

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA

AÇÃO DA APLICAÇÃO DE BIODEFENSIVOS
MICROBIOLÓGICOS NOS ASPECTOS HIDRÁULICOS,
FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DE SOJA
EXPOSTA À SECA

Autora: Leticia Ferreira de Sousa
Orientadora: Dra. Fernanda S Farnese
Coorientadora: Dra. Layara A Bessa

RIO VERDE – GO
Outubro – 2023

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA

AÇÃO DA APLICAÇÃO DE BIODEFENSIVOS
MICROBIOLÓGICOS NOS ASPECTOS HIDRÁULICOS,
FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DE SOJA
EXPOSTA À SECA

Autora: Leticia Ferreira de Sousa

Orientador: Dra. Fernanda dos Santos Farnese

Coorientadora: Dra. Layara Alexandre Bessa

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA, no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, *Stricto sensu*, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. Área de Concentração: Produção Vegetal Sustentável no Cerrado. Linha de pesquisa: Fisiologia, bioquímica e pós-colheita de produtos vegetais.

RIO VERDE – GO
Outubro – 2023

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SS0725 Sousa, Leticia Ferreira de
a Ação da aplicação de biodefensivos microbiológicos
nos aspectos hidráulicos, fisiológicos, bioquímicos e
anatômicos de soja exposta à seca / Leticia Ferreira
de Sousa; orientadora Fernanda dos Santos Farnese;
co-orientadora Layara Alexandre Bessa. -- Rio Verde,
2023.
72 p.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias - Agronomia)
-- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2023.

1. Déficit hídrico. 2. Glycine max. 3.
Microorganismos. 4. Embolismo. 5. Recuperação. I.
Farnese, Fernanda dos Santos, orient. II. Bessa,
Layara Alexandre, co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 76/2023 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

AÇÃO DA APLICAÇÃO DE BIODEFENSIVOS MICROBIOLÓGICOS NAS RELAÇÕES HÍDRICAS E ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE SOJA EXPOSTA À SECA

Autora: Leticia Ferreira de Sousa

Orientadora: Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em, 06 de outubro de 2023.

Prof.^a Dr.^a Fernanda dos Santos Farnese (Presidente)

Prof. Dr. Roberto Gomes Vital (Avaliador interno)

Prof. Dr. Eduardo Souza Freire (Avaliador externo)

Prof.^a Dr.^a Layara Alexandre Bessa (Avaliadora interna)

Prof. Dr. Paulo Eduardo de Menezes Silva (Avaliador interno)

Documento assinado eletronicamente por:

- **Paulo Eduardo de Menezes Silva**, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 16/10/2023 10:37:33.
- **Eduardo Souza Freire**, Eduardo Souza Freire - 2345 - PROFESSORES NA ÁREA DE FORMAÇÃO PEDAGÓGICA DO ENSINO SUPERIOR - Universidade de Rio Verde (01815216000178), em 11/10/2023 13:54:57.
- **Layara Alexandre Bessa**, ASSISTENTE EM ADMINISTRACAO, em 11/10/2023 11:19:00.
- **Roberto Gomes Vital**, 2023102343860002 - Discente, em 10/10/2023 13:53:47.
- **Fernanda dos Santos Farnese**, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 09/10/2023 19:06:37.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 05/10/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 537350
Código de Autenticação: b80aa0e769



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3624-1000

AGRADECIMENTOS

A Deus,

“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.”

(Romanos 11:36)

Família,

Aos meus pais Nelson Camilo e Selma Regina, aos meus irmãos Priscila, Robison e Nelma, pelos conselhos, incentivo e carinho. E, aos meus sobrinhos, Karollyne, Júlia, Diogo e Íris, que, ainda tão pequenos, iluminaram de forma especial meus pensamentos em procurar evoluir sempre. Vocês são minha razão!

Instituições e empresa,

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos. Ao grupo Vittia S.A., pela parceria e fornecimento dos produtos biodefensivos microbiológicos.

Laboratórios,

Ao Laboratório de Estudos Aplicados em Fisiologia Vegetal (LEAF)/IFGoiano, pelos materiais, reagentes e equipamentos para condução do trabalho, supervisionado pelos professores Drs. Fernanda dos Santos Farnese e Paulo Eduardo de Menezes Silva. Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal (LECO)/IFGoiano, coordenado pelo prof. Dr. Alan Carlos Costa, que disponibilizou os equipamentos e a casa de vegetação. Laboratório Metabolismo e Genética da Biodiversidade/IFGoiano, supervisionado pela Dra. Layara Alexandre Bessa sendo solícita e dando todo o suporte necessário. Ao Laboratório de Bioquímica e Genética coordenado pela professora Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça que disponibilizou o espectrofotômetro para as análises de enzimas antioxidantes. E, ao Laboratório de Anatomia vegetal (LAVEg) coordenado pelo professor Sebastião Carvalho Vasconcelos Filho, onde deu todo o suporte necessário para a execução das análises anatômicas e histoquímicas, auxiliados pela Giselle S Faria.

Orientação e coorientação,

Agradecimento em especial a minha orientadora Fernanda Farnese, pela amizade, oportunidade, confiança, apoio e valiosos ensinamentos que foram essenciais para a minha formação profissional (desde a iniciação científica, mestrado e doutorado), você tem o meu mais profundo respeito e admiração. A minha coorientadora Layara Bessa, pela confiança, apoio, contribuições, conselhos e ensinamentos; palavras não podem expressar imensa gratidão mesmo antes ingressar no processo seletivo do doutorado. Ao meu coorientador, Paulo Eduardo pela parceria, amizade, ensinamentos e contribuições para a minha formação profissional, dando todo o suporte necessário desde a iniciação científica, mestrado e no doutorado. Sua genialidade é admirável!

Equipe e amizade,

A equipe LEAF em especial aos colegas de laboratório, pelos momentos de descontração, apoio, troca de conhecimentos e ajuda para a conclusão deste trabalho, em especial a Sabrina E. S. Almeida, Kamila M. B. Alencar, Valdeir M. A. Filho, Bianca S. Oliveira, Lucas Loram, Rauander D. F. B. Alves, Maria Lucia F. Silva e Priscila F. Batista. A Samylla T. F. Freitas pela amizade e incentivo na graduação e pós-graduação. Em especial ao professor Dr. Eduardo Souza Freire, que coordena o Laboratório de Fitopatologia situado na Universidade de Rio Verde (UniRV), agradeço a parceria, ensinamento, dedicação e execução nas aplicações dos biodefensivos microbiológicos.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Leticia Ferreira de Sousa, natural de Diamantino -MT, mudou-se para a cidade de Rio Verde Goiás aos 15 anos de idade. É filha de Nelson Camilo de Sousa e Selma Regina Ferreira de Sousa, nasceu em 27 de julho de 1992. Coursou ensino fundamental e médio em escolas públicas. No primeiro semestre de 2012, ingressou no curso de graduação de Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. Pela mesma instituição, no segundo semestre de 2017 iniciou seu *Stricto sensu* - Mestrado em Biodiversidade e Conservação, concluindo-o em agosto de 2019. No primeiro semestre de 2020 iniciou seu *Stricto sensu* – Doutorado em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, defendendo sua tese em outubro de 2023.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2
CAPÍTULO I	5
ABSTRACT	5
1. Introduction	6
2. Material and methods	8
2.1. Growth conditions	8
2.2. Screening of microorganisms and forms of application	9
2.2.1 Leaf water potential (Ψ_w) and relative water content (RWC)	10
2.2.2 Leaf gas exchanges measurements	10
2.2.3. Cell membrane integrity	11
2.2.4. Chlorophyll index	11
2.3. Physiological evaluation, hydraulics, and post-drought recovery: Impact of inoculation on soybean plants exposed to drought	11
2.3.1. Water relations and cell damage	12
2.3.1.1. Leaf water potential (Ψ_w)	12
2.3.1.2. Transpiration rates	12
2.3.1.3. Residual transpiration ($g_{leaf-res}$)	12
2.3.1.4. Plant hydraulic conductivity (K_{plant})	12
2.3.1.5. Leaf hydraulic conductance (K_{leaf})	12
2.3.1.6. Cell membrane damage	13
2.3.2. Embolism tolerance	13
2.3.2.1. Sapwood-specific hydraulic conductivity and percentage loss of conductivity (PLC)	13
2.3.2.2. Embolism vulnerability and hydraulic safety margin	13
2.3.3. Leaf area	14
2.3.4. Root dry weight	14
2.3.5. Post-drought recovery	14
2.3.6. Statistical analyses	14
4. RESULTS	15
5. DISCUSSION	24

6. CONCLUSION	27
7. REFERENCES	27
CAPÍTULO II	33
RESUMO.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Geral.....	37
2.2 Específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Condições de cultivo	37
3.2. Relações hídricas	38
3.2.1 <i>Potencial hídrico (Ψ_w)</i>	38
3.2.2 <i>Potencial de soluto (Ψ_s)</i>	38
3.2.3 <i>Condutividade hidráulica do caule (K_{stem})</i>	39
3.3. Caracterização morfoanatômica	39
3.3.1 <i>Caracterização estomática</i>	39
3.3.2 <i>Caracterização do xilema foliar</i>	39
3.4 Análises fisiológicas	40
3.4.1 <i>Teor de pigmentos cloroplastídicos</i>	40
3.4.2 <i>Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas</i>	40
3.4.3 <i>Respiração noturna (R_N)</i>	41
3.5 Análises Bioquímicas	41
3.5.1 <i>Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)</i>	41
3.5.2 <i>Avaliação da Peroxidação Lipídica</i>	41
3.5.3 <i>Ensaio de enzimas antioxidantes</i>	42
3.6. Caracterização micromorfométrica	42
3.6.1 <i>Aspectos anatômicos foliares</i>	42
3.7 Produtividade	43
3.8 Índice de tolerância (IT)	43
3.9. Análises estatísticas	43
4. RESULTADOS.....	44
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO I

Figure 1. Experimental design: In A, is represented the *screening* performed to verify which combination of microorganisms (upper panel) and which form of application (bottom panel) would be most efficient to mitigate the damage triggered by drought. Microorganisms were applied in the seeds, leaves, or both (bottom panel). The most efficient combinations are marked with a red rectangle. In B are represented the treatments and forms of application selected to carry out the hydraulic and physiological evaluations of the plants in water deficit, as well as the post-drought recovery evaluation 8

Figure 2. Water relations: predawn water potential (Ψ_{pd} - A), midday water potential (Ψ_{md} - B), and stem water potential (Ψ_{stem} - C) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$) 16

Figure 3. Water loss and transport: transpiration rate (E - A), leaf residual transpiration rate ($g_{leaf-res}$ - B), plant hydraulic conductivity (K_{plant} - C), and leaf hydraulic conductivity (K_{leaf} - D) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms.. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$) 17

Figure 4. Percentage loss of conductivity (PLC) in in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$) 18

Figure 5. Embolism tolerance: Embolism vulnerability curves (A), water potential at which 50% (P_{50} - B) and 88% (P_{88} - C) of the hydraulic conductivity is lost, hydraulic safety margin until reaching P_{50} (HSM₅₀ - D) and P_{88} (HSM₈₈) (E), time to reach 50% of hydraulic failure (T_{P50} - F), and time to reach lethal hydraulic failure (T_{P88} - G) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms.. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$) 19

Figure 6. Electrolyte leakage rate (ELR) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$) 20

Figure 7. Leaf area (A), venation density (B) and root dry mass (C) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$) 21

Figure 8. Post-drought recovery: recovery of hydraulic and photosynthetic parameters in soybean plants. The variables (midday water potential (Ψ_{md} - A), plant hydraulic conductivity (K_{plant} - B), stomatal conductance (g_s - C), transpiration rate (E - D), and net carbon assimilation rate (A - E)) were evaluated after 10 days of drought (day 0) and daily for four days after rehydration. For each evaluated day, means followed by an asterisk (*) differ from the control by the Student t -test ($P < 0.05$) 22

CAPÍTULO II

Figura 1 – Relações hídricas: potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}) (A), potencial hídrico do meio-dia (Ψ_{md}) (B) e potencial de soluto (Ψ_s) (C) condutividade hidráulica do caule (K_{stem}) (D), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 44

Figura 2 – Impressão epidérmica: Estômatos e células epidérmicas na face abaxial dos tratamentos, CT (100% CC) (A); CT BV02+BV10 (100% CC + *B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) (B); CT BV03+BV10 (100% CC + *B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (C); DH (30% da CC) (D); DH BV02+BV10 (30% CC + *B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) (E) e DH BV03+BV10 (30% CC + *B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (F) 46

Tabela 1 – Caracterização estomática na face foliar adaxial e abaxial em plantas de *Glycine max* completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade. Abreviações: densidade estomática (SD), tamanho do estômato (S), tamanho do par de células-guarda (a_{gc}), condutividade estomática máxima (g_{wmax}) e fração da epiderme alocada aos estômatos (f_{gc}) 47

Figura 3 – Vasos dos xilemas foliares: densidade de venação (A), diâmetro médio dos vasos xilemáticos (B), área do xilema (C) número dos vasos xilemáticos (D), resistência ao colapso induzido por estresse (t/b)³ em *Glycine max* completamente irrigada (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* +

Trichoderma asperellum em folhas) e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 50

Figura 4 – Pigmentos cloroplastídicos: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (Chl_a+Chl_b) (C), razão entre a clorofila *a* e *b* (Chl_a+Chl_b) (D) e carotenoides (E), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 51

Figura 5 – Fluorescência da clorofila *a*: rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A), produção quântica basal dos processos não fotoquímico no fotossistema II (F_0/F_m) (B), rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (C), quenching não fotoquímico (q_N) (D) e quenching fotoquímico (q_P) (E), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 53

Figura 6 – Fluorescência de imagem da clorofila *a*: fluorescência mínima (F_0), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), quenching não fotoquímico (q_N), fração de centros do PSII abertos (q_L) e quenching fotoquímico (q_P), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Aumento significativo entre tratamentos em déficit hídrico são indicadas por asteriscos (*) pelo teste SNK a 0,05% 54

Figura 7 – Trocas gasosas: taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), taxa transpiratória (E) (C), concentração interna de CO₂ (C_i) (D), eficiência de carboxilação (A/C_i) (E) e eficiência no uso da água (A/E) (F), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 55

Figura 8 – Taxa respiratória: respiração noturna (R_N) (A) e razão entre a taxa de respiração e a fotossíntese (R_N/A) (B), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 56

Figura 9: Secção transversal da lâmina foliar de *G. max* fixado em resina para detecção de amido (reagente Lugol): EdAd- epiderme adaxial, PP- parênquima paliçádico, PS-parênquima esponjoso, EpAb- epiderme abaxial, em plantas completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos: CT (A), CT BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) (B), CT BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas), e submetidas ao déficit hídrico, DH (D), DH BV02+BV10 (E) (*B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) e DH BV03+BV10 (*B.*

amyloliquefaciens + *T. asperellum* em sementes e folhas) (F). Seta branca indicando tricoma glandular. Barras de 200 µm 56

Figura 10 – Danos em membranas e metabolismo antioxidante: peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), Hidroperóxido Dieno Conjugado (HPDC) (B), superóxido dismutase (SOD) (C), catalase (CAT) (D), ascorbato peroxidase (APX) (E) e peroxidase (POX) (F), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade 58

Figura 11 - Caracterização anatômica do limbo foliar EpAd - epiderme adaxial, EpAb - epiderme abaxial, PP – parênquima paliçádico, PS – parênquima esponjoso. Seta lilás indicando presença de mucilagem nas epidermes. Seta branca indicando tricoma glandular e a seta cinza indicando remoção de células da epiderme. Em *Glycine max* completamente irrigada (controle – CT) ou submetida ao déficit hídrico (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos: CT (A), CT BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) (B), CT BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas), e submetidas ao déficit hídrico, DH (D), DH BV02+BV10 (E) (*B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) e DH BV02+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (F). Barras de 200 µm 59

Figura 12 – Análises micromorfométricas do limbo foliar: epiderme adaxial (A) e abaxial (B), espessura do limbo (C), mesofilo (D), parênquima paliçádico (E) e parênquima esponjoso (F) em *Glycine max* completamente irrigada (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade ... 60

Figura 13 – Produtividade: Número de vagens (A), número de grãos (B) e volume de grãos (C) e índice de tolerância (D) em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade. Para a variável índice de tolerância (IT) comparou-se DH com DH BV02+BV10; e DH com DH BV03+BV10 utilizando-se o teste t. Médias seguidas pelos (*) diferem do tratamento DH para o índice de tolerância a seca 61

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

- A – Taxa fotossintética líquida
 A/C_i - Eficiência de carboxilação
 A/E – Eficiência do uso da água
 ANOVA – Análise de variância
 APX – Peroxidase do ascorbato
 Bio-Imune[®] (*Bacillus subtilis* BV02)
 CAT - Catalase
 CC – Capacidade de campo
 Chla+Chlb - Clorofila total
 Chla/Chlb - Razão da a clorofila a/b
 C_i – Concentração interna de CO₂
 CO₂ - Dióxido de carbono
 CT – Controle
 DIC – Delineamento inteiramente casualizado
 DH – Déficit hídrico
 E – Taxa transpiratória foliar
 ELR – Taxa de extravasamento de eletrólitos
 f_{gc} - Fração da epiderme alocada aos estômatos
 F_v/F_m – Rendimento quântico potencial do fotossistema II
 F_0/F_m - Produção quântica basal dos processos não fotoquímico no fotossistema II
 $g_{leaf-res}$ – Transpiração residual
 g_s - condutância estomática
 g_{wmax} - Condutividade estomática máxima
 HPDC - Hidroperóxido Dieno Conjugado
 H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
 IT – Índice de tolerância
 K_{leaf} - Condutividade hidráulica foliar

K_{plant} - Condutividade hidráulica da planta

K_{stem} - Condutividade hidráulica caulinar

L - Comprimento da célula de guarda

MSH – Margem de Segurança Hidráulica

MPCP - Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas

No-Nema[®] (*Bacillus amyloliquefaciens* BV03)

P - Área dos poros

PLC – Porcentagem de Perda de Condutividade

POX - Peroxidase

P_{50} - Potencial hídrico no qual as plantas perderam 50% da sua condutividade

P_{88} - Potencial hídrico no qual as plantas perderam 88% da sua condutividade

q_N - Quenching não fotoquímico

q_P – Extinção fotoquímica

ROS – Espécies reativas de oxigênio

R_N – Respiração noturna

RWC – Teor relativo de água

S - Tamanho dos estômatos

SD - Densidade estomática

SNK – Student Newman Keuls

SOD – Superóxido Dismutase

TEE- Taxa de Extravasamento de Eletrólitos

TRA - Teor Relativo de Água

Tricho-Turbo[®] (*Trichoderma asperellum* BV10)

T_{P50} - tempo gasto para atingir 50% da falha hidráulica

T_{P88} - Tempo para a falha hidráulica letal

W - Largura da célula-guarda

WD – Drought

a_{gc} - par de células-guarda

ϕ_{PSII} - Eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II

Ψ_w – Potencial hídrico

Ψ_{am} - Potencial hídrico da antemanhã

Ψ_{md} - Potencial hídrico do meio-dia

RESUMO

SOUSA, L.F. **Ação da aplicação de bio defensivos microbiológicos nos aspectos hidráulicos, fisiológicos, bioquímicos e anatômicos de soja exposta à seca.** Outubro de 2023. Tese apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, como parte das exigências para obtenção do título de doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

Um dos desafios do século XXI é fornecer comida suficiente para a crescente população global em um cenário de mudanças climáticas que restringe a produção agrícola, sendo essencial buscar alternativas que aumentem a tolerância das culturas ao déficit hídrico. Neste trabalho, avaliou-se se a inoculação com diferentes microrganismos promotores de crescimento tem a capacidade de intensificar as respostas da soja ao déficit hídrico. No capítulo 1 realizou-se um *screening* para a definição das combinações de microrganismos e forma de aplicação a serem utilizadas. No *screening* as plantas de soja foram submetidas a dois regimes hídricos diferenciais (irrigada ou em déficit hídrico); e sem o tratamento com microrganismos ou expostas a oito combinações dos bio defensivos (Bio-Imune[®] (*Bacillus subtilis* BV02), Biobaci[®] (*B. subtilis* BV09), No-Nema[®] (*Bacillus amyloliquefaciens* BV03) e Tricho-Turbo[®] (*Trichoderma. asperellum* BV10)). Após dez dias de exposição aos tratamentos, foram avaliados o potencial hídrico, teor relativo de água, trocas gasosas, extravasamento de eletrólitos e clorofilas totais, sendo possível escolher as duas combinações de bio defensivos que mantiveram as respostas mais similares ao controle. Plantas de soja foram novamente cultivadas e, ao atingir o estágio R1, foram expostas a dois regimes hídricos diferenciais (irrigação e seca), com ou sem a combinação com os bio defensivos selecionados no *screening* (BV02 + BV10 aplicados em folhas e BV03 + BV10 aplicados em sementes e folhas). Após dez dias de exposição aos tratamentos observou-se que todas as plantas na seca apresentaram plasticidade do aparato hidráulico, sendo capazes de aumentar a tolerância ao embolismo. Em adição, as plantas tratadas com os bio defensivos microbiológicos mantiveram bom status hídrico em seus tecidos, principalmente porque foram capazes de manter maior condutividade hidráulica da planta, do caule e da folha. Fatores determinantes para a manutenção da capacidade de conduzir água foram a maior densidade de venação e aumento da biomassa radicular. Tais fatores, em conjunto, contribuíram para que as plantas tratadas com microrganismos apresentassem recuperação mais rápida após a seca. No capítulo 2 as plantas de soja foram cultivadas até o estágio R1 e expostas a dois regimes hídricos (irrigação e seca), de forma isolada ou em combinação com os bio defensivos (BV02 + BV10 e BV03 + BV10). Foram avaliados o potencial hídrico, potencial de soluto, condutividade hidráulica do caule, caracterização estomática e do xilema foliar, teor de pigmentos cloroplastídicos, fotossíntese, respiração noturna, caracteres micromorfométricos, danos celulares, metabolismo antioxidante e produtividade. Após dez dias de exposição aos tratamentos, observou-se que os microrganismos aumentaram a eficiência no uso da água, diminuindo a transpiração e a condutância estomática, ao mesmo tempo que maximizaram a aquisição de carbono. O fechamento estomático, junto com a maior condutividade hidráulica do caule, contribuiu para a manutenção da hidratação dos tecidos. A hidratação dos tecidos e a ação combinada das

enzimas antioxidantes, por sua vez, foram essenciais para a redução dos danos celulares causados pela seca. Todos esses fatores refletiram na produtividade, promovendo aumento percentual no número de grãos e aumento no índice de tolerância à seca. Os dados obtidos em ambos os capítulos permitiram concluir que a combinação de bio defensivos à base de microrganismos foi eficiente na atenuação dos efeitos negativos da seca nos aspectos hidráulicos, fisiológicos, anatômicos, bioquímicos e produtivos, com resultados promissores do ponto de vista social e agrônomo.

Palavras-chave: Déficit hídrico; *Glycine max*; Microrganismos; Embolismo; Recuperação.

ABSTRACT

SOUSA, L.F. **Action of applying microorganisms-based products on the hydraulic, physiological, biochemical and anatomical aspects of soybeans exposed to drought.** Outubro de 2023. Thesis presented to the Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, as part of the requirements to obtain the title of doctor in Agricultural Sciences

One of the most important challenges of the 21st century is to provide sufficient food for the growing global population in a scenario of climate change that restricts agricultural production, turning essential to seek alternatives that increase crop tolerance to water deficit. In this study, it was evaluated whether inoculation with different growth-promoting microorganisms has the capacity to intensify soybean responses to water deficit. In chapter 1, *screening* was carried out to define the combinations of microorganisms and form of application to be used. In *screening*, soybean plants were subjected to two different water regimes (irrigated or drought); and without treatment with microorganisms or exposed to eight combinations of microorganisms-based products Bio-Imune[®] (*Bacillus subtilis* BV02), Biobaci[®] (*B. subtilis* BV09), No-Nema[®] (*Bacillus amyloliquefaciens* BV03) e Tricho-Turbo[®] (*Trichoderma. asperellum* BV10)). After ten days of treatments, there were evaluated midday water potential (Ψ_{md}), relative water content (RWC), gas exchange, electrolyte extravasation rate (ELR) and total chlorophyll content (Chltotal). The data were used to choose two products combinations that maintained the responses of water stressed plants like the control plants. Soybean plants were cultivated again and, upon reaching the R1 stage, they were exposed to two differential water regimes (irrigation and drought), alone or in combination with the products selected in the *screening* (BV02 + BV10 applied to leaves and BV03 + BV10 applied to seeds and leaves). After ten days of treatments, it was discovered that all plants in drought showed plasticity in the hydraulic system, being able to increase embolism tolerance. Furthermore, plants treated with microorganism-based products maintained the water status of their tissues like those of control plants, mainly because they were able to maintain greater hydraulic conductivity. The determining factors for maintaining water conductivity capacity were the greater venation density and the increase in root biomass. These factors, together, contributed to the plants treated with microorganisms had a quicker recovery after drought. In chapter 2, soybean plants were grown to the R1 stage and exposed to two water regimes (irrigation and drought), alone or in combination with microorganisms-based products (BV02 + BV10 and BV03 + BV10). The water potential, solute potential, hydraulic conductivity of the stem, stomatal and leaf xylem characterization, chloroplast pigment content, photosynthesis, nocturnal respiration, micromorphometric characters, cellular damage, antioxidant metabolism and productivity were evaluated. After ten days of treatments, it was observed that microorganisms increased water use efficiency, reducing transpiration and stomatal conductance while maximizing carbon acquisition. Stomatal closure, together with the greater hydraulic conductivity of the stem, contributed to maintaining tissue hydration. Tissue hydration and the combined action of antioxidant enzymes, in turn, were essential for reducing cellular damage caused by drought. All these factors impacted productivity, promoting a percentage increase in the number of grains and an increase in the drought tolerance index. The data obtained in both chapters allowed us to conclude that the combination of microorganisms was efficient in mitigating the negative effects of drought on hydraulic, physiological, anatomical, biochemical, and productive aspects, with promising results from a social and agronomic point of view.

Keywords: Water deficit; *Glycine max*; Microorganisms; Embolism; Recovery.

INTRODUÇÃO GERAL

A água é um recurso crucial para a vida na Terra, sendo insubstituível em seu papel de manter o funcionamento dos ecossistemas e da sociedade (D'odorico et al., 2020). A atividade humana que consome a maior quantidade de água é a agricultura, sendo que mais de 70% da água doce do mundo é utilizada nesse processo. Estima-se que, até 2050, a produção de alimentos tenha que aumentar em até 50% para alimentar o crescente contingente populacional, o que irá demandar o aumento de 10% na captação de recursos hídricos (FAO, 2017). Nas últimas décadas, a procura pelo incremento do desempenho da soja em condições de restrição hídrica aumentou consideravelmente ao longo dos anos (Yaghoubian *et al.*, 2022). Para atender essa elevada demanda por alimentos é imprescindível alternativas que consigam driblar a pressão que as mudanças climáticas impõe sobre a produção alimentar (Leng e Hall 2019).

Os efeitos hidroclimáticos negativos provocados pelo El Niño de 2015–2016 promoveram desertificação de terras em diversas regiões do globo pela ocorrência da combinação de altas temperaturas e secas intensas (van Schaik *et al.*, 2018). O El Niño de 2023–2024 está sendo uma preocupação atual na época de cultivo de importantes culturas anuais, sendo prevista desde junho de 2023 na projeção probabilística NOAA CPC ENSO (Mugiyo *et al.*, 2023). Em resposta aos fatores climáticos, as plantas desenvolvem séries de ajustes estruturais e funcionais para tentar driblar a pressão causada pelo estresse (Brodribb *et al.*, 2014; Trueba *et al.* 2017), bem como, fechamento estomático para reduzir a transpiração excessiva, o que limita a difusão de CO_2 difusão para a fotossíntese (Galmés *et al.*, 2013 ; Xiong *et al.*, 2016), redução da transpiração residual, $g_{\text{leaf-res}}$ (Machado *et al.*, 2021) e a manutenção da condutividade hidráulica. A falha hidráulica nos vasos do xilema causa dessecação dos tecidos podendo culminar na morte vegetal. Neste contexto, avaliar a vulnerabilidade das plantas ao embolismo torna-se necessário, principalmente em importantes culturas sensíveis a seca. O P_{50} e o P_{88} são parâmetros mais utilizados para determinar a vulnerabilidade ao embolismo, onde o P_{50} consiste no valor do potencial hídrico no qual 50% da condutividade hidráulica foi perdida, enquanto o P_{88} consiste na falha hidráulica letal (Hammond *et al.*, 2019; Hartmann *et al.*, 2018).

A soja (*Glycine max* L. Merril) é atualmente a principal leguminosa cultivada no mundo (Bandillo *et al.*, 2017). No Brasil, a classificação da soja é regulamentada pela Normativa Nº 11, de 15 de maio de 2007 e Instrução Normativa Nº 37 de 27 de julho de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, permitindo avaliar a qualidade da safra que atende as exigências do mercado (BRASIL, 2007a; 2007b; CONAB, 2021). No entanto, o crescimento, a produtividade e a qualidade dos grãos de soja são fortemente afetadas pelo déficit hídrico (Wang *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2021). Foi documentado que na safra 2021/22 o déficit hídrico impactou negativamente no cultivo da soja, com queda de aproximadamente 4,12% em relação à safra passada (Barcelos, 2022).

