

# Trocas gasosas em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *gluconacetobacter diazotrophicus* e submetidas aos estresses salino e hídrico

Janice Maria Ribeiro Dias<sup>1</sup>, André Oliveira Souza, Roberta Ribeiro Barbosa<sup>2</sup>, Eliemar Campostrini<sup>3</sup>, Gonçalo Apolinário de Souza Filho<sup>4</sup>

Submissão: 04/03/2020 - Aprovação: 02/04/2020

**Resumo** - A cultura da cana-de-açúcar é considerada moderadamente sensível a estresses ambientais, o que resulta na diminuição do crescimento e conseqüentemente da produtividade. Adicionalmente, existe uma necessidade da aplicação de altas doses de fertilizante nitrogenado. Uma alternativa em potencial e agroecologicamente correta é o uso de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio, como a *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Porém, em condições de estresse abiótico, os benefícios provenientes dessa associação planta-endófito podem ser alterados devido à fisiologia de resposta ao estresse. Neste trabalho, objetivou-se estudar o efeito da inoculação de *G. diazotrophicus* por meio da avaliação dos parâmetros de trocas gasosas em plantas de cana-de-açúcar submetidas aos estresses salino e hídrico. Foram avaliadas as taxas de condutância estomática, transpiração e fotossíntese líquida, por meio de um analisador portátil de gases por infravermelho (IRGA). Os resultados obtidos demonstraram que a presença da bactéria pode alterar as taxas de condutância estomática e transpiração, interferindo na fisiologia de resposta à salinidade e seca.

**Palavras-chave:** Bactéria endofítica. Condutância estomática. Transpiração. Salinidade. Seca.

## Gas exchanges in sugar cane plants inoculated with *gluconacetobacter diazotrophicus* and submitted to saline and hydroid stresses

**Abstract** - The sugarcane crop is considered moderately sensitive to environmental stresses, which results in reduced growth and lower productivity. In addition, there is a need for the application of high doses of nitrogen fertilizer. A potential and agroecologically correct alternative is the use of nitrogen-fixing endophytic bacteria, such as *Gluconacetobacter diazotrophicus*. However, under conditions of abiotic stress the benefits from this plant-endophyte association can be altered due to the physiology of stress response. The objective of this work was to study the effect of inoculation of *G. diazotrophicus* by means of the evaluation of the parameters of gas exchange, in sugarcane plants submitted to salt and water stresses. The rates of stomatal conductance, transpiration and liquid photosynthesis were evaluated by means of a portable infrared gas analyzer (IRGA). The results showed that the presence of the bacteria may alter the rates of stomatal conductance and transpiration, interfering in the physiology of response to salinity and drought.

**Keywords:** Endophytic bacteria. Stomatal conductance. Transpiration. Salinity. Drought.

## INTRODUÇÃO

Plantas podem interagir com diferentes microrganismos formando associações benéficas ou patogênicas. Há décadas, essa coevolução entre plantas e bactérias têm sido estudadas e importantes efeitos positivos, oriundos de bactérias endofíticas, já foram observados e descritos, como a promoção do crescimento vegetal, a fixação biológica do nitrogênio (SCHULTZ et al., 2016; MUANGTHONG et al., 2015), a solubilização de nutrientes (INTORNE et al., 2012) e a produção de

fitormônios (COHEN et al., 2009; COHEN et al., 2008; BOTTINI et al., 2004).

O comportamento endofítico é determinado por microbiomas encontrados e isolados de dentro de tecidos vegetais, sendo incapazes de prejudicar visivelmente a planta (MARASCO et al., 2012; RASHID et al., 2012; HARDOIM et al., 2008). Entre as bactérias com potencial agrobiotecnológico está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, caracterizada inicialmente como endofítica fixadora de nitrogênio. Muitos estudos já descreveram essa interação e, particularmente, pesquisas envolvendo *G.*

<sup>1</sup> Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas pela UENF. Mestrado em Produção Vegetal pela UENF. Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela UENF. Graduanda em Biomedicina pela Faculdade Multivix Cachoeiro de Itapemirim. Professora e Coordenadora pedagógica do Curso de Medicina da Faculdade Brasileira de Cachoeiro.

<sup>2</sup> Doutorado e Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela UENF. Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela UENF.

