



ISSN: 2525-815X

# Journal of Environmental Analysis and Progress

Journal homepage: [www.jeap.ufrpe.br/](http://www.jeap.ufrpe.br/)

10.24221/jeap.7.2.2022.4670.104-116



## Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas promovem ajustes anatômicos nas folhas de espécies nativas da Caatinga sob déficit hídrico

### Plant Growth Promoting Rhizobacteria promote anatomical adjustments in the leaves of native Caatinga species under water deficit

Angela Lucena Nascimento de Jesus<sup>a</sup>, Nielson Dinivan da Silva Brito<sup>a</sup>, Maria Jucicléa dos Santos Medeiros<sup>b</sup>, Andréa dos Santos Oliveira<sup>a</sup>, André Luiz Alves de Lima<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Unidade Acadêmica de Serra Talhada-UAST. Av. Gregório Ferraz Nogueira, s/n, Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. CEP: 56909-535. E-mail: [angela.lucena@outlook.com](mailto:angela.lucena@outlook.com), [nielsonbotancia@gmail.com](mailto:nielsonbotancia@gmail.com), [engandreasantos@gmail.com](mailto:engandreasantos@gmail.com), [andre.alima@ufrpe.br](mailto:andre.alima@ufrpe.br).

<sup>b</sup> Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Departamento de Botânica. Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 50670-901. E-mail: [clea.smedeiros@gmail.com](mailto:clea.smedeiros@gmail.com).

#### ARTICLE INFO

Recebido 28 Set 2021

Aceito 05 Mai 2022

Publicado 21 Jun 2022

#### ABSTRACT

In semiarid regions, water deficit is a factor that limits the establishment of seedlings, which need more efficient morphoanatomical structures. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (RPCPs) promotes better performance in cultivated plants; however, no records exist for native species in the semiarid region. The objective of this study was to evaluate the anatomical variations of leaves of four species of young plants from the riparian forest of the Caatinga inoculated with *Azospirillum lipoferum* cultivated under different levels of water deficit. The experiment was carried out in a nursery covered with 70% shade. Two hundred forty seeds of each species were germinated (*Triplaris gardneriana*, *Handroanthus impetiginosus*, *Licania rigida*, and *Myracrodruon urundeuva*), and half of the seeds were inoculated with the strain of *Azospirillum lipoferum* (BR-11080). Three irrigation levels were adopted: 25, 50, and 100% of the Reference Evapotranspiration (ET<sub>0</sub>). After three months, a leaf was collected from each individual for anatomical characterization. *A. lipoferum* conferred greater thickening of the leaf mesophyll (0.65 to 57%), the epidermis (50 to 95%), chlorophyllian parenchyma (40 to 80%), and thickness of the xylem wall (63%), especially in treatments of greater stress (25 and 50% of ET<sub>0</sub>). Deposition of biochemical components was verified, especially in plants with inoculum, in treatments with higher stress. These results show that RPCPs change the anatomical structures of young plants in the semiarid region, making them more tolerant to water deficit and, therefore, showing strong potential for use in reforestation and recovery of degraded areas.

**Keywords:** Leaf anatomy, *Azospirillum lipoferum*, riparian forests, microorganisms, semiarid.

#### RESUMO

Em regiões semiáridas, o déficit hídrico é um fator que limita o estabelecimento das plântulas, as quais necessitam de estruturas morfoanatômicas mais eficientes. As Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs) promovem uma melhor performance em plantas cultivadas, entretanto, os registros são escassos para espécies nativas do semiárido. Objetivou-se avaliar as variações anatômicas de folhas de quatro espécies de plantas jovens de mata ripária da caatinga inoculadas com *Azospirillum lipoferum* cultivadas sob diferentes níveis de déficit hídrico. O experimento foi conduzido em viveiro coberto com sombrite 70%. Foram postas para germinar 240 sementes de cada espécie (*Triplaris gardneriana*, *Handroanthus impetiginosus*, *Licania rigida* e *Myracrodruon urundeuva*), sendo metade das sementes inoculadas com a cepa de *Azospirillum lipoferum* (BR-11080). Três níveis de irrigação foram adotados: 25, 50 e 100% da Evapotranspiração de Referência

(ET0). Após três meses foi coletada uma folha de cada indivíduo para caracterização anatômica. *A. lipoferum* conferiu um maior espessamento do mesofilo foliar (0,65 a 57%), epiderme (50 a 95%), parênquima clorofiliano (40 a 80%) e espessura da parede do xilema (63%), especialmente nos tratamentos de maior estresse (25 e 50% da ET0). Verificou-se deposição dos componentes bioquímicos especialmente nas plantas com inóculo, nos tratamentos de maior estresse. Estes resultados mostram que as RPCPs conferem mudanças nas estruturas anatômicas de plantas jovens do semiárido, tornando-as mais tolerantes ao déficit hídrico e, portanto, apresentando forte potencial para uso em reflorestamento e recuperação de áreas degradadas.

**Palavras-Chave:** Anatomia foliar, *Azospirillum lipoferum*, florestas ripárias, microrganismos, semiárido.

## Introdução

As regiões semiáridas distribuem-se por grande parte do mundo (Nóbrega et al., 2011), e são caracterizadas pela irregularidade de chuvas e longos períodos secos, ocasionando a escassez hídrica (Trovão et al., 2007). Desta forma, o estabelecimento das plântulas em regiões semiáridas torna-se limitado (Duque et al., 2013). Para tolerar as condições de déficit hídrico, as plantas dessas regiões apresentam mecanismos que refletem na sua estrutura (Duque et al., 2013), como a redução de área foliar, fechamento estomático (Osakabe et al., 2014), aumento da compactação do mesofilo e variações na permeabilidade da cutícula, que limitam o desenvolvimento das plantas (Xoconostle-Cazares et al., 2010). Nesse contexto, as Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs) têm sido utilizadas para amenizar os efeitos negativos decorrentes da falta de água, através da produção de substâncias, dentre elas as auxinas e citocininas que reduzem o estresse e auxiliam em um melhor desenvolvimento estrutural das plantas (Kumar, Prakash & Johri, 2011). Apesar de estudos apontarem o efeito positivo da interação entre microrganismos e plantas cultivadas (Lucy et al., 2004; Freitas et al., 2003; Chen et al., 2000), são escassos os estudos que avaliam a real eficácia da relação entre microrganismos e plantas nativas de florestas ripárias do semiárido (Oliveira et al., 2018).

Em situações de elevada temperatura e escassez de água, as plantas respondem de diferentes formas para evitar a perda excessiva de água (Xoconostle-Cazares et al., 2010), como fechamento estomático, aumento da densidade de tricomas na face abaxial da folha ou perda de folhas (Chaves; Flexas & Pinheiro, 2009). Como consequência ocorre a diminuição do mesofilo foliar e do desenvolvimento da planta (Duque et al., 2013). Essas alterações limitam o crescimento, e sobrevivência dos vegetais, pois de acordo com Boeger & Wisniewski (2003), plantas sob menor disponibilidade de água e expostas a altas temperaturas, apresentam folhas de menores tamanhos e, em casos específicos, chegam a perder

suas folhas para evitar os efeitos da seca (Lima et al., 2021). Em razão disso, a planta é limitada a realizar funções importantes, como a fotossíntese e condutância estomática, além de interferir no desenvolvimento celular (Ahmad et al., 2014). Dessa forma, o déficit hídrico dificulta o estabelecimento das espécies vegetais (Ahmad et al., 2014).

Em condições de déficit hídrico alguns microrganismos fixadores de nitrogênio, promovem um melhor desenvolvimento e crescimento de espécies vegetais, melhorando a turgescência celular e reduzindo os efeitos da seca (Mendes, Garbea & Raaijmarkers, 2013). Entre esses microrganismos, as Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs) se destacam por não produzirem nódulos e desenvolvem-se de forma extracelularmente nos vegetais, estimulando a produção de fitormônios como auxinas e citocininas, que favorecem o desenvolvimento das plantas (Bottini et al., 1989). As rizobactérias do gênero *Azospirillum* pertencem às RPCPs, e possui alta capacidade de interação eficiente com as plantas submetidas a estresse hídrico, facilitando a absorção de água pela planta, e melhorando a realização dos processos fisiológicos nas espécies vegetais (Radwan et al., 2004).

