) tem efeitos benéficos no crescimento do feijão-caupi em condições de estresse hídrico.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, Estresse hídrico, Expressão gênica, Crescimento vegetal.

ABSTRACT

Water is fundamental for agriculture and more and more becoming a limiting factor for crop production. In general, abiotic stresses, especially drought, are the main causes of crop loss worldwide. Cowpea (*Vigna unguiculata*) is a rustic plant, and, although it is considered a crop with potential for cultivation in regions with water limitations, drought stress is one of the factors that limit its yield. Several studies have shown that the effects of water deficit can be mitigated by inoculation with pre-selected symbiotic bacteria. The present work aimed to evaluate the response of cowpea inoculation with symbiotic bacteria isolated from the semi-arid *Microvirga vignae* (strains BR 3296 and BR 3299) and *Bradyrhizobium* sp. recommended as an inoculant for cowpea (strain BR 3301) under two water regimes: fully irrigated or drought stress. Two greenhouse experiments were carried out and the following physiological parameters were analyzed: chlorophyll content; stomatal conductance; relative water content (RW), shoot, root and nodule biomass production, number of nodules and nitrogen accumulation. Furthermore, the expression of genes belonging to the functional categories: antioxidant cell metabolism and abscisic acid biosynthesis (ABA) responsive to water deficit was evaluated in cowpea nodules submitted to two water regimes. In addition, *in vitro* tests with bacterial strains were performed to evaluate the production of indole acetic acid (IAA), exopolysaccharides (EPS), biofilm formation and the bacterial growth capacity under water stress induced by PEG-6000. All strains were able to survive in culture medium with osmotic potentials of -0.2 MPa and -1 MPa, and biofilm formation was observed in osmotic potentials of 0 MPa and -0.2 MPa. The strains were also able to produce AIA at different tryptophan concentrations and produce EPS in the presence of glucose, sucrose and sorbitol. Water stress reduced shoot dry matter production and nitrogen accumulation but did not significantly affect root and nodule dry mass. The expression level of *Vu*CPRD12, *Vu*CPRD65 and *Vu*NCED1 genes was evaluated by RT-qPCR, and showed an increase in nodules under drought stress, indicating its participation in processes related to nodules protection from abiotic stress. These results suggest that the inoculation of cowpea with bacteria *Microvirga vignae* (strains BR 3296 and BR 3299) and *Bradyrhizobium* sp. (strain BR 3301) have beneficial effects on plant growth under water stress conditions.

Keyword: *Vigna unguiculata*, Drought stress, Gene expression, Plant grown.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Média anual do consumo de água no Brasil. Fonte: Agência Nacional de Águas, 2018.

Figura 2 - Ensaio realizado para verificar a formação de biofilme bacteriano das estirpes BR 3299, BR 3296, BR 3301 em meio 79 (controle) e meio 79 com 10% de PEG-6000. A e B (em triplicata sem PEG): meio controle negativo; BR 3299; BR 3296; BR 3301. C e D (em triplicata com PEG-6000): meio controle negativo; BR 3299; BR 3296; BR 3301.

Figura 3 - Amostras da microplaca utilizada para o teste de produção de AIA pelas estirpes BR 3299 e BR 3296 aos três dias de incubação, meio de cultura enriquecido com 100 µg/mL de triptofano.

Figura 4 - Plantas de feijão-caupi (cultivar Gurguéia) adubadas com N mineral ou inoculadas com as estirpes BR 3301 ou BR 3299, aos 35 DAE sob 9 dias de restrição hídrica, primeiro experimento em casa-de-vegetação.

Figura 5 - Plantas de feijão-caupi (cultivar Guariba) adubadas com N mineral ou inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3299 ou BR 3301, aos 50 DAE sob 12 dias de restrição hídrica, segundo experimento em casa-de-vegetação.

Figura 6 - Capacidade de crescimento das estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura com potencial osmótico de 0 MPa, -0,2 MPa, -1 MPa. Barra de erro representa do desvio padrão.

Figura 7 - Teste qualitativo da produção de EPS pelas estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura 79 (controle, 1% manitol) e suplementado com 2% (A) e 10% (B) das seguintes fontes de carbono: glicose, sorbitol e sacarose.

Figura 8 - Quantificação da produção de EPS ($\mu\text{g mL}^{-1}$) pelas estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura 79 sólido (controle, 1% manitol) e suplementado com 2% e 10% das seguintes fontes de carbono: glicose, sorbitol e sacarose.

Figura 9 - Quantificação da formação de biofilme pelas estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura 79 sob dois potenciais osmóticos: 0 MPa e -0,2 MPa.

Figura 10 - Quantificação da produção de AIA pelas estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301, na presença do precursor L-triptofano nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL.

Figura 11 - Teores de Clorofila *a* e *b* em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a dois regimes hídricos, segundo experimento em casa de vegetação.

Figura 12 - Teores de clorofila total em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a dois regimes hídricos, segundo experimento em casa-de-vegetação.

Figura 13 - Condutância estomática em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a dois regimes hídricos, segundo experimento em casa de vegetação.

Figura 14 - Conteúdo relativo de água em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a dois regimes hídricos, segundo experimento em casa de vegetação.

Figura 15 - Expressão relativa dos genes *VuNCED1* (9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase), *VuCPRD12* (álcool desidrogenases não metálicas de cadeia curta) e *VuCPRD65* (9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase) em nódulos de feijão-caupi submetido a dois regimes hídrica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão relativa em nódulo de feijão-caupi em condições de estresse hídrico.

Tabela 2 - Produção de biomassa e parâmetros fisiológicos de plantas de feijão-caupi (cultivar Gurguéia), inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos. Plantas coletadas aos 35 DAE, primeiro experimento em casa de vegetação.

Tabela 3 - Produção de biomassa e parâmetros fisiológicos de plantas de feijão-caupi (cultivar Gurguéia), inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral, e submetidas a dois regimes hídricos. Plantas coletadas aos 54 DAE, primeiro experimento em casa de vegetação.

Tabela 4 - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de feijão-caupi (cultivar Guariba) inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos: segundo experimento em casa de vegetação.

Tabela 5 - Número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas de feijão-caupi (cultivar Guariba) inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos: segundo experimento em casa de vegetação.

Tabela 6 - Nitrogênio total (NT) e acúmulo de nitrogênio de plantas de feijão-caupi (cultivar Guariba) inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos: segundo experimento em casa de vegetação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
AIA	Ácido-indol-acético
ANA	Agência Nacional de Águas
ATP	Trisfosfato de Adenosina
°C	Grau Celsius
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Cl	Cloro
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CRA	Conteúdo Relativo de Água
DAE	Dias Após a Emergência
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	Densidade Optica
DTT	Ditiotreitol
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPS	Exopolissacarídeos
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
Fe	Ferro
g	Gramma
GC	Guanina-citosina
H	Hidrogênio
ha	Hectare
H ₂ O	Água
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>)
Kg	Kilograma
M	Molar

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
MSN	Massa Seca de Nódulos
MSPA	Massa Seca de Parte Aérea
MSR	Massa seca de Raiz
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
ng	Nanograma
NH ₄	Amônio
nm	Nanômetro
NN	Número de Nódulos
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NT	Nitrogênio Total
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	PCR em Tempo Real Quantitativo
PEG	Polietilenoglicol
PGPR	Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>)
p/v	Peso/Volume
RNaseOUT	Inibidor de RNase
RUBISCO	Ribulose-1,5-bifosfato
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida de PCR em tempo Real
SO ₄	Sulfato
YM	Meio de cultura rico (extrato de levedura e manitol) para o crescimento de rizóbio
xg	Força Centrífuga Relativa (<i>Relative Centrifugal Force</i>)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Consumo de água no setor agrícola.....	17
2.2 <i>Vigna unguiculata</i> (feijão-caupi).....	18
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	19
2.4 Efeito do déficit hídrico em plantas.....	21
2.5 Mecanismos de ação das rizobactérias: Respostas dos microrganismos ao déficit hídrico.....	23
2.4.1 Síntese de Auxina	24
2.4.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	25
2.4.3 Formação de Biofilme	26
2.5 Alteração do padrão de expressão de genes resposivos ao déficit hídrico	27
3 HIPÓTESE	
4 OBJETIVO.....	28
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5 MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> das bactérias simbióticas <i>Microvirga Vignae</i> (estirpes BR 3299, BR 3296) e <i>Bradyrhizobium</i> sp. (BR 3301).....	29
5.1.1 Crescimento bacteriano sob condições de estresse hídrico induzido por PEG-6000	29
5.1.2 Capacidade de formação de biofilme sob condições de estresse hídrico induzido por PEG-6000	30
5.1.3 Avaliação qualitativa e quantitativa de exopolissacarídeos (EPS) em meio com diferentes fontes de carbono	31
5.1.4 Capacidade de produção de AIA em meio com diferentes concentrações de triptofano.....	32
5.2 Experimentos em casa de vegetação	33
5.2.1 Experimento I: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Gurguéia, submetido à déficit hídrico	33
5.2.2 Experimento II: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Guariba, submetido à déficit hídrico	34

5.2.3	Coleta de nódulos, produção de biomassa e acúmulo de N total.....	35
5.2.4	Avaliação dos teores de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , condutância estomática e conteúdo relativo de água (CRA).....	36
5.3	Análises estatísticas	36
5.4	Análise de expressão gênica	37
5.4.1	PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	37
5.4.1.1	Extração de RNA total dos nódulos	37
5.4.1.2	Síntese do cDNA fita simples	38
5.4.1.3	Desenho dos indicadores.....	399
5.4.1.4	Análise por RT-qPCR.....	40
6	RESULTADOS.....	40
6.1	Teste <i>in vitro</i>	41
6.1.1	Tolerância das estirpes ao estresse hídrico	41
6.1.2	Produção de EPS	41
6.1.3	Formação de biofilme sob estresse hídrico.....	44
6.1.4	Produção de AIA	44
6.2	Experimento I: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Gurguéia, submetido a dois momentos de déficit hídrico	46
6.2.1	Teor de clorofila, abertura estomática, CRA e produção de biomassa após o primeiro déficit hídrico.....	46
6.2.2	Teor de clorofila, abertura estomática, CRA e produção de biomassa após o segundo déficit hídrico.....	48
6.3	Experimento II: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Guariba, submetido a déficit hídrico	48
6.3.1	Biomassa seca de parte aérea e raiz	49
6.3.2	Número e biomassa de nódulos	49
6.3.3	Nitrogênio total e acúmulo de N na parte aérea.....	50
6.3.4	Teores de Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> e Clorofila total.....	50
6.3.5	Condutância estomática em folha de feijão-caupi	52
6.3.6	Conteúdo relativo de água (CRA)	53
6.4	Análise de expressão relativa por RT-qPCR	53
6.4.1	Expressão dos genes selecionados em nódulos de feijão-caupi	53
7	DISCUSSÃO	555

8

CONCLUSÃO.....	655
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa com grande importância social e econômica, cultivada em regiões tropicais e subtropicais distribuídas pela Ásia, África e continente americano (XIONG et al., 2016). Essa espécie é considerada uma planta rústica, adaptando-se às diferentes condições de clima e solo, e se caracteriza por apresentar tolerância à seca, embora essa capacidade varie entre as cultivares e os estádios de desenvolvimento (MENDES et al., 2007). Apesar de ser considerada uma planta rústica, os menores rendimentos da cultura são registrados em regiões que sofrem com a escassez de água. Segundo levantamento da CONAB (2018) em anos anteriores ao de 2018 a produção de feijão-caupi foi prejudicada pela falta de água no estado da Paraíba e Maranhão. Entretanto, na safra 2018 ocorreu um importante incremento de área, com o plantio de 76,7 mil hectares e com produtividade de 452 Kg ha⁻¹ na Paraíba, e um aumento na ordem de 2,5% de área plantada no Maranhão. As condições pluviométricas favoráveis acabaram por estimular principalmente pequenos e médios produtores a expandir e diversificar seus cultivos. YAHAYA et al. (2019) observaram que, embora alguns genótipos de feijão-caupi sejam considerados tolerantes à seca, estes não produziram os maiores rendimentos sob condição de estresse, apresentando redução de 33% da biomassa, 54% no número de vagens, assim como o tamanho das sementes.

A água é um recurso natural esgotável, escasso e essencial para a vida. Em algumas regiões a água disponível atende de forma precária ou pode não atender todas as necessidades da sociedade. No Brasil, o setor que mais consome água é a agricultura irrigada: 68% das derivações dos cursos d'água brasileiros são para fins de irrigação, e parte dessa água utilizada não retorna ao seu curso original, havendo redução efetiva da disponibilidade do manancial (ANA, 2018). Além disso, a água que retorna aos mananciais tem qualidade inferior à da água que foi captada, devido à aplicação de defensivos agrícolas, fertilizantes e transporte de sedimentos.

Mais de 50% do globo terrestre é árido ou semi-árido ou está sujeito a seca (ARZANESH et al., 2011), e sabe-se que o crescimento e a produtividade das culturas são afetados por diversos fatores abióticos, dentre eles a seca. O déficit hídrico dificulta os processos bioquímicos e fisiológicos necessários para o crescimento e desenvolvimento normal da planta.

Com o avanço da ciência e da tecnologia, tem sido essencial desenvolver estratégias biotecnológicas para promover o crescimento das plantas mesmo em condições onde a disponibilidade de água é baixa. A inoculação com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR, do inglês *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) pode representar uma importante abordagem biotecnológica para mitigar os efeitos do estresse e otimizar a ciclagem de nutrientes em diferentes culturas (FIGUEIREDO et al., 2016). A associação de plantas com microrganismos nativos de regiões áridas e semi-áridas, adaptados às condições de seca, pode ser eficaz em ajudar as plantas a lidarem com o déficit hídrico (SANDHYA et al., 2010). Essas bactérias podem associar-se às plantas e se beneficiar com os compostos orgânicos produzidos. Em troca, as bactérias podem promover o crescimento vegetal por meio de vários mecanismos, como por exemplo, aumento da tolerância à seca através da alteração do nível de fitormônios vegetais, como AIA (ácido-indol-acético) e ABA (ácido abscísico), síntese de enzimas como ACC deaminase (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), aumento do crescimento das raízes e a absorção de nutrientes, acumulação de osmólitos e antioxidantes (DAR et al., 2018).

O gênero *Microvirga* foi proposto por KANSO & PATEL (2003) para descrever um isolado de um aquífero geotérmico que foi posteriormente denominado *Microvirga subterranea*. Pertencente à classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhizobiales* e família *Methylobacteriaceae*, os membros desse gênero são caracterizados por serem bactérias gram-negativas, aeróbicas e em forma de bastonete (ZHANG et al., 2019). Atualmente o gênero *Microvirga* possui 16 espécies reconhecidas (<http://www.bacterio.net/microvirga.html>). Dentre essas espécies, seis foram isoladas de amostras de solo, incluindo *M. guangxiensis*, *M. makkahensis*, *M. arabica*, *M. pakistanensis*, *M. soli* e *M. indica* (ZHANG et al. 2009; VEYISOGLU et al. 2016; AMIN et al. 2016; DAHAL & KIM 2017; TAPASE et al. 2017). Outras cinco espécies foram descritas como fixadoras de nitrogênio em leguminosas: *M. lupini*, *M. lotononidis*, *M. zambiensis*, *M. osserica* e *M. vignae* (ARDLEY et al., 2012; RADL et al., 2014; SAFRONOVA et al., 2017). As bactérias simbióticas *Microvirga vignae* (estirpes BR 3299 e BR 3296) foram isoladas de nódulos de feijão-caupi em uma região conhecida como polígono da seca no nordeste brasileiro (RADL, et al., 2014).

O gênero *Bradyrhizobium* compõe uma ampla diversidade de espécies bacterianas capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em leguminosas (ORRILLO & ROMERO, 2019). Além disso, algumas estirpes são capazes de fixar nitrogênio como endofíticos (PIROMYOU et al., 2015). A estirpe BR 3301 (INPA 03-11B) (*Bradyrhizobium* sp.) é uma

bactéria simbiótica isolada de *Centrosema* sp. em uma região da Amazônia brasileira, utilizada na fabricação do inoculante comercial recomendado para feijão-caupi (MAGALHÃES, 1986; LACERDA et al., 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Consumo de água no setor agrícola

A água é um solvente universal imprescindível à vida, e um bem comum essencial para a manutenção do suprimento de alimento e para que se tenha um ambiente produtivo para todos os organismos (PIMENTEL, et al., 2004). No entanto, a demanda por água quase duplicou nos últimos 60 anos (FLORKE et al., 2013), e essa tendência continuará com previsão para aumentar em mais de 80% até 2030 (AMARASINGHE & SMAKHTIN, 2014). Espera-se que as mudanças climáticas alterem a disponibilidade de água doce em muitas regiões do mundo, causando mudanças nos padrões de temperaturas e precipitações (COLLINS, 2018). FLORKE et al. (2018) destacam que as mudanças climáticas e o aumento da demanda urbana conduzirão a uma concorrência pela água entre os setores agrícola e urbano afetando uma fração das bacias hidrográficas do mundo.

No Brasil, são frequentes os fenômenos de estiagem ou estação seca, com períodos de intensidade e efeitos variáveis ao longo do tempo (SNAK, 2018). A seca na agricultura é conhecida como fenômeno meteorológico que ocorre quando o balanço hídrico da cultura se torna negativo, ou seja, quando a entrada de água por precipitação ou irrigação é inferior ao potencial de evapotranspiração (PIMENTEL, 2004). O estresse hídrico é considerado o principal fator responsável por reduzir o rendimento das lavouras. Na agricultura a falta d'água pode ser drástica, pois não afeta somente os agricultores, mas também toda a sociedade, sendo uma das ameaças mais crítica para a segurança alimentar (FARIAS et al., 2001). Segundo dados da FAO (2017), a agricultura tem sido apontada como consumidora de 70% das reservas globais de água doce. O Brasil está entre os dez países com maior área equipada para irrigação no mundo, com cerca de 6,95 milhões de hectares. De acordo com esse levantamento, a região que apresenta a maior extensão de área irrigada é o Sudeste, com 2.709.342 hectares (ha), seguida pelo Sul, 1.696.233 ha, Centro-Oeste, 1.183.974 ha e Nordeste, 1.171.159 ha. A região Norte vem por último com 194.002 ha do total de água consumida no Brasil, 68% destina-se à irrigação, o que corresponde a $792,1 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ de água que

não retorna diretamente para os corpos hídricos (figura 1) (ANA, 2018). Um dos maiores desafios na agricultura é o aumento da eficiência no uso da água irrigada. Conforme descrito por FERNANDES et al. (2008), a eficiência no uso da água na agricultura irrigada no Brasil é cerca de 64%, sendo que os 36% restante da água são perdidos por fenômenos como a evaporação ou má condução por distribuição nas infraestruturas hidráulicas, provocando um grande desperdício. Para a FAO (2011) uma redução de apenas 10% do desperdício da água na agricultura irrigada, poderia abastecer o dobro da população mundial.



Figura 1: Média anual do consumo de água no Brasil. Fonte: Agência Nacional de Águas (ANA), 2018 (modificada).

2.2 *Vigna unguiculata* (feijão-caupi)

O *Vigna unguiculata* (L.) Walp., popularmente conhecido como feijão-caupi, é uma planta dicotiledônea pertencente à família das leguminosas, rica em proteínas (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al, 2019), e possui a capacidade de formar relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio. Seus grãos possuem entre 18% e 30% de proteína, e é rico em lisina, carboidratos, vitaminas A, C, E e do complexo B, lipídios e, dependendo da variedade, possuem alto valor energético (320.8 a 357 Kcal), (CAMPBELL et al., 2016). Apesar de ser nativo da África, o feijão-caupi é amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e nos continentes americanos (D'ANDREA et al., 2007). O cultivo dessa espécie exerce uma importante função, tanto na alimentação humana quanto animal,

constituindo uma fonte de proteína principalmente para as populações com menor poder aquisitivo, sendo, portanto, uma cultura de grande valor social e econômico (XIONG et al., 2016). O genoma do feijão-caupi foi recentemente sequenciado e tem um tamanho estimado de 640,6 Mbp (LONARDI et al., 2019). Essas informações genômicas certamente serão fundamentais para a identificação de genes relacionados com características importantes como: tolerância a estresses bióticos e abióticos, qualidade do grão, fixação biológica de nitrogênio (FBN) e aumento da produtividade.

No Brasil, até o ano de 1990, o feijão-caupi era quase que exclusivamente cultivado por pequenos e médios agricultores de base familiar e com baixa tecnologia, nas regiões Norte e Nordeste, principalmente por sua adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (GUALTER et al., 2011), com um mercado relativamente restrito. Atualmente, o feijão-caupi passou a ocupar outros cenários agrícolas, em áreas de perímetro irrigado na safrinha após a cultura de soja, e começou a ser cultivada por grandes produtores, com maior utilização de tecnologia (SOARES et al., 2006; GUALTER et al., 2011) em algumas áreas da região central do Brasil (SILVA JUNIOR et al., 2018). No Cerrado, na região do estado do Mato Grosso, o plantio do feijão-caupi tem aumentado e se tornado popular. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mais de 175.000 ha foram plantados nos anos de 2016 e 2017 (CONAB, 2017). Essa ampliação das áreas de produção, com a incorporação de produtores com perfil tecnológico, tem feito surgir novas demandas, bem como resultou na exportação do produto para outros países (ALCANTARA, 2011).

A planta de feijão-caupi é bastante rústica, mesmo assim, o estresse hídrico e térmico podem causar perdas de rendimento da cultura (MARINHO et al., 2014). GULL et al. (2018) mostraram que o estresse hídrico afeta negativamente a altura das plantas, a biomassa e o rendimento de grãos. O requerimento de água desta cultura é variável com o seu estágio de desenvolvimento, exige um valor mínimo de água na germinação e um valor máximo de água na floração e na formação das vagens (BASTOS et al., 2008).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio é o gás mais abundante na atmosfera, podendo chegar a aproximadamente 80% em relação aos demais gases, no entanto, os animais e as plantas não são capazes de absorvê-lo diretamente do ar a partir da sua forma química, N_2 . O nitrogênio é um nutriente essencial e sua importância para as plantas é dada pela sua participação no

processo de fotossíntese, e diversos outros processos metabólicos importantes para o crescimento vegetal, sendo um elemento importante em moléculas como DNA e proteínas (TAÍZ & ZIEGER, 2004; MOREAU et al., 2019). Na agricultura, dentre os macronutrientes, o nitrogênio é um dos elementos mais limitantes ao desenvolvimento das plantas, pois é um componente essencial dos aminoácidos, enzimas e co-fatores os quais são cruciais para o crescimento e fisiologia da planta (RUAN et al., 2010). Sendo necessário o seu suprimento extra na lavoura para que sejam alcançadas altas produtividades

O N mineral quando aplicado no solo percorre diferentes caminhos: uma parte é absorvida pela planta, outra é perdida do sistema solo-planta pelos processos de lixiviação, volatilização, erosão e desnitrificação (CABEZAS et al., 2000) e o restante permanece no solo em sua maioria na forma orgânica (SILVA et al., 2006). Contudo, do total de fertilizantes nitrogenados aplicados no solo, o aproveitamento pela planta é raramente superior a 50% (HUNGRIA et al., 2007), o que aumenta o custo da produção agrícola e pode provocar problemas ambientais, incluindo acidificação do solo, lixiviação e emissão de óxido nitroso (N₂O) que contribui para o efeito estufa (KAMAU et al., 2008; RUAN et al., 2019). Dessa maneira, a FBN realizada pelas bactérias capazes de converter o N₂ atmosférico em NH₃ (amônia), se torna uma alternativa para o fornecimento de N para as plantas (UNAY et al., 2019). A FBN pode diminuir ou até mesmo eliminar a dependência da cultura por fertilizantes nitrogenados, apresentando benefícios econômico-sociais e ambientais (ALCANTARA et al., 2014).

A simbiose de rizóbio com leguminosas se destaca por ser importante nos ecossistemas devido sua ampla distribuição geográfica e eficiência no processo de FBN (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). O termo rizóbio tem sido usado popularmente para designar um grupo de bactérias diazotróficas que formam nódulos nas raízes (LEITE, 2015). Nos nódulos, o rizóbio fixa o nitrogênio que é fornecido à planta, e recebe em troca compostos ricos em carbono, aminoácidos e vitaminas (UDVARD & POOLE, 2013).