<sup>3</sup> Doutorado em Produção Vegetal pela UENF. Mestrado em Ciências Agrárias pela UFV. Graduação em Agronomia pela UFV. Pós Doutorado pela UNB, Universidad de Almeria, Università Cattolica Del Sacro Cuore e USDA-ARS. Professor na Universidade Estadual Norte Fluminense.

<sup>4</sup> Pós Doutorado em Genética e Biologia Integrativa pela Universidade de Harvard. Doutorado em Biociências e Biotecnologia pela UENF. Mestrado em Genética e Biologia Molecular pela UNICAMP. Graduação em Agronomia pela UFV. Professor na Universidade Estadual Norte Fluminense.

*diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar vêm sendo desenvolvidas buscando entender como tais bactérias podem impactar positivamente o crescimento e a saúde vegetal (BALDANI et al., 2014).

Essa coevolução bactéria-plantas tem demonstrado a existência de uma adaptação constante para reconhecer e burlar os mecanismos de ataque e defesa em ambos organismos. Essa interação inicia-se com um reconhecimento molecular mútuo, levando a uma cascata de sinalização, que resultará em uma resposta de resistência ou susceptibilidade. Durante essas alterações moleculares, a epiderme vegetal é a primeira barreira a ser ultrapassada. Um dos mecanismos do vegetal em resposta ao reconhecimento bacteriano é a abertura e fechamento dos estômatos (MELOTTO, 2017). Os estômatos são responsáveis por usar eficientemente o CO<sub>2</sub> para a fotossíntese e realizar simultaneamente a evapotranspiração (SCHROEDER et al., 2001).

Plantas desenvolveram um mecanismo para fechar estômatos ao detectar padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs). Esse mecanismo é conhecido como defesa estomática (MELOTTO, 2017; GIMENEZ-IBANEZ et al., 2017). Estudos anteriores relataram a sinalização que regula a defesa estomática envolvendo mecanismos endógenos e exógenos na resposta integrada das células guarda (MURATA et al., 2015; LEE et al., 2016; MELOTTO, 2017; LIN; CHEN, 2018). Esse controle estomático é regulado por diversos fatores ambientais, incluindo luz, CO<sub>2</sub>, estresse bióticos e abióticos. A principal função do fechamento estomático é evitar a perda de água através da transpiração, induzindo a tolerância à seca em condições de estresse hídrico.

As plantas são constantemente confrontadas com estresses abióticos e bióticos que resultam na diminuição ou perda da produtividade. Atualmente, o aumento do aquecimento global tem aumentado a frequência de condições meteorológicas extremas e, juntamente com a má distribuição pluviométrica, ameaçam a produção agrícola e a segurança alimentar mundial (QI et al., 2018). A seca é um dos estresses abióticos que mais afetam o crescimento e desenvolvimento vegetal, levando a grandes perdas na agricultura (LIM et al., 2015).

Para tentar solucionar tais condições adversas, nos últimos anos, diversas práticas agrícolas que utilizam sistemas de irrigação inadequados, insumos externos, fertilizantes e pesticidas inorgânicos têm resultado em uma degradação ambiental contínua do solo, da vegetação e de

recursos hídricos. Atualmente, abordagens sustentáveis e agroecologicamente corretas estão ganhando o foco de biólogos, agrônomos e outros profissionais ambientalistas, priorizando a gestão integrada do ambiente. Uma opção em potencial para aumentar o crescimento e a produtividade das plantas, e reduzir o impacto destrutivo do uso inadequado de fertilizantes químicos no meio ambiente, pode ser a inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal (KRAUSE et al., 2006).

No entanto, em condições ambientais adversas, os benefícios provenientes da associação planta-endófito podem ser alterados devido à fisiologia de resposta ao estresse, como salinidade e seca (SANTOS et al., 2012). Assim, torna-se importante avaliar as propriedades benéficas dos endófitos, no aumento da produtividade agrícola e na adaptação de plantas em resposta a estresses ambientais, visando sua aplicação em práticas sustentáveis na agricultura (MEI; FLINN, 2010).