A utilização das RPCPs proporciona aumento dos teores de clorofila, magnésio, nitrogênio e proteínas, os quais podem melhorar o desempenho fotossintético, dando melhores condições para estabelecimento das plantas (Kaushal et al., 2015). Estudos como o de Freitas (1998) mostram a eficiência de microrganismos promotores do crescimento em cultivares de café, que melhorou o desenvolvimento em plantas inoculadas. Em espécies de ambientes naturais, destacam-se os estudos de Oliveira et al. (2018), onde foi observado que a *A. lipoferum* possibilitou um maior desenvolvimento de raízes e parte aérea, bem como proporcionou maior potencial hídrico e teor de clorofila em plântulas de *Myracrodruon urundeuva*, e os de Ricón (2008); Liu et al. (2013) que também avaliaram a interação de rizobactérias em espécies vegetais. No entanto, não há relatos de

estudos que abordem a influência das RPCPs na estrutura anatômica foliar de plantas do semiárido.

Tendo em vista, que o déficit hídrico em plantas causa modificações morfoanatômicas, ressalta-se a importância de se conhecer como esses microrganismos atuam nos tecidos foliares. Neste sentido, buscou-se testar a hipótese que a inoculação de RPCPs promovem mudanças nas estruturas anatômicas foliares, que possibilitam maior tolerância ao estresse hídrico (Pereira et al., 2012). Objetivou-se avaliar as respostas anatômicas foliares de quatro espécies nativas de floresta ripária do semiárido do Brasil, inoculadas com a rizobactéria *Azospirillum lipoferum* e sob diferentes níveis de déficit hídrico.

## Material e Métodos

### Área de estudo

O experimento foi conduzido em um viveiro, coberto com sombrite a 70% de sombreamento, instalado na Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST-UFRPE), situada em torno das seguintes coordenadas geográficas 7°53'21" e 7°57'36" S e 38°18'42" e 38°17'7" W, no município de Serra Talhada, Pernambuco. O clima da região é semiárido, BSw<sub>h</sub> conforme Köppen, com temperatura média anual de 24°C e precipitação pluviométrica anual de 632 mm (Silva & Almeida, 2013).

### Coleta e processamento do material

Foram coletadas 240 sementes de cada espécie. As sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd. (Polygonaceae) e *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) (Bignoniaceae) foram coletadas no Parque Estadual Mata da Pimenteira (PEMP) em novembro de 2017, em Serra Talhada, Pernambuco, e as sementes de *Licania rigida* Benth. (Chrysobalanaceae) e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) foram coletadas em novembro e dezembro do mesmo ano, naquele município. As sementes foram armazenadas em recipientes de polipropileno fechado e guardadas em local refrigerado a 4°C até o dia da semeadura. Posteriormente, as sementes de cada espécie foram separadas em dois lotes, cada um contendo 120 sementes, sendo um destinado para a inoculação e outro para o tratamento controle.

### Preparação e aplicação do inoculante *Azospirillum lipoferum* (BR- 11080)

A cepa da rizobactéria *Azospirillum lipoferum* (BR-11080) foi isolada e caracterizada pela EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ (Oliveira et al., 2018). A preparação e a aplicação do inoculante foram realizadas no laboratório de

microbiologia da Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST/UFRPE). As cepas foram cultivadas em caldo nutriente composto de 5 g de cloreto de sódio e 1,5 g de extrato de carne por 48 horas. Em seguida, foi agitado a temperatura ambiente em um agitador magnético e posto em uma centrífuga (Hettich Universal 320) por dois minutos, em velocidade de giro de 10000 rpm, descartando o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 4 mL de água destilada e esterilizada para ressuspensão do precipitado. Para confirmar as unidades formadoras de colônia em mL<sup>-1</sup>, foi realizada a leitura de densidade ótica (DO), em espectrofotômetro (biochrom), ajustando-as pela adição de água destilada esterilizada até atingir um DO próximo de 1,0 a 535 nm, indicando a presença de 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônia mL<sup>-1</sup> de solução (Kuss et al., 2007).

A aplicação do inoculante foi realizada pela imersão das sementes das quatro espécies em 20 ml da solução da suspensão bacteriana, durante duas horas (Sousa, 2007). Após isso, as sementes inoculadas e não inoculadas foram postas para germinar à temperatura ambiente, em bandejas de polipropileno contendo solo de uma área local de Caatinga (Oresca et al., 2018), e irrigadas diariamente. Após um mês, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3,8 L com o mesmo solo (Oresca et al., 2018). Além disso, foi adicionado 1 mL da solução bacteriana no solo dos vasos dos tratamentos com inóculo, para garantir a presença do inoculante após o transplante.

As plântulas foram submetidas a três níveis de disponibilidade de água com base na Evapotranspiração de Referência (ET<sub>0</sub>) de 100%, 50% e 25%, sendo irrigadas três vezes por semana durante 60 dias, pelo método de Penman-Monteith (Kalekar, 2018). Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizados (DIC) em modelo fatorial 4x2x3, sendo quatro espécies, dois tratamentos de inóculo de RPCPs e três tratamentos de disponibilidade hídrica, respectivamente.

### Cortes anatômicos

A análise anatômica foi conduzida no Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, na Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST). Aos 60 dias após a semeadura foi coletada uma folha de cada um dos cinco indivíduos de cada espécie, a partir do segundo nó, a contar do ápice, completamente expandidas, livres de patógenos e sem danos aparentes. De cada folha foi obtida uma amostra da porção mediana, contendo a nervura principal, posteriormente fixada em formaldeído, ácido acético e etanol 50% (FAA 50%), por 72 horas (Johansen, 1940). Em

seguida as amostras foram postas em etanol 60% por uma hora e estocadas em etanol 70% até serem analisadas.

As amostras foram estocadas e submetidas ao processo de desidratação etílica de 80%, 85%, 90% e 95% (Johansen, 1940). Foi realizada a infiltração da resina sintética (kit Historesina - hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg) junto com o pó ativador para fixação, processada em um agitador magnético, e em seguida a solução e as amostras foram armazenadas em um dessecador para a ação do pó ativador. Na fase da polimerização, para o endurecimento do produto, a resina foi adicionada junto ao endurecedor, e posteriormente depositada em Histomold de polietileno para inclusão das amostras em resina plástica, contendo 9 inclusões de 6 x 8 mm por placa.

Após esse processo os moldes foram guardados em estufa para secagem a 103°C. Os blocos foram fixados em um suporte de madeira e em seguida seccionados em micrótomo semiautomático (CUT-5062). Para detectar os componentes bioquímicos, as secções transversais das amostras obtidas com espessura de 5 µm, foram coradas com os respectivos reagentes: Lugol para avaliar amido, fluoroglucina ácida para lignina (Johansen, 1940), Sudam III para lipídeos (Pearse, 1972) e Azul de toluidina para analisar mucilagem e a estrutura celular (Fisher, 1968). Posteriormente, foram produzidas lâminas permanentes montadas em Entellan® (Fisher, 1968). Para a captura das imagens e medições das estruturas celulares foi usado o software *Image pro Plus* versão 4.0.5.29, as quais foram calibradas com uma régua micrométrica para determinar sua dimensão real. Foram feitas cinco medições de cada tratamento, sendo mensuradas a espessura do mesofilo,

parênquimas paliçádico e esponjoso, células epidérmicas e cutículas das faces abaxial e adaxial, além da nervura central das folhas e a espessura da parede dos vasos do xilema.

#### Análise estatística

Para avaliar se houve ou não diferenças estatísticas entre os tratamentos com e sem a rizobactéria e os de estresse hídrico, os dados das estruturas anatômicas foram submetidos a análise de variância pelo teste F. As médias obtidas de cada tratamento foram submetidas ao teste de Tukey com  $P < 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados pelo programa estatístico Rstudio, e os gráficos foram gerados por meio do *software Sigma-Plot* versão 14.0.