A rizosfera possui um sistema biológico complexo e dinâmico, abrigando inúmeros microrganismos que podem ser benéficos para as plantas (Nannipieri *et al.*, 2017). Já está bem documentado que plantas cultivadas com Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas (MPCP) conseguem mitigar os impactos negativos causados pelo estresse hídrico (Hosseinzadeh *et al.*, 2019). As bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma* por exemplo, podem aumentar a produção de fitohormônios, como auxinas no tecido radicular alterando a sua arquitetura e ácido abscísico para a regulação da abertura e fechamento estomático (Ambreetha *et al.*, 2018; Poveda, 2020), além do aumento do conteúdo de osmólitos, induzir a expressão de genes para manter a integridade das membranas e regular o acúmulo de ROS (Jumali *et al.*, 2011; Mastouri *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019; da Silva *et al.*, 2023). Neste contexto, ainda não está claro a influência dos microrganismos sobre a vulnerabilidade de plantas herbáceas, como a soja, ao embolismo, o entendimento da recuperação subsequente após o alívio do estresse hídrico e, o impacto que isso pode gerar na produtividade.

REFERÊNCIAS

- Ambreetha, S., et al (2018) Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. **Rhizosphere**, 5, 57-66.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 11, de 15 de maio de 2007. Estabelece o Regulamento Técnico da Soja, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade intrínseca e extrínseca, a amostragem e a marcação ou rotula- 116 perdas em transporte e armazenagem de grãos gem. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 93, p. 13-15, 16 maio 2007a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 37, de 27 de julho de 2007. Altera o inciso IV, do art. 2º, do Capítulo I, do anexo da Instrução

- Normativa n. 11, de 15 de maio de 2007, que passa a vigorar com alterações, dando-se nova redação às alíneas “b” e “g” e acrescentando-se a alínea “h”.Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 145, p. 9, 30 jul. 2007b. Seção 1.
- Brodribb, Timothy J. et al. (2014) Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. **PNAS**, v. 111, n. 40, p. 14489- 14493.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Perdas em transporte e armazenagem de grãos: panorama atual e perspectivas / Organizadores Paulo Cláudio Machado Júnior e Stelito Assis dos Reis Neto. – Brasília, DF: Conab, 2021.
- D’Odorico, P., et al (2020) The global value of water in agriculture. *Proceedings of the national academy of sciences*, 117(36), 21985-21993.
- FAO (2017) Water for Sustainable Food and Agriculture A report produced for the G20 Presidency of Germany. 33p.
- Galmés J, et al (2013) Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. **Plant, Cell & Environment** 36: 920–935.
- Hammond, W. M. et al. (2019) Dead or dying? Quantifying the point of no return from hydraulic failure in drought-induced tree mortality. **New Phytologist**, v. 223, n. 4, p. 1834–1843.
- Hartmann, H. et al. (2018) Research frontiers for improving our understanding of droughtinduced tree and forest mortality. *New Phytologist*, v. 218, n. 1, p. 15–28.
- Jumali, S. S., et al (2011) Genes induced by high concentration of salicylic acid in 'Mitragyna speciosa'. **Australian Journal of Crop Science**, 5(3), 296-303.
- Mastouri, F., et al (2012) *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(9), 1264-1271.
- Mugiyo, H., et al. (2023) El Niño Effects on Southern African Agriculture in 2023/24, Anticipatory Action Strategies to Reduce the Impacts in Zimbabwe. Preprints 2023, 2023100421.
- Nannipieri, P. et al. (2017) Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, v. 68, n. 1, p. 12-26, 2017.
- Poveda, J. (2020). *Trichoderma parareesei* favors the tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.) to salinity and drought due to a chorismate mutase. **Agronomy**, 10(1), 118.

- Trueba S, et al (2017). Vulnerability to xylem embolism as a major correlate of the environmental distribution of rain forest species on a tropical island. **Plant Cell Environ** 40: 277– 289.
- van Schaik, E et al (2018) Changes in surface hydrology, soil moisture and gross primary production in the Amazon during the 2015/2016 El Niño. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1760), 20180084.
- Wang, A., et al (2018) Elevated CO₂ reduces the adverse effects of drought stress on a high-yielding soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar by increasing water use efficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, 132, 660-665.
- Xiong D, et al (2016) Leaf anatomy mediates coordination of leaf hydraulic conductance and mesophyll conductance to CO₂ in *Oryza*. **New Phytologist** 213: 572–583.
- Yaghoubian, I., et al (2022) Plant growth promoting microorganisms (PGPM) as an eco-friendly option to mitigate water deficit in soybean (*Glycine max* L.): Growth, physiological properties and oil content. **Plant Physiology and Biochemistry**, 191, 55-66.
- Zhang, S., et al (2019) Seed treatment with *Trichoderma longibrachiatum* T6 promotes wheat seedling growth under NaCl stress through activating the enzymatic and nonenzymatic antioxidant defense systems. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(15), 3729.
- Zou, J., et al (2021) Physiological and UPLC-MS/MS widely targeted metabolites mechanisms of alleviation of drought stress-induced soybean growth inhibition by melatonin. **Industrial Crops and Products**, 163, 113323.

CAPÍTULO I

Xylem plasticity and maintenance of hydraulic functionality: An analysis of the impact of drought and microbial inoculation on soybean plants

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the use of microorganisms in the attenuation of physiological and hydraulic damage caused by drought in soybean. Soybean plants, inoculated or not with microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Trichoderma asperellum*), were exposed to drought for 10 days. Then, the plants were re-watered and monitored until the complete recovery of the physiological processes. It was observed that soybean plants have high plasticity of the xylem vulnerability to embolism (measured as P_{50} values). The adjustment in P_{50} may allow soybean plants to balance growth and hydraulic safety during favorable and unfavorable conditions and allowed plants to operate with a higher hydraulic safety margin. This plasticity occurred in plants inoculated and not inoculated, but in plants treated with microorganisms, other aspects of water balance were affected. Indeed, although total and residual transpiration were similar in all plants subjected to stress, inoculated plants were able to maintain higher water transport in the stem and leaf and, consequently, showed greater foliar hydration and delayed lethal hydraulic failure. By maintaining hydraulic functionality, microorganisms not only decreased cellular damage induced by drought but also ensured faster recovery when water was available again in the soil, which is especially important for plants with short life cycles. Stomatal conductance remained low in non-inoculated plants even after complete recovery of water potential, showing that non-hydraulic factors were also part of stomatal control mechanisms. In addition, cellular damage also influenced the slower recovery of photosynthesis. This study contributes, therefore, to the understanding of water balance mechanisms in soybean grown under water restriction, providing information about xylem plasticity and the ability of microorganisms to interact with plants and alter hydraulic responses to stress.

Keywords: Water deficit, drought recovery, embolism, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma asperellum*.

1. Introduction

Climate change has altered natural and agricultural ecosystems, compromising crop survival and productivity due to the intensification of drought events (Malhi et al., 2021; Liaqat et al., 2022). One of the first responses of plants to water deficit consists of decreasing transpiratory rates through stomatal closure (Sousa et al., 2020), which reduces

photosynthetic activity consequently leading to negative carbon balance (Leng and Hall, 2019). This limitation to CO₂ diffusion is directly influenced by the plant's ability to transport water from roots to transpiring tissues (Carminati and Javaux, 2020; Lei et al., 2023). Hence, leaf hydraulic conductivity is fundamental for the maintenance of photosynthesis by providing an adequate supply of water capable of maintaining stomatal opening (Sack and Scoffoni, 2013). At the same time, the stomata closure helps to delay the occurrence of embolism in the xylem vessels (Martin-StPaul et al., 2017; Klein et al., 2018). Thus, as the soil dries out, stomata control leaf water loss to prevent the tension in the xylem vessels from increasing beyond the tolerance range of the hydraulic system (Choat et al. 2012; Islam et al., 2019). If this range is exceeded, the water column breaks due to the nucleation of air bubbles (Trueba et al., 2017; Islam et al., 2019), which may induce hydraulic failure, tissue desiccation, and ultimately plant death (Choat et al. 2012; Grossiord et al., 2017).

Despite being one of the main damages caused by drought, embolism is still little studied in crops. P_{50} and P_{88} are common parameters used to determine vulnerability to embolism and lethal hydraulic failure in plants, respectively. They consist of the value of the water potential at which 50% and 88% of the hydraulic conductivity is lost (Hartmann et al., 2018; Hammond et al., 2019). Although P_{50} and P_{88} values are relevant to characterize the vulnerability of different species to embolism (Urli, et al., 2013; Brodribb et al., 2020), these parameters should not be evaluated in isolation to characterize the damage triggered by hydraulic failure. This is because the plant water balance, determined also by water uptake and loss, can accelerate or delay the hydraulic impairment of the xylem (McDowell et al., 2022). Thus, in addition to stomatal functioning and xylem vulnerability to drought, other aspects such as residual transpiration ($g_{\text{leaf-res}}$), water uptake by the root system, and venation density can influence plant performance under stressful conditions (Li et al., 2016). For example, fast-growing plants generally have high photosynthetic rates and high $g_{\text{leaf-res}}$, which may increase xylem susceptibility to hydraulic failure even without changes in P_{50} (Blackman et al., 20169; Machado et al., 2021).

Soybean (*Glycine max* L. Merrill) is the main legume grown worldwide (Bandillo et al., 2017), but the climate instability with frequent short summer droughts may further aggravate the current economic losses and compromise the planting of this important crop (IPCC, 2014; Leng and Hall, 2019). An ecological and sustainable approach with the potential to generate crop improvement under abiotic stress is the use of microorganisms present in the soil and living in symbiosis with plants (Sathya et al., 2017; Sheirdil et al., 2019). The rhizosphere harbors a wide range of microorganisms that interact with roots through signaling pathways and exert a

beneficial effect on plant growth and productivity (Ahmad et al., 2013; Meena et al., 2017). Plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) comprise a group of bacteria and fungi that play a significant role in mitigating the damage triggered by water deficit stress, enhancing crop growth and yield (Sheirdil et al., 2019; Camargo et al., 2019). Microorganisms can improve plant drought tolerance through the production of antioxidant compounds, phytohormones, osmotic solutes, siderophores, alterations in leaf and root morphology, and even by regulating stress-responsive genes (Timmusk et al., 2014; Ngumbi and Kloepper, 2016; Barnawal et al., 2017; Meena et al., 2020; Ali and Khan, 2021). Many PGPMs also induce the production of hormones that influence xylem formation and development in plants, having the potential to affect plant vulnerability to embolism and consequently alter plant water balance. However, this hypothesis remains to be tested.

Among several microorganisms characterized as capable of enhancing plant growth, bacteria of the genus *Bacillus* and fungi of the genus *Trichoderma* stand out. They can fix and solubilize essential nutrients and provide metabolites involved in the tolerance mechanisms to abiotic stresses (Su et al., 2017, Camargo et al., 2019). Previous work has already demonstrated that inoculation of PGPMs in soybean promotes plant defense responses related to drought exposure (Moretti et al., 2021; Sheteiwiy et al., 2021; Hoang et al., 2022; da Silva et al., 2023). Despite these promising results, studies evaluating the possible beneficial effects of the interaction between different microorganisms are still needed to develop an efficient methodology for field application. Although PGPMs are commonly employed in isolation, the combination of microorganisms has a higher potential to induce responses in crops compared to single inoculation (Orozco-Mosqueda et al., 2021). Considering the central role of hydraulic functioning in plant response to drought, it remains to be investigated whether the beneficial effects triggered by microorganisms in drought-exposed plants correlate with the maintenance of water transport. Here, we evaluated the potential of PGPMs to mitigate drought-induced damage in soybean, focusing on aspects of water transport and xylem vulnerability to embolism. The study aimed to answer the following questions: *i*) How does drought impact soybean hydraulic responses? *ii*) Can different combinations of PGPMs and modes of application have different effects on plants exposed to water deficit? And *iii*) Does the addition of PGPMs have any impact on the hydraulic responses of soybean plants grown under water restriction? We tested the hypothesis that PGPMs can impact the vulnerability of the xylem to embolism, as well as alter characters involved in water conservation, assisting in the maintenance of hydration of plant tissues.

2. Material and methods

2.1. Growth conditions

The authors divided the work into two complementary experiments, due to the large number of treatments and analyses performed. The first experiment (item 2.2) was a *screening* of 14 different treatments, with different combinations of microorganisms and application forms. Regarding microorganisms, inoculations with a single microorganism or combinations of microorganisms were evaluated. Concerning the form of application, most works perform inoculation in the seeds before planting. However, since microorganisms are also susceptible to water deficit in the soil, seed inoculation may not be the best strategy, which is why the impact of foliar spraying was also evaluated. This *screening* served as the basis for the second experiment (item 2.3). In the second experiment, only the treatments that were most efficient in mitigating the damage caused by drought were used and an in-depth evaluation was carried out to understand the form of action of the microorganisms.

The two experiments were carried out in the greenhouse of the Ecophysiology and Plant Productivity Laboratory at the Goiano Federal Instituto, Campus Rio Verde, Goiás, Brazil (17°48'18.33"S, 50°54'0.04"W, 748 m altitude). Soybean seeds (cultivar Neo680, exhibits precocious flowering and early maturity) supplied by the Associated Research Group of Southwest Goiás (GAPES, Brazilian acronym) were sown in 9 L PVC pots containing fertilized soil, sand, and organic matter (2:1:1 v/v/v). Before fertilization, the soil was autoclaved to eliminate any microorganisms and ensure that the observed responses were triggered by the inoculated microorganisms. Plants were irrigated at field capacity (FC) until the beginning of the treatments.

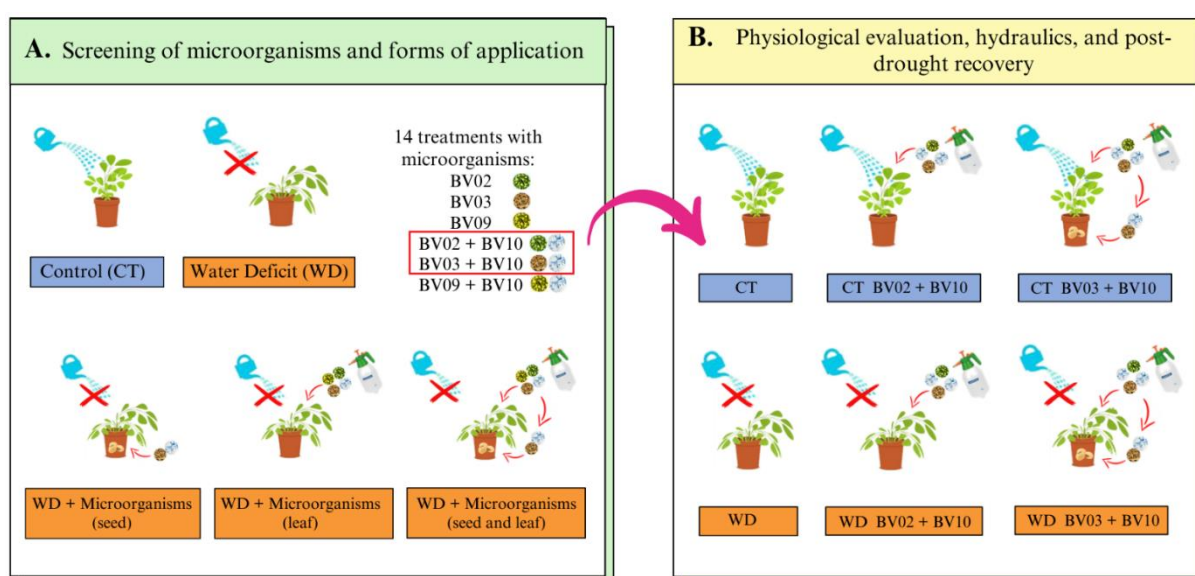


Fig. 1. Experimental design: In A, is represented the *screening* performed to verify which combination of microorganisms (upper panel) and which form of application (bottom panel)

would be most efficient to mitigate the damage triggered by drought. Microorganisms were applied in the seeds, leaves, or both (bottom panel). The most efficient combinations are marked with a red rectangle. In B are represented the treatments and forms of application selected to carry out the hydraulic and physiological evaluations of the plants in water deficit, as well as the post-drought recovery evaluation.

2.2. Screening of microorganisms and forms of application

To characterize the best mode of application and evaluate the beneficial potential of the combination of microorganisms, the soybean plants were irrigated at FC until reaching the V2 vegetative stage. Plants were then subjected to 14 treatments ($n = 5$) via seed inoculation or foliar application, using the standard doses indicated by the company Vittia S.A. Seed inoculation (6 mL kg^{-1} of seeds as recommended by the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA) was performed before sowing. The foliar application was carried out only on the 1st day of drought, using a CO₂-pressurized backpack sprayer, with a flow rate of 150 L ha^{-1} . Plants exposed only to drought, without the inoculation of microorganisms, were sprayed with irrigation water to maintain the same degree of hydration of tissues that received the foliar application of microorganisms. Plants were subjected to the following treatments:

T1 – Control

T2 – Water deficit (WD)

T3 – WD + BV03 (seed inoculation)

T4 –WD + BV03 (seed inoculation) + BV03 (foliar application)

T5 - WD + BV03 (seed inoculation) + BV10 (seed inoculation)

T6 - WD + BV03 (seed inoculation and foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application)

T7 – WD + BV09 (foliar application)

T8 - WD + BV09 (foliar application) + BV10 (foliar application)

T9 - WD + BV09 (foliar application) + BV10 (seed inoculation)

T10 - WD + BV09 (foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application)

T11 – WD + BV02 (foliar application)

T12 –WD + BV02 (foliar application) + BV10 (foliar application)

T13 – WD + BV02 (foliar application) + BV10 (seed inoculation)

T14 - WD + BV02 (foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application)

in which Bio-Imune[®] [MAPA (Brazilian acronym for the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply) registration number: 43418 - *Bacillus subtilis*], No-Nema[®] (MAPA registration number: 34518 - *Bacillus amyloliquefaciens*), Biobaci[®] (MAPA registration number: 36118 - *Bacillus subtilis*), and Tricho-Turbo[®] (MAPA registration number: 34018 - *Trichoderma asperellum*) are referred to as BV02, BV03, BV09, and BV10, respectively. All biostimulants were provided by Vittia S.A. and plants were subjected to the treatments for 10 days. The selection of microorganisms, as well as the combinations tested in the *screening*, were selected based on previous analyses carried out by the researchers involved in the work.

2.2.1 Leaf water potential (Ψ_w) and relative water content (RWC)

Midday leaf water potential (Ψ_{md}) was determined on individual leaves of each treatment at the end of the dry period using a Scholander-type pressure bomb. Leaf relative water content (RWC) was determined following the methodology proposed by Barrs and Wheelerley (1962).

2.2.2 Leaf gas exchanges measurements

The net carbon assimilation rate (A), stomatal conductance (g_s), and transpiration rate (E) were determined in an open system under saturating light (1000 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), with an infrared gas analyzer (IRGA, model LI-6400XTR Nebraska, USA).

2.2.3. Cell membrane integrity

The electrolyte leakage rate (ELR) in each treatment was determined according to Lutts et al. (1996), using a conductivity meter (Instrutherm Model CD-850). Five leaf discs (5 mm diameter) were immersed in 30 mL of deionized water and kept at room temperature for 24 h. The initial conductivity (C_I , $\mu\text{S cm}^{-1}$) was evaluated with a conductivity meter (Instrutherm Model CD-850). The samples were then transferred to an oven at 90 °C for 1 h to induce maximum (total) leakage (C_T , $\mu\text{S cm}^{-1}$). The ELR in each treatment was then calculated according to the following formula (Lutts et al., 1996):

$$\text{ELR (\%)} = (C_I / C_T) * 100$$

2.2.4. Chlorophyll index

The leaf chlorophyll index was determined with a portable chlorophyll meter (ChlorofiLOG1030®, Falker®, Porto Alegre, Brazil) to obtain the total chlorophyll content, expressed as the chlorophyll index.

2.3. Physiological evaluation, hydraulics, and post-drought recovery: Impact of inoculation on soybean plants exposed to drought

After the *screening*, soybean plants were grown again following the same pattern described in item 2.1 until reaching the reproductive stage R1. Plants were then subjected to the following treatments: (i) Control (CT - plants under full irrigation); (ii) CT BV02+BV10 (plants irrigated and treated with BV02 and BV10 via foliar application); (iii) CT BV03+BV10 (plants irrigated and treated with BV03 and BV10 via seed inoculation and foliar application); (iv) Water deficit (WD, suspension of irrigation until the amount of water in the soil reached 30% of the control levels); (v) WD BV02+BV10 (plants subjected to WD and treated with BV02 and BV10 via foliar application); and (vi) WD BV03+BV10 (plants subjected to WD and treated with BV03 and BV10 via seed inoculation and foliar application).

The combinations of microorganisms were based on the results of the *screening* and the application of treatments was performed as described in item 2.2. Plants were exposed to the treatments for 10 days before further analyses using leaves that expanded along the treatments.

2.3.1. Water relations and cell damage

2.3.1.1. Leaf water potential (Ψ_w)

The leaf water potential was determined in individual leaves of each treatment at the end of the dry period using a Scholander-type pressure bomb in the early morning (04:30 h - 05:30, Ψ_{pd}) and at midday (Ψ_{md}). The stem water potential (Ψ_{stem}) was measured at noon on a non-transpiring leaf covered with a ziploc plastic bag and aluminum foil for at least 1 h before the measurement (Begg and Turner, 1970; Choné et al., 2001).

2.3.1.2. Transpiration rates

Daily transpiration (E_a) was determined using a gravimetric method by the weight difference of the pots in the morning (05:00) and at noon (Lima et al., 2006; Silva et al., 2013). The value was divided by the total leaf area of each plant, the molecular weight of water, and the time interval between pot weighings.

2.3.1.3. Residual transpiration ($g_{\text{leaf-res}}$)

For determining $g_{\text{leaf-res}}$, leaves collected from each treatment were kept in the dark for 2 h to guarantee total stomatal closure. Subsequently, the leaves were weighed every 20 min on an analytical balance to measure water loss until reaching $g_{\text{leaf-res}}$. The temperature was recorded during the weighing, and the data were tabulated until the linearity of all the measurements was achieved. Weighings were stopped after obtaining at least three linear points (Brodrribb et al., 2014). The values obtained for $g_{\text{leaf-res}}$ were normalized by the total leaf area of the plant.

2.3.1.4. Plant hydraulic conductivity (K_{plant})

Plant hydraulic conductivity (K_{plant}) was determined according to Stiller et al. (2003), using E_d (described in section 2.3.1.2.) and the gradient between soil hydraulic (Ψ_{soil} - 04:30 - 05:30 am) and leaf hydraulic potential (Ψ_{leaf} - 12:00 pm):

$$K_{\text{plant}} = E_d / (\Psi_{\text{soil}} - \Psi_{\text{leaf}})$$

2.3.1.5. Leaf hydraulic conductance (K_{leaf})

Leaf hydraulic conductance (K_{leaf}) was estimated by the evaporative flux method, using transpiration (E), Ψ_{stem} , and Ψ_{leaf} . This technique required sampling of two adjacent leaves, one of which was used to measure Ψ_{stem} whereas the adjacent leaf was sampled for E and Ψ_{leaf} . The transpiration was measured with a gas analyzer (IRGA, model LI-6400XTR Nebraska, USA) at midday. After obtaining E , the leaf was collected for determination of Ψ_{leaf} . Leaves used as an assay for Ψ_{stem} were covered in plastic film and aluminum foil before the measurement period to ensure equilibration between the covered Ψ_{leaf} and Ψ_{stem} (Simonin et al., 2015). K_{leaf} was obtained according to Ohm's Law:

$$K_{\text{leaf}} = E / (\Psi_{\text{stem}} - \Psi_{\text{leaf}})$$

2.3.1.6. Cell membrane damage

Cell membrane damage was characterized by the ELR, following the same methodology described in section 2.2.3.

2.3.2. Embolism tolerance

2.3.2.1. Sapwood-specific hydraulic conductivity and percentage loss of conductivity (PLC)

Sapwood-specific hydraulic conductivity (K_{stem}) was determined in the main stem of soybean following the protocol proposed by Markesteijn et al. (2011). The pots were transported to the laboratory, where the soybean stem was separated from the root and shoot apex under

distilled water. While submerged, the end of the stem was connected to a tubing system attached to a pressurized reservoir (150 kPa) filled with a flow solution of 10 mmol KCl dissolved in degassed and filtered (0.2 μm) distilled water. An elevated water reservoir supplied the same flow solution to the stems, with the height quantified for each conductivity measurement to allow the determination of pressure (approximately 5 kPa). The mass of the solution flowing per unit time through the segments was constantly monitored to determine the K_{stem} . After obtaining K_{stem} , the cavitated vessels were recovered by infiltrating the perfusion solution (20 mM KCl and 1 mM CaCl_2) using a vacuum pump. Afterward, sapwood-specific hydraulic conductivity was measured again to obtain the maximum hydraulic conductivity (K_{max}). The PCL was calculated according to the formula:

$$\text{PCL} = 100 \times [1 - (K_{\text{stem}}/K_{\text{max}})]$$

2.3.2.2. Embolism vulnerability and hydraulic safety margin

To determine embolism vulnerability, soybean plants of each treatment were removed from the soil, had their roots washed, and were kept hydrated in water for the whole night. After that, plants were placed on a bench to simulate gradual desiccation caused by water scarcity events. One leaf of each plant was continuously monitored to verify the occurrence of embolism with the optical light transmission method (Brodribb et al., 2016), which monitors changes in light transmission through the xylem vessels. Photos were taken every 4 min for 4 days allowing the visualization of embolism in the xylem vessels in real time. The images obtained were processed and analyzed with ImageJ software and OSOV package and used for determining P_{50} and P_{88} (Brodribb et al., 2017). During the dry-down period, the water potential measurements were taken every 1-3 h using a Scholander pressure chamber. Vulnerability curves were generated using the Weibull function of the fitPLC package in R v.4.0.2 (R Core Team 2018). The xylem vulnerability to embolism was assessed and associated with water potential values to obtain the water potential value at which 50% (P_{50}) or 88% (P_{88}) of xylem vessels were cavitated. T_{P50} was defined as the time between the onset of monitoring the vulnerability curve to embolism and the point at which 50% of the vessels were embolized.

The hydraulic safety margin was calculated based on the difference between Ψ_{min} (lowest water potential during the imposition of drought) and P_{50} and Ψ_{min} and P_{88} , according to the formula:

$$\text{HSM}_{50} = \Psi_{\text{min}} - P_{50}; \text{ and } \text{HSM}_{88} = \Psi_{\text{min}} - P_{88}$$

2.3.3. Leaf area

Leaf area (cm²) was measured non-destructively by taking pictures of all the leaves per plant in each treatment. The images were analyzed using ImageJ software.

2.3.4. Root dry weight

Plant roots were removed from the pots and washed in water before drying in a forced circulation oven at 70°C. The root dry weight was obtained using an analytical balance (Silva et al., 2013).

2.3.5. Post-drought recovery

To evaluate post-drought recovery, plants were well irrigated (at 100 % FC) after 10 days of drought. The Ψ_{md} , K_{plant} , g_s , E , and A were evaluated daily (following the methodologies described in the previous sections) until all variables were similar to the control.

2.3.6. Statistical analyses

The experiment was conducted in a randomized block design ($n = 5$). Data normality was checked using the Shapiro-Wilk test, and differences among treatments were tested via ANOVA followed by post hoc SNK test ($P < 0.05$). For post-drought recovery data, each variable was compared with the control using Student t -test ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Screening

The imposition of drought for 10 days affected the water relations and physiology of the soybean plants (Table 1). Treatments with microorganisms were effective in mitigating the damage caused by drought, but treatments T6 and T12 stood out. All treatments with microorganisms decreased membrane damage when compared with the WD treatment. Treatments T6, T11, and T12 were the only ones in which the Ψ_{md} remained higher than in plants submitted only to drought. In T6, T7, T8, T12 and T14 treatments, an increase in A was observed, without increments in g_s or E , which is very promising for cultures. Finally, the chlorophyll index at T4, T6, and T12 was higher than in plants subjected only to water deficit. Thus, as they are the only treatments that improved all parameters evaluated during *screening*, T6 (WD + BV03 (seed inoculation and foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application)) and T12 (WD + BV02 (foliar application) + BV10 (foliar application)) were selected for deeper characterization and the results are described in topic 3.2.

Table 1. Leaf water potential at midday (Ψ_{md}), relative water content (RWC), net carbon assimilation rate (A), stomatal conductance (g_s), transpiration rate (E), and total chlorophyll contents (Chl_{total}) in soybean plants under full irrigation or subjected to drought and treated or not with different combinations of microorganisms. The plants were subjected to the following treatments: *T1* – Control; *T2* – water deficit (WD); *T3* – WD + BV03 (seed inoculation); *T4* – WD + BV03 (seed inoculation) + BV03 (foliar application); *T5* – WD + BV03 (seed inoculation) + BV10 (seed inoculation); *T6* – WD + BV03 (seed inoculation and foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application); *T7* – WD + BV09 (foliar application); *T8* – WD + BV09 (foliar application) + BV10 (foliar application); *T9* – WD + BV09 (foliar application) + BV10 (seed inoculation); *T10* – WD + BV09 (foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application); *T11* – WD + BV02 (foliar application); *T12* – WD + BV02 (foliar application) + BV10 (foliar application) ; *T13* – WD + BV02 (foliar application) + BV10 (seed inoculation); *T14* – WD + BV02 (foliar application) + BV10 (seed inoculation and foliar application).

