



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA**

BRUNA COELHO DE LIMA

**ATENUAÇÃO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA DURANTE O
ESTÁDIO REPRODUTIVO DO FEIJOEIRO-COMUM, EM FUNÇÃO DA
INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis***

BRUNA COELHO DE LIMA

**ATENUAÇÃO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA DURANTE O
ESTÁDIO REPRODUTIVO DO FEIJOEIRO-COMUM, EM FUNÇÃO DA
INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis***

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador:
Dr. Fabio F. de Araujo

631.42
L732a

Lima, Bruna Coelho de.

Atenuação do estresse por alta temperatura durante o estágio reprodutivo do feijoeiro-comum, em função da inoculação de *Bacillus subtilis* / Bruna Coelho de Lima. – Presidente Prudente, 2020.

85f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Fábio Fernando de Araujo

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Rizobactérias. 3. Bioquímica. 4. Análise espectral. I. Araujo, Fábio Fernando de. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ATENUAÇÃO DO ESTRESSE POR ALTA TEMPERATURA DURANTE O ESTÁDIO REPRODUTIVO DO FEJÓEIRO-COMUM, EM FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO DE *BACILLUS subtilis*"

AUTOR(A): BRUNA COELHO DE LIMA

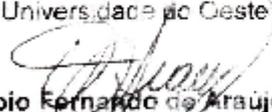
ORIENTADOR(A): FÁBIO FERNANDO DE ARAÚJO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

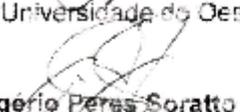
Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)


Prof. Dr. Fábio Fernando de Araújo

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)


Prof. Dr. Rogério Peres Soratto

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Botucatu (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 18 de março de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José e Telma, ao meu irmão, Rafael e ao meu namorado, Lucas Kaique, que sempre com muito incentivo, compreensão e carinho, não mediram esforços para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida.

Aos meus avôs, Antônio Lima e Antônio Coelho (*in memoriam*), pelo exemplo de dignidade e perseverança em suas histórias de vida como Homens do campo.

Ao meu querido amigo Everton Cavalieri Francisquini (*in memoriam*), pela valiosa amizade e imensa alegria em viver a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tamanha bondade em me conceder essa oportunidade desejada por muitos, e por nunca desistir de mim. Agradeço por sua voz que não me deixou desistir. Por me permitir errar, aprender e crescer, e principalmente, por ter me dado família e amigos de grande valor.

Ao professor e orientador, Fábio Fernando de Araújo, pela orientação, amizade e ensinamentos durante esse longo período de aprendizado.

Aos assistentes técnicos de laboratório, Diego Magalhães Guevara, e Mayara de Oliveira V. Figueiredo, hoje, tidos por mim como grandes pessoas e amigos. Obrigado pela paciência e dedicação, do início ao fim desta etapa.

À professora Angelica Augusta Grigoli Dominato, pela amizade e empenho em contribuir com a minha pesquisa.

Ao professor Flávio Alberto Oliva, pela grandiosa amizade e ensinamentos.

Ao professor William Hiroshi Suekane Takata, pela disponibilidade e boa vontade em me ensinar.

Aos meus amigos de pós-graduação, Giovana Ferraresi Guimarães, Diliane Harumi Yaguinuma, Lorryne Guimarães Bavaresco, João Victor Souza Cruz, Caroline Honorato Rocha e Flávia Alessandra Mignacca, por partilharem comigo, momentos alegres e também difíceis, nos quais sempre me apoiaram e ofereceram suas amizades.

Aos meus amigos estagiários, João Pedro Gasparotto, Mateus Paviani, Maria Eduarda F. de Oliveira, Maria Clara Zerbinatti, Luíz Henrique B. de Quadros e Luíz Gustavo G. Lobo, que não mediram esforços para me ajudar na execução da minha pesquisa. Obrigado pelo carinho, consideração e comprometimento.

À Thaís Regina Cruz, que sem nos conhecermos, abdicou inúmeras vezes de seus afazeres para atenciosamente, ajudar a concluir o meu. Obrigado pela amizade.

À minha amiga irmã, Ana Paula Verginassi Pocaia, que acompanhou minha caminhada e esteve comigo desde a graduação. Amizade e palavras de apoio nunca me faltaram.

Ao meu querido irmão, Rafael Ap. Coelho de Lima, pela parceria e cuidados.

À minha mãe e meu pai, deixo um agradecimento especial. Por todas as lições de amor, carinho e compreensão. Por nunca deixarem de acreditar em minha capacidade de conquista. Pelas inúmeras palavras de consolo, quando o desânimo e a angústia tentaram me fragilizar. Obrigado por ser minha base e por ter me conduzido a ser a pessoa que me tornei hoje.

Ao meu amado namorado, Lucas K. Martins Roncaselli, pelo seu amor “lindo e infinito, mais que tudo nessa vida”, pelo companheirismo e imensa paciência, que fizeram e fazem dos meus dias, os melhores a serem vividos. Por me incentivar e acreditar que sou capaz. Pela compreensão e apoio diante de tantos momentos difíceis ao longo dessa caminhada. Por permanecer ao meu lado mesmo sem a devida atenção, e por cuidar de mim. Obrigada por me fazer feliz.

Agradeço a instituição de ensino Unoeste, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por possibilitarem o desenvolvimento e realização dessa pesquisa.

Por fim, à todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que eu concluísse essa dissertação, meus sinceros agradecimentos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

RESUMO

Atenuação do estresse por alta temperatura durante o estágio reprodutivo do feijoeiro-comum, em função da inoculação de *Bacillus subtilis*

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da alta temperatura em genótipos de feijoeiro-comum durante o estágio reprodutivo em função da inoculação das plantas com *Bacillus subtilis*. O estudo foi conduzido em câmara de crescimento de plantas. O delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados contendo três tratamentos, duas cultivares e seis repetições. Os tratamentos foram estabelecidos pela inoculação de duas estirpes de *B. subtilis* e o controle. Os cultivares utilizados foram: IAC Imperador e TAA Dama. A rizobactéria foi inoculada diretamente sobre cada semente, na dosagem de 0,1 mL com 10^9 células por mL de *B. subtilis* AP-3 ou AP-12. As plantas receberam a reposição de umidade periodicamente e foram submetidas ao estresse térmico ao atingir o estágio reprodutivo com aumento da temperatura para 28°/33°C. A duração do período de estresse foi de dez dias. O tempo de duração do experimento foi de 55 dias. Foram realizadas avaliações biométricas, de florescimento, bioquímicas, microbiológicas e análises espectrais nos feijoeiros. A inoculação de *B. subtilis* foi eficiente para aumentar a colonização bacteriana na rizosfera e promover o crescimento do feijoeiro IAC Imperador submetido à condição de estresse térmico no período reprodutivo. Houve redução no abortamento de flores e aumento do número de vagens no cultivar IAC Imperador submetido ao estresse térmico em função da inoculação com *B. subtilis*. Após o período do estresse térmico as plantas inoculadas com *B.s.* (AP-3) apresentaram maiores concentrações de prolina e atividade da peroxidase nas folhas. Durante o período do estresse térmico as plantas inoculadas com *B. subtilis* apresentaram maiores concentrações de etileno foliar. A inoculação do feijoeiro com a estirpe AP-3 de *B. subtilis* também reduziu o estresse térmico avaliado pela maior refletância na região da borda do vermelho na análise espectral.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Rizobactérias; Bioquímica; Análise espectral.

ABSTRACT

High temperature stress attenuation during the common bean reproductive stadium, according to the inoculation of *Bacillus subtilis*

The present work aimed to evaluate the effect of high temperature in common bean genotypes during the reproductive stage due to the inoculation of plants with *Bacillus subtilis*. The study was conducted in a plant growth chamber. The experimental design used was in randomized blocks containing three treatments, two cultivars and six replications. The treatments were established by inoculation of two strains of *B. subtilis* and the control. The cultivars used were: IAC Imperador and TAA Dama. Rhizobacteria was inoculated directly on each seed, at a dosage of 0.1 ml with 10^9 cells per ml of *B. subtilis* AP-3 or AP-12. The plants received periodic moisture replacement and were subjected to thermal stress when reaching the reproductive stage with an increase in temperature to 28 ° / 33 ° C. The duration of the stress period was ten days. The duration of the experiment was 55 days. Biometric, flowering, biochemical, microbiological and spectral analyzes were performed on beans. The inoculation of *B. subtilis* was efficient to increase bacterial colonization in the rhizosphere and to promote the growth of common bean IAC Imperador submitted to the condition of thermal stress in the reproductive period. There was a reduction in the abortion of flowers and an increase in the number of pods in the cultivar IAC Imperador submitted to thermal stress due to inoculation with *B. subtilis*. After the period of thermal stress the plants inoculated with *B.s.* (AP-3) showed higher concentrations of proline and peroxidase activity in the leaves. During the period of thermal stress, plants inoculated with *B. subtilis* showed higher concentrations of leaf ethylene. The inoculation of common bean with the *B. subtilis* strain AP-3 also reduced the thermal stress evaluated by the higher reflectance in the red edge region in the spectral analysis.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; Rhizobacteria; Biochemistry; Spectral analysis.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Avaliação do crescimento de isolados de *B. subtilis* em meio de cultura líquido contendo ACC.37
- Tabela 2.** Análise de variância para as seguintes variáveis: Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR); Razão entre parte aérea e raiz (MSPA/MSR); Número de trifólios por planta e colonização radicular em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.....47
- Tabela 3.** Avaliação de florescimento, porcentagem de abortamento de flores (%) e formação de vagens, em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) de dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.50
- Tabela 4.** Avaliação do índice de clorofila em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.....55
- Tabela 5.** Avaliação da concentração de prolina em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.....56
- Tabela 6.** Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (GPX) em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12), em dois cultivares de feijoeiro expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.....57
- Tabela 7.** Avaliação de etileno em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12), em dois cultivares de feijoeiros expostos à elevação de temperatura no estágio reprodutivo.....59

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. OBJETIVO | 14 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 3.1 Cultura do feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) | 15 |
| 3.1.1 Morfologia e hábito de crescimento da leguminosa | 16 |
| 3.1.2 Efeitos climáticos na cultura do feijão | 19 |
| 3.2 Síntese de etileno em plantas e estresse por aumento de temperatura | 21 |
| 3.3 Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP) | 24 |
| 3.3.1 Produção de ACC deaminase por rizobactérias e associação com estresses abióticos | 26 |
| 3.3.2 Uso de <i>Bacillus subtilis</i> na agricultura | 28 |
| 3.4 Avaliação da diversidade genética em bactérias com o uso da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 30 |
| 3.5 Atividade enzimática e antioxidante | 31 |
| 3.6. Espectroradiometria em plantas | 33 |
| 3.6.1. Índice de vegetação | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 Condução das plantas e efetivação dos tratamentos | 36 |
| 4.2 Característica dos genótipos utilizados | 36 |
| 4.3 Condução do experimento | 36 |
| 4.4. Descrição das avaliações biométricas e bioquímicas | 39 |
| 4.4.1. Avaliações de florescimento e crescimento das plantas | 39 |
| 4.4.2. Avaliação espectral em plantas | 40 |
| 4.4.3. Medição de clorofila nas plantas | 41 |
| 4.4.4. Avaliação de Etileno foliar | 42 |
| 4.4.5. Concentração de Prolina | 43 |
| 4.4.6. Guaiacol Peroxidase | 44 |
| 4.5 Descrição das avaliações biológicas e genética dos isolados bacterianos | 45 |
| 4.5.1. Avaliação da colonização de <i>Bacillus</i> spp. na rizosfera dos feijoeiros | 45 |
| 4.5.2. Avaliação da diversidade genética nos isolados bacterianos | 45 |
| 4.6 Análise estatística | 46 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 5.1 Avaliações biométricas e biológicas | 47 |
| 5.2 Avaliações bioquímicas | 55 |
| 5.3 Avaliação da diversidade genética de isolados de <i>Bacillus</i> spp. | 63 |
| 5.4 Avaliação espectral em plantas | 65 |
| 6. CONCLUSÕES | 70 |
| 7. REFERÊNCIAS | 71 |

1. INTRODUÇÃO

Devido às mudanças climáticas ocorridas nos últimos anos, os estresses ambientais têm sido o grande desafio para a agricultura. A falta de água e temperaturas elevadas provocam instabilidade nos sistemas de cultivos e conseqüentemente perdas na produtividade. Assim como o estresse hídrico, o estresse térmico altera drasticamente o metabolismo das plantas comprometendo diversas etapas do seu ciclo de vida.

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta que não possui boa adaptação à locais com altos índices de temperatura média. O período de maior sensibilidade da cultura à elevação da temperatura é o reprodutivo. Áreas de cultivo com registros de temperaturas acima de 30°C são consideradas de risco para o cultivo da cultura levando à perda consideráveis de rendimento. Estudos recentes sobre modelagem climática sugerem que nas próximas décadas, a temperatura alta será a principal ameaça à produção de feijão-comum, com possíveis reduções na área plantada até 2050 (CGIAR, 2015).

Atualmente, no cenário agrônômico, novas pesquisas buscam comprovar os efeitos benéficos para redução de estresse abióticos, provenientes da associação entre microrganismos do solo e as plantas cultivadas. Os resultados dessa interação são de grande importância para o aumento da produtividade no campo (DODD; PEREZ-ALFOCEA, 2012).

Existem diversas espécies de bactérias e cada uma com uma função capaz de beneficiar o vegetal de alguma forma. Entre os gêneros mais citados estão, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Azospirillum* spp., *Rhizobium* spp., *Azotobacter* spp., entre outras (SANTOYO *et al.*, 2016).

Os efeitos observados com a inoculação dessas espécies microbianas em cultivos beneficiam desde a semente, com o aumento de germinação e emergência de plântulas, até a biomassa vegetal e produção de grãos e frutos. No gênero *Bacillus*, a espécie *B. subtilis* vem sendo bastante estudada devido ao seu potencial de propiciar ganhos diretos e indiretos no crescimento das plantas, como também, a sua capacidade em atenuar os efeitos deletérios de estresses abióticos em plantas.

Em resposta aos estresses abióticos, o metabolismo das plantas é alterado dando início à síntese de hormônios, entre eles, o etileno. O etileno é um importante articulador do crescimento normal das plantas, interferindo em processos como a

nodulação, senescência de folhas, abortamento de flores, crescimento de raízes, entre outros (BALBONTÍN *et al.*, 2007).

Este hormônio é formado a partir da conversão da S-adenosil-metionina (SAM) em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) sob a ação da ACC sintase (ACCS), e a conversão do ACC para a molécula de etileno acontece através da enzima ACC oxidase (ACCO) (ADAMS; YANG, 1979). Tem sido relatado na literatura que *B. subtilis* pode interferir na produção do etileno pela degradação do ACC utilizando a enzima ACC deaminase (MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004)

Para lidar com os efeitos causados por diversos tipos de estresses durante a produção de alimentos, é necessário implementar soluções biológicas sustentáveis e ecologicamente corretas no cultivo. Medidas promissoras incluem o uso de inoculantes microbianos que podem melhorar o estresse, favorecer o crescimento, controlar doenças e cooperar para o desenvolvimento da agricultura sustentável (BERG *et al.*, 2013).

Nesse contexto, torna-se importante que estudos comprovem a hipótese de que a inoculação do feijoeiro-comum com *B. subtilis* tenha potencial em atenuar os efeitos deletérios do estresse térmico, e que sejam disponibilizadas novas tecnologias para o manejo da cultura em diferentes regiões de cultivo.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da alta temperatura em cultivares de feijão-comum durante o estágio reprodutivo, em função da inoculação das plantas com *Bacillus subtilis*, através de avaliações voltadas ao crescimento, florescimento, processos bioquímicos, microbiológicos e análise espectral.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cultura do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijão-comum é uma dicotiledônea de porte herbáceo pertencente à família Fabaceae. Pode apresentar um crescimento determinado ou indeterminado, com ciclo anual alternando entre 60 e 120 dias (SANTOS; GAVILANES, 2006).

Levando em consideração todos os gêneros e espécies classificados como feijão pela FAO (2016), este é cultivado em 117 países. No contexto global, os maiores produtores dessa leguminosa são Myanmar, Índia, Brasil, China, EUA e México (CONAB, 2018). Os estados brasileiros produtores são Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Goiás. O consumo do grão no país gera preferências por coloração e também, particularidades culinárias existentes em cada região (EMBRAPA, 2016).

No Brasil, o cultivo do feijoeiro-comum acontece em três períodos diferentes ao longo do ano, sendo elas a “safra das águas” ou primeira safra, iniciando em outubro a dezembro; na “safra seca” ou segunda safra de fevereiro a março; ou ainda na “safra de inverno” terceira safra, que começa a partir do mês de março (CONAB, 2017).

Fornecedor de nutrientes essenciais ao ser humano, o feijão-comum possui cálcio, ferro, zinco, vitaminas do complexo B, carboidratos e fibras. É tido como principal fonte de proteínas para populações de baixa renda, e um dos alimentos mais tradicionais na dieta dos brasileiros (MESQUITA *et al.*, 2007).

3.1.1 Morfologia e hábito de crescimento da leguminosa

A planta de feijão-comum é formada por uma haste principal da qual, originam-se ramos laterais que brotam das axilas das folhas. Os ramos primários são emitidos da haste principal, os secundários se originam dos primários, e assim por diante, de acordo com a morfologia da planta e seu tipo de crescimento (VILHORDO; MULLER, 1981).

A altura do feijoeiro está ligada ao seu hábito de crescimento e ao seu desenvolvimento (CICHY; SNAPP; BLAIR, 2009). Dentre as características que definem o porte estão, o hábito de florescimento, extensão da haste principal, número e comprimento de internódios na haste central, quantidade de ramificações que tem início na haste, distribuição das vagens na planta, diâmetro do hipocótilo, e o hábito de crescimento (SANTOS; GAVILANES, 2006).

O crescimento completo da planta é resultado da junção entre a multiplicação e o crescimento celular, com a diferenciação dessas células. Desse modo, o crescimento das células promove a expansão irreversível do tamanho da planta sendo notado através da quantidade de folhas, número de nós, altura da planta ou matéria seca da planta. Enquanto que, na diferenciação celular, as mudanças acontecem na função e na forma das células (ALBERTS *et al.*, 2007).

Do início ao fim do seu ciclo de vida, o feijoeiro se desenvolve e passa por fases como germinação, desenvolvimento vegetativo, aparecimento de botões florais, antese, formação de vagens, enchimento de grãos, maturação e senescência das folhas. O período de ocorrência desses eventos e a intensidade com que o crescimento de diversas partes da planta acontece, indicam as particularidades agronômicas de uma cultivar, levando em consideração que, o porte, o tempo de maturação e o hábito de crescimento são influenciados pela relação entre crescimento e desenvolvimento (ALBERTS *et al.*, 2007).

No feijoeiro, posteriormente ao surgimento das folhas primárias, o caule permanece se desenvolvendo, originando uma continuidade de nós e internódios. Nos nós, encontra-se a inserção das folhas trifolioladas e um agrupamento de gemas axilares. Já os internódios correspondem ao espaço de um nó até outro. Os nós caulineares são enumerados de maneira ascendente, o seja, de baixo para cima, sendo o primeiro nó onde há a inserção dos cotilédones, o segundo, a

emissão das folhas primárias, o terceiro, a ocorrência da primeira folha trifoliolada, e assim gradativamente (SANTOS; GAVILANES, 2006).

As folhas do feijoeiro comum são simples, opostas e alternas, formadas por três folíolos (um central ou simétrico, e dois laterais opostos assimétricos) (SILVA; COSTA, 2003).

As cultivares de feijão demonstram variações em relação à sua forma de florescimento (determinado ou indeterminado), número de nós e dimensão da haste principal, quantidade e comprimento de ramos laterais, aptidão para escalar ou não tutores e, propensão ou não, de se prostrar ao solo (PINHEIRO, 2015).