O feijão-caupi, por exemplo, quando inoculado com estirpes eficientes, pode chegar a dispensar a necessidade de adubação nitrogenada (BRITO et al., 2011), podendo ocorrer aumentos no rendimento dos grãos de 30 a 50%, (SILVA et al., 2014). A simbiose eficiente ocorre quando a planta é inoculada com bactérias previamente selecionadas quanto à capacidade de nodular e fixar nitrogênio (LACERDA et al., 2004). ALCANTARA et al., (2014) avaliaram genótipos de feijão-caupi em resposta a inoculação com a BR 3299, e mostraram que há diferenças de respostas entre os genótipos para a inoculação e contribuição

da FBN variando entre 49 a 65%. Um estudo realizado por FREITAS et al., (2012) mostrou que há variabilidade da FBN entre cultivares de feijão-caupi, com contribuições variando de 47 a 79%, de acordo com a estirpe.

2.4 Efeito do déficit hídrico em plantas

A água é o principal constituinte do vegetal representando cerca de 80% a 95% da massa fresca nas plantas herbáceas, sendo necessária para o transporte de solutos e gases, como reagente no metabolismo vegetal, na turgência celular e na abertura dos estômatos (LARCHER, 2006). A produtividade das culturas pode ser afetada por vários tipos de estresses como a alta ou baixa temperatura, a salinidade e a restrição hídrica, pois qualquer fator de influência externa, biótico ou abiótico, que causa danos à planta pode ser considerado um estresse (TAIZ & ZEIGER, 2009). Entende-se como estresse biótico as interações com outros organismos, como ataques por insetos-praga, fungos, bactérias, nematóides e vírus (KRISHANIA et al., 2013). Já o estresse abiótico refere-se àqueles que regulam o crescimento da planta, como luminosidade, disponibilidade de nutrientes, temperatura e disponibilidade hídrica (DOLFERUS, 2014). O tempo para o déficit de água causar reduções de crescimento depende do tipo de planta, da capacidade de retenção de água no solo, das condições atmosféricas, e principalmente da diferença de pressão de vapor entre a folha, o ar e a temperatura, e de fatores que controlam a evapotranspiração (PIMENTEL, 2004). As respostas das plantas à seca são caracterizadas por alterações morfológicas e fisiológicas. As plantas possuem estratégias de adaptação ao período de restrição hídrica, tais como: desenvolvimento de um sistema radicular profundo, diminuição do crescimento de ramos, senescência foliar e dormência; redução da abertura dos estômatos para diminuir a perda de água (ZHAO et al., 2014); modificação da atividade de enzimas do metabolismo de nitrogênio e de carbono; e mudanças nos teores de antioxidantes (RIBEIRO et al., 2013).

Sob condições de baixa disponibilidade hídrica, algumas plantas perdem a turgência celular, levando à redução da condutância estomática e do potencial de água na folha (NOGUEIRA & SANTOS, 2000). CARVALHO et al. (2019) avaliando a resposta do feijão-caupi sob estresse hídrico, verificaram uma menor eficiência no uso da água e redução do conteúdo de clorofila em alguns genótipos. O fechamento estomático pode ser um indicativo de envio de sinais químicos da raiz para a parte aérea ou mesmo de substâncias osmorreguladoras que podem influenciar no fechamento estomático. Assim, o fechamento dos

estômatos representa equilíbrio entre duas pressões conflitantes: as vantagens ligadas ao rápido fechamento estomático para minimizar a perda de água, e a necessidade de permanecer com os estômatos abertos para maximizar a assimilação de carbono (VICO et al., 2011). O ácido abscísico (ABA) tem sido considerado um sinal químico relevante no desenvolvimento vegetal sob restrição hídrica (DAVIES & ZHANG, 1991). Existe uma relação bastante significativa entre a concentração de ABA e fechamento dos estômatos. CASTRO et al. (2019) observaram que o baixo potencial hídrico em toda planta praticamente dobrou as concentrações de ABA no xilema, coincidindo com o fechamento dos estômatos em plantas de soja. O fechamento estomático também pode ser influenciado com a diminuição do turgor e do potencial hídrico foliar (LAWLOR, 2002).

A restrição de água também afeta a fotossíntese por diferentes mecanismos: redução da abertura do estômato diminuindo a entrada de CO₂; redução da síntese de clorofila; diminuição da atividade de enzimas envolvidas nos sistemas fotossintéticos; alteração da taxa de transpiração foliar (DUBEY et al., 2019). Segundo LAWLOR (2002) a limitação da fotossíntese também acontece em consequência da menor síntese de ATP (trifosfato de adenosina) pela ATP sintase com o decaimento do conteúdo relativo de água (CRA). A síntese de ATP parece ser afetada pela inativação progressiva ou pela perda do fator de acoplamento da enzima ATP sintase, pela redução da capacidade de transporte de elétrons e prótons, ou ainda por um gradiente de prótons inadequado no tilacóide (LAWLOR, 2002). O ATP possui um papel vital no metabolismo. A diminuição desta molécula energética influencia vários processos como a síntese de aminoácidos, proteínas e a atividade de enzimas nas células. MACHADO et al. (2013) verificaram redução na atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco) acceptor primário de CO₂, em plantas de cana-de-açúcar submetidas ao deficit hídrico. Outra enzima que pode apresentar diminuição na sua atividade causado pelo déficit hídrico é a nitrato redutase, enzima que cataliza a etapa da redução de nitrato (NO₃⁻) à nitrito (NO₂⁻) na assimilação de nitrogênio (FOYER et al., 1998).

O estresse hídrico também tem efeito negativo no desenvolvimento vegetal levando a um efeito biofísico como a redução da turgidez, afetando a expansão foliar e o alongamento das raízes (REIS et al., 1988). Como resposta morfológica ao déficit hídrico, há restrição ao acúmulo de biomassa, prejudicando tanto os estádios iniciais das plantas como os estádios mais tardios, limitando o número de folhas e reduzindo a área foliar, o número e as taxas de crescimento dos ramos, e o crescimento do caule (OSÓRIO et al., 1998). Com a área foliar

menor a planta transpira menos, o que ajuda na conservação do suprimento de água limitado no solo por um período mais longo (KERBAUY, 2009).

2.5 Mecanismos de ação das rizobactérias: respostas dos microrganismos ao déficit hídrico

Um dos principais fatores que afetam a produtividade agrícola é a falta de água, portanto é de extrema importância entender como as plantas respondem a essa alteração ambiental para traçar estratégias e evitar prejuízos (MARCOS, 2012). Tendo em vista os efeitos negativos causados pelo déficit hídrico, e a crescente demanda por alimentos, há necessidade de ampliar os esforços para entender a relação entre plantas e bactérias (DAR et al., 2018). Uma das estratégias que vem sendo estudada para atenuar os efeitos negativos causados pelo estresse hídrico tem sido a inoculação com microrganismos presentes no solo (NAVNITA et al., 2015). Milhares de microrganismos habitam o sistema radicular das plantas, formando uma comunidade ecológica complexa que pode influenciar o crescimento e desenvolvimento vegetal através da ação de suas atividades metabólicas (SCHMIDT et al., 2014). Nesse contexto, as PGPRs podem desempenhar um papel significativo amenizando os efeitos adversos causados pela seca (VURUKONDA et al., 2016). As rizobactérias benéficas colonizam a rizosfera e promovem o crescimento das plantas através de mecanismos diretos ou indiretos (GROVER et al., 2011). A composição da comunidade microbiana próximo a raiz é muito mais rica e diversa quando comparado com o solo mais distante das raízes. Essa zona específica do solo é chamada de rizosfera (VERBON et al., 2019). A rizosfera está associada ao acúmulo de fonte de carbono liberado pelas raízes, que serve como fonte rica em energia para a microbiota que habita esse nicho (LUNDBERG et al., 2012). Em troca, micróbios mutualistas podem fornecer à planta, nutrientes fisiologicamente acessíveis e fitormônios que melhoram o crescimento das plantas, suprimem fitopatógenos ou podem ajudar as plantas a resistirem ao calor, à salinidade e à seca (MENDES et al., 2011; ARAUJO et al., 2012). Alguns possíveis mecanismos de tolerância ao déficit hídrico por meio das rizobactérias incluem: produção de fitormônios como ácido abscísico (ABA), ácido giberélico, citocininas e ácido-indol-acético (AIA); síntese de ACC deaminase, o qual reduz o nível de etileno nas raízes; indução de resistência sistêmica por compostos produzidos por bactérias; solubilização de fósforo, contribuindo com a nutrição vegetal; formação de biofilme bacteriano e produção e

exopolissacarídeos, que aumenta a nutrição e hidratação da raiz (GLICK, 2012; NICO et al., 2012; AHEMAD & KIBRET, 2013; KAVAMURA, et al., 2013; TIMMUSK et al., 2014).

2.5.1 Síntese de Auxina

A auxina é um fitohormônio vegetal que regula diversos processos celulares e de desenvolvimento das plantas. Dentre as auxinas, o ácido 3-indol-acético (AIA) é considerado o mais importante no que se refere à regulação do crescimento das plantas (EGAMBERDIEVA et al., 2016). O AIA funciona como uma molécula de sinalização na regulação do desenvolvimento da planta, o que inclui a organogênese, regulação de genes e repostas celulares como a expansão, divisão e diferenciação das células (RYU & PETTEN, 2008). A síntese de AIA por microrganismos vem sendo estudada faz algum tempo, e foi reportado que 80% dos microrganismos isolados da rizosfera possuem a capacidade de sintetizar esse fitohormônio (PARRAY et al., 2016). A biossíntese do AIA tem como precursor o aminoácido triptofano, e existem diferentes vias metabólicas para a biossíntese do AIA bacteriano (THEUNIS et al., 2004; SPAEPEN et al., 2007). São descritas pelo menos cinco rotas de biossíntese utilizando este precursor, as quais são nomeadas pelos seus intermediários: indol-3-acetamina, indol-3-acetonitrila, indol-3-piruvato, triptamina e oxidase da cadeia lateral do triptofano (WOODWARD & BATEL, 2005).

A interação entre rizobactéria sintetizadoras de AIA e plantas pode levar a diversos resultados benéficos na planta (CONSTRACURTA & VALDERLEYDEN, 1996; SPAEPEN et al., 2007). A produção de AIA por bactérias associadas às raízes das plantas pode estimular a produção de células radiculares, aumentando a área e o comprimento da superfície das raízes, facilitando a absorção de água e nutrientes presentes no solo (EGAMBERDIEVA et al., 2016). De acordo com SPAEPEN et al. (2007), a biossíntese de AIA pelas bactérias pode auxiliar as plantas no processo de tolerância a alguns estresses ambientais que incluem déficit hídrico, pH ácido e limitação de carbono.

Geralmente o AIA secretado por rizobactérias interfere em muitos processos do desenvolvimento vegetal porque a quantidade de AIA endógeno da planta pode ser alterado pelo efeito do AIA exógeno secretado pelas bactérias do solo (GLICK, 2012; SPAEPEN et al., 2007). Muitas espécies de rizobactérias têm mostrado a capacidade de produzir AIA (AHEMAD & KHAN, 2012). ARAFA et al. (2018) observaram um incremento de massa seca de raiz e parte aérea em plantas de feijão-caupi inoculadas com estirpes de rizóbios

sintetizadores de AIA. O AIA está envolvido em processos que são essenciais para a formação dos nódulos: divisão e diferenciação celular, e a formação do feixe vascular (AHEMAD & KIBRET, 2014). TULLIO et al. (2019) mostraram estímulo na nodulação de plantas de feijão comum devido ao efeito do ácido indol-3-acético produzido por *Rhizobium tropici* (CIAT 899). CAMERINI et al. (2008) mostraram que a leguminosa *Vicia hirsute* inoculada com *Rhizobium leguminosarum* formou nódulos radiculares fixadores de nitrogênio contendo até 60 vezes mais AIA do que os nódulos formados por estirpes selvagens.

2.5.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Os exopolissacarídeos (EPS) são compostos formados por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos extracelulares sintetizados por alguns fungos e bactérias, encontrados ligados à superfície das células ou excretados para o meio extracelular (WINGENDER et al., 1999; SEESURIYACHAN et al., 2012). As bactérias podem produzir dois tipos de EPS: EPS capsular, em que o polímero está associado à superfície celular e, *slime* EPS, o qual pouco se associa à superfície da célula, sendo excretado no meio (NGOUFACK et al., 2004). Os EPSs auxiliam a proteção da bactéria contra a dessecação em condições de restrição hídrica por aumentar a retenção de água e regular a difusão da fonte de carbono orgânico (CHENU & ROBERSON, 1996) e possuem um papel importante na formação de biofilme e aderência à superfície, mudanças na estrutura do solo, por influenciar na agregação microbiana, ajuda na mineralização de cálcio e proteção contra condições ambientais extremas como: estresse hídrico, alta temperatura, radiação UV e salinidade (SOUZA & GARCIA, 2004; ERCOLE et al., 2007; SILAMBARASAN et al., 2019). Diante de fatores ambientais desfavoráveis tal como seca, algumas bactérias como *Rhizobium phaseoli* têm a capacidade de sobreviver devido à produção de EPS (HUSSAIN et al., 2018).

As rizobactérias que produzem EPS auxiliam as plantas a tolerar o estresse hídrico devido o EPS criar um microambiente que retém a água e que seca mais lentamente, protegendo assim as raízes das plantas contra a dessecação (VURUKONDA et al., 2016). Além disso, o EPS liberado no solo pode ser adsorvido pela superfície da argila devido às pontes catiônicas, ligação hidrogênio, forças de *Van der Waals* e mecanismos de adsorção aniônica, formando uma cápsula protetora ao redor dos agregados (TISDALL et al., 1982; SANDHYA et al., 2009).

Plantas inoculadas com bactérias que produzem EPS têm mostrado resistência ao estresse abiótico, em especial o estresse hídrico (BENSALIM et al., 1998; ASHRAF et al., 2004). A produção de EPS por rizobactéria proporciona aumento dos agregados do solo e ajuda a manter o potencial da água alto ao redor das raízes, assim aumenta a absorção de água e nutrientes pelas raízes, influenciando no crescimento da planta e protegendo contra o estresse hídrico (SELVAKUMAR et al., 2012). KHAN et al. (2019) mostraram que rizobactérias isoladas de plantas de trigo promoveram o crescimento dessas plantas sob condições de seca. Além disso, esses autores relatam que devido ao seu papel no manejo integrado dos nutrientes e na proteção contra a dessecação conferida pelos EPS, as rizobactérias mostraram múltiplos benefícios no crescimento e rendimento da cultura KHAN et al., 2019).

2.5.3 Formação de biofilme

O biofilme pode ser definido, de modo geral, como uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, carboidratos extracelulares, proteínas ou até mesmo DNA, produzidos por bactérias, podendo estar aderido às superfícies bióticas ou abióticas (BRANDA et al., 2005). A formação do biofilme pode incluir uma única espécie ou várias espécies microbianas, e de acordo com FLEMMING & WINGENDER (2010) sua manutenção depende diretamente da produção e qualidade de EPS.

A formação de biofilme é um mecanismo de adaptação das bactérias que contribui para a sobrevivência em condições adversas (MAGDANOVA & GOLYASNAYA, 2013). A maioria das rizobactérias usam o *quorum sensing* para a formação e funcionamento do biofilme (BEGUM et al., 2019). Através do *Quorum Sensing* as bactérias regulam a expressão de genes envolvidos em processos celulares como a formação de biofilme (PIETERSE et al., 2016). O biofilme geralmente é composto por EPS e forma uma matriz gelatinosa em que os microrganismos permanecem unidos e aderidos a superfícies, protegendo contra condições ambientais extremas como a seca e alta temperatura (SILAMBARASAN et al., 2019). Os biofilmes auxiliam no suporte contra as forças físicas, na resistência a antibióticos, na proteção contra fitopatógenos e proteção contra a dessecação (MONIER & LINDOW, 2003). Em condições desfavoráveis, a formação de biofilme é desencadeada, levando a alterações no microambiente e na expressão de genes envolvidos na maturação da matriz (JEFFERSON, 2004). SANDHYA et al. (2009) mostraram que a formação de biofilme por *Pseudomonas*

putida na superfície das raízes de girassol protegeu as plantas contra o déficit hídrico. Para as bactérias fixadoras de nitrogênio que formam nódulos em leguminosas, a formação de biofilme tem interferências em etapas críticas da simbiose, influenciando na motilidade e na ligação das bactérias aos pêlos radiculares e formação de nódulos (TAW et al., 2015).

2.6 Alteração do padrão de expressão de genes responsivos ao déficit hídrico

Os mecanismos de percepção de estresses abióticos em plantas envolvem vias de transdução de sinais, as quais iniciam uma cascata de eventos moleculares que levam à indução ou repressão de genes envolvidos com a resposta ao estresse (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; NAKASHIMA et al., 2014). Tais respostas são mediadas pela ativação de proteínas denominadas fatores transcricionais que irão se ligar a domínios específicos presentes nas regiões promotoras de genes induzidos pelo estresse (KIZIS et al., 2001; SHINOZAKI, 2003). Esses genes irão atuar direta ou indiretamente na proteção da célula contra o estresse (BRAY, 2004). A avaliação qualitativa e quantitativa dos níveis de transcritos desses genes nas células vegetais possibilita a identificação de sua função metabólica (KUHN et al., 2001).

Diversos estudos moleculares têm identificado genes responsivos ao déficit hídrico. Uma grande parte dessas respostas são mediadas pelo ácido abscísico (ABA), um fitohormônio vegetal que atua na sinalização ao estresse hídrico (QIN & ZEEVAART, 1999; ZOU et al., 2009). O ABA desempenha um papel vital na dormência e germinação de sementes, na arquitetura das raízes, na senescência foliar, na regulação dos estômatos e no desenvolvimento de plantas (FINKELSTEIN, 2013). É também conhecido como fitohormônio do estresse, por promover tolerância ao estresse abiótico como, estresse hídrico e salino (SAH & REDDY, 2016). Sob condições de seca ou alta concentração de sais, os níveis elevados de ABA endógenos promovem o fechamento estomático, o que é essencial para diminuir a perda de água. Pode também induzir a expressão de protetores osmóticos e genes relacionados com antioxidantes (FUJITA et al., 2011; YE & ZHANG, 2012). Em *Arabidopsis thaliana* o sinal de seca é mediado por vias de transdução de sinais dependentes e independentes de ABA para regular a expressão de genes que estão envolvidos na tolerância à seca (SHINOZAKI & YAMAGUCHISHINOZAKI, 2000). Elementos regulatórios de ação em *cis* ABRE (do inglês, *ABA-responsive element*) e DRE/CRT (Rehydration-Responsive Element /C-repeat) estão envolvidos com a resposta dependente e independente da sinalização

por ABA, respectivamente (NAKASHIMA & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2010). A biossíntese do ABA em plantas superiores ocorre por meio da enzima dioxigenase 9-cis-epoxicarotenoide (NCED) que faz a clivagem oxidativa de 9-cis-violaxantina e/ou 9-cis-neoxantina para produzir xantoxina, um epóxido de 15 carbonos semelhante ao ABA (NAMBARA & MARION, 2005).

IUCHI et al. (2000) mostraram o aumento na expressão da enzima 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) em resposta ao déficit hídrico em feijão-caupi. Esta enzima regula a etapa-chave na via de biossíntese de ABA (TAIZ & ZEIGER, 2009), levando a um aumento dos níveis endógenos de ABA em plantas submetidas a condições de estresse. O acúmulo de ABA nas células de plantas sob estresse hídrico estimula o fechamento dos estômatos e regula a expressão de vários genes, aumentando a capacidade das plantas em suportar as condições de estresse (RECCHIA et al, 2018). FIGUEIREDO et al. (2018) observaram uma tendência para o aumento de ABA em plantas de feijão comum sob déficit hídrico enquanto a condutância estomática estava reduzida. HUANG et al. (2019) também avaliaram a expressão de genes NCED em plantas de arroz submetidas ao estresse salino e hídrico, e observaram que esse gene foi significativamente induzido, e estava envolvido no aumento da tolerância da planta às tensões de estresse por aumentar o conteúdo de ABA.

3 HIPÓTESE

As bactérias simbióticas isoladas da região semiárida brasileira *Microvirga vignae* (estirpes BR 3296 e BR 3299) e a bactéria *Bradyrhizobium* sp. (estirpe BR 3301), utilizada como inoculante para o feijão-caupi, possuem mecanismos que podem auxiliar o feijão-caupi a tolerar os efeitos adversos causados pelo estresse hídrico.

4 OBJETIVO

Avaliar o crescimento e o desenvolvimento de plantas de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com bactérias simbióticas, e avaliar a expressão de alguns genes nos nódulos dessas plantas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS), formação de biofilme e o crescimento das estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura com o potencial osmótico reduzido e produção de ácido-indol-acético (AIA), em condições *in vitro*;
- Avaliar o teor de clorofila, a condutância estomática e o conteúdo relativo de água (CRA) em plantas de feijão-caupi inoculadas com as estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 sob déficit hídrico e em condições normais de irrigação.
- Analisar a produção de biomassa, a nodulação e o acúmulo de N das plantas de feijão-caupi inoculadas com as estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 sob déficit hídrico e em condições normais de irrigação;
- Determinar por RT-qPCR o nível de expressão dos genes *VuNCED1*, *VuCPRD12* e *VuCPRD65* em nódulos de feijão-caupi submetidos ao déficit hídrico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Avaliação *in vitro* das bactérias simbióticas *Microvirga vignae* (estirpes BR 3299 e BR 3296) e *Bradyrhizobium* sp. (BR 3301)

5.1.1 Crescimento bacteriano sob condições de estresse hídrico induzido por PEG-6000

Para verificar a tolerância das estirpes BR 3299, BR 3296 e BR 3301 às condições de estresse hídrico, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura TY (ANEXO A) com e sem adição de polietilenoglicol (PEG) 6000. Foi avaliado o crescimento das bactérias em duas concentrações de PEG-6000: 10% e 30%, os quais correspondem aos níveis de potenciais osmóticos -0,2 MPa e -1 MPa, respectivamente. Para obter os referidos potenciais osmóticos, foi calculada a quantidade de PEG-6000 com base em MICHEL & KAUFMANN (1973). Para o preparo do pré-inóculo, as bactérias foram previamente cultivadas em 25 mL de meio TY a 30°C, em 180 rpm durante 48 h, até atingir a densidade óptica (DO₆₀₀) de aproximadamente 0,8. Após esse período, a partir do pré-inóculo foram inoculadas aproximadamente 10⁸ células bacterianas em meio de cultura TY com diferentes concentrações de PEG-6000: 0%; 10% e 30%, e incubadas por 24 h, nas mesmas condições de crescimento descritas acima. Todo o ensaio foi realizado em triplicata. Foi realizada a

leitura da densidade óptica (DO) utilizando o espectrofotômetro (KASUAKI IL-592) no comprimento de onda 600 nm, após 24 h de cultivo.

5.1.2 Capacidade de formação de biofilme sob condições de estresse hídrico induzido por PEG-6000

As estirpes BR 3299, BR 3296, BR 3301 foram cultivadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura 79 (ANEXO B) sem corante durante dois dias sob agitação de 180 rpm a 30°C. Após esse intervalo de cultivo a DO₆₀₀ foi ajustada para 0,1. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 200 µL de meio 79, sem corante, e meio 79 com adição de 10% de PEG-6000 (potencial osmótico -0,2 Mpa) (Figura 2). Em seguida foram adicionados em cada poço, 20 µL do inóculo bacteriano. Todo o ensaio foi realizado em triplicata biológica e triplicata técnica. Para o tratamento controle absoluto (sem bactéria) foi adicionado meio 79 sem PEG ou com 10% de PEG-6000. A placa foi incubada sob as condições descritas acima durante 3 dias, e a avaliação da formação de biofilme foi realizada seguindo a metodologia de SANHUEZA (2007) adaptada. Após esse período de incubação os caldos de cultivo foram descartados e foram cuidadosamente realizadas cinco lavagens com 200 µL de água ultrapura (Milli-Q[®]) estéril. Esta etapa visa à remoção das células frouxamente aderidas. Após as lavagens as placas secaram em temperatura ambiente e foi adicionado em cada poço 150 µL de cristal violeta 1% para corar durante 45 minutos. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e secas conforme descrito acima. Neste momento pode-se observar a coloração arroxeada das paredes das placas, indicando a formação de biofilme. Foram adicionados 200 µL de etanol absoluto em cada poço, o álcool elui o cristal violeta presente no biofilme. Após aguardar 1 minuto, foi realizada a leitura da DO₅₆₀ em leitor de microplaca (ZENYTH 200st).