Treatment	Ψ_{md} (MPa)	RWC (%)	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	ELR (%)	Chl_{total} FCI
T1	-0.23 a	80.88 ± 0.70 a	23.39 ± 1.17 a	1.13 ± 0.01 a	0.012 ± 0.00 a	15.29 ± 0.15 c	39.42 ± 0.48 ab
T2	-0.86 c	64.89 ± 3.31 b	11.49 ± 0.93 e	0.09 ± 0.26 b	0.002 ± 0.00 c	26.30 ± 0.41 a	33.67 ± 0.23 c
T3	-0.87 c	62.81 ± 2.50 b	15.67 ± 3.13 bcde	0.21 ± 0.01 b	0.004 ± 0.00 bc	20.02 ± 0.16 b	36.02 ± 0.48 bc
T4	-0.75 bc	72.79 ± 3.18 ab	16.82 ± 0.93 bcde	0.35 ± 0.08 b	0.006 ± 0.00 bc	22.35 ± 0.16 b	38.40 ± 0.16 ab
T5	-0.63 bc	71.37 ± 3.18 ab	15.69 ± 0.93 bcde	0.23 ± 0.08 b	0.004 ± 0.00 bc	20.88 ± 0.31 b	36.90 ± 0.66 abc
T6	-0.58 b	72.65 ± 2.14 ab	18.50 ± 0.91 abcd	0.23 ± 0.08 b	0.004 ± 0.00 bc	18.74 ± 0.18 b	40.60 ± 0.88 a
T7	-0.63 bc	71.89 ± 3.06 ab	20.70 ± 0.51 ab	0.37 ± 0.02 b	0.006 ± 0.00 b	20.63 ± 0.19 b	37.07 ± 0.58 abc
T8	-0.63 bc	69.39 ± 2.97 ab	19.76 ± 0.15 abc	0.39 ± 0.05 b	0.007 ± 0.00 b	21.30 ± 0.65 b	37.65 ± 0.59 abc
T9	-0.70 bc	70.85 ± 2.75 ab	14.20 ± 0.45 cde	0.19 ± 0.04 b	0.004 ± 0.00 bc	21.80 ± 0.38 b	37.00 ± 0.48 abc
T10	-0.72 bc	68.54 ± 3.50 ab	14.90 ± 0.47 cde	0.16 ± 0.02 b	0.003 ± 0.00 bc	20.77 ± 0.35 b	35.65 ± 0.60 bc
T11	-0.58 b	71.76 ± 2.05 ab	13.28 ± 1.05 de	0.23 ± 0.12 b	0.004 ± 0.00 bc	21.81 ± 0.31 b	35.75 ± 0.48 bc
T12	-0.55 b	74.77 ± 2.09 ab	18.86 ± 1.68 abcd	0.30 ± 0.03 b	0.005 ± 0.00 bc	19.22 ± 0.31 b	38.52 ± 0.47 ab
T13	-0.74 bc	69.83 ± 3.08 ab	14.90 ± 0.49 cde	0.22 ± 0.02 b	0.004 ± 0.00 bc	21.83 ± 0.23 b	35.60 ± 0.87 bc
T14	-0.60 bc	71.20 ± 1.43 ab	18.56 ± 0.33 abcd	0.26 ± 0.04 b	0.005 ± 0.00 bc	18.76 ± 0.70 b	37.00 ± 0.50 abc

Data are means ± SE ($n = 5$). Different letters represent significant differences (SNK test, $P < 0.05$).

3.2. Physiological evaluation, hydraulics, and post-drought recovery: Impact of inoculation on soybean plants exposed to drought

3.2.1. Water relations (water status)

Exposure to drought resulted in soybean plants with altered water relations (Fig. 2). All treatments led to lower early morning water potential (Ψ_{am}) and WD BV02+BV10 had increased values of this variable (Fig. 2A). The midday water potential (Ψ_{md}), in turn, showed a decrease only in plants exposed only to water deficit (WD) and remained constant in

treatments combining WD with microorganisms (Fig. 2B). This same pattern was observed for the stem water potential (Ψ_{stem}) (Fig. 2C).

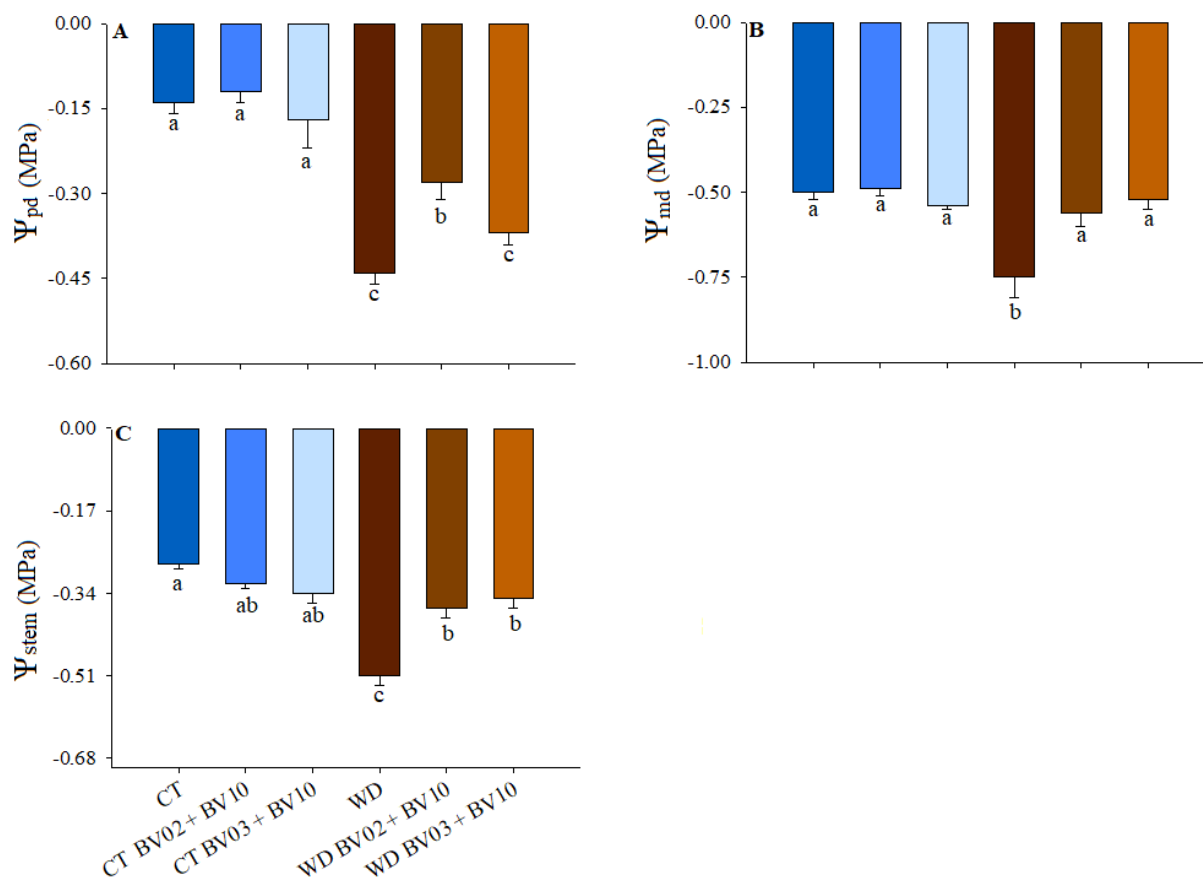


Figure 2. Water relations: predawn water potential (Ψ_{pd} - A), midday water potential (Ψ_{md} - B), and stem water potential (Ψ_{stem} - C) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$).

3.2.2. Water relations (transport)

The daily transpiration (E_d) was reduced in all WD treatments (Fig. 3A), while the residual transpiration ($g_{\text{leaf-res}}$) was lower in WD and WD BV02+BV10 when compared with CT BV02+BV10, which presented the highest value in this parameter (Fig. 3B). Concerning the hydraulic conductivity of the plant (K_{plant}), most treatments showed values close to the control and the only significant change was detected comparing WD and CT BV02+BV10 (Fig. 3C). K_{leaf} had a sharp decrease in WD and microorganism inoculation led to significant increments in this parameter (Fig. 3D).

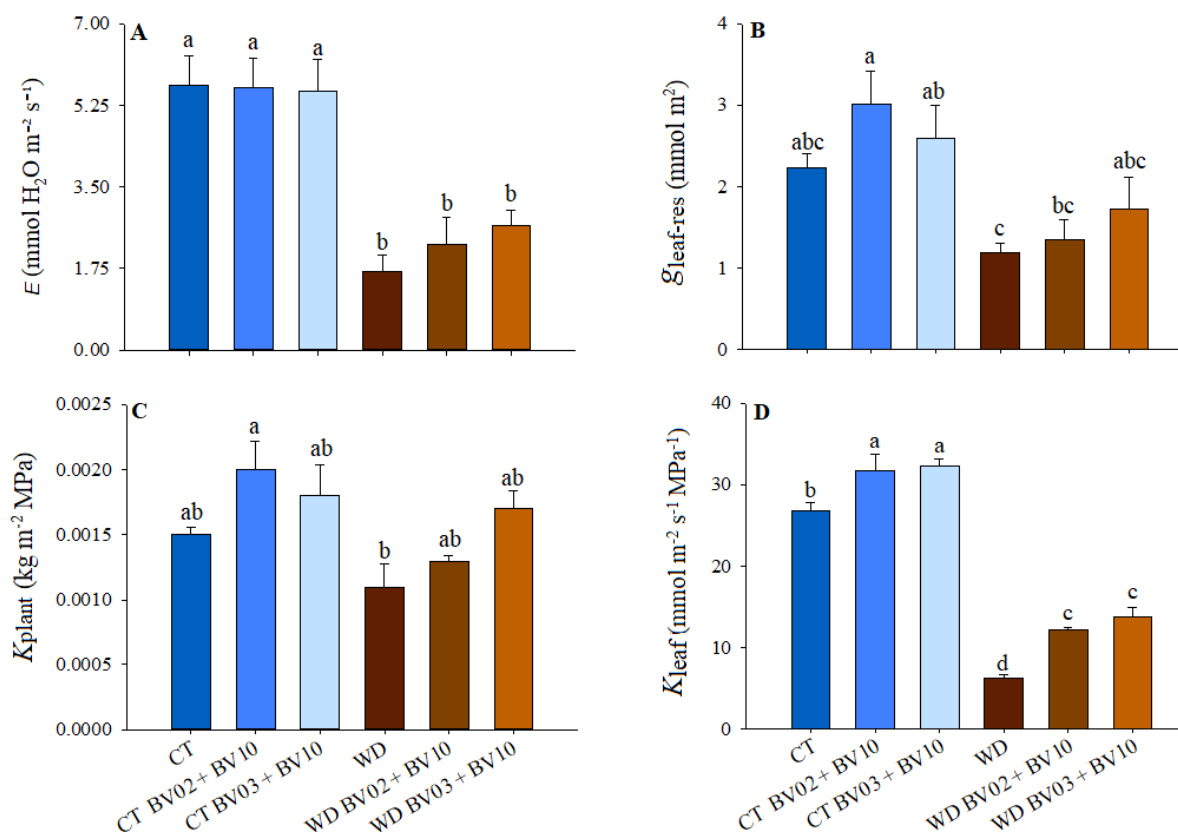


Figure 3. Water loss and transport: transpiration rate (E - A), leaf residual transpiration rate ($g_{leaf-res}$ - B), plant hydraulic conductivity (K_{plant} - C), and leaf hydraulic conductivity (K_{leaf} - D) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms.. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$).

3.2.3 Percentage loss of conductivity (PLC)

Exposure of plants to WD promoted a 35% loss of hydraulic conductivity in the xylem vessels of the stem. When the drought was combined with the inoculation of microorganisms, plants showed, on average, 21% PCL (Fig. 4).

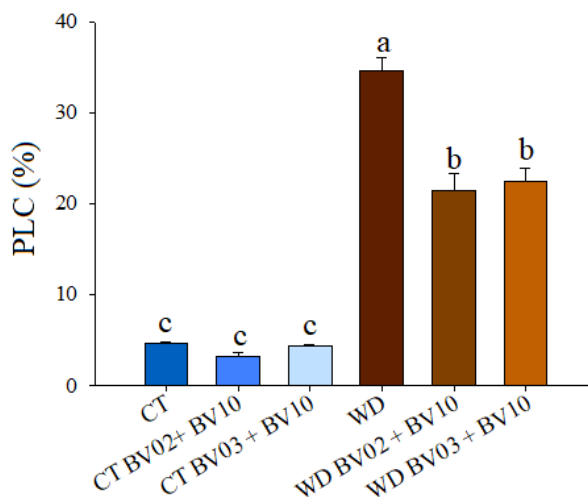


Figure 4. Percentage loss of conductivity (PLC) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$).

3.2.4. Embolism tolerance

Soybean plants exposed to drought showed increased embolism tolerance, with increments in both P_{50} and P_{88} when compared with the control (Fig. 5A-C). The same pattern was observed in WD BV02+BV10, while plants subjected to WD BV03+BV10 were similar to the control. The mean values of Ψ_w to reach P_{50} were -2.6 MPa for WD and WD BV02+BV10, and -1.8 MPa in WD BV03+BV10 (Fig. 5B). Similarly, in WD BV03+BV10 the P_{88} was on average -2.2 MPa, while in the other plants subjected to drought this value was -3.2 MPa (Fig. 5C). Soybean plants cultivated under full irrigation operate with narrow (< 1 MPa) hydraulic safety margins (Fig. 5 D-E). Xylem plasticity in drought-exposed soybeans, however, increased HSM₅₀ and HSM₈₈ in WD and WD BV02+BV10 treatments. The combination of microorganisms led to a greater time spent to reach 50% of hydraulic failure (T_{P50}) and lethal hydraulic failure (T_{P88}) (Fig. 5F-G), and this difference was more expressive in the treatment with *B. subtilis* + *T. asperellum*, in which T_{P88} was almost the double of that observed for plants in WD only.

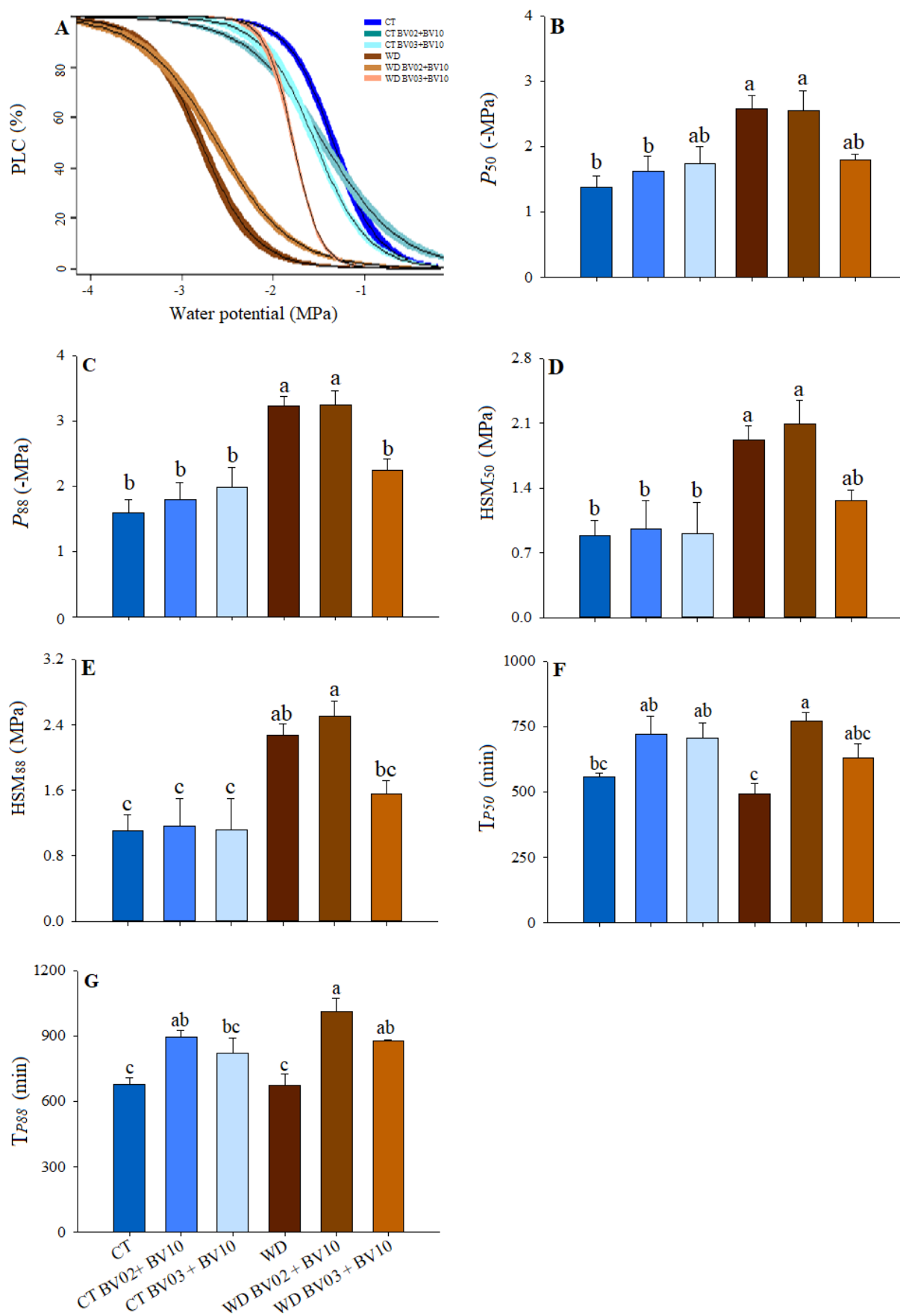


Figure 5. Embolism tolerance: Embolism vulnerability curves (A), water potential at which 50% (P_{50} - B) and 88% (P_{88} - C) of the hydraulic conductivity is lost, hydraulic safety margin

until reaching P_{50} (HSM₅₀ - D) and P_{88} (HSM₈₈) (E), time to reach 50% of hydraulic failure (T_{P50} - F), and time to reach lethal hydraulic failure (T_{P88} - G) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms.. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$).

3.2.5. Cell membrane integrity

ELR increased by around 20% in soybean plants subjected to WD, while it remained similar to the control when microorganisms were inoculated in combination with drought (Fig. 6).

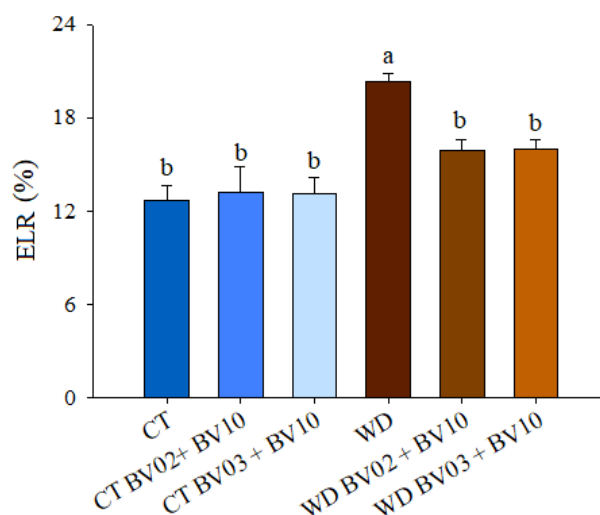


Figure 6. Electrolyte leakage rate (ELR) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$).

3.2.6. Foliar leaf area, leaf venation density, and root biomass

Soybean plants subjected to drought had a significantly reduced number of leaves in all treatments (Fig. 7A). However, the inoculation of the microorganisms increased the leaf venation density, with values higher than those observed in WD only (Fig. 7B). All treatments

exposed to water deficit showed a reduction in the dry mass of the root system. Despite this, root dry mass was higher in treatment WD BV03+BV10 compared to WD (Fig. 7C).

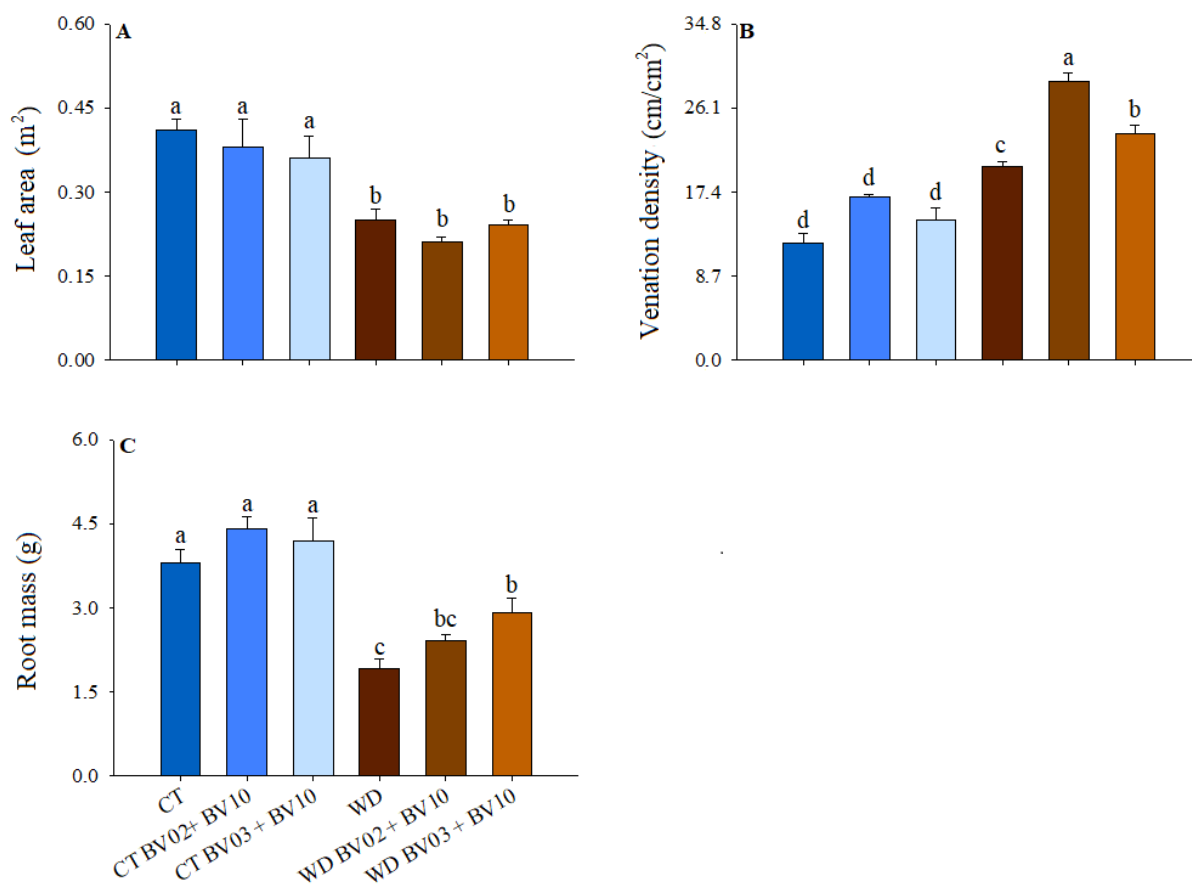


Figure 7. Leaf area (A), venation density (B) and root dry mass (C) in soybean plants fully irrigated (control – CT) or subjected to drought (WD), alone or in combination with microorganisms. Two combinations of microorganisms were applied: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* via foliar application); and BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* via seed inoculation and foliar application). Means followed by the same letter do not differ from each other by the SNK test ($P < 0.05$).

3.2.7. Post-drought recovery

Soybean plants exposed to drought were able to fully recover hydraulic parameters on the first day after rehydration (Fig. 8A-B). Diffusive parameters were only restored on the third day and photosynthetic rates from the fourth day after the start of rehydration (Fig. 8C-E). Both combinations of microorganisms accelerated the recovery of g_s and photosynthesis, with the net carbon assimilation rate being similar to the control already on the second day after the start of rehydration.

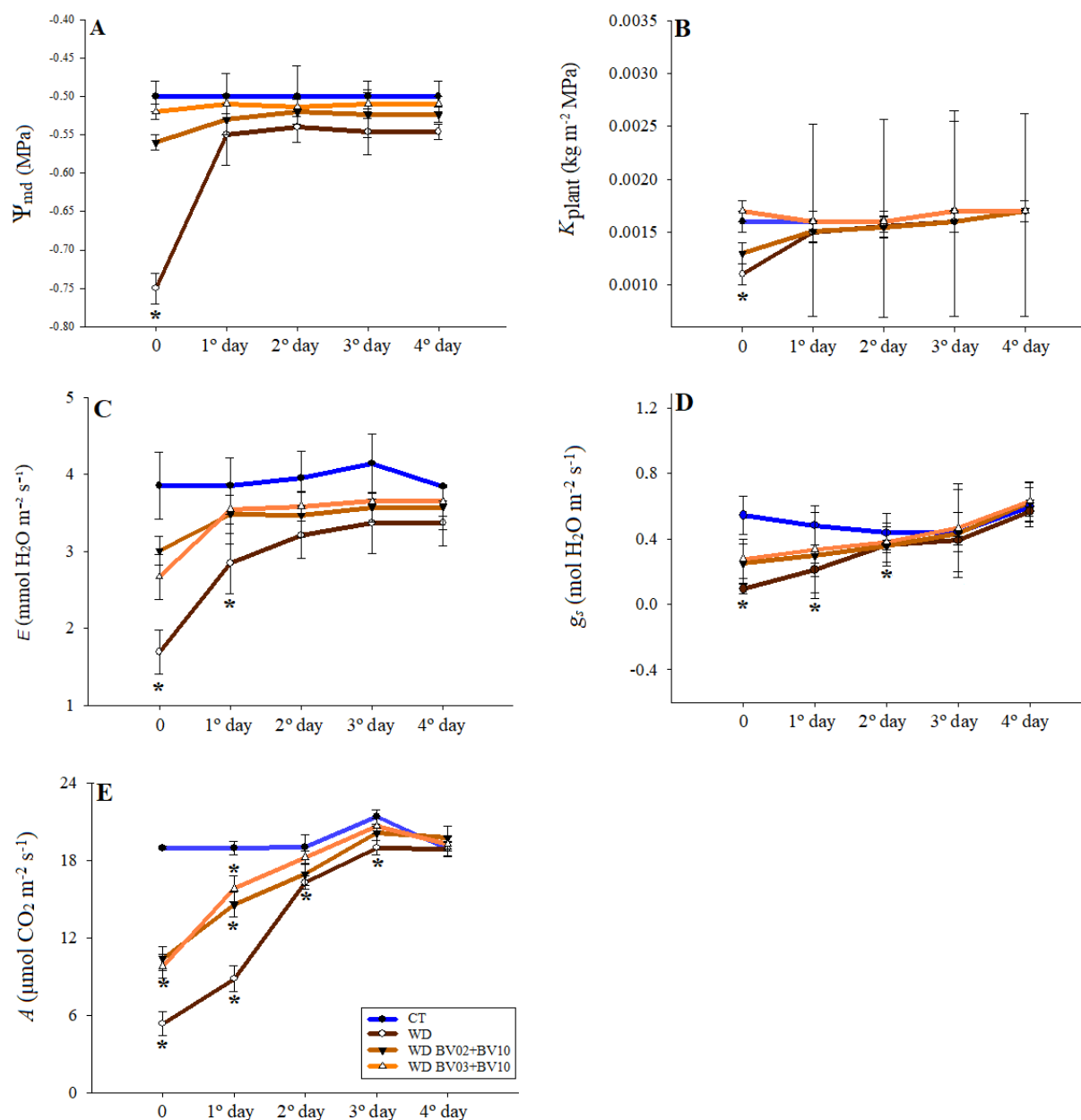


Figure 8. Post-drought recovery: recovery of hydraulic and photosynthetic parameters in soybean plants. The variables (midday water potential (Ψ_{md} - A), plant hydraulic conductivity (K_{plant} - B), stomatal conductance (g_s - C), transpiration rate (E - D), and net carbon assimilation rate (A - E)) were evaluated after 10 days of drought (day 0) and daily for four days after rehydration. For each evaluated day, means followed by an asterisk (*) differ from the control by the Student t -test ($P < 0.05$).

4. Discussion

4.1. *The combination of microorganisms is more efficient than single inoculation in maintaining physiological processes*

Several studies have highlighted the beneficial effect of microorganisms on plant response to drought, but inoculation with multiple microorganisms is a more recent and promising strategy compared to single inoculation (Tabacchioni et al., 2021). This is because the combined use of distinct microorganisms results in a broader spectrum of responses triggered in plants, representing an interesting alternative to increase plant tolerance to different environmental conditions (Bradáčová et al., 2019; Tabacchioni et al., 2021). Our results reinforce this hypothesis as the combination of microorganisms, except for the T9 treatment, resulted in a more conspicuous response in soybean plants exposed to drought in comparison to single inoculation (Table 1). Indeed, the bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* acted synergistically with the fungus *Trichoderma asperellum*, increasing the photosynthetic capacity of the plants, and maintaining the degree of tissue hydration and the chlorophyll index.