Escalas e modelos para a classificação do hábito de crescimento do feijoeiro estão acessíveis em diferentes centros de pesquisas (PINHEIRO, 2015). As classificações realizadas por diferentes países se assemelham entre si, assim como ao formulário para a proteção de cultivares de feijão, do Ministério da Agricultura, o qual reúne as cultivares de feijão em hábitos de crescimento dos tipos I, II, III e IV (DÍAZ, 1972).

Os genótipos do hábito de crescimento tipo I, exibem crescimento determinado e sua inflorescência tem origem das gemas apicais da haste principal e dos ramos laterais. A duração do seu ciclo de vida vai de 60 a 80 dias. Plantas do hábito de crescimento II possuem porte arbustivo e crescimento indeterminado. Suas inflorescências têm início nas gemas axilares. O ciclo de vida das plantas está na faixa de 80 a 90 dias. Representantes do hábito de crescimento III exibem inúmeros ramos laterais bem desenvolvidos, sua haste central pode medir até 120 centímetros de comprimento e são originados das gemas nas axilas das folhas e dos ramos, e seu ciclo varia de 85 a 90 dias. Já as cultivares do grupo IV tendem a ser prostradas ou “galgadoras”, capazes de galgar um tutor e se fixarem nele. A haste principal é mais longa podendo atingir 2 metros de comprimento. Sua inflorescência tem origem a partir de gemas situadas na axila das folhas e dos ramos, e o ciclo de vida da planta vai de 100 a 110 dias (VIEIRA *et al.*, 2005).

O entendimento sobre a disposição da raiz e sua relação com outras características pode possibilitar ganhos na seleção de plantas ideais para determinado ambiente e cultivo. Não existe um ideótipo de planta de feijão que se estabeleça bem em todos os ambientes, e por esse motivo, o hábito de crescimento,

intimamente associado à adaptação e produção da planta, é um ponto importante da seleção no desenvolvimento de cultivares (VELHO *et al.*, 2018).

Feijões que apresentam hábito de crescimento determinado (tipo I) são menores, isso propõe que a demanda por energia para o desenvolvimento da parte aérea também seja menor quando comparada às plantas com hábito de crescimento indeterminado (tipo II e III) (KELLY, 1998). Entretanto, essas plantas têm um ciclo de vida reduzido em comparação com os demais hábitos, e o desenvolvimento do sistema radicular pode parar em poucas semanas (KELLY, 1998). Sendo assim, genótipos de hábito de crescimento determinado, possivelmente estarão mais sensíveis às variações ambientais que o indeterminado.

3.1.2 Efeitos climáticos na cultura do feijão

Por se tratar de uma cultura de ciclo curto, o feijão-comum se torna sensível às variações ambientais (HOFFMANN *et al.*, 2007). Entre os fatores climáticos que dificultam o desenvolvimento e a produção da cultura, a temperatura e a precipitação pluviométrica ganham destaque (EMBRAPA, 2003).

Dentre os elementos climáticos limitantes ao feijoeiro, a temperatura é considerada como a maior interferente no florescimento e frutificação, bem como, no desenvolvimento das vagens. Em virtude da variação térmica ao longo do território brasileiro, o cultivo de feijão-comum é limitado em algumas regiões, tanto pela baixa temperatura no período de inverno na região sul, quanto pelas altas temperaturas relacionadas aos elevados índices de umidade ao norte (EMBRAPA, 2003).

Nos períodos de baixas temperaturas, a semeadura do feijão pode ser afetada, levando à redução da população de plantas emergidas e da produtividade final. Isto se dá pelo fato de que, após ser posta ao solo, a semente dará início ao processo de germinação somente quando o ambiente estiver adequado, em termos de temperatura, umidade e luminosidade. Caso o período de baixas temperaturas venha acontecer após a fase de germinação, com a planta em crescimento vegetativo, seu crescimento será afetado, ocasionando plantas de porte pequeno, além de propiciar o aborto de sementes (VIEIRA, 2006).

As altas temperaturas exercem grande influência no desenvolvimento dos botões florais e das sementes (VIEIRA, 2006), além de desencadear desequilíbrios como, diminuição de ciclo, elevação da atividade respiratória, queda na assimilação de gás carbônico, aumento da biomassa e decréscimo na produtividade de grãos (DIDONET; MADRIZ, 2002).

Em temperaturas muito elevadas, acima de 35°C, a planta inicia o processo de abscisão dos órgãos reprodutivos, reduzindo a formação de vagens e comprometendo significativamente a produção final (VIEIRA, 2006). De acordo com Portes (1988) e Vieira (2006), a abscisão de estruturas reprodutivas nessa condição, está vinculada ao aumento da síntese de etileno, hormônio regulador do crescimento vegetal.

Outro fator capaz de limitar o cultivo do feijoeiro é a precipitação pluviométrica. Presume-se que o consumo hídrico pela cultura do feijão seja de 300 a 600 milímetros ao longo de todo seu ciclo de vida, consumindo em média, 3 a 4

mm por dia, necessitando de um total de 100mm mensal (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000) (MARCO *et al.*, 2012).

Quando o cultivo ocorre sem irrigação, as precipitações devem ser suficientes para suprir a demanda hídrica da planta, sem ocasionar umidade extrema. No decorrer do verão, a ocorrência de chuvas é ideal para o desenvolvimento da leguminosa, no entanto, há a possibilidade de excesso de umidade no solo. A incidência de chuvas no período da colheita pode gerar prejuízos, elevando o número de brotações e o aparecimento de manchas nas sementes durante a secagem. A alta umidade favorece a disseminação de patógenos e o surgimento de doenças radiculares ao longo do crescimento do feijoeiro. Geralmente, quando a semeadura tem início no final da estação das chuvas, entre os meses de fevereiro e março, a umidade do solo mantém-se apropriada para a fase vegetativa e reprodutiva da planta (VIEIRA, 2006).

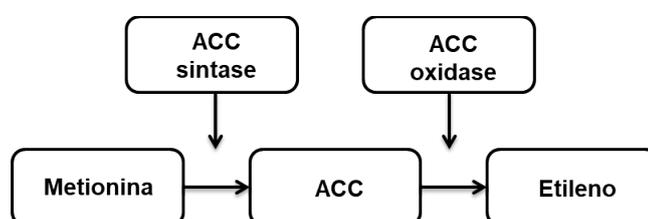
Conforme Silveira e Stone (2001), a época de semeadura, as particularidades da cultivar, a área de cultivo e os tratos com a cultura e com o solo, são aspectos que influenciam diretamente na exigência hídrica para a obtenção máxima da produção.

3.2 Síntese de etileno em plantas e estresse por aumento de temperatura

O etileno é um hormônio vegetal volátil sintetizado por todos os vegetais, capaz de se dispersar a partir de fontes endógenas e exógenas, biológicas e não biológicas, exercendo uma função essencial no amadurecimento e senescência de frutos (VILAS BOAS, 2002). Pode ser elaborado em quase todas as regiões do tecido vegetal, com diferentes taxas de produção e em todos os estádios fenológicos.

Os sítios mais ativos na produção deste hormônio são os meristemas e os nós. Durante a maturação do fruto, a senescência da flor e a abscisão foliar, a síntese de etileno aumenta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Para os autores, tanto o estresse biótico (pragas e doenças), quanto o abiótico (temperatura ou estresse hídrico), estimulam a produção de etileno pela planta.

Adams e Yang (1979), pesquisaram a biossíntese de etileno em tecidos de maçã e determinaram sua via biossintética:



Onde, ocorre a conversão de S-adenosil-metionina (SAM) em ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) sob a ação da ACC sintase (ACCS). A transformação do ACC em etileno é realizada pela enzima formadora do etileno (EFE) ou ACC oxidase (ACCO).

A veracidade dessa via foi confirmada também em outros sistemas (YANG, 1980) envolvendo a produção de etileno induzida por auxina (YU; ADAMS; YANG, 1979) e por estresses (YU; YANG, 1980).

Esse hormônio é capaz de ativar os mecanismos de defesa da planta, como por exemplo, a produção de fitoalexinas (FAN; MATTHEIS; ROBERTS, 2000), PR-proteínas (RODRIGO *et al.*, 1993), indução de fenilpropanóides (CHAPPELL; HAHNBROCK; BOLLER, 1984) e, provocar modificações na parede celular (BELL, 1981), através da degradação da celulose e da pectina (RODRIGUES; ONO, 2001).

A ação do etileno no complexo de defesa da planta é supostamente versátil. O processo de senescência foliar e maturação de frutos estimulados por ele podem expor o tecido vegetal ao desenvolvimento de doenças causadas por certos tipos de patógenos, sendo comumente os necrotróficos. Em compensação, o hormônio também incentiva o desenvolvimento de necroses no tecido vegetal (LUND; STALL; KLEE, 1998), e reações de hipersensibilidade (CIARDI *et al.*, 2001). Dessa forma, diversos mecanismos de defesa são ativados a favor da resistência, sendo cada um deles, eficientes para um grupo específico de patógenos (THOMMA *et al.*, 2001).

Bem como os hormônios, a temperatura possui forte influência sobre a atividade metabólica das plantas e o estresse gerado por sua alta intensidade pode estimular o envelhecimento precoce das folhas (MORISON; LAWLOR, 1999), comprometer o ciclo reprodutivo e resultar em baixos rendimentos da cultura (PRASAD *et al.*, 2008). Conhecido por exercer influência sobre diversos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, inclusive sob a senescência foliar (ABELES *et al.*, 1992), o etileno teve sua atividade descrita em vários estudos atrelados à ocorrência desse fator.

Zacarias e Reid (1990) explicam que, o etileno propicia a senescência diante de uma temperatura ideal de crescimento e que, a taxa de síntese desse hormônio mediante a uma temperatura elevada, permanece incerta, pois o estresse ocasionado pelo aumento térmico modifica a produção de etileno de forma diferente, de uma espécie vegetal para outra.

Segundo a revisão literária de Lieberman (1979) sobre a síntese e ação do etileno, o autor estabelece que há muitos fatores desconhecidos envolvidos na produção de etileno basal e induzido por estresse em plantas. A temperatura tem sido usada como variável para definir alguns fatores relacionados à biossíntese de etileno (FIELD, 1981).

Mattoo e Lieberman (1977) e Field (1981), utilizaram a equação de Arrhenius em experimentos envolvendo tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e feijão-comum, com o objetivo de demonstrar que uma intensa alteração na produção de etileno superior e inferior a temperatura sensível ao resfriamento, estava associada a uma modificação na membrana celular.

A imposição de temperaturas de sub-resfriamento a uma planta sensível ao resfriamento ocasiona um desarranjo nas enzimas ligadas à membrana celular,

promovendo mudanças físicas nos lipídios que a compõem, modificando-os de um estado líquido-cristalino para sólido em gel (SIMON, 1974).

Saltveit e Dilley (1978) pesquisaram o efeito de temperaturas superiores à temperatura de crescimento de 24° C na produção de etileno, em seções excisadas de caule de mudas de ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Alaska). Eles observaram que em temperatura de 36°C, o tecido vegetal exibiu uma rápida resposta em relação ao aumento na produção de etileno, enquanto em temperaturas superiores a 36°C, apontou uma redução drástica dessa síntese. Breves desordens na membrana provocada por curto período de exposição à temperaturas superiores a 36°C impediram a produção de etileno. Esse resultado indica que para a produção de etileno, a membrana celular deve estar íntegra (FIELD, 1981).

Aparentemente, uma das considerações contundentes para que haja a biossíntese de etileno são sistemas celulares intactos e membranas celulares funcionais (LIEBERMAN, 1979).

3.3 Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP)

Desde a criação da definição de rizosfera por Lorenz Hiltner em 1904, muitas pesquisas descreveram que o ambiente do solo envolto ao sistema radicular, é uma região abundante em atividade microbiana, em virtude da existência de exsudatos radiculares (HARTMANN; ROTHBALLER; SCHMID, 2008).

Alguns microrganismos presentes na rizosfera podem ser considerados neutros ou nocivos em relação ao crescimento das plantas, enquanto outros cooperam com seus hospedeiros (RAAIJMAKERS *et al.*, 2009).

Essas bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) (BASHAN; HOLGUIN, 1998), ou rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) (KLOEPPER; SCHROTH, 1978), conseguem produzir diversos compostos como, fitohormônios; ácidos orgânicos e sideróforos; sintetizar antibióticos e quitinases, que interrompem os efeitos deletérios dos patógenos; promover a fixação de nitrogênio atmosférico; atuar na solubilização de fosfato (TAHIR; SARWAR, 2013); bem como, reduzir os efeitos de estresses abióticos (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

Os microrganismos benéficos para as plantas são de interesse para o uso na agricultura, como biofertilizantes ou no controle biológico (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Entretanto, em alguns casos, esses organismos não conseguem estimular os efeitos desejados quando aplicados no campo e isso pode ocorrer devido à insuficiência por parte da colonização ou, do desenvolvimento da rizosfera (LUGTENBERG; DEKKERS; BLOEMBERG, 2001).

A colonização da rizosfera tem sido definida em relação à exsudação radicular (LUGTENBERG; DEKKERS, 1999). Muitos carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e demais compostos, que fornecem uma fonte de nutrientes para as bactérias associadas à raiz, são disponibilizados na rizosfera (WALKER *et al.*, 2003). A constituição dos exsudatos é dependente da cultivar, da exposição da planta ao estresse, do estágio de crescimento em que a planta se encontra e também, pode mostrar diferenças no decorrer do desenvolvimento radicular, resultando em diferenças na composição das inúmeras comunidades bacterianas (HAICHAR *et al.*, 2008).

O uso de Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP) como uma opção para atenuar os efeitos danosos dos estresses abióticos em plantas está ganhando importância. Sua capacidade em induzir tolerância ao estresse é constantemente remetida à vários processos que envolvem modificações fisiológicas e bioquímicas. Inclui alterações no conteúdo fitohormonal (KAUSHAL; WANI, 2016), defesa antioxidante (JYOTHSNA; MURTHY, 2016), produção de osmólitos (DIBY; HARSHAD, 2014) e atividade enzimática do ACC deaminase (YANG; KLOEPPER; RYU, 2009).

Entretanto, estudos comprovam que a redução de ACC nos tecidos vegetais pode ocorrer com a atividade de outra enzima, denominada ACC-deaminase que por sua vez, é possível ser produzida por rizobactérias. A inoculação de plantas de quiabo com *Bacillus megaterium* e *Enterobacter* spp., produtores de ACC deaminase, aumentou a expressão de genes codificadores de antioxidantes, causando uma maior tolerância ao estresse salino (HABIB; KAUSAR; SAUD, 2016).

Plantas inoculadas com as bactérias mostraram grande capacidade para produção de ACC-deaminase de origem bacteriana o que contribui consideravelmente para redução dos teores de etileno em seus tecidos (MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004).

3.3.1 Produção de ACC deaminase por rizobactérias e associação com estresses abióticos

A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilase (ACC) deaminase, descrita pela primeira vez por Honma e Shimomura (1978), provou estar intimamente envolvida na promoção do crescimento das plantas induzida por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) (GLICK; PENROSE; LI, 1998). Após absorver o ACC exsudado pelas raízes da planta, o mesmo é clivado e modificado para ácido α -cetobutírico e amônia. Desse modo, as bactérias estarão se comportando como um coletor de ACC, reduzindo sua quantidade dentro do organismo do vegetal e impedindo que a molécula seja convertida em etileno.

Em consequência, na presença de uma rizobactéria produtora da enzima ACC deaminase, uma planta que foi submetida às situações de estresse biótico ou abiótico, que geralmente tem seu crescimento prejudicado pela ação do etileno, pode se considerar parcialmente ou completamente protegida devido à interrupção da síntese desse hormônio. Assim, os pesquisadores determinaram que, as RPCP portadoras da enzima deaminase podem preservar efetivamente a planta hospedeira contra os efeitos nocivos ocasionados por inundações, salinidade, seca, presença de patógenos fúngicos e bacterianos, danos por nematoides, influência de altos níveis de metais pesados e contaminantes orgânicos, além de estresse por baixa temperatura (GLICK, 2015).

Baseado nessas evidências, um grupo de pesquisadores presumiu que para as RPCP endofíticas, a atividade da enzima ACC deaminase é um elemento chave em sua habilidade de estimular o crescimento da planta (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008). Eles subentenderam que, “a redução dos níveis de etileno na planta depende da eficiência da absorção do ACC pelas bactérias sintetizadoras da enzima deaminase, antes que a molécula sofra a oxidação no metabolismo da planta”. Neste contexto, os endófitos bacterianos de alta atividade enzimática podem ser excelentes promotores de crescimento de plantas, porque melhoram o estresse das plantas ao bloquear eficientemente a produção de etileno.

A confirmação do envolvimento da ACC deaminase no estímulo ao crescimento de plantas, provém da RPCP *Burkholderia phytofirmans* PsJN (SESSITSCH, 2005). Mutantes oriundos dessa bactéria, que tiveram a atividade

enzimática inativada, demonstraram incapacidade em estimular o alongamento radicular em mudas de canola (SUN; CHENG; GLICK, 2009).

Contudo, nos últimos estudos, foi relatado o isolamento e a caracterização de outras RPCP endofíticas sintetizadoras de ACC deaminase (RASHID; CHARLES; GLICK, 2012), que ocasionaram o alongamento das raízes em mudas de canola. Além do mais, estudos apresentam a capacidade de rizobactérias endofíticas produtoras da enzima deaminase, em atenuar estresse osmótico (SZIDERICS *et al.*, 2007) e estresse pelo teor de cobre no solo (ZHANG *et al.*, 2011).

3.3.2 Uso de *Bacillus subtilis* na agricultura

O gênero *Bacillus* spp. são taxonomicamente e metabolicamente amplo. Tem como habitat primário o solo, se habituando também em plantas associadas, rios e águas estuarinas, embora algumas espécies sejam patogênicas para mamíferos (por exemplo, *B. anthracis*) e insetos (*B. sphaericus*, *B. thuringiensis*) (WIPAT; HARWOOD, 1999).

Uma particularidade comum indispensável desse gênero bacteriano, é a habilidade em desenvolver endosporos que os ajudam a sobreviver por longos períodos de tempo sob condições ambientais adversas. A capacidade de esporular e a sua eficiência metabólica, são fatores significativos que proporcionaram êxito na colonização de uma ampla variedade de ambientes (WIPAT; HARWOOD, 1999).

Seis grupos taxonômicos nomeados de acordo com suas espécies membros mais relevantes foram descritos para *Bacillus* spp. (PRIEST, 1993). Os integrantes do grupo *B. polymyxa*, recentemente renomeado para *Paenibacillus*, são auxotróficos e, geralmente relacionados a materiais vegetais em decomposição, adubos e rizosfera. Alguns membros deste conjunto são capazes de fixar nitrogênio (JORDAN; MCNICOL; MARSHALL, 1978) e podem auxiliar significativamente à planta na absorção de nitrogênio, como o trigo canadense.

Além disso, há indícios de que os membros desse grupo sintetizam hormônios vegetais, como a giberelina (BROADBENT; BAKER. WATERWORTH, 1977). Integrantes do conjunto *B. brevis*, renomeado *Brevibacillus*, são localizados nos habitats terrestres e aquáticos. O grupo *B. sphaericus* é classificado como patógeno de insetos e encontra-se nos sedimentos de piscinas, lagos e valas de drenagem, onde as larvas de insetos prosperam. Dois grupos de termófilos, que envolvem membros dos gêneros *Alicyclobacillus* e *B. stearothermophilus*, são identificados predominantemente em solos de zonas térmicas e não térmicas (WIPAT; HARWOOD, 1999).