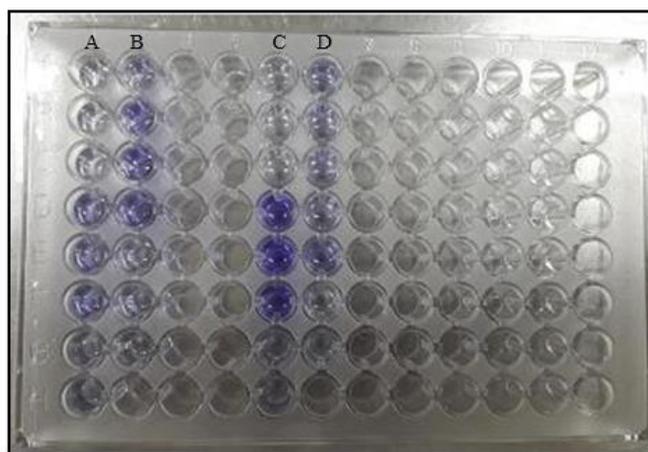


Figura 2: Ensaio realizado para verificar a formação de biofilme bacteriano das estirpes BR 3299, BR 3296, BR 3301 em meio 79 (controle) e meio 79 com 10% de PEG 6000. A e B (em triplicata sem PEG): meio controle negativo; BR 3299; BR 3296; BR 3301. C e D (em triplicata com PEG-6000): meio controle negativo; BR 3299; BR 3296; BR 3301.

5.1.3 Avaliação qualitativa e quantitativa de exopolissacarídeos (EPS) em meio com diferentes fontes de carbono

A avaliação qualitativa da produção de EPS foi feita de acordo com BRAGA (2016). Para verificar a capacidade das bactérias de produzir EPS, as estirpes BR 3299, BR 3296 e BR 3301 foram cultivadas em meio de cultura 79 sólido acrescentado com 2% ou 10% de diferentes fontes de carbono: sacarose, sorbitol e glicose, e meio controle (1% de manitol), de modo a verificar as melhores condições de produção, em pH 6,8. As bactérias foram cultivadas em meio 79 líquido até atingirem a DO_{600} de 1,0 correspondente a 10^9 células/mL de meio de cultivo. Posteriormente foi realizada a pipetagem de 10 μ L em triplicata na placa contendo meio 79 sólido com as diferentes fontes de carbono com diferentes concentrações, durante quatro dias em estufa a 30°C. Todo o ensaio foi realizado em triplicata biológica e triplicata técnica. Após esse período de cultivo, a produção qualitativa de EPS foi caracterizada visualmente pela presença ou ausência da substância mucoide. Logo em seguida a confirmação de produção de EPS foi realizada pelo método químico, misturando uma alça de platina impregnada com a colônia em 1 mL de álcool etílico absoluto gelado. Quando o EPS precipita indica produção positiva, enquanto o meio turvo caracteriza que não houve produção de EPS (KAVAMURA, et al., 2013).

Para a avaliação quantitativa de produção de EPS, as estirpes BR 3299, BR 3296 e BR 3301 foram cultivadas em meio líquido 79 com adição de três fontes de carbono (sacarose, glicose, sorbitol) a 2% ou 10%, em pH 6,8. Para o preparo do pré-inóculo as estirpes foram

cultivadas em meio 79 a 30°C, 180 rpm durante 48 h. Após esse período, foram inoculadas 10⁶ células em 25 mL de meio 79 modificado com as diferentes fontes de carbono. As estirpes cresceram durante três dias nas diferentes fontes de carbono, e logo após esse período a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por vinte minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e despejado em 125 mL de etanol absoluto gelado, e colocado no freezer (-20°C) durante quatro dias para que ocorresse a precipitação do EPS presente no sobrenadante. Após esse período de incubação, a solução foi centrifugada novamente a 10.000 g por 15 minutos a 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura estéril. Todo o ensaio foi realizado em triplicata biológica e triplicata técnica. Em seguida, o EPS foi quantificado pelo método colorimétrico para determinação de açúcares de acordo com DUBOIS et al (1956) modificado. Em 0,5 mL da amostra foi adicionado 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. A amostra foi mantida em repouso por 20 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro (KASUAKI IL-592) a 490 nm, utilizando-se uma curva de solução padrão de glicose (0,1%) nas seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL.

5.1.4 Capacidade de produção de AIA em meio com diferentes concentrações de triptofano

As estirpes BR 3299, BR 3296, BR 3301 foram previamente cultivadas em meio líquido 79 a 30°C, 180 rpm durante 48 h. Após esse período de incubação, 10⁸ células foram transferidas para erlenmeyer contendo 25 mL de meio de cultura 79 na ausência e presença de diferentes concentrações de triptofano (0, 25, 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL), sendo utilizadas três repetições. Após três, cinco e sete dias de crescimento sob agitação rotatória (180 rpm) a 30°C, foi retirada uma alíquota do cultivo e centrifugada a 5.000 rpm durante dez minutos e realizada a dosagem de auxinas no sobrenadante. Para a análise colorimétrica de AIA foram utilizadas 100 µL do reagente de Salkowski [(FeCl₃ 0,5 M + HClO (35%)] e 150 µL das amostras (em triplicata), a microplaca foi agitada e incubada no escuro durante trinta minutos (Figura 3), e em seguida a quantificação de AIA foi realizada através DO₅₄₀ em leitor de microplaca (ZENYTH 200st). As concentrações de AIA foram calculadas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de AIA sintético (ANEXO C).

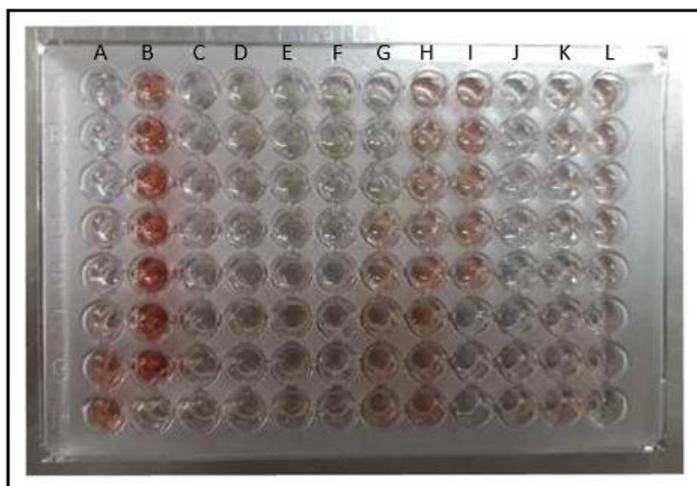


Figura 3: Avaliação da produção de AIA pelas estirpes BR 3299 e BR 3296 aos três dias de incubação, meio de cultura enriquecido com 100 $\mu\text{g/mL}$ de triptofano. A e B: pontos da curva; C ao F: controle negativo nas concentrações de 0, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ de triptofano; G ao I: BR 3299 nas concentrações de 0, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ de triptofano; J ao L: BR 3296 nas concentrações de 0, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$ de triptofano.

5.2 Experimentos em casa de vegetação

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação localizada na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ,

5.2.1 Experimento I: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Gurguéia, submetido a déficit hídrico

O deliamento experimental foi realizado em blocos casualizados, com quatro repetições. O esquema fatorial foi $3 \times 2 \times 2$ composto por três fontes de N, dois regimes de rega (plenamente irrigado e déficit hídrico) e duas coletas, totalizando 48 vasos. As fontes de N foram: estirpe BR 3299, estirpe BR 3301 e N mineral, na dose equivalente a 40 Kg ha^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cada vaso apresentava a capacidade de 1 Kg, preenchido com substrato composto por areia e vermiculita na proporção 2:1. Foram semeadas cinco sementes (previamente desinfestadas com etanol 70% e hipoclorito de sódio 1,5%) por vaso e aos 11 dias após a emergência (DAE) foi realizado um desbaste restando duas plantas. As bactérias foram previamente cultivadas em meio de cultura 79 com agitação constante (180 rpm) a 30°C durante três dias, sendo inoculadas 1 mL de inóculo no momento da semeadura. Os vasos

foram pesados e irrigados regularmente com água destilada e semanalmente foi fornecida solução nutritiva de acordo com PACHECO et al. (2017).

O 1º déficit hídrico se deu aos 26 DAE com a suspensão da irrigação das plantas destinadas a esse tratamento por 9 dias. Aos 35 DAE foi realizada a 1ª coleta e obtidos os parâmetros fisiológicos e de biomassa das plantas (Figura 4). O 2º déficit hídrico foi realizado aos 44 DAE com a suspensão da irrigação das plantas destinadas a esse tratamento por 11 dias. Aos 54 DAE foi realizada a 2ª coleta e obtidos parâmetros fisiológicos e de biomassa das plantas.

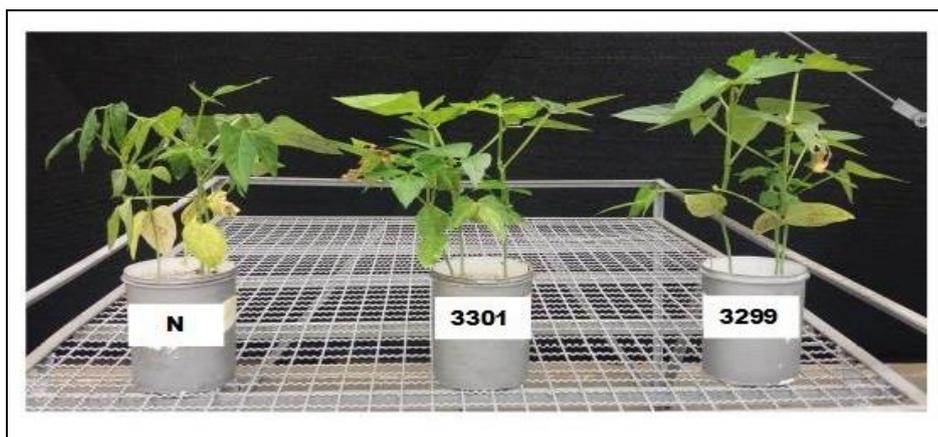


Figura 4: Plantas de feijão-caupi aos 35 DAE (cultivar Gurgueia) adubadas com N mineral ou inoculadas com as estirpes BR 3301 ou BR 3299 após 9 dias de restrição hídrica. Autor: Sulamita Correa.

5.2.2 Experimento II: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Guariba, submetido a déficit hídrico

Para o segundo experimento foi utilizado o deliamento em blocos casualizados e esquema fatorial de 4x2 com oito repetições, das quais quatro repetições foram destinadas para coleta de material para análises dos parâmetros fisiológicos, nodulação, biomassa e N total, e as outras quatro repetições foram utilizadas para as análises de RT-qPCR. Tais conjuntos de repetições foram analisados de forma independente como se fossem dois experimentos separados. Foram avaliadas quatro fontes de N: estirpes BR 3299, BR 3296 e BR 3301 e N mineral na dose equivalente a 60 Kg ha⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e dois regimes hídricos (plenamente irrigado e déficit hídrico). Em vasos de 2 Kg preenchidos com pedrisco número 0 e vermiculita na proporção 1:1 foram semeadas cinco sementes e 1,0 mL de inoculante líquido foi adicionado no momento da semeadura. O preparo do inoculante foi realizado

conforme descrito no item 5.2.1. Aos 8 DAE foi realizado o desbaste para três plantas por vaso. Os vasos foram pesados semanalmente e foi adicionado solução nutritiva (PACHECO et al., 2017) e água destilada até os 38 DAE, quando foi iniciado o tratamento de déficit hídrico durante 12 dias. Aos 50 DAE foi realizada a coleta (Figura 5). As plantas do conjunto de repetições destinadas à análise de RT-qPCR foram colhidas, as raízes foram lavadas, os nódulos destacados e imediatamente congelados em N líquido e armazenados em ultra-freezer a -70 °C para posterior extração de RNA total. Das plantas do outro conjunto de quatro repetições foram obtidos os dados fisiológicos (teores de clorofila, condutância estomática e CRA), a produção de biomassa (parte aérea, raiz e nódulo), número de nódulos e o acúmulo de N total.

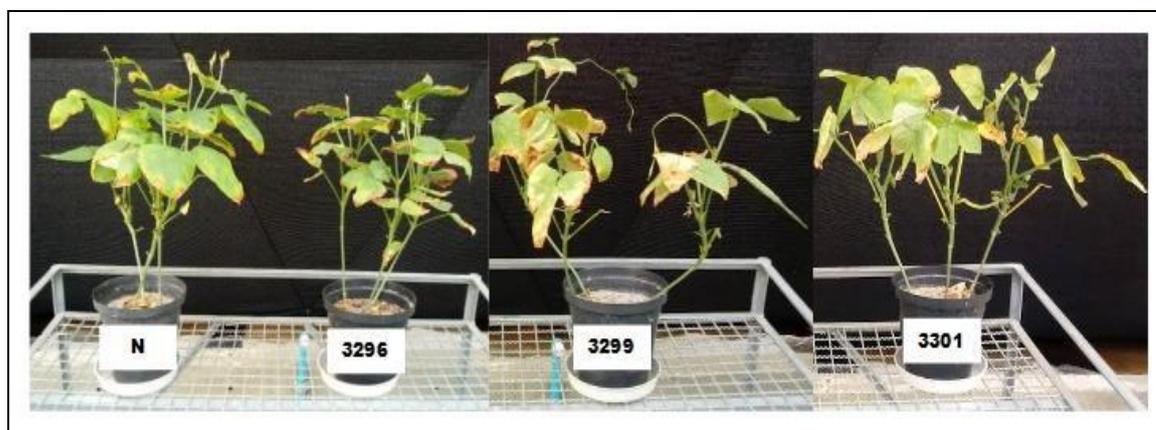


Figura 5: Plantas de feijão-caupi (cultivar Guariba) adubadas com N mineral ou inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3299 ou BR 3301, aos 50 DAE após 12 dias de restrição hídrica. Autor: Sulamita Correa.

5.2.3 Coleta de nódulos, produção de biomassa e acúmulo de N total

Em ambos os experimentos em casa-de-vegetação, as plantas foram coletadas e separadas em parte aérea e raiz com um corte na base da planta. As raízes foram lavadas, os nódulos destacados e contados. Todo o material foi acondicionado em sacos de papel devidamente identificados, seco em estufa a 60°C até peso constante, quando foi realizada a pesagem da biomassa seca da parte aérea, raiz e nódulos. Para o segundo experimento, as amostras de parte aérea foram moídas em moinho de facas tipo Wiley, para serem analisadas quanto ao teor de N-total pelo método semi-micro Kjeldahl, descrito por BREMNER &

MULVANEY (1982). O acúmulo de N na parte aérea foi obtido multiplicando o teor de N total de cada amostra a sua respectiva massa seca total.

5.2.4 Avaliação dos teores de clorofila *a* e *b*, abertura estomática e conteúdo relativo de água (CRA).

A medição dos teores de clorofila nas folhas do feijão-caupi foi realizada pela manhã, utilizando o aparelho *ClorofiLOG* (CFL1030-Falker), que utiliza fotodiodos emissores em três comprimentos de onda (FALKER, 2008): dois emitem dentro da banda do vermelho, próximos aos picos de cada tipo de clorofila (= 635 e 660nm) e um outro no infravermelho próximo (= 880nm)]. A partir desses dados, o aparelho fornece valores chamados Índice de Clorofila Falker (ICF) proporcionais à absorbância das clorofilas. A medição da condutância estomática, também foi feita pela manhã usando o equipamento porômetro (*Decagon Devices 2365 NE Hopkins Court Pullman, WA 99163*), e os valores são apresentados em $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para determinar o CRA, retirou-se, com auxílio de um furador de papel, três discos foliares ($28,3 \text{ mm}^2 \text{ folha}^{-1}$), totalizando uma amostra composta de $84,9 \text{ mm}^2$ de tecido verde/folha. Esse material foi imediatamente transferido para microtubos de 1,5 mL para serem pesados quanto à massa fresca dos segmentos de folhas. Posteriormente esses discos foram imersos em água destilada durante 24 hs dentro dos microtubos para posterior peso túrgido, e por fim colocado para secar em estufa a 60°C , para obter o peso seco. O CRA foi expresso como porcentagem do conteúdo máximo de água contido na folha, e foi calculado a partir da fórmula (SHARP et al., 1990):

$$\% \text{ CRA} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}} \times 100$$

Onde: PF = peso fresco; PS = peso seco; PT = peso túrgido

5.3 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas com o *Software STATISTICA* versão 10 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos).

5.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

Inicialmente foi realizada uma busca na literatura para indentificar e selecionar genes responsivos ao estresse hídrico. Os seguintes genes foram selecionados: *VuCPRD12* o qual pertence a categoria funcional: metabolismo antioxidante e *VuCPRD65* e *VuNCED1* envolvidos na biossíntese de ácido abscísico (ABA).

5.4.1 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

5.4.1.1 Extração de RNA total dos nódulos

Os nódulos foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de grau e pistilo de porcelana, em seguida 200 µg das amostras foram transferidos para microtubos de 2,0 mL. Para extração de RNA total foi usado o reagente Trizol (Invitrogen®), seguido o protocolo do fabricante. Desta forma, 1 mL do reagente foi adicionado a cada microtubo e agitado em vortex por cerca de 30 segundos até inteira homogeneização com a amostra. Em seguida as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Posteriormente foram adicionados 200 µL de clorofórmio, homogeneizado em vortex e incubadas em temperatura ambiente por 3 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo de 1,5 mL. Para precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol, homogeneizados por inversão, e incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (tratado com DEPC), homogeneizado em vórtex e depois centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado que se formou foi seco à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos e ressuscitado em 40 µL de H₂O tratada com DEPC.

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, através do NanoDrop 2000-2000C (Thermo Scientific, DE, USA), a partir da leitura da absorbância de 1 µL do RNA total, em um comprimento de onda de 260 nm. O grau de pureza das amostras foi avaliado pela relação entre as leituras da absorbância a 260 e 280 nm, de forma que leituras entre 1,8 e 2,0 indicam alto grau de pureza (SAMBROOK et al., 1989). A integridade do RNA total extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) não-desnaturante

contendo brometo de etídio ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). O RNA ($500 \text{ ng}/\mu\text{L}$) foi adicionada em $1,5 \mu\text{L}$ de tampão *Loading Buffer* 10x e completadas com água tratada com DEPC até o volume final de $10 \mu\text{L}$. As amostras foram aplicadas no gel de agarose e submetidas à eletroforese com 80 volts por 80 minutos. O gel, com as bandas de RNA coradas pelo brometo de etídio (ANEXO D), foi visualizado em um transiluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação L PIX (Loccus Biotecnologia) e comparadas com um padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen®).

As amostras de RNA total extraído foram armazenadas em freezer a -70°C até a sua utilização para a síntese do cDNA e os subsequentes experimentos de RT-qPCR.

5.4.1.2 Síntese do cDNA fita simples

Inicialmente as amostras de RNA total dos nódulos foram tratadas com DNase a fim de eliminar o DNA e fornecer RNA de alta qualidade para a síntese de cDNA. Para o tratamento foram aplicados $2 \mu\text{L}$ de DNase *I Amplification Grade* (Illumina, Cat. No. D9902K) e $1 \mu\text{L}$ de tampão da enzima (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) em $5 \mu\text{g}$ de RNA total. O volume final da reação foi ajustado para $20 \mu\text{L}$ e foi incubado em máquina de PCR, em uma reação a 37°C por 20 minutos, e em seguida a 65°C por 5 minutos para inativação da enzima. O RNA tratado foi quantificado por espectrofotometria, através do NanoDrop 2000-2000C (Thermo Scientific, DE, USA), a partir da leitura da absorvância de $1 \mu\text{L}$ do RNA tratado, em um comprimento de onda de 260 nm (ANEXO E). Para confirmar a eficácia do tratamento com a DNase, o RNA foi avaliado novamente através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) não-desnaturante (ANEXO F) contendo brometo de etídio ($1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) visualizado em um transiluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação L PIX (Loccus Biotecnologia). Posteriormente, as amostras do RNA tratado foram submetidas à PCR convencional (PCR teste) a fim de checar alguma contaminação residual com DNA. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose não-desnaturante (2% p/v) (ANEXO G) e após a confirmação da ausência de DNA, as amostras foram quantificadas usando o espectrofluorímetro Qubit® com o kit *RNA HS Assay* (Invitrogen, Cat. No. Q32852) (ANEXO E).

O RNA, livre de DNA, foi utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA fita simples) com a enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase*TM (Invitrogen, Cat. No. 18080-044) seguindo as especificações do fabricante. Aos $5 \mu\text{g}$ de RNA tratado, $1 \mu\text{L}$ do iniciador

Poly T e 1 μL de dNTP (10 mM) foram adicionados e incubados durante 5 minutos a 65°C em termociclador e resfriado em banho de gelo por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado o *mix* para síntese de cDNA o qual continha: 4 μL de tampão de reação *buffer*, 1 μL do inibidor *RNaseOUT Recombinat RNase Inhibitor* (40 U μL^{-1}) (Invitrogen™, Cat. No. 10777-019), 1 μL de DTT (0,1 M) e 1 μL da enzima *SuperScript III RT* (200 U μL^{-1}). Essa reação foi ajustada para 20 μL , incubada a 50°C por 60 minutos e posteriormente a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. Em seguida foi realizada uma corrida em gel de agarose para análise qualitativa da síntese de cDNA fita simples (ANEXO H). E por fim as amostras de cDNA sintetizadas foram quantificadas utilizando Qubit® com o *kit ssDNA Assay* (Invitrogen, Cat. No. Q10212) (ANEXO I).

5.4.1.3 Desenho dos iniciadores

O programa Primer 3 Plus (<http://primer3plus.com/>) (UNTERGASSER et al., 2007) foi utilizado para desenhar os iniciadores para cada gene selecionado. Os seguintes critérios foram utilizados: 19-22 nucleotídeos de tamanho; temperatura de anelamento entre 58-62°C; conteúdo GC de pelo menos 50% e tamanho do fragmento amplificado na faixa de 100 a 180 pares de bases. Em seguida, os iniciadores foram avaliados no programa Oligo Explorer v.1.1.2 (<http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware/>) (KUULASMA, 2002). Os genes normalizadores utilizados nas reações de RT-qPCR foram o *VuPDF2* (subunidade regulatória da proteína fosfatase) e *VuYLS8* (proteína mitótica). Os normalizadores utilizados nestes ensaios foram: *VuPDF2* (subunidade regulatória da proteína fosfatase) e *VuYLS8* (proteína mitótica).

Tabela 1: Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para avaliação da expressão relativa dos genes *VuNCED1*, *VuCPRD12*, *VuCPRD65* em nódulo de feijão-caupi em condições de estresse hídrico.

Gene ID	Função	Sequência (5'- 3')	Tamanho amplicon	Eficiência
<i>VuNCED1</i>	9-cis- expoxicarotenóide dioxigenase	CGAAGACGATTTACCCTACCAC (F) GAGGTAAGGCTTCTGAATGACG(R)	144 pb	1,78 ± 0,010
<i>VuCPRD12</i>	Álcool desidrogenase	AACTGTGTGTCCCCTTTTGC(F) CAGCTTCTGCCACATCGTTA(R)	258 pb	1,82 ± 0,006
<i>VuCPRD65</i>	9-cis- expoxicarotenóide dioxigenase	GTTTGTGCTTCCACCTCTGG(F) GCACGCTCTTCAAACCTCTCC(R)	144 pb	1,84 ± 0,005
<i>VuPDF2</i> *	Subunidade regulatória da proteína fosfatase	CATTGTTGAGCTTGCTGAGG(F) GAGCACCAAGCTTGTCATCA(R)	100 pb	2.08 ± 0.007
<i>VuYLS8</i> *	Proteína mitótica	CTGGTGGACATAACGGAGGT(F) GTTGTTTCCAGTGCCGAGAT(R)	100 pb	2.07 ± 0.007

*Genes utilizados como normalizadores para as reações de RT-qPCR

5.4.1.4 Análise por RT-qPCR

Para avaliar a expressão dos genes, após a reação de transcriptase reversa (RT), foi realizado PCR em tempo real (qPCR) utilizando o termociclador *7500 fast real-time PCR system* (Applied Biosystems cat. no. 275013373), no laboratório de genoma da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ). As amostras de cDNA foram diluídas 1:50, resultando em aproximadamente 5,6 ng.µL⁻¹ de cDNA para cada reação de RT-qPCR. As reações de RT-qPCR foram realizadas com 5 a 6 µL de cDNA (diluição 1:50), 0,75 µL de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*) e 7,5 µL do kit *GoTaq® qPCR Master Mix, 2X* (Promega, Madison, WI, USA). As condições de amplificação foram as seguintes: 2 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 20 seg a 95°C e 30 seg a 60°C. O experimento foi conduzido em triplicata técnica para cada uma das 4 repetições biológicas de cada tratamento. Os dados brutos obtidos foram inseridos no *software online Miner* (ZHAO & RUSSEL, 2005) para obtenção dos valores de *cycle threshold* (Ct). Estes valores de Ct foram então utilizados pelo programa *qBASE Software v.1.3.5* (HELLEMANS et al., 2007) para o cálculo de expressão relativa de cada gene. Os genes *VuPDF2* e *VuYLS8* foram empregados como normalizadores (ANEXO J) e as diferenças significativas de expressão foram estimadas pelos valores de desvio padrão fornecidos pelo programa.