#### Resultados

As espécies com e sem a rizobactéria apresentaram diferenças significativas na estrutura anatômica nos diferentes tratamentos de estresse hídrico. Entretanto, as plantas inoculadas apresentaram valores significativamente maiores quanto a espessura das estruturas anatômicas: do mesofilo (0,65% a 57%), células epidérmicas das faces adaxial e abaxial (50-95%), nervura mediana (65%), parede dos vasos do xilema (63%), parênquima paliçádico e esponjoso (40-80%), especificamente nos regimes de 25% e 50% da ET0.

#### *Handroanthus impetiginosus*

Houve diferença significativa para os tratamentos com e sem o inóculo, e de estresse hídrico. As faces epidérmicas adaxial e abaxial possuem paredes celulares sinuosas e cutícula delgada em todos os tratamentos (Figura 1 ACD).

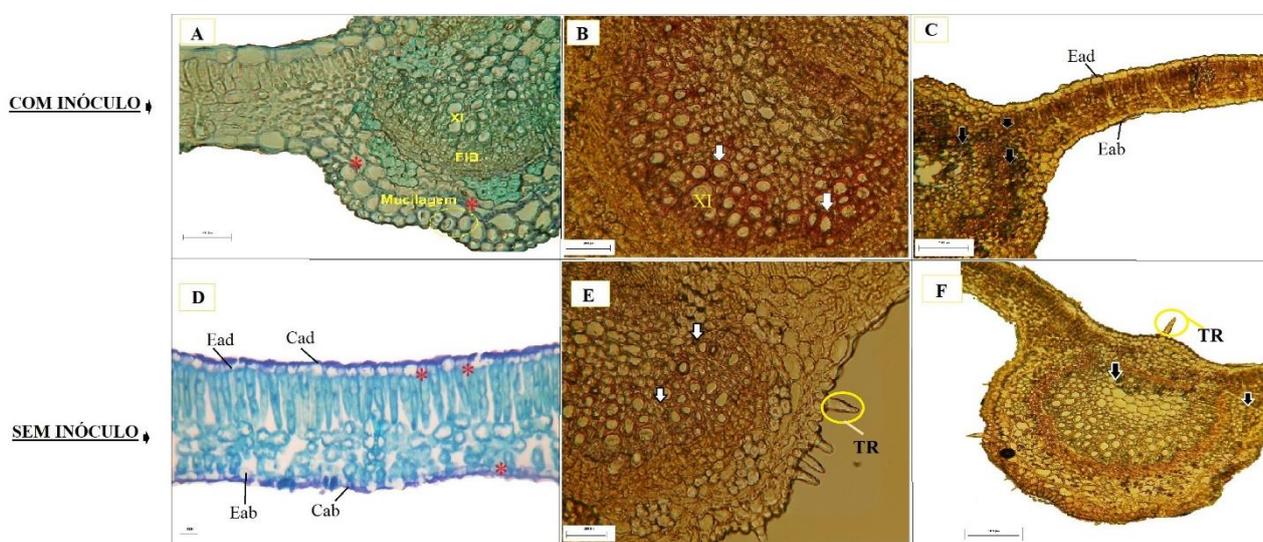


Figura 1. Secções transversais do mesofilo e nervura central de folhas de *Handroanthus impetiginosus*, com e sem inóculo. A. Mucilagem na região cortical, corado com azul de toluidina; B. Lignina nas paredes dos vasos

xilemáticos, corados com fluoroglucina ácida; C. Deposição de amido no interior de células do parênquima clorofiliano, corados com Lugol; D. Mucilagem na epiderme; E. Lignina; F. Substâncias amiláceas na região cortical e mesofilo. Escala: 100 µm (imagens C, D e F) e 200 µm (imagens A, B e E). Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; FI = fibra; PE = parênquima esponjoso; PP = parênquima paliçádico; TR = tricoma; asterisco = mucilagem, seta branca = lignina, seta preta = amido. Fonte: Jesus et al. (2020).

A face epidérmica adaxial das folhas inoculadas foi mais espessada (50 a 72%), principalmente, nos tratamentos de 25% e 50% da ET0, assim como a face abaxial (23 a 32%) (Tabela

1). A cutícula não apresentou diferença significativa, entretanto, os maiores valores foram observados nas plantas inoculadas (25 a 33%) no tratamento de 25% da ET0 (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação quantitativa da anatomia das folhas de *Handroanthus impetiginosus* inoculadas com a *Azospirillum lipoferum* e sob os diferentes tratamentos de estresse hídrico. C.I = com inóculo; S.I = sem o inóculo; Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; MS = Mesofilo; PP = parênquima paliçádico; PE = parênquima esponjoso. Fonte: Jesus et al. (2020).

Estresse hídrico (ET0)	Inóculo	Espessura (µm)							Parede do vaso do xilema	Nervura (mm)
		Cad	Cab	Ead	Eab	MS	PP	PE		
25%	C.I	3,3Aa	2,8Aa	12,1Aa	8,2Aa	76,4Aa	31,1Aa	42,2Aa	3,52Aa	0,338Aa
	S.I	2,0Aa	2,1Aa	3,5Bb	3,8Bb	75,9Ba	23,7Bb	41,8Ba	2,34Aa	0,207Ba
50%	C.I	3Aa	1,5Aa	6,8Aa	5,8Aa	76,4Aa	31,7Aa	42Aa	3,78Aa	0,338Aa
	S.I	2,8Aa	2,0Aa	5,2Bb	3,9Ab	75,9Bb	23,7Ba	41,8Bb	2,48Aa	0,207Bb
100%	C.I	2,9Aa	2Aa	7,2Aa	5,1Ba	76,4Aa	31,6Aa	42Aa	3,17Aa	0,350Aa
	S.I	3Aa	1,8Aa	7,5Aa	5,4Aab	75,9Bb	27,5Bb	41,2Bb	2,14Bb	0,250Bb
CV (%)		14,17	27,3	44,71	35,24	16,78	46,38	22,42	31,65	0,89

\*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não apresentaram diferença significativa para o tratamento de inoculação e médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferença significativa entre os tratamentos de irrigação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas folhas sem inóculo verificou-se a presença de tricomas do tipo tectores, aparentemente unicelulares e alongados (Figura 1EF). O parênquima esponjoso ocupou maior proporção do mesofilo (57%) em relação ao parênquima paliçádico (41%) (Tabela 1). No entanto, nas folhas inoculadas, verificou-se maior espessura tanto do parênquima paliçádico (23%) quanto o esponjoso (2%), quando comparadas com aquelas sem o inóculo (Tabela 1). O parênquima esponjoso, em todos os tratamentos, apresentou células peculiarmente arredondadas e com alguns espaços intercelulares (Figura 1ACD). Houve diferenças significativas para o mesofilo (1,33%), nervura central (1,46%) e parede dos vasos

xilemáticos (32%), sendo os maiores valores para as folhas inoculadas, especialmente no tratamento de 100% da ET0 (Tabela 1). Os componentes químicos avaliados foram evidenciados em todos os tratamentos, com os vasos do xilema aparentemente mais lignificados nas folhas inoculadas (Figura 1B).

#### *Licania rigida*

As folhas inoculadas de *L. rigida* apresentaram diferenças significativas das estruturas analisadas, quando comparadas com as folhas sem o inoculante. As células epidérmicas são sinuosas da face adaxial e abaxial (Figura 2A).