Em culturas como a cana-de-açúcar, é necessária a aplicação de altas doses de fertilizante nitrogenado por hectare (BOODEY et al., 2003), que pode ser perdido por lixiviação e volatilização, podendo também ocasionar danos ao ambiente devido à eutrofização de rios e lençóis freáticos (SANTOS et al., 2012). Tudo isso leva ao aumento do custo de produção. Uma solução agroecológica e viável seria a inoculação dessas plantas de cana-de-açúcar com bactérias endofíticas, fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento vegetal. A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma opção que já vem sendo objeto de pesquisa e também utilizada por alguns produtores.

Considerando a importância da cultura de cana na economia brasileira, a necessidade da preservação do ambiente, e sabendo-se que a cana-de-açúcar é uma espécie moderadamente sensível ao estresse hídrico (MAAS; HOFFMAN, 1977), objetivou-se estudar o efeito da inoculação de *G. diazotrophicus* na resposta de plantas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino e hídrico. Entre as metodologias utilizadas para diagnosticar a integridade vegetal, em resposta a estresses ambientais, estão as análises fisiológicas de trocas gasosas.

Com base no exposto, objetivou-se estudar parâmetros de trocas gasosas (condutância estomática-gs, transpiração-E e fotossíntese líquida-A) em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, durante a exposição aos estresses salino e hídrico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense, localizada no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, situada a latitude 21°45'15" Sul, longitude 41°19'28" Oeste e altitude de 13 m.

Foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar cv RB 758540, cultivadas a partir de minitoletes, cedidos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes, RJ). Os minitoletes foram desinfestados por submersão em água a 52 °C durante 2 horas. Após a desinfestação, foram levados à casa de vegetação e plantados em vasos plásticos de 700 mL, contendo um minitolete por vaso e uma mistura de areia autoclavada e vermiculita, numa proporção de 2:1. Após 20 dias, as plantas foram submetidas a seis diferentes tratamentos e divididas em grupos: controle, inoculada, inoculada + estresse salino, inoculada + estresse hídrico, estresse salino e estresse hídrico.

Para realizar o inóculo, as raízes foram imersas em cultura de *G. diazotrophicus* PAL-5, crescida em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido com densidade ótica entre 1,3 a 1,5 Abs, em 600 ηm, com 200 μL de glicerol a 50 %.

As plantas de cana-de-açúcar foram inoculadas com a bactéria, por meio da imersão de suas raízes na cultura de *G. diazotrophicus*. As raízes das plantas foram mantidas imersas na solução durante 3 horas. As plantas não inoculadas foram imersas em meio DYGS isento de bactéria, por igual período de tempo.

Após a inoculação, cada plântula foi novamente transferida para vasos individuais, contendo o substrato e mantidas em casa-de-vegetação onde permaneceram até o final dos experimentos. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

Dois semanas após a inoculação, as plantas foram submetidas ao estresse salino (1,0 % de NaCl,  $\psi_s$  de -0,5 MPa) e hídrico durante 30 dias. Para o estresse salino, as plantas foram irrigadas com 400 mL de solução Yoshida (Yoshida et al., 1985) salinizada (1,0 % NaCl). Para o estresse hídrico, a irrigação foi cessada no primeiro dia de estresse. Plantas do tratamento controle e inoculada receberam 400 mL de solução Yoshida sem o agente estressante.

Todas as plantas eram irrigadas em intervalos de 2 dias com 50 mL de água destilada, quantidade suficiente para evitar a desidratação e não permitir a percolação, evitando a retirada do sal, presente no substrato das plantas submetidas ao estresse salino.

As análises dos parâmetros de trocas gasosas foram determinadas através da utilização do sistema analisador portátil de gases por infravermelho (IRGA), modelo Ciras II (PP Systems). Foram avaliadas as taxas de condutância estomática (Gs, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), transpiração (E, mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e fotossíntese líquida (A, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

As leituras foram realizadas na região mediana da primeira folha completamente expandida (+1), abaixo do cartucho foliar, em limbo foliar de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>, aos 15, 20 e 30 dias de tratamento, durante o período da manhã, entre 8 e 10 h, à temperatura ambiente. Foram utilizadas três plantas para cada tratamento, sendo realizadas duas leituras para cada planta, totalizando seis leituras.