Há evidências de que o desenvolvimento de *B. subtilis* é predominante em ambientes nutritivos, como a rizosfera. Existem inúmeros relatos a respeito do isolamento de *B. subtilis* da rizosfera de uma vasta variedade de espécies de plantas (MAHAFFEE; BACKMAN, 1993) em concentrações de até 107 UFC por grama de solo da rizosfera (PANDEY; PALNI, 1997).

As espécies de *Bacillus* vêm sendo estudadas desde o início dos anos 1960 devido aos seus efeitos promotores de crescimento de plantas (RIDGE; ROVIRA, 1968) onde, a interação entre *B. subtilis* e as plantas já foi estabelecida. Araujo e Hungria (1999), constataram que *Bacillus subtilis* AP-3 e os seus metabólitos ocasionaram incrementos na nodulação e crescimento de plantas de soja à campo.

O *Bacillus subtilis* tem sido estudado em diversos trabalhos como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (RPCP) e sua inoculação tem conferido ganhos diretos e indiretos no crescimento dos vegetais, sendo esta espécie bacteriana já disponível comercialmente para o tratamento de sementes em diversos países (ARAUJO, 2008).

A identificação de compostos do metabolismo secundário produzidos por *B. subtilis* é importante para o esclarecimento dos efeitos benéficos que a bactéria proporciona às plantas (TAHIR *et al.*, 2017). O grande número de mecanismos envolvidos na produção desses compostos pode ser a razão pela qual *B. subtilis* tem sido avaliado em grande espectro de culturas agrícolas sob diferentes condições (KILIAN *et al.*, 2000).

Dentro das principais vias metabólicas estudadas e que envolvem a participação de rizobactérias como *B. subtilis* tem se destacado a regulação ou produção de hormônios vegetais no ambiente rizosférico (ARAUJO *et al.*, 2005). Este mecanismo tem influenciado diretamente na resistência ou tolerância à estresses bióticos e abióticos em plantas (HAN *et al.*, 2014).

3.4 Avaliação da diversidade genética em bactérias com o uso da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As análises moleculares podem ser muito úteis desde que haja confiabilidade, rapidez e simplicidade no método utilizado. A Reação em Cadeia da Polimerase é uma técnica rápida e resume-se na síntese bidirecional e repetitiva de DNA por meio da extensão de uma região do ácido nucléico com a aplicação de “primers” ou iniciadores.

A amplificação de uma amostra através da técnica de PCR necessita de um par de iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons de magnésio ($MgCl_2$), que devem estar em maior concentração que os dNTPs e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar o DNA.

Três etapas diferentes irão ocorrer durante cada ciclo de reação da PCR. Na primeira fase acontece a desnaturação da dupla fita do material genético, quando a temperatura alcança 92°-96°C. O tempo preciso para a realização da desnaturação varia conforme o volume da reação e o termociclador. Na segunda fase do ciclo da PCR tem início o anelamento dos iniciadores ou “primers” à fita de DNA que será sintetizada. O processo acontece quando a temperatura dentro do termociclador atinge 37° à 65°C dependendo da composição dos iniciadores. O anelamento se dá com êxito, pois os iniciadores estão com uma concentração mais alta que o DNA e seus tamanhos muitas vezes são inferiores ao da molécula, assim, eles hibridizam com sua sequência complementar num espaço de tempo bem menor que o ideal para que as fitas se renaturem. A última etapa do ciclo é a extensão originada a partir dos iniciadores e da polimerase termoestável. Normalmente, essa fase do ciclo de PCR tem início com a temperatura à 72°C. O tempo responsável pela cópia completa da fita de DNA varia de acordo com o tamanho do produto de PCR (DIEFFENBACH; DVEKSLER, 1995).

Dentre as técnicas usadas para avaliar a diversidade genética bacteriana encontra-se o Box-PCR. Uma análise simples para discriminar pequenas diferenças entre cepas bacterianas, a partir de um único “primer” ou iniciador, possibilita ter de uma forma clara, a identificação quando inoculada ou não uma bactéria em solo (FALCÃO *et al.*, 2014).

3.5 Atividade enzimática e antioxidante

As espécies reativas de oxigênio – ERO são elaboradas, particularmente, quando uma pequena porção de elétrons da cadeia respiratória escapa e resulta numa redução parcial do oxigênio molecular. Como exemplo, temos peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) entre outros (MITTLER, 2002). Assim, as ERO são subprodutos do metabolismo celular regular, nos peroxissomos. Todas estas moléculas oxidativas são malélicas e também podem ser produzidas por estímulos bióticos ou abióticos aos quais as plantas estão frequentemente expostas (MITTLER, 2002).

Quando as plantas sofrem algum estresse, os pontos centrais de produção das ERO são os cloroplastos e as mitocôndrias, em razão de serem organelas com elevada atividade de oxidação metabólica ou com abundante fluxo de elétrons (GILL; TUTEJA, 2010).

As plantas dispõem de um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático que propicia a detoxificação das ERO e a preservação das células vegetais aos danos oxidativos. A glutathiona (GSH), a cisteína, as hidroquinonas, manitol, vitaminas C e E, os flavonoides, os alcaloides e o β -caroteno, são exemplos de defesa não enzimática, enquanto que, a defesa enzimática antioxidante abrange enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, a peroxidase, entre outras (DINAKAR; DJILIANOV; BARTELS, 2012). Entretanto, a eliminação efetiva das ERO demanda a ação conjunta desses sistemas antioxidantes.

A Superóxido dismutase (SOD) retira o $O_2\cdot^-$ catalisando sua dismutação, na qual um $O_2\cdot^-$ é reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 . A remoção do O_2 , minimiza o risco de formação de $OH\cdot$ no interior celular (MITTLER, 2002). Trata-se de umas das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficientes e presentes em todos os organismos aeróbicos e divisões subcelulares, predispostas a uma explosão oxidativa em virtude de um estresse biótico ou abiótico. Esta enzima proporciona a primeira linha de proteção contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das espécies reativas de oxigênio (GILL; TUTEJA, 2010).

A Catalase (CAT), é uma das enzimas essenciais para a desintoxicação celular de plantas sob estresse, pois ela é encarregada pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo este peróxido elaborado nos peroxissomos por oxidase na oxidação de ácidos graxos, fotorespiração, e catabolismo de purinas

(GILL; TUTEJA, 2010). Essa enzima é a via principal de degradação H_2O_2 e, em vista disso, a inibição da atuação da Catalase resulta na ativação da resistência sistêmica adquirida. Este sistema é despertado quando as plantas são abordadas, principalmente por fungos fitopatogênicos no qual sua evolução é impedida no local infectado (GAYATRIDEVI; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2012).

As Peroxidases são um grupo de enzimas presentes em tecidos de animais, plantas e microrganismos, que catalisam a oxirredução entre H_2O_2 e diversos redutores, participam de uma extensa variedade de processos fisiológicos nos vegetais, como lignificação, suberização, composição e reticulação de componentes da parede celular, catabolismo de auxínicas, senescência, defesa contra ataques de patógenos e estressores abióticos (HIRAGA *et al.*, 2001).

Dessa forma, a SOD atua como a primeira frente de defesa transformando o O_2 a H_2O_2 , e a CAT e a peroxidase atuam, portanto, eliminando o H_2O_2 da célula. A diferença entre o modo de ação da CAT e da peroxidase encontra-se na necessidade por parte da peroxidase em uma molécula redutora (proteínas como citocromo c ou tioredoxina) que agirá como um cofator de regeneração que não leva à evolução de O_2 , por que a água é o produto final da reação (BHATT; TRIPATHI, 2011).

3.6. Espectroradiometria em plantas

O entendimento sobre a interação entre a vegetação e o meio que a cerca possui grande relevância para a compreensão dos fenômenos naturais, sendo o sensoriamento remoto, uma ferramenta precisa para o conhecimento da cobertura vegetal (LUCHIARI, 2001). Nesse contexto, a espectrorradiometria permite detectar a resposta espectral de alvos específicos, podendo ser realizada em laboratórios, permitindo assim, reduzir a intromissão dos fatores ambientais presentes nas leituras de outros sensores (SILVA *et al.*, 2012).

A explicação mais clássica e difundida de sensoriamento remoto foi proposta por Houghton (1989), comparando-o como a ciência e a arte de se obter informações sobre um objeto, área ou fenômeno, por meio do estudo de dados resultantes de um sistema com ausência de contato físico. Essa inovação aborda a reação de objetos submetidos à radiação, sendo o solo e a vegetação os elementos mais examinados na área de ciências agrárias.

A relação entre a radiação eletromagnética e a estrutura celular da folha acontece em função da constituição, morfologia e estrutura interna. Desse modo, as particularidades geneticamente controladas, exibirão diferenças no comportamento espectral entre grupos geneticamente diferentes (PONZONI, 2002). A parcela de energia absorvida, transmitida ou refletida pelas folhas pode variar de uma espécie para outra, inclusive, dentro da própria espécie, porque há a influência direta ou indireta das condições ambientais nessa associação (MOREIRA, 2011).

A detecção de estressores e seus efeitos na vegetação são relevantes para a agricultura e a preservação do ecossistema. Os métodos convencionais de detecção de estresse são baseados na avaliação de alterações físicas, por exemplo, cor ou turgidez, com o risco de ser verificado somente após um ponto crítico de dano ter sido alcançado. Outros métodos concentram-se na detecção de sintomas precoces de estresses, fazendo o uso de técnicas bioquímicas e biofísicas, como o potencial hídrico nas folhas e a condutância estomática (ZORB *et al.*, 2004) ou, no conteúdo de água nas folhas (LWC) com câmeras térmicas e sensores infravermelhos (COSTA; GRANT; CHAVES, 2013).

Segundo Jensen e Epiphanyo (2011), quando uma planta encontra-se sob estresse e/ou a produção de clorofila diminui, a redução de clorofila faz com que a planta absorva menos energia nas respectivas regiões de absorção de clorofila, azul

e vermelho, desse modo não refletindo o verde de uma planta saudável. A refletância espectral foliar de uma planta estressada encontra-se, conforme Carter, Cibula e Dell (1996), na região do visível, entre os intervalos de 535 e 640 nanômetros, e de 685 a 700nm. No sensoriamento remoto essas regiões podem detectar a presença de estresse, não somente em folhas individuais, como em dosséis vegetais densos.

3.6.1. Índice de vegetação

O monitoramento da vegetação através do sensoriamento remoto pode ser feito a partir de Índices de Vegetação (IV), que são medidas radiométricas que apontam a quantidade e a atividade da vegetação verde, incluindo o índice de área foliar (IAF), a porcentagem de cobertura verde, índice de clorofila, a biomassa verde e a radiação fotossintética absorvida (JENSEN; EPIPHANIO, 2011).

Esses índices estão associados aos parâmetros biofísicos da cobertura vegetal, como a biomassa, além da luminosidade do ambiente e declividade da superfície, que influenciam nos valores de refletância da vegetação (PONZONI; SHIMABUKURO, 2007).

A relação entre os parâmetros biofísicos das culturas e o sensoriamento remoto, pode ser estimulada através de índices de vegetação ou de bandas simples, assim, os índices de vegetação são comumente utilizados para mensurar características das culturas (GATES *et al.*, 1965).

Alguns autores correlacionaram a produtividade de cultivos com índices de vegetação. Picoli *et al.* (2009) observaram resultados promissores quando associaram variáveis espectrais com estimativas de produtividade para a cana – de – açúcar. Monteiro *et al.* (2013) avaliaram índices de vegetação como, razão simples, índice de vegetação ajustado ao solo, índice de vegetação realçado, índice de vegetação por diferença normalizada e o índice de vegetação por área foliar, como aceitáveis para estimar a produtividade da cultura do feijoeiro.

Segundo Uno *et al.* (2005), vários índices foram desenvolvidos para analisar as condições das culturas na agricultura. Técnicas de realce de imagem com índices de vegetação proporcionam um aumento na resposta de áreas vegetadas, aprimorando a aparência da distribuição espacial das informações da imagem, o que resulta em simplificada interpretação computacional e visual.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condução das plantas e efetivação dos tratamentos

O experimento foi realizado no laboratório de Biologia do Solo da Universidade do Oeste Paulista, campus II, em Presidente Prudente – SP. A unidade experimental foi constituída por vasos plásticos com capacidade para 3 litros. Para o cultivo das plantas foram utilizados 700 gramas do substrato comercial (Figura 1-a). O delineamento experimental utilizado foi o fatorial 2x3 em blocos casualizados com seis repetições. Constituído por três tratamentos, sendo eles *Bacillus subtilis* AP-3, *Bacillus subtilis* AP-12 e Controle, e duas cultivares de feijoeiro, IAC Imperador e TAA Dama.

4.2 Característica dos genótipos utilizados

IAC Imperador: O cultivar possui ciclo precoce compreendendo o período de 75 dias, enquanto as tradicionais sementes presentes no mercado, em geral, possuem ciclo de 85 a 95 dias até serem colhidas. Possui resistência à Antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), tolerância à Murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum*), principais doenças da cultura. A planta apresenta hábito de crescimento determinado e porte ereto. Expressa potencial produtivo de 4.600 kg ha⁻¹, observado em campos de produção no Estado de São Paulo. A cultivar é recomendada para a semeadura no Estado de São Paulo, para as três épocas de cultivo (águas, seca e inverno) (GOMES; GALDINO, 2011).

TAA Dama: O cultivar possui ciclo intermediário compreendendo o período de 82 a 93 dias. Possui resistência ao vírus do Mosaico comum e à murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*). A planta apresenta hábito de crescimento indeterminado e porte prostrado. Expressa potencial produtivo de 4200 kg ha⁻¹ em condições de sequeiro e, 4500 kg ha⁻¹ em irrigado (SEMENTES MARAMBAIA, 2017).

4.3 Condução do experimento

As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento de plantas Fitotron® modelo Weiss Technik UK LTD, apresentado na (Figura 1-b). O equipamento proporciona controle de temperatura, umidade e fotoperíodo. A emissão luminosa foi

resultante de lâmpadas fluorescentes que forneceram um total de 350 W.m⁻². O fotoperíodo foi determinado para 16 horas de luz e 8 horas de escuro. A temperatura inicial para o cultivo foi ajustada para 20/25°C nos períodos noite/dia. A umidade relativa foi programada para 60% e as plantas foram conduzidas na intensidade de 300 µmol m⁻² s⁻¹.

Antes do plantio as sementes foram previamente limpas em uma solução de hipoclorito de sódio (2%) e água, durante 2 minutos. Em seguida, foram enxaguadas em água corrente. Posteriormente, foram tratadas com o inoculante líquido Nitro 1000 para feijão (*Phaseolus vulgaris*) composto por *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 e SEMIA 4088), na dosagem de 250mL para 50kg sementes.

Foram avaliados sete isolados de *Bacillus subtilis* pertencentes à coleção de culturas bacterianas do laboratório de microbiologia da Unoeste. Para selecionar os isolados a serem utilizados no experimento, foi realizado previamente um ensaio para a caracterização quanto à produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilase (ACC) deaminase, utilizando-se o método descrito por Lucon, Akamatsu e Harakava (2008). Neste método, a capacidade de crescimento dos isolados na presença de ACC foi verificada em meio líquido através de incubação durante 48h a 27°C, sob agitação constante. Para a escolha dos isolados foi utilizado o critério de maior e menor atividade de ACC deaminase *in vitro* (Tabela 1). A partir dessa análise, foram selecionados para o uso no experimento os isolados *B. subtilis* AP-3 com atividade enzimática intermediária, mas já caracterizado como promotora do crescimento de plantas (ARAUJO *et al.*, 2005) e o isolado *B. subtilis* AP-12 com maior atividade de ACC deaminase.

Tabela 1. Avaliação do crescimento de isolados de *B. subtilis* em meio de cultura líquido contendo ACC.

| Isolados | Absorbância (596nm) |
|----------|---------------------|
| AP-12 | 0,724 |
| 1B | 0,718 |
| AP-91 | 0,707 |
| A-35 | 0,680 |
| AP-3 | 0,673 |
| AP-105 | 0,655 |
| AP-137 | 0,575 |

Os isolados bacterianos foram selecionados e multiplicados em placas de Petri em meio de cultura Ágar nutriente sólido (3g L^{-1} de extrato de levedura, 5g L^{-1} de peptona e 20g L^{-1} de ágar). As placas foram mantidas em estufa bacteriana durante 48 horas a 32°C . Após este período, as colônias bacterianas foram raspadas e transferidas para 100 mL de água salina esterilizada ($\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01M). Na sequência, a suspensão foi agitada em Vortex® para total dispersão bacteriana e avaliação da concentração pelo método da diluição seriada. Em seguida, foi aplicado diretamente sobre cada semente 0,1 mL de solução aquosa contendo 10^9 células por mL de cada um dos *Bacillus* em seus respectivos tratamentos. No momento da semeadura, cada tratamento recebeu cinco sementes.

Os vasos foram então acondicionados na câmara de crescimento de plantas onde receberam a reposição de umidade periodicamente. Após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso.

Ao atingir o estágio reprodutivo (R5) aos 21 dias de cultivo, as plantas foram submetidas ao aumento de temperatura. A duração do período de estresse foi de dez dias. Nesse período a temperatura do ar no interior do Fitotron foi elevada para $28/33^{\circ}\text{C}$ nos períodos noite/dia. Ao final do período do estresse térmico, as plantas retornaram à temperatura inicial, na qual permaneceram até a finalização do cultivo. O tempo de duração do experimento foi de 55 dias após a emergência (DAE) das plantas (Figura 1-c).



Figura 1. a) Vasos contendo substrato comercial para a semeadura, b) Câmara de crescimento de plantas Fitotron, c) Plântulas após a emergência.

4.4. Descrição das avaliações biométricas e bioquímicas

4.4.1. Avaliações de florescimento e crescimento das plantas

As características fenológicas das plantas foram avaliadas individualmente em cada repetição (vaso), quantificando-se o número total de flores emitidas (estádio R5) (Figura 2-a), número de vagens formadas (Figura 2-b) no final do experimento (R7) (considerando-se vagem quando foi verificada a presença de pelo menos uma semente). Para o cálculo da porcentagem de abortamento de flores durante o estresse térmico, foram quantificados e marcados os botões florais existentes no estágio R5, e após quatro dias do início do estresse foram quantificadas as flores abortadas. Ao final do experimento, aos 55 dias após a emergência (DAE), foi quantificado o número de flores e vagens restantes nas plantas.

Para a avaliação da biomassa seca ao final do experimento foram coletados todos os trifólios e vagens desenvolvidos ao longo do ciclo da planta e colocados em sacos de papel devidamente identificados para a pesagem e posteriormente secagem em estufa com ventilação forçada à 60°C por 48h.

As raízes separadas das plantas no término do experimento foram pesadas e lavadas em água corrente. Foram separadas 1 grama de raiz de cada repetição para análises de colonização bacteriana da rizosfera. Em seguida, as raízes foram postas em sacos de papel identificados e secas em estufa com ventilação forçada à 60°C por 24h. A razão parte aérea/raiz foi calculada dividindo-se a massa seca total da parte aérea pela massa seca total do sistema radicular.