The differential response of plants treated with BV02 and BV10 via foliar application and with BV03 and BV10 via seed inoculation and foliar application may be a consequence of the impact of the stresses on the microorganism colonization. Indeed, microorganisms are also affected by water stress (Rahman et al. 2021), so their performance and survival can be impacted and, consequently, their effect on the plant will be different. Although in this study we did not assess the inoculation efficiency or the survival rate of the microorganisms, it is feasible to suggest that the colonies remained viable at least long enough to impact plant physiology, due to the various contrasting responses between treatments only with stress and treatments with stresses + microorganisms. The greater response shown in the plants of the selected treatments, however, may be a consequence of the mode of application (foliar application, so that the microorganisms were not exposed to soil drought); or the greater drought tolerance of the selected microorganisms.

4.2. *Plasticity of the hydraulic apparatus and water relations: The effect of drought and the synergistic action of microorganisms*

Water potential reflects the water status of the plant and is determined, in an integrated manner, by the processes of water uptake, transport, and loss (Jain et al., 2021). Plants typically minimize the risk of hydraulic dysfunction and lethal dehydration of tissues via stomatal regulation (Creek et al., 2018) but changes in residual transpiration ($g_{\text{leaf-res}}$) are also

determinants of plant survival during water deficit (Machado et al., 2021). The higher water potential values in soybean treated with microorganisms did not involve modifications in transpiratory processes (Fig. 3A-B) but changes in water transport were determinants for leaf hydration. The microorganisms assisted in maintaining K_{plant} at similar levels to the control, which contributed to higher K_{leaf} (Fig. 3C-D) (Scoffoni et al., 2018). Increases in K_{leaf} have already been associated with the maintenance of water potential in soybean plants (Sousa et al., 2020), but the synergistic effect of *B. subtilis* and *T. asperellum*, and *B. amyloliquefaciens* and *T. asperellum* on these traits had not yet been demonstrated.

A preponderant factor for the response observed in K_{plant} was the maintenance of a functional xylem in the stem capable of transporting water to the transpiring surfaces, as evidenced by the lower PLC in plants treated with the microorganisms (Fig. 4). Increases in PLC are often associated with a blockage in water transport due to nucleation of air bubbles (Scoffoni et al., 2017). The occurrence of embolism is also pointed out as a determinant for decreases in K_{leaf} . In this work, treatments combining drought and microorganisms did not affect the P_{50} of the leaves when compared to plants exposed to water restriction only (Fig. 5A-B). It is likely, therefore, that the microorganisms affected other aspects of water transport that contributed to the maintenance of K_{leaf} . By maintaining higher K_{plant} , for example, the microorganisms facilitated water transport to the leaves, preventing structural damages that could compromise leaf hydraulic conductance. This is in line with electrolyte leakage data (Fig. 6) showing that drought compromised the integrity of cell membranes, which was attenuated in plants treated with microorganisms.

It is interesting to note that, although no differences in the vulnerability of the xylem to embolism between the WD and WD BV02+BV10 were observed, these two treatments differ from plants kept fully irrigated (Fig. 5A-C), with decreases in the values of P_{50} and P_{88} after the application of stress. Soybean, including the cultivar analyzed in this study, is particularly vulnerable to embolism, having 50% of its hydraulic conductivity compromised when reaching water potential near -1.0 MPa. Although not a universal pattern, different species present a trade-off between efficiency and hydraulic safety (Markestijn et al., 2011; Gleason et al., 2016; Liu et al., 2021). Species with more vulnerable xylem tend to present higher hydraulic conductivity, which, in turn, favors gas exchange and growth (Reich et al., 2003). Thus, the high vulnerability of soybean to embolism may be a consequence of structural characteristics that allow its rapid growth and short life cycle, while the plastic capacity of the xylem observed here would increase hydraulic safety during drought events, enabling plant survival and recovery after the stress. Similar results have been observed for sunflower (Cardoso et al.,

2018), indicating that xylem plasticity in response to drought may be a strategy that allows herbaceous plants to prioritize growth or hydraulic safety according to environmental conditions. Another possibility may involve the high construction costs of embolism-tolerant xylem (Eller et al., 2018). The plasticity would guarantee the construction of “expensive” xylem vessels (in terms of carbon investment) only when it would be essential. The plasticity also allowed plants subjected to drought (except for WD BV03+BV10) to operate with higher HSM, decreasing the risk of leaf hydraulic failure (Fig. 5D-E).

Despite not having decreased P_{50} and P_{88} in comparison with plants exposed only to drought, treatment with microorganisms delayed the occurrence of lethal hydraulic failure (T_{P88}), practically doubling the time that the crop took to reach P_{88} (Fig. 5G). This effect of microorganisms is extremely interesting because it increases the time thresholds of water stress exposition within which plants can maintain the functionality of their hydraulic apparatus. Moreover, in many places soybean is grown during the rainy season (Adie and Krisnawati, 2021; Brumatti et al., 2020), in which water restriction events, although frequent, are succeeded by the return of precipitation. Thus, delaying the occurrence of hydraulic failure may allow this crop to survive until water is again available in the soil.

Although the delay in T_{P88} is important, one can ask: if the values of P_{50} and P_{88} in leaves did not decrease, how did the addition of the microorganisms delay the hydraulic failure in these organs? In this sense, it is worth noting that the maintenance of the hydraulic functioning of plants is a complex process, which could hardly be explained by a single parameter. A characteristic that certainly contributed to the delay of the hydraulic failure in the leaves was the lower PLC in the stem of the plants inoculated with microorganisms (Fig. 4). The maintenance of stem conductivity would favor the transport of water from the internal reservoirs to the leaf. Even without changes in the amount of water stored in the root or stem tissues, the maintenance of the hydraulic conductivity of the stem, by itself, would already allow greater reallocation of water resources, delaying the variations in leaf water potential (Scholz et al., 2011). The higher venation density, observed in both treatments that associated drought with microorganisms (Fig. 7B), is another factor that may helped to delay lethal hydraulic failure in soybean leaves due to a higher water transport rate (higher K_{leaf}). This is because the higher number of veins per unit surface area increases alternative water pathways in case of partial drought-induced damage to leaf veins (Nardini et al., 2012; Nardini et al., 2014). Finally, for the WD BV03+BV10 treatment, the longer time to reach the lethal hydraulic failure may be correlated with the higher root biomass (Fig. 7C). Increased root mass allows for maximizing soil water exploration, which contributes to greater water uptake and absorption from deeper

soil layers (Bacher et al., 2023). The greater root biomass also enables more water to be stored in the root tissues, which can be distributed to other organs, such as stems and leaves (Domec et al., 2009).

4.3. Soybean recovery from drought

The ability of plants to recover after a stressful event is essential for their survival and recovery of their productive potential (Couchoud et al., 2020), especially for soybean that endures drought events often followed by the return of precipitation (Roldão et al., 2015). For some crops, such as maize, the ability to recover from damage triggered by water deficit may be more important for plant resilience than drought tolerance per se (Chen et al., 2016). *G. max* plants were able to rapidly recover water relations parameters (Ψ_w and K_{plant}), with complete restoration of water transport and leaf hydration 24 h after water resupply (Fig. 8A-B). Some authors associate the rapid recovery of hydraulic processes with active repair mechanisms of embolized vessels (Martorell et al., 2014). Considering that refilling has so far not been fully proven even in herbaceous plants (Johnson et al., 2018; Lamarque et al., 2018), we reasoned that the rapid recovery occurred because no extensive impairment of stem water transport occurred in any of the plants. Even in the plants exposed to drought only, the loss of stem hydraulic conductivity remained below 50% (Fig. 4). Similarly, due to the plasticity of the leaf xylem, in all treatments the plants operated far from the thresholds that cause hydraulic dysfunction. Thus, much of the xylem remained functional and was able to transport water as soon as this resource became available again in the soil.

For plants exposed to drought only, a delay in the recovery of g_s was observed (Fig. 8C-D) as this parameter remained lower than in control plants even after Ψ_w recovery. These data highlight that, after water restriction, non-hydraulic factors are also involved with stomatal regulation in soybean. As observed by McAdam and Brodribb (2015), this delay was likely caused by the time required for the complete degradation of ABA and other signaling molecules involved in stomatal closure. However, even after the complete restoration of g_s , the photosynthetic rate in the WD treatment remained compromised, which did not occur in plants inoculated with microorganisms (Fig. 8E). This delay in A recovery may be related to the occurrence of cellular damage in photosynthetic membranes, which would keep carbon assimilation rates lower regardless of CO_2 availability (Wang et al., 2018). In contrast, the synergistic action of microorganisms was effective in maintaining cellular structures (Fig. 6), which enabled a twofold faster recovery of photosynthetic rate. Delayed recovery of photosynthetic rate can have significant impacts on crop growth and productivity, especially

considering that short-lived crops such as soybean experience more than one drought event before the end of the reproductive stage.

5. Conclusions

In this study, we demonstrated that soybean has a high plasticity of its hydraulic apparatus, which not only allows conciliate growth and drought safety but also guarantees a fast recovery of tissue hydration after stress. Despite this, the recovery of the photosynthetic process occurred slowly, both due to diffusion factors, which showed a recovery delay compared to water potential; as well as non-stomatal limitations, reflecting the damage induced by water deficit. The combined inoculation of microorganisms, however, was efficient in mitigating the damage induced by drought by ensuring the maintenance of hydraulic functioning and delaying lethal hydraulic failure, which involved a decrease in the generation of embolisms in the stem, an increase in root biomass, and changes in vein density in the leaves. Therefore, this study demonstrates that soybean can modify its hydraulic characteristics when exposed to drought, which may reflect differential strategies of herbaceous plants with a short life cycle, and that these mechanisms can be maximized by interaction with microorganisms.

References

- Adie, M.M., Krisnawati, A., 2021. Yield and yield component performance of soybean promising line in upland during the rainy season. In IOP Conference Series: Earth Environ Sci. 911, 012021.
- Ahmad, M., Zahir, Z.A., Nadeem, S.M., Nazli, F., Jamil, M., Khalid, M., 2013. Field evaluation of Rhizobium and Pseudomonas strains to improve growth, nodulation and yield of mung bean under salt-affected conditions. *Soil Environ.* 32, 158–165.
- Ali, S., Khan, N., 2021. Delineation of mechanistic approaches employed by plant growth promoting microorganisms for improving drought stress tolerance in plants. *Microbiol. Res.* 249, 126771.
- Araújo-Filho, P.F., 2019. Análise climática do verânico no período chuvoso do município de São José do Egito - PE. In: XXIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Foz do Iguaçu – PR. 1-10.
- Bacher, H., Montagu, A., Herrmann, I., Walia, H., Schwartz, N., Peleg, Z., 2023. Stress-induced deeper rooting introgression enhances wheat yield under terminal drought. *J Exp Bot.* erad059.
- Bandillo, N.B., Anderson, J.E., Kantar, M.B., Stupar, R.M., Specht, J.E., Graef, G.L., Lorenz, A.J., 2017. Dissecting the genetic basis of local adaptation in soybean. *Sci Rep.* 7: 17195.
- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S.S., Pandey, A., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2017. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiol. Plant.* 161, 502-514.
- Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15, 413-428.
- Begg, J.E., Turner N.C., 1970. Water potential gradients in field tobacco. *Plant Physiol.* 46, 343-346.

- Blackman, C.J., Pfautsch, S., Choat, B., Delzon, S., Gleason, S.M., Duursma, R.A., 2016. Toward an index of desiccation time to tree mortality under drought. *Plant Cell Environ.* 39, 2342-2345.
- Bradáčová, K., Florea, A.S., Bar-Tal, A., Minz, D., Yermiyahu, U., Shawahna, R., J.A., Erel, R., Dietel, K., Weinmann, M., Zimmermann, B., Berger, N., Ludewig, U., Neumann, G., Pošta, G., 2019. Microbial consortia versus single-strain inoculants: an advantage in PGPM-assisted tomato production? *Agronomy.* 9, 105.
- Brodribb, T.J., Carriqui, M., Delzon, S., Lucani, C. 2017. Optical measurement of stem xylem vulnerability. *Plant Physiol.* 174, 2054–2061.
- Brodribb, T.J., Powers, J., Cochard, H., Choat, B., 2020. Hanging by a thread? Forests and drought. *Science*, 368, 261-266.
- Brodribb, T.J. McAdam, S.A., Jordan, G.J., Martins, S.C. 2014. Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. *PNAS.* 111, 14489- 14493.
- Brodribb, T.J., Bienaimé, D., Marmottant, P., 2016. Revealing catastrophic failure of leaf networks under stress. *PNAS.* 113, 4865-4869.
- Brumatti, L.M., Pires, G.F., Santos, A.B., 2020. Challenges to the adaptation of double cropping agricultural Systems in Brazil under changes in climate and land cover. *Atmosphere.* 11, 1310.
- Camargo, G.S.M., 2019. Ação de *Trichoderma sp.* e *Bacillus subtilis* associado a fungicida em tratamento de semente na promoção da germinação de sementes de feijão. Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA. 36f.
- Cardoso, A.A., Brodribb, T.J., Lucani, C.J., DaMatta, F.M., McAdam, S.A., 2018. Coordinated plasticity maintains hydraulic safety in sunflower leaves. *Plant Cell Environ.* 41, 2567-2576.
- Carminati, A., Javaux, M., 2020. Soil rather than xylem vulnerability controls stomatal response to drought. *Trends Plant Sci.* 25, 868-880.
- Choat, B., Jansen, S., Brodribb, T.J., Cochard, H., Delzon, S., Bhaskar, R., Bucci, S.J., Feild, T.S., Gleason, S.M., Hacke, U.G. Jacobsen, A.L., 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature.* 491, 752-755.
- Chen, D., Wang, S., Cao, B., Cao, D., Leng, G., Li, H., Deng, X., 2016. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Front. Plant Sci.* 6, 1241.
- Choné, X., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D., Gaudillère, J.P., 2001. Stem water potential is a sensitive indicator. *Ann. Bot.* 87, 477-483.
- Couchoud, M., Salon, C., Girodet, S., Jeudy, C., Vernoud, V., Prudent, M., 2020. Pea efficiency of post-drought recovery relies on the strategy to fine-tune nitrogen nutrition. *Front Plant Sci.* 11, 204.
- Creek, D., Blackman, C.J., Brodribb, T.J., Choat, B., Tissue, D.T., 2018. Coordination between leaf, stem, and root hydraulics and gas exchange in three arid-zone angiosperms during severe drought and recovery. *Plant Cell Environ.* 41, 2869-2881.
- Cunha, A.P.M., Zeri, M., Deusdará Leal, K., Costa, L., Cuartas, L.A., Marengo, J.A., Tomasella, J., Vieira, R.M., Barbosa, A.A., Cunningham, C., Garcia, J.V.C., Broedel, E., Alvalá, R., Ribeiro-Neto, G., 2019. Extreme drought events over Brazil from 2011 to 2019. *Atmosphere.* 10, 642.
- da Silva, M.C.A.P., Batista, P.F., Menezes-Silva, P.E., Sousa, L.F., Loram-Lourenço, L., Alencar, K.M., Abrel, I.M.P.G., Alves, R.D.F.B., Freire, E.S., Silva, F.G., Silva, J.B., Farnese, F.S., 2023. With a little help from my friends: inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma asperellum* alleviates drought and salt stress in soybean. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 35, 169–183.
- Domec, J-C, Palmroth, S., Ward, E., Maier, C.A., Thérézien, M., Oren, R.A.M., 2009. Acclimation of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance of *Pinus taeda*

- (loblolly pine) to long-term growth in elevated CO₂ (free-air CO₂ enrichment) and N-fertilization. *Plant, Cell Environ.* 32, 1500-1512.
- Eller, C.B., Barros, F. V., Bittencourt, P. R. L., Rowland, L., Mencuccini, M., Oliveira, R. S., 2018. Xylem hydraulic safety and construction costs determine tropical tree growth. *Plant Cell Environ.* 41, 548-562.
- Gleason, S.M., Westoby, M., Jansen, S., Choat, B., Hacke, U.G., Pratt, R.B., Bhaska, R., Brodribb, T.J., Bucci, S.J., Cao, K-F., Cochard, H., Delzon, S., Domec, J-C., , Ze-Xin, F., Field, T.S., Jacobsen, A.L., Johnson, D.M., Maherali, H., Stefan Mayr, S., Zanne, A.E., 2016. Weak tradeoff between xylem safety and xylem-specific hydraulic efficiency across the world's woody plant species. *New Phytol.* 209, 123-136.
- Grossiord, C., Sevanto, S., Adams, H.D., Collins, A.D., Dickman, L.T., McBranch, N., Michaletz, S.T., Stockton, E.A., Vigil, M., McDowell, N.G. 2017. Precipitation, not air temperature, drives functional responses of trees in semi-arid ecosystems. *J. Ecol.* 105, 163–75.
- Hammond, W.M., Yu, K., Wilson, L.A., Will, R.E., Anderegg, W.R., Adams, H.D., 2019. Dead or dying? Quantifying the point of no return from hydraulic failure in drought-induced tree mortality. *New Phytol.* 223, 1834–1843.
- Hartmann, H.M., Anderegg, C.F., Ruehr, W.R., Salmon, N.K., Y., Allen, C.D., Breshears, D.D., Davi, H., Galbraith, D., Ruthrof, K.X., Wunder, J., Adams, H.D., Bloemen, J., Cailleret, M., Cobb, R., Gessler, A., Grams, T.E.E., Jansen, S., Kautz, M., Lloret, F., O'Brien, M., 2018. Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. *New Phytol.* 218, 15-28.
- Hoang, D.T.T., Rashtbari, M., Anh, L.T., Wang, S., Tu, D.T., Hiep, N.V., Razavi, B.S., 2022. Mutualistic interaction between arbuscular mycorrhiza fungi and soybean roots enhances drought resistant through regulating glucose exudation and rhizosphere expansion. *Soil Biol. Biochem.* 171, 108728.
- Islam, M., Rahman, M., Bräuning, A., 2019. Impact of extreme drought on tree-ring width and vessel anatomical features of *Chukrasia tabularis*, *Dendrochronologia.* 53, 63–72.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151.
- Jain, P., Liu, W., Zhu, S., Stroock, A.D., 2021. A minimally disruptive method for measuring water potential in planta using hydrogel nanoreporters. *PNAS*, 118, e2008276118.
- Johnson, K.M., Jordan, G.J., Brodribb, T.J., 2018. Wheat leaves embolized by water stress do not recover function upon rewatering. *Plant Cell Environ.* 41, 2704-2714.
- Klein, T., Zeppel, M.J.B., Anderegg, W.R.L., Bloemen, J., Kauwe, M.G., Hudson, P., Ruehr, N.K., Powell, T.L., von Arx, G., Nardini, A., 2018. Xylem embolism refilling and resilience against drought-induced mortality in woody plants: processes and trade-offs. *Ecol Res.* 33, 839 -855.
- Lamarque, L.J., Corso, D., Torres-Ruiz, J.M., Badel, E., Brodribb, T.J., Burlett, R., Delzon, S., 2018. An inconvenient truth about xylem resistance to embolism in the model species for refilling *Laurus nobilis* L. *Ann. For. Sci.* 75, 88.
- Lei, G., Zeng, W., Nguyen, TH, Zeng, J., Chen, H., Srivastava, AK, Gaiser, T., Wu, J., Huang, J., 2023. Relating soil-root hydraulic resistance variation to stomatal regulation in soil-plant water transport modeling. *J Hydr.* 617, 128879.
- Leng, G., Hall, J. 2019. Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future. *Sci Total Environ.* 654, 811–821.
- Li, Y., Xu, S., Gao, J., Pan, S., Wang, G., 2016. *Bacillus subtilis*-regulation of stomatal movement and instantaneous water use efficiency in *Vicia faba*. *Plant Growth Regul.* 78, 43-55.

- Liaqat, W., Celaledin B., Muhammad, U.F., Haseeb, A., Muhammad, F.J, Zahoor, A., Haq, N., Ming, Li., 2022. Climate change in relation to agriculture: A review. *Span. J. Agric. Res.* 20, 1-15.
- Lima, J.R.S., Antonino, A.C.D., Andrade, A.P., Souza, C., Soares, W.A., Souza, E.S., Silva, I.F., 2006. Comparação da sonda de nêutrons e de sensores tipo TDR para a determinação dos componentes do balanço hídrico no solo e evapotranspiração do feijão caupi. *Agro. Tec.* 27, 21-29.
- Liu, H., Ye, Q., Gleason, S.M., He, P., Yin, D., 2021. Weak tradeoff between xylem hydraulic efficiency and safety: climatic seasonality matters. *New Phytol.* 229, 1440-1452.
- Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J., 1996. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Plant Growth Regul.* 19, 207–218.
- McDowell, N.G., Sapes, G., Pivovarov, A., Adams, H.D., Allen, C.D., Anderegg, W.R., Arend, M., Breshears, D.D., Brodrigg, T., Choat, B., Cochard, H., Cáceres, M., Kauwe, M.G., Grossiord, C., Hammond, W.M., Hartmann, H., Hoch, G., Kahmen, A., Klein, T., Mackay, D.S., Mantova, M., Martínez-Vilalta, J., Medlyn, B.E., Xu, C., 2022. Mechanisms of woody-plant mortality under rising drought, CO₂ and vapour pressure deficit. *Nat. Ver. Earth Env.* 3, 294-308.
- Machado, R., Loram-Lourenço, L., Farnese, F.S., Alves, R.D.F.B., Sousa, L.F., Silva, F.G., Filho, S.C.V., Torres-Ruiz, J.M., Cochard, H., Menezes-Silva, P.E., 2021. Where do leaf water leaks come from? Trade-offs underlying the variability in minimum conductance across tropical savanna species with contrasting growth strategies. *New Phytol.* 229, 1415-1430.
- Malhi, G.S., Kaur, M., Kaushik, P. 2021. Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review. *Sustainability*, 13, 1318.
- Markesteyn, L., Poorter, L., Paz, H., Sack, L., Bongers, F., 2011. Ecological differentiation in xylem cavitation resistance is associated with stem and leaf structural traits. *Plant Cell Environ.* 34, 137-148.
- Martin-StPaul N., Delzon, S., Cochard, H., 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol. Lett.* 20, 1437–1447.
- Martorell, S., Diaz-Espejo, A.N.T.O.N.I.O., Medrano, H., Ball, M.C., Choat, B., 2014. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant Cell Environ.* 37, 617-626.
- McAdam, S.A., Brodrigg, T.J., 2015. Hormonal dynamics contributes to divergence in seasonal stomatal behaviour in a monsoonal plant community. *Plant Cell Environ.* 38, 423-432.
- Meena, V.S., Meena, S.K., Verma, J.P., Kumar, A., Aeron, A., Mishra, P.K., Bisht, J.K., Pattanayak, A., Naveed, M., Dotaniya, M.L., 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. *Ecol Eng.* 107, 8–32.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Tripathi, Y.N., Zehra, A., Marwal, A., Upadhyay, R.S., 2020. PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *J. Basic Microbiol.* 60, 828-861.
- Meza, I., Siebert, S., Döll, P., Kusche, J., Herbert, C., Eyshi Rezaei, E., Nouri, H., Gerdener, H., Popat, E., Frischen, J., Naumann, G., Vogt, J.V., Walz, Y., Sebesvari, Z., Hagenlocher, M., 2020. Global-scale drought risk assessment for agricultural systems. *Nat Hazards Earth Syst Sci.* 20, 695–712.
- Moretti, L. G., Crusciol, C.A.C., Bossolani, J.W., Calonego, J.C., Moreira, A., Garcia, A., Momesso, L., Kuramae, E., Hungria, M., 2021. Beneficial microbial species and metabolites alleviate soybean oxidative damage and increase grain yield during short dry spells. *Eur J Agron.* 127, 126293.

- Nardini, A., Nardini, A., Gullo, M.A.L., Trifilò, P., Salleo, S., 2014. The challenge of the Mediterranean climate to plant hydraulics: Responses and adaptations. *Environ. Exp. Bot.* 103, 68–79.
- Nardini, A., Pedà, G., La Rocca, N., 2012. Trade-offs between leaf hydraulic capacity and drought vulnerability: morpho-anatomical bases, carbon costs and ecological consequences. *New Phytol.* 196, 788–798.
- Ngumbi, E., Kloepper, J., 2016. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Appl. Soil Ecol.* 105, 109–125.
- Orozco-Mosqueda, M.D.C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C.A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M.F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., Santoyo, G., 2021. Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy.* 11, 1167.
- Pertussatti, C. A., 2013. Veranicos no estado do Mato Grosso: análise da variabilidade espaço-temporal e modelagem estatística. Universidade de Brasília. 101p.
- Reich, P.B., Wright, I.J., Cavender-Bares, J., Craine, J.M., Oleksyn, J., Westoby, M., Walters, M.B., 2003. The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. *Int. J. Plant Sci.* 164, S143-S164.
- Core Team, R., 2018. R: A language and environment for statistical computing. Version 3.5. 2. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roldão, A.D.F., 2015. Influência do fenômeno veranico na produtividade da soja na mesorregião do Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba-MG. *Estudos Geográficos*, 116f.
- Sack, L., Scoffoni, C., 2013. Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytol.* 198, 983–1000.
- Scholz, F.G., Phillips, N.G., Bucci, S.J., Meinzer, F.C., Goldstein, G., 2011. Hydraulic capacitance: biophysics and functional significance of internal water sources in relation to tree size. *Size- age-related Chang. tree Struct. Funct.* 4, 341–361.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., Gopalakrishnan, S., 2017. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech.* 7, 102.
- Silva, P.E.M., Cavatte, P.C., Morais, L.E., Medina, E.F., DaMatta, F.M., 2013. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 87, 49–57.
- Scoffoni, C., Sack, L., 2017. The causes and consequences of leaf hydraulic decline with dehydration. *J. Exp. Bot.* 68, 4479–4496.
- Scoffoni, C., Albuquerque, C., Cochard, H., Buckley, T.N., Fletcher, L.R., Caringella, M.A., Bartlett, M., Brodersen, C.R., Jansen, S., McElrone, A.J., Sack, L., 2018. The causes of leaf hydraulic vulnerability and its influence on gas exchange in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 178, 1584–1601.
- Sousa, L.F., Menezes-Silva, P.E., Loram-Lourenço, L., Galmes, J., Guimarães, A.C., Silva, A.F., Lima, A.P.R., Henning, L.M.M., Costa, A.C., Silva, F.G., Farnese, F.S., 2020. Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. *Physiol. Plant.* 168, 576–589.
- Sheteiwy, M.S., Ali, D.F.I., Xiong, Y.C., Brestic, M., Skalicky, M., Hamoud, Y.A., Ulhassan, Z., Shaghaleh, H., Elgawad, H.A., Farooq, M., Sharma, A., El-Sawah, A.M., 2021. Physiological and biochemical responses of soybean plants inoculated with Arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium under* drought stress. *BMC Plant Biol.* 21, 195.
- Sheirdil, R.A., Hayat, R., Zhang, X.X., Abbasi, N.A., Ali, S., Ahmed, M., Khattak, J.Z.K., Ahmad, S., 2019. Exploring potential soil bacteria for sustainable wheat (*Triticum aestivum* L.) Production. *Sustainability.* 11, 3361.

- Stiller, V., Lafitte, H.R., Sperry, J.S., 2003. Hydraulic properties of rice and the response of gas exchange to water stress. *Plant Physiol.* 132, 1698-1706.
- Su, A.Y., Niu, S.Q., Liu, Y.Z., He, A.L., Zhao, Q., Paré, P.W., Li, M-F., Han, Q.Q., Khan, S.A., Zhang, J.L., 2017. Synergistic effects of *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and water retaining agent on drought tolerance of perennial ryegrass. *Int J Mol Sci.* 18, 2651.
- Tabacchioni, S., Passato, S., Ambrosino, P., Huang, L., Caldara, M., Cantale, C., Hett, J., Fiore, A.D., Fiore, A., Schlüter, A., Sczyrba, A., Maestri, E., Marmioli, N., Neuhoff, D., Nesme, J., Sørensen, S.J., Aprea, G., Nobili, C., Presenti, O., Bevivino, A., 2021. Identification of beneficial microbial consortia and bioactive compounds with potential as plant biostimulants for a sustainable agriculture. *Microorganisms.* 9, 426.
- Timmusk, S., Abd El-Daim, I.A., Copolovici, L., Tanilas, T., Kännaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E., Niinemets, Ü., 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PloS one.* 9, e96086.
- Trueba S., Pouteau, R., Lens, F., Feild, T.S., Isnard, S., Olson, M.E., Delzon, S., 2017. Vulnerability to xylem embolism as a major correlate of the environmental distribution of rain forest species on a tropical island. *Plant Cell Environ.* 40, 277– 289.
- Urli, M., Porté, A.J., Cochard, H., Guengant, Y., Burrett, R., Delzon, S., 2013. Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree physiol.* 33, 672-683.
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., Mei, L., 2018. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biol Open.* 7, bio035279.