6 RESULTADOS

6.1 Testes *in vitro*

6.1.1 Tolerância das estirpes ao estresse hídrico

Para avaliar o nível de tolerância ao estresse as estirpes foram cultivadas em meio com diferentes níveis de pressão osmótica e o crescimento foi estimado por meio da densidade óptica (D.O). A D.O das estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 diminuiu gradualmente conforme o potencial osmótico foi reduzido sendo maior no potencial osmótico de -0,2 MPa do que no potencial osmótico de -1 MPa (Figura 6).

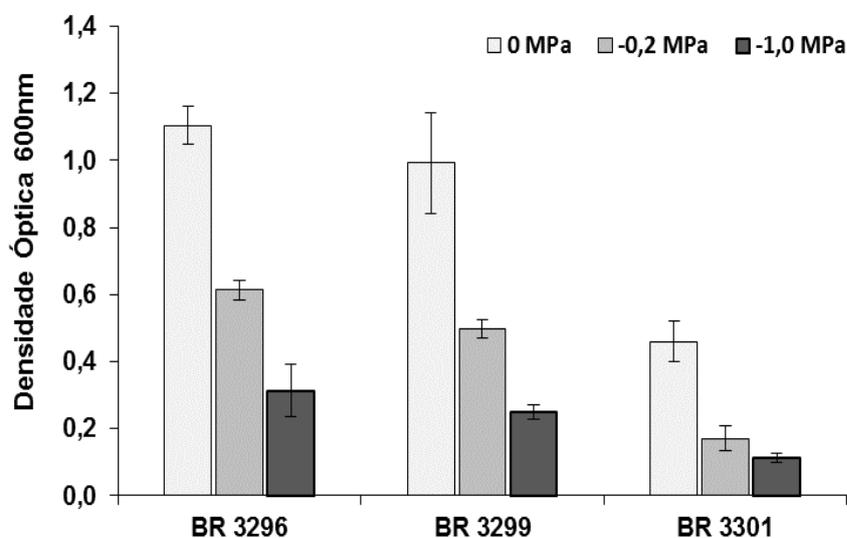


Figura 6: Capacidade de crescimento das estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura com potencial osmótico de 0 MPa, -0,2 MPa, -1 MPa. Barra de erro representa do desvio padrão.

6.1.2 Produção de EPS

A avaliação qualitativa de EPS das três estirpes foi realizada em placas com meio sólido suplementado com 2% ou 10% de fontes de carbono. As três estirpes foram capazes de produzir EPS nas fontes de carbono: sacarose, glicose e sorbitol a 2% e 10%, e foram capazes de produzir EPS no meio de cultura padrão usado como controle (1% de manitol) (Figura 7 A; B).

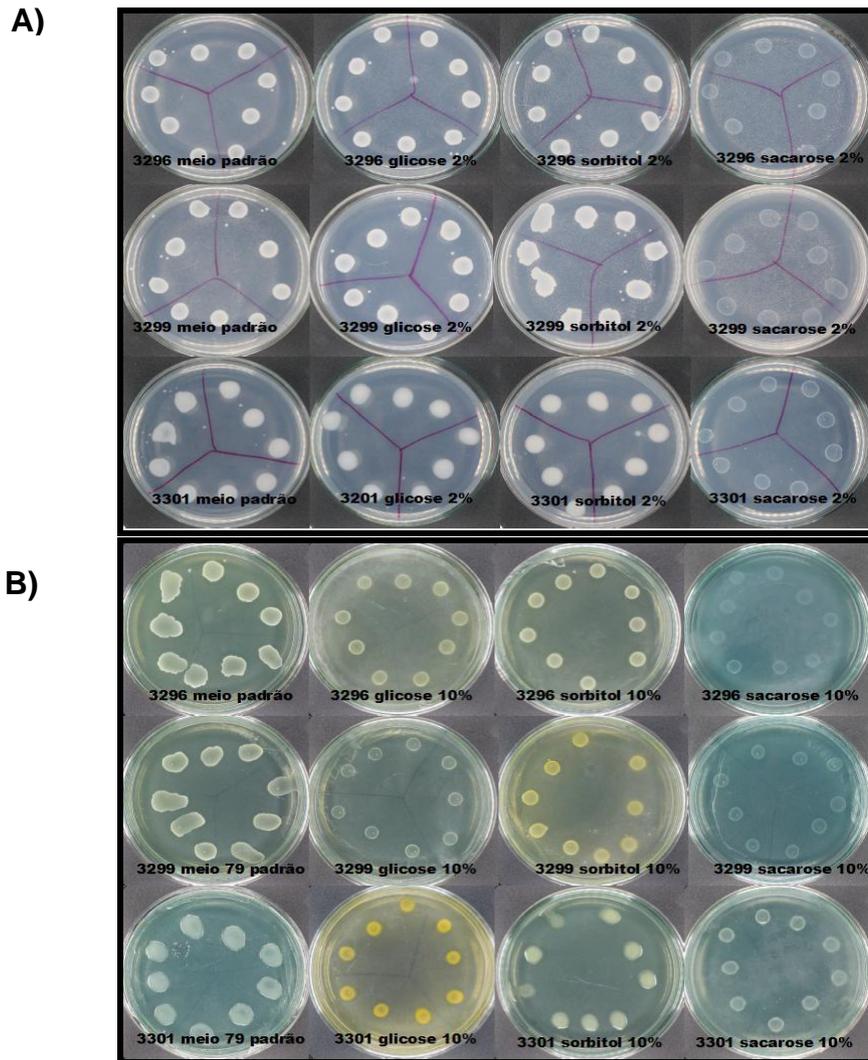


Figura 7: Teste qualitativo de produção de EPS pelas estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura 79 controle e suplementado com 2% (A) ou 10% (B) das seguintes fontes de carbono: glicose, sorbitol e sacarose.

No teste quantitativo da produção de EPS, sob 10% de fonte de carbono as três estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 produziram mais EPS no meio de cultura com glicose e sacarose. No meio de cultura suplementado com 10% de glicose a estirpe BR 3296 produziu $2,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS, a estirpe BR 3299 produziu $1,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a estirpe BR 3301 produziu $1,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 8 A; B; C). E no meio de cultura suplementado com 10% de sacarose a produção de EPS pela estirpe BR 3296 foi de $2,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, a estirpe BR 3299 produziu $4,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a estirpe BR 3301 produziu $7,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 8 A; B; C). Já no meio de cultura suplementado com 2% de fonte de carbono a produção de EPS pela estirpe BR 3296 foi similar estatisticamente no meio com glicose e sorbitol, $732 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $713 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 8 A). As estirpes BR 3299 e BR 3301 apresentaram baixa produção de EPS na presença de 2% de sorbitol: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 8 B;

C). Com 2% de fonte de carbono as estirpes BR 3299 e BR 3301 produziram mais EPS na presença de glicose e sacarose. Com 2% de glicose a estirpe BR 3299 produziu 612 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS e a estirpe BR 3301 produziu 405 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS (Figura 8 B; C). E com 2% de sacarose a produção de EPS pela estirpe BR 3296 foi de 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS, a BR 3299 produziu 466 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS e a BR 3301 produziu 612 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EPS (Figura 8 A; B; C). As três estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 produziram pouco EPS no meio de cultura controle em ambas as concentrações avaliadas (Figura 8 A; B; C).

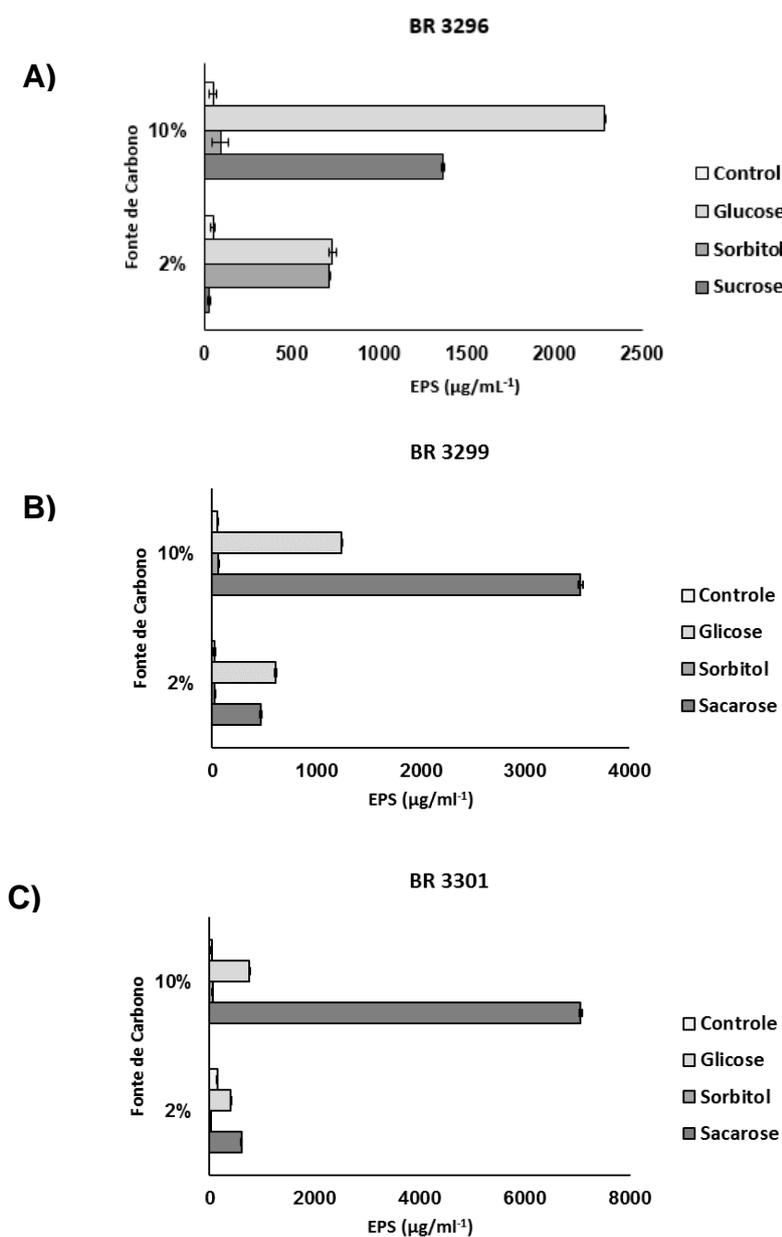


Figura 8: Produção de EPS pelas estirpes (A) BR 3296, (B) BR 3299 e (C) BR 3301 em meio de cultura padrão controle (1% manitol) e suplementado com 10% ou 2% das seguintes fontes de carbono: glicose, sorbitol e sacarose. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

6.1.3 Formação de biofilme sob estresse hídrico

A formação de biofilme bacteriano foi avaliada sob dois potenciais osmóticos: 0 MPa e -0,2 MPa. As três estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 formaram biofilme sob os potenciais osmóticos de 0 MPa e -0,2 MPa. A formação de biofilme pela estirpe BR 3296 foi similar entre os dois potenciais osmóticos 0 MPa e -0,2 MPa (Figura 9). A estirpe BR 3299 formou mais biofilme sob o potencial osmótico de -0,2 MPa (Figura 9). E a estirpe BR 3301 foi capaz de apresentar maior formação de biofilme no potencial osmótico de 0 MPa (Figura 9).

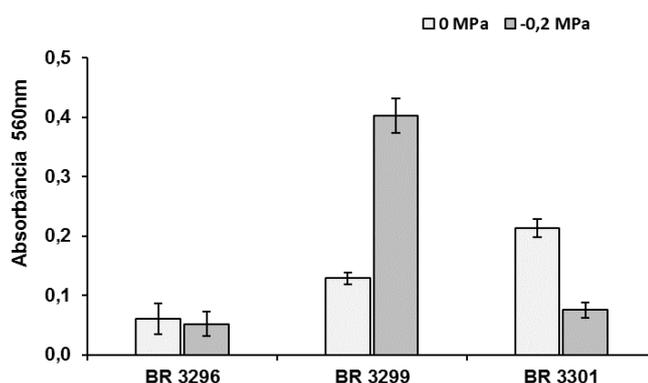


Figura 9: Formação de biofilme das estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em meio de cultura sob dois potenciais osmóticos: 0 MPa e -0,2 MPa. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

6.1.4 Produção de AIA

Todas as estirpes avaliadas mostraram capacidade de sintetizar AIA na presença do precursor L-triptofano. No entanto, houve uma diferença significativa da quantidade de AIA produzida a partir das concentrações de L-triptofano adicionadas ao meio. A estirpe BR 3296 foi a que produziu mais AIA com 25 μ g de triptofano no quinto dia de incubação com decréscimo da produção no sétimo dia. Para as estirpes BR 3299 e BR 3301 observou-se maior produção do fitormônio no terceiro dia e houve uma diminuição gradualmente até o sétimo dia (Figura 10 A). Em meio suplementado com 50 μ g de triptofano houve um pico de produção de AIA no sétimo dia pela estirpe BR 3296 (Figura 10 B). A produção do fitormônio pela estirpe BR 3299 na presença de 50 μ g de triptofano foi similar no quinto e sétimo dia de incubação, e a estirpe BR 3301 produziu mais AIA no terceiro dia de incubação (Figura 10 B). Com 100 μ g e 150 μ g de triptofano no meio de cultura a estirpe BR 3296 produziu mais AIA no quinto e sétimo dia, a produção pela estirpe BR 3299 foi similar no

quinto e sétimo dia de incubação e a estirpe BR 3301 apresentou maior produção do fitormônio no sétimo dia de incubação (Figura 10 C; D). Na presença de 250 µg do precursor houve um pico de produção de AIA pela estirpe BR 3296 no quinto dia de incubação e foi observado um decréscimo na produção do fitormônio no sétimo dia (Figura 10 E). A produção de AIA na presença de 250 µg de triptofano pela estirpe BR 3299 se mostrou similar no terceiro, quinto e sétimo dia de incubação. A produção do fitormônio pela estirpe BR 3301 aumentou gradualmente na presença de 250 µg de triptofano, com maior produção observada no sétimo dia de incubação (Figura 10 E). A estirpe BR 3296 e BR 3301 apresentaram produção gradual de AIA na presença de 500 µg de triptofano com maior produção do sétimo dia, já a estirpe BR 3299 também na presença de 500 µg de triptofano apresentou a produção do fitormônio similar no quinto e sétimo dia de incubação (Figura 10 F).

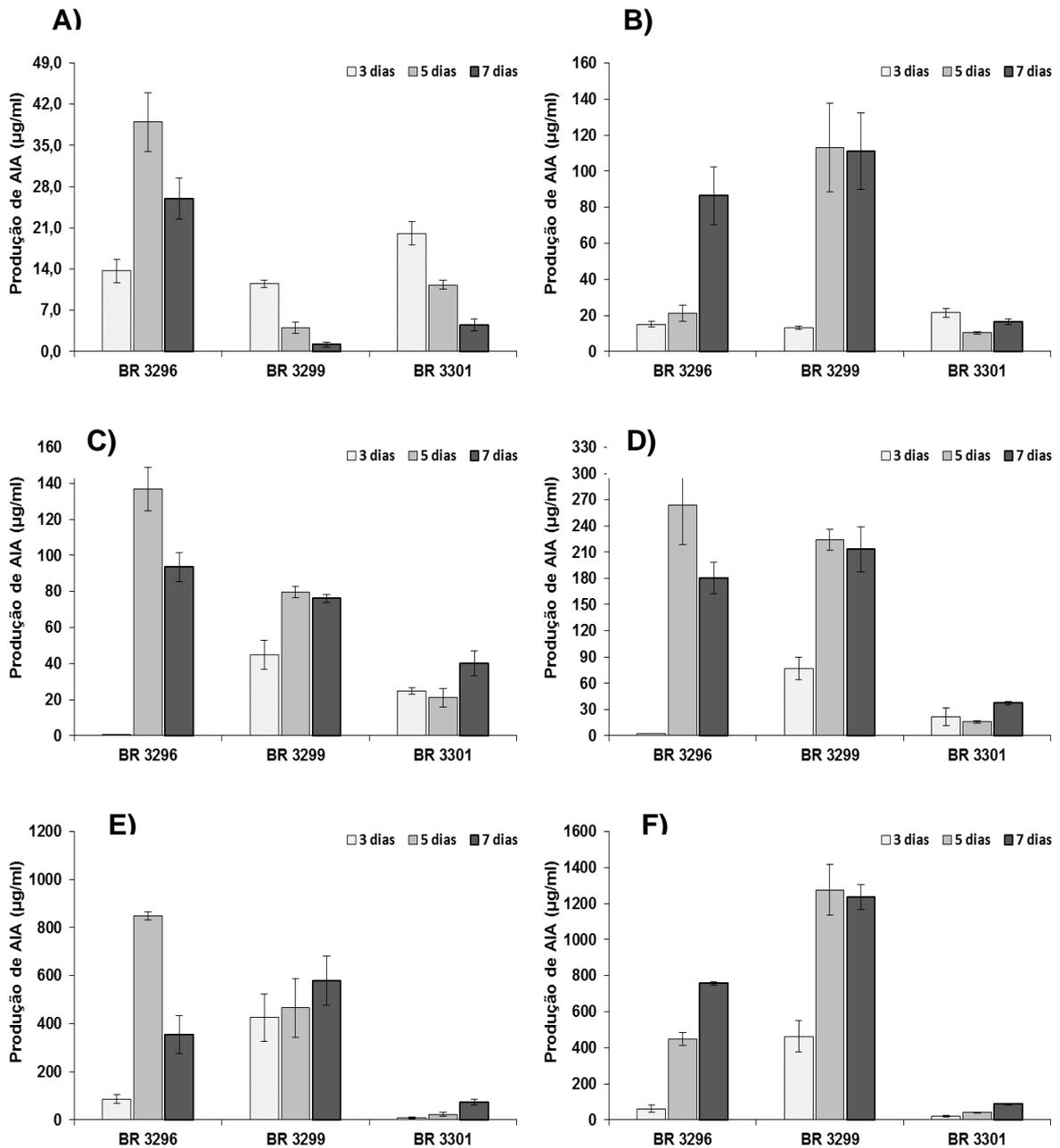


Figura 10: Produção de AIA pelas estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301, na presença do precursor L-triptofano nas seguintes concentrações de A a F: 25, 50, 100, 150, 250 e 500 µg, respectivamente. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

6.2 Experimento I: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Gurguéia, submetido a dois momentos de déficit hídrico

6.2.1 Teor de clorofila, abertura estomática, CRA e produção de biomassa após o primeiro déficit hídrico.

Aos 35 DAE, as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 apresentaram maior acúmulo de MSPA (massa seca de parte aérea) tanto no tratamento plenamente irrigado quanto sob déficit hídrico (Tabela 2). Já as plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 apresentaram o menor acúmulo de MSPA, nos dois regimes hídricos (Tabela 2). O maior acúmulo de MSR (massa seca de raiz) foi observado nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 sob déficit hídrico, o qual se mostrou similar estatisticamente a MSR das plantas plenamente irrigadas e das adubadas com N mineral sob déficit hídrico (Tabela 2). A MSN (massa seca de nódulos) foi maior nas plantas plenamente irrigadas do que nas plantas sob déficit hídrico (Tabela 2).

O teor de clorofila *a* das plantas irrigadas e inoculadas com a estirpe BR 3301, foi superior apenas ao das plantas que estavam sob déficit hídrico e inoculadas com a estirpe BR 3299 (Tabela 2). Sob déficit hídrico o teor de clorofila *b* das plantas inoculadas com as estirpes BR 3299 e das plantas adubadas com N mineral foi inferior ao das plantas plenamente irrigadas e inoculadas com a estirpe BR 3301 (Tabela 2). A menor abertura estomática foi observada nas plantas que estavam sob déficit hídrico e inoculadas com a estirpe BR 3301 (Tabela 2). Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto ao conteúdo relativo de água (CRA) das plantas coletadas aos 35 DAE (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de biomassa, clorofilas, abertura estomática e CRA de plantas de feijão-caupi inoculadas com rizóbio ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes de rega. Plantas coletadas aos 35 DAE.

Tratamento		MSPA	MSR	MSN	CL <i>a</i>	CL <i>b</i>	AE	CRA
Regime de rega	Fonte de N	g pl. ⁻¹	g pl. ⁻¹	mg pl. ⁻¹	ICF	ICF	mmol m ⁻² s ⁻¹	%
Plenamente irrigado	BR 3299*	1,10 d	0,25 b	426,7 a	33,1 ab	9,8 ab	241,0 a	87
Déficit hídrico	BR 3299*	0,77 d	0,23 b	176,7 b	24,7 b	5,4 b	130,3 b	80
Plenamente irrigado	BR 3301*	3,99 a	0,31 ab	442,5 a	37,5 a	14,3 a	178,7 ab	73
Déficit hídrico	BR 3301*	2,77 b	0,39 a	243,4 b	34,5 ab	11,6 ab	31,1 c	68
Plenamente irrigado	N mineral	1,86 c	0,21 b	-----	29,6 ab	8,3 ab	186,0 ab	87
Déficit hídrico	N mineral	1,78 c	0,33 ab	-----	28,8 ab	6,5 b	223,3 a	78

*Estirpes de rizóbio, médias seguidas por letras iguais minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. DAE: dias após a emergência; MSPA: massa seca de parte aérea; MSR: massa seca de raiz; MSN: massa seca de nódulos; CL *a*: clorofila *a*; CL *b*: clorofila *b*; AE: abertura estomática; CRA: conteúdo relativo de água.

6.2.2 Teor de clorofila, abertura estomática, CRA e produção de biomassa após o segundo déficit hídrico.

O segundo déficit hídrico foi aplicado aos 44 DAE e aos 54 DAE as plantas foram coletadas. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística de MSPA entre os dois regimes hídricos (irrigado e déficit hídrico) nas plantas inoculadas com as estirpes BR 3299 ou BR 3301. No entanto, foi observado que as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 apresentaram o acúmulo de MSPA maior do que nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 e tratadas com N mineral nos dois regimes hídricos (Tabela 3).

Os teores de clorofilas *a* e *b* se mostraram similares estatisticamente entre as plantas inoculadas com as estirpes BR 3299, ou BR 3301, ou adubadas com N mineral nos dois regimes de rega (Tabela 3). Os resultados mostram que a abertura estomática também não diferiu estatisticamente entre as plantas inoculadas com as estirpes BR 3299, ou BR 3301, ou adubadas com N mineral (Tabela 3). No entanto, os dados de CRA mostraram que as plantas plenamente irrigadas e adubadas com N mineral apresentaram menor CRA.

Tabela 3: Produção de biomassa e parâmetros fisiológicos de plantas de feijão-caupi, inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral, e submetidas a dois regimes de rega. Plantas coletadas aos 54 DAE.

Tratamento		MSPA	CL <i>a</i>	CL <i>b</i>	AE	CRA
Regime de rega	Fonte de N	g pl. ⁻¹	ICF	ICF	mmol m ⁻² s ⁻¹	%
Plenamente irrigado	BR 3299*	1,69 c	32,6	7,9	116,3	79 a
Déficit hídrico	BR 3299*	1,40 c	32,0	7,6	121,0	81 a
Plenamente irrigado	BR 3301*	5,32 a	32,5	7,2	109,0	83 a
Déficit hídrico	BR 3301*	5,30 a	31,6	8,0	75,0	82 a
Plenamente irrigado	N mineral	3,46 b	32,7	5,3	124,6	69 b
Déficit hídrico	N mineral	3,26 b	27,4	8,1	95,3	78 a

*Estirpes de rizóbio, médias seguidas por letras iguais minúsculas, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. DAE: dias após a emergência; MSPA: massa seca de parte aérea; CL *a*: clorofila *a*; CL *b*: clorofila *b*; AE: abertura estomática; CRA: conteúdo relativo de água.