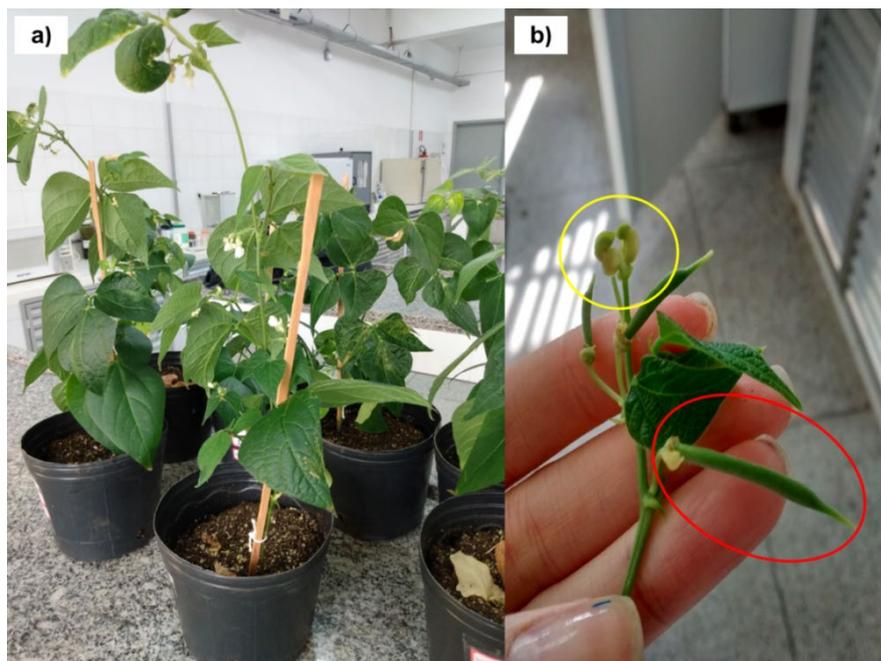


Figura 2. a) Plantas em floração (R6) e b) Formação de vagens (R7): círculo amarelo botões florais, círculo vermelho vagem em desenvolvimento.

4.4.2. Avaliação espectral em plantas

As plantas foram avaliadas em três períodos, sendo eles, antes do aumento de temperatura (início do estágio R5), durante (estádios R5 e R6), e após (estádio R7). Para iniciar a espectralradiometria as plantas de cada cultivar foram retiradas da câmara de crescimento de plantas Fitotron, e foram levadas para uma sala totalmente escura.

A assinatura espectral das plantas foi medida com auxílio de um espectralradiômetro ASD Fieldspec HandHeld em uma sala escura (Figura 3-a). Esse equipamento registra 512 canais com resolução espectral de 1,6 nm e um campo de visada de 10°, no intervalo de 325 a 1075 nm. O equipamento mede 10 curvas espectrais a cada leitura, para então calcular a curva média, utilizada como representativa para o alvo de interesse. O espectralradiômetro foi posicionado em um ângulo de 45°, em relação à altura da planta, de modo que o campo de visão (FOV - Field of View) não ultrapassasse a área das folhas coletadas. Ao lado oposto, uma fonte contendo uma lâmpada de halógeno foi posicionada a 45°.

O equipamento espectralradiômetro foi calibrado conforme as condições de iluminação do local. Para isso, foi medida a radiância de uma placa Lambertiana (Spectralon® plate) (Figura 3-b). Essa calibração permitiu estimar o Fator de

Refletância Hemisférico Cônico (HCRF - Hemispherical Conical Refletance Factor) das folhas e, em seguida, converter o sinal medido pelo espectroradiômetro em refletância. O HCRF é calculado a partir da equação:

$$\text{HCRF} (\omega_i \omega_r) = \frac{dL (\theta_r, \Phi_r) (\text{alvo})}{dL (\theta_r, \Phi_r) (\text{referência})} K (\theta_i, \Phi_i, \theta_r, \Phi_r)$$

onde: dL é a radiância, ω é o ângulo sólido, θ e Φ são os ângulos zenital e azimutal, respectivamente; i corresponde ao fluxo incidente e r é o fluxo de energia refletido. O valor K é o fator de correção do equipamento utilizado.

A partir da equação, calculamos o fator de refletância das plantas em cada tratamento. Em seguida calculamos as curvas médias.

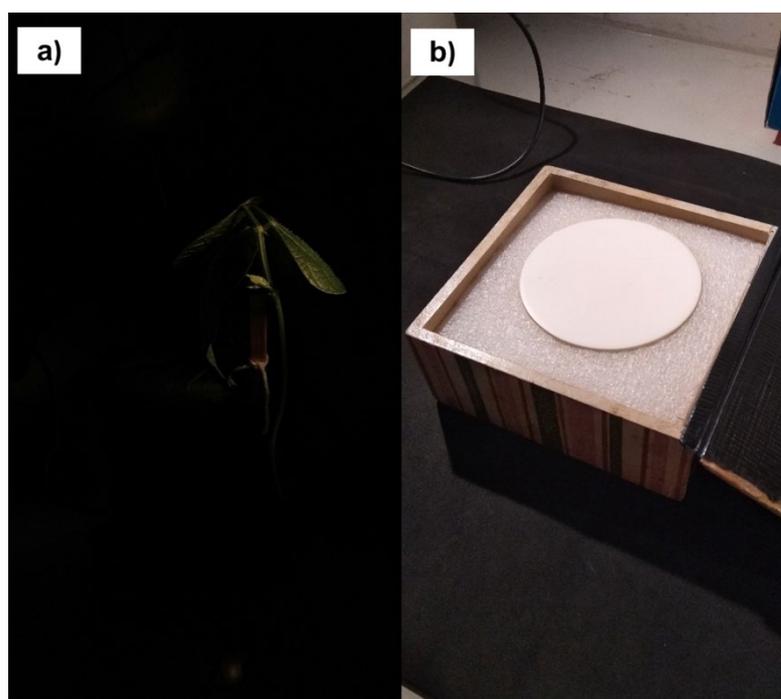


Figura 3. a) Planta fotografada dentro da sala-escura, antes da medida e b) Placa Lambertiana utilizada na calibração do espectroradiômetro.

4.4.3. Medição de clorofila nas plantas

O teor relativo de clorofila total nas folhas foi determinado por método não destrutivo utilizando clorofilômetro portátil digital, modelo clorofiLOG CFL 1030, da marca Falker®. Para a medida, foram escolhidos dois trifólios do terço médio da haste principal da planta de cada repetição, e após a medida, foram calculadas as

médias de cada folíolo, afim de representar toda a superfície foliar amostrada (FONTES; ARAÚJO, 2007). As medições ocorreram antes das plantas ficarem expostas à alta temperatura (início do estágio R5), durante a exposição (estádios R5 e R6) após 96 horas, e após a redução da temperatura (estádio R7) decorridos 240 horas.

O índice de clorofila é calculado com base na absorção de luz em comprimentos de onda de 0 a 100nm. O clorofiLOG mede a quantidade de radiação transmitida através das folhas, de forma óptica em três diferentes comprimentos de onda (dois na faixa do vermelho, próximos aos picos de absorção da clorofila e um no infravermelho próximo). A combinação destes valores de transmitâncias nestes três comprimentos de onda gera o ICF – Índice de Clorofila Falker®. A unidade de medição para os resultados obtidos através do clorofiLOG é chamada de Índice de Clorofila Falker (ICF) (FALKER, 2011).

4.4.4. Avaliação de Etileno foliar

Para avaliação da liberação do gás etileno durante o cultivo antes, durante e após o estresse térmico foram selecionadas quatro repetições de cada um dos três tratamentos, totalizando 12 amostras por genótipo. As coletas tiveram início cinco dias antes do início de alta temperatura, no quinto dia de estresse e, com cinco dias após o estresse.

Foi coletado um folíolo do trifólio localizado no terço médio da haste principal de cada planta, o qual, com o auxílio de um cortador de folhas em formato circular com diâmetro de 5mm, foi recortado em onze discos, atingindo a porção de 200mg. Os discos foram rapidamente colocados em frascos de vidro com volume de 20mL e vedados com séptos de silicone e lacre de alumínio (Figura 4-a). As amostras foram analisadas dentro de um período médio de 4h após a coleta e vedação dos frascos.

Para análise do etileno foi empregado o método da cromatografia gasosa utilizando-se cromatógrafo à gás (CG-2010) modelo Shimadzu representado na (Figura 4-b) conforme Makky *et al.* (2014). O equipamento foi instalado com um detector de ionização de chama (FID), equipado com a coluna Rtx-Wax 100% polietilenoglicol. O cromatógrafo foi inicialmente ajustado com a temperatura de 60°C e mantido assim por 2 min. Após a temperatura atingir o equilíbrio durante 0,5 min, o equipamento teve o aquecimento elevado a uma taxa de 30°C.min⁻¹ até

atingir 240°C, onde a temperatura foi mantida por 1 min. A temperatura máxima do forno não pode exceder 250°C, enquanto o tempo total de execução do CG foi de 9,5 min.

Com a rampa de aquecimento configurada (Figura 4-c), foi realizado um teste injetando no aparelho uma amostra pura do gás etileno. Para isso, foi utilizado um balão volumétrico de 50mL, onde foi feito o processo de vácuo durante 5 minutos e em seguida, a introdução do gás de etileno. O balão foi vedado com o sêpto impedindo a saída e a entrada de outros gases, mantendo a pureza da amostra. A atmosfera retida dentro do balão foi retirada e injetada no cromatógrafo com a ajuda da seringa Hamilton modelo 80300 com capacidade para 10 μ L, dando início à análise. O tempo necessário para a detecção do gás etileno pelo equipamento foi de 1,44 minutos. Essa amostra foi refeita para certificar o momento de saída do gás, onde o mesmo se confirmou. Com o teste concluído, foi dado início à leitura das amostras foliares. O pico formado em cada amostra foi quantificado e usado para cálculo da concentração final com base na amostra padrão de etileno puro.

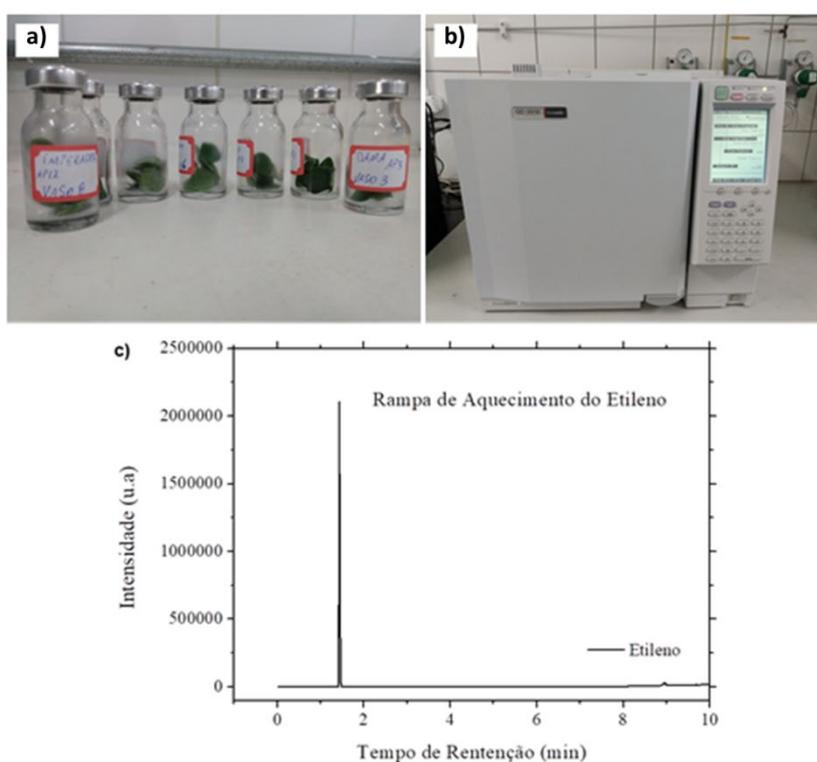


Figura 4. a) Amostras de tecido vegetal para análise, b) Cromatógrafo gasoso Shimadzu-2010 e c) Padrão de etileno puro.

4.4.5. Concentração de Prolina

Para a determinação dos teores de Prolina no tecido foliar, foi utilizada a metodologia descrita por Bates, Waldren e Teare (1973). Foram coletadas amostras do tecido foliar do terço médio das plantas de cada repetição, antes (início do período de estresse), durante (96 horas) e após o término do período de estresse. A amostra recém coletada foi imediatamente armazenada em saquinhos de papel alumínio e colocadas em nitrogênio líquido para manter a atividade celular do tecido paralisada até o início da análise. Com o final da coleta, cada amostra devidamente identificada, teve 100mg do tecido macerado com 10mL de ácido sulfosalicílico 3%. Ao final da maceração, as amostras foram filtradas e tiveram 2mL retirados e acrescidos de 2mL de ninidrina ácida e 2mL de ácido acético glacial. Feito isso, as amostras foram postas em “banho maria” a 100°C durante 1h. Quando retiradas da fervura, as amostras foram ser inseridas em uma caixa com gelo para dar inicio a reação. Para a leitura das amostras, foi acrescentado 4mL de Tolueno e homogeneizadas. Após isso, as amostras permaneceram imóveis por 5 minutos, até formar duas fases, separando assim, as frações orgânicas da aquosa. O sobrenadante formado foi retirado com o auxílio de uma pipeta e lido no espectrofotômetro com o comprimento de onda em 520 nanômetros (nm). A concentração de prolina foi calculada na seguinte fórmula e expressa em μmol de prolina/grama de peso fresco.

$$\frac{[(\mu\text{g de prolina} \times \text{mL de Tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}]}{[(\text{gramas de amostra}/3)]}$$

4.4.6. Guaiacol Peroxidase

Para a determinação da atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (EC 1.11.1.7), foram coletadas amostras do tecido foliar inseridas no terço médio da haste principal das plantas de feijão, no mesmo período de coleta para a avaliação da concentração de Prolina. Durante a coleta, as folhas foram armazenadas em papel alumínio com suas respectivas identificações e colocadas em nitrogênio líquido. Foi macerado 100mg do tecido armazenado com 3mL de Tampão fosfato (0,01M) pH 6,0 e transferidos para um eppendorf. As amostras após maceradas foram mantidas no gelo, e em seguida, foram centrifugadas em uma centrífuga

refrigerada durante 25 minutos a 20.000 giros. Com as amostras centrifugadas, foi retirado 100 μ L do sobrenadante e misturado com 2,9mL de Tampão fosfato contendo Guaiacol e Peróxido de Hidrogênio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 470nm. A atividade catalítica da enzima foi calculada com base nas absorbâncias obtidas e expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca.

4.5 Descrição das avaliações biológicas e genética dos isolados bacterianos

4.5.1. Avaliação da colonização de *Bacillus* spp. na rizosfera dos feijoeiros

Amostras de raízes foram lavadas em água corrente e colocadas em Herlenmeyer contendo 100mL de solução salina ($\text{MgSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$) autoclavada. Após a inserção da raiz na solução salina, as amostras foram agitadas por 5 minutos em um agitador automático e em seguida, os Herlenmeyer foram para o “banho maria” à uma temperatura de 70°C durante 2 minutos para selecionar os microrganismos termoresistentes, produtores de endósporos e relacionados ao gênero *Bacillus* (BETTIOL, 1995). Foi retirado com o auxílio de uma pipeta, 1mL dessa solução e repassado para outro tubo contendo 9mL de solução salina estéril, e deste, já diluído, à outro tubo, dando início a uma diluição seriada.

Em placas contendo meio de cultura Ágar nutriente, respectivamente identificadas conforme a amostra foi aplicado 0,1mL da solução do primeiro tubo. O procedimento foi refeito com a segunda diluição. As placas foram armazenadas em estufa à 30°C durante 72h. A contagem de colônias ocorreu com base nas características morfológicas típicas de *Bacillus* spp.

4.5.2. Avaliação da diversidade genética nos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram obtidos durante avaliação da colonização radicular do feijoeiro após a coleta das plantas. Foram avaliados ao todo 72 isolados obtidos em todos os tratamentos conduzidos. Os mesmos foram cultivados em meio de cultura Ágar nutriente sólido (3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de peptona. e 20 g L⁻¹ de ágar) em tubos, incubados durante 48 horas em estufa bacteriológica à 37° C.

Logo após o processo de extração de DNA (DOYLE; DOYLE, 1987) e da realização das análises quantitativas e qualitativas, as mesmas passaram pela técnica do Box-PCR. Para essa técnica realizou-se a montagem do Mix com um volume final de reação de 25 μL , constituído por 14,6 μL de H₂O mili-Q, 2,5 μL de Tampão de Reação (20mM Tris-HCl pH 8,4 50mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM de dNTPs, 0,5 μL do primer BOX A1R (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'), 5,0 μL de DNA diluído (1:99) conforme Falcão *et al.* (2014). As reações ocorreram em 48 ciclos, onde a desnaturação inicial iniciou-se a 94°C por 5 minutos, anelamento à 35°C por 1 minuto e extensão das fitas à 72°C por 30 segundos. Logo após os 48 ciclos, a fase da extensão ficou à uma temperatura de 72°C durante 5 minutos. Após esse processo, as amostras foram visualizadas em gel de Agarose a 1,5% em cuba de eletroforese embebido com tampão TBE 0,5%. Para estimar o peso molecular de cada banda foi utilizado o programa Quantum ST4.

4.6 Análise estatística

Foi utilizado o software SISVAR para efetivação da análise de variância, e o teste de Tukey para a comparação das médias a 0,01% e 0,05% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliações biométricas e biológicas

A colonização radicular e a massa seca da parte aérea (MSPA) apresentaram interação entre os tratamentos e os cultivares. Na massa seca da raiz (MSR) e razão (MSPA/MSR), não foi encontrada diferença em relação aos tratamentos e cultivares. No número de trifólios por planta o genótipo TAA Dama exibiu maior número de trifólios (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para as seguintes variáveis: Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR); Razão entre parte aérea e raiz (MSPA/MSR); Número de trifólios por planta e colonização radicular em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

| Tratamentos | Colonização | MSPA | MSR | MSPA/MSR | Nº de trifólios |
|-----------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|----------|-----------------|
| | ($\times 10^5 \text{ g}^{-1}$) | (g.pl^{-1}) | (g.pl^{-1}) | - | - |
| Controle | 0,77 b | 3,50 | 1,18 | 3,15 | 14,66 ab |
| B.s. (AP-3) | 3,63 a | 4,01 | 1,23 | 2,78 | 15,75 a |
| B.s. (AP-12) | 3,39 a | 4,13 | 1,29 | 2,90 | 13,08 b |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,0015 | 0,1001 | 0,7971 | 0,9111 | 0,0149 |
| Cultivares | | | | | |
| IAC Imperador | 2,98 | 4,25 a | 1,27 | 2,33 | 13,77 b |
| TAA Dama | 2,21 | 3,51 b | 1,20 | 3,56 | 15,22 a |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,1980 | 0,0054 | 0,6051 | 0,0984 | 0,0475 |
| T x C | * | * | n.s. | n.s. | n.s. |

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. n.s. Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.

No desdobramento apresentado é possível observar que na cultivar IAC Imperador, a inoculação com ambas as estirpes de *B. subtilis* (AP-3 e AP-12) promoveu maior crescimento da biomassa na parte aérea, quando comparadas ao controle, sem a inoculação de bactérias. Na cultivar TAA Dama, não foi detectado este efeito. Comparando-se as cultivares, a cultivar IAC Imperador proporcionou maior resposta a inoculação das bactérias (Figura 5).

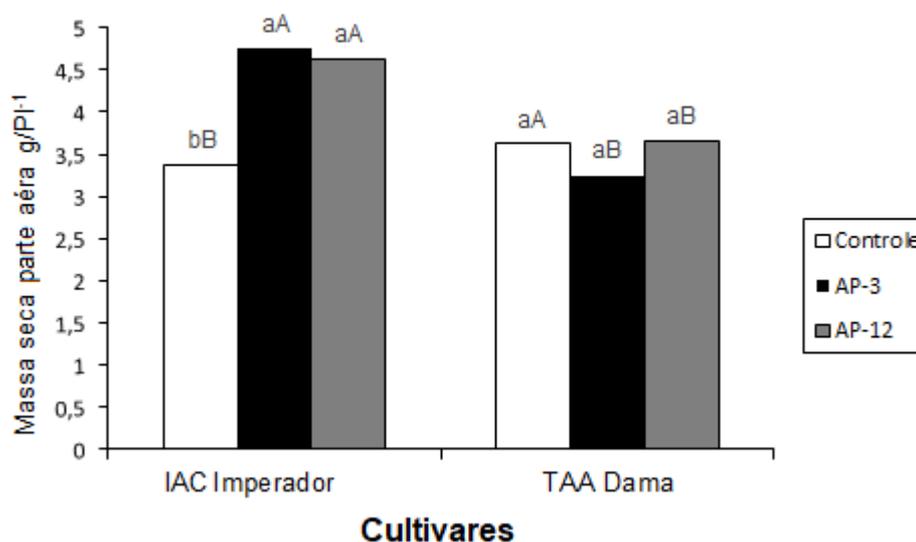


Figura 5. Massa seca da parte aérea de plantas com a inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) de dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo. Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar. Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tratamento.