CAPÍTULO II:

PLASTICIDADE FENOTÍPICA EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO: EFEITO DOS BIODEFENSIVOS À BASE DE MICRORGANISMOS SOBRE OS PROCESSOS MORFOANATÔMICOS FOLIARES, FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS E SEU IMPACTO NA PRODUTIVIDADE EM *Glycine max* (L.) Merrill)

RESUMO

A água é o principal determinante para o desempenho e produtividade das culturas. A restrição hídrica ocasiona inúmeras disfunções no metabolismo vegetal, afetando principalmente as características morfoanatômicas foliares, redução de pigmentos cloroplastídicos, aumento no grau de desidratação dos tecidos, danos celulares e o conjunto desses fatores refletem negativamente a fotossíntese e a produtividade vegetal. Neste contexto, os Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas são alternativas economicamente viáveis que conseguem mitigar os danos desencadeados pela restrição hídrica em importantes culturas, como a soja. O estudo foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, avaliando os efeitos dos microrganismos nos principais aspectos fisiológicos, morfoanatômicos que impactam a produtividade de *Glycine max* a seca. Para isso, sementes de soja foram inoculadas com biodefensivos Bio-Imune[®] (*B. subtilis* BV02), No-Nema[®] (*B. amyloliquefaciens* BV03) e Tricho-Turbo[®] (*T. asperellum* BV10) e cultivadas até o estágio R1, sendo então submetidas aos seguintes tratamentos: T1 - Controle (100% da capacidade de campo (CC)); T2 - CT BV02+BV10 (100% CC, ambos microrganismos aplicados via foliar); T3 - CT BV03+BV10 (100% CC, ambos tratados em sementes e folhas); T4 - DH (30% da CC); T5 - DH BV02+BV10 (30% CC, ambos tratados em folhas); T6 - DH BV03+BV10 (30% CC, ambos tratados em sementes e folhas), permanecendo nestas condições por 10 dias. Em seguida, foram realizadas análises de relações hídricas, pigmentos cloroplastídicos, caracterização morfoanatômica foliar, aspectos fisiológicos, bioquímicos e produtividade vegetal. Neste contexto, os resultados mostraram que a ação sinérgica dos microrganismos em plantas de soja na seca promoveram maior condutividade hidráulica do caule e maior diâmetro nos vasos xilemáticos, contribuindo para a maximização no transporte de água para o tecido foliar, que por sua vez, manteve a concentração de pigmentos cloroplastídicos, com incremento na taxa fotossintética mesmo estando com a condutância estomática e taxa transpiratória reduzida. A manutenção de hidratação dos tecidos juntamente com o aumento das atividades de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e a catalase foram essenciais para atenuar o dano oxidativo. Como reflexo, esses fatores contribuíram para o incremento do percentual no número de grãos.

Palavras-chave: Fotossíntese, *Bacillus subtilis*; *Bacillus amyloliquefaciens*; *T. asperellum*; Bioquímica; Produtividade.

1. INTRODUÇÃO

Compreender os impactos da seca na produção agrícola é fundamental para garantir a segurança alimentar global (Leng e Hall, 2019). A crescente demanda por alimentos coloca em destaque os grãos de soja como fonte de alto valor nutricional, estando entre as quatro plantas mais cultivadas mundialmente, sendo a primeira entre as leguminosas (O'Donoghue *et al.*, 2017; Valliyodan *et al.*, 2017). Para atender essa elevada demanda, no entanto, é necessário driblar a severa pressão que as mudanças climáticas impõe sobre a produção de alimentos (Leng e Hall 2019; Etesami, 2018), já que a agricultura brasileira é amplamente dependente do ciclo hidrológico local (Agência Nacional de Águas, 2020), sendo severamente afetada por eventos de seca, que estão previstos para aumentar em frequência e intensidade nos próximos anos (Borges *et al.*, 2018; Leng e Hall, 2019).

Um das principais alterações desencadeadas pelo déficit hídrico nas plantas é a redução da abertura estomática, a fim de evitar a taxa transpiratória excessiva (E), o que influencia o grau de hidratação dos tecidos. Assim, a redução de E contribui para a manutenção do potencial hídrico (Ψ_w) dentro de limites que sustentem o metabolismo celular (Marcos *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2020). Neste contexto, as características morfoanatômicas dos estômatos assumem papel central na regulação da perda de água por transpiração (Choat *et al.*, 2018; Almeida, 2022) e, recentemente, foi constatado que mesmo após o completo fechamento estomático, o tamanho e a distribuição dessas estruturas continuam a influenciar a perda de água para a atmosfera (Machado *et al.*, 2021). Desse modo, a alteração no padrão de distribuição dos estômatos na epiderme foliar, determinado pela densidade estomática (SD), juntamente com o tamanho do estômato (S), o tamanho do par de células-guarda (a_{gc}) e área máxima do poro estomático (a_{max}), determinam a condutância estomática máxima (g_{smax}) (Boer *et al.*, 2016) e a intensidade da perda de água pela transpiração residual (Machado *et al.*, 2021).

O controle no fechamento estomático também é importante para a prevenção da falha hidráulica nos vasos xilemáticos ocasionado pela ocorrência de embolismo, que por sua vez, pode desencadear a dessecação dos tecidos culminando na morte vegetal (Klein *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2019). Além do funcionamento estomático, outros aspectos anatômicos foliares influenciam na performance vegetal em condições estressantes. A epiderme foliar, mesófilo e nervura central de plantas herbáceas são caracteres funcionais estratégicos em condições de restrição hídrica (Yang *et al.*, 2023). Células epidérmicas maiores contribuem para baixa transpiração estomática e cuticular (Queiroz-Voltan *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2021). A redução na espessura do parênquima paliádico e esponjoso pode facilitar o caminho para a condução e fixação do dióxido de carbono (CO_2) na Rubisco (Yang *et al.*, 2023). Em adição,

aumentos na espessura das nervuras, nos vasos xilemáticos e na densidade de venação podem diminuir a desidratação foliar (Roãcàs *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2018).

Apesar de ser essencial para manutenção do Ψ_w , a redução da abertura estomática diminui a condutância estomática (g_s) (Sales *et al.*, 2015), ou seja, limita a difusão do CO_2 , que afeta negativamente a atividade fotossintética (Nguyen *et al.*, 2018), podendo resultar em balanço negativo de carbono (Ping *et al.*, 2015). Além do fechamento estomático, outros fatores cooperam na limitação da fotossíntese em condições de restrição hídrica, e pode ocorrer, por exemplo, devido à redução na concentração das clorofilas *a* e *b* (Adiba *et al.*, 2021), limitações difusivas relacionadas a condutância do mesofilo, além dos fatores hidráulicos (transporte de água aos tecidos transpirantes) e fatores bioquímicos (como limitação na atividade das enzimas do ciclo de Calvin-Benson) (Gago *et al.*, 2019; Nagy, *et al.*, 2013).

Desiquilíbrios, principalmente na etapa fotoquímica da fotossíntese, podem desencadear a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), por meio da transferência de elétrons para o O_2 (Silveira *et al.*, 2017) e como reflexo promover danos celulares e até a morte vegetal. Para manter níveis constantes de ROS, aumentos nas atividades de enzimas do metabolismo antioxidantes auxiliam na desintoxicação desses compostos. As enzimas antioxidantes mais comuns incluem a superóxido dismutase (SOD), atuando na primeira linha de defesa, convertendo o O_2^- (ânion superóxido) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 , por sua vez, pode ser eliminado pela ação das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) ou peroxidase (POX) (Mishra *et al.*, 2023). Para estimar danos causados pelo ROS, o Hidroperóxido Dieno Conjugado (HPDC) é um produto primário da peroxidação lipídica, sendo um importante marcador de dano oxidativo às membranas celulares (Giampaoli *et al.*, 2021).

O impacto das alterações citadas acima depende da planta analisada, da intensidade do estresse e do estágio de desenvolvimento da cultura, sendo que o estágio fenológico reprodutivo é frequentemente o estágio mais sensível à restrição hídrica, conforme evidenciado em estudos em feijão (Miorini *et al.*, 2011), milho (Clemente, 2017) e soja (Nakagawa *et al.*, 2018). Nas leguminosas, por exemplo, a indisponibilidade hídrica pode promover o abortamento floral, abortamento de vagens, senescência foliar, distúrbios no vigor e qualidade dos grãos nas vagens presentes, além do encurtamento do ciclo de vida da planta (Farooq *et al.*, 2017; Barcelos *et al.*, 2022).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada uma das commodities mais relevantes para a economia mundial, mas é uma cultura é particularmente sensível à seca. Na safra 2018/19, por exemplo, um dos estados mais afetados foi Goiás, no qual a ocorrência de dois

veranicos acarretou queda de aproximadamente 2 milhões de toneladas na produtividade da soja (CONAB, 2019). Na safra 2021/22 a escassez hídrica comprometeu novamente o cultivo dessa oleaginosa, com queda de aproximadamente 4,12% em relação à safra passada (Barcelos, 2022). Essas perdas contribuem para diminuir a competitividade do produto brasileiro quando comparado a outros países, como Argentina e EUA. É importante ressaltar que o El Niño de 2015–2016 promoveu desertificação de terras em diversas regiões do globo ocasionado pelas altas temperatura combinadas com secas intensas (Van Schaik *et al.*, 2018). Para a safra atual, a amostragem probabilística de NOAA CPC ENSO prevê efeitos hidroclimáticos ainda mais negativos provocados pelo El Niño de 2023–2024 (Mugiyo *et al.*, 2023). Neste contexto, torna-se necessário a introdução de novas tecnologias que sejam capazes de mitigar os danos desencadeados pela seca.

Microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP) são úteis para o crescimento e melhoria da produtividade vegetal (Meena *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2018; Karuppiah *et al.*, 2019; Silva, 2019). As bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de colonizar as raízes de diversas culturas, com capacidade de estimular o desenvolvimento radicular e a tolerância a estresses bióticos e abióticos, sendo este último contribuindo no aumento do teor relativo de água, pigmentos cloroplastídicos, fotossíntese e índice de estabilidade da membrana em plantas em condições de déficit hídrico (Camargo, 2019; da Silva, 2023; Bakhshi *et al.*, 2023). Estes microrganismos estão entre os mais abundantes na rizosfera, sendo comumente encontrados em diversas zonas climáticas, e diferentes estudos apontam que a associação entre plantas e as bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e o fungo *Trichoderma asperellum* podem trazer benefícios tanto para os microrganismos quanto para os vegetais (Hashem *et al.*, 2019; Izquierdo-García *et al.*, 2020; Mulato *et al.*, 2022; da Silva, 2023). Existem ainda estudos que apontam que a combinação de diferentes microrganismos têm um potencial ainda maior para induzir respostas vegetais, por abranger maior gama de respostas, mas essa abordagem é mais recente e seus efeitos e potencialidades ainda não estão totalmente esclarecidos (Srivastava *et al.*, 2021; Díaz-Urbano *et al.*, 2023; Etesami *et al.*, 2023). Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar como a interação entre bactérias e fungos afeta a fisiologia e a reprodução da soja, testando as seguintes hipóteses: (i) a combinação de bio defensivos à base de microrganismos atenuará o efeito negativo da seca sobre os processos centrais do metabolismo da soja; (ii) Plantas de soja não tratadas com bio defensivos em exposição à seca apresentarão alterações nas estruturas foliares, estomáticas e xilemáticas, desidratação dos tecidos, com conseqüente, impacto negativo dos processos fisiológicos e na reprodução.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar a combinação de bio defensivos à base de microrganismos *Bacillus subtilis* BV02 + *Trichoderma asperellum* BV10 e *B. amyloliquefaciens* BV03 + *T. asperellum* BV10, nos aspectos fisiológicos, morfoanatômicos, bioquímicos e produtivos de plantas de *Glycine max* exposta à seca.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a ação do déficit hídrico e a combinação de microrganismos sobre as relações hídricas vegetais;
- Avaliar o impacto dos microrganismos nos principais aspectos fisiológicos e bioquímicos de plantas de soja submetidas a restrição hídrica;
- Determinar as características morfoanatômicas foliares, estomáticas e xilemáticas em resposta a restrição hídrica, isoladamente ou em conjunto com microrganismos;
- Avaliar o potencial da combinação dos microrganismos sobre a produtividade vegetal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde – GO, Brasil (17°48'18.33" de latitude sul e 50°54'0.04" de longitude oeste e 748 m de altitude). Sementes de soja da cultivar Neo680, com grau de precocidade superprecoce, fornecidas pela empresa GAPES (Grupo Associado de Pesquisa do Sudoeste Goiano), foram semeadas em vasos de PVC com capacidade para nove litros, contendo solo adubado, areia e matéria orgânica na proporção de 2:1:1 (v/v) e mantidas irrigadas na capacidade de campo (CC) até o estágio vegetativo R1. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos e com cinco repetições cada. Após essas condições, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: I. **CT** (100% CC); II. **CT BV02+BV10** (100% CC, ambos aplicados via foliar); III. **CT BV03+BV10** (100% CC, ambos microrganismos tratados em sementes e folhas); IV. **DH** (suspensão da irrigação até 30% da CC); V. **DH BV02+BV10** (30% CC, ambos microrganismos tratados em folhas) e VI. **DH BV03+BV10** (30% CC, ambos microrganismos tratados em sementes e folhas). Os bio defensivos à base de microrganismos utilizados são referenciados como Bio-Imune®

(registro no MAPA: 43418 - *B. subtilis* BV02), No-Nema[®] (registro no MAPA: 34518 - *B. amyloliquefaciens* BV03) e Tricho-Turbo[®], (registro no MAPA: 34018 - *T. asperellum* BV10), fornecidos pelo Vittia S.A. As plantas controles permaneceram permanentemente irrigadas, enquanto plantas expostas à seca foram submetidas à suspensão gradual de irrigação até que o solo secasse de forma natural e gradativa até atingir 30% CC (seca severa), sendo os vasos pesados diariamente. As sementes foram tratadas com os bio defensivos a base de microrganismos antes da germinação, utilizando o volume de calda de 6 mL kg⁻¹ de sementes, conforme recomendação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A aplicação dos tratamentos via foliar foi realizada apenas no 1º dia de seca, no estágio R1, utilizando um pulverizador agrícola costal de CO₂, com a vazão de 150 L ha⁻¹. Após a aplicação de cada tratamento, o pulverizador foi higienizado com solução de hipoclorito de sódio a 2%. As plantas expostas apenas à seca, sem adição de bio defensivos, receberam pulverização com água de irrigação, a fim de, manter o grau de hidratação dos tecidos que receberam tratamentos via foliar com bio defensivos. Por fim, as plantas permaneceram nessas condições por 10 dias, sendo então utilizadas nas análises descritas a seguir.

3.2. Relações hídricas

3.2.1 Potencial hídrico (Ψ_w)

O potencial hídrico foliar foi determinado em folhas individuais de cada um dos tratamentos, ao final do período de déficit hídrico, com o auxílio de bomba de pressão tipo Scholander, na antemã (04h30 – 05h30) (Ψ_{am}) e ao meio-dia (Ψ_{md}).

3.2.2 Potencial de soluto (Ψ_s)

O potencial osmótico foliar (Ψ_s) foi mensurado de acordo com Pask *et al.* (2012). As amostras foliares foram acondicionadas em seringas esterilizadas com trava de êmbolo e o suco celular foi extraído com a utilização de uma pipeta automática, sendo acondicionado em microtubos devidamente identificados. Uma alíquota de 10 µL do suco celular foi utilizada para determinação da osmolaridade utilizando um osmômetro de pressão de vapor (modelo 5600; VAPRO). A determinação do Ψ_s foi realizada utilizando a equação de Van't Hoff:

$$\Psi_s = -R \times T \times C_s$$

Onde R é a constante universal dos gases (0.08205 L atm mol⁻¹K⁻¹), T é a temperatura em K (T K = T °C + 273) e C_s a concentração do soluto (M), usualmente expressa em atmosferas e convertida em MPa.

3.2.3 Condutividade hidráulica do caule (K_{stem})

A condutividade hidráulica de segmentos caulinares (K_{stem}) de soja foi determinada com o auxílio de um sistema de fluxo, seguindo a metodologia proposto por Torres-Ruiz et al. (2014). Onde, foi monitorada constantemente a massa de solução fluindo por unidade de tempo através dos segmentos, com o uso de pipetas volumétricas. Este valor, juntamente com a pressão aplicada e o comprimento do segmento utilizado foram usados para a obtenção da condutividade hidráulica (K) baseando-se na seguinte fórmula:

$$K \text{ (Kg m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}) = \text{fluxo (Kg s}^{-1}) \times \text{comprimento do caule (m) / pressão aplicada MPa}.$$

Os valores de K foram utilizados para o cálculo da condutividade hidráulica específica do caule (K_{stem}).

3.3. Caracterização morfoanatômica

3.3.1 Caracterização estomática

Para a caracterização estomática, foi utilizada a técnica de impressão epidérmica para determinar a densidade estomática (SD), tamanho do estômato (S), tamanho do par de células-guarda (a_{gc}), condutividade estomática máxima (g_{wmax}) e fração da epiderme alocada aos estômatos (f_{gc}). Para isso, a impressão da epiderme foi realizada utilizando cola instantânea em lâminas histológicas, onde o material vegetal foi pressionado contra essa lâmina por alguns minutos. Em seguida, as lâminas foram observadas na ampliação de 20x com o auxílio de um fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus Optical) equipado com o sistema U-Photo.

Para análise na lâmina histológica, foram selecionados 30 campos nas faces foliares abaxial e adaxial para determinar a SD , o comprimento da célula de guarda (L), a área dos poros (P) e a largura da célula-guarda (W) usando o software Image Pro Plus (Martins *et al.* 2014).

3.3.2 Caracterização do xilema foliar

Para a determinação da densidade de venação, utilizou-se fragmentos da parte central do limbo foliar, posteriormente foram lavados e acondicionados no processo de clarificação, emergindo os fragmentos em hidróxido de sódio (NaOH) a 10% no período de 2 horas, seguido da imersão dos fragmentos em hipoclorito de sódio 20% até a obtenção do clareamento. Em seguida, os fragmentos foram lavados com água destilada e corados com safranina. Após isso, montou-se lâminas histológicas com as amostras, levadas ao microscópio ótico de luz Olympus (BX61, Tokyo, Japão) acoplado com câmera DP-72 e fotografadas. As imagens foram

analisadas no software Imagens J e mensuradas pela razão entre comprimento total das nervuras e superfície da área foliar (Uhl e Mosbrugger, 1999).

Para as análises morfoanatômicas da nervura foliar foram coletadas 3 mm² de amostras foliares de *Glycine max* da região central. Inicialmente as amostras foram fixadas em FAA₇₀. Após 24 horas foi armazenada em álcool 70% e desidratada em série etílica crescente de 30% a 100%, posteriormente, pré-infiltrada e infiltrada em historesina (Leica, Alemanha). Em seguida, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien *et al.*, 1964). Após isso foram preparadas lâminas com os cortes histológicos e fotografadas no fotomicroscópio. As mensurações dos números de vasos dos xilemas, diâmetro médio dos vasos, a área total dos vasos e a resistência ao colapso induzido por estresse (t/b)³ foram calculadas como a média dos diâmetros máximo e mínimo de cada lúmen, sendo analisadas pelo programa ImageJ (Blackman *et al.*, 2010; Rodriguez-Dominguez *et al.*, 2018; Rueden *et al.*, 2017).

3.4 Análises Fisiológicas

3.4.1 Teor de pigmentos cloroplastídicos

A análise da concentração de clorofilas e carotenoides foi determinada por meio da extração com dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃), descrita por Kuki *et al.* (2005). Aproximadamente 5 discos foliares com diâmetro de 5 mm foram acondicionados em frascos vedados e envolvidos com papel alumínio, contendo 5 mL da solução de DMSO, por um período de 24 horas a 65 °C em banho-maria. Posteriormente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison -USA) nos comprimentos de onda 480, 649.1 e 665.1 nm. Os dados foram calculados de acordo com Wellburn (1994) e expresso por massa seca.

3.4.2 Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas

Os dados de fluorescência da clorofila *a* foram obtidos com o uso de fluorômetro modulado, acoplado ao leitor de gases a infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA) e fluorômetro modulado Imaging-PAM (versão MAXI-Standard, Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha). Inicialmente as folhas foram adaptadas por pelo menos 1 hora no escuro e analisadas seguindo o proposto por Maxwell e Jhonson (2000). Com esses parâmetros, foram

calculados os coeficientes de extinção fotoquímica (q_P), a eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II (ϕ_{FSII}).

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração interna de CO_2 (C_i) e a taxa transpiratória (E) foram determinadas em sistema aberto, sob luz saturante ($1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com o analisador de gases a infravermelho supracitado. Com os dados destes parâmetros foram calculadas as razões: F_v/F_m , F_0/F_m , A/C_i e A/E .

3.4.3 Respiração noturna (R_N)

A respiração noturna (R_N), ou taxa de assimilação líquida de CO_2 noturna, foi avaliada antes do amanhecer utilizando um analisador de gases à infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Nebraska, EUA). Com os dados de R_N e A foi calculada a razão taxa de respiração noturna sobre a fotossíntese (R_N/A).

3.5 Análises Bioquímicas

3.5.1 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células foram determinados seguindo o proposto por Kuo e Kao (2003). Inicialmente macerou-se aproximadamente 0,25g de tecidos foliares em nitrogênio líquido e meio de extração composto por tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. As amostras foram então centrifugadas a $10.000 \times g$, por 15 minutos, a 4°C (Kuo e Kao, 2003). Após isso, uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi adicionado a 250 μM de meio de reação contendo $FeNH_4SO_4$, 25 mM de ácido sulfúrico, 250 μM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos e a leitura da absorvância determinada em espectrofotômetro UV-VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 560 nm. As concentrações do H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 e normalizadas em função do peso das amostras.

3.5.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica

O dano oxidativo nas membranas celulares foi estimado pela quantificação de Hidroperóxido dieno conjugado (HPDC). Para isso, macerou-se aproximadamente 0,100g de tecidos foliares com o auxílio de nitrogênio líquido, sendo o tecido homogeneizado em 12mL de etanol 96%. O extrato resultante foi filtrado e uma alíquota foi diluída na proporção 1:15 em água deionizada (Wannaz & Pignata 2006). Posteriormente lido em espectrofotômetro sob

comprimento de onda de 234 nm. A peroxidação lipídica foi estimada como conteúdo de HPDC e calculado a partir da constante $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levin & Pignata 1995). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{ MS}$.

3.5.3 Ensaio de enzimas antioxidantes

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (POX) e Peroxidase do Ascorbato (APX). Para isso, aproximadamente 0,30g de amostras foliares foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% para (SOD, EC 1.15.1.1), (POX, EC 1.11.1.7) e (APX, EC 1.11.1.11) (Peixoto *et al.*, 1999; Carlberg e Mannervik, 1985). A seguir, os homogenatos foram submetidos a centrifugação a 12.000 g por 15 min, a 4°C, sendo os sobrenadantes utilizados como extrato enzimático bruto. Os seguintes meios de reação foram utilizados: tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM , para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977); tampão fosfato de potássio 50 mM e H_2O_2 12,5 mM, para CAT (Peixoto *et al.*, 1999); tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 2 mM, para POX (Peixoto *et al.*, 1999); tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1 mM, para APX (Peixoto *et al.*, 1999). Para determinação da SOD as amostras foram iluminadas por 5 min e absorbância foi lida a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotorredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977). As atividades das enzimas POX e APX foram estimadas pela leitura da absorbância durante o primeiro minuto de reação, nos comprimentos de onda de 420 e 290 nm, respectivamente (Peixoto *et al.*, 1999).

3.6. Caracterização micromorfológica

3.6.1 Aspectos anatômicos foliares

Para as análises morfoanatômicas foram coletadas 3 mm^2 de amostras foliares de *Glycine max* da região central e da margem no décimo dia de déficit hídrico. Inicialmente as amostras foram fixadas em FAA₇₀. Após 24 horas foram armazenadas em álcool 70% e desidratadas em série etílica crescente de 30% a 100%, posteriormente, pré-infiltradas e infiltradas em historesina (Leica, Alemanha), conforme as recomendações do fabricante.

Em seguida, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 μm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Scientific, China) e os cortes corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien *et al.*,

1964). As imagens anatômicas da epiderme, mesofilo, parênquima paliçádico, esponjoso e nervura principal foram obtidas através do microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão) acoplado com câmera DP-72 utilizando opção de campo claro. Posteriormente, foram realizadas observações morfoanatômicas da epiderme nas faces adaxial e abaxial, parênquima paliçádico, esponjoso, mesofilo e nervura principal. Para o teste histoquímico com o regente de Lugol para detecção de amido, foram feitos cortes seriados de amostras previamente fixadas em FAA₇₀ e incluídas em historesina.

3.7 Produtividade

As vagens das plantas foram colhidas manualmente, após o estágio R8 de desenvolvimento, quando os grãos mantiveram o grau de umidade abaixo de 15% (base úmida). Posteriormente, os grãos de soja foram debulhados das vagens, limpos com o auxílio de peneiras, secos em condições naturais.

A avaliação da produtividade foi quantificada pelo número de vagens por planta, o número de grãos por legume e a massa específica do grão. A massa específica aparente dos grãos de soja será medida em uma balança de peso hectolítrico de ¼ de litro utilizando grãos limpos, ou seja, os grãos retidos na peneira de 3,00 mm de diâmetro, de acordo com a Portaria nº 262, de 23/11/1983, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1983).

3.8 Índice de tolerância (IT)

O índice de tolerância à seca foi estimado seguindo a fórmula proposto por Wilkins (1978):

$$IT (\%) = (Rw^*/Rw)$$

Em que: Rw^* é o número de grãos nos tratamentos de seca (com ou sem a combinação com microrganismos); e Rw é o número de grãos produzidos pelas plantas cultivadas com plena irrigação (controle).

3.9. Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi avaliada usando o teste Shapiro-Wilk, sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias calculadas pelo teste SNK (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade

4. RESULTADOS

4.1. Relações hídricas

A exposição das plantas de *Glycine max* à seca afetou diferentes aspectos relacionados às relações hídricas das plantas (Fig. 1). Em relação ao potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}), foram observadas alterações em todos os tratamentos de seca, os quais apresentaram menor potencial hídrico, com incremento nos valores dessa variável no tratamento DH BV02+BV10 (Fig. 1A). O potencial hídrico do meio-dia (Ψ_{md}), por sua vez, apresentou queda apenas nas plantas expostas apenas ao déficit hídrico (DH), enquanto nos tratamentos de seca com bio defensivos esse parâmetro manteve-se constante e similar ao controle (Fig. 1B). Não foram observadas alterações significativas no potencial osmótico (Ψ_s) em comparação ao CT (Fig. 1C), o qual foi menor em todos os tratamentos de seca. Por fim, a condutividade hidráulica do caule (K_{stem}) foi menor em todos os tratamentos em déficit hídrico, com incrementos parciais nos tratamentos contendo bio defensivos microbiológicos (Fig. 1D).

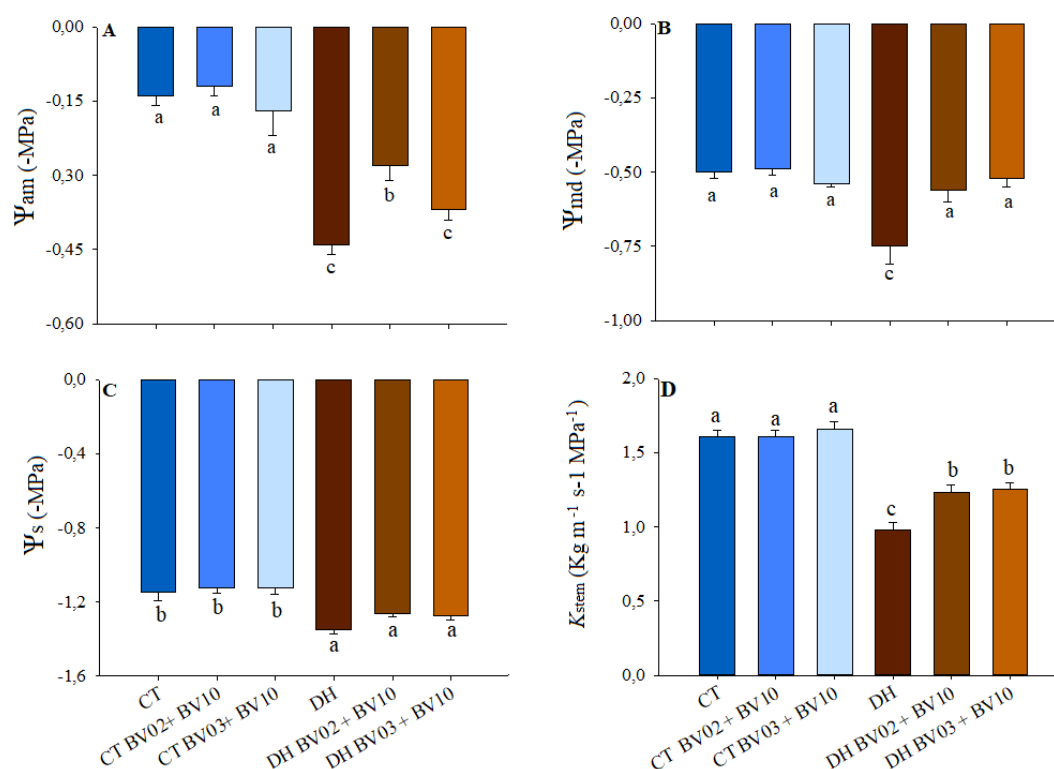


Figura 1 – Relações hídricas: potencial hídrico da antemanhã (Ψ_{am}) (A), potencial hídrico do meio-dia (Ψ_{md}) (B) e potencial de soluto (Ψ_s) (C) condutividade hidráulica do caule (K_{stem}) (D), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos. Foram aplicadas duas combinações de bio defensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.2. Caracterização estomática

As características morfológicas dos estômatos foram alteradas pela exposição aos dez dias de seca, com comportamento bastante variável em cada um dos tratamentos analisados (Tabela 1). Em relação à densidade estomática (SD), não houve diferença significativa entre os tratamentos nas duas faces. Houve redução do tamanho dos estômatos (S) em ambas as faces da epiderme, sendo que na face adaxial foram observados estômatos menores em todos os tratamentos com exposição à restrição hídrica, enquanto na face abaxial apenas os tratamentos DH e DH+BV02+BV10 apresentaram diferença no tamanho dos estômatos em relação aos respectivos controles. Na face abaxial, a queda em S foi mais expressiva no tratamento DH BV02+BV10, sendo que os estômatos foram 17.82 % menores do que no controle. Como resultado do S , o tamanho do par de células-guarda (a_{gc}) foi diminuído em todos os tratamentos em déficit hídrico nas duas faces, com exceção de DH BV03+BV10, que não diferiu estatisticamente do controle na face abaxial. Além disso, não houve alteração na condutividade estomática máxima (g_{wmax}) entre os tratamentos avaliados. E, por fim, as mudanças nas características estomáticas refletiram na fração da epiderme alocada aos estômatos (f_{gc}), sendo menor na face adaxial no tratamento DH BV03+BV10 quando comparado ao CT BV03+BV10, enquanto na face abaxial a redução de f_{gc} foi intensa em todos os tratamentos em déficit hídrico com e sem microrganismos, em comparação aos seus respectivos controles. A figura 2 ilustra a distribuição dos estômatos na epiderme foliar da face abaxial por meio da impressão epidérmica.