6.3 Experimento II: Efeitos da inoculação com bactérias simbióticas em feijão-caupi, cultivar Guariba, submetido a déficit hídrico aos 38 DAE

6.3.1 Biomassa seca de parte aérea e raiz

Nenhuma das estirpes avaliadas foi capaz de promover acúmulo na MSPA semelhante aos encontrados nas plantas adubadas com N mineral, independentemente do regime de rega aplicado (Tabela 4). Após doze dias de restrição hídrica as plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 e BR 3299 não diferiram estatisticamente quanto ao acúmulo de MSPA das plantas que foram plenamente irrigadas (Tabela 4). No entanto, o mesmo não ocorreu com as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 e plantas adubadas com N mineral que apresentaram MSPA inferior sob déficit hídrico (Tabela 4). Na média, as plantas que foram plenamente irrigadas produziram mais MSPA do que as plantas que estavam sob déficit hídrico (Tabela 4). Quanto a produção de MSR, não houve diferença estatística entre ambos os regimes hídricos aplicados (Tabela 4). A maior MSR foi encontrada nas plantas adubadas com N mineral e a menor nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 (Tabela 4).

Tabela 4: Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de feijão-caupi inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos.

Fonte de N	MSPA g planta ⁻¹			MSR g planta ⁻¹		
	Plenamente irrigado	Déficit hídrico	Média	Plenamente irrigado	Déficit hídrico	Média
BR 3296	4,44 Ac	3,83 Ac	4,14 c	1,54 Ac	1,87 Ab	1,71 bc
BR 3299	2,69 Ad	2,06 Ad	2,38 d	0,99 Ad	0,79 Ac	0,89 c
BR 3301	6,71 Ab	4,48 Bb	5,60 b	2,24 Ab	1,27 Ab	1,76 b
N mineral	8,34 Aa	6,99 Ba	7,67 a	3,92 Aa	3,41 Aa	3,67 a
Média	5,55 A	4,34 B		2,17 A	1,84 A	

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

6.3.2 Número e biomassa de nódulos

As plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 e BR 3301 produziram maior NN (número de nódulos) e MSN (massa seca de nódulos) no regime plenamente irrigado (Tabela 5). Sob o déficit hídrico não houve diferença estatística no NN entre as estirpes, mas observa-se que a MSN sob déficit hídrico foi maior nas plantas inoculadas com estirpe BR 3296 e não houve diferença estatística nas plantas inoculadas com a BR 3299 e BR 3301 (Tabela 5). Entre os dois regimes hídricos, observa-se que a MSN não diferiu estatisticamente nas plantas

inoculadas com as estirpes BR 3299, já nas plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 e BR 3301 a MSN foi maior no regime irrigado do que sob déficit hídrico (Tabela 5).

Tabela 5: Número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) de plantas de feijão-caupi inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos.

Fonte de N	NN NN planta ⁻¹			MSN mg planta ⁻¹		
	Plenamente irrigado	Déficit hídrico	Média	Plenamente irrigado	Déficit hídrico	Média
BR 3296	84 a	73	79 a	861,7 Aa	584,2 Ba	723,0 a
BR 3299	59 b	49	54 b	376,7 Ab	398,0 Ab	387,3 b
BR 3301	82 a	60	71 a	786,0 Aa	444,2 Bb	615,1 ab
Média	75 A	61 A		674,8 A	475,5 B	

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

6.3.3 Nitrogênio total e acúmulo de N na parte aérea

A maior percentagem de N, foi observada nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299, e não houve diferença estatística em relação aos dois regimes hídricos aplicados: irrigado ou déficit hídrico (Tabela 6). O acúmulo de N mineral foi similar entre as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 e plantas adubadas com N mineral nos dois regimes hídricos (Tabela 6). Já as plantas inoculadas com a estirpe BR 3296 ou BR 3299 não apresentaram diferença significativa entre os dois regimes hídricos (Tabela 6).

Tabela 6: Nitrogênio total (NT) e acúmulo de nitrogênio de plantas de feijão-caupi inoculadas com bactérias simbióticas ou adubadas com N mineral e submetidas a dois regimes hídricos.

Fonte de N	NT %			Acúmulo de nitrogênio mg planta ⁻¹		
	Irrigado	Déficit hídrico	Média	Irrigado	Déficit hídrico	Média
BR 3296	2,98 bc	2,89 bc	2,94 bc	132,5 Ab	110,9 Ab	121,7 b
BR 3299	3,73 a	3,69 a	3,71 a	100,9 Ac	75,4 Ac	88,2 c
BR 3301	3,08 b	3,01 bc	3,05 b	205,9 Aa	134,8 Bab	170,4 a
N mineral	2,57 c	2,31 c	2,44 c	213,2 Aa	161,7 Ba	187,5 a
Média	3,09 A	2,97 A		163,1 A	120,7 B	

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

6.3.4 Teores de Clorofila *a*, Clorofila *b* e Clorofila total

Na figura 11 é possível observar os teores de clorofila *a* e *b* presentes nas folhas de feijão-caupi sob os dois regimes hídricos. O teor de clorofila *a* e clorofila *b* das plantas irrigadas é mais alto nas plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3301 (Figura 11 A; B). As plantas plenamente irrigadas inoculadas com a estirpe BR 3299 apresentaram teor de clorofila *a* e *b* similar estatisticamente às plantas adubadas com N mineral sob o mesmo regime hídrico (Figura 11 A; B). Nas plantas sob déficit hídrico os maiores teores de clorofila *a* foram observados nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 ou BR 3301, os quais não diferiram estatisticamente (Figura 11 A). O teor de clorofila *a* das plantas inoculadas com a estirpe BR 3296 foi similar aos das plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 e superior ao das plantas adubadas com N mineral sob déficit hídrico (Figura 11 A). Em relação ao teor de clorofila *b* das plantas sob restrição hídrica, observa-se que o maior valor foi nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299, e o menor acúmulo nas plantas adubadas com N mineral (Figura 11 B). Já nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3296 ou BR 3301 o acúmulo de clorofila *b* se mostrou similar nas plantas sob déficit hídrico (Figura 11 B).

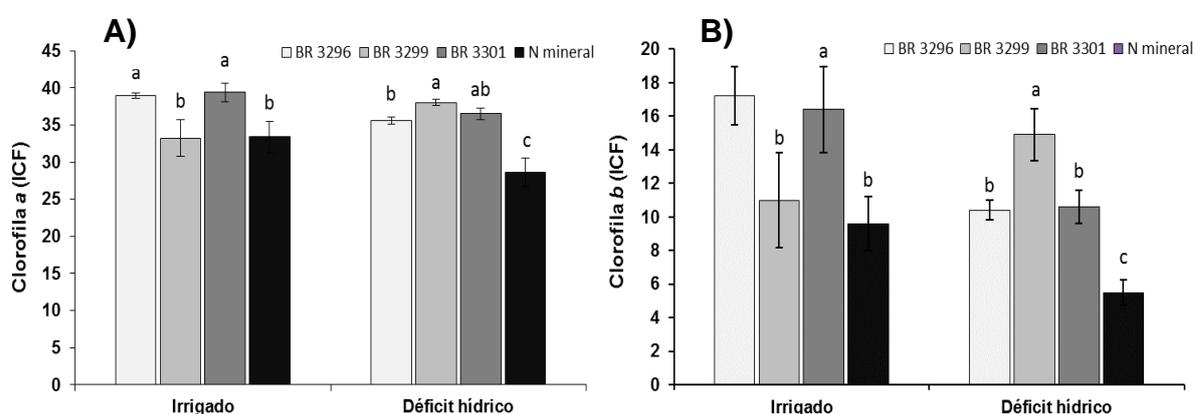


Figura 11: Teores de Clorofila *a* e Clorofila *b* em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a déficit hídrico de 12 dias aos 38 DAE. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

O conteúdo total de clorofilas nas plantas plenamente irrigadas o tratamento com as estirpes BR 3296 ou BR 3301 apresentaram valores superiores aos encontrados nos tratamentos com a estirpe BR 3299 e adubado com N mineral (Figura 12). O teor de clorofila total das plantas sob déficit hídrico foi maior no tratamento com a estirpe BR 3299, seguido

pelos tratamentos com as estirpes BR 3301 e BR 3296, e o menor teor de clorofila total foi observado nas plantas, adubadas com N mineral (Figura 12).

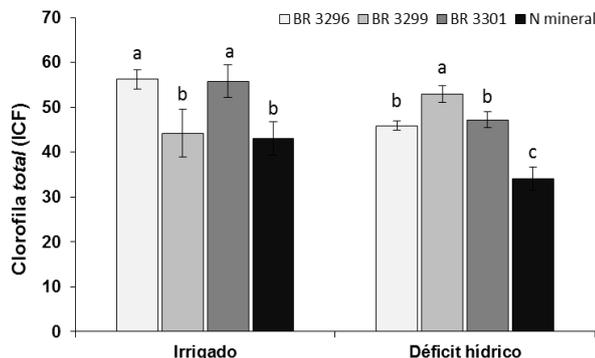


Figura 12: Teores de Clorofila total em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a déficit hídrico de 12 dias aos 38 DAE. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

6.3.5 Condutância estomática em folha de feijão-caupi

A abertura estomática diminuiu quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. Sob condições de irrigação plena a condutância estomática variou de 80 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 176 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo a maior abertura estomática observada nas plantas inoculadas com as estirpes BR 3299 e BR 3296 (157 mmol m^{-2} e 176 mmol m^{-2} , respectivamente) (Figura 13). Já as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 apresentaram menor abertura estomática no regime irrigado, similar estatisticamente ao controle adubado com N mineral (82 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 96 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente) (Figura 13). O déficit hídrico levou a diminuição da condutância estomática em todos os tratamentos, variando de 39 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 78 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 13). Porém, observa-se que nas plantas dos tratamentos com as estirpes BR 3299, BR 3296 e BR 3301 apresentaram abertura estomática maior em relação às plantas do tratamento adubado com N mineral (Figura 13).

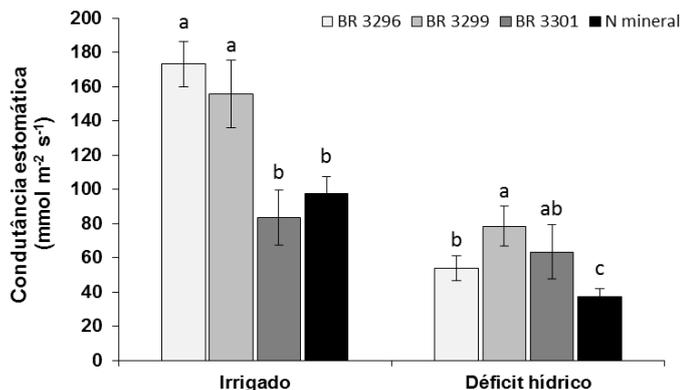


Figura 13: Condutância estomática em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a déficit hídrico de 12 dias aos 38 DAE. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

6.3.6 Conteúdo relativo de água (CRA)

As plantas irrigadas apresentaram CRA maior, quando inoculadas com as estirpes BR 3299 e BR 3296, em relação às plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 (Figura 14). Sob déficit hídrico, as plantas do tratamento com a estirpe BR 3299 apresentam o maior CRA, 71%, e as plantas dos demais tratamentos com as estirpes BR 3296, BR 3301 não diferiram estatisticamente do controle adubado com N mineral (Figura 14).

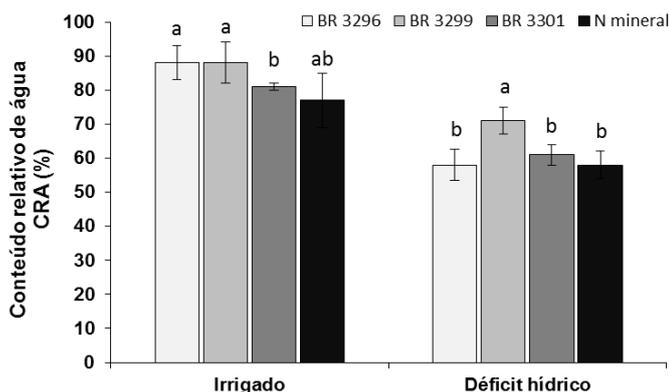


Figura 14: Conteúdo relativo de água em folhas de feijão-caupi inoculado com bactérias simbióticas ou adubado com N mineral e submetido a déficit hídrico de 12 dias aos 38 DAE. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

6.4 Análise de expressão relativa por RT-qPCR

6.4.1 Expressão dos genes *VuNCED1*, *VuCPRD12* e *VuCPRD65* em nódulos de feijão-caupi

Foi avaliada em condições de casa de vegetação plantas inoculadas com as bactérias *Microvirga vignae* (estirpe BR 3296 e BR 3299) e *Bradyrhizobium* (estirpe BR 3301) submetidas a um estresse hídrico de 12 dias aos 38 DAE e a expressão dos genes *VuNCED1*, *VuCPRD12* e *VuCPRD65* nos nódulos foi determinada por RT-qPCR. Os três genes foram expressos em nódulos de feijão-caupi, contudo observou-se variação no padrão de expressão entre as diferentes estirpes utilizadas e o déficit hídrico (Figura 15). Os genes *VuNCED1* e *VuCPRD65* apresentaram maior expressão nas plantas sob déficit hídrico e inoculadas com as estirpes BR 3299 ou BR 3301 do que nas plantas plenamente irrigada e também inoculadas com essas duas estirpes (Figura 15 A; C). No caso das plantas inoculadas com a estirpe BR 3296, o gene *VuNCED1* foi mais expresso nas em nódulos de plantas plenamente irrigadas (Figura 15 A). O gene *VuNCED1* apresentou o mesmo padrão de expressão em nódulos de plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3301 no regime plenamente irrigado (Figura 15 A). A expressão do gene *VuCPRD12* foi muito baixa nos nódulos sob restrição hídrica e inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3299 (Figura 15 B). No entanto, sob déficit hídrico as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 o gene *VuCPRD12* apresentou o nível de expressão extremamente elevado, sendo o mais alto entre todos genes e tratamentos avaliados (Figura 15 B). O gene *VuCPRD65* foi induzido pelo déficit hídrico na inoculação com as estirpes BR 3299 e BR 3301, enquanto, nos nódulos com a estirpe BR 3296 essa tendência se inverteu (Figura 15 C).

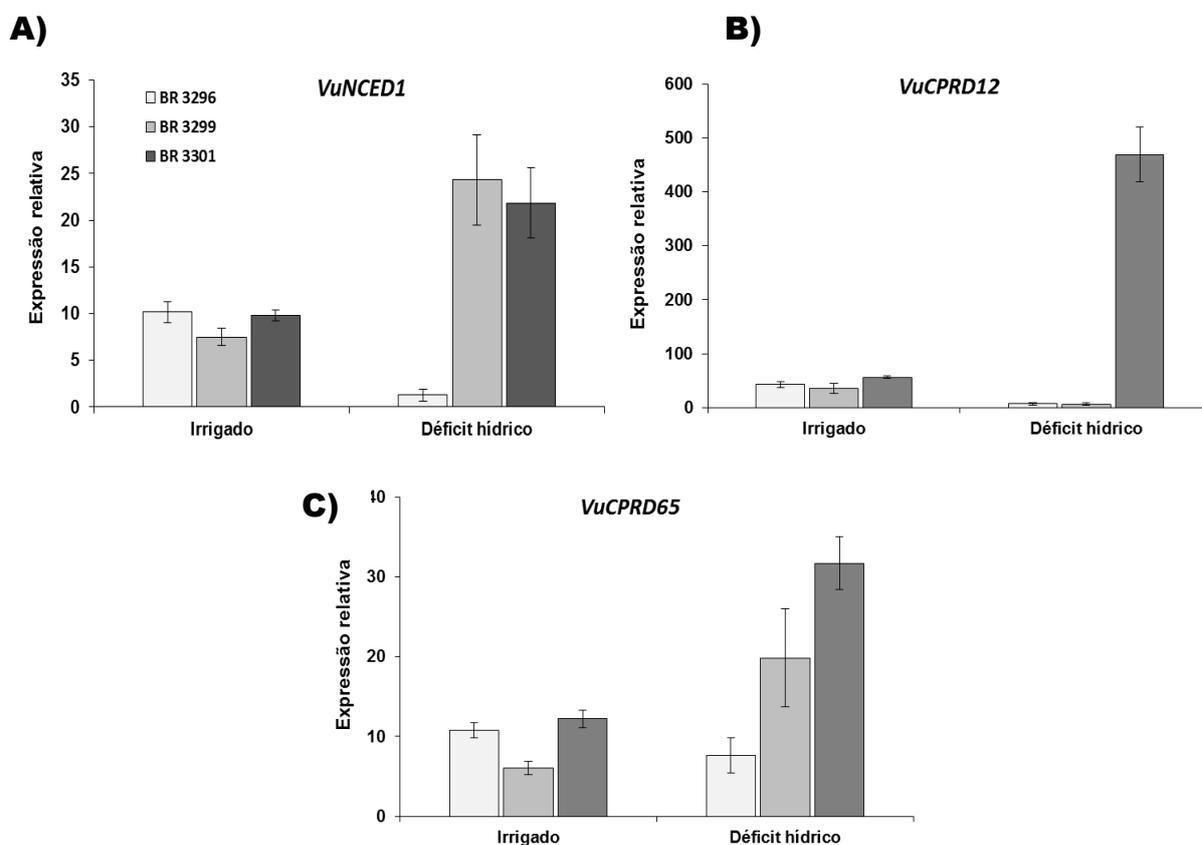


Figura 15: Expressão relativa dos genes *VuNCED1* (A), *VuCPRD12* (B) e *VuCPRD65* (C) expressos em nódulos de feijão-caupi inoculados com diferentes estirpes de bactérias simbióticas e submetido a dois regimes de disponibilidade hídrica. Os dados de expressão gênica são representativos de quatro repetições biológicas independentes para cada tratamento e três replicatas técnicas. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

7 DISCUSSÃO

O potencial osmótico é um dos parâmetros que determina a capacidade dos microrganismos de proliferar em um determinado ambiente (PATEL et al. 2017). Diversas evidências sugerem que a regulação da composição citoplasmática e hidratação é uma característica fundamental da homeostase celular (WOOD, 2011) e pequenas alterações na osmotolerância podem resultar em diferenças sutis nos mecanismos de osmo Adaptação, influenciando na aptidão relativa das estirpes de bactérias (FREEMAN et al., 2013). Para avaliar a capacidade de crescimento das estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 em condições de estresse hídrico, diferentes concentrações de PEG foram adicionadas ao meio de cultura. O PEG cria uma pressão osmótica no meio de cultura e tem sido utilizado para medir o nível de tolerância e o crescimento das estirpes sob estresse (SHIRINBAYAN et al., 2019). As estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 foram capazes de tolerar o estresse hídrico em meio de cultura suplementado com 10% e 30% de PEG, os quais correspondem a -0,2 MPa; -1,0 MPa,

respectivamente. Durante o período de incubação de 24 horas, os resultados mostraram que houve uma diminuição gradual na densidade óptica com a diminuição do potencial osmótico. No entanto, as três estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 foram capazes de sobreviverem a esses potenciais osmóticos substancialmente baixos (-0,2 MPa; -1,0 MPa). Esses resultados sugerem que essas três estirpes poderiam tolerar mudanças de alto potencial hídrico, e assim, sobreviver em condições de seca. A produção de EPS pode ser um dos mecanismos de tolerância à seca utilizados por essas estirpes de bactérias, uma vez que, o EPS consegue reter a água ao redor das colônias protegendo contra a dessecação. SÁ et al. (2019) avaliaram as respostas bioquímicas e fisiológicas de estirpes presentes em solo plantado com leguminosas selvagens sob diferentes níveis de potencial osmótico induzido por PEG 6000, e destacaram que bactérias que sobrevivem nas concentrações de 10% e 15% são classificadas como moderadamente osmotolerantes, acima de 15% de PEG, tolerantes e abaixo de 10% de PEG, são consideradas sensíveis. Logo essas três estirpes podem ser consideradas bactérias tolerantes ao déficit hídrico. As bactérias apresentam variadas capacidades de adaptação em diferentes condições de estresse osmótico (NAZ et al., 2009; SGROY et al., 2009) dependendo de sua diversidade genética (TRABELSI et al., 2009). O controle da osmorregulação através da produção de compostos como prolina (YAAKOP et al., 2016), trealose e glicina (DAS et al., 2015) são alguns mecanismos que ajudam as bactérias a sobreviverem em condições de escassez de água. Outros mecanismos que ajudam as bactérias a sobreviverem sob o déficit hídrico são as substâncias poliméricas extracelulares como exopolissacarídeos, EPS (NGUMBI & KLOPPER, 2016).

A secreção de EPS pelas rizobactérias tem sido relatada como facilitadora da colonização das raízes e formação de biofilmes, o que confere proteção das raízes contra a dessecação. GHOSH et al. (2019a) observaram um incremento na biomassa fresca e seca de parte aérea em plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com rizobactérias tolerantes ao estresse hídrico produtora de EPS e fitormônios. HUSSAIN et al. (2018) avaliaram plantas de milho submetidas ao estresse hídrico e inoculadas com rizóbios produtores de EPS, o grupo observou um incremento na biomassa dessas plantas, além disso o rizóbio teria induzido modificações nas raízes, melhorando assim a absorção de água e nutrientes. No presente, os resultados mostraram que as três estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 foram capazes de produzir EPS nas diferentes fontes de carbono e esse mecanismo pode ajudar essas estirpes a sobreviverem em condições limitantes de água. A estirpe BR 3296 e BR 3299 produziram elevadas concentrações de EPS em meio de cultura com 10% de sorbitol. O sorbitol, manitol

ou polietilenoglicol (PEG) geralmente são usados para simular condições de seca (VERSLUES et al., 2006), por reduzirem o potencial da água no meio, semelhante à seca no solo. Esse dado sugere que, em condições de restrição hídrica, essas duas estirpes BR 3296 e BR 3299 apresentam a produção de EPS estimulada, o que pode auxiliar as plantas a reduzirem os efeitos causados pela seca. Exopolissacarídeos secretados pelas rizobactérias podem ter efeitos positivos sobre a saúde das plantas. O EPS aumenta a colonização de bactérias nas raízes e forma uma camada protetora na rizosfera que ajuda as plantas a reduzirem os danos causados pelo estresse, permitindo a absorção de nutrientes pelas raízes (VURUKONDA et al. 2016; GHOSH et al., 2019a).

Durante o crescimento vegetal, o biofilme pode auxiliar na colonização radicular e proteger as células vegetais de condições limitantes de água (RAMEY et al., 2004; CHANG et al., 2007). Uma variedade de funções específicas como a motilidade flagelar, quimiotaxia e produção de exopolissacarídeo são relevantes para a colonização e formação de biofilme em raízes de plantas (LUGTENBERG et al., 2002). No presente estudo as três estirpes estudadas formaram biofilme no potencial osmótico de -0,02 MPa, porém a estirpe BR 3299 se mostrou mais eficiente em formar biofilme em condição limitante de água. Em condições de seca as bactérias podem ser induzidas a produzirem biofilme para se protegerem da dessecação, no entanto, a produção de biofilme varia de acordo com as bactérias e condições do meio. As bactérias podem produzir biofilme quando estiverem sob condição de estresse hídrico, o biofilme também pode resultar na promoção de crescimento das plantas (RICCI et al., 2019). O caráter distintivo da ação de biofilmes benéficos desenvolvidos *in vitro* já mostrou potencial para trazer numerosos efeitos favoráveis às aplicações biotecnológicas microbianas (SENEVIRATNE et al., 2007). KHAN et al. (2011) caracterizaram o biofilme bacteriano sob sistemas *in vitro* e *in vivo* e verificaram o envolvimento bacteriano na eficácia do crescimento das plantas de grão-de-bico sob condições de estresse hídrico.