Ocorreu maior colonização bacteriana na rizosfera da cultivar IAC Imperador com aumento na ordem de cinco vezes da concentração, quando foi inoculado com a estirpe AP-3 de *B. subtilis* em comparação ao controle. No genótipo TAA Dama, a inoculação com a estirpe AP-12 proporcionou aumento significativo da colonização bacteriana em relação ao controle. Comparando-se o desempenho das duas cultivares quanto à presença das rizobactérias no sistema radicular, verifica-se que a cultivar IAC Imperador apresentou-se como mais responsiva a essa colonização (Figura 6).

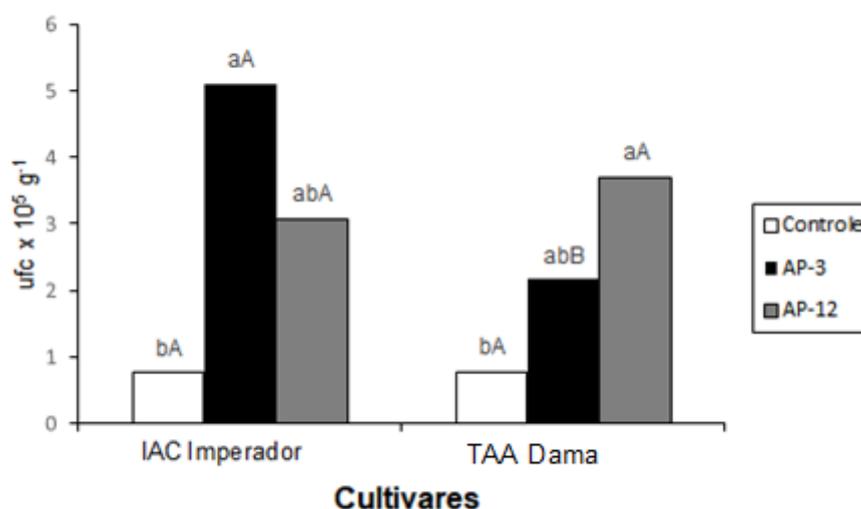


Figura 6. Colonização do sistema radicular por *Bacillus* sp. em plantas de dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo. Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar. Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tratamento.

O número de botões florais em 0h de estresse não diferiu entre os tratamentos avaliados, apenas entre as cultivares, sendo maior na cultivar TAA Dama. Ambas as estirpes de *B. subtilis* promoveram aumento no número de botões florais em 240h de estresse térmico na cultivar TAA Dama (Tabela 3).

No desdobramento estatístico sobre o florescimento pode ser verificado que na cultivar IAC Imperador houve redução do abortamento nos tratamentos com inoculação de *B. subtilis* (Figura 7). A estirpe AP-3 aumentou o número de botões florais no final do experimento e o número de vagens por planta ao final do experimento na cultivar IAC Imperador (Figuras 8 e 9).

Tabela 3. Avaliação de florescimento, porcentagem de abortamento de flores (%) e formação de vagens, em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) de dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

| Tratamentos | Nº de botões florais | Porcentagem de Abortamento | Nº de botões florais | Nº de botões florais ao final do experimento | Nº de vagens ao final do experimento |
|---------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|
| | Antes do estresse | Com 4 dias em estresse | Com 10 dias em estresse | Aos 55 (DAE) | Aos 55 (DAE) |
| Controle | 8,30 | 14,1 a | 14,3 b | 10,33 b | 1,41 a |
| <i>B.s.</i> (AP-3) | 10,30 | 9,91ab | 18,0 a | 14,58 a | 2,16 a |
| <i>B.s.</i> (AP-12) | 8,70 | 5,07 b | 18,8 a | 11,16 ab | 2,33 a |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,184 | 0,012 | 0,011 | 0,046 | 0,04 |
| Cultivares | | | | | |
| IAC Imperador | 6,20 b | 0,11a | 11,3 b | 6,66 b | 3,94 a |
| TAA Dama | 12,0 a | 0,7 a | 22,8 a | 17,38 a | (*) |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,000 | 0,07 | 0,0001 | 0,000 | 0,0000 |
| T x C | n.s. | ** | ns | * | * |

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. n.s. Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras iguais entre linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Obs: (*) Nº de vagens ao final do ciclo referente à cultivar TAA Dama não foi avaliado devido ao ciclo de vida mais longo da cultivar.

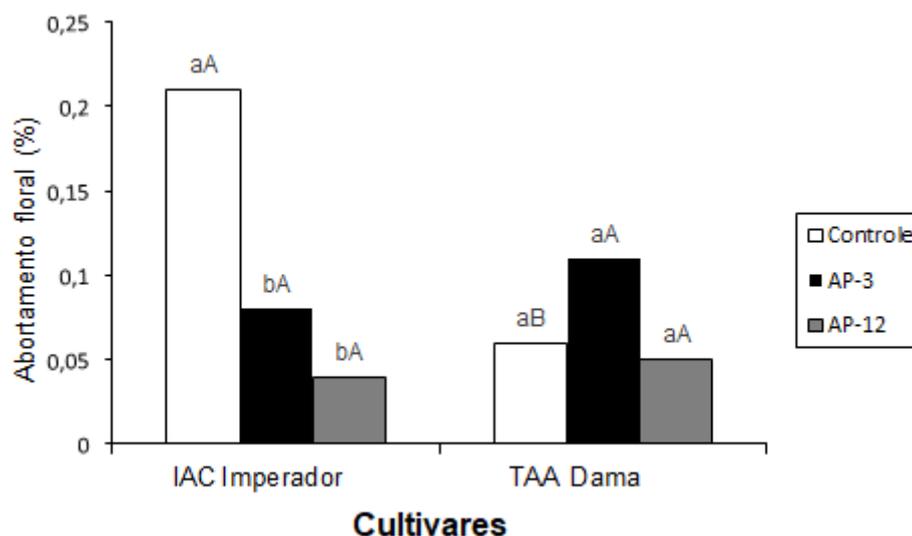


Figura 7. Porcentagem de abortamento floral em 96h de estresse térmico em plantas inoculadas com *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois genótipos de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar. Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tratamento.

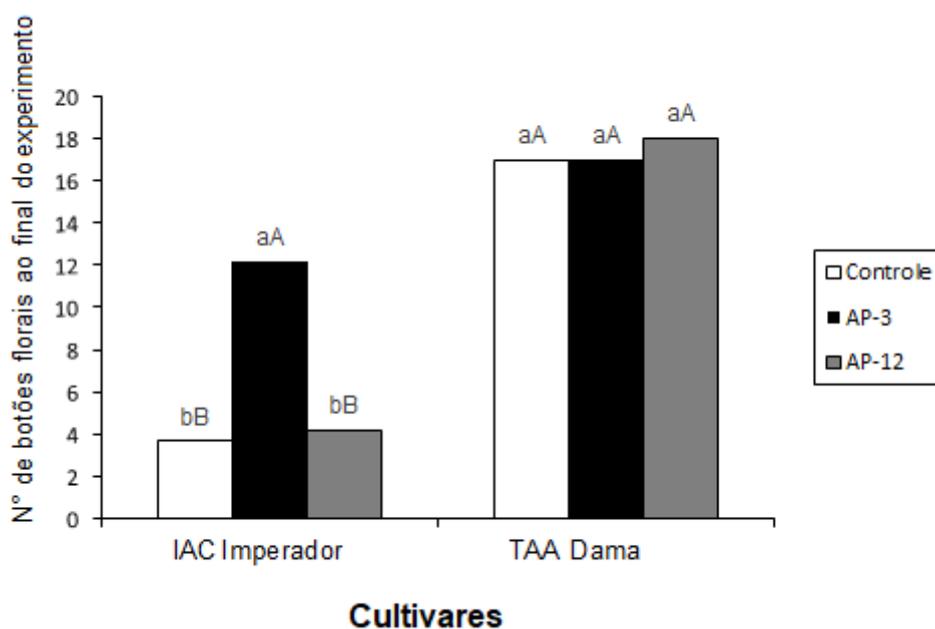


Figura 8. Número de botões florais ao final do experimento em plantas inoculadas com *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois genótipos de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar. Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tratamento.

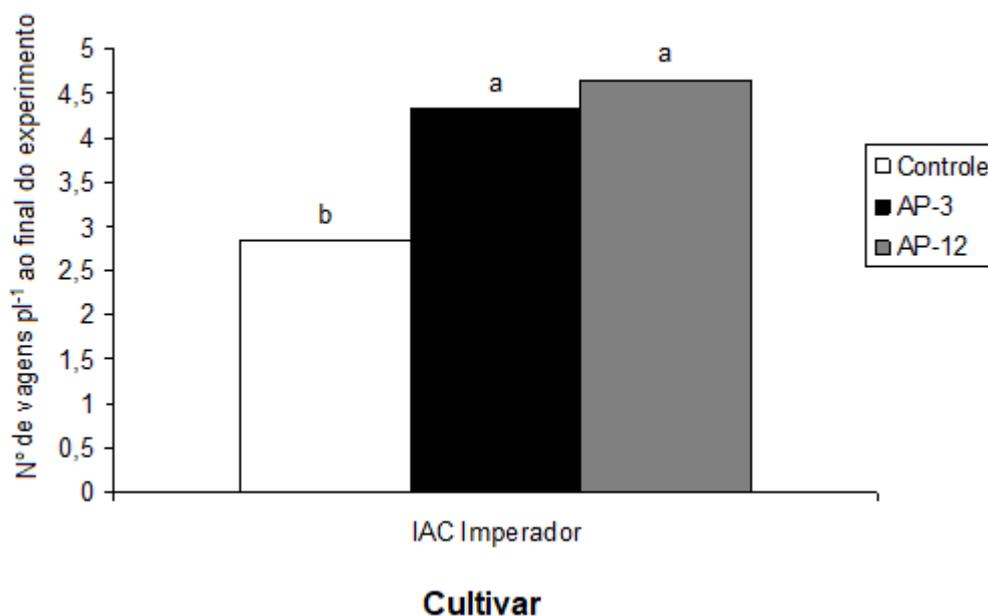


Figura 9. Número de vagens ao final do experimento em plantas com a inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) no feijoeiro IAC Imperador exposto ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar.

A inoculação do feijoeiro com *B. subtilis* promoveu maior produção de massa seca de parte aérea no cultivar IAC Imperador (Tabela 2), demonstrando que aconteceu maior interação das estirpes de *B. subtilis* com esse genótipo. A capacidade de promoção de crescimento de plantas por algumas bactérias pode ser altamente específica para certas espécies de plantas, variedades, cultivares e genótipos (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Essa promoção de crescimento tem sido atribuída em parte à atenuação de estresses abióticos (KANG; LI; GUO, 2014a), regulação de mecanismos de defesa (ABDALLAH *et al.*, 2017), controle de fitopatógenos (MAZZUCHELLI; MAZZUCHELLI; ARAUJO, 2020), e também ao fato de que a bactéria sintetiza hormônios como auxínas (ARAÚJO *et al.*, 2005) e giberelinas (HOLL *et al.*, 1988) que promovem o crescimento da parte aérea das plantas. Esses efeitos benéficos podem resultar em consequências diretas no aumento da biomassa das plantas como observado neste trabalho, onde houve um aumento significativo com a inoculação de *B. subtilis* AP-3 e AP-12, em relação ao controle sem inoculação. Efeito similar foi visto em um estudo, em que observando os efeitos da inoculação utilizando essa rizobactéria em feijoeiro, houve acréscimos significativos na massa seca e massa fresca de parte aérea (CERQUEIRA *et al.*, 2015).

A cultivar TAA Dama apresentou maior número de trifólios em relação à cultivar IAC Imperador. Isso pode ter ocorrido devido às características como precocidade e hábito de crescimento das cultivares. Cultivares com hábito de crescimento indeterminado, à exemplo da cultivar TAA Dama, apresentam desenvolvimento vegetativo durante o seu estágio reprodutivo, ou seja, sobreposição das fases de desenvolvimento (BEZERRA *et al.*, 2009), isso demonstra que ela continua emitindo folhas nos ramos laterais, após o florescimento. Levando em consideração que as condições edafoclimáticas foram iguais para as duas cultivares, pode-se afirmar que a diferença entre estádios para atingir o índice de área foliar máximo foi inteiramente dependente de fatores genotípicos (GONZALEZ *et al.*, 2010).

O aumento da colonização radicular no feijoeiro por bactérias do gênero *Bacillus* spp. verificadas no estudo, mostra que houve maior interação nos tratamentos com a inoculação de *B. subtilis* AP-3 na cultivar IAC Imperador e da estirpe AP-12 na cultivar TAA Dama. A colonização bacteriana da rizosfera é

estimulada pela maior emissão de exsudatos radiculares por parte do hospedeiro, o que estimula o aumento da colonização da rizosfera pela microbiota do solo (QIAO *et al.*, 2017). A interação da planta com determinado isolado verificado nesse estudo reforça o fato de que existe especificidade para produção de exsudatos radiculares por parte do hospedeiro, dependendo do isolado bacteriano utilizado (JIMÉNES *et al.*, 2003). O aumento da colonização demonstrada neste estudo também reforça que a presença da bactéria na rizosfera pode ter contribuído para esse aumento na comunidade de *Bacillus* spp. na raiz e que não houve incompatibilidade mútua entre os simbiossitos (ALBAREDA *et al.*, 2006). Qiao *et al.* (2017) concluíram que a inoculação de *B. subtilis* tem efeito transitório na composição do microbioma da rizosfera com aumento repentino de células de *Bacillus* após a inoculação, que dura poucas semanas, e que logo é compensada pela recomposição da comunidade microbiana nativa. Foi estimado em inoculação de *Bacillus* em soja que a colonização radicular da bactéria na primeira semana era da ordem de 10^7 por g de raiz e na quarta semana reduziu para ordem de 10^5 (MENDIS *et al.*, 2018). Neste estudo, para a cultivar IAC Imperador foram encontrados valores na ordem de 10^5 bactérias por grama de raiz na avaliação com 55 dias (DAE).

O estresse térmico aplicado no estágio reprodutivo na cultivar de feijoeiro-comum IAC Imperador resultou em maior porcentagem de abortamento de flores nas plantas controle (Figura 7). O abortamento de flores e vagens pequenas geralmente é alto no feijoeiro (SILVEIRA; CASTRO; STONE, 1980) e isso ocorre para regular o fornecimento de fotoassimilados com a sua demanda (BINNIE; CLIFFORD, 1999). No entanto, em condições de estresse térmico, os efeitos da elevação da temperatura, aceleram a produção de etileno aumentando a taxa de abortamento de flores e danificando a viabilidade do pólen (MARKING, 1986). Isto conseqüentemente reduz o número de botões florais e a produção de vagens ao final do ciclo (Figuras 8 e 9), reduções essas que foram mais acentuadas no tratamento controle. O estresse térmico é considerado um dos principais fatores que afetam negativamente a produção agrícola. As altas temperaturas reduzem o crescimento das plantas, bem como o número de botões florais, flores e sementes por vagem (WHEELER; BRAUN, 2013). Em estudo com imposição de estresse térmico em cultivares de feijoeiro Silva *et al.* (2020) verificaram que as altas temperaturas proporcionaram reduções de 42% na produção de flores, 26% no

número de vagens, 38% no número de sementes. Foi verificado no presente estudo que ocorreu abortamento de 14% de flores, na média, e 21% na cultivar IAC Imperador, após o quarto dia de estresse térmico nas plantas. (Tabela 3) (Figura 7).

Observou-se que apenas a cultivar IAC Imperador apresentou vagens ao final do ciclo, isso pode estar atrelado às características genotípicas de cada cultivar, sendo cultivar IAC Imperador (Tipo I) e a cultivar TAA Dama (Tipo III). O hábito de crescimento da planta, os dias para alcançar a maturação e o tamanho do grão, são particularidades intrínsecas de cada cultivar de feijoeiro sendo responsáveis por diferenças no potencial de produção (SINGH, 1992).

Porch *et al.* (2010), observaram que temperaturas médias diárias máximas acima de 30 ° C e temperaturas noturnas acima de 20 ° C podem afetar significativamente a produção de feijão nos trópicos, resultando em abortamento excessivo de botões, flores e vagens. A inoculação do feijoeiro com *B. subtilis* pode atenuar os efeitos do estresse térmico no período reprodutivo, pois foi verificada a redução no abortamento de flores e aumento do número de vagens por plantas, na cultivar IAC Imperador (Figuras 7 e 9). Recentemente este cultivar também foi relatado entre os cultivares de melhor desempenho de crescimento em condição de estresse térmico (SILVA *et al.*, 2020).

5.2 Avaliações bioquímicas

O índice de clorofila mensurada antes, durante e após a exposição das plantas à alta temperatura, não apresentou alterações significativas entre os tratamentos (Tabela 4). No entanto, em relação aos genótipos, as plantas da cultivar TAA Dama apresentaram maior índice de clorofila durante os três períodos de avaliação. A interação entre tratamentos e cultivares foi observada apenas na medição realizada durante o estresse térmico (Figura 10).

Tabela 4. Avaliação do índice de clorofila em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

| Tratamentos | Clorofila | Clorofila | Clorofila |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | Antes do estresse (ICF) | Durante o estresse (ICF) | Após o estresse (ICF) |
| Controle | 42,63 | 39,70 | 43,98 |
| <i>B.s.</i> (AP-3) | 42,02 | 40,75 | 41,95 |
| <i>B.s.</i> (AP-12) | 42,92 | 41,83 | 44,15 |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,6705 | 0,0630 | 0,1837 |
| Cultivares | | | |
| IAC Imperador | 40,43 b | 36,67 b | 41,73 b |
| TAA Dama | 44,62 a | 44,85 a | 44,90 a |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,0000 | 0,0000 | 0,048 |
| T x C | n.s | ** | n.s |

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. n.s. Não significativo a 0,05% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Na cultivar TAA Dama, verificou-se que a inoculação com as estirpes AP-3 e AP-12 de *B. subtilis* resultou em maior índice de clorofila foliar durante o estresse térmico quando comparados ao controle (Figura 10). Na comparação efetuada entre as duas cultivares, percebe-se que as plantas da cultivar TAA Dama apresentaram maiores índices de clorofila durante o período de estresse em todos os tratamentos.

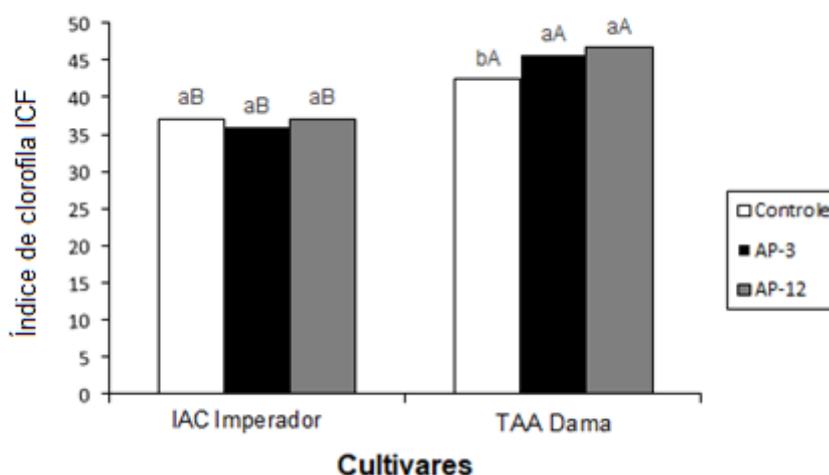


Figura 10. Índice de clorofila em plantas durante o estresse térmico em dois cultivares de feijoeiros com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo. Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar. Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tratamento.