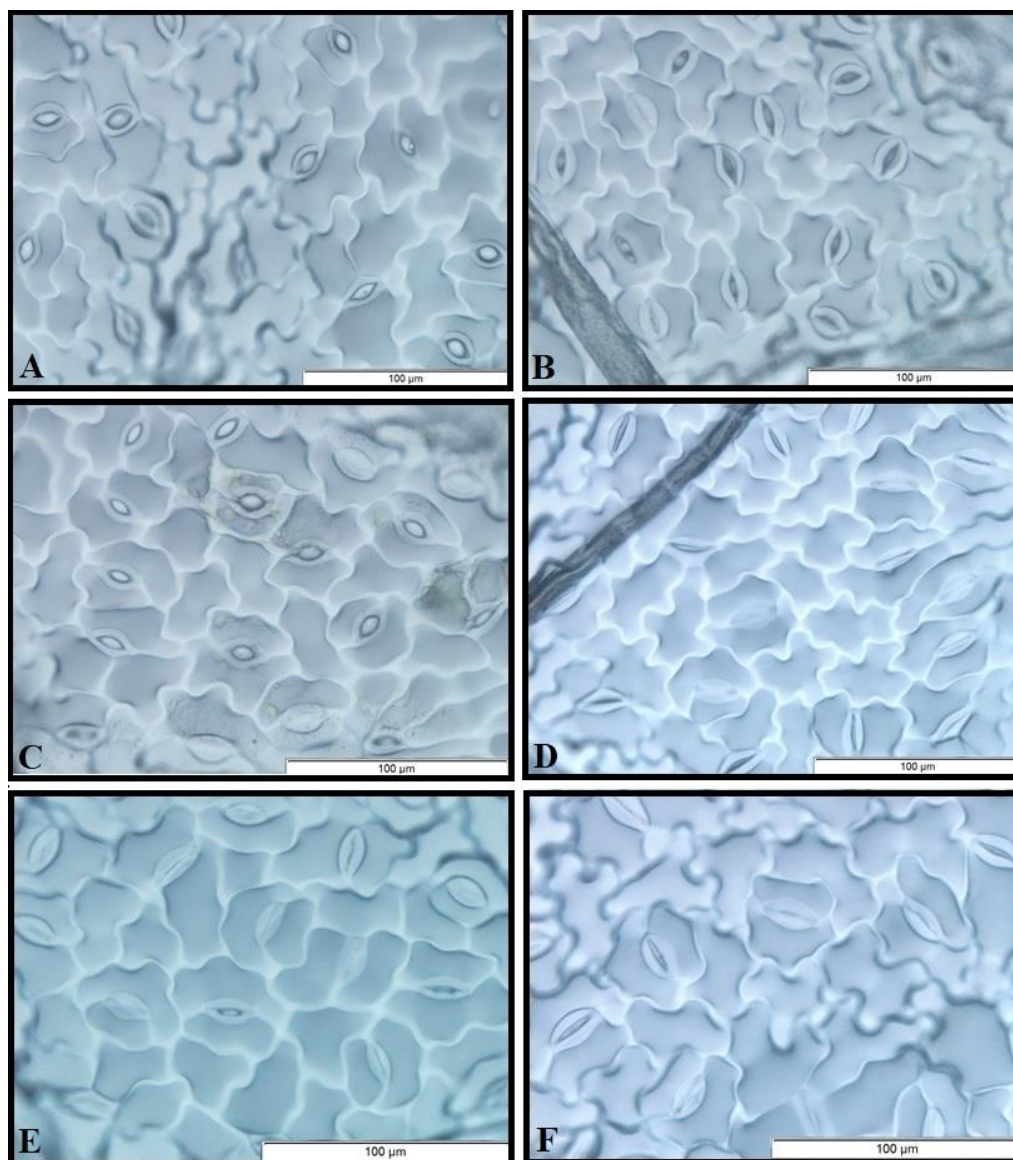


Figura 2 – Impressão epidérmica: Estômatos e células epidérmicas na face abaxial dos tratamentos, CT (100% CC) (A); CT BV02+BV10 (100% CC + *B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) (B); CT BV03+BV10 (100% CC + *B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (C); DH (30% da CC) (D); DH BV02+BV10 (30% CC + *B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) (E) e DH BV03+BV10 (30% CC + *B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (F).

Tabela 1 – Caracterização estomática na face foliar adaxial e abaxial em plantas de *Glycine max* completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos. Foram aplicadas duas combinações de bio defensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade. Abreviações: densidade estomática (SD), tamanho do estômato (S), tamanho do par de células-guarda (a_{gc}), condutividade estomática máxima (g_{wmax}) e fração da epiderme alocada aos estômatos (f_{gc}).

	Tratamento	SD (μm^2)	S (μm^2)	a_{gc} (mm^2)	g_{wmax} ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	f_{gc} (%)
Adaxial	CT	1.51 ± 0.0 a	281.1 ± 7.7 b	0.0017 ± 0.0 b	0.005 ± 0.0 a	0.26 ± 0.0 bc
	CT BV02+BV10	1.72 ± 0.1 a	297.2 ± 4.0 a	0.0018 ± 0.0 a	0.005 ± 0.0 a	0.32 ± 0.0 ab
	CT BV03+BV10	1.71 ± 0.1 a	310.6 ± 2.3 a	0.0019 ± 0.0 a	0.006 ± 0.0 a	0.39 ± 0.0 a
	DH	1.45 ± 0.0 a	228.9 ± 2.8 c	0.0014 ± 0.0 c	0.006 ± 0.0 a	0.21 ± 0.0 c
	DH BV02+BV10	1.80 ± 0.0 a	237.7 ± 6.8 c	0.0014 ± 0.0 c	0.006 ± 0.0 a	0.27 ± 0.0 bc
	DH BV03+BV10	1.54 ± 0.0 a	245.3 ± 5.0 c	0.0015 ± 0.0 c	0.005 ± 0.0 a	0.23 ± 0.0 c
Abaxial	CT	3.9 ± 0.00 ab	291.7 ± 5.7 ab	0.0018 ± 0.0 ab	0.012 ± 0.0 ab	0.71 ± 0.02 ab
	CT BV02+BV10	4.0 ± 0.10 a	298.4 ± 4.8 a	0.0019 ± 0.0 a	0.011 ± 0.0 b	0.75 ± 0.02 a
	CT BV03+BV10	4.0 ± 0.00 ab	291.0 ± 3.0 ab	0.0018 ± 0.0 ab	0.011 ± 0.0 b	0.73 ± 0.02 a
	DH	3.4 ± 0.20 b	260.6 ± 6.2 c	0.0016 ± 0.0 c	0.014 ± 0.0 a	0.54 ± 0.02 d
	DH BV02+BV10	3.9 ± 0.10 ab	245.2 ± 4.3 d	0.0015 ± 0.0 c	0.013 ± 0.0 ab	0.60 ± 0.01 cd
	DH BV03+BV10	3.8 ± 0.10 ab	273.7 ± 6.3 bc	0.0017 ± 0.0 b	0.013 ± 0.0 ab	0.65 ± 0.02 bc

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.3. Caracterização dos vasos do xilema foliar

A adição dos microrganismos aumentou a densidade de venação, com valores superiores aos observados nas plantas na seca sem microrganismos (Fig. 3A). Avaliando os vasos xilemáticos na nervura principal da folha, constatou-se que o diâmetro médio dos vasos xilemáticos e a área total do xilema reduziram significativamente nas plantas na seca isolada em comparação com as plantas em seca e tratadas com microrganismos (Fig. 3B-C). O número de vasos, no entanto, não se alterou em nenhum dos tratamentos em comparação com os respectivos controles (Fig. 3D). Por fim, observou-se que o aumento da resistência ao colapso induzida por estresse (Fig. 3E) aumentou apenas na seca sem microrganismos, mantendo-se igual ao controle nos demais tratamentos de restrição hídrica.

4.4. Pigmentos cloroplastídicos

A seca promoveu alterações nos pigmentos cloroplastídicos em *Glycine max*, sendo essas alterações mais conspícuas nas plantas expostas à seca isoladamente. O conteúdo de clorofila a (Chl_a) foi reduzido no tratamento DH, enquanto em ambos os tratamentos de seca com bio defensivos a concentração de pigmentos manteve-se similar ao controle (Fig. 4A). Em relação ao conteúdo de clorofila b (Chl_b), apenas o tratamento DH BV02+BV10 conseguiu promover um aumento na concentração desse pigmento em comparação com as plantas no tratamento DH, embora no DH BV03+BV10 a Chl_b , não tenha diferido do controle sem microrganismos (Fig. 4B). Como consequência, a concentração de clorofilas totais ($\text{Chl}_a+\text{Chl}_b$) diminuiu apenas no tratamento DH, em comparação ao CT, enquanto os tratamentos DH BV02+BV10 e DH BV03+BV10 foram similares ao controle (Fig. 4C). Não foram observadas alterações na razão da a clorofila a/b ($\text{Chl}_a/\text{Chl}_b$), já no conteúdo de carotenoides foi reduzido no tratamento DH em comparação ao controle (Fig. 4D-E).

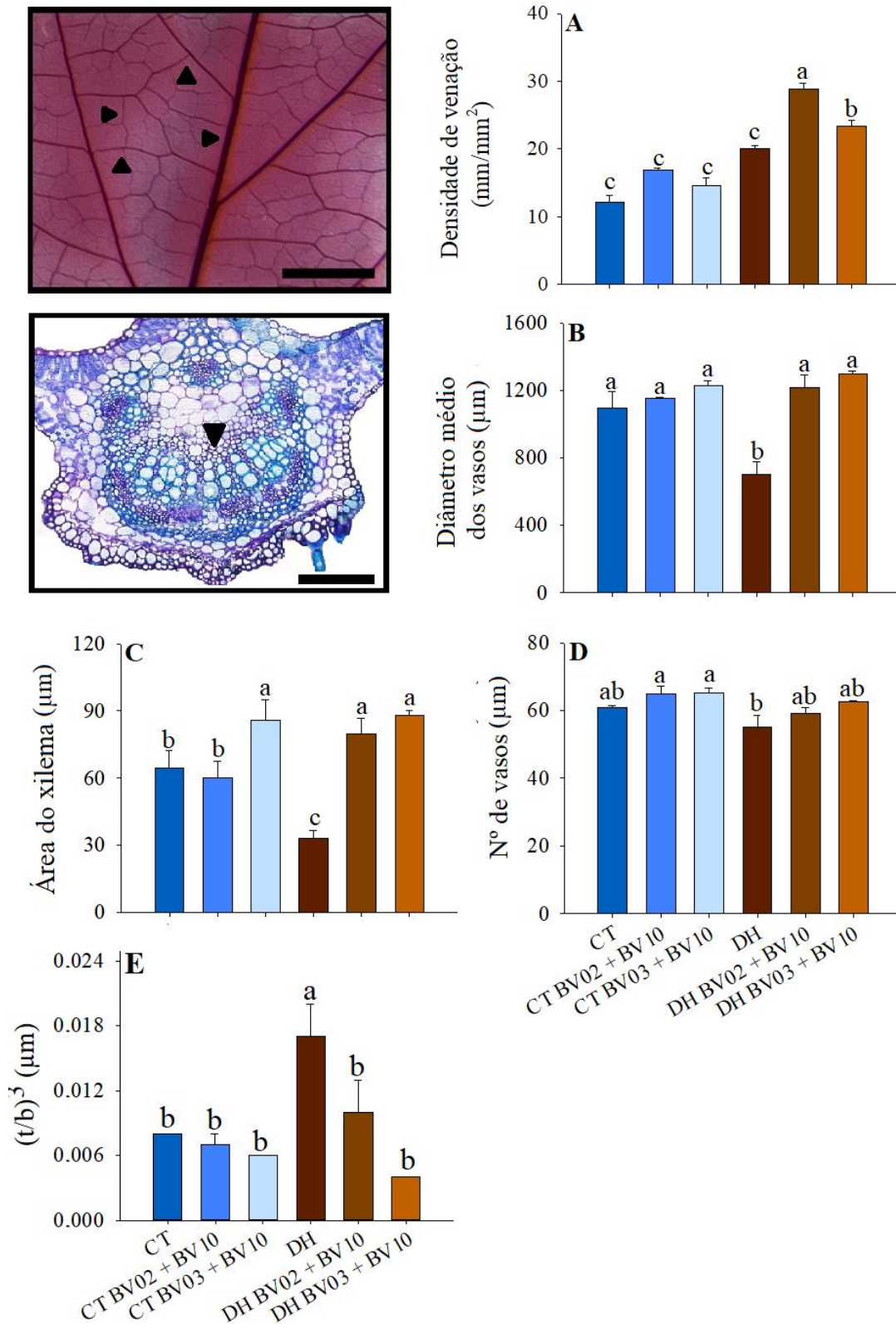


Figura 3 – Caracterização do xilema foliar: densidade de venação (A), diâmetro médio dos vasos xilemáticos (B), área do xilema (C) número dos vasos xilemáticos (D), resistência ao colapso induzido por estresse $(t/b)^3$ em *Glycine max* completamente irrigada (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) e BV03+BV10 (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma asperellum* em sementes e folhas). Seta preta indica as nervuras e os vasos xilemáticos,

respectivamente. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

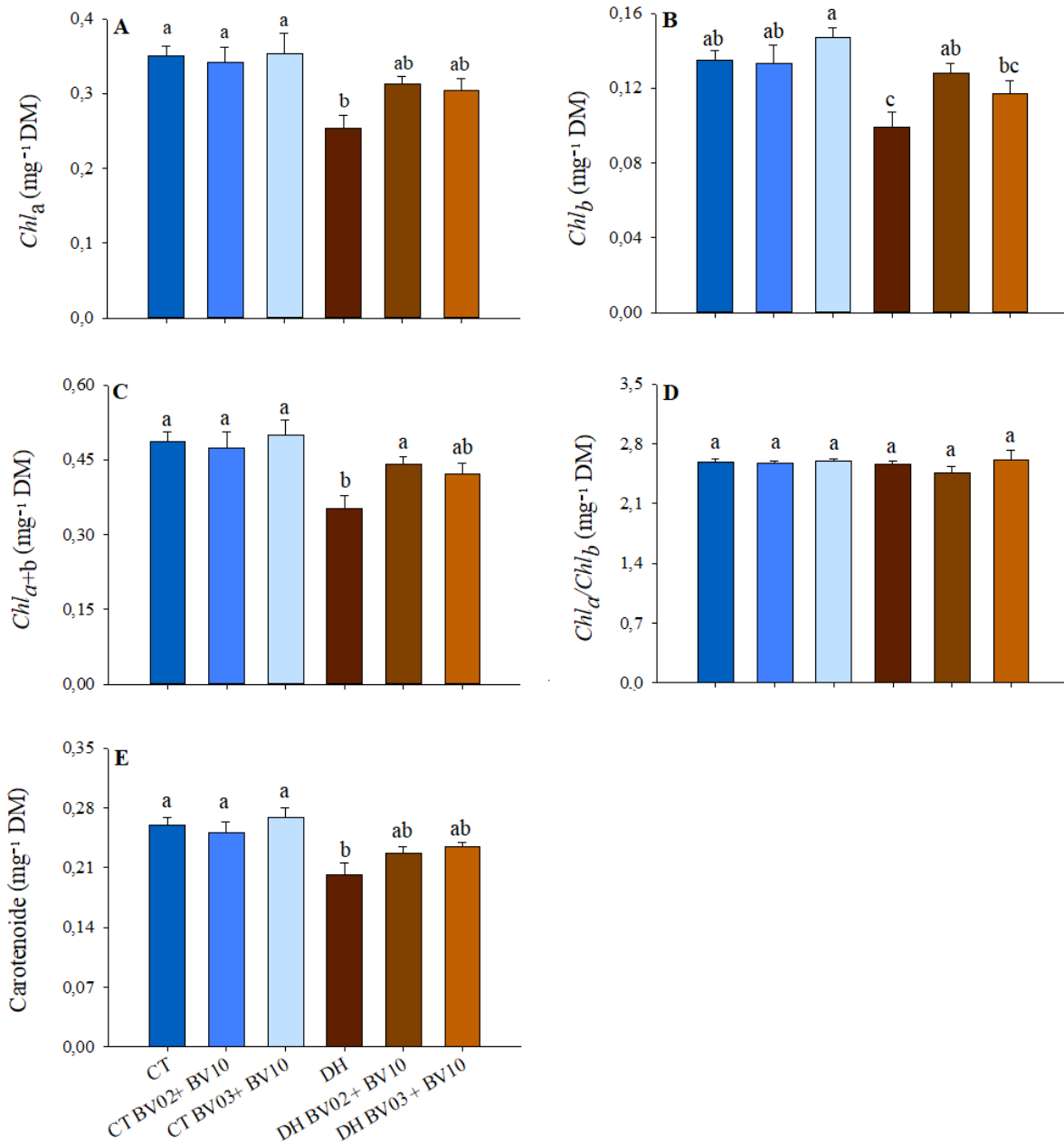


Figura 4 – Pigmentos cloroplásticos: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (Chl_a+Chl_b) (C), razão entre a clorofila a e b (Chl_a+Chl_b) (D) e carotenoides (E), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.5. Fluorescência da clorofila *a*

A seca alterou a primeira etapa da fotossíntese, evidenciado pela fluorescência da clorofila *a* e fluorescência de imagem (Fig. 5 e 6). O rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) e o rendimento quântico basal dos processos fotoquímicos (F_0/F_m) (Fig. 5A-B) não se alteraram em nenhum dos tratamentos analisados (Fig. 5A). O rendimento quântico efetivo do PSII (ϕ_{PSII}), por outro lado, diminuiu significativamente em todos os tratamentos de seca, mas essa queda foi menos intensa quando os microrganismos estavam presentes (Fig. 5C). O quenching não fotoquímico (q_N) aumentou nos tratamentos DH e DH BV02+BV10, enquanto DH BV03+BV10 manteve-se similar ao controle (Fig. 5D). O quenching fotoquímico (q_P), por outro lado, apresentou queda apenas no tratamento DH, enquanto a combinação dos bio defensivos nessas condições manteve o q_P próximo ao controle (Fig. 5E).

A fluorescência de imagem ilustrou o aumento da fluorescência mínima (F_0) no DH isolado; incrementos no ϕ_{PSII} , fração de centros abertos do PSII (q_L) e q_P com a adição dos bio defensivos microbiológicos; e, aumento de q_N em DH e DH BV02+BV10 (Fig. 6).

4.6. Trocas gasosas

A exposição das plantas à seca afetou todos os parâmetros das trocas gasosas analisados (Fig. 7). A taxa de assimilação líquida do carbono (A) diminuiu em todos os tratamentos, sobretudo nas plantas expostas à DH, com incremento significativo em DH BV02+BV10 e DH BV03+BV10 (Fig. 7A). Queda acentuada também foi observada na condutância estomática (g_s) e na taxa transpiratória (E) após a exposição aos estresses, não havendo, nesse caso, diferença entre os tratamentos em restrição hídrica (Fig. 7B-C). Não foi observado alterações na concentração interna de CO_2 (C_i) ao final da imposição dos tratamentos (Fig. 7D). Entretanto, a eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) foi menor nos tratamentos de seca, com incremento significativo em ambos os tratamentos com a combinação de bio defensivos (Fig. 7E). Por fim, a maior eficiência no uso da água, representada pela razão entre A/E , foi apresentada no tratamento DH BV02+BV10 em comparação ao controle (Fig. 7F).

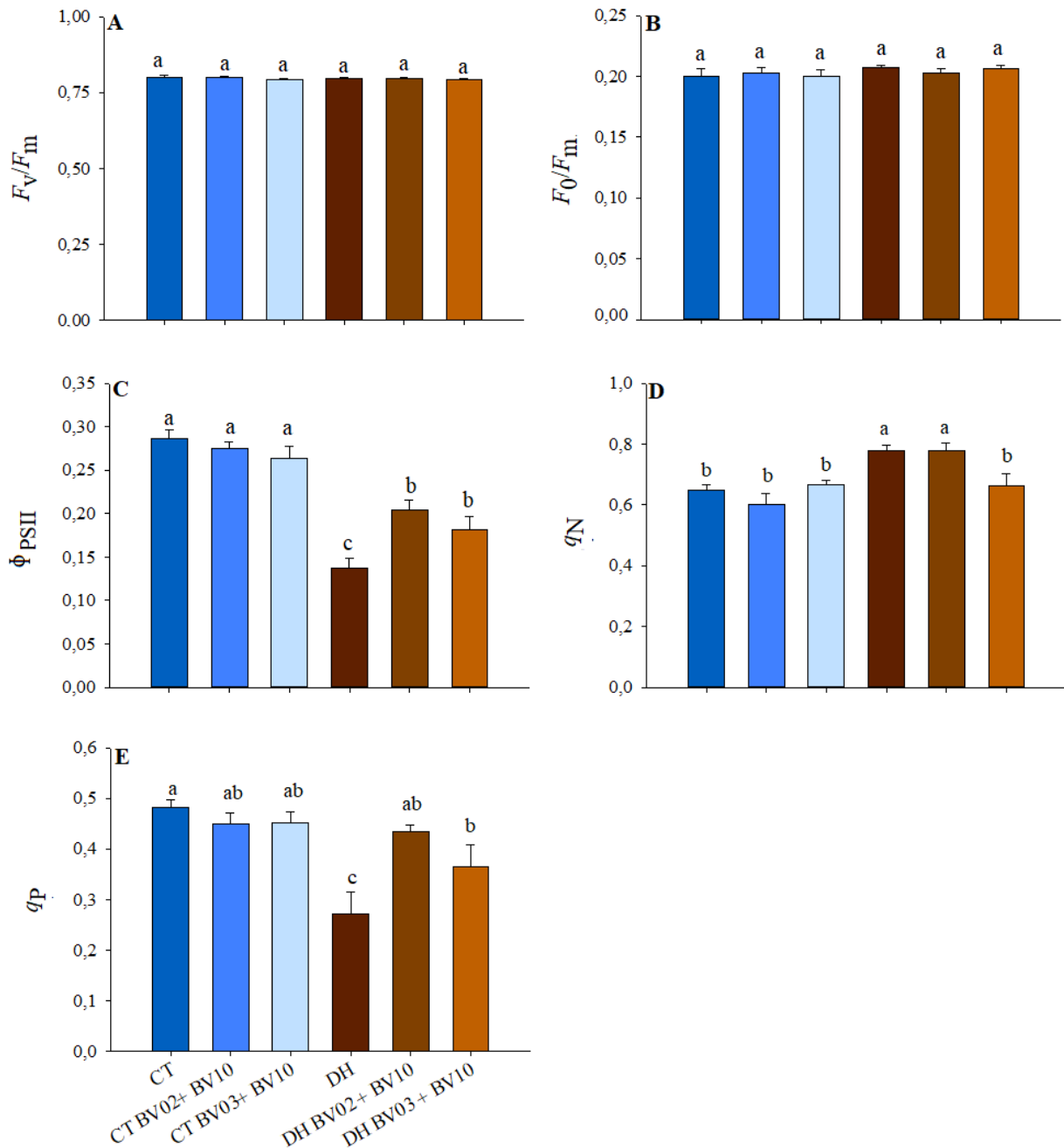


Figura 5 – Fluorescência da clorofila a: rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) (A), produção quântica basal dos processos não fotoquímico no fotossistema II (F_0/F_m) (B), rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (C), quenching não fotoquímico (q_N) (D) e quenching fotoquímico (q_P) (E), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

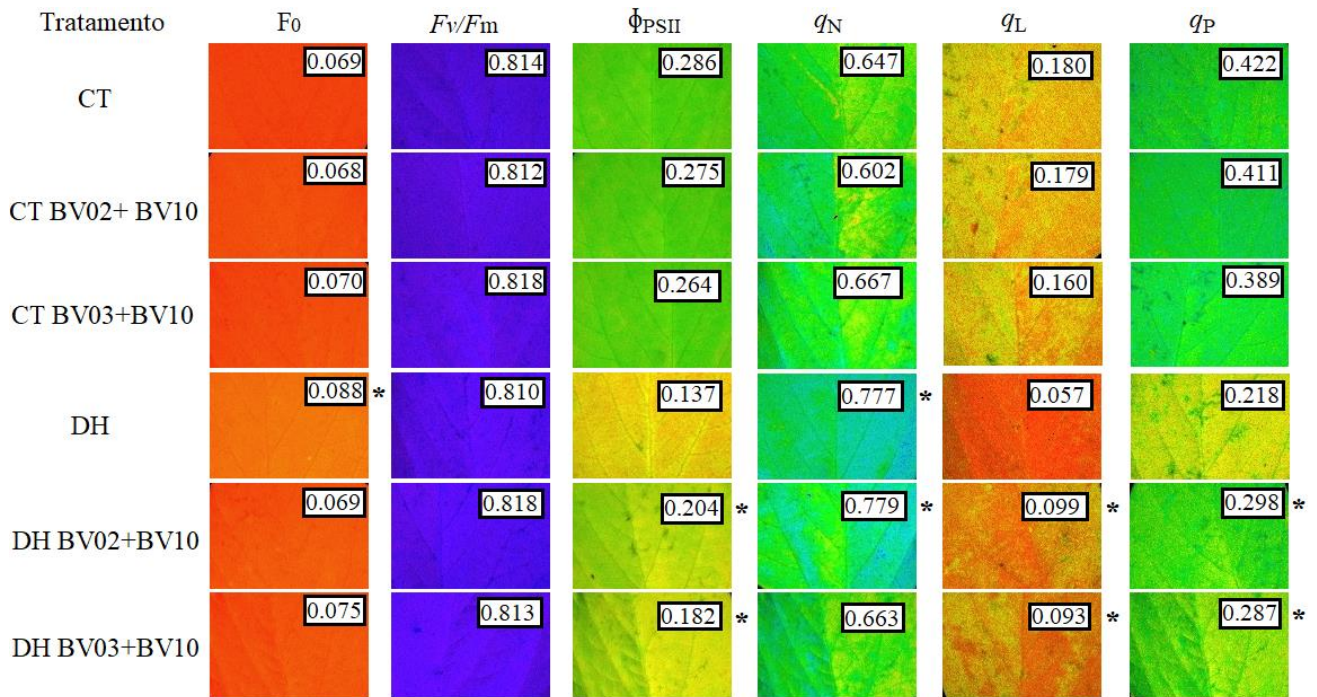


Figura 6 – Fluorescência de imagem da clorofila *a*: fluorescência mínima (F_0), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}), quenching não fotoquímico (q_N), fração de centros do PSII abertos (q_L) e quenching fotoquímico (q_P), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Aumento significativo entre tratamentos em déficit hídrico são indicadas por asteriscos (*) pelo teste SNK a 0,05%.