As rizobactérias que possuem a habilidade de sintetizar o hormônio AIA podem ajudar as plantas a suportarem a falta de água por estimular o crescimento das raízes, e absorção de água e nutrientes (TAHIR et al., 2015). De acordo com o modelo proposto por SHI et al. (2014), as auxinas medeiam a tolerância ao estresse hídrico, melhorando a arquitetura da estrutura radicular, a homeostase metabólica, a desintoxicação das espécies reativas de oxigênio e induzindo uma infinidade de genes relacionados ao estresse. As estirpes BR 3296, BR 3299 e BR 3301 são capazes de sintetizar AIA na presença de triptofano, no entanto, em meio de cultura sem o precursor a produção de AIA não foi detectada. Além disso, a

quantidade de AIA sintetizado por cada estirpe variou de acordo com a concentração de triptofano adicionado ao meio e o tempo de cultivo das bactérias. A capacidade de produção de AIA por essas estirpes é uma característica importante e pode ser importante no processo de tolerância a estresse hídrico nos nódulos. No entanto, há necessidade de uma avaliação dos níveis desse hormônio nas plantas inoculadas e não inoculadas para confirmar se essas bactérias podem alterar os níveis de AIA nos nódulos. As rizobactérias podem não se comportar da mesma maneira após a inoculação nas plantas sob estresse ambiental, como ocorre em condições de meio de cultura. O fato de a bactéria sintetizar fitormônios em certas quantidades em meio de cultura não garante a síntese desse fitormônio nas mesmas quantidades quando inoculados nas plantas ou presentes no solo (GHOSH et al., 2019b). No entanto, na maioria dos estudos que envolvem a caracterização de PGPR, é feita uma correlação dos fitormônios produzidos por PGPR nas plantas com base na secreção de fitohormônio observada sob condições *in vitro* (SANDHYA et al. 2009, 2010). No entanto, TAHIR et al. (2019) atribuiu o ganho de crescimento, produtividade e qualidade de plantas de milho sob condições de estresse em experimentos de campo, a inoculação com rizobactérias produtoras de AIA, ACC deaminase e exopolissacarídeos.

Diversos grupos de trabalhos têm buscado utilizar bactérias do solo tolerantes para amenizar os efeitos causados por estresse abiótico em plantas através da simbiose (DIMKPA et al., 2009; GROVER et al., 2010). Desse modo, tem sido importante selecionar bactérias com características multifuncionais, como tolerância ao estresse abiótico e características de promoção de crescimento de plantas testadas *in vitro* de modo que possam ser usadas para reduzir o déficit hídrico nas plantas. ARZANESH et al. (2011) mostraram que *Azospirillum* sp. é capaz de sobreviver sob condição de seca, indicando que as bactérias por si só e a quantidade de exsudados radiculares produzidos sob restrição hídrica são capazes de manter o crescimento bacteriano. A suspensão da irrigação nas plantas de feijão-caupi nos dois experimentos realizados em casa-de-vegetação provocou alterações na condutância estomática, no conteúdo relativo de água e no teor de clorofila *a* e *b*. Essas alterações foram refletidas no acúmulo de N total e na biomassa seca de parte aérea e de nódulos.

LAU & LENNON (2011) mostram que o teor de clorofila em *Brassica rapa* cultivado em solo com baixa população microbiana é menor do que das plantas cultivadas em solo com comunidade microbiana mais elevada. Os teores de clorofila *a* e *b* avaliados após as plantas serem submetidas ao déficit mostraram que não houve diferença significativa sob os dois regimes hídricos, nos tratamentos com as estirpes no segundo experimento. Já as plantas

controlem adubadas com N mineral (no segundo experimento) apresentaram redução no conteúdo de clorofilas quando as plantas foram submetidas à restrição hídrica. SHIRINBAYAN et al. (2019) também observou que o teor de clorofila foi significativamente aumentado em plantas de milho plenamente irrigadas, devido a inoculação com *Azotobacter*, comparado com as plantas controle.

A condutância estomática das plantas de feijão-caupi submetidas ao déficit hídrico foi menor devido o fechamento dos estômatos. No entanto, mesmo com a redução da abertura dos estômatos, as plantas inoculadas com as estirpes parecem que controlaram melhor esse mecanismo. De acordo com KRAMER & BOYER (1995) a eficiência no controle estomático permitiu uma alta atividade fotossintética, o que é desejável para as plantas em situação de déficit hídrico. MENDES et al. (2007) também constataram redução na abertura estomática quando avaliaram a relação fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica na fase reprodutiva. NASCIMENTO et al. (2011), avaliando a tolerância de genótipos de feijão-caupi ao déficit hídrico, observaram uma variação na abertura estomática de $30 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ à $110 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O CRA das plantas, utilizado como indicador fisiológico do déficit hídrico, foi avaliado doze dias após o início da suspensão da irrigação. O teor relativo de água nas folhas é considerado, segundo NGUMBI & KLOPPER (2016), um dos melhores critérios para medir o *status* de água na planta, porque o CRA está envolvido nas atividades metabólicas dos tecidos. Em condição de irrigação plena (segundo experimento) nas plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 e BR 3299, percebe-se que o CRA foi maior. No entanto, sob déficit hídrico o CRA mais elevado foi observado nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3296, o que sugere essa estirpe pode de alguma forma atenuar o efeito da restrição hídrica. Os valores de CRA mostraram boa relação com a condutância estomática nas plantas sob déficit hídrico. As plantas sob déficit hídrico reduziram a abertura estomática e conseguiram manter o CRA relativamente alto. É possível observar que nas plantas inoculadas com as estirpes BR 3299, BR 3296 e BR 3301, sob restrição hídrica, a condutância estomática reduziu em relação as plantas plenamente irrigadas e o CRA se manteve relativamente alto em torno de 52% a 72%. No caso das plantas controle (plenamente irrigada) e inoculadas com as estirpes o maior CRA observado foi de 88%. CASANOVAS et al. (2002) sugeriram que o alto CRA em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasiliense* foi resultado do efeito do ácido abscísico que provocou o fechamento estomático e mitigou o estresse causado pelo déficit hídrico. DODD et al. (2010) também sugeriram que a mediação de rizobactérias no estado hormonal das

plantas pode provocar alterações em processos fisiológicos como o fechamento estomático e, por consequência causar o aumento do CRA. Segundo NGUMBI & KLOEPPER (2016), o CRA deve ser considerado estratégico na melhoria da tolerância à seca, e poderia ser usado como parâmetro na triagem de rizobactérias com potencial de afetar a tolerância de plantas ao estresse causado pela seca. De fato, diversos estudos mostram que sob condição de estresse, plantas inoculadas com rizobactérias mantiveram o CRA relativamente alto em comparação com plantas não inoculadas. Em experimento realizado com milho inoculado com *Pseudomonas putida* e expostas ao déficit hídrico, SANDHYA et al. (2010) mostraram que o CRA das plantas inoculadas foi maior do que nas plantas não inoculadas com rizobactérias. ARZANESH et al. (2011) também observaram maior valor de CRA em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum sp.* sob déficit hídrico. Resultado similar foi observado por GROVER et al (2014) em plantas de *Sorghum sp.* inoculadas com *Bacillus sp.* As plantas sob déficit hídrico mostraram um aumento de 24% de CRA em relação às plantas não inoculadas.

Em condições de seca, as plantas tentam reduzir a condutância estomática e conservar valores elevados de CRA a fim de evitar a desidratação dos tecidos. De acordo com NASCIMENTO et al. (2011), esse é um dos principais mecanismos de defesa das plantas ao déficit hídrico. No entanto, essa estratégia leva a uma diminuição de sua capacidade produtiva, sobretudo quando o estresse é prolongado. A fim de controlar a reserva de água, ocorre também a inibição do crescimento da parte aérea, o que reduz o tamanho da área foliar, diminuindo a transpiração (SKIRYCH & INZÉ, 2010). No primeiro e segundo experimento, foi observado um elevado acúmulo de MSPA nas plantas plenamente irrigadas e inoculadas com a estirpe BR 3301, indicando que esta estirpe apresenta ótimo potencial em incrementar a biomassa das plantas quando essas encontram-se em condições normais de irrigação. No entanto, a MSPA desse tratamento reduziu quando foi aplicado restrição hídrica no primeiro experimento (primeiro déficit hídrico) e no segundo experimento. Um segundo déficit hídrico aplicado durante a fase reprodutiva, observou-se que as plantas inoculadas com a estirpe BR 3301 apresentaram o acúmulo de MSPA similar aos das plantas plenamente irrigadas. Esse resultado sugere que a estirpe BR 3301 pode ter contribuído para aumento de biomassa de parte aérea mesmo sob o déficit hídrico. Também foi observado que nos dois experimentos as plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 (embora não tenham alcançado incremento de MSPA sob déficit hídrico) apresentaram a biomassa similar às plantas irrigadas. Para as plantas inoculadas com a estirpe BR 3296 no segundo experimento o acúmulo de MSPA foi similar entre os dois regimes de rega. Acredita-se que essas duas estirpes BR 3299 e BR 3296

contribuiu para a manutenção da biomassa de parte aérea das plantas de feijão-caupi mesmo quando a planta está em condições de estresse hídrico. Para VARDHARAJULA et al. (2011), plantas inoculadas com rizobactérias eficientes podem manter as taxas de crescimento de parte aérea perto do normal, o que pode resultar em vantagens para produção da cultura. SHIRINBAYAN et al. (2019) mostraram que plantas de milho inoculadas com estirpes de *Azotobacter* isoladas de regiões semi-áridas apresentaram um significativo aumento de massa seca de parte aérea em torno de 60% a 80% da sua capacidade de produção.

Em condição de estresse hídrico é comum que as plantas invistam no sistema radicular para conseguir alcançar a água. NAVEED et al. (2014) sugerem que o aumento da biomassa seca de raiz proporciona uma melhor absorção de água das plantas durante o período de seca. De acordo com DIMKPA et al. (2009) as bactérias capazes de sintetizar AIA ajudam no aumento da formação de raízes em várias espécies de plantas inoculadas. O aumento na formação de raiz ou a capacidade das bactérias em manter o bom funcionamento das raízes ajudam na absorção de água e nutrientes pela planta em condição de seca. FIGUEIRAS et al. (2019) avaliaram a inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em plantas de arroz sob estresse hídrico e mostraram que as plantas com restrição hídrica de 50% e 70% da capacidade de campo apresentaram maiores valores de relação de biomassa de raiz e parte aérea do que nas plantas inoculadas em 100% da capacidade de campo. No presente trabalho, observou-se que, as plantas inoculadas com as estirpes BR 3296, BR 3299 ou BR 3301 e sob déficit hídrico no primeiro experimento (26 DAE) e segundo experimento (38 DAE) mostraram o mesmo acúmulo de MSR das plantas plenamente irrigadas (Tabela 2 e 4). Esses resultados sugerem que, mesmo sob estresse, as plantas inoculadas investiram em raiz. Quando as plantas são expostas à deficiência de água, há um investimento no aumento do sistema radicular para encontrar e absorver água, em detrimento da redução da parte aérea a fim de reduzir a evapotranspiração (GUO et al., 2016). O maior investimento em MSR em detrimento da MSPA também foi observado por ABDELHAMID et al. (2011); FENTA et al. (2014); HUSSAIN et al. (2019); MARINKOVIĆ et al. (2019).

A nodulação das plantas de feijão-caupi não diferiu significativamente com a inoculação das três estirpes nos dois regimes de rega do segundo experimento. No entanto, o acúmulo de MSN do primeiro experimento e na primeira restrição hídrica foi similar entre as plantas inoculadas com as estirpes BR 3299 ou BR 3301. Entretanto, as plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 foram capazes de manter os nódulos sob restrição hídrica, o NN e a MSN não diferiram estatisticamente das plantas inoculadas e plenamente irrigadas, sugerindo

que o déficit hídrico não afetou a nodulação. De acordo com MHADHBI et al. (2011), estirpes mais tolerantes ao estresse osmótico conseguem se multiplicar melhor na rizosfera de uma planta hospedeira e contribuem para uma melhor tolerância à seca. As células bacterianas geralmente diminuem a desidratação acumulando solutos de baixo peso molecular como glicina, betaína, prolina e trealose (KIBIDO et al., 2019). MNASRI et al. (2007) verificaram que *Sinorhizobium meliloti* (estirpe LILM4H41) tolerante ao estresse salino, se mostrou mais eficiente na nodulação do que a rizobactéria referência *Rhizobium tropici* (CIAT 899) em plantas de feijão comum. Vale ressaltar que no o acúmulo de MSN do segundo experimento foi similar entre os dois regimes de rega para as plantas inoculadas com a estirpe BR 3299 o que corrobora o resultado observado no primeiro experimento. Analisando as plantas submetidas a restrição hídrica no segundo experimento, verifica-se que a MSN das plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3301 apresentaram redução na biomassa seca de nódulos. As bactérias e os nódulos são muito sensíveis à falta de água no solo, o déficit hídrico pode reduzir a nodulação e afetar a atividade da nitrogenase, o que conseqüentemente ocasiona a diminuição FBN. HUSSAIN et al. (2019) também observaram redução no número de nódulos e massa seca de nódulos na leguminosa *Tephrosia apollinea* submetido ao déficit hídrico induzido por PEG. KIBIDO et al. (2019) também observou redução na nodulação de plantas de soja submetida ao déficit hídrico aos 21 DAE.

A maior percentagem de N-total foi observada nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299; entretanto, a menor média de acúmulo de N por planta também foi observado nessas plantas. Isso se deve ao fato dessas plantas terem apresentado menor MSPA, com isso o N-total se mostra mais concentrado refletindo em maior percentagem. O acúmulo de N não diferiu significativamente entre as estirpes no regime plenamente irrigado. No entanto, quando essas plantas foram submetidas ao déficit hídrico, as plantas inoculadas com a estirpe referência BR 3301 apresentaram alto acúmulo de nitrogênio, o que sugere que fixaram mais nitrogênio do que as plantas inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3299. Além disso, as plantas inoculadas com a estirpe BR 3296 ou BR 3301 apresentaram mais nódulos do que as plantas inoculadas com a estirpe BR 3299, o que aparentemente também refletiu em maior acúmulo de N e conseqüentemente maior eficiência em fixar N atmosférico. Esta observação é importante, pois de acordo com DOBEREINER (1966), há uma correlação positiva entre a massa nodular e a quantidade de N acumulado em leguminosas. Essa mesma correlação também foi encontrada por FARIAS et al. (2016) analisando a eficiência simbiótica de rizóbios inoculados em planta de feijão-caupi. Isso sugere que plantas com maior número de

nódulos fixam mais N, embora, de acordo com XAVIER, et al. (2007); HANSEN et al. (1993), essa correlação não seja linear e, portanto, é necessário não só muitos nódulos, mas nódulos grandes, com maior eficiência relativa em fixar N.

A avaliação da expressão dos genes *VuNCED1*, *VuCPRD12* e *VuCPRD65* por RT-qPCR mostrou que o padrão de expressão foi alterado pelo regime hídrico e a estirpe de bactéria inoculada. Os genes avaliados pertencem a diferentes categorias funcionais, que incluem: metabolismo antioxidante da célula (*VuCPRD12*), e síntese de ABA (*VuNCED1* e *VuCPRD65*). Na literatura, há relatos da indução de *VuCPRD12*, *VuNCED1* e *VuCPRD65* em folhas de feijão-caupi, em resposta à desidratação progressiva (IUCHI et al., 1996a). A indução desses genes em nódulos de feijão-caupi foi observada, pela primeira vez por SILVA et al. (2012), sugerindo que parte dos mecanismos moleculares ativados em folhas durante o estresse também podem atuar nos nódulos e contribuir para a manutenção da FBN sob condições adversas. O gene *VuCPRD12* codifica uma enzima da família das álcool desidrogenases não metálicas de cadeia curta. Esse gene foi isolado de uma biblioteca de feijão-caupi em condições de desidratação progressiva (IUCHI et al., 1996a). Essas proteínas apresentam domínio multifuncional de oxireductase e atuam em uma variedade de vias metabólicas, que incluem: ácidos graxos, glicose e esteroides (PERSSON & KROOK et al., 1991). IUCHI et al., 1996^a também mostram que em caupi que o ABA acumulado sob condição de desidratação induziu o gene *VuCPRD12*. A indução dependente de ABA de genes para álcool desidrogenase de cadeia curta não-metálica, sugere que essa molécula pode estar envolvida na tolerância à seca nas plantas. Muitos genes da álcool desidrogenase (ADH) são induzidos por anaerobiose, desidratação, baixa temperatura e alto estresse salino (DOLFERUS et al. 1994). Os resultados de RT-qPCR mostraram que houve uma maior expressão do gene *VuCPRD12* em resposta ao déficit hídrico em nódulo de feijão-caupi inoculado com a estirpe referência BR 3301. Por outro lado, houve uma expressão menor em nódulos com as estirpes BR 3296 e BR 3299. O gene *VuCPRD65* foi isolado e caracterizado a partir de folhas de feijão-caupi submetidos à seca (IUCHI et al., 1996b). A sequência de aminoácidos deduzida da proteína CPRD65 mostrou alta similaridade com o VP14 de milho (TAN et al., 1997) e LeNCED1 de tomate (BURBIDGE et al., 1997). Devido a sua similaridade com a 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED), o gene *VuCPRD65* foi renomeado para *VuNCED1* (IUCHI et al., 2000). O gene *VuNCED1* de feijão-caupi é fortemente induzido pelo déficit hídrico em folhas um pouco antes do acúmulo de ABA causado pela seca. IUCHI et al. (2000) também mostraram que o gene *VuNCED1* codifica

uma enzima chave na biossíntese do ABA em plantas (NAMBARA & MARIONPOLI, 2005). Têm-se observado que a síntese de ABA, além de controlar processos fundamentais de desenvolvimento em plantas, está relacionada a estresses abióticos, como baixas temperaturas, condições de seca e alta salinidade (WAN & LI, 2006; CLEMENT et al., 2008). A expressão de genes NCED determina o acúmulo de ABA na célula, quanto maior a expressão desse gene maior a síntese de ABA, que por sua vez, induz as respostas ao déficit hídrico (ALEXANDRE et al., 2016). Os dados de RT-qPCR mostraram que o gene *VuCPRD65* e *VuNCED1* apresentaram maior nível de expressão em condições de estresse nos nódulos com as estirpes BR 3296 ou BR 3301, do que nos nódulos com a estirpe BR 3299. O que sugere que as plantas sob estresse hídrico e inoculadas com as estirpes BR 3296 ou BR 3301 pode está sintetizando mais ABA do que nas plantas inoculadas com a estirpe BR 3299. No entanto, essa hipótese ainda precisa de experimentos adicionais para confirmação. O padrão de expressão observado nos nódulos de feijão-caupi inoculados com diferentes estirpes de bactérias também sugere que a estirpe de bactéria pode afetar o padrão de expressão nos nódulos da planta. A expressão diferencial desses genes em nódulos de feijão-caupi provavelmente está associada a diferentes mecanismos de proteção da célula contra estresses abióticos, o que contribui de forma direta ou indireta para a manutenção da atividade de FBN nessas condições (SILVA et al., 2012). A caracterização funcional mais detalhada desses genes pode fornecer uma melhor compreensão dos processos adaptativos desenvolvidos no interior dessas estruturas simbióticas, o que permitiria o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas pontuais para maior contribuição da FBN em leguminosas sob condições tropicais.

8 CONCLUSÃO

- As estirpes testadas apresentaram capacidade de crescimento *in-vitro* sob os potenciais osmóticos de -0,2 MPa e -1,0 MPa.
- As estirpes possuem capacidade de produção *in vitro* de biofilme, EPS e AIA.
- O elevado acúmulo de N e a produção de AIA, EPS e biofilme pela estirpe BR 3301, contribuiu no crescimento das plantas de feijão-caupi (Gurguéia e Guariba) inoculadas com essa estirpe.
- As estirpes BR 3296 e BR 3299 sintetizadoras de AIA, EPS e biofilme ajudaram às plantas de feijão-caupi (Guguéia e Guariba) a resistirem o estresse hídrico aplicado.
- As estirpes inoculadas afetam o padrão de expressão dos genes *VuNCED1*, *VuCPRD12* e *VuCPRD65* nos nódulos de feijão-caupi sob estresse hídrico. Além disso, esse efeito varia de acordo com a estirpe utilizada para a inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAMID, M. T.; KAMEL, H. A.; DAWOOD, M. G. Response of nonnodulating, nodulating, and super-nodulating soybean genotypes to potassium fertilizer under water stress. *Journal of Plant Nutrition*, v. 34, p. 1675–1689, 2011.
- AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (*Pisum sativum*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRP1. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 24, p. 334–343, 2012.
- AHEMAD, M.; KIBRET, E. M. Mechanisms and Application of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University. Science*, v. 26, n.1, p. 1-20, 2013.
- AHN, T. S.; KA, J. O.; LEE, G. H.; SONG, H. G. Microcosm study for revegetation of barren land with wild plants by some plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 52–57, 2007.
- AMARASINGHE, U.; SMAKHTIN, V. Global water demand projections: past, present, and future. International Water Management Institute, Colombo, 2014.
- AMIN, A.; AHMED, I.; HABIB, N.; ABBAS, S.; HASAN, F.; XIAO, M.; LI, W. J. *Microvirga pakistanensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from desert soil of Cholistan, Pakistan. *Archives of Microbiology*, v. 198, p. 933-939, 2016.
- Agência Nacional das Águas (ANA): Atlas irrigação, 2018. Disponível em: <http://atlasirrigacao.ana.gov.br/>. Acesso: Fevereiro, 2019.
- ARAFI, M. M.; EL-BATANONY, N. H.; NOFAL, A. M. Inoculation effect of rhizobial strains on growth, yield and chemical composition of some legume crops in new reclaimed soil. *Middle East Journal*, v. 7, n. 2, p. 352-363, 2018.
- ARAUJO, F. F.; CREMONEZI, A. C. T.; MANRIQUE, A. E. R.; GONZAGA, E. N.; OLIVEIRA, G. C.; MAZZUCHELLI, R. C. L.; Seleção de rizobactérias para promoção do crescimento de algodoeiro. *Colloquium Agrariae, Presidente Prudente*, v. 8, n. Especial, p. 32-38, 2012.
- ARDLEY, J. K.; PARKER, M. A.; DE MEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. W.; REEVE, W. G.; HOWIESON, J. G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, n. 11, p. 2579-2588, 2012.
- ARZANESH, M. H.; ALIKHANI, H. A.; KHAVAZI, K.; RAHIMIAN, H. A.; MIRANSARI, M. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 197-205, 2011.

- ASHRAF, M.; BERGE, S. H.; MAHMOOD, O. T. Inoculating wheat seedling with exopolysaccharides producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, v. 40, p. 57-162, 2004.
- BARNAWAL, D.; BHARTI, N.; PANDEY, S. S.; PANDEY, A.; CHANOTIYA, C. S.; KALRA, A. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1 /TaDREB2 expression. *Physiologia Plantarum*, v. 161, n. 4, p. 502–514, 2017.
- BASTOS, E. A.; FERREIRA, V. M.; SILVA, C. R.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. Evapotranspiração e coeficiente de cultivo do feijão-caupi no vale do Gurguéia, PI. *Irriga*, v.13, p.182-190, 2008.
- BASTOS, E. A.; NASCIMENTO, S. P.; SILVA, E. M.; FREIRE FILHO, F. R.; GOMIDE, R. L. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, p.100-107, 2011.
- BEGUM, J. F.; TAMILARASI, M.; PUSHPAKANTH, P.; BALACHANDAR, D. A. Simple method for direct isolation of N-acyl-L-homoserine lactone mediated biofilm-forming rhizobacteria from roots. *Journal of Microbiological Methods*, v. 156, p. 34-39, 2019.
- BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S. K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *American Journal of Potato Research*, v. 75, p. 145-152, 1998.
- BORGHETTI, J. R.; SILVA, W. L. C.; NOCKO, H. R.; LOYOLA, L. N.; CHIANCA, G. K. Agricultura irrigada sustentável no Brasil: identificação de áreas prioritárias. FAO, Brasília, 2017.
- BRAGA, A. P. A. Rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para redução dos efeitos da seca em soja (*Glycine max* L.). Embrapa Meio Ambiente-Tese/dissertação (ALICE), 2016.
- BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 2331-2341, 2004.
- BRANDA, S. S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 13, p. 20-26, 2005.
- BREMNER, J. M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen-Total. In: methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. Eds., American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, p. 595-624, 1982.
- BRITO, M. P.; MARCIANO D.; MURAOKA, T.; CABRAL, S. E. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. *Bragantia*, v. 70, n. 1, p. 206-2015, 2011.
- BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; TAYLOR, I. B. Structure and expression of a cDNA encoding a putative neoxanthin cleavage enzyme (NCE)

isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. Journal of Experimental Botany, v. 47, p. 2111-2112, 1997.

CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; KONDÖRFER, G. H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura de milho, em sistema plantio direto no triângulo mineiro (Mg). Revista Brasileira De Ciência Do Solo, v. 24, p. 363-376, 2000.

CAMERINI, S.; SENATORE, B.; LONARDO, E.; IMPERLINI, E.; BIANCO, C.; MOSCHETTI, G.; ROTINO, G.L.; CAMPION, B.; DEFEZ, R. Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. Archives of Microbiology, v 190, p. 67–77, 2008.

CAMPBELL, L.; EUSTON, S. R.; AHMED, M. A. Effect of addition of thermally modified cowpea protein on sensory acceptability and textural properties of wheat bread and sponge cake. Food Chemistry, Barking, v. 194, p. 1230-1237, 2016.

CARVALHO, M.; CASTRO, I.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; CORREIA, C.; EGEE-CORTINES, M.; MATOS, M.; LINO-NETO, T. Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. Journal of Plant Physiology, p. 153001, 2019.

CASANOVAS, E. M.; BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J. *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. Cereal Research Communications, Rio de Janeiro, p. 343–350, 2002.

CASTRO, P.; PUERTOLAS, J.; DODD, I. C. Stem girdling uncouples soybean stomatal conductance from leaf water potential by enhancing leaf xylem ABA concentration. Environmental and Experimental Botany, v. 159, p. 149-156, 2019.

CATELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. de M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

CHANG, W. S.; van de MROTEL, M.; NIELSEN, L.; GUZMAN, G. N.; LI, XI.; HALVERSON, L. J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water limiting conditions. Journal of Bacteriology, Washington, v. 189, n. 22, p. 8290-8299, 2007.

CHENU, C.; ROBERSON, E. B. Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. Soil Biology Biochemistry, v. 28, p. 877–884, 1996.

CLEMENT, M.; LAMBERT, A.; HEROUART, D.; BONCOMPAGNI, E. Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. Gene, v.426, p.15-22, 2008.

COLLINS, M.; MINOBE, S.; BARREIRO, M.; BORDONI, S.; KASPI, Y.; KUWANO-YOSHIDA, A.; XIE, S. P. Challenges and opportunities for improved understanding of regional climate dynamics. Nature Climate Change, v. 8, n. 2, p. 101, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_03_14_15_28_33_boletim_graos_marco_2017bx.pdf. Acesso: Março 2019.

Conjuntura Recursos Hídricos Brasil. Disponível em: <http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/aguas-no-brasil/usos-da-agua/irrigacao>. Acesso: 13 de fevereiro de 2018.

CONSTRACURTA, A.; VANDELEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant associates bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 1101, n. 21, p. 108, 1995.

CORDEIRO, Y. E. M. Potencial de uso em recuperação de áreas degradadas: um estudo de três espécies nativas da Amazônia oriental sob dois regimes hídricos. Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias–Instituto de Ciências Agrárias-Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.

COSTA, A. F.; VALE, L. S.; OLIVEIRA, A. B.; BRITO, NETO, J. F.; RIBEIRO, W. S.; CARDOSO, G. D. Evaluation of yield performance in cowpea genotypes (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Australian Journal of Crop Science*, v. 11, n. 3, p. 308-312, 2017.

DAR, Z. M.; MASOOD, A.; MUGHAL A. H.; ASIF M.; MALIK M. A. Review on drought tolerance in plants induced by plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 7, n. 5, 2018.

DAHAL, R. H.; KIM, J. *Microvirga soli* sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 127-132, 2017.

D'ANDREA, A.C.; KAHLHEBER, S.; LOGAN, A.L.; WATSON, D.J. Early domesticated cowpea (*Vigna unguiculata*) from Central Ghana. *Antiquity*, v. 81, p. 686–698, 2007.

DAS, P.; NUTAN K. K.; SINGLA-PAREEK S. L.; PAREEK A. Understanding salinity responses and adopting 'omicsbased' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. *Frontiers Plant Science*, v. 6, p. 712, 2015.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 42, p. 55-76, 1991.

DE ALCANTARA, ROSA MARIA CARDOSO MOTA. Fixação biológica de nitrogênio em genótipos ancestrais de feijão-caupi. Embrapa Meio-Norte-Tese/dissertação (ALICE), 2011.

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

DOBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature*, v. 210, p. 850-852, 1966.

DODD, I.C.; ZINOVKINA, N.Y.; SAFRONOVA, V.I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, v. 157, p. 361–379, 2010.

DOLFERUS, R.; JACOBS, M.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiology*, v. 105, p. 1075-1087, 1994.

DOLFERUS, R. To grow or not to grow: A stressful decision for plants. *Plant Science*, v. 299, n. 0, p. 247-261, 2014.

DUBEY, A.; KUMAR, A.; ABD ALLAH, E. F.; HASHEM, A.; KHAN, M. L. Growing more with less: breeding and developing drought resilient soybean to improve food security. *Ecological Indicators*, v. 105, p. 425-437, 2019.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S.; BEHRENDT, U.; Abd_ALLAH, E. F.; BERG, G. Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-11, 2016.

ERCOLE, C.; CACCHIO, P.; BOTTA, AL.; CENTI, V. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: the role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy and Microanalysis*, v. 13, p. 42-50, 2007.

FALKER, Automação agrícola. Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG/CFL 1030). Porto Alegre, p. 33, 2008. Disponível em: <https://www.falker.com.br/produto-clorofilog-medidor-clorofila.php>. Acesso em: Fevereiro, 2019.

FARIAS, J. R. B.; ALMEIDA, I. R.; GARCIA, A. Zoneamento agroclimático da cultura da soja para o estado do Paraná. Londrina: Embrapa Soja, p. 84, 2001.

FARIAS, T. P.; SOARES, B. L.; ARAÚJO, A. R. A. D.; MOREIRA, F.; DE SOUZA, M. A. R. I. A. Symbiotic efficiency of rhizobia strains with cowpea in southern Maranhão. *Revista Caatinga*, v. 29, n. 3, p. 611-618, 2016.

FENTA, B. A.; BEEBE, S. E.; KUNERT, K. J.; BURRIDGE, J. D.; BARLOW, K. M.; LYNCH, P. J.; FOYER, C. H. Field phenotyping of soybean roots for drought stress tolerance. *Agronomy*, v. 4, p. 418-435, 2014.

FERNANDES, J. D. A irrigação no Brasil: situação e diretrizes. Brasília: Ministério da integração nacional; Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, v. 132, 2008.

FIGUEIRAS, L.; SILVA, R.; ALMEIDA, I.; VIDAL, M.; BALDANI, J. I.; MENESES, C. H. S. G. *Gluconacetobacter diazotrophicus* mitigates drought stress in *Oryza sativa* L. *Plant and Soil*, p. 1-17, 2019.

FIGUEIREDO, M. D. V. B.; Bonifacio, A.; Rodrigues, A. C.; de Araujo, F. F. Plant growth-promoting rhizobacteria: key mechanisms of action. In: *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer, Singapore, p. 23-37, 2016.

FINKELSTEIN, R. Abscisic acid synthesis and response, *The Arabidopsis book*, v. 11, p. 166, 2013.

FOYER, C. H.; VALADIER, M.H.; MIGGE, A.; BECKER, T. W. Drought-induced effects on nitrate reductase activity an mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology*, v. 117, p. 283-292, 1998.

FLORKE, M.; KYNAST, E.; BARLUND, L.; EISNER, S.; WIMMER, F.; ALCAMO, J. Domestic and industrial water uses of the past 60 years as a mirror of socio-economic development: a global simulation study. *Global Environmental Change*, p. 144–156, 2013.

FLORKE, M.; SCHNEIDER, C.; MCDONALD, R. I. Water competition between cities and agriculture driven by climate change and urban growth. *Nature Sustainability*, v. 1, n. 1, p. 51, 2018.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 623, 2010.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. Laboratory manual of general microbiology – with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book Company, p. 145, 1928.

FREITAS, A. D. S.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V. S. B. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of brazil. *Biomass and Bioenergy*, v. 45, p. 109-114, 2012.

FREEMAN, B.C.; CHEN, C.; YU, X.; NIELSEN, L.; PETERSON, K.; BEATTIE, G.A. Physiological and transcriptional responses to osmotic stress of two *Pseudomonas syringae* strains that differ in epiphytic fitness and osmotolerance. *Journal os Bacteriology*, v. 195, p. 4742–4752, 2013.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants, *Journal of Plant Research*, v. 124, p. 509–525, 2011.

GHOSH, D.; GUPTA, A.; MOHAPATRA, S. A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on osmotic-stress mitigation in *Arabidopsis thaliana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 6, p. 90, 2019a.

GHOSH, D.; GUPTA, A.; MOHAPATRA, S. Dynamics of endogenous hormone regulation in plants by phytohormone secreting rhizobacteria under water-stress. *Symbiosis*, v. 77, n. 3, p. 265-278, 2019b.

GLICK, B. R. Plant growth promotion bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, v. 2012, p. 15, 2012.

GULL, M.; SOFI, P. A.; MIR, R. R.; ARA, A.; DAR, S. A.; BHAT, M. A. Maturity, biomass partitioning and growth response indices in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under water

stress. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, v. 11, n. 6, p. 863-869, 2018.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, p. 395-412, 2005.

GROVER, M.; ALI SKZ.; SANDHYA, V.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agricultural crops to abiotic stresses. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 1231-1240, 2011.

GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M.; RUMJANEK, N. V.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R.; Eficiência Agronômica de Estirpes de Rizóbio em Feijão-caupi Cultivado na Região da Pré-Amazônia Maranhense. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, p. 302-308, 2011.

GUO, Y.Y.; YU, H.Y.; KONG, D.S.; YAN, F.; ZHANG, Y.J. Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum* Murr. seedlings. *Photosynthetica* v. 54, p. 524-531, 2016.

HANSEN, A. P.; YONEYAMA, T.; KOUCHI, H.; HIRAOKA, K. Respiration and nitrogen fixation of hydroponically cultured *Phaseolus vulgaris* L. cv. OAC Rico and a supernodulating mutant. *Planta*, v. 189, n. 4, p. 546-556, 1993.

HARRIS, D.; TRIPATHI, R. S.; JOSHI, A. On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. *Direct seeding: Research Strategies and Opportunities*, International Research Institute, Manila, Philippines, p. 231-240, 2002.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, v.8, n. 19, p. 2, 2007.

HUANG, Y.; JIAO, Y.; XIE, N.; GUO, Y.; ZHANG, F.; XIANG, Z.; LI, D. OsNCED5, a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene, regulates salt and water stress tolerance and leaf senescence in rice. *Plant Science*, p. 110-188, 2019.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. *Embrapa Soja-Documents (Infoteca-E)*, 2007.

HUSSAIN, M. B.; MAHMOOD, S.; AHMED, N.; NAWAZ, H. Rhizobial inoculation for improving growth physiology, nutrition and yield of maize under drought stress conditions. *Pakistan Journal Botany*, v. 50, n. 5, p. 1681-1689, 2018.

HUSSAIN, M. I.; EL-KEBLAWY, A.; ALJABI, A. E.; ALJABI, D. E.; HAFEZ, M.; AL JASMI, A.; TEMPERTON, V. M. Nitrogen fixation and carbon assimilation of the desert legume *Tephrosia apollinea* under PEG-induced osmotic stress. *Flora*, v. 251, p. 105-113, 2019.

Information System on Water and Agriculture – AQUASTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/irrigationmap/>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2018.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought tolerant cowpea. *Plant Physiology*, v.123, p.553–562, 2000.

IUCHI, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; SHINOZAKI, K. Characterization of two cDNAs for novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea. *Journal Plant Research*, v. 109, p. 415–424, 1996a.

IUCHI, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; TERAU, T.; SHINOZAKI, K. Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNAs and analysis of their gene expression. *Plant Cell Physiology*, v. 37, p. 1073–1082, 1996b.

IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology*, v. 123, p. 553-562, 2000.

JAMSHAD, M. U.; ZAHIR, Z. A.; ASGHAR, H. N.; JAMIL, A. Variability in stress tolerance and potential of endophytic bacteria to improve chickpea growth under water limited conditions. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, v. 55, n. 3, p. 531-539, 2018.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 236, p. 163-173, 2004.

KAMAU, D.M.; JHJ, S.; OENEMA, O.; OWUOR, P. O. Productivity and nitrogen use of tea plantations in relation to age and genotype. *Field Crops Research*, v. 108, n. 1, p. 60-70, 2008.

KANSO, S., & PATEL, B. K. *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 401-406, 2003.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M. AVILA, L. A. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, Jaguariúna, v. 168, p. 183-191, 2013.

KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five classical plant hormones. *The Plant Cell*, v.9, p. 1197-1210, 1997.

KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 452, 2009.

KIZIS, D.; LUMBRERAS, V.; PAGES, M. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters*, v.498, p.187-189, 2001.

KHAN, N.; MISHRA, A.; CHAUHAN, P. S.; & NAUTIYAL, C. S. Induction of *Paenibacillus lentimorbus* biofilm by sodium alginate and CaCl₂ alleviates drought stress in chickpea. *Annals of applied biology*, v. 159, n. 3, p. 372-386, 2011.

KHAN, N.; BANO, A.; BABAR, M. A. The stimulatory effects of plant growth promoting rhizobacteria and plant growth regulators on wheat physiology grown un sandy soil. Archives of Microbiology, v. 201, p. 769, 2019.

KIBIDO, T.; KUNERT, K.; MAKGOPA, M.; GREVE, M.; VORSTER, J. Improvement of rhizobium soybean symbiosis and nitrogen fixation under drought. Food and Energy Security, p. 177, 2019.

KUHN, K. M.; DERISI, J. L.; BROWN, P. O.; SARNOV, P. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. Molecular and cellular biology, v. 21, n. 3, p. 916-927, 2001.

KUULASMA, T. OLIGO EXPLORER. University of Kuopio, Finland, Kuopio, 2002.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. Academic Press, New York, p. 495, 1995.

KRISHANIA, S.; DWIVEDI, P.; AGARWAL, K. Strategies of adaptation and injury exhibited by plants under a variety of external conditions: a short review. Comunicata Scientiae, v. 4, n. 2, p. 103-110, 2013.

LACERDA, A. D.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L.; Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. Revista Ceres, v. 51, p. 67-82, 2004.

LARCHER, W. Ecofisiologia vegetal (Tradução: Carlos H. Pedro), Ed. Rima, São Paulo, p. 531, 2000.

LAU, J. A.; LENNON, J.T. Evolutionary ecology of plant–microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. New Phytologist, v. 192, p. 215–224, 2011.

LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. Annals of Botany, v. 89, p. 871-885, 2002.

LIMA-PRIMO, H. E.; HALFELD-VIEIRA, B. D. A.; NECHET, K. D. L.; DE SOUZA, G. R.; MIZUBUTI, E. S.; DE OLIVEIRA, J. R. Influence of bacterial blight on different phenological stages of cowpea. Scientia Horticulturae, v. 255, p. 44-51, 2019.

LLANES, A.; ANDRADE, A.; ALEMANO, S.; LUNA, V. Alterations of endogenous hormonal levels in plants under drought a salinity. American Journal of Plant Science, v. 7, p. 1357-1371, 2016.

LONARDI, S.; MUÑOZ-AMATRIAÍN, M.; LIANG, Q.; SHU, S.; WANAMAKER, S. I.; LO, S.; ALHAKAMI, H. The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). The Plant Journal, v. 98, n. 5, p. 767-782, 2019.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN, A. W. T. F.; BLOEMBERG, G. V. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 81, p. 373–383, 2002.

LUNDBERG, S. D.; LEBEIS, S. L.; PAREDES, H. S.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; RIO, T.; EDGAR, R.; EICKHORST, T.; LEY, R.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S.; DANGL, J. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, v. 488, p. 86-90, 2012.

MACHADO, D.; LAGÔA, A.; RIBEIRO, R.; MARCHIORI, P.; MACHADO, R.; MACHADO, E. Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 5, p. 487-495, 2013.

MAGALHÃES, F. M. M. O estado atual do conhecimento sobre fixação biológica de nitrogênio na Amazônia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, Belém. Anais. Belém: Embrapa CPATU, 1986. p.499-512, 1986.

MAGDANOVA L. A.; GOLYASNAYA, N. V. Heterogeneity as an adaptive trait of microbial populations. *Microbiology*, v. 1, p. 1-10, 2013.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [S.l.], v. 444, n. 2, p.139- 158, 2005.

MARCOS, F. C. C. Influência de bactérias endofíticas na fisiologia de plantas de cana-de-açúcar sob restrição hídrica. Dissertação. Instituto Agrônomo de Campinas, 2012.

MARINKOVIC, J.; DORDEVIC, V.; BALESEVIC-TUBIC, S.; BJELIC, D.; VUCELIC-RADOVIC, B.; JOSIC, D. Osmotic stress tolerance, PGP traits and RAPD analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Genetica*, v. 45, n. 1, p. 75–86, 2013.

MARINKOVIĆ, J.; BJELIĆ, D.; ĐORĐEVIĆ, V.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; JOŠIĆ, D.; VUCELIĆ-RADOVIĆ, B. Performance of different *Bradyrhizobium* strains in root nodule symbiosis under drought stress. *Acta physiologiae plantarum*, v. 41, n. 3, p. 37, 2019.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P. I. Field performance of cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian semiarid. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014.

MARTENS, D. A.; W. R. T. FRANKENBERGER, Jr. Soil saccharide extraction and detection. *Plant Soil*, v. 149, p.145–147, 1993.

MEDICI, L. O.; AZEVEDO, R. A.; CANELLAS, L. P.; MACHADO, A. T.; PIMENTEL, L. C. Stomatal conductance of maize under water and nitrogen deficits. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n.4, p. 599-601, 2007.

MENDES, R. M. S.; TÁVORA, F.; BITOMBEIRA, J.; NOGUEIRA, R. Relações fonte-dreno em feijão-de-corda submetido à deficiência hídrica. *Revista Ciência Agrônômica*, v. 38, n. 1, p. 95-103, 2007.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VOORT, M.; SCHNEIDER, J.; PICENO, Y.; DESANTIS, T.; ANDERSEN, G.; BAKKER, P.; RAAIJMAKERS, J. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, v. 322, p. 1097, 2011.

MHADHBI, H.; CHIHAOUI, S.; MHAMDI, R.; MNASRI, B.; JEBARA, M. A.; MHAMDI, R. A highly osmotolerant rhizobial strain confers a better tolerance of nitrogen fixation and enhances protective activities to nodules of *Phaseolus vulgaris* under drought stress. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 4555–4563, 2011.

MICHEL, B.E.; KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology, Lancaster*, v. 51, n. 6, p. 914-916, 1973.

MNASRI, B.; MRABET, M.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M. E.; MHAMDI, R. Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂ fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (*bv. mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, v. 187, p. 79-85, 2007.

MONIER, J. M.; LINDOW, S. E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promote aggregate formation on leaf surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Washington*, v. 100, n. 26, p. 15077-15982, 2003.

MOREAU, D.; BARDGETT, R. D.; FINLAY, R. D.; JONES, D. L.; PHILIPPOT, L. A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*, v. 33, n. 4, p. 540-552, 2019.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora Ufla, 2002.

MOURA, J. Z.; PÁDUA, L. E. D. M.; de Moura, S. G.; TORRES, J. S.; SILVA, P. R. R. E. Escala de desenvolvimento fenológico e exigência térmica associada a graus dia do feijão-caupi. *Revista Caatinga*, v. 25, n. 3, p. 66-71, 2012.

DO NASCIMENTO, S. P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C.; FREIRE FILHO, F. R.; DA SILVA, E. M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. *Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2011.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Promoters and transcription factors in abiotic stress-responsive gene expression. *Abiotic Stress Adaptation in Plants*, p. 199–216, 2009.

NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science*, v.5, n. 170, 2014.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism, *Annual Review of Plant Biology*, v. 56, p. 165–185, 2005.

NAVEED, M.; MITTER, B.; REICHENAUER, T. G.; WIECZOREK, K.; SESSITSCH, A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter sp.* FD17. *Environmental and Experimental Botany*, v. 97, p. 30-39, 2014.

NAVNITA, S.; KULDEEP, Y.; JAGBEER C.; NEETU, B.; ASHOK A. *Mycorrhizala arbuscular* symbiosis and water stress: a critical review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Sciences*, v. 38, n. 4, p. 427-453, 2015.

NASEEM, H; AHSAN, M; SHAHID, MA; KHAN, N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology*, v. 58, p. 1009-1022, 2018.

NAZ, I.; BANO, A.; TAMOOR-UL-HASSAN. Morphological, biochemical and molecular characterization of rhizobia from halophytes of Khewra Salt Range and Attock. *Pakistan Journal of Botany*, v. 41, p. 3159-3168, 2009.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: Mecanismos fisiológicos e moleculares. *Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, p. 12-18, 2001.

NGOUFACK, F. Z; EL-NODA, A. N; TCHOUANGUEP, F. M; EL-SODA, M. Effect of ropy and capsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese. *African Journal of Biotechnology*, v. 3, p. 512-518, 2004.

NGUMBI, E.; KLOEPPER, J. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, v. 105, p. 109-125, 2016.

NICO, M.; RIBAUDO, C. M.; GORI, J. I.; CANTORE, M. L.; CURÁ, J. A. Uptake phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants inoculated with plant growth-promotion bacteria. *Applied Soil Ecology*, v. 61, n. 0, p. 190-195, 2012.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; SANTOS, R. C. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Bodocongó, v. 4, p. 41-45, 2000.

ORRILLO, O. E.; ROMERO, M. E. A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1334, 2019.

OSÓRIO, J.; OSORIO M.; CHAVES, M.; PEREIRA, J. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, v. 18, p. 363-373, 1998.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. Pior seca dos últimos 50 anos no nordeste brasileiro confirma estatísticas da ONU sobre escassez. 2013. Disponível em: <http://www.onu.org.br/pior-seca-dos-ultimos-50-anos-no-nordeste-brasileiro>. Acesso: 04 de fevereiro de 2019.

PACHECO, R. S.; BODDERY, R. M.; ALVES, B. J. R.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A. P. Growth patterns of common bean cultivars affect the 'B' value required to quantify biological N₂ fixation using the ¹⁵N natural abundance technique. *Plant and Soil*, v. 419, p. 293-304, 2017.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, Taxonomy, and Morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. Et Al. Advances in Cowpea Research. 1. ed. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture, p. 1-12, 1997.

PARRAY, J. A.; JAN, S.; KAMILI, A. N.; QADRI, R. A.; EGAMBERDIEVA, D.; AHMAD, P. Current perspectives on plant growth-promotion rhizobacteria. *Journal of plant growth regulation*, New York, v. 35, p. 877-902, 2016.

PATEL, S.; JINAL, H.N.; AMARESAN, N. Isolation and characterization of drought resistance bacteria for plant growth promoting properties and their effect on chilli (*Capsicum annuum*) seedling under salt stress. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v. 12, p. 85-89, 2017.

PIETERSE, C. M. J.; DE JONGE, R.; BERENDSEN, R. L. The soil-borne supremacy. *Trends Plant Science*, v. 21, p. 171-173, 2016.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; GAIAD, J. E.; HIDALGO, M. J.; AVANZA, M. V.; PELLERANO, R. G. Classification of cowpea beans using multielemental fingerprinting combined with supervised learning. *Food control*, v. 95, p. 232-241, 2019.

PERSSON, B.; KROOK, M.; JORNVALL, H. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *European Journal of Biochemistry*, v. 200, p. 537-543, 1991.

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. EDUR - Editora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, p. 191, 2004.

PIMENTEL, D.; BERGER, B.; FILIBERTO, D.; NEWTON, M.; WOLFE, B.; KARABINAKIS, E.; NANDAGOPAL, S. Water resources: agricultural and environmental issues. *BioScience*, v. 54, n. 10, p. 909-918, 2004.

PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 719, 2015.

PIROMYOU, P.; SONGWATTANA, P.; GREETATORN, T.; OKUBO, T.; KAKIZAKI, K. C.; PRAKAMHANG, J. The type III secretion system (T3SS) is a determinant for rice-endophyte colonization by non-photosynthetic *Bradyrhizobium*. *Microbes and Environment*, v. 30, p. 291-300, 2015.