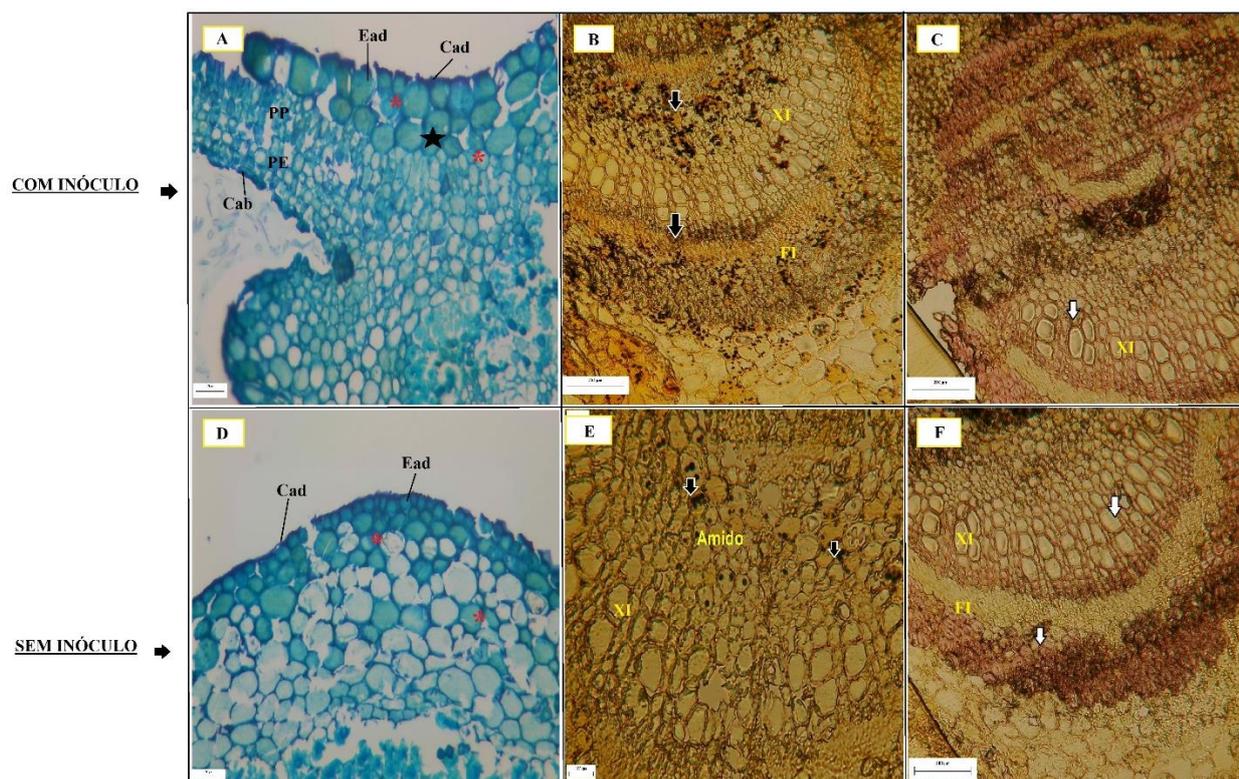


Figura 2. Secções transversais do mesofilo e nervura central de folhas de *Licania rigida*, com e sem a *Azospirillum lipoferum*. A. Mucilagem, corados com azul de toluidina; B. Amido na região do parênquima, corado com lugol; C. Lignina em vasos do xilema, corado com fluoroglucina ácida; D. Mucilagem na região cortical; E. Substâncias amiláceas coradas com lugol na nervura central; F. Lignina na parede dos vasos do xilema. Escala: 200  $\mu$ m. Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; Ead = epiderme adaxial; FI = fibra; PE = parênquima esponjoso; PP = parênquima paliçádico; XI = xilema; asterisco = mucilagem, seta branca = lignina, seta preta = amido; Estrela= camada subepidérmica. Fonte: Jesus et al. (2020).

A espessura da faces epidérmicas adaxial e abaxial das folhas apresentou diferenças estatísticas quanto ao inoculo e déficit hídrico,

especialmente no tratamento de 100% da ET0, sendo os maiores valores para as folhas inoculadas (40 a 55%) (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliações quantitativas da anatomia das folhas de *Licania rigida* inoculadas com a *Azospirillum lipoferum* e sob os diferentes tratamentos de estresse hídrico. C.I = com inoculo; S.I = sem o inoculo; Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; MS = Mesofilo; PP = parênquima paliçádico; PE= parênquima esponjoso. Fonte: Jesus et al. (2020).

Estresse hídrico (ET0)	Inóculo	Espessura ( $\mu$ m)								Nervura (mm)
		Cad	Cab	Ead	Eab	MS	PP	PE	Parede do vaso do xilema	
25%	C.I	1,7Ba	2,1Aa	7,8Aa	2,4Ba	64Aa	31,2Aa	34,1Aa	3,42Aa	0,487Aa
	S.I	2,8Aa	1,1Ba	6,1Aa	4,1Aa	53,2Ba	17,4Bb	33,6Ba	3,4Ba	0,313Ba
50%	C.I	2,8Ab	1,9Aa	6,6Aa	2,8Aa	67,4Aa	17,4Aa	34,1Aa	2,8Ab	0,447Aa
	S.I	2Ab	1,6Aa	5,9Aa	3,7Aa	49,1Aa	19,5Aa	26,4Ba	2,3Bb	0,300Ba
100%	C.I	2,3Ab	1,3Ba	9Aa	8Aa	69Aa	31Aa	38Aa	3Aa	0,452Aa
	S.I	2,7Ab	1,4Aa	5,4Bb	3,6Bb	48,7Bb	20,4Ab	27,9Bb	1,9Bb	0,214Bb
CV (%)		19,39	24,1	19,88	49,02	15,87	28,56	13,46	22,05	0,29

\*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não apresentaram diferença para o inoculo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferença significativa entre os tratamentos de irrigação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas folhas inoculadas, a cutícula da face abaxial foi mais espessa nos tratamentos de 25% da ET0 (Tabela 2), quando comparadas com as sem

inoculo. Nessa espécie, observou-se uma camada subepidérmica na face adaxial, a qual pode ter natureza colenquimática (Figura 2A).

Nas folhas de *L. rigida* o parênquima paliçádico apresenta apenas uma camada com células pequenas, e parênquima esponjoso com quatro camadas de células irregulares e compactadas (Figura 2A). O parênquima esponjoso ocupou a maior parte do mesofilo (61%), quando comparado com o parênquima paliçádico, que ocupou 38% (Tabela 2). No entanto, tanto o parênquima paliçádico quanto o esponjoso apresentam aumento significativo ( $p > 0,05$ ) para as folhas com inóculo (34 e 26%), especialmente nos tratamentos de 25% e 100% da ET0 (Tabela 2). Foi registrado maiores espessuras do mesofilo (34%) nas folhas inoculadas e da nervura central das folhas (41%) quando comparada com as sem inóculo (Tabela 2). A espessura das paredes do xilema foi maior (35%) para as plantas inoculadas, as quais apresentaram diferenças significativas

( $p < 0,05$ ) para todos os tratamentos de estresse (Tabela 2).

As folhas de *L. rigida* possuem a nervura cutinizada (Figura 2AD). Na nervura central, fibras, provavelmente de origem pericíclica, envolvem o feixe vascular (Figura 2BCF). Componentes bioquímicos foram evidenciados para todos os tratamentos, no entanto, lignina e amido se destacaram mais claramente nas folhas inoculadas com a rizobactéria (Figura 2BC).

#### *Myracrodruon urundeuva*

Houve diferenças das estruturas anatômicas para todos os tratamentos. Evidenciou-se células epidérmicas com contorno ondulado (Figura 3ADE), em toda a extensão do mesofilo e nervura mediana.