A concentração de prolina nas folhas, antes e durante o aumento de temperatura não foi alterada pelos tratamentos. Contudo, verificou-se um aumento de sua concentração nas plantas da cultivar IAC Imperador inoculadas com a estirpe AP-3, após o período de estresse térmico (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação da concentração de prolina em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) em dois cultivares de feijoeiros expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

| Tratamentos | Prolina | | |
|---------------------|---|--|---|
| | Antes do estresse ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{MF}$) | Durante o estresse ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{MF}$) | Após o estresse ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{MF}$) |
| Controle | 1,94 | 1,75 | 2,39 b |
| <i>B.s.</i> (AP-3) | 1,88 | 2,04 | 4,63 a |
| <i>B.s.</i> (AP-12) | 2,93 | 1,50 | 3,39 ab |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,1482 | 0,3020 | 0,027 |
| Cultivares | | | |
| IAC Imperador | 2,59 | 1,57 | 4,17 a |
| TAA Dama | 1,91 | 1,95 | 2,78 b |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,1598 | 0,1837 | 0,036 |
| T x C | n.s | n.s | n.s |

n.s. Não significativo a 0,05% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Observou-se um aumento na atividade da Guaiacol peroxidase nas folhas do feijoeiro durante e após o aumento de temperatura. Entretanto, nos tratamentos inoculados com *B. subtilis*, verificou-se que durante o estresse a atividade da peroxidase aumentou em comparação ao controle (Tabela 6).

Quando mensurada após o final do período sob altas temperaturas, o desempenho catalítico da Guaiacol peroxidase apresentou interação entre os tratamentos e as cultivares (Figura 11). Foi detectado aumento significativo da atividade enzimática na cultivar IAC Imperador inoculada com a estirpe AP-3, no período após o estresse térmico.

Tabela 6. Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (GPX) em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12), em dois cultivares de feijoeiro expostos ao aumento de temperatura no estágio reprodutivo.

| Tratamentos | GPX | GPX | GPX |
|---------------------|---|--|---|
| | Antes do estresse ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) | Durante o estresse ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) | Após o estresse ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) |
| Controle | 0,005 | 0,030 b | 0,031 b |
| <i>B.s.</i> (AP-3) | 0,008 | 0,047 a | 0,050 a |
| <i>B.s.</i> (AP-12) | 0,010 | 0,043 a | 0,029 b |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,1740 | 0,0099 | 0,0101 |
| Cultivares | | | |
| IAC Imperador | 0,003 b | 0,035 b | 0,040 |
| TAA Dama | 0,012 a | 0,045 a | 0,033 |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,0007 | 0,0212 | 0,2567 |
| T x C | n.s | n.s | * |

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. n.s. Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.

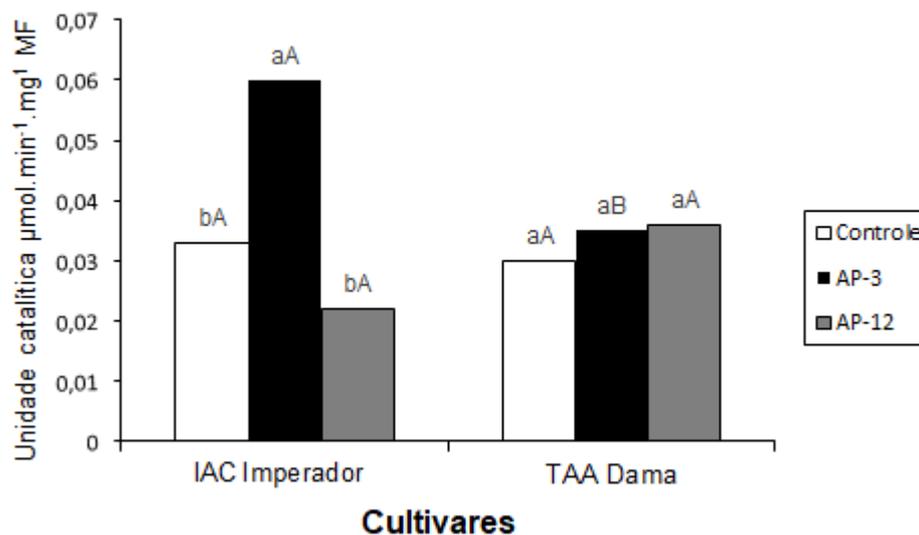


Figura 11. Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase (GPX) em plantas após o período de estresse térmico em dois cultivares de feijoeiros com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) expostos à elevação de temperatura no período reprodutivo. Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar. Letras maiúsculas comparam as cultivares dentro de cada tratamento.

Quanto à avaliação do etileno em discos foliares do feijoeiro, verifica-se que antes do aumento de temperatura, o tratamento controle apresentava os maiores valores de produção de etileno foliar. Durante o estresse verificou-se interação entre tratamentos e as cultivares (Figura 12). Já na avaliação após o estresse, não foi detectada a produção de etileno em nenhum dos tratamentos, fato este que pode ter ocorrido devido a algum problema com a seringa injetora. Na avaliação entre cultivares, verificou-se maior volume de etileno na cultivar IAC Imperador (Tabela 7). Na avaliação do efeito das estirpes de *B. subtilis* dentro de cada cultivar durante o estresse, verifica-se que a estirpe AP-3 apresentou o maior volume de etileno em ambas as cultivares (Figura 12).

Tabela 7. Avaliação de etileno em plantas com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12), em dois cultivares de feijoeiros expostos à elevação de temperatura no estágio reprodutivo.

| Tratamentos | Etileno | Etileno | Etileno |
|---------------------|--|---|--|
| | Antes do estresse (nmol.g.h ⁻¹) | Durante o estresse (nmol.g.h ⁻¹) | Após o estresse (nmol.g.h ⁻¹) |
| Controle | 0,188 a | 0,020 c | (*) |
| <i>B.s.</i> (AP-3) | 0,097 b | 0,108 a | - |
| <i>B.s.</i> (AP-12) | 0,129 ab | 0,056 b | - |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,0111 | 0,0001 | - |
| Cultivares | | | |
| IAC Imperador | 0,169 | 0,084 a | - |
| TAA Dama | 0,107 | 0,039 b | - |
| <i>Pr>Fc</i> | 0,0111 | 0,0007 | - |
| T x C | n.s | * | - |

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. n.s. Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey. Obs: (*) Não foi detectado emissão do gás etileno durante a quantificação das amostras.

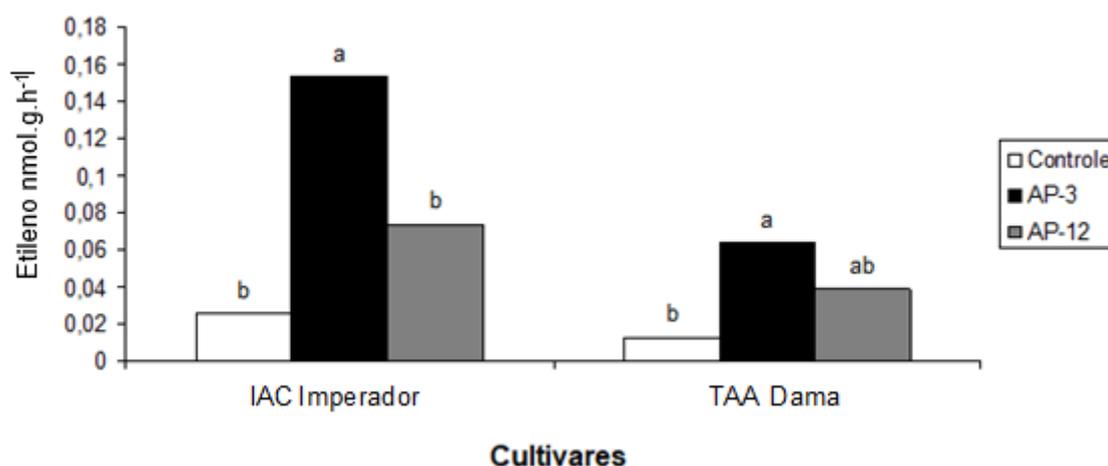


Figura 12. Produção de etileno em dois cultivares de feijoeiro com inoculação de *Bacillus subtilis* (AP-3 e AP-12) durante a elevação de temperatura no período reprodutivo. Letras minúsculas comparam os tratamentos entre si dentro de cada cultivar.

A inoculação com os isolados de *B. subtilis* AP-3 e AP-12 ocasionou aumento no índice de clorofila da cultivar TAA Dama durante o estresse térmico, em relação ao controle. Em compensação, na cultivar IAC Imperador os tratamentos não diferiram entre si (Figura 10). A temperatura influencia diretamente no metabolismo do vegetal, modificando a velocidade das reações químicas e das atividades

enzimáticas (TAIZ; ZEIGER, 2013). A síntese de clorofila nos vegetais é reduzida, ou seja, impedida quando o mesmo é submetido a uma temperatura elevada, considerando que a membrana do tilacóide apresenta sensibilidade a esse fator (RISTIC; BUKOVNIK; PRASAD, 2007).

O aumento no índice de clorofila é um efeito mitigatório de rizobactérias contra efeitos abióticos como a seca e salinização, conforme observado em estudos com canola e soja (KANG *et al.*, 2014b). Segundo López *et al.* (2014), o conteúdo de clorofila foliar também está diretamente relacionado com o acúmulo de nitrogênio na planta, sendo assim, as bactérias promotoras do crescimento de plantas podem potencializar a elevação da clorofila nas folhas (PINDI; SULTANA; VOOTLA, 2014), pois foi verificado que bactérias do gênero *Bacillus* spp. são capazes de melhorar a condição nutricional da planta, através da disponibilização do N assimilável no solo (LOON, 2007).

Na avaliação da concentração de prolina na cultivar IAC Imperador mensurada após o estresse, verificou-se maior concentração do aminoácido em relação a cultivar TAA Dama (Tabela 5). O aumento na concentração de prolina, após o estresse no feijoeiro, inoculado com *B. subtilis* AP-3, mostrou que esse aminoácido tem papel importante nos eventos de estresse na planta. Diversos mecanismos de proteção são ativados nas plantas como resposta à exposição a condições limitantes de cultivo, entre eles, o regulamento osmótico, considerado como um dos mais relevantes para a conservação do turgor celular que acontece em função do acúmulo de substâncias como a prolina (MONTEIRO *et al.*, 2014). A prolina é considerada atualmente, como um potente antioxidante e inibidor potencial da peroxidação lipídica, além de agir na osmorregulação e na estabilidade das proteínas (GILL; TUTEJA, 2010). Segundo os autores, a submissão a condições adversas induz o acúmulo de prolina livre na planta, por meio da elevação da síntese ou inibição da degradação, o que pode favorecer a tolerância a vários estresses abióticos (GILL; TUTEJA, 2010).

De acordo com Ashraf e Foolad (2007), o acúmulo de prolina em várias espécies de plantas sob estresse tem sido associada à tolerância do vegetal, e sua concentração é comumente mais elevada em plantas tolerantes do que em plantas com sensibilidade a determinada situação de estresse. O acúmulo de prolina nas plantas tem sido frequentemente associado a resposta da planta como proteção ao

efeito de estresses ambientais (SINGH *et al.*, 2014). Fato este que foi observado na cultivar IAC Imperador, quando inoculada com *B. subtilis* AP-3 (Tabela 5), com aumento dessa tolerância ao estresse térmico.

O estresse térmico estimula as enzimas reguladoras de espécies de oxigênio ativas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PRX) e vários antioxidantes (ERIC *et al.*, 2006).

Em relação à análise da atividade enzimática da Guaiacol peroxidase nas folhas do feijoeiro, esse estudo revelou que a atividade antioxidante durante o estresse, aumentou na presença das espécies bacterianas AP-3 e AP-12, em relação ao controle (Tabela 6), e após o estresse o tratamento AP-3 resultou em maior atividade catalítica dessa enzima (Figura 11). Inúmeras funções fisiológicas das peroxidases em plantas foram descritas, como remoção de H₂O₂, oxidação de redutores tóxicos, catabolismo de auxínicas, reações defensivas a ferimentos, defesa contra ataques de patógenos ou insetos, e alguns processos respiratórios (GASPAR *et al.*, 1982). Mas, especificamente, a enzima peroxidase tem sido associada ao surgimento de lesões fisiológicas provocadas nas plantas pelo estresse, e o aumento de sua atividade, pelo estresse de alta temperatura (MAZORRA *et al.*, 2002).

Em um estudo avaliando os efeitos da inoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas na atividade antioxidante do feijão, Stefan, Munteanu e Mihasan (2013), observaram o aumento da peroxidase em plantas inoculadas. Heidari e Golpayegani (2012) avaliando diferentes níveis de estresse hídrico em plantas de manjeriço inoculado com *Pseudomonas* spp., *Bacillus lentus* e *Azospirillum brasiliense*, notaram o aumento da atividade enzimática da Guaiacol peroxidase.

O aumento de temperatura nas plantas de feijão provavelmente ocasionou um acúmulo de ERO's no conteúdo celular, e a inoculação de *Bacillus subtilis* AP3 e AP-12 pode ter estimulado a planta a sintetizar a enzima, o que resultou em maior atividade antioxidante e acúmulo de peroxidase nos tratamentos.

A alta temperatura altera a produção de etileno de modo divergente em diferentes espécies vegetais. Por exemplo, o estresse térmico ressaltou a produção sistêmica de etileno em hipocótilos de soja (HAYS *et al.*, 2007), mas apresentou um decréscimo em folhas de trigo (ARSHAD; FRANKENBERGER; JOHN, 2002).

A maioria dos estudos sobre esse assunto foi realizado nos estádios iniciais do desenvolvimento das culturas (isto é, estádios de plântulas), no entanto, o impacto do estresse térmico elevado durante os estádios reprodutivos do desenvolvimento das culturas não é claramente compreendido nas culturas de grãos (DJANAGUIRAMAN; PRASAD, 2010). Ferreira (2017), avaliando a fisiologia e morfologia de plantas de feijão sob deficiência hídrica, observou aumento na produção de etileno em plantas controle da cultivar Imperador, superior às plantas com déficit hídrico.

Espécies bacterianas sintetizadoras de ACC deaminase podem, em parte, aliviar o impacto negativo ocasionado pelo etileno resultante do estresse nas plantas (GLICK, 2005). Neste trabalho, verificamos que a inoculação com *B. subtilis* AP-3 e AP-12, promoveu o acúmulo de massa seca da parte aérea, produção de vagens por planta, desenvolvimento de botões florais ao final do experimento, aumento no índice de clorofila, maior atividade da enzima antioxidante nas células, e redução do abortamento floral na cultivar IAC Imperador. No entanto, na avaliação de concentração de etileno, observou-se que as plantas controle apresentavam valores mais altos de etileno antes do estresse, mas durante o período de estresse, os tratamentos inoculados com as estirpes bacterianas, apresentaram valores mais elevados do hormônio quando comparados ao controle (Figura 12).

Este fato inesperado pode estimular novos estudos que investiguem como ocorre o modo de ação das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e sintetizadoras de ACC deaminase de acordo com Glick, Penrose e Li (1998), em condições de estresse térmico. A atividade biológica das rizobactérias pode estar relacionada às quantidades relativas de ACC deaminase e ACC oxidase presentes no organismo vegetal. Para que as RPCP possam reduzir os níveis de etileno na planta, o nível de ACC deaminase bacteriano deve ser pelo menos de 100 a 1000 vezes maior que o nível de ACC oxidase da planta (GLICK; PENROSE; LI, 1998).

Por outro lado, as condições de estresse em plantas conduzidas à campo, são diferentes das conduzidas em condições controladas, cultivadas em vasos, o que leva a resultados contrastantes na literatura (NARAYANA; LALONDE; SAINI, 1991). Esses autores também observaram que plantas de trigo sob déficit hídrico produziram menos etileno do que as plantas controle.

5.3 Avaliação da diversidade genética de isolados de *Bacillus* spp.

A análise filogenética empregada para verificar a variabilidade genética entre os isolados de *Bacillus* mostrou que houve maior similaridade entre os isolados bacterianos na cultivar IAC Imperador (Figura 13). Encontrou-se nessa cultivar que 86% dos isolados tiveram 99% de similaridade, enquanto que na cultivar TAA Dama essa similaridade foi de 70%. Com relação à semelhança genética com a espécie *B. subtilis* foi verificado que 40% dos isolados da cultivar IAC Imperador se alinharam geneticamente com essa espécie. Pelo dendrograma apresentado podemos também afirmar que houve maior diversidade genética nos isolados provenientes da rizosfera da cultivar TAA Dama.

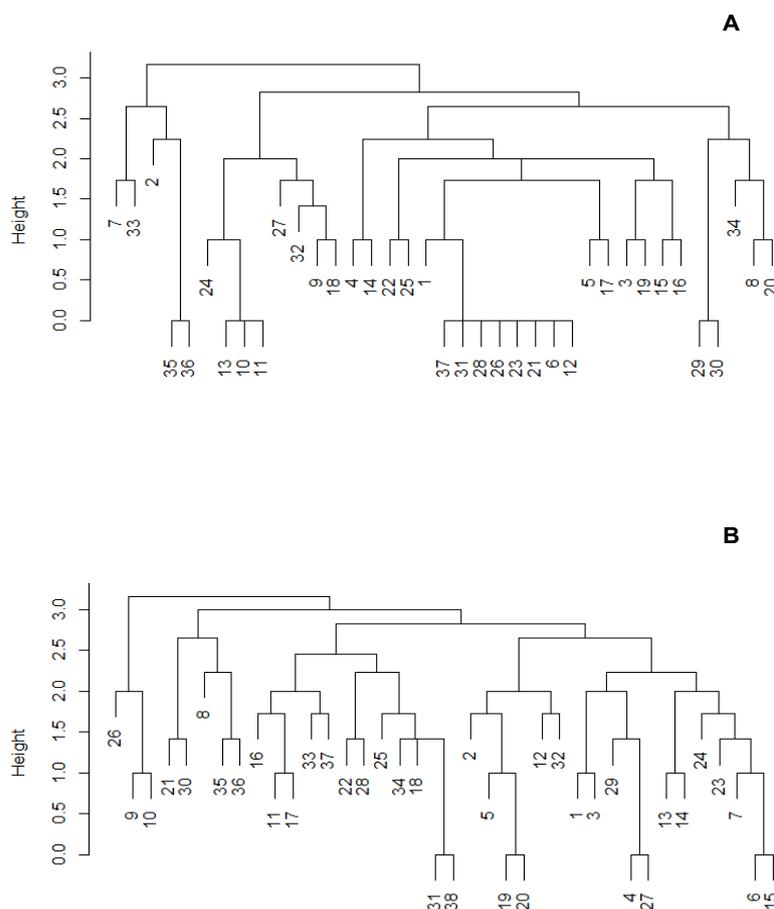


Figura 13. Dendrograma de isolados de *Bacillus* spp. obtidos com BOX A1R. (A) Cultivar IAC Imperador; (B) Cultivar TAA Dama. Códigos: 1 a 24 - Tratamentos inoculados com *B. Subtilis*; 25 a 36 – Não inoculados; 37- *B. Subtilis*. Os níveis de similaridade são indicados pelos eixos ao lado dos dendrogramas. A similaridade "0.0" indica 100% de identidade entre os isolados.