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e regressão. A análise de variância foi realizada por meio de delineamento experimental inteiramente casualizado, em faixas (split-block), ao nível de 5% para o teste F, e suas médias foram comparadas pelo método de agrupamento Scott-Knott (1974). O programa utilizado para a análise dos dados foi o pacote estatístico R, de domínio público, obtido em <http://www.r-project.org>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser verificado na Tabela 1, dos três parâmetros fisiológicos analisados, a condutância estomática apresentou respostas significativas para as análises em função do tempo e para a interação tratamento x tempo. A variável transpiração apresentou variação significativa apenas em função do tempo. Para a fotossíntese líquida não houve resposta significativa.

Apesar da parcela subdividida ser utilizada por muitos autores, Pearce (1953) sugeriu uma adequação para essa análise estatística. O autor sugere que o tempo pode ser considerado como um fator sistemático, podendo ser desejável particionar o Erro(b). A esse procedimento, ele deu o nome de análise de experimentos em faixas (split-block). Nesse sentido, optou-se por realizar a análise experimental em split-block, levando em consideração que a fundamental diferença entre delineamentos com observações repetidas e delineamentos em parcelas subdivididas é que a classificação da subparcela (tempo) não foi casualizada para formar os arranjos experimentais.

As plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* e as plantas não inoculadas, submetidas às condições de salinidade e estresse hídrico, apresentaram menores valores de

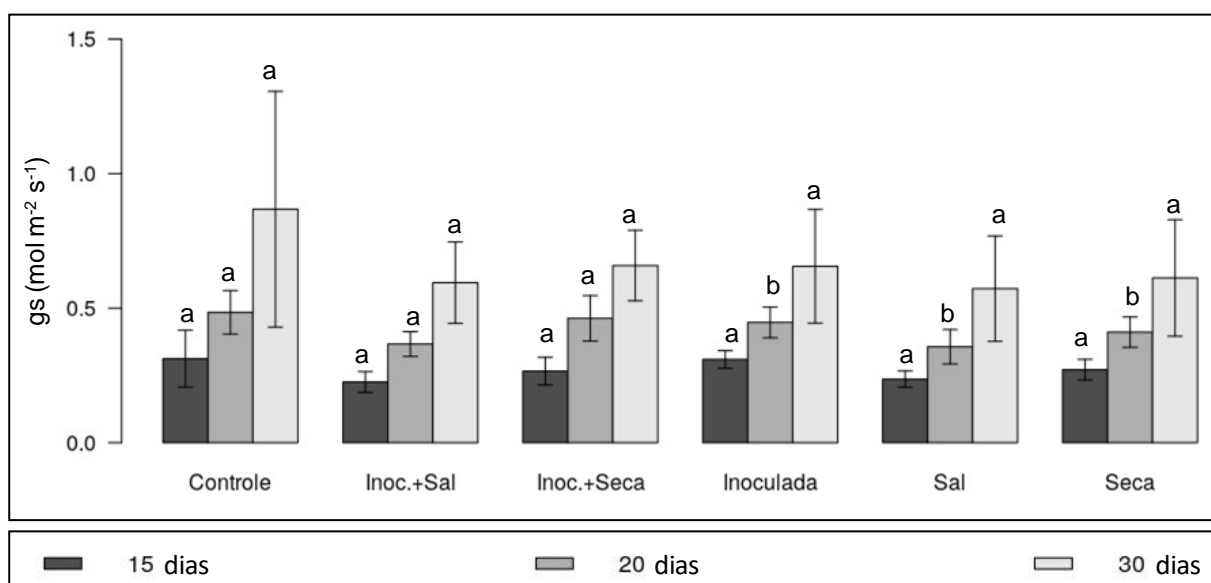
condutância estomática (gs) aos 20 dias de tratamento (Figura 1). Estes resultados indicam que a presença da bactéria influenciou a abertura

estomática de plantas inoculadas submetidas aos estresses salino e hídrico.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para valores do quadrado médio da condutância estomática (gs), transpiração (E) e fotossíntese líquida (A) de plantas de cana-de-açúcar submetidas aos diferentes tratamentos. As leituras foram realizadas após 15, 20 e 30 dias de tratamento.