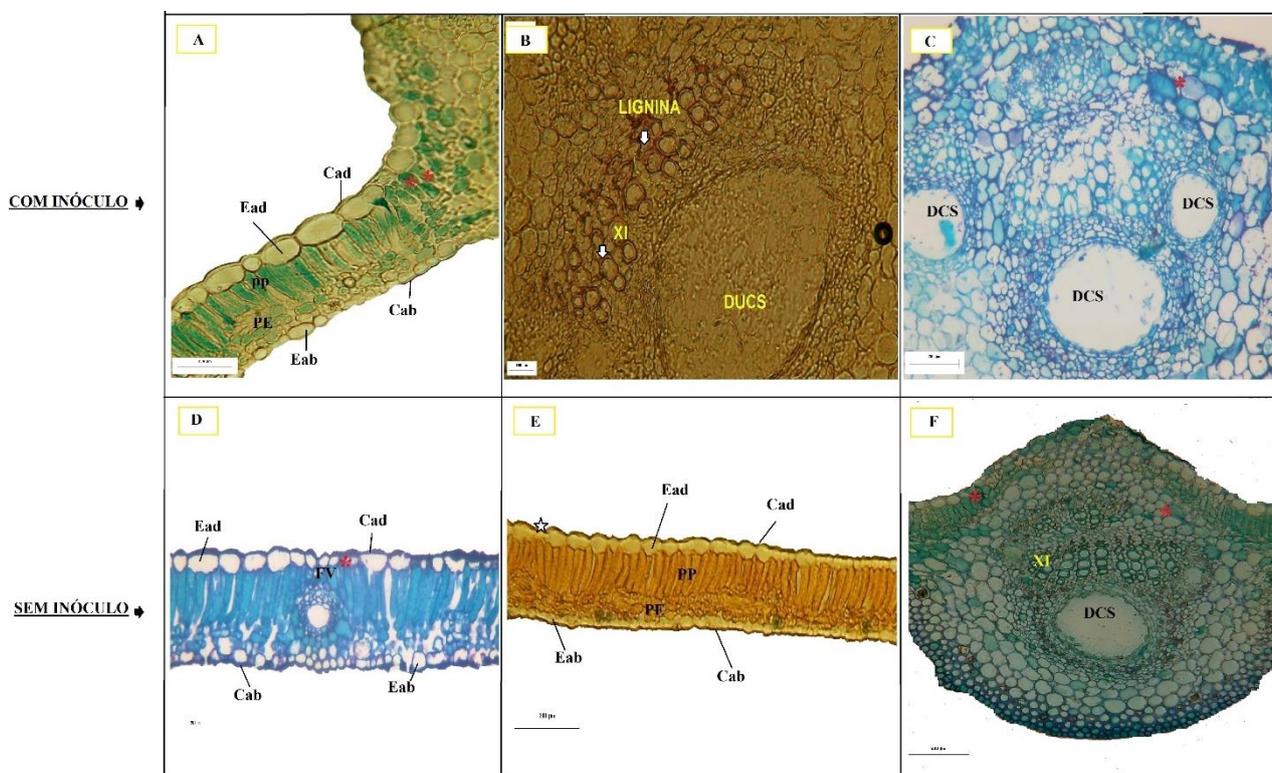


Figura 3. Secções transversais do mesofilo e nervura central de folhas de *Myracrodruon urundeuva*, com e sem inóculo. A. Mucilagem no parênquima, corado com azul de toluidina; B. Vasos xilemáticos lignificados, corados com fluoroglucina ácida; C. Substâncias mucilaginosas na região cortical; D. Região do mesofilo apresentando mucilagem; E. Substâncias lipídicas na parede celular de células epidérmicas, corados com Sudan III; F. Substâncias mucilaginosas na região cortical. Escala:100 (imagens A, D, E e F) e 200  $\mu\text{m}$  (imagens B e C). Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; DCS = Ducto secretor; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; FI = fibra; FV = feixe vascular; PE = parênquima esponjoso; PP = parênquima paliçádico; PE = parênquima esponjoso; asterisco = mucilagem, seta branca = lignina, estrela = Lignina. Fonte: Jesus et al. (2020).

Para a cutícula não foram observadas diferenças esteticamente significativas, entre os tratamentos, no entanto observou-se que no

tratamento de 100% da ET0 as folhas com inóculo apresentaram maiores valores em espessura da cutícula (5 a 22%) (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliações quantitativas da anatomia das folhas de *Myracrodruon urundeuva* inoculadas com a *Azospirillum lipoferum* e sob os diferentes tratamentos de estresse hídrico. C.I = com inóculo; S.I = sem o inóculo; Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; MS = Mesofilo; PP = parênquima paliçádico; PE= parênquima esponjoso. Fonte: Jesus et al. (2020).

Estresse hídrico (ET0)	Inóculo	Espessura (µm)							Parede do vaso do xilema	Nervura (mm)
		Cad	Cab	Ead	Eab	MS	PP	PE		
25%	C.I	2,4 Aa	2 Aa	10,1 Aa	8,9 Ab	55,5 Aa	33,3 Aa	22,8 Aa	1,3Aa	0,371 Aa
	S.I	2,9 Aa	2,1 Aa	11,3 Aa	9,1 Aa	39,9 Bb	27,9 Bb	15 Abc	1,2Aa	0,148 Ba
50%	C.I	2,5 Aa	1,3 Aa	13 Aa	8Aa	49 Ab	31 Aa	18,6 Ab	2,7Aa	0,160 Aa
	S.I	2,8 Aa	1,8 Aa	12Aa	7Aa	57,9 Bb	23,8 Bb	34,1Aa	1,6Ab	0,148 Aa
100%	C.I	3,5 Aa	1,9 Aa	12,8 Aa	8,2 Ab	49,5 Aa	31,5 Aa	18,6 Ab	2,2Ab	0,221 Aa
	S.I	2,7 Aa	1,8 Aa	6,6 Ba	9,8 Aa	53Bb	33 Aa	28 Aa	3,8Aa	0,149 Ba
CV (%)		13,94	15,34	21,76	11,52	12,48	12,07	30,9	46,6	0,44

\*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não apresentaram diferença para o inóculo e médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferença significativa entre os tratamentos de irrigação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A epiderme da face adaxial apresentou maiores valores em espessura para as folhas inoculadas (48,4%) no tratamento de 100% da ET0, sendo estatisticamente diferente com relação as folhas sem o inóculo (Tabela 3). Mesmo não havendo diferença estatística no tratamento de 50% da ET0, os maiores valores absolutos foram registrados para o inóculo, sendo 8% maior na face epidérmica adaxial e 12,5% na face abaxial (Tabela 3).

O parênquima paliçádico ocupou maior área do mesofilo nas plantas inoculadas (56%) nos tratamentos de 25 e 50% da ET0 (Tabela 3), enquanto o parênquima esponjoso foi maior nas folhas sem o inóculo (42%), sendo mais evidente esse aumento nos tratamentos de 50% e 100% da ET0 (Tabela 3). No parênquima esponjoso são vistas de duas a três camadas celulares achatadas com pouco espaços intercelulares (Figura 3ADE). A parede do vaso do xilema apresentou maior

espessura nas plantas inoculadas (1,3 µm), quando comparadas as não inoculadas (Tabela 3), principalmente nos tratamentos de 25 e 50% da ET0. Observou-se canais secretores, em secção transversal, de lúmen relativamente grande, nas proximidades do floema (Figuras 3BCF). No entanto, o número de ductos secretores (2-3) foi maior nas folhas dos tratamentos inoculados, enquanto aquelas sem o inóculo apresentaram ductos (1 - 2), para todas as folhas e tratamentos de ET0 (Figura 3). Para as plantas inoculadas, os vasos do xilema apresentaram-se, visualmente, mais lignificados (Figura 3B).

#### *Triplaris gardneriana*

Houve diferença estatística para a maioria dos aspectos anatômicos das folhas inoculadas (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliações quantitativas da anatomia das folhas de *Triplaris gardneriana* inoculadas com a *Azospirillum lipoferum* e sob os diferentes tratamentos de estresse hídrico. C.I = com inóculo; S.I = sem o inóculo; Cad = cutícula adaxial; Cab= cutícula abaxial; Ead= epiderme adaxial; Eab= epiderme abaxial; PP= parênquima paliçádico; PE= parênquima esponjoso. Fonte: Jesus et al. (2020).