Ferramentas como Box-PCR são úteis para separar isolados nativos de *Bacillus* spp. em grupos distintos, o que não seria possível apenas com a análise da região do gene 16S rRNA (SOLANKI *et al.*, 2012). Com o uso dessa técnica verificou-se que houve o efeito do genótipo hospedeiro na atração de grupos diferentes de isolados de *Bacillus* spp. para a rizosfera (Figura 13). Bulgarelli *et al.* (2013) observaram que o genótipo hospedeiro é responsável por aproximadamente 5,7% da variação na composição do microbioma da rizosfera. Nesse estudo, foi encontrada uma variação inferior a 3% na variabilidade de *Bacillus* spp. comparando-se as duas cultivares de feijoeiro. Sabe-se também que os isolados bacterianos no solo sofrem com frequência mutação e recombinação o que proporciona variações genéticas (OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000) que podem ser detectadas através de métodos de avaliação de DNA, como o PCR utilizado nesse estudo.

O gênero *Bacillus* não tem impacto duradouro nas bactérias que vivem nas proximidades das raízes das plantas, sendo presumido que o efeito transitório de *Bacillus subtilis* (PTS-394) na composição do microbioma da rizosfera é causado por um aumento repentino de células de *Bacillus* após a inoculação, que logo é compensada pela comunidade microbiana nativa (QIAO *et al.*, 2017). Já foi comprovado que a inoculação de um determinado isolado de *Bacillus* spp. estimula as plantas a produzirem exsudatos radiculares como ácido málico e cítrico que atraem outros isolados de *Bacillus* presentes no solo (ZHANG *et al.*, 2011).

5.4 Avaliação espectral em plantas

A partir das curvas espectrais médias (Figura 14) percebe-se que houve um aumento na refletância de ambas as regiões do visível e do infravermelho durante o estresse e após o estresse térmico. Ambos os feijoeiros TAA Dama e IAC Imperador iniciaram com comportamentos espectrais parecidos na primeira medição.

Outra observação importante é de que, durante o estresse, ambos os feijoeiros apresentaram comportamentos semelhantes, sendo que o tratamento com *B. subtilis* AP-3 resultou em menor refletância do que o controle ou *B. subtilis* AP-12. Uma alteração interessante pode ser observada na região do vermelho (de 600 a 700 nm), na qual o estresse provocou um aumento de refletância, reduzindo a diferença com a região do verde (de 500 a 600 nm) e garantindo um aspecto mais amarelado à folha.

Por último, após o estresse, nota-se que o comportamento espectral da cultivar TAA Dama foi semelhante para *B. subtilis* AP-3 e o controle, e para o IAC Imperador o controle apresentou maior refletância. Nesse mesmo período, a cultivar TAA Dama exibiu maior refletância, sobretudo no infravermelho próximo, do que o genótipo IAC Imperador, enquanto ambas apresentaram comportamentos semelhantes na região do visível.

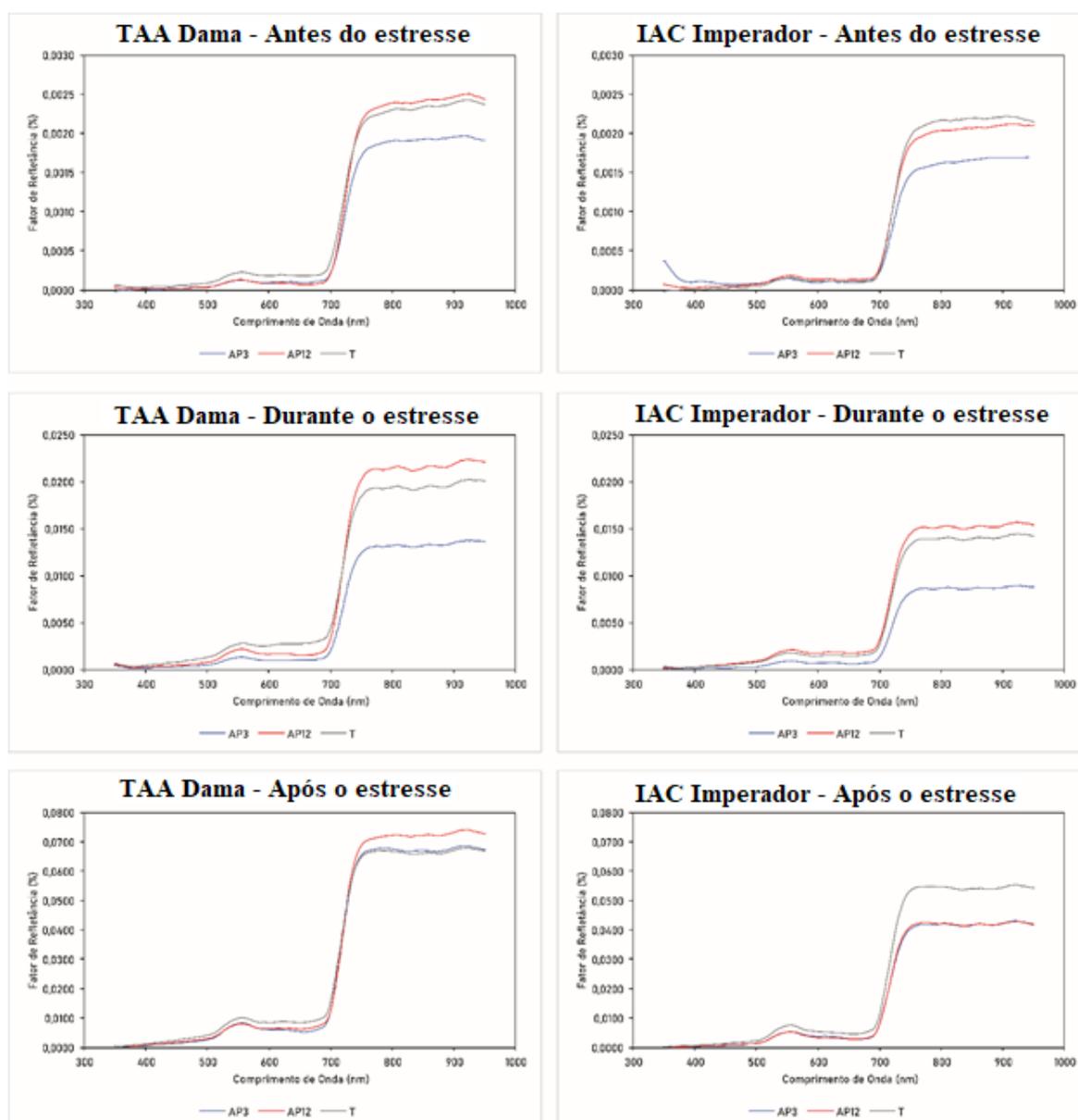


Figura 14. Comportamento espectral dos feijoeiros, submetidos à diferentes tratamentos, antes durante e após o estresse.

Em um estudo realizado com os dados espectrais obtidos por meio deste estudo, foram encontradas regiões espectrais que melhor explicavam a resposta ao estresse térmico a partir das curvas medidas (Figura 15). A partir dessa definição, destacaram-se duas zonas de importância, uma na região do verde (530 a 570 nm) e outra na região da borda do vermelho (700 a 710 nm). Por essa razão foi calculado um índice espectral a partir da razão entre as bandas centrais dessas duas regiões (705 e 550 nm) (Figura 16).

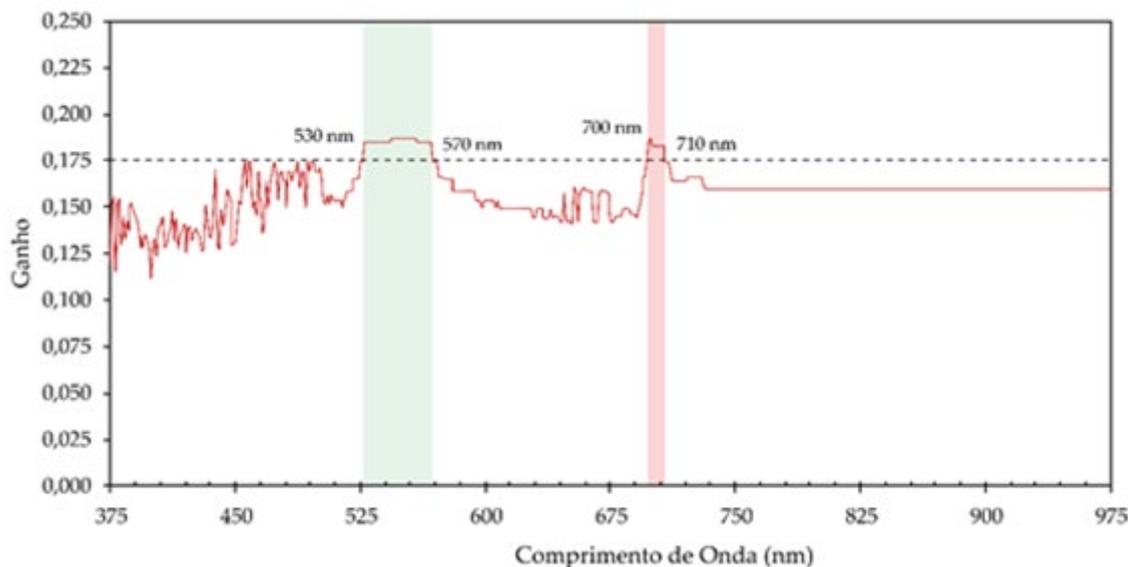


Figura 15. Ganho por comprimento de onda em classificação realizada por algoritmos de aprendizagem de máquina.

Utilizando-se a relação entre as duas bandas (705 e 550 nm) verificou-se pela avaliação desse índice espectral de vegetação no feijoeiro maiores valores nas plantas controle (Figura 16). Observa-se também que os índices aumentaram durante e após o estresse térmico. O índice calculado indica que quanto maior o valor, maior a resposta do tratamento ao estresse térmico.

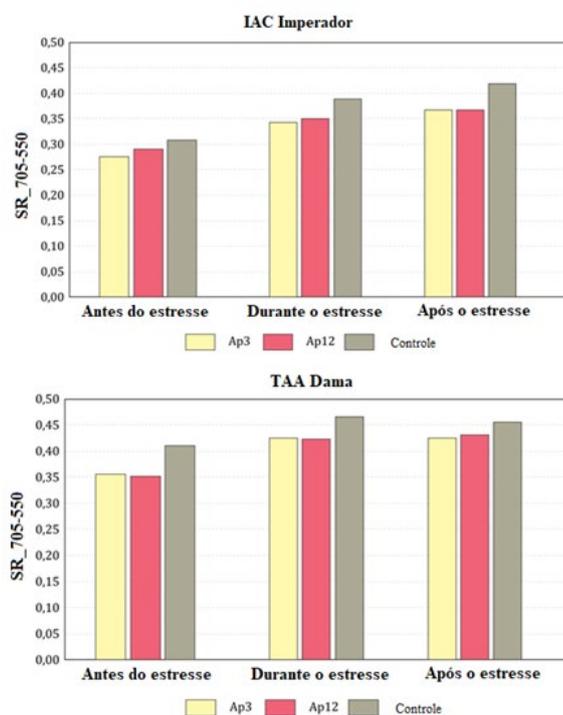


Figura 16. Índice espectral de vegetação em duas cultivares de feijoeiro antes, durante e após o período de estresse térmico em função da inoculação de *B. subtilis* (AP-3 e AP-12).

Os índices espectrais de vegetação possuem correlação com muitos dos parâmetros fotossintéticos (BALLESTER *et al.*, 2019). Em plantas sob estresse a refletância pode ser alterada e geralmente tem sido medida na região da borda do vermelho. Estudos experimentais mostram que o perfil de refletância nessa região muda de acordo com mudanças no conteúdo de clorofila. Quando as plantas estão saudáveis apresentam alto teor de clorofila atingindo comprimentos de onda maiores. Quando as plantas sofrem de doença ou estresse, o teor de clorofila diminui e a região da borda do vermelho atinge comprimentos de onda mais curtos (BALLESTER *et al.*, 2019). Pela assinatura espectral encontrada no cultivar IAC Imperador durante o estresse, observa-se que os tratamentos com inoculação da estirpe de *B. subtilis* AP-3 apresentaram a região da borda de vermelho em comprimentos de ondas maiores, podendo estar mais saudáveis (Figura 14). Este fato também foi observado na cultivar TAA Dama, porém em menor expressão.

A relação da refletância da região da borda de vermelho (705nm) com a região da refletância fotoquímica (550nm) pode indicar também uma condição de anormalidade na refletância foliar, ou também, ser utilizado como um índice para avaliação de estresse térmico em plantas (JIANG *et al.*, 2019). Nesses casos, os valores mais baixos encontrados no índice baseado nessa relação (705nm/550nm) seriam esperados para uma condição de menor estresse (IHUOMA; MADRAMOOTOO, 2019). Desta forma, por meio do comportamento espectral, foi evidenciado que a inoculação do feijoeiro com *B. subtilis* reduziu o estresse térmico induzido no período reprodutivo.

A inoculação de *B. subtilis* no feijoeiro pode contribuir consideravelmente para a redução do estresse térmico na cultura. Com isso, pode ser atenuado o efeito desse estresse no florescimento da cultura, possibilitando maior produção de vagens nas plantas. Foi verificado o aumento da colonização bacteriana na rizosfera das plantas inoculadas com *B. subtilis*, que pode ter influenciado em alterações bioquímicas das plantas, detectado pelo aumento da concentração foliar da prolina e atividade da peroxidase, como também, pela avaliação da redução do estresse pela assinatura espectral das plantas. A avaliação da produção de etileno não conseguiu elucidar como o estresse térmico pode influenciar nessa rota bioquímica, tornando-se necessários novos estudos com a avaliação da produção desse hormônio através das raízes e em condições de campo.

A rizobactéria em estudo mostrou-se como promotora do crescimento de plantas e de grande potencial para uso na agricultura. Serão necessários novos estudos para analisar a relação da presença da bactéria na rizosfera e as alterações no metabolismo secundário das plantas, que podem abrir novos campos de estudo para estresses abióticos.

6. CONCLUSÕES

A inoculação de *B. subtilis* aumenta a colonização bacteriana na rizosfera e promove o crescimento do feijoeiro cv. IAC Imperador submetido à condição de estresse no período reprodutivo.

Houve redução no abortamento de flores e aumento dos números de vagens no cultivar IAC Imperador submetido ao estresse térmico em função da inoculação com *B. subtilis*.

Após o período do estresse térmico as plantas inoculadas com *B. subtilis* AP-3 apresentaram maiores teores de prolina e atividade da peroxidase nas folhas.

Durante o período do estresse térmico as plantas inoculadas com *B. subtilis* AP-3 apresentaram maiores concentrações de etileno foliar.

Na filogenia, a cultivar IAC Imperador apresentou 40% de seus isolados geneticamente semelhantes à espécie *B. subtilis*.

A inoculação do feijoeiro com a estirpe AP-3 de *B. subtilis* reduz o estresse térmico avaliado pela maior refletância na região da borda do vermelho, durante análise espectral.

7. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, R. A. B. *et al.* Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of Fusarium wilt by endophytic Bacillus spp. in tomato. **Crop Protection**, v. 99, n. 05, p. 45–58, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219417301242>. Acesso em: 05 out. 2019.
- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. **Ethylene in plant biology**. London: Elsevier, 1992.
- ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 1, p. 170–174, 1979. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.76.1.170>. Acesso em: 10 ago. 2019.
- ALBAREDA, M. *et al.* Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, n. 1, p. 67–73, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00244.x>. Acesso em: 20 out. 2019.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 5. ed. New York: Bookshelf, 2007.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com Bacillus subtilis, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 456–462, 2008.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* Phytohormones and antibiotics produced by Bacillus subtilis and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1639–1645, 2005.
- ARAUJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com Bacillus subtilis e Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633–1643, 1999.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. J.; JOHN, P. Ethylene: agricultural sources and applications. **Annals of Botany**, v. 90, n. 3, p. 424–424, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcf201>. Acesso em: 23 out. 2019.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206–216, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847206000268>. Acesso em: 30 out. 2019.
- BALBONTÍN, C. *et al.* Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 67–77, 2007. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521406002122>. Acesso em: 08 jul. 2019.

BALLESTER *et al.* Monitoring the effects of water stress in cotton using the green red vegetation index and red edge ratio. **Remote Sensing**, v. 11, n. 7, p. 873, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-4292/11/7/873>. Acesso em: 02 nov. 2019.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 8–9, p. 1225–1228, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071797001879>. Acesso em: 19 ago. 2019.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, 1973. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00018060>. Acesso em: 22 out. 2019.

BELL, A. A. Biochemical Mechanisms of Disease Resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, n. 1, p. 21–81, 1981. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.32.060181.000321>. Acesso em: 29 ago. 2019.

BERG, G. *et al.* Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. **Agronomy**, v. 3, n. 4, p. 648–656, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2073-4395/3/4/648>. Acesso em: 02 nov. 2019.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de Bacillus. *In*: MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. coords. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1995. p. 35-36. (Manual Técnico)

BEZERRA, A. A. C. *et al.* Características de dossel e de rendimento em feijão-caupi ereto em diferentes densidades populacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 10, p. 1239–1245, 2009.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 850–859, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000991>. Acesso em: 01 set. 2019.

BINNIE, R. C.; CLIFFORD, P. E. Sink characteristics of reproductive organs of dwarf bean in relation to likelihood of abscission. **Crop Science**, v. 39, n. 4, p. 1077, 1999. Disponível em: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/39/4/CS0390041077>. Acesso em: 28 set. 2019.

BRASIL. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira grãos**: v. 5 safra 2017/18 - quarto levantamento. Brasília: CONAB, 2017. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/gaos/boletim-da-safra-de-gaos?start=30>. Acesso em: 19 set. 2019.

BRASIL. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Perspectivas agropecuária 2018/19**: volume 6 - safra 2018/2019. Brasília: CONAB, 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 05 ago. 2019.

BROADBENT, P.; BAKER, K. F.; WATERWORTH, Y. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. **Phytopathology**, v. 77, n. 8, p. 1027, 1977. Disponível em: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Abstracts/Phyto67_1027.htm. Acesso em: 10 set. 2019.

BULGARELLI, D. *et al.* Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>. Acesso em: 01 nov. 2019.

CARTER, G. A.; CIBULA, W. G.; DELL, T. R. Spectral reflectance characteristics and digital imagery of a pine needle blight in the southeastern United States. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 26, n. 3, p. 402–407, 1996. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/x26-045>. Acesso em: 12 set. 2019.

CERQUEIRA, W. F. *et al.* Influência de bactérias do gênero *Bacillus* sobre o crescimento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *In*: SIMPÓSIO REGIONAL DE AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL, 1., 2015, Piauí. **Anais** [...]. Piauí: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2015. p. 82–93. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015a/simposio-agroecologia/influencia-de-bacterias.pdf>. Acesso em: 01 out. 2019.

CGIAR. **Annual Report to CGIAR Consortium**: CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). France: CGIAR, 2015.

CHAPPELL, J.; HAHLBROCK, K.; BOLLER, T. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. **Planta**, v. 161, n. 5, p. 475–480, 1984. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00394581>. Acesso em: 14 ago. 2019.

CIARDI, J. A. *et al.* Reduced expression of the tomato ethylene receptor gene *leetr4* enhances the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 4, p. 487–495, 2001. Disponível em: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2001.14.4.487>. Acesso em: 31 ago. 2019.

CICHY, K. A.; SNAPP, S. S.; BLAIR, M. W. Plant growth habit, root architecture traits and tolerance to low soil phosphorus in an Andean bean population. **Euphytica**, v. 165, n. 2, p. 257–268, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10681-008-9778-2>. Acesso em: 20 jan. 2020.

COSTA, J. M.; GRANT, O. M.; CHAVES, M. M. Thermography to explore plant–environment interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3937–3949, 2013.

DÍAZ, R. O. **Boletim técnico**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1972. p. 119.

DIBY, P.; HARSHAD, L. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 737–752, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13593-014-0233-6>. Acesso em: 24 jan. 2020.