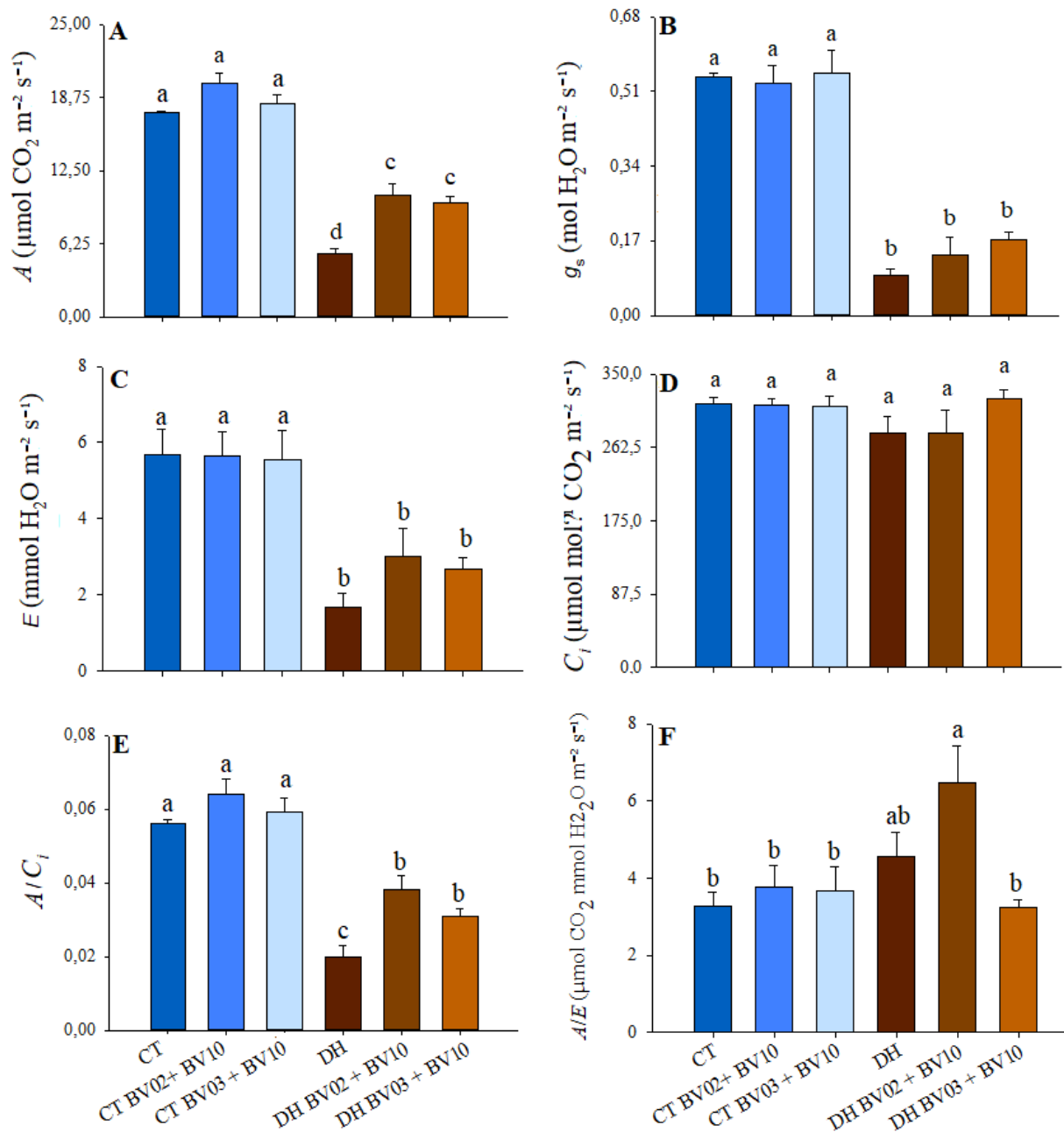


Figura 7 – Trocas gasosas: Assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), transpiração (E) (C), concentração interna de CO_2 (C_i) (D), eficiência de carboxilação (A/C_i) (E) e eficiência no uso da água (A/E) (F), em plantas completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos. Foram aplicadas as combinações de bio defensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (SNK, 0,05% de probabilidade).

4.7. Respiração noturna (R_N)

Em relação à respiração noturna (R_N) não foram observadas alterações significativas após a imposição dos tratamentos (Fig. 8A). No entanto, houve alteração na relação entre a taxa de respiração

e a taxa fotossintética (R_N/A), com aumento considerável nas plantas em DH e parcialmente nos tratamentos de seca combinada com biodefensivos (DH BV02+BV10 e DH BV03+BV10) (Fig. 8B).

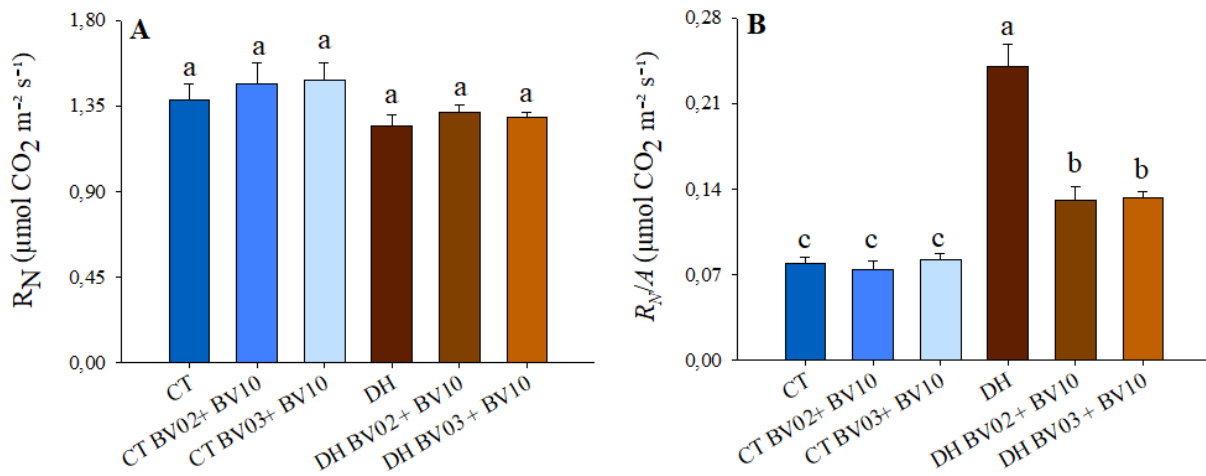


Figura 8 – Taxa respiratória: respiração noturna (R_N) (A) e razão entre a taxa de respiração e a fotossíntese (R_N/A) (B), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.8. Detecção de amido transitório foliar

Apenas tratamento déficit hídrico, sem microrganismos, apresentou menor coloração com lugol, principalmente no parênquima esponjoso (Fig. 9).

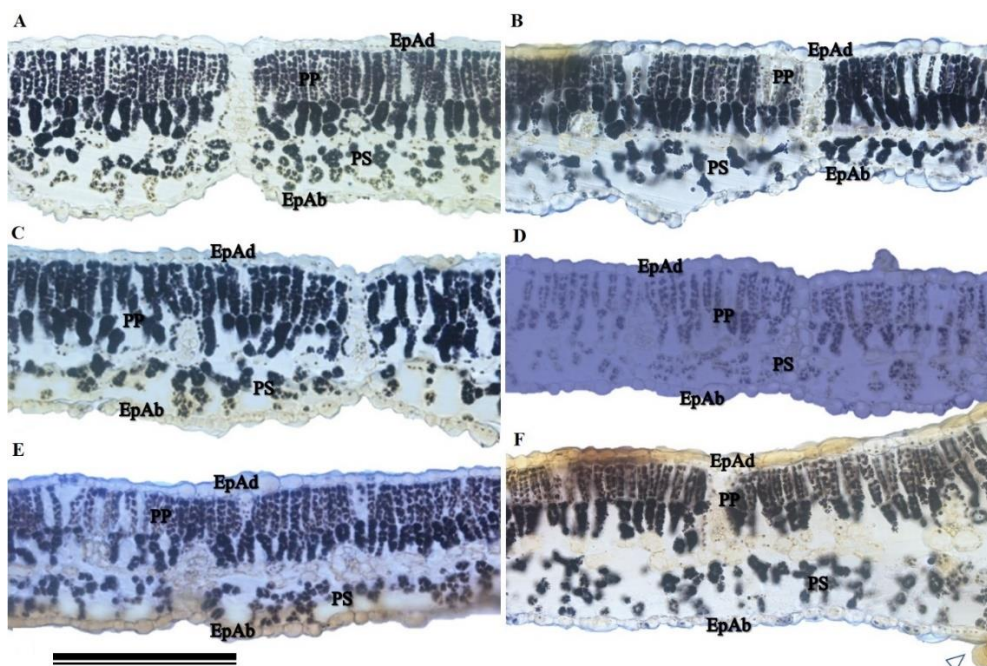


Figura 9: Secção transversal da lâmina foliar de *G. max* fixado em resina para detecção de amido (reagente Lugol): EdAd- epiderme adaxial, PP- parênquima paliçádico, PS-parênquima

esponjoso, EpAb- epiderme abaxial, em plantas completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos: CT (A), CT BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) (B), CT BV03+BV10 (C) *Bacillus amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas), e submetidas ao déficit hídrico, DH (D), DH BV02+BV10 (E) (*B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) e DH BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (F). Seta branca indicando tricoma glandular. Barras de 200 µm.

4.9. Danos celulares e metabolismo antioxidante

A exposição das plantas ao déficit hídrico ocasionou danos celulares e aumento da atividade do metabolismo antioxidante, sendo essas alterações atenuadas pelo tratamento com microrganismos (Fig. 10). Em comparação ao CT, o estresse hídrico, quando aplicado isoladamente, aumentou a concentração de H₂O₂ nas células vegetais, não observando diferença estatística nos tratamentos com bio defensivos (Fig. 10A). O incremento em H₂O₂, por sua vez, refletiu em danos nas membranas celulares de *G. max* no tratamento DH, onde a concentração de Hidroperóxido Dieno Conjugado (HPDC) foi elevada (Fig. 10B).

Em relação às enzimas antioxidantes, observou-se que nas plantas submetidas ao estresse e tratadas com microrganismos ocorreu aumento na atividade da SOD e da CAT, enquanto nas plantas expostas à restrição hídrica de forma isolada apenas a enzima CAT apresentou maior atividade do que o controle (Fig. 10C-D). As enzimas APX e POX não diferiram do controle (CT) em nenhum dos tratamentos (Fig. 10E-F).

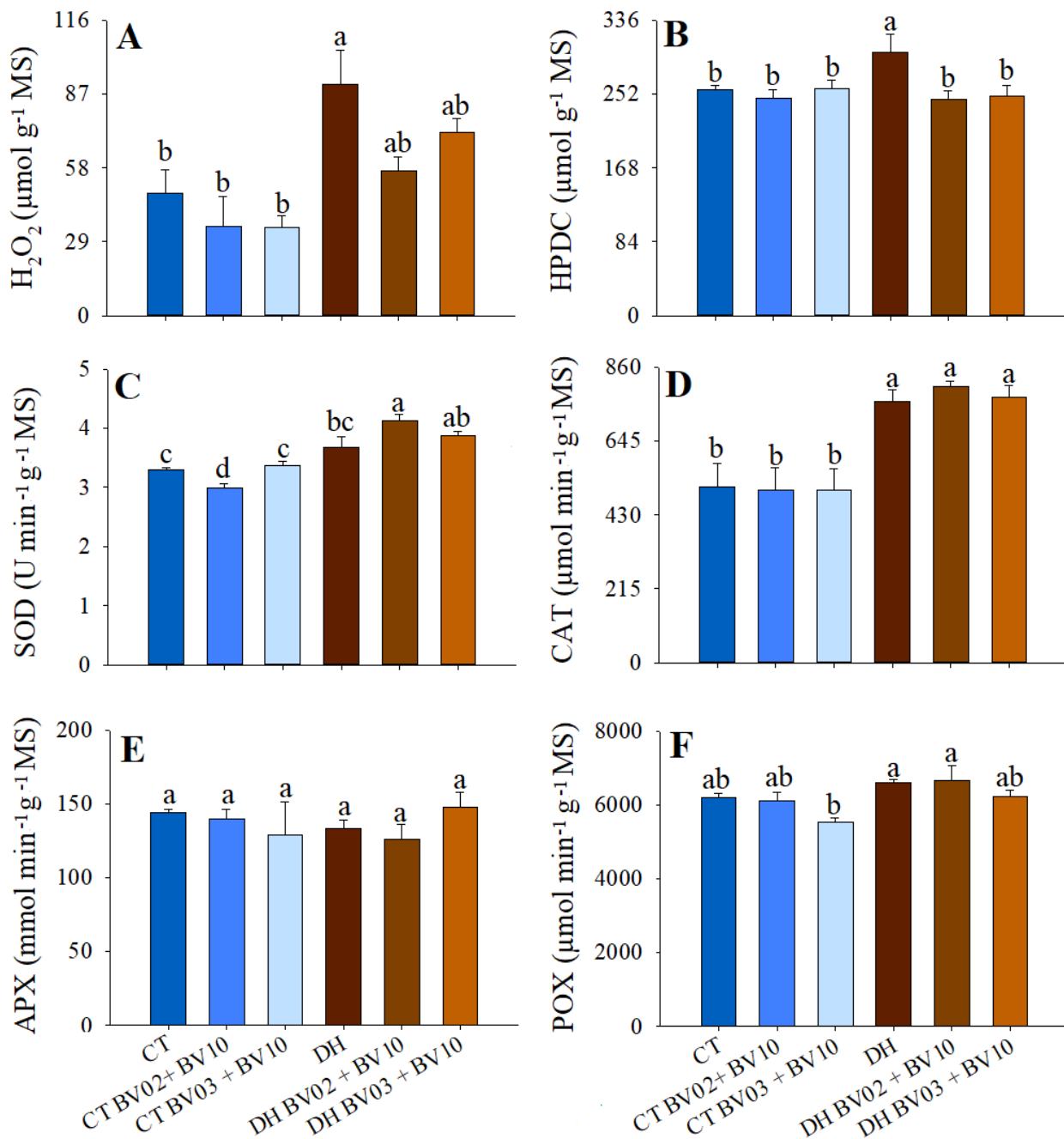


Figura 10 – Danos em membranas e metabolismo antioxidante: peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), hidroperóxido dieno conjugado (HPDC) (B), superóxido dismutase (SOD) (C), catalase (CAT) (D), ascorbato peroxidase (APX) (E) e peroxidase (POX) (F), em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.10. Descrição anatômica e micromorfométricas do limbo foliar

Em secção transversal do limbo foliar foi observado que a epiderme de *G. max* é simples com presença de mucilagem e estômatos em ambas as faces, caracterizando a folha como anfiestomática

(Fig. 11A). Há presença de tricomas tectores (seta verde) e glandulares (seta laranja) (Fig. 11 D, seta amarela) projetados acima das células epidérmicas. O parênquima clorofiliano paliçádico é do tipo dorsiventral, contendo duas camadas de células alongadas, ocupando cerca de 50% da espessura do mesofilo e o parênquima clorofiliano esponjoso é constituído de três a quatro células com grandes espaços intercelulares. A exposição aos dez dias de seca promoveu remoção de algumas células da epiderme adaxial no tratamento na seca isolada (Fig. 11D, seta preta).

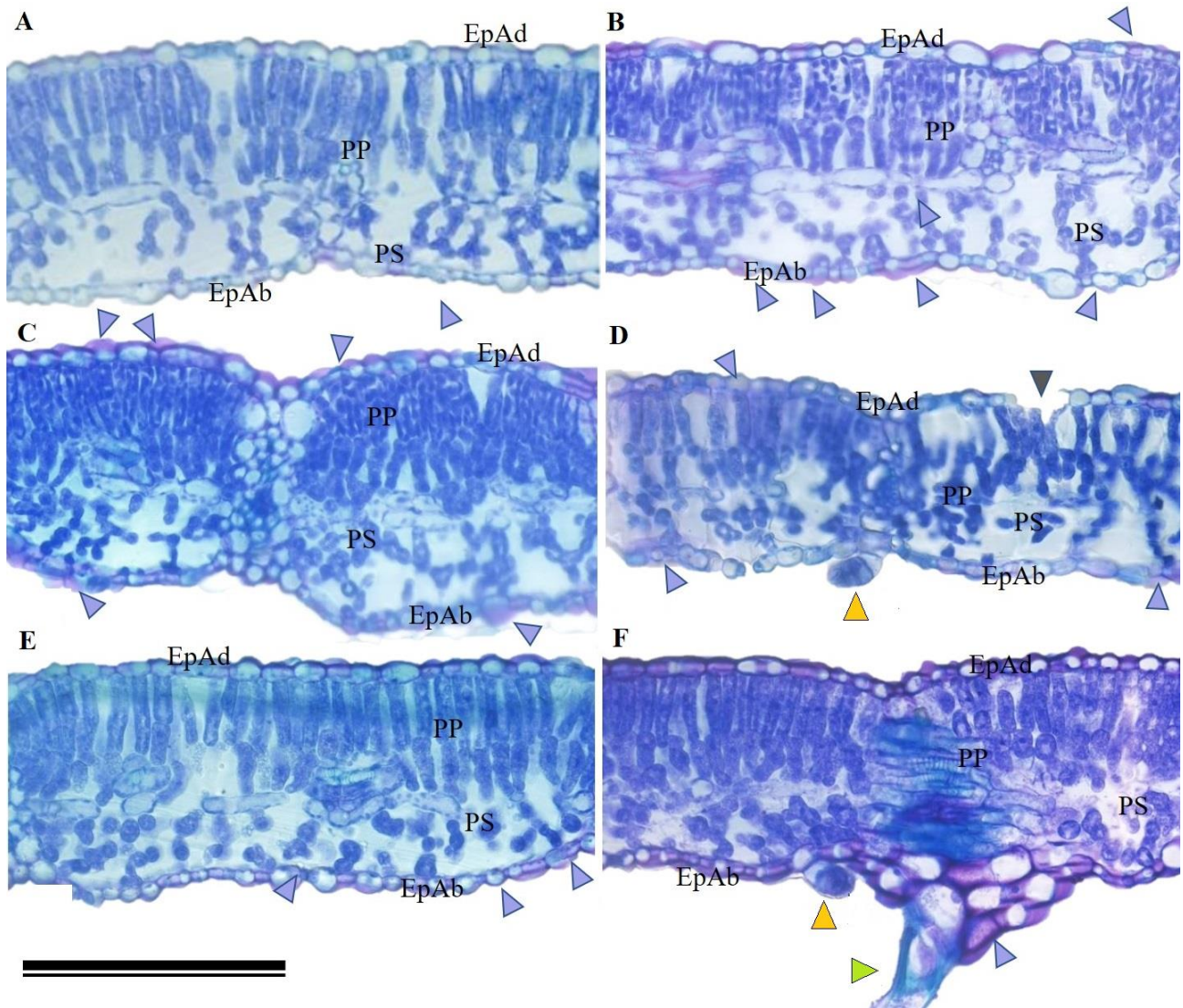


Figura 11 - Caracterização anatômica do limbo foliar EpAd - epiderme adaxial, EpAb - epiderme abaxial, PP – parênquima paliçádico, PS – parênquima esponjoso. Seta lilás indicando presença de mucilagem nas epidermes. Seta laranja indicando tricoma glandular, seta verde indicando tricoma tector e a seta preta indicando remoção de células da epiderme. Em *Glycine max* completamente irrigada (controle – CT) ou submetida ao déficit hídrico (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos: CT (A), CT BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas) (B), CT BV03+BV10 (C) *B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas), e submetidas ao déficit hídrico, DH (D), DH BV02+BV10 (E) (*B. subtilis* + *T. asperellum* em folhas) e DH BV02+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas) (F). Barras de 200 µm.

4.11. Análises micromorfológicas do limbo foliar

A exposição aos dez dias em déficit hídrico alterou os aspectos anatômicos foliares em *G. max* (Fig. 12). A epiderme adaxial (EpAd) foi reduzida no tratamento DH BV03+BV10 quando comparado ao seu respectivo controle (CT BV03+BV10) (Fig. 12A). Não houve alterações na epiderme abaxial (EpAb) e no parênquima paliçádico entre os tratamentos avaliados (Fig. 12B e E). Por outro lado, a espessura do limbo foliar e do mesofilo foi reduzida no tratamento DH sem microrganismos em comparação ao CT, sendo essa alteração também observada no tratamento DH +BV02+BV10 (Fig. 12C-D). E, por fim, o parênquima esponjoso foi menor nos tratamentos em DH e DH BV02+BV10 em comparação aos respectivos controles (Fig. 12F).

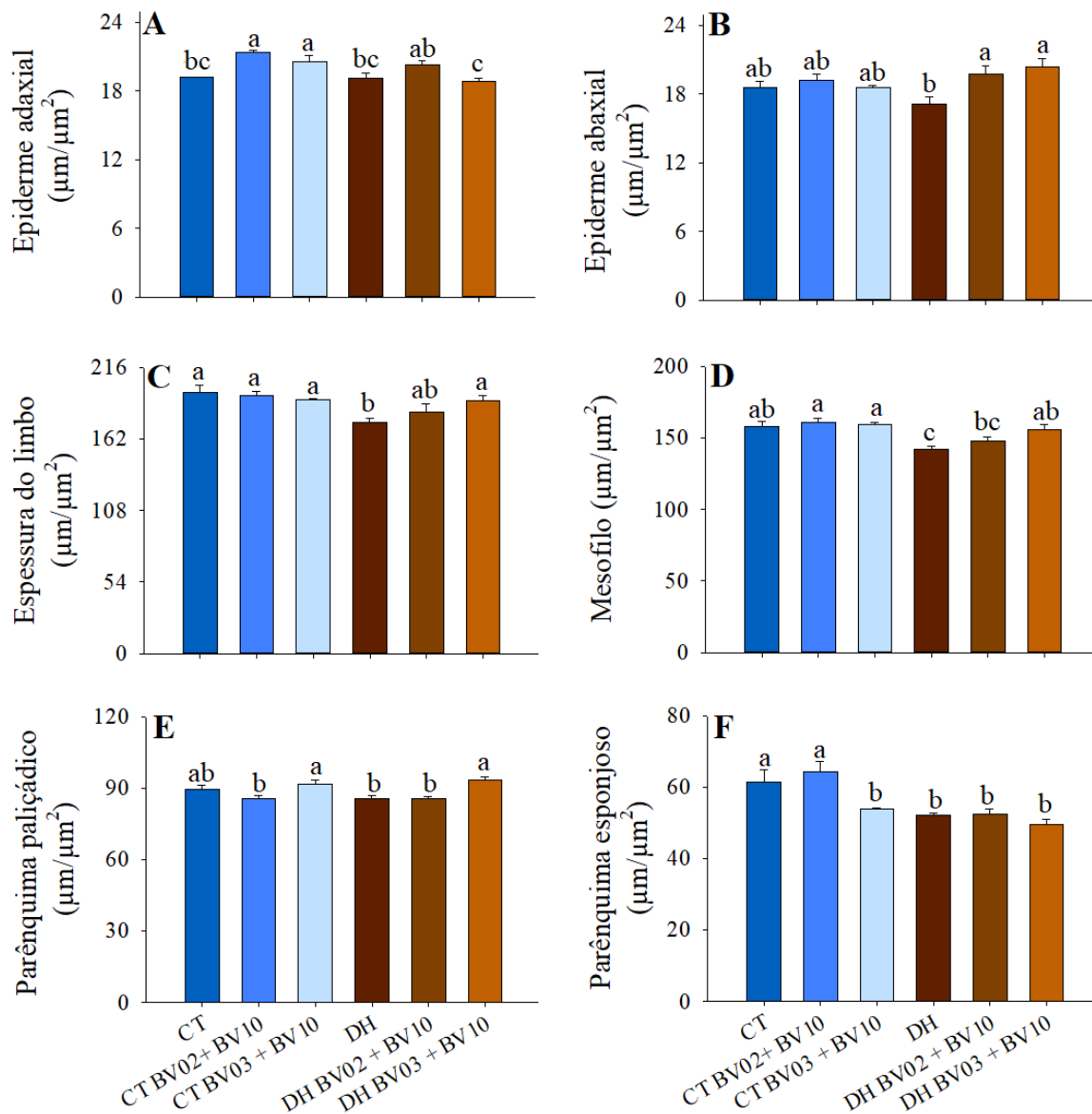


Figura 12 – Análises micromorfológicas do limbo foliar: epiderme adaxial (A) e abaxial (B), espessura do limbo (C), mesofilo (D), parênquima paliçádico (E) e parênquima esponjoso (F) em *Glycine max* completamente irrigada (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com bio defensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em

folhas) e BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade.

4.12. Produtividade e índice de tolerância

A exposição das plantas por dez dias de seca afetou a produtividade das plantas, sendo esse efeito danoso parcialmente atenuado pela combinação de microrganismos (Fig. 13). O número de vagens e de grãos diminuiu consideravelmente nas plantas expostas à seca sem o tratamento com os biodefensivos e, embora queda também tenha sido observada nos tratamentos na seca com microrganismos, a queda foi menor e as plantas mantiveram-se similares ao controle (Fig. 13A-C). De fato, em comparação com o tratamento DH, houve aumento de 41% e 38% no número de vagens e de 38 % e 34 % no número de grãos para os tratamentos DH BV02+BV10 e DH BV03+BV10, respectivamente. Em relação ao volume dos grãos, essa variável foi menor nas plantas tratadas em DH quando comparado ao controle. O tratamento com biodefensivos resultou em aumento de 12% do volume de grãos em comparação com o déficit hídrico. Como consequência, tratamentos em déficit hídrico com microrganismos apresentaram maior índice de tolerância a seca.

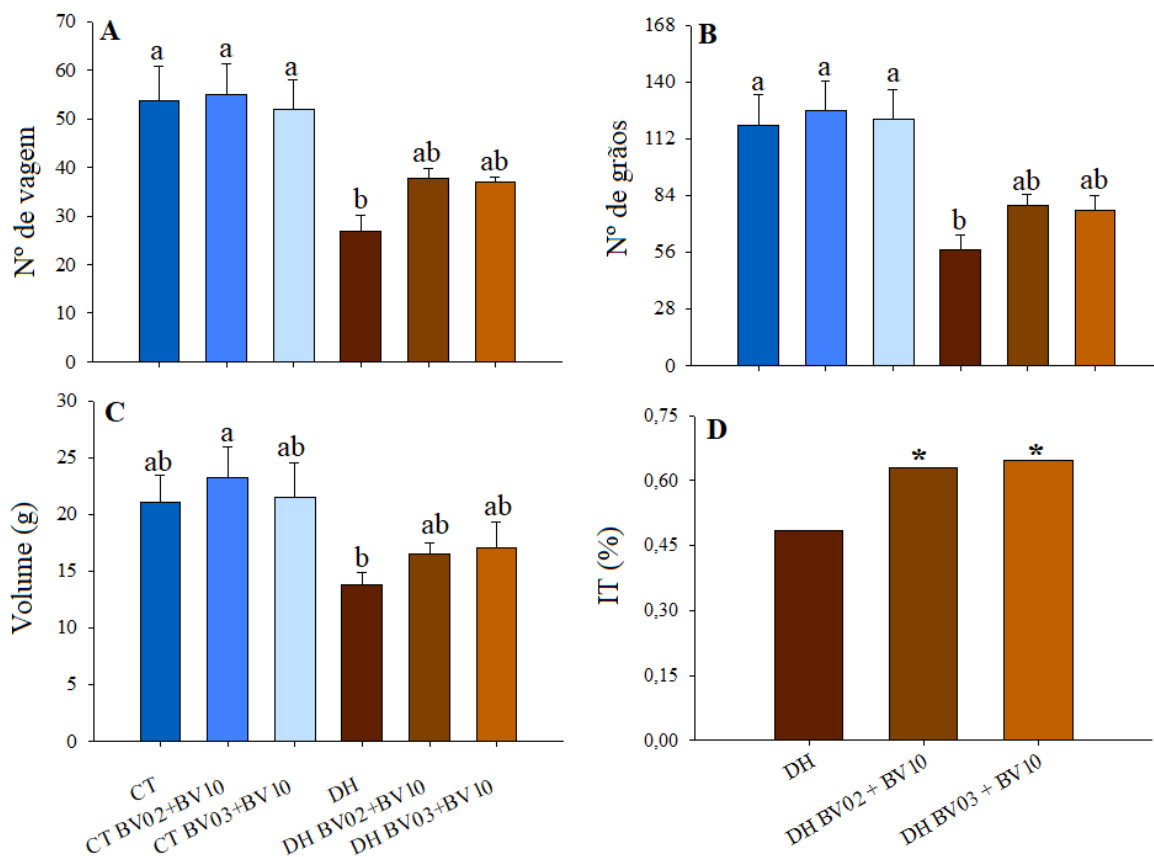


Figura 13 – Produtividade: Número de vagens (A), número de grãos (B) e volume de grãos (C) e índice de tolerância (D) em plantas de soja completamente irrigadas (controle – CT) ou submetidas à seca (DH), isoladamente ou em combinação com biodefensivos. Foram aplicadas duas combinações de biodefensivos: BV02+BV10 (*Bacillus subtilis* + *Trichoderma asperellum* em folhas); e

BV03+BV10 (*B. amyloliquefaciens* + *T. asperellum* em sementes e folhas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK a 0,05% de probabilidade. Para a variável índice de tolerância (IT) comparou-se DH com DH BV02+BV10; e DH com DH BV03+BV10 utilizando-se o teste t. Médias seguidas pelos (*) diferem do tratamento DH para o índice de tolerância a seca.