Estresse hídrico (ET0)	Inóculo	Espessura (µm)							Parede do vaso do xilema	Nervura (mm)
		Cad	Cab	Ead	Eab	MS	PP	PE		
25%	C.I	3,8 Aa	2,9 Aa	14,1 Aa	6,7 Bb	80,9 Aa	33,9 Aa	45,6 Aa	3,5Aa	0,151 Ba
	S.I	3,3 Bb	2,9 Aa	12,2 Ba	8,9 Aa	72 Bb	26 Ba	45 Ab	3,4Aa	0,472 Aa
50%	C.I	2,6 Bb	1,7 Aa	11,4 Aa	10,2 Aa	96 Aa	22 Aa	65,1 Aa	2,3Bb	0,130 Ab
	S.I	2,7 Aa	1,7 Aa	9,5 Bb	8,1 Ba	47,2 Bb	19,1 Bb	31,2 Bb	3,2Aa	0,472 Aa
100%	C.I	2,7 Aa	1,9 Aa	11,2 Aa	10,1 Aa	96 Aa	22 Aa	65,1 Aa	1,9Bb	0,139 Ab
	S.I	2,6 Bb	1,75Ab	9,8 Bb	7,8 Aa	47Bb	16 Bb	39,9 Bb	2,8Aa	0,97 Aa
CV (%)		16,71	27,64	14,79	15,87	30,3	26,87	28,25	22,49	0,73

\*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não apresentaram diferença para o inóculo e médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não apresentam diferença significativa entre os tratamentos de irrigação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que a epiderme foi mais espessa (8,33%), especialmente nas folhas inoculadas na face adaxial, em todos os tratamentos da ET0 (Tabela 4).

As células epidérmicas das folhas inoculadas apresentaram-se mais volumosas (Figura 4AB).

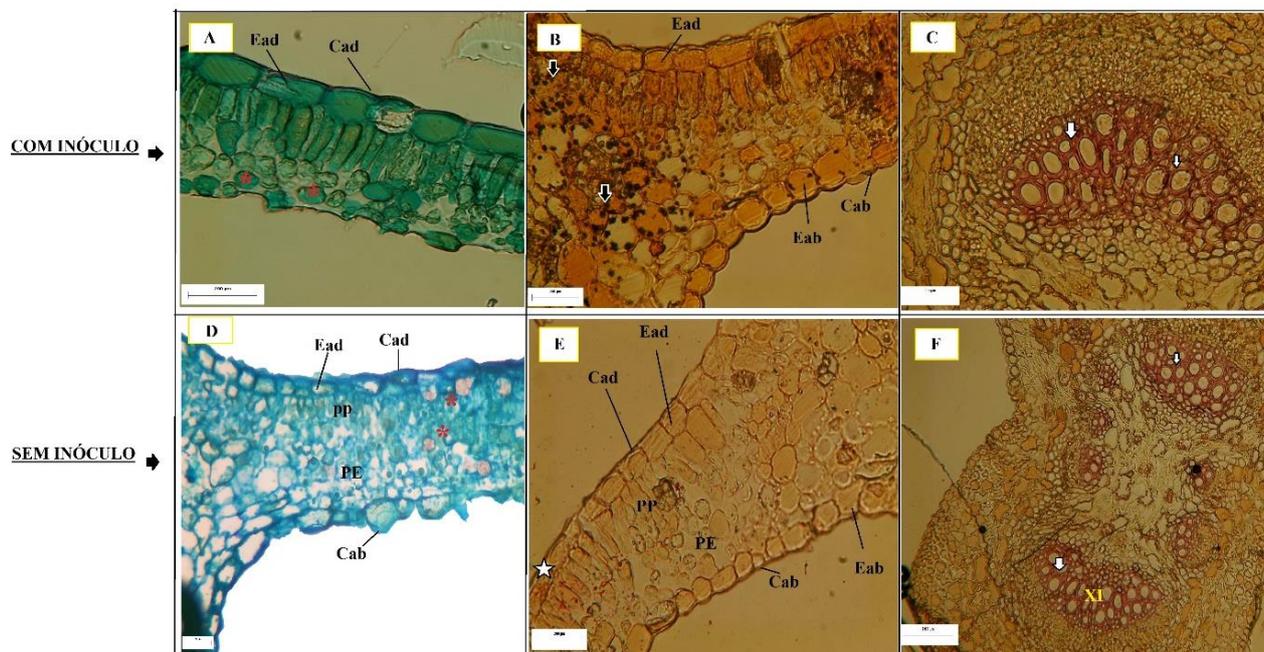


Figura 4. Seções transversais do mesofilo e nervura central de folhas de *Triplaris gardneriana*, com e sem inóculo, A. Mucilagem no parênquima, corado com azul de toluidina; B. Parênquima com substâncias amiláceas, corados com Lugol; C. Lignina nas paredes do xilema, corado com fluoroglucina ácida; D. Região do mesofilo apresentando mucilagem; E. Substâncias lipídicas na parede celular de células epidérmicas, corados com Sudan III; F. Lignina nas paredes do xilema. Escala: 200 µm. Cad = cutícula adaxial; Cab = cutícula abaxial; Ead = epiderme adaxial; Eab = epiderme abaxial; FI = fibra; PE = parênquima esponjoso; PP = parênquima paliçádico; PE = parênquima esponjoso; XI = xilema; Asterisco = mucilagem, seta branca = lignina, seta preta = amido; Estrela = lipídeos. Fonte: Jesus et al. (2020).

Por outro lado, nos tratamentos sem inóculo, as células epidérmicas apresentaram menor espessura na face adaxial e maior na abaxial de (1,5 e 20%) a 25% da ET0 (Tabela 1).

O inóculo conferiu maior espessura da cutícula da face adaxial (10%), principalmente nos tratamentos de 25% e 100% da ET0 (Tabela 4).

A área do mesofilo (50%) e parede dos vasos do xilema (33%) foram maiores nas folhas inoculadas, nos tratamentos de 25% da ET0, quando comparadas àquelas sem o inóculo (Tabela 4). Substâncias lipídicas, mucilaginosas, bem como lignina, foram evidenciadas para as folhas com e sem a rizobactéria (Figura 4).

## Discussão

As espécies nativas do semiárido realizam ajustes em suas estruturas morfoanatômicas em decorrência da escassez de água e irregularidade das chuvas (Figuerôa et al., 2004). No presente

estudo, a ação da RPCPs foi confirmada a partir de dados anatômicos realizadas nas folhas das quatro espécies de plântulas submetidas a estresse hídrico. As plântulas inoculadas apresentaram diferenças na epiderme, na área e células do mesofilo e nervura mediana, principalmente nas condições de baixo regime hídrico, além de apresentar diferenças quanto aos componentes bioquímicos, confirmando a ação da rizobactéria. Dessa forma, as RPCPs auxiliaram na resistência das folhas sob estresse hídrico, otimizando o uso da água (Wang et al., 2014).

A epiderme possui diversas funcionalidades, por ser um tecido formado por diferentes tipos de células especializadas, que constituem os estômatos e os tricomas, por exemplo (Dickison, 2000). Este tecido desempenha um importante papel nas espécies vegetais de regiões semiáridas, expostas a condições de alta temperatura (Dickison, 2000), pois possibilita a

resistência à perda de água, elevando a eficiência hídrica (Burghardt & Riederer, 2006; Tenhaken, 2015). A maior espessura da epiderme evidenciada nas plantas inoculadas, sugere que a rizobactéria proporciona ajustes anatômicos que favorece a melhor performance da planta. Em todas as espécies estudadas, as células epidérmicas mostraram-se bastante sinuosas, por estarem em ambiente controlado.

A espessura da cutícula não diferiu entre os tratamentos de inóculo e de estresse para as plântulas de *M. urundeuva*. No entanto, as demais espécies estudadas apresentaram maior espessamento da cutícula, principalmente da face adaxial. As cutículas espessas proporcionam proteção contra altas intensidades luminosas (Cen & Ornman, 1993; Pireda et al., 2019). Marcati (2001) destacou que a espessura da cutícula não é, necessariamente, um fator de controle de permeabilidade, embora constitua um tema de grande importância. No entanto, os autores também esclarecem que a cutícula é a primeira barreira para redução da perda de água, contra os efeitos de herbicidas e poluição ambiental.