QIN, X.; ZEEVAART, J. A. D. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Plant Biology*, v. 96, n. 26, 1999.

RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n. 64, p. 725-730, 2014.

RAMEY, B. E.; KOUTSOUDIS, M.; VON BODMAN, S. B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*, Oxford, v. 7, p. 602-609, 2004.

RAMOS, H. M. M.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q.; Nascimento, F. N. Produtividade de grãos verdes do feijão caupi sob diferentes regimes hídricos. Engenharia Agrícola, v.34, p. 683-694, 2014.

RECCHIA, G. H.; KONZEN, E. R.; CASSIERI, F.; CALDAS, D. G.; TSAI, S. M. *Arbuscular mycorrhizal* symbiosis leads to differential regulation of drought-responsive genes in tissue-specific root cells of common bean. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1339, 2018.

REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; MAESTRI, M. Crescimento e relações hídricas de mudas de *Eucalyptus grandis* e *E. camaldulensis* em tubetes sob três regimes de irrigação. *Revista Árvore*, v. 12, n. 2, p. 183-195, 1988.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, R.S.; MACHADO, E.C.; MACHADO, D.F.S.P.; MAGALHÃES FILHO, J.R.; LANDELL, M.G.A. Revealing drought resistance and productive patterns in sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. *Experimental Agriculture*, v.49, p.212-224, 2013.

RICCI, E.; SCHWINGHAMER, T.; FAN, D.; SMITH, D. L.; GRAVEL, V. Growth promotion of greenhouse tomatoes with *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. biofilms and planktonic cells. *Applied Soil Ecology*, v. 138, p. 61-68, 2019.

RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J.I. Obtenção e seleção de Mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas. *Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia*, 2007 (boletim de pesquisa e desenvolvimento/ Embrapa Agrobiologia, ISSN 1516-2311, 27).

RUAN, J.; HAERDTER, R.; GERENDÁS, J. Impact of nitrogen supply on carbon/nitrogen allocation: a case study on amino acids and catechins in green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] plants. *Plant Biology*, v. 12, n. 5, p. 724-734, 2010.

RUAN, L.; WANG, L.; WEI, K.; CHENG, H.; LI, H.; SHAO, S.; WU, L. Comparative analysis of nitrogen spatial heterogeneity responses in low nitrogen susceptible and tolerant tea plants (*Camellia sinensis*). *Scientia horticulturae*, v. 246, p. 182-189, 2019.

RYU R. J.; PATTEN C. L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Bacteriology*, v. 190, p. 7200-7208, 2008.

SÁ, C.; CARDOSO, P.; FIGUEIRA, E. Alginate as a feature of osmotolerance differentiation among soil bacteria isolated from wild legumes growing in Portugal. *Science of The Total Environment*, v. 681, p. 312-319, 2019.

SAH, S. K.; REDDY, K. R; LI, J. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants, *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 571, 2016.

SAFRONOVA, V. I.; KUZNETSOVA, I. G.; SAZANOVA, A. L.; BELIMOV, A. A.; ANDRONOV, E. E.; CHIRAK, E. R.; WILLEMS, A. *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 94-100, 2017.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A, 1989.

SANDHYA, V.; ALI, S. K. Z.; GROVER, M.; REDDY, G.; VENKATESWARLU, B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, p. 17-26, 2009.

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

SANHUEZA, R. V.; MELO, I. D. Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos. Embrapa Uva e Vinho, 2007.

SCHMIDT, R.; MARTINA, K.; AMR, M.; ELSHAHAT, M. R.; MARLENE, M.; KENNETH, B. J.; RUDOLF, B; GABRIELE, B. Effects of bacterial inoculants on the indigenous microbiome and secondary metabolites of chamomile plants. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 64, 2014.

SENEVIRATNE, G.; ZAVAHIR, J. S.; BANDARA, W. M. M. S.; WEERASEKARA, M. L. M. A. W. Fungal–bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 739–743, 2007.

SEESURIYACHAN, P.; KUNTIYA, A.; HANMOUNGJAI, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T.; LEKSAWASDI, N. Optimization of exopolysaccharide overproduction by lactobacillus confuses in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.76, n.5, p. 912-917, 2012.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; SATOU, M. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full length cDNA microarray. *The Plant Journal*, v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.

SELVAKUMAR, G.; PANNEERSELVAM, P.; GANESHAMURTHY, A. N. Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 205-224, 2012.

SGROY, V.; F. CASSAN, O.; MASCIARELLI, M.F.; DEL PAPA, A.; LAGARES & LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 371-381, 2009.

SHARP, R. E.; HSIAO, T. C.; SILK, W. K. Growth of the maize primary root at low water potentials: II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology*, v. 93, n. 4, p. 1337-1346, 1990.

SHI, H.; CHEN, L.; YE, T.; LIU, X.; DING, K.; CHAN, Z. Modulation of auxin content in *Abidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 82, p. 209-217, 2014.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, p. 217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 221-227, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, p. 410-417, 2003.

SHIRINBAYAN, S.; KHOSRAVI, H.; MALAKOUTI, M. J. Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays*) by inoculation with *Azotobacter* strains isolated from semi-arid regions. *Applied Soil Ecology*, v. 133, p. 138-145, 2019.

SILAMBARASAN, S.; LOGESWARI, P.; CORNEJO, P.; KANNAN, V. R. Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 121, p. 55-62, 2019.

SILVA, E. C.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; VELOSO, M. E. C.; TRIVELIN, P. C. O. Aproveitamento do nitrogênio (15n) da crotalária e do milho pelo milho sob plantio direto em latossolo vermelho de cerrado. *Ciência Rural*, v. 36, n. 3 p. 739-746, 2006.

SILVA, H.; GALISA, P.; OLIVEIRA, R.; VIDAL, M.; ARAUJO, J. Expressão gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 47, n. 6, p. 797-807, 2012.

SILVA, E. B. J.; SILVA, K.; OLIVEIRA, S.; OLIVEIRA, P.; BODDEY, R.; ZILLI, J.; XAVIER, G. Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, n. 10, p. 804-812, 2014.

SILVA JUNIOR, E. B.; FAVERO, V. O.; XAVIER, G. R.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E.; *Rhizobium* Inoculation of Cowpea in Brazilian Cerrado Increases Yields and Nitrogen Fixation. *Agronomy Journal*, v. 110, p. 1-6, 2018.

SKIRY CZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 197-203, 2010.

SNAK, A. Associação de bactérias endofíticas com forrageiras e submetidas ao déficit hídrico. Dissertação de Mestrado – Universidade do Paraná, Palotina, 2018.

SOARES, A. L. de L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. de; MOREIRA, F. M. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p 795-802, 2006.

SOUZA, D.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactéria. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

SOUZA, P. J. D. O. P.; FARIAS, V. D. D. S.; LIMA, M. J. A. D.; RAMOS, T. F.; SOUSA, A. Cowpea leaf area, biomass production and productivity under different water regimes in Castanhal, Pará, Brazil. *Revista Caatinga*, v. 30, n. 3, p. 748-759, 2017.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

TAPASE, S. R.; MAWLANKAR, R. B.; SUNDHARAM, S. S.; KRISHNAMURTHI, S.; DASTAGER, S. G.; KODAM, K. M. *Microvirga indica* s p. Nov., an arsenite-oxidizing *Alphaproteobacterium*, isolated from metal industry waste soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, p. 3525-3531, 2017.

TAN, B. C.; SCHWARTZ, S. C.; ZEEWAART, J. A.; McCARTY, D. R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* v. 94, p. 12235-12240, 1997.

TAW, M. N.; LEE, H. I.; LEE, S.H.; CHANG, W. S. Characterization of MocR, a GntR-like transcriptional regulator, in *Bradyrhizobium japonicum*: its impact on motility, biofilm formation, and soybean nodulation. *Journal of Microbiology*, v. 1, p. 518-25, 2015.

TAIZ L.; ZEIGER E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2009.

TAHIR, M.; MIRZA, M. S.; HAMEED, S.; DIMITROV, M. R.; SMIDT, H. Cultivation-based and molecular assessment of bacterial diversity in the rhizosphere of wheat under different crop rotations. *PloS One*, v. 10, n. 6, e. 0130030, 2015.

TAHIR, M.; KHALID, U.; KHAN, M. B.; SHAHID, M.; AHMAD, I.; AKRAM, M.; AHMAD, N. Auxin and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity exhibiting rhizobacteria improved maize quality and productivity under drought conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 21, n. 5, p. 943-954, 2019.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, n. 10, p. 1153-1161, 2004.

TIMMUSK, S.; EL-DAIM, I. A. A.; COPOLOVOSCI, L.; TANILAS, T.; KANNASTE, A.; BEHERS, L.; NEVO, E.; SEISENBAEVA, G.; STENSTROM, E.; NIINEMETS, U. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PloS one*, v. 9, n. 5, p. e96086, 2014.

TRABELSI, D.; MENGONI, A.; AOUANI, M. E.; MHAMDI, R.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity and salt tolerance of bacterial communities from two Tunisian soils. *Annals of Microbiol*, v. 59, p. 1-8, 2009.

TISDALL, J. M.; OADES, J. M. Organic matter and water stable aggregates in soils. *J Soil Sci*, v. 33, p.141-163, 1982.

TULLIO, L. D.; NAKATANI, A. S.; GOMES, D. F.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Revealing the roles of *y4wF* and *tidC* genes in *Rhizobium tropici* CIAT 899: biosynthesis of indolic compounds and impact on symbiotic properties. *Archives of microbiology*, v. 201, n. 2, p. 171-183, 2019.

TURRAL, H.; BURKE, J.; FAURÈS, J. M. Climate change, water and food security (No. 36). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011.

UDVARD, M.; POOLE, P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review Plant Biology*, v. 64, p. 781-805, 2013.

UNAY, J.; PERRET, X. Synthetic plasmids to challenge symbiotic nitrogen fixation between rhizobia and legumes in: methods in rhizosphere biology research. Springer, Singapore, p. 3-18, 2019.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, v.35, p.71-74, 2007.

VANHOOREN, P.; VANDAMME, E. J. Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent Research developments in fermentation & bioengineering*, p. 253-300, 1998.

VARDHARAJULA, S.; ZULFIKAR ALI, S.; GROVER, M.; REDDY, G.; BANDI, V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2011.

VENTURI, V.; KEEL, C. Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Science*. 21, 187–198, 2016.

VERBON, E. H.; TRAPET, P. L.; KRUIJS, S.; TEMPLE-BOYER-DURY, C.; ROUWENHORST, T. G.; & PIETERSE, C. M. Rhizobacteria-mediated activation of the Fe deficiency response in *Arabidopsis* roots: impact on Fe status and signaling. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 909, 2019.

VEYISOGLU, A.; TATAR, D.; SAYGIN, H.; INAN, K.; CETIN, D.; GUVEN, K.; SAHIN, N. *Microvirga makkahensis* sp. nov., and *Microvirga arabica* sp. nov., isolated from sandy arid soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 109, n. 2, p. 287-296, 2016.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance drought, salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. *The Plant Journal*, v. 45, p. 523-539, 2006.

VICO, G.; MANZONI, S.; PALMROTH, S.; KATUL, G. Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytologist*, v. 192, p. 640-652, 2011.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, v. 184, p. 13-24, 2016.

WAN, X.R.; LI, L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 347, p. 1030-1038, 2006.

WINGENDER J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. What are bacterial extracellular polymeric substances? *Microbial extracellular polymeric substances*. Berlin, Heidelberg: Springer; p. 1-9, 1999.

WOOD, J.M. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Review of Microbiology*, 65, 215–238, 2011.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

XAVIER, T. F.; DE ARAÚJO, A. S. F.; DOS SANTOS, V. B.; CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v. 37, n. 2, p. 561-564, 2007.

XIONG, H; SHI, A; MOU, B; QIN, J; MOTES, D; LU, W; WU, D. Genetic diversity and population structure of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *PLoS One*, v. 11, n. 8 e0160941, 2016.

YAHAYA, D.; DENWAR, N.; BLAIR, M. W. Effects of moisture deficit on the yield of cowpea genotypes in the Guinea savannah of northern Ghana. *Agricultural Sciences*, v. 10, n. 4, p. 577-595, 2019.

YAAKOP, A.S.; CHAN, K.-G.; EE, R.; LIM, Y.L.; LEE, S.-K.; MANAN, F.A.; GOH, K.M. Characterization of the mechanism of prolonged adaptation to osmotic stress of *Jeotgalibacillus malaysiensis* via genome and transcriptome sequencing analyses. *Scientific Reports*, 6, 33660, 2016.

YAN, N.; MARSCHNER, P.; CAO, W.; ZUO, C.; QIN, W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, v. 3, p. 316-323, 2015.

YE, N.; JIA, L.; ZHANG, J. ABA signal in rice under stress conditions, *Rice* v.5, n. 1, 2012.

ZHANG, J.; SONG, F.; XIN, Y. H.; ZHANG, J.; FANG, C. *Microvirga guangxiensis* sp. nov., a novel alphaproteobacterium from soil, and emended description of the genus *Microvirga*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 8, p. 1997-2001, 2009.

ZHANG, X. J.; ZHANG, J.; YAO, Q.; ZHU, H. H. *Microvirga flavescens* sp. nov., a novel bacterium isolated from forest soil and emended description of the genus *Microvirga*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 667-671, 2019.

ZHAO, S.; RUSSEL, F. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, v. 12, p. 1047-1064, 2005.

ZHAO, P.; LIU, P.; SHAO, J.; LI, C.; WANG, B.; GUO, X.; YAN, B.; XIA, Y.; PENG, M. Analysis of different strategies adapted by two cassava cultivars in response to drought stress: ensuring survival or continuing growth. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 5, p. 1477-1488, 2014.

ZOU, J.; LIU, A.; CHEN, X.; ZHOU, X.; GAO, G.; WANG, W.; ZHANG, X. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, p. 851-861, 2009.

ANEXOS

Anexo A - Meio de cultura TY

Meio de cultura TY

5 g Cloreto de Cálcio Dihidratado

3 g Extrato de Levedura

0,9 g Triptona

⇒ Ajustar o pH para 6,8 - 7,0 com KOH sol. 10%;
Completar o volume para 1000 mL com água destilada;
Adicionar o agar (15 g).

Anexo B - Meio de cultura 79 segundo Fred e Waskman, 1928.

MEIO 79 (FRED E WAKSMAN, 1928)

Manitol (*) (crescimento lento)..... 10 g

K₂HPO₄.....sol. 10%..... 1 mL

KH₂PO₄.....sol. 10%..... 4 mL

MgSO₄.7H₂O.....sol. 10%..... 2 mL

NaCL.....sol 10%..... 1 mL

Extrato de levedura (**)...... 0,4 g

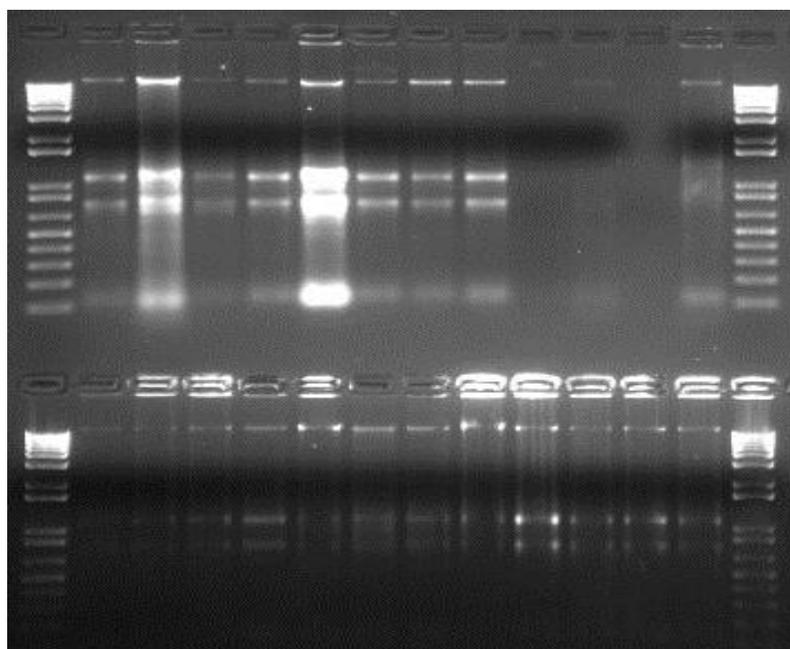
Azul de bromotimol 0.5% em 0.2N de KOH..... 5 mL

⇒ Ajustar o pH Para 6,8 - 7,0 com KOH sol. 10%; Completar o volume para
1000 mL com água destilada; Adicionar o agar (15 g).

ANEXO C - Pontos da curva de calibração de AIA em que há linearidade de resposta (Rodrigues et al., 2007).

AIA ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	AIA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Solução de AIA 10mM	Água destilada
25	4,38	2,5 μL	997,5 μL
50	8,76	5 μL	995 μL
100	17,52	5 μL	495 μL
200	35,04	10 μL	490 μL
300	52,56	15 μL	485 μL
400	70,08	20 μL	480 μL
500	87,60	25 μL	475 μL
600	105,11	30 μL	470 μL
700	122,63	35 μL	465 μL
800	140,15	40 μL	460 μL
900	157,67	45 μL	455 μL
1000	175,19	50 μL	450 μL

ANEXO D - Eletroforese em gel de agarose não-desnaturante (1,5% p/v) das amostras de RNA-total (500 ng/ μL), extraídas de nódulos de feijão-caupi utilizando o protocolo TRIzol. As primeiras e últimas linhas contêm o marcador 1 Kb ladder (Invitrogen®).



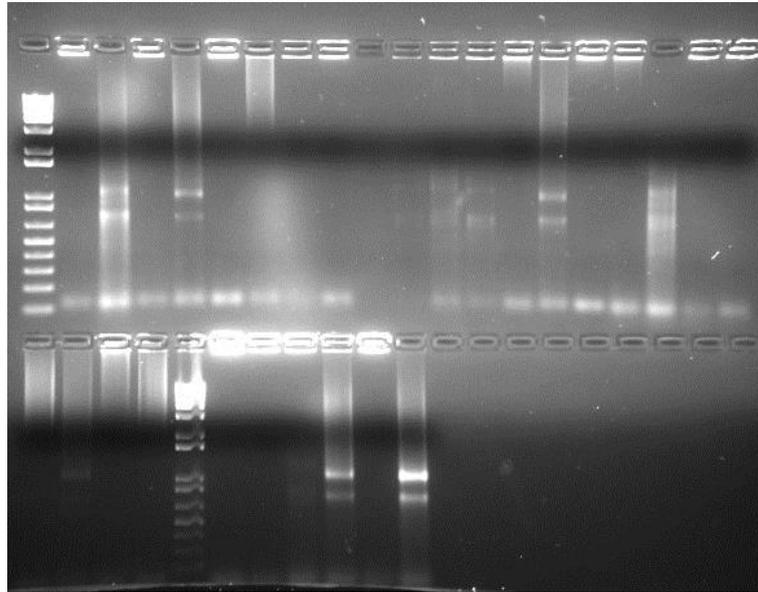
ANEXO E - Quantificação por espectrofotômetro (Nanodrop) e por fluorometria (Qubit®) do RNA-total extraído de nódulos de feijão-caupi, utilizando o protocolo TRIzol. Quantificação feita após tratamento do RNA com DNase. Amostras diluídas em 10X em água de PCR.

Tratamentos		Amostra	NanoDrop			Qubit
Regime de rega	Estirpe bacteriana		260/280	260/230	[ng/μL]	[ng/μL] ^a
Déficit hídrico	BR 3299	1	1,96	0,75	122,9	56,3
		2	1,92	0,79	71,2	78,2
		3	1,9	0,64	140,7	43,2
		4	1,9	0,64	90,3	61,5
		5	2	0,86	99,0	104,0
Irigado	BR 3299	6	1,96	0,83	108,0	83,2
		7	1,79	0,62	83,1	65,4
		8	1,98	1,09	111,4	66,1
		9	1,66	0,32	18,3	ND ^b
Déficit hídrico	BR 3296	10	1,8	0,55	122,9	36,2
		12	1,78	0,71	81,8	37,0
		13	1,79	0,48	70,2	32,1
		14	1,97	0,75	110,3	76,9
		15	1,97	0,97	103,7	47,5
Irigado	BR 3296	16	1,94	0,69	124,2	52,2
		17	1,85	0,67	103,6	37,6
		18	1,94	0,92	146,8	60,2
		19	1,9	0,71	109,9	70,1
Déficit hídrico	BR 3301	20	1,72	0,51	97,3	33,0
		21	1,99	1,07	89,2	56,4
		22	1,92	0,77	63,3	34,3
Irigado	BR 3301	23	1,94	0,86	88,2	42,3
		24	2,01	1,46	113,6	47,7

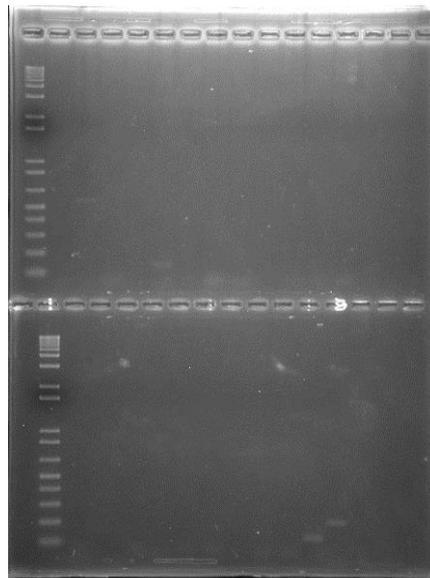
^aMédia de duas leituras.

^bNão detectado.

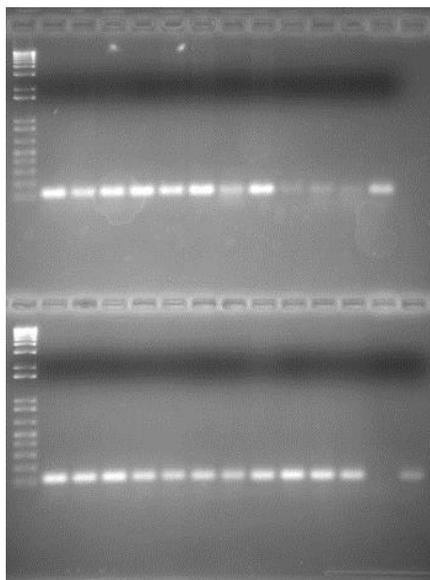
ANEXO F - Eletroforese em gel de agarose não-desnaturante (1,5% p/v) das amostras de RNA, extraídas de nódulos de feijão-caupi, após tratamento com DNase. Amostras diluídas 10X. A primeira linha contém o marcador 1 Kb *ladder* (Invitrogen®).



ANEXO G - Eletroforese em gel de agarose não-desnaturante (2% p/v) das amostras de RNA, extraídas de nódulos de feijão-caupi, após tratamento com DNase. Amostras diluídas 10X. A primeira linha contém o marcador 1 Kb *ladder* (Invitrogen®).



ANEXO H - Gel de agarose (2,0% p/v) para análise qualitativa da síntese de cDNA fita simples utilizando amostras-produto de RT-PCR.



ANEXO I - Quantificação por fluorometria (Qubit®) do cDNA sintetizado à partir do RNA tratado. Amostras diluídas em 10X. Média de duas leituras.

Tratamentos		Amostra	[ng/μL] ^a
Regime de Rega	Estirpe de bactéria		
Déficit hídrico	3299	1	9,5
		2	22,4
		3	20,6
		4	18,1
		5	17,4
Irrigado	3299	6	15,4
		7	10,5
		8	23,0
Déficit hídrico	3296	9	8,0
		10	11,6
		12	18,4
		13	10,4
		14	16,0
Irrigado	3296	15	24,7
		16	13,0
		17	15,2
		18	17,5
Déficit hídrico	3301	19	18,5
		20	21,2
		21	20,1
Irrigado	3301	22	27,9
		23	18,3
		24	16,1

ANEXO J: Quantificação relativa dos genes normalizadores *VuPDF2* e *VuYLS8* expressos em nódulos de feijão-caupi submetido a diferentes regimes de disponibilidade hídrica. Os dados de expressão gênica são representativos de quatro repetições biológicas independentes para cada tratamento e três replicatas técnicas. Os valores são as médias \pm erro padrão, as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