5. DISCUSSÃO

A seca é o principal fator abiótico limitante do rendimento das culturas e a queda na produtividade está relacionada com o comprometimento de importantes processos centrais do metabolismo vegetal (Zhang *et al.*, 2022). Uma alternativa de grande interesse comercial, que tende a atenuar as perdas na agricultura, aumentando a tolerância de plantas à seca de forma sustentável, é o uso biodefensivos multicepa (Mpanga *et al.*, 2019). Neste estudo, avaliou-se os efeitos da seca, aplicada isoladamente ou em combinação com MPCP, nos principais aspectos fisiológicos, morfoanatômicos e produtivos de *Glycine max*. Foi possível constatar que os biodefensivos mitigaram os danos desencadeados pela seca e mantiveram a funcionalidade de importantes processos, sendo atributos fundamentais quando se pensa no aumento de produtividade em um cenário de mudanças climáticas globais.

A manutenção do status hídrico celular demandou ajustes nos mecanismos de perda e transporte de água pelas plantas

O potencial hídrico é considerado o melhor indicador do estado hídrico da planta, porque é o resultado integrado das condições ambientais acima e abaixo do solo (De Swaef *et al.*, 2022). Com efeito, o potencial hídrico reflete o balanço entre o suprimento hídrico, largamente determinado pela disponibilidade de água no solo, e a perda de água para a atmosfera, que pode ser parcialmente regulada pela planta. Todas as plantas na seca apresentaram alterações capazes de diminuir a perda de água para a atmosfera, através de ajustes em g_s (Fig. 7). Além disso, algumas alterações na anatomia dos estômatos também contribuem para diminuir a transpiração. Nesse sentido, todas as plantas em déficit hídrico apresentaram menor tamanho dos estômatos na face adaxial, enquanto na face abaxial foram observadas reduções nos tratamentos DH e DH+BV02+BV10 (Tabela 1). Estômatos menores na soja exposta à seca tem sido observado em diferentes estudos (Zhang *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2020; Mano *et al.*, 2023) e são comumente associados a maior velocidade de resposta (Drake *et al.*, 2013). Em variedades de arroz, por exemplo, foi demonstrado que cultivares com estômatos menores apresentavam maior redução em g_s quando expostas à seca (Ouyang *et al.*, 2027). Na soja, a diminuição no tamanho do estômato não foi acompanhada por aumentos na densidade, de forma que f_{gc} apresentou a mesma tendência observada em S (Tabela 1). Assim como

a diminuição no tamanho das células-guarda, decréscimos em f_{gc} também podem resultar em menor perda de água para a atmosfera, incluindo, nesse caso, tanto a transpiração estomática quanto a transpiração residual (Machado *et al.*, 2021). Apenas as alterações na perda de água para a atmosfera, no entanto, não são suficientes para explicar as diferenças observadas no Ψ_w em plantas tratadas ou não com microrganismos, já que alterações estomáticas ocorreram em praticamente todos os tratamentos com restrição hídrica. Porém, nas plantas tratadas com microrganismos, também foi possível observar ajustes no transporte de água, com maior condutividade hidráulica do caule (K_{stem} , Fig. 1D), garantindo uma maior disponibilidade de recursos hídricos para as folhas (Poorter *et al.*, 2014). Em adição, as folhas dos tratamentos com microrganismos mantiveram, em comparação com o déficit hídrico isolado, vasos xilemáticos com maior diâmetro (Fig. 3 B), maior área de xilema (Fig. 3 C) e maior densidade de venação (Fig. 3 A). Segundo a equação de Hagen-Poiseuille, a eficiência do transporte de água de um conduto é equivalente a quarta potência do seu diâmetro (Pickard & Melcher 2005). Nesse sentido, vasos xilemáticos com diâmetros maiores contribuem para a maximização no transporte de água para o tecido foliar o que, juntamente com aumentos na densidade de venação, amplificam as vias alternativas de transporte hídrico (Nardini *et al.*, 2014), mantendo maior nível de hidratação foliar (Roãcàs *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2018).

Aumento no diâmetro do vaso xilemático pode resultar em maior vulnerabilidade teórica ao embolismo se não for acompanhada de alterações na espessura da parede (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2023; Isasa *et al.*, 2023), o que foi evidenciado pelos menores valores de $(t/b)^3$ em *G. max* tratadas com microrganismos (Fig. 3 E). Esses dados evidenciam, portanto, que a adição de microrganismos altera a resposta da planta ao déficit hídrico, investindo, principalmente, em mecanismos de aquisição e transporte de água. A longo prazo, essa estratégia pode resultar no esgotamento da água disponível no solo. Convém ressaltar, no entanto, que cultivares de soja são selecionadas para serem cultivadas durante a estação chuvosa, na qual os eventos de seca são curtos e periódicos, de forma que investir em transporte de água pode ser mais importante do que investir em tolerância ao embolismo. Os dados corroboram com o estudo de Dória *et al.* (2019) em diversas espécies herbáceas anuais, mostrando que a tolerância ao embolismo não é afetada pelo diâmetro dos vasos xilemáticos. Em adição, maior tolerância ao embolismo não necessariamente irá ocorrer por maior espessura de parede em proporção à área de lúmen. Com efeito, Dória *et al.*, 2019 observaram que, em espécies herbáceas, o aumento na concentração de fibras pode fornecer o suporte celular contra implosão dos vasos do xilema, aumentando a tolerância ao embolismo sem que ocorram alterações na espessura da parede dos vasos.). Especula-se que o aumento no diâmetro dos vasos xilemáticos dos pecíolos foliares aumenta a eficiência no crescimento compensatório após eventos de seca (Pereira, 2019).

Biodefensivos microbiológicos promoveram ajustes no balanço de carbono e metabolismo antioxidante em *G. max*

Plantas que conseguem promover a manutenção do Ψ_w reduzem os riscos de danos celulares, favorecendo a manutenção da estrutura celular, bem como, os níveis adequados de moléculas necessárias ao metabolismo vegetal (Sousa *et al.*, 2020). Em relação à estrutura, observou-se que as plantas em déficit hídrico apresentaram menor espessura de diversas partes da folha, como é o caso da epiderme abaxial, do limbo foliar e do mesofilo (Fig. 12), podendo refletir a perda de turgor das células. Com efeito, há forte correlação entre a espessura da folha e o teor relativo de água (Afzal *et al.*, 2017). A diminuição na concentração de moléculas, por outro lado, pode comprometer os processos fisiológicos. Decréscimos nas clorofilas *a* e *b*, por exemplo, são comuns em plantas submetidas à seca (Adiba *et al.*, 2021) devido, principalmente, a fatores como peroxidação de membranas cloroplastídicas, aumento na atividade das clorofilases e regulação negativa de enzimas responsáveis pela biossíntese de clorofilas (Tewari *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2017). No entanto, manter os teores de clorofilas reduzidos por muito tempo compromete o crescimento, o grau de tolerância e a produtividade vegetal (Kalaji *et al.*, 2018), de forma que a manutenção dessas moléculas é um traço robusto na tolerância ao estresse por seca (Ma *et al.*, 2020). No presente estudo, os resultados ilustram que o déficit hídrico reduziu as concentrações de clorofilas *a* e *b* e clorofilas totais (Chl_{a+b}), enquanto as plantas tratadas com a combinação de biodefensivos apresentaram apenas tendência à queda, sem diferença do controle (Fig. 4).

A seca promoveu alterações nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Fig. 5-6). O F_v/F_m não se alterou em nenhum dos tratamentos em déficit hídrico, ficando dentro dos valores considerados ótimos, em torno de 0,75 a 0,85, o que pode indicar ausência de danos aos componentes do fotossistema II (Fig. 5A) (Baker, 2008; Murchie & Lawson, 2013). De forma similar, embora diversos autores utilizem a relação F_0/F_m como indicativo de estresse, neste estudo essa razão se manteve constante em todos os tratamentos (Fig. 5B), estando próximos aos valores considerados normais ou preconizados, em torno de 0,14 e 0,20 (Roháček, 2002). Por outro lado, a seca desencadeou queda no ϕ_{PSII} , aumento na dissipação de energia na forma de calor e redução na proporção dos centros de reação abertos do PSII, evidenciado pelo q_N e q_P , respectivamente (Fig. 5C-E). Com efeito, o baixo rendimento quântico do PSII (fotossistema II) pode ter sido reflexo do baixo conteúdo de clorofilas, o que, provavelmente, comprometeu a taxa o transporte de elétrons, reduzindo a absorção e transferência de energia para o PSII (Lukić *et al.*, 2020; Agathokleous *et al.*, 2020). Ao manter a concentração de pigmentos, no entanto, os biodefensivos microbiológicos conseguiram mitigar os danos desencadeados pela seca nos parâmetros de fluorescência.

Como observado para a primeira etapa da fotossíntese, a exposição das plantas aos dez dias de seca, sem o tratamento com bio defensivos, impactou as trocas gasosas (Fig. 7). Em condições de restrição hídrica a fotossíntese pode ser limitada por três fatores principais: aspectos difusivos, hidráulicos e bioquímicos (Gago *et al.*, 2019). Os fatores difusivos dizem respeito às resistências para a difusão do CO₂, as quais podem ser divididas em resistência estomática (g_s) e mesofílica (g_m) (Martins *et al.*, 2014). Já a limitação hidráulica está intimamente relacionada com a primeira resistência citada e diz respeito à capacidade da planta em transportar água do tecido radicular para os tecidos transpirantes (Scharwies *et al.*, 2019). E, por fim, a limitação bioquímica é caracterizada pela inibição da atividade enzimática do ciclo de Calvin-Benson (Wang *et al.*, 2018). Os resultados aqui obtidos apontam que as plantas expostas ao déficit hídrico sem os bio defensivos passaram pelas três limitações desencadeadas pela seca, o que resultou na queda na taxa de assimilação líquida de carbono (A) (Fig. 7A). Assim, o fechamento estomático desencadeou a diminuição de g_s (Fig. 7B) e essas plantas apresentaram menores valores de condutividade hidráulica do caule. Em relação às limitações bioquímicas, as plantas expostas à seca isoladamente apresentaram quedas mais intensas na razão A/C_i , a qual reflete a eficiência de carboxilação da Rubisco (Fig. 7D).

É interessante observar que os tratamentos de seca com e sem os bio defensivos permaneceram com a mesma E e g_s mas, apesar disso, a fixação de carbono foi maior nas plantas tratadas com os bio defensivos. É provável que tanto a combinação de *B. subtilis* e *T. asperellum* quanto a combinação de *B. amyloliquefaciens* e *T. asperellum* tenham aumentado a capacidade de assimilação de carbono, conforme evidenciado pela razão A/C_i . Assim, é possível que, ao manter a hidratação dos tecidos, os microrganismos tenham atenuado os danos sobre a Rubisco e, dessa forma, permitido maior carboxilação. Em adição, os bio defensivos também aumentaram a eficiência da primeira etapa da fotossíntese, refletindo em ganhos na fixação de CO₂. Esse dado é particularmente importante do ponto de vista agrônomo, pois aumentar a taxa fotossintética sem incrementos em g_s permite obter maior estabilidade de produção sem, contudo, desencadear a desidratação dos tecidos vegetais (Sousa *et al.*, 2020).

Uma abordagem que permite evidenciar o balanço de carbono foliar consiste na razão entre a taxa de respiração noturna e a fotossíntese (R_N/A), ou seja, mols de O₂ consumidos por mols de CO₂ incorporados (Pattison *et al.*, 1998). No presente estudo essa razão foi maior nas plantas em déficit hídrico isolado (Fig. 8B), indicando que essas plantas apresentaram maiores custos respiratórios em relação a capacidade carbono assimilado (Galmés *et al.*, 2007) o que, a longo prazo, pode comprometer todo o balanço de carbono vegetal. Tal afirmação foi corroborada pelo acúmulo de amido nas folhas de soja, o qual foi visualmente menor nas plantas expostas apenas à restrição hídrica (Fig. 9).

A imposição do déficit hídrico sem os biodefensivos microbiológicos amplificou o estresse oxidativo em *G. max*, conforme evidenciado pelo aumento na concentração de H_2O_2 e de HPDC (Fig. 6A e B). Nem mesmo o incremento na atividade das enzimas antioxidantes (Fig. 6C – F) foi suficiente para atenuar o dano oxidativo que ocorreu nas plantas cultivadas apenas na seca. Níveis do indicador HPDC em plantas tratadas com biodefensivos similares as plantas controles, por sua vez, podem ser explicados tanto pela menor ocorrência de danos, devido a manutenção da hidratação foliar, quanto pela ação combinada da ativação de enzimas do metabolismo antioxidante, particularmente a SOD e a CAT.

Impacto na produtividade

As alterações na taxa fotossintética e no balanço de carbono na soja cultivada em condições de seca refletiram em queda na produtividade da cultura, o que foi atenuado parcialmente pela combinação de microrganismos (Figura 13). O estágio fenológico reprodutivo de plantas de soja é um dos mais sensíveis à restrição hídrica (Sentelhas *et al.*, 2015). Plantas nessas condições aceleram a precocidade do período de florescimento, além disso o abortamento floral e de vagens (Mundstock & Thomas, 2005). No estágio de enchimento de grãos, por sua vez, basta um curto período de exposição à seca, associada a altas temperaturas, para que as sementes produzidas reduzam o seu tamanho e o grau de vigor (Peske & Barros, 2003). Neste estudo é importante salientar que, embora o tratamento com biodefensivos tenha promovido aumento percentual no número de grãos, vagens e no volume dos grãos, a produtividade nesses tratamentos não foi estatisticamente diferente daquela observada nas plantas submetidas à seca sem tratamento adicional. Apesar disso, os dados obtidos são extremamente relevantes quando se tem em mente o produtor de soja, uma vez que ganhos próximos a 40% no número de grãos tem grande impacto econômico, sobretudo quando se considera grandes propriedades rurais. Por fim, foi possível observar que os tratamentos com microrganismos efetivamente alteraram o índice de tolerância à seca, o que é importante, sobretudo em locais de instabilidade climática, em especial a precipitação pluvial no período de cultivo da soja, a exemplo da região Centro-Oeste brasileira.

6. CONCLUSÃO

Conseguir manter a produtividade com riscos mínimos às culturas durante a restrição hídrica é uma prioridade entre os estudos científicos. Observou-se que a combinação de biodefensivos microbiológicos foi eficiente na atenuação dos efeitos negativos da seca nos principais aspectos fisiológicos, morfoanatômicos, bioquímicos e produtivos de *Glycine max*, com capacidade de ajustar a perda de água para a atmosfera, por meio de ajustes estomáticos e xilemáticos e maior

condutividade hidráulica foliar, garantindo assim maior hidratação dos tecidos, o que promoveu incremento da taxa fotossintética mesmo com redução da abertura estomática. Estes resultados são interessantes do ponto de vista social e agrônomo, pois a manutenção da produtividade é essencial para a segurança alimentar e energética do país.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiba, A. et al (2021) Assessment of water stress tolerance in eleven pomegranate cultivars based on agronomic traits. **Agric Water Manag**, 243, 106419.
- Agathokleous, et al. (2020) Chlorophyll hormesis: are chlorophylls major components of stress biology in higher plants? **Sci Total Environ**, v.726, p.13863.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (2020) Uso da água na agricultura de sequeiro no Brasil (2013-2017). Brasília, DF. 63 p.
- Armada, E. et al (2014) Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions. **Geoderma**, 232, 640-648.
- Askari, et al (2015) Osmoregulation-mediated differential responses of field-grown fennel genotypes to drought. **Ind. Crops Prod**. 76, 494-508.
- Aung, K. et al (2018) The role of water in plant–microbe interactions. **Plant J**. 93, 771–780.
- Bai J, et al (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. **Photosynthetica**. 46: 232–237.
- Bakhshi, S et al (2023) Application of candidate endophytic fungi isolated from extreme desert adapted trees to mitigate the adverse effects of drought stress on maize (*Zea mays* L.). **Plant Physio. Bioch.**, 202, 107961.
- Banks, J. M. (2018) Chlorophyll fluorescence as a tool to identify drought stress in Acer genotypes. **Environ. Exp. Bot.**, v.155, p.118-127, 2018.
- Basu S (2016). Plant adaptation to drought stress. **F1000Research**, 5, 1554.
- Braga, AF. (2021). Interação de *Trichoderma asperellum* e *Bacillus spp.* utilizados no controle biológico de doenças na soja. IF Goiano, campos Rio Verde, 35f.
- Barcelos, G. F. (2022). Efeito da utilização de prolina na tolerância ao estresse hídrico na cultura de soja (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Beutler, AN, Centurion, J. F., Roque, C. G., & Ferraz, M. V. (2005). Optimal relative bulk density for soybean yield in Oxisols. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29, 843-849.
- Blackman, CJ. et al (2010) Leaf hydraulic vulnerability is related to conduit dimensions and drought resistance across a diverse range of woody angiosperms. **New Phytol**. 188:1113–1123.
- Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant Cell Environ**, 40(1), 4-10.
- Borges PA, et al (2018) Extreme rainfall indices in Distrito Federal, Brazil: Trends and links with El Niño southern oscillation and Madden-Julian oscillation. **Int J Clima**. 38(12): 4550–4567.
- Carvalho, IR. et al (2013) Demanda hídrica das culturas de interesse agrônomo. Enciclopédia Biosfera, 9(17).
- Clemente, DI. (2017) Estresse hídrico sobre caracteres morfofisiológicos e agrônômicos em populações de milho. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. 109 f.: il.
- de Boer, HJ. et al (2016) Optimal allocation of leaf epidermal area for gas exchange. **New Phytologist**, 210(4), 1219-1228.
- da Silva, MC, et al (2023) With a little help from my friends: inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma asperellum* alleviates drought and salt stress in soybean. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. 18:1-5.

- De Swaef, T. (2022) On the pivotal role of water potential to model plant physiological processes. in silico **Plants**, 4(1), diab038.
- Dias, MC. Brüggemann, W. (2010) Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. **Photosynthetica**, 48(1), 96-102.
- Díaz-Urbano, M., et al (2023) Development of agricultural bio-inoculants based on mycorrhizal fungi and endophytic filamentous fungi: co-inoculants for improve plant-physiological responses in sustainable agriculture. **Biological Control**, 105223.
- Dória LC, et al (2018) Embolism resistance in stems of herbaceous Brassicaceae and Asteraceae is linked to differences in woodiness and precipitation. **Ann Bot.**, 20: 1-13
- Drake PL, et al (2013) Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. **Journal of Experimental Botany** 64: 495–505.
- Eshaghi Gorgi, O., et al (2022) Effect of Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizal fungi inoculations on essential oil in *Melissa officinalis* L. under drought stress. **Biologia**, 77(1), 11-20.
- Etesami, H. et al (2023) Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. **Current Research in Biotechnology**, 100128.
- Farooq, M.; et al (2017) Estresse hídrico em leguminosas durante a reprodução e enchimento de grãos. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v.203, p.81-102.
- Flexas, J. et al (2005) The effects of drought in plant respiration. In *Plant Respiration. Advances in Photosynthesis and Respiration* (eds. Lambers, H. & Ribas-Carbo, M.) 85–94 (Springer, New York).
- Fragoso, DB. Custódio, DP. (2016) Uso de agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas em arroz de terras altas. **Front Agri Info Tec.** 15: 1-3.
- Franks PJ, Farquhar G (2001) The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. **Plant Physiol** 125:935-942.
- Gago, J. et al (2019). Photosynthesis optimized across land plant phylogeny. **Trends Plant Sci**, 24(10), 947-958.
- Galmés, J. et al (2007) Response of leaf respiration to water stress in Mediterranean species with different growth forms. **J. Arid Environ**, 68(2), 206-222.
- Giampaoli, P. Tavares, AR., Domingos M (2021). Physiological responses of two different epiphytic bromeliads exposed in a polluted subtropical region in southeast Brazil characterized by seasonal climate. **Ecological Indicators**, 120, 106945.
- Harman, G. et al (2021) Benefits to plant health and productivity from enhancing plant microbial symbionts. **Front. Plant Sci**, 11, 610065.
- Hashem, A. et al (2019) *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, 26(6), 1291-1297.
- Holbrook, NM. Zwieniecki, MA. (Eds.). (2011). *Vascular transport in plants*. Elsevier.
- Islam M, et al (2019) Impact of extreme drought on tree-ring width and vessel anatomical features of *Chukrasia tabularis*, **Dendrochronologia**. 53:63–72.
- Isasa, E. et al (2023) Addressing controversies in the xylem embolism resistance–vessel diameter relationship. **New Phytol.**, 238(1), 283-296.
- Izquierdo-García, L.F., et al (2020) *Trichoderma virens* G1006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling Fusarium wilt of cape gooseberry. **Sci Rep** 10, 6857.
- Minguez-Mosquera, I, et al (1991) Color-pigment correlation in virgin olive oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 68: 332–336.
- Johnson KM, et al (2018) Wheat leaves embolized by water stress do not recover function upon rewatering. **Plant Cell Environ.** 41: 2704–2714.
- Kalaji, HM. et al (2018) Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. **Photosynthetica**, 56(3), 953-961.

- Karuppiyah, V. et al (2019) Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 Causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. **Front Microb.** 10:1-16.
- Klein, T. et al (2018) Xylem embolism refilling and resilience against drought-induced mortality in woody plants: processes and trade-offs. **Ecol Res.** 33: 839.
- Kuki KN, et al (2005) Avaliação da eficiência do dimetilsulfóxido na extração de pigmentos foliares de *Schinus terebenthifolius* e *Cocos nucifera*. In: Anais X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal.
- Li, Y. et al. (2016) *Bacillus subtilis*-regulation of stomatal movement and instantaneous water use efficiency in *Vicia faba*. **Plant Growth Regul.**, 78(1), 43-55.
- Lukić, N. et al (2020) Plant stress memory is linked to high levels of anti-oxidative enzymes over several weeks. **Environ. Exp. Bot.**, 178, 104166.
- Machado, Renan et al. (2021) Where do leaf water leaks come from? Trade-offs underlying the variability in minimum conductance across tropical savanna species with contrasting growth strategies. **New Phytologist**, v. 229, n. 3, p. 1415-1430, 2021.
- McAdam SAM, Brodribb TJ. (2014) Separating active and passive influences on stomatal control of transpiration. **Plant Physiology**, 164: 1578–1586.
- McAdam, SAM. Brodribb, TJ. (2012) Stomatal innovation and the rise of seedplants. **Ecology Letters**, 15:1–8.
- Maxwell K, Johnson GN. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **J Exp bot**, 51(345), 659-668.
- Martins, SCV. et al (2014) Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. **PLoS ONE** 9: 95571.
- Menezes-Silva, PE. et al (2015) Wood density, but not leaf hydraulic architecture, is associated with drought tolerance in clones of *Coffea canephora*. **Trees** 29: 1687–1697.
- Miorini, TJJ. et al (2011) Water suppression in different phenological stages of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Irriga**, v.16, n.4, p. 360-368.
- Mishra, N. et al (2023) Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, 14, 1110622.
- Monclus R, et al (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* times *Populus nigra*. **New Phytol.** 169: 765–777.
- Mugiyo, H., et al. (2023) El Niño Effects on Southern African Agriculture in 2023/24, Anticipatory Action Strategies to Reduce the Impacts in Zimbabwe. Preprints 2023, 2023100421.
- Mundstock, CM. Thomas, AL. (2005) Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 31p.
- Mulatu, A. et al (2022) Biodiversity of the Genus *Trichoderma* in the rhizosphere of coffee (*Coffea arabica*) plants in ethiopia and their potential use in biocontrol of coffee wilt disease. **Crops**, 2(2), 120-141.
- Nagy, Z., et al (2013) Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. **Plant Physiol Biochem**, 67, 48-54.
- Nakagawa, S. (2021) Alterações em polifenóis, antocianinas e atividades de eliminação de radicais DPPH em batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) durante o crescimento do tubérculo. **Scientia Horticulturae**, 284, 110100.
- Nardini, A. et al (2014) The challenge of the Mediterranean climate to plant hydraulics: Responses and adaptations. **Environ. Exp. Bot.**, 103, 68–79.
- O'Donoghue EJ, et al (2017) USDA Agricultural Projections to 2026. World Agricultural Outlook Board, U.S. Dep Agric. 1-106.
- O'Brien, TP. et al (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59, 368–373.

- Oliveira, P. de; Kluthcouski, J. (2009) Práticas indutoras do crescimento radicular das principais culturas anuais, com ênfase na cultura do feijoeiro. In: Kluthcouski, J.; STONE, L. F.; Aidar, H. (Org.) Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás. EMBRAPA, p. 185-223.
- Pardo, E. M. et al (2015) Drought tolerance screening under controlled conditions predicts ranking of water-limited yield of field-grown soybean genotypes. **J Agron Crop Sci.** 201(2), 95-104.
- Pattison, R. R. et al (1998) Growth, biomass allocation and photosynthesis of invasive and native Hawaiian rainforest species. **Oecologia**, 117(4), 449-459.
- Pask AJD (2012) Physiological Breeding II: A field guide to wheat phenotyping, in: Pierre CS, Arce, VT (Eds.), Osmotic adjustment. D.F.: CIMMYT, México, p. 21-24.
- Pereira, TS (2019) Aspectos hidráulicos da tolerância à seca em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – MG. 43 f.
- Perkins, R., & Vaida, V. (2017). Phenylalanine increases membrane permeability. **J. Am. Chem. Soc.** 139(41), 14388-14391.
- Peske, AST. Barros, ACSA. (2003) Produção de sementes. Pelotas Editora RS, Cap 1, p. 12-91.
- Pickard, WF. Melcher, PJ. (2005) Perspectives on the biophysics of xylem transport. In: **Vascular transport in plants**. Academic Press. p. 3-18.
- Roãças, G. et al (2001) Leaf anatomical variation in *Alchornea triplinervia* (Spreng) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) under distinct light and soil water regimes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 136(2), 231-238.
- Rodríguez-Ramírez, EC. et al (2022) Plastic adjustments in xylem vessel traits to drought events in three *Cedrela* species from Peruvian Tropical Andean forests. **Scientific Reports**, 12(1), p.21112.
- Rodriguez-Dominguez CM, et al (2018) Mapping xylem failure in disparate organs of whole plants reveals extreme resistance in olive roots. **New Phytol.** 218:1025–1035.
- Roháček, K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, Prague, v.40, p.13-29.
- Rueden, CT. et al (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, 18:1–26
- Scharwies, J.D, Dinneny, J.R (2019). Water transport, perception, and response in plants. **J. Plant Res.**, 132(3), 311-324.
- Schuster, AC, Burghardt M, Riederer M (2017) The ecophysiology of leaf cuticular transpiration: are cuticular water permeabilities adapted to ecological conditions? *J Exp. Bot.*, 9(19):5271-9.
- Sentelhas, P.C., et al (2015) The soybean yield gap in Brazil—magnitude, causes and possible solutions for sustainable production. **The journal of agricultural science**, 153(8), 1394-1411.
- Silva, C. Ribeiro, JR. (2009) Zoneamento agroclimático para o feijão (2ª safra) nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Bahia. In: Kluthcouski, J.; Stone, L.F.; Aidar, H (Ed.). Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás. EMBRAPA. p. 97-104.
- Simeão, M. (2016) Crescimento e produtividade de grãos de soja sob déficit hídrico no solo. Universidade Federal do Piauí, 78 p.
- Siebers, MH. (2015) Heat waves imposed during early pod development in soybean (*Glycine max*) cause significant yield loss despite a rapid recovery from oxidative stress. **Glob Chang Biol.** 21(8):3114-25.
- Sharma, et al. (2020) Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. **J Plant Growth Regul.** v.39, p.509–531.
- Sperry, JS. (2000) Hydraulic constraints on plant gas exchange. **Agric. For. Meteorol.** 104: 13–23.
- Su AY, et al (2017) Synergistic effects of *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and water retaining agent on drought tolerance of perennial ryegrass. **Int J mol sci**, 18(12): 2651.

- Shukla, N. et al (2015) Seed bioprimering with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. **Annals Appl. Biol.** 166, 171–182.
- Srivastava, S. et al (2021) Review of patents for agricultural use of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, 31, 127-136.
- Stone, BW. et al (2018) The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. **Ann. Plant Rev.**, 1, 533–556.
- Tewari, A. et al (2008) Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. **Bioresource Technology** 18: 8715-8721.
- Valentini R, et al (1995) In-situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in turkey oak (Q-Cerris L) Leaves-diurnal cycles under different levels of water-supply. **Plant Cell Environ.** 18: 631–640.
- Valliyodan B, et al (2017) Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans. **J Exp Bot.** 68: 1835–1849.
- van Schaik, E et al (2018) Changes in surface hydrology, soil moisture and gross primary production in the Amazon during the 2015/2016 El Niño. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1760), 20180084.
- Vurukonda, SSKP. et al. (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological research**, v. 184, p. 13-24.
- Wellburn AR. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J Plant Physiol.** 144: 307-313.
- Zhang, P. et al (2020) Drought resistance of ten ground cover seedling species during roof greening. **PloS one**, 15(6), e0220598.
- Zhang, J. et al (2016) Photosynthetic performance of soybean plants to water deficit under high and low light intensity. **South African Journal of Botany**, 105, 279-287.
- Waha, K., et al (2012) Climate-driven simulation of global crop sowing dates. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 21, 247–259.
- Wu, L. et al (2018) Acetoin and 2, 3-butanediol from *Bacillus amyloliquefaciens* induce stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. **J. Exp. Bot.** 69, 5625–5635.