Para as folhas de *H. impetiginosus*, sem a rizobactéria, observou-se tricomas na face abaxial. Os tricomas são estruturas adaptativas das espécies vegetais, para evitar a perda de água (Hallik et al., 2017). De acordo com Hallik et al. (2017), a ocorrência dos tricomas é mais comum em ambientes secos, onde há uma maior incidência de elevada temperatura.

O maior espessamento do parênquima paliçádico das folhas inoculadas foi observado no tratamento de maior déficit hídrico. Esse maior espessamento pode ser melhor explicado, conforme Reed (2005), devido ao estímulo de fitormônios produzidos pelas RPCPs, que permitem o alongamento e a multiplicação celular no vegetal. O parênquima paliçádico pode ser constituído de várias camadas, dessa forma, há maior possibilidade de aumento da atividade fotossintética (Oguchi, Hikosaka & Hirose, 2003). Esses autores destacaram que isso é possível devido ao aumento da superfície da membrana plasmática, que confere um maior número de cloroplastos. Nesse sentido, a atividade metabólica das plantas é mais favorecida (Oguchi et al., 2003).

O presente estudo mostra que a nervura e a lâmina foliar foi significativamente mais expandida nas plantas inoculadas, confirmando o que já foi estudado por Reed (2005), o qual mostrou a grande eficiência das RPCPs para auxiliar no crescimento celular, aumento da área do limbo foliar e raiz. Estas características facilitam a condução de água via xilema (Metcalfe, 1983; Fahn & Cutler, 1974). De acordo com Figueiredo

(2010), esse fator se deve a uma maior produção de auxinas e citocininas pelas RPCPs, as quais atuam na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular (Figueiredo, 2010).

O maior espessamento na lâmina foliar e do mesofilo nas plantas sem inóculo no tratamento a 25% da ET0 indica que o déficit hídrico é um fator que exerce forte influência na estrutura anatômica das plantas. Costa et al. (2007), explica que o déficit hídrico no solo promove maior condição das plantas terem suas folhas reduzidas, e com isso um adiantamento da senescência.

As folhas de *M. urundeuva* apresentaram estrutura de secreção interna ligados aos feixes vasculares, sendo diferentes nos tratamentos de inóculo. De acordo com Fahn (2000), ductos são estruturas que possui a característica de um epitélio secretor. A presença desses ductos, especialmente na região do floema pode servir como um marcador taxonômico e anatômico para a diferenciação das espécies (Mastroberti & Mariath, 2008). Segundo Ascensão et al. (2007), essas estruturas de secreção interna são de ocorrência comum em Anacardiaceae, podendo ter origem lisígena (rompimento celular) ou esquizógena (afastamento de células). As cavidades encontradas foram em maiores quantidades nas folhas inoculadas e pode, portanto, ser decorrente das características de turgescência das células (Machado, Canaveze & Rodrigues, 2017). No entanto, há necessidade de mais estudos para esclarecimento da ação da rizobactéria nas estruturas secretoras.

A deposição de amido foi evidenciada em maior parte nas folhas inoculadas, principalmente no parênquima clorofiliano. O amido funciona como uma reserva energética nas plantas, e caracterizado como um dos principais produtos da fotossíntese (Fahn, 1979; Mastroberti & Mariath, 2008). Esse resultado confirma de fato a ação benéfica da rizobactéria em auxiliar no processo fotossintético nas plantas. A presença de células mucilaginosas também foi evidente nas plantas de todos os tratamentos. A presença de mucilagem está relacionada à capacidade adaptativa e de sobrevivência da espécie aos ambientes secos (Barreiro & Machado, 2007).

Nas folhas inoculadas foram observadas poucas concentrações de substâncias lipídicas nas paredes celulares da epiderme e tricomas das espécies estudadas. Essas substâncias têm como função amenizar o processo de difusão de vapor de água das folhas para o meio externo (Burghardt & Riederer, 2006; Larcher, 2006), no entanto, o excesso de lipídios pode causar oxidação e prejudicar o desenvolvimento da folha (Larcher, 2006). Dessa forma, as RPCPs podem ter atuado na redução desse componente bioquímico.

As RPCPs minimizaram os efeitos do estresse hídrico através de mecanismo de resistência, associando modulações fisiológicas e bioquímicas (Fahn, 2000). A análise anatômica das folhas das quatro espécies da caatinga aqui estudadas mostrou que a associação da rizobactéria *A. lipoferum* em plantas da caatinga resultou em um melhor desenvolvimento e uma maior tolerância dessas plantas em situação de escassez hídrica.

### Conclusão

A inoculação de RPCPs em quatro espécies arbóreas do semiárido do Brasil atuou de forma positiva no ajuste das estruturas anatômicas foliares sobre condições de déficit hídrico. Embora, algumas características se mantiveram semelhantes em ambos os tratamentos, notou-se que a atividade da rizobactéria foi significativa. Portanto, pode-se inferir que as RPCPs induzem ajustes anatômicos foliares, permitindo melhor tolerância ao estresse hídrico. Dessa forma, a utilização da rizobactéria *A. lipoferum* em espécies de plantas nativas do semiárido do Brasil mostrou-se satisfatória, podendo ser aplicada em projetos visando o reflorestamento de áreas degradadas.

### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), à Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), à Fundação Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Processo nº APQ-0401-2.03/14).

### Referências

- Ahmad, P.; Jamsheed, S.; Hameed, A.; Rasool, S.; Sharma, I.; Azooz, M. M.; Hasanuzzaman, M. 2014. Drought Stress Induced Oxidative Damage and Antioxidants in Plants. In: Ahmad, P. Oxidative Damage to Plants, Antioxidant Networks and Signaling. Academic Press, pp. 345-367.
- Ascensão, L. 2007. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. (eds.). Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. Ed. da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, Portugal, Lisboa, pp. 19-28.
- Barreiro, D. P.; Machado, D.R. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. Brazilian Journal of Botany. 30 (3). <https://doi.org/10.1590/S0100-84042007000300005>.
- Boeger, M. R. T.; Wisniewski, C. 2003. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. Revista Brasileira de Botânica, 26, (1), 61-72. <https://doi.org/10.1590/S010084042003000100007>
- Bottini, R.; Fulchieri, M.; Pearce, D.; Pharis, R. 1989. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiology, 90, 45-47. <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.90.1.45>
- Burghardt, M.; Riederer, M. 2006. Cuticular transpiration. In: Riederer, M.; Müller, C. (eds.). Biology of the Plant Cuticle. Blackwell, Oxford, UK, pp. 292-311.
- Cen, Y. P.; Bornman, J. 1993. The effect of exposure to enhanced UV-B radiation on the penetration of monochromatic and polychromatic UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. Physiologia Plantarum, 87, 249-255. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01727.x>
- Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany, 103, (4), 551-560. <https://dx.doi.org/10.1093%2Faob%2Fmcn125>
- Chen, C.; Bélanger, R. R.; Benhamou, N.; Paulitz, T. C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium sphaeroderma*. Physiology and Molecular Plant Pathology, 56, p.13-23. 10.1006 / pmpp.1999.0243
- Costa, D. A.; Silva, D. A.; Cavalcanti, A. C.; Medeiros, M. A. A.; Lima, J. T.; Cavalcante, J. M. S.; Silva, B. A.; Agra, M. A.; Souza, M. F. V. 2007. Chemical constituents from *Bakeridesia apickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-beta-D-(6"-E-p - coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. Química Nova, 30, (4), 901-903. Doi:10.1590/s0100-40422007000400026
- Dickison, W. C. 2000. Integrative Plant Anatomy. Burlington: Academic Press. 180p.
- Duque, A. S. et al. 2013. Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive. In: Vahdati, K.; Leslie, C. (eds). Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture.