DIDONET, A. D.; MADRIZ, P. M. Abortamento de flores e vagens no feijoeiro: efeito da temperatura e da radiação solar. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa, MG. **Anais [...]** Viçosa: UFV, 2002. p. 55-58.

DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. **PCR primer: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29–41, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945211000379>. Acesso em: 17 nov. 2019.

DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V. V. Ethylene production under high temperature stress causes premature leaf senescence in soybean. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 11, p. 1071, 2010. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/?paper=FP10089>. Acesso em: 14 nov. 2019.

DODD, I. C.; PEREZ-ALFOCEA, F. Microbial amelioration of crop salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3415–3428, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers033>. Acesso em: 01 nov. 2019.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de feijão**. Guaíba, RS: Agropecuaria, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

EMBRAPA. Cultivo do Feijoeiro Comum. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2003.

EMBRAPA. **Embrapa arroz e feijão**. Brasília: Embrapa, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao/biblioteca/acervo>. Acesso em: 29 jan. 2020.

ERIC, E. *et al.* Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. **Planta**, v. 49, n. 1, p. 205–211, 2006.

FALCÃO, L. L. *et al.* Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB629. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1584–1592, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12485>. Acesso em: 28 jan. 2020.

FALKER. **Base de informações medição de clorofila**. Porto Alegre, RS: FALKER,

2011. Disponível em: <https://www.falcker.com.br/base/article/AA-00299/41/Clorofila/clorofiloLOG-CFL1030/Como-o-índice-ICF-é-calculado.html>. Acesso em: 28 set. 2019.

FAN, X.; MATTHEIS, J. P.; ROBERTS, R. G. Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. **Physiologia Plantarum**, v. 110, n. 4, p. 450–454, 2000. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2000.1100404.x>. Acesso em: 29 ago. 2019.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Food and agriculture data**. Rome: FAO, 2016. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 29 set. 2019.

FERREIRA, A. C. **Fisiologia e morfologia de plantas de feijão sob deficiência hídrica**. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-08012018-102124/>. Acesso em: 03 set. 2019.

FIELD, R. J. A Relationship between Membrane Permeability and Ethylene Production at High Temperature in Leaf Tissue of *Phaseolus vulgaris* L. **Annals of Botany**, v. 48, n. 1, p. 33–39, 1981.

FIGUEIREDO, M. DO V. B. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. *In*: MAHESHWARI, D. **Plant growth and health promoting bacteria**. Berlin: Springer, 2010. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-13612-2_2. Acesso em: 30 ago. 2019.

FONTES, P. C. R.; ARAÚJO, C. **Adução nitrogenada de hortaliças: princípios e práticas com o tomateiro**. Viçosa: UFV, 2007. 122 p.

GASPAR, T. H. *et al.* **Chemistry and biochemistry of peroxidases, Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Geneva: Univ. Genève Press, 1982.

GATES, D. M. *et al.* Spectral properties of plants. **Applied Optics**, v. 4, n. 1, p. 11, 1965. Disponível em: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ao-4-1-11>. Acesso em: 11 fev. 2020.

GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 154–161, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942811003652>. Acesso em: 07 nov. 2019.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942810001798>. Acesso em: 24 set. 2019.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/j.femsle.2005.07.030>. Acesso em: 28 out. 2019.

GLICK, B. R. Beneficial plant-bacterial interactions. **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. v. 183, p.97–122, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131530029X>. Acesso em: 16 nov. 2019.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63–68, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519397905324>. Acesso em: 15 nov. 2019.

GOMES, C.; GALDINO, M. **Nova variedade de feijão precoce do IAC tem grãos de alta qualidade**: característica inédita no mercado. Campinas: IAC, 2011. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/noticiasdetalhes.php?id=769>. Acesso em: 01 out. 2019.

GONZALEZ, N. *et al.* Increased leaf size: different means to an end. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 1261–1279, 2010.

HABIB, S. H.; KAUSAR, H.; SAUD, H. M. plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-Scavenging Enzymes. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/6284547/>. Acesso em: 12 ago. 2019.

HAICHAR, F. EL Z. *et al.* Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, n. 12, p. 1221–1230, 2008. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ismej200880>. Acesso em: 25 out. 2019.

HAN, Q. Q. *et al.* Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00525/abstract>. Acesso em: 09 nov. 2019.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. ELSAS, V. J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X08001923>. Acesso em: 07 set. 2019.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1–2, p. 7–14, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-007-9514-z>. Acesso em: 30 ago. 2019.

HAYS, D. B. *et al.* Heat stress induced ethylene production in developing wheat grains induces kernel abortion and increased maturation in a susceptible cultivar.

- Plant Science**, v. 172, n. 6, p. 1113–1123, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945207000945>. Acesso em: 20 out. 2019.
- HEIDARI, M.; GOLPAYEGANI, A. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 11, n. 1, p. 57–61, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1658077X11000518>. Acesso em: 09 out. 2019.
- HIRAGA, S. *et al.* A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001. Disponível em: <http://academic.oup.com/pcp/article/42/5/462/1890452/A-Large-Family-of-Class-III-PlantPeroxidases>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- HOFFMANN, L. *et al.* Resposta de cultivares de feijão à alta temperatura do ar no período reprodutivo. **Ciencia Rural**, v. 37, n. 6, p. 1543–1548, 2007.
- HOLL, F. B. *et al.* Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 19–24, 1988.
- HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1825–1831, 1978. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ismej200880>. Acesso em: 16 ago. 2019.
- HOUGHTON, J. T. Introduction to the physics and techniques of remote sensing. **Physics of the Earth and Planetary Interiors**, v. 54, n. 1–2, p. 194, 1989. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003192018990201X>. Acesso em: 06 set. 2019.
- IHUOMA, S. O.; MADRAMOOTOO, C. A. Sensitivity of spectral vegetation indices for monitoring water stress in tomato plants. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 163, p. 104-860, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168169918313590>. Acesso: 18 fev. 2019.
- JENSEN, J. R.; EPIPHANIO, J. C. N. **Sensoriamento remoto do ambiente: uma perspectiva em recursos terrestres**. São José dos Campos, SP: Parêntese, 2011.
- JIANG, C. *et al.* Study of a high spectral resolution hyperspectral LiDAR in vegetation red edge parameters extraction. **Remote Sensing**, v. 11, n. 17, p. 2007, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-4292/11/17/2007>. Acesso em: 18 fev. 2019.
- JIMÉNES, M. B. *et al.* Chemical characterization of root exudates from rice (*Oriza sativa*) and yheir effects on the chemotactic response of endophytic bactéria. **Plant & Soil**, v. 249, n. 2, p. 271-277, 2003.

- JORDAN, D. C.; MCNICOL, P. J.; MARSHALL, M. R. Biological nitrogen fixation in the terrestrial environment of a high Arctic ecosystem (Truelove Lowland, Devon Island, N.W.T.). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 643–649, 1978. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m78-108>. Acesso: 17 ago. 2019.
- JYOTHSNA, P.; MURTHY, S. D. S. A review on effect of senescence in plants and role of phytohormones in delaying senescence. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 152–162, 2016.
- KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 9, p. 2287–2297, 2014a.
- KANG, S.-M. *et al.* Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, p. 115–124, 2014b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814002733>. Acesso em: 25 out. 2019.
- KAUSHAL, M.; WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 35–42, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13213-015-1112-3>. Acesso em: 27 ago. 2019.
- KELLY, J. D. Bean roots: a plant breeder ' s perspective. **Crop and Soil Sciences**, v. 41, p. 214–215, 1998.
- KILIAN, M. *et al.* FZB24 *Bacillus subtilis*: mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 53, n. 1, p. 72-93, 2000.
- KLOEPPER, J.; SCHROTH, M. . Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria Article. **Reads**, n. 1, p. 879, 1978.
- LIEBERMAN, M. Biosynthesis and action of ethylene. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, n. 1, p. 533–591, 1979. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.30.060179.002533>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- LOON, L. C. V. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243–254, 2007. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10658-007-9165-1>. Acesso em: 17 out. 2019.
- LÓPEZ, D. B. S. *et al.* Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 2, p. 122–128, 2014. Disponível em: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/41077>. Acesso em: 17 out. 2019.

LUCHIARI, A. Identificação da cobertura vegetal em áreas urbanas por meio de produtos de sensoriamento remoto e de um Sistema de Informação Geográfica. **Geography Department, University of Sao Paulo**, v. 14, p. 47–58, 2001.

Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rdg/article/view/47312>. Acesso em: 07 set. 2020.

LUCON, C. M. M.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 691–697, 2008.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G. V. Molecular Determinants of Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 461–490, 2001. Disponível em:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.39.1.461>. Acesso em: 11 out. 2019.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L. C. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 9–13, 1999.

Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.1999.00005.x>. Acesso em: 07 out. 2019.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 2009. Disponível em:

<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>. Acesso em: 30 set. 2019.

LUND, S. T.; STALL, R. E.; KLEE, H. J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **The Plant Cell**, v. 10, n. 3, p. 371, 1998. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/10.2307/3870595?origin=crossref>. Acesso em: 17 nov. 2019.

MAHAFFEE, W. F.; BACKMAN, P. A. Effect of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. **Phytopatology**, v. 83, n. 10, p. 1120–1125, 1993. Disponível em: [papers3://publication/uuid/5ABB37DA-15A8-42DB-9B54-B3CD23FD7DE4](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12345678/). Acesso em: 26 set. 2019.

MAKKY, M. *et al.* **A new rapid gas chromatographic method for ethylene, respirational, and senescent gaseous production of climacteric fruits stored in prolonged low temperature.** Thailand: International Conference on Agricultural, Environmental and Biological Sciences, 2014. p. 1–6.

MARCO, K. *et al.* Aptidão agroclimática e características agronômicas do feijão-comum semeado na safra das águas em Tangará da Serra – MT. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 160, 2012.

MARKING, S. Heat stress shrivels bean bushels. **Soybean Digest**, p. 44–45, 1986.

MATTOO, A. K.; LIEBERMAN, M. Localization of the ethylene-synthesizing system in apple tissue. **Plant Physiology**, v. 60, n. 5, p. 794–799, 1977. Disponível em:

<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.60.5.794>. Acesso em: 14 set. 2019.

- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, v. 166, n. 2, p. 525–530, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945203004680>. Acesso em: 05 set. 2019.
- MAZORRA, L. M. *et al.* Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. **Biologia Plantarum**, v. 45, p. 593–596, 2002.
- MAZZUCHELLI, R. C. L.; MAZZUCHELLI, E. H. L.; ARAUJO, F. F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Biological Control**, v. 143, p. 104185, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964419304517>. Acesso em: 15 out. 2020.
- MENDIS, H. C. *et al.* Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. (S. Jogaiah, Org.) **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0193119, 2018. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0193119>. Acesso em: 29 out. 2019.
- MESQUITA, F. R. *et al.* Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114–1121, 2007.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138502023129>. Acesso em: 03 set. 2019.
- MONTEIRO, J. G. *et al.* Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 18–25, 2014.
- MONTEIRO, P. F. C. *et al.* Índices de vegetação simulados de diferentes sensores na estimativa das variáveis biofísicas do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 433–441, 2013.
- MOREIRA, M. A. **Fundamentos do sensoriamento remoto e metodologias de aplicação**. 4 ed. Viçosa: UFV, 2011.
- MORISON, J. I. L.; LAWLOR, D. W. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 659–682, 1999. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.1999.00443.x>. Acesso em: 16 ago. 2019.
- NARAYANA, I.; LALONDE, S.; SAINI, H. S. Water-stress-induced ethylene production in wheat. **Plant Physiology**, v. 96, n. 2, p. 406–410, 1991. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.96.2.406>. Acesso em: 24 out. 2019.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35012500>. Acesso em: 16 fev. 2020.

PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. Bacillus species: the dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. **Microbiological Research**, v. 152, n. 4, p. 359–365, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501397800523>. Acesso em: 06 set. 2019.

PICOLI, M. C. A. *et al.* Índice de vegetação do sensor MODIS na estimativa da produtividade agrícola da cana-de-açúcar. **Revista Bragantia**, v. 68, p. 789–795, 2009.

PINDI, P. K.; SULTANA, T.; VOOTLA, P. K. Plant growth regulation of Bt-cotton through Bacillus species. **3 Biotech**, v. 4, n. 3, p. 305–315, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-013-0154-0>. Acesso em: 20 out. 2019.

PINHEIRO, L. R. **Correlações entre caracteres estruturais determinantes dos hábitos de crescimento das cultivares de feijão**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2015.

PONZONI, F. J. **Sensoriamento remoto no estudo da vegetação**: diagnosticando a Mata Atlântica. São José dos Campos: INPE, 2002. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/lepac/bie5759/CAP8_FJPonzoni.pdf. Acesso em: 08 set. 2019.

PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. **Sensoriamento remoto no estudo da vegetação**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007.

PORTES, T. A. Ecofisiologia. *In*: ZIMMERMANN, M. J. O.; ROCHA, M.; YAMADA T. (Ed.). **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988.

PRASAD, P. V. V.; PISIPATI, S. R.; MUTAVA, R. N.; TUINSTRA, M. R. Sensitivity of grain sorghum to high temperature stress during reproductive development. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1911–1917, 2008.

PRIEST, F. **Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria**. Washington: American Society of Microbiology, 1993.

QIAO, J. *et al.* No Title Addition of plant-growth-promoting Bacillus subtilis PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017.

RAAIJMAKERS, J. M. *et al.* The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 341–361, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-008-9568-6>. Acesso em: 20 ago. 2019.

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 217–224, 2012. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139311002198>. Acesso em: 22 out. 2019.

RIDGE, E. H.; ROVIRA, A. D. **Transactions of the 9th International Congress of Soil Science (International Society of Soil Science)**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1968.

RISTIC, Z.; BUKOVNIK, U.; PRASAD, P. V. V. Correlation between heat stability of thylakoid membranes and loss of chlorophyll in winter wheat under heat stress. **Crop Science**, v. 47, n. 5, p. 2067, 2007. Disponível em:

<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/47/5/2067>. Acesso em: 03 out. 2019.

RODRIGO, I. *et al.* cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23: Characterization as a vacuolar antifungal factor. **Plant Physiology**, v. 102, n. 3, p. 939–945, 1993.

RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Grandes culturas: café. **Revista cultivar Grandes Culturas**, v. 30, n. 257, p. 32–34, 2001.

SALTVEIT, M. E.; DILLEY, D. R. Rapidly induced wound ethylene from excised segments of Etiolated *Pisum sativum* L., cv. Alaska. **Plant Physiology**, v. 61, n. 4, p. 675–679, 1978. Disponível em:

<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.61.4.675>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006.

SANTOYO, G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131530029X>. Acesso em: 20 jan. 2020.

SEMENTES MARAMBAIA. **Feijão Carioca TAA Dama**. Goiás: Sementes Marambaia, 2017. Disponível em:

<http://www.sementesmarambaia.com.br/objeto.php?id=22>. Acesso em: 12 set. 2019.

SESSITSCH, A. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1187–1192, 2005. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.63149-0>. Acesso em: 20 ago. 2019.

SILVA, D. A. *et al.* Influence of high temperature on the reproductive biology of dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Scientia Agricola**, v. 77, n. 3, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162020000301100&tlng=en. Acesso em: 11 out. 2019.

SILVA, E. A. *et al.* Caracterização espectral na reflectância de *Eucalyptus grandis*.

- FLORESTA**, v. 42, n. 2, p. 285, 2012. Disponível em: <http://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/17587>. Acesso em: 18 ago. 2019.
- SILVA, H. T.; COSTA, A. O. **Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero Phaseolus**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 156).
- SILVEIRA, P. M.; CASTRO, T. A. P.; STONE, L. F. Idade de floração e vingamento de flores em duas cultivares de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 229–232, 1980.
- SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. **Irrigação do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2001.
- SIMON, E. W. Phospholipids and plant membrane permeability. **New Phytologist**, v. 73, n. 3, p. 377–420, 1974. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.1974.tb02118.x>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- SINGH, M. *et al.* Proline and salinity tolerance in plants. **Biochemistry & Pharmacology: Open Access**, v. 03, n. 06, 2014. Disponível em: <http://omicsgroup.org/journals/proline-and-salinity-tolerance-in-plants-2167-0501.1000e170.php?aid=35285>. Acesso em: 27 out. 2019.
- SINGH, S. P. Common bean improvement in the tropics. **Plant Breeding Reviews**, v. 10, p.199–269, 1992. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470650011.ch7>. Acesso em: 19 out. 2019 .
- SOLANKI, M. K. *et al.* Diversity and antagonistic potential of *Bacillus* spp. associated to the rhizosphere of tomato for the management of *Rhizoctonia solani*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 203–217, 2012. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583157.2011.649713>. Acesso em: 27 fev. 2020.
- STEFAN, M.; MUNTEANU, N.; MIHĂȘAN, M. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 18, n. 2, p. 8132–8143, 2013.
- SUN, Y.; CHENG, Z.; GLICK, B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 131–136, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01625.x>. Acesso em: 01 set. 2019.
- SZIDERICS, A. H. *et al.* Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1195–1202, 2007. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/W07-082>. Acesso em: 29 ago. 2019.
- TAHIR, H. A. S. *et al.* *Bacillus volatiles* adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco

against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40481, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep40481>. Acesso em: 25 ago. 2019.

TAHIR, M.; SARWAR, M. A. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

THOMMA, B. P. *et al.* The complexity of disease signaling in Arabidopsis. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 1, p. 63–68, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791500001837>. Acesso em: 28 set. 2019.

UNO, Y. *et al.* Artificial neural networks to predict corn yield from compact airborne spectrographic imager data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 47, n. 2, p. 149–161, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168169904001577>. Acesso em: 28 set. 2019.

VELHO, L. P. S. *et al.* Root distribution and its association with bean growth habit. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1837–1844, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652018000401837&lng=en&tling=en. Acesso em: 12 out. 2019.

VIEIRA, C. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2006.

VIEIRA, C. *et al.* **Melhoramento do feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: Melhoramento de plantas cultivadas, 2005.

VILAS BOAS, E. V. B. Frutos climatéricos e não climatéricos: implicações na pós colheita. *In*: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2., 2002, Lavras. **Anais** [...] Lavras: UFLA, 2002. p. 24-30.

VILHORDO, B. W.; MULLER, L. Correlação entre caracterização botânica e classificação comercial em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **IPAGRO. Boletim Técnico**, v. 8, p. 62, 1981.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 44–51, 2003. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.102.019661>. Acesso em: 13 set. 2019.

WHEELER, T.; BRAUN, J. VON. Climate change impacts on global food security. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 508–513, 2013. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1239402>. Acesso em: 08 dez. 2019.

WIPAT, A.; HARWOOD, C. R. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 1999.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1–4, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138508002902>. Acesso em: 23 out. 2019.

YANG, S. F. **Mechanism and regulation of ethylene biosynthesis: the new frontiers in plant biochemistry**. New York: Springer Netherlands, 1980. p.219–229. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-94-009-6854-7_11. Acesso em: 27 out. 2019.

YU, Y. B.; ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Regulation of auxin-induced ethylene production in mung bean hypocotyls. **Plant Physiology**, v. 63, n. 3, p. 589–590, 1979. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.63.3.589>. Acesso em: 27 out. 2019.

YU, Y. B.; YANG, S. F. Biosynthesis of wound ethylene. **Plant Physiology**, v. 66, n. 2, p. 281–285, 1980. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.66.2.281>. Acesso em: 15 out. 2019.

ZACARIAS, L.; REID, M. S. Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 80, n. 4, p. 549–554, 1990. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05677.x>. Acesso em: 18 out. 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. **Chemosphere**, v. 83, n. 1, p. 57–62, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653511000695>. Acesso em: 15 nov. 2019.

ZORB, C. *et al.* The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. **Plant Science**, v. 167, n. 1, p. 91–100, 2004.