- Croatia, Rijeka: Tech., pp. 49-102. Doi: 10.5772/52779
- Fahn, A. 1974. Anatomia Vegetal. 2 ed, Madri, H. Blume, 197p.
- Fahn, A. 2000. Structure and function of secretory cells. Adv. Bot. Res, 31, 37-75.
- Fisher, D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie, 16, 92-96. <https://doi.org/10.1007/bf00306214>
- Figueiredo, M. do V.B.; Seldin, L.; Araujo, F. F.; Mariano, R. de L. R. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. Plant Growth and Health Promoting Bacteria, 3, 21-43. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2\_2
- Figueirôa, J. M.; Barbosa, D. C. de A.; Simabukuro, E. A. 2004. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. Acta Botanica Brasilica, 18, (3), 573-580. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000300015>
- Freitas, S. S. 1989. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. Revista Brasileira de Ciências do Solo, 13, 31-34.
- Freitas, S. S.; Mello, A. M. T.; Donzeli, V. P. 2003. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 27, 61-70. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000100007>
- Hallikh, L. et al. 2017. Generality of relationships between leaf pigment contents and spectral vegetation indices in Mallorca (Spain). Regional Environmental Change, 17, 2097-2109.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York. 523p.
- Kalekar, S. P. et al. 2018. Comparison of temperature based reference evapotranspiration methods with FAO, Penman-Monteith method. Mysore Journal of Agricultural Sciences, 52, (1), 12-17.
- Kaushal, M.; Wani, S. P. 2015. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. Annals of Microbiology, 66, 35-42.
- Kumar, A.; Prakash, A.; Johri, B. N. 2011. Bacillus as PGPR in crop ecosystem. In: Maheshwari, D. K. K. Bacteria in Agrobiolgy: Crop Systems. Heidelberg: Springer-Verlag, 2, pp. 37-59.
- Kuss, A. V.; Kuss, V. V.; Holtz, E. K.; Lovato, T. 2007. Inoculação de bacterias diazotróficas e Desenvolvimento de Plântulas de arroz irrigado em Solução Nutritiva e Câmara de Crescimento. Revista da FZVA, 14, (2), 23-33.
- Larcher, W. 2006. Ecofisiologia vegetal. São Carlos, SP: Rima Artes e Textos, 531p.
- Lima, A. L. A.; Rodal, M. J. N.; Castro, C. C.; Antonino, A. C. D.; Melo, A. L.; Souza, T. G.; Sampaio, E. V. S. B. 2021 Phenology of high- and low-density wood deciduous species responds differently to water supply in tropical semiarid regions. Journal of Arid Environments, 193, 104594. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104594>
- Liu, F., Xing, S., Ma, H. et al. 2013. Rizobactérias produtoras de citocinina e promotoras de crescimento de plantas que conferem resistência ao estresse hídrico em mudas de recipiente de *Platyclusus orientalis*. Appl Microbiol Biotechnol, 97, 9155-9164. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5193-2>
- Lucy, M.; Reed, E.; Glick, B. R. 2004. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 86, 1-25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- Machado, S. R., Canaveze, Y.; Rodrigues, T. M. 2017. Structure and functioning of oil cavities in the shoot apex of *Metrodorea nigra* A. St.-Hil. (Rutaceae). Protoplasma, 254, 1661-1674. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-016-1056-x>
- Mastroberti A. A.; Mariath J. E. A. 2008. Immunocytochemistry of the mucilage cells of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). Revista Brasileira de Botânica, 31, 1-13. Doi: 10.1590/S0100-84042008000100002
- Marcati, C. M.; Angyalossy-Alfonso, V.; Benetati, L. 2001. Anatomia Comparada do lenho e *Copaifera longsdorffii* Desfa. (Leguminosae-Caesalpinoideae) de floresta e cerradão. Rev. Bra. Bot., 24, (3), 311-320.
- Mendes, R.; Garbeva, P.; Raaijmakers, J. M. 2013. The rizhosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and humam pathogenic microorganisms. Federation of European Microbiological Societies, 37, 634-663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Metcalf, C. R.; Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Oxford: Clarendon. 1500p.

- Nóbrega, M. T.; Collischonn, W.; Tucci, C. E. M.; Paz, A. R. 2011. Uncertainty in climate change impacts on water resources in the Rio Grande Basin, Brazil Hydrol. Earth Syst. Sciences, 15, 585-595. <https://doi.org/10.5194/hess-15-585-2011>.
- Oguchi, R.; Hikosaka, K.; Hirose, T. 2003. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? Plant, Cell and Environment, 26, 505-512. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00981.x>
- Oliveira, M. D.; Lima, A. L. A.; Diniz, B. N.; Santos, S. R. E. C.; Silva, F. L. S.; Simões, N. A. 2018. Inoculation of plant-growth-promoting rhizobacteria in *Myracrodruon urundeuva* Allemão supports in tolerance to drought stress. Journal of Plant Interactions, 13, 1-99. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1432770>
- Osakabe, Y.; Osakabe, K.; Shinozaki, K.; Tran, L. S. P. 2014. Response of to water stress. Frontiers in Plant Science, 5, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Oresca, D. 2018. Adubação nitrogenada como atenuador dos efeitos da salinidade da água de irrigação utilizada para produção de forragem no semiárido. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal), Universidade Federal Rural de Pernambuco- Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada- PE, pp. 20-21.
- Pereira, A. P. A.; Silva, M. C. B.; Oliveira, J. R. S.; Ramos, A. P. S.; Freire, M. B. G. S.; Freire, F. J.; Kuklinsky-Sobral, J. 2012. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. Bioscience Journal, 28, 112-121.
- Pearse Age. 1972. Histochemistry: theoretical and applied. Vol. 2, 3<sup>a</sup> ed. (The Williams & Wilkins Company: Baltimore). 998p.
- Pireda, S.; Silva, D. O.; Borges N. L.; Amaral F. G.; Barroso, L. M.; Simioni, P.; Vitória, A. P.; Cunha, M. 2019. Acclimatization capacity of leaf traits of species co-occurring in restinga and seasonal semideciduous forest ecosystems. Environmental and Experimental Botany, 164, 190-202. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.05.012>
- Radwan, T. E.; Mohamed, Z. K.; Reis, V. M. 2004. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39, 987-994. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>
- Reed, M. L. E.; Warner, B. G.; Glick, B. R. 2005. Plant Growth-Promoting Bacteria Facilitate the Growth of the Common Reed *Phragmites australis* in the Presence of Copper or Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Curr Microbiol, 51, 425-429. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4584-8>
- Rincón, A.; Valladares, F.; Gimeno, T. E.; Pueyo, J. J. 2008. Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. Tree Physiology, 28, 1693-1701. Doi: 10.1093/treephys/28.11.1693
- Silva, T. G. F.; Almeida, A. Q. 2013. Climatologia e Características Geomorfológicas (Cap 2). In: Santos, E. M. et al. (Orgs). Parque Estadual Mata da Pimenteira: Riqueza Natural e Conservação da Caatinga. Recife: EDUFRPE, pp. 83-103.
- Sivakumar, M. V. K.; Shaw, R. H. 1978. Relative evaluation of water stress indicators for soybeans. Agronomy Journal, 70, 619-623. <https://doi.org/10.2134/agronj1978.00021962007000040022x>
- Sousa, M. V. et al. 2008. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum em sementes de algodoeiro. Trop. Plant Pathol., 33, (1), 41-48. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000100007>
- Tenhaken, R. 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. Frontiers in Plant Science, 5, 771. Doi:10.3389/fpls.2014.00771
- Trovão, D. M. B. M.; Fernandes, P. D.; Andrade, L. A.; Dantas, N. J. 2007. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 11, 307-311. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000300010>
- Wang, S.; Ouyang, L.; Ju, X.; Zhang, L.; Zhang, Q.; Li, Y. 2014. Survey of Plant Drought-Resistance Promoting Bacteria from *Populus euphratica* Tree Living in Arid Area. Indian Journal of Microbiology, 54, 419-426.
- Xoconostle-Cazares, B. et al. 2010. Drought tolerance in crop plants. American Journal of Plant Physiology, 5, (5), 241-256.