FV	GL	Quadrados Médios		
		Condutância (gs)	Transpiração (E)	Fotossíntese (A)
Tratamento	5	0,06716 <sup>ns</sup>	15,142 <sup>ns</sup>	40,600 <sup>ns</sup>
Erro a	30	0,03207	5,345	18,850
Tempo	2	1,39243*	65,800*	30,328 <sup>ns</sup>
Erro b	10	0,07683	6,580	7,484
Trat. x Tempo	10	0,01290*	1,219 <sup>ns</sup>	15,959 <sup>ns</sup>
Erro c	50	0,00618	1,219	8.137

\* - significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, <sup>ns</sup> - não significativo.



**Figura 1.** Condutância estomática (gs) em plantas de cana-de-açúcar submetidas aos diferentes tratamentos. As abreviações Inoc.+Sal e Inoc.+Seca representam os tratamentos combinados Inoculada e Sal, Inoculada e Seca, respectivamente. As leituras foram realizadas após 15, 20 e 30 dias de tratamento. As barras representam o valor médio (n=6) ± desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas pelo método de agrupamento Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Foi realizada a análise de regressão, aos 20 dias, para a variável condutância estomática, e observa-se, na Tabela 2, que os valores de condutância apresentaram redução nas plantas inoculadas ( $0,02288 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), submetidas à salinidade ( $0,0223 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e seca ( $0,0224 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). O maiores valores de condutância, quando comparados ao controle, foram verificados nos

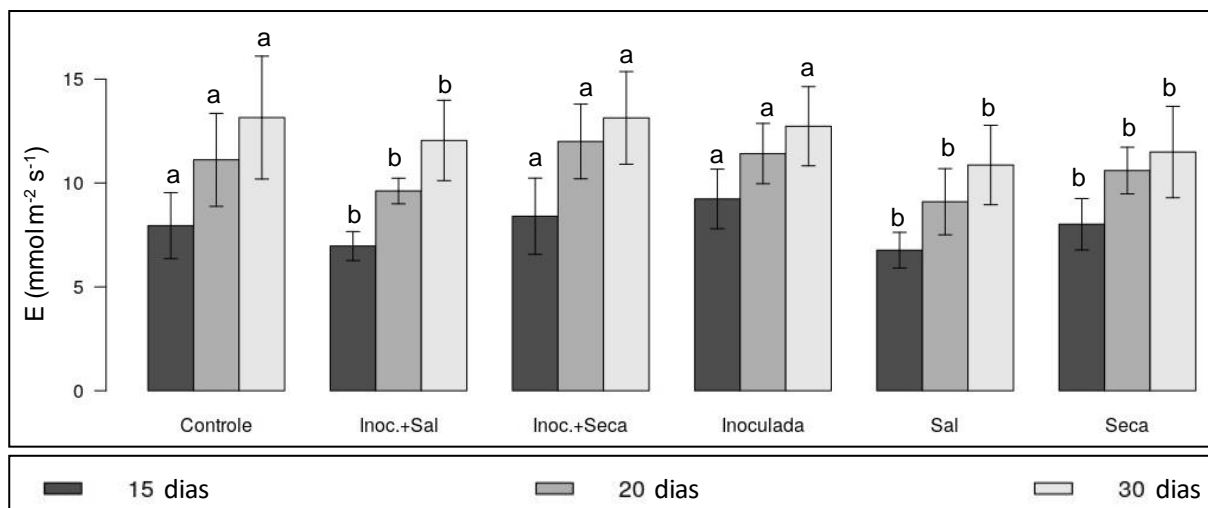
tratamentos combinados ( $0,0244 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,00252 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Os resultados indicam que o efeito combinado inoculação+estresse, isso é, a presença da bactéria durante o estresse, não permitiu que as plantas realizassem o fechamento estomático que é previsto em resposta à salinidade e déficit hídrico.

**Tabela 2.** Análise de regressão para a variável condutância estomática.

Tratamento	Modelo de Regressão Linear		R <sup>2</sup> (%)
	$\beta_0$	$\beta_1$	
Controle	- 0,2515	<b>0,0372</b>	99,93
Inoc. + Sal	- 0,1326	<b>0,0244</b>	99,70
Inoc. + Seca	- 0,0842	<b>0,0252</b>	96,41
Inoculada	- 0,0225	<b>0,0228</b>	99,48
Sal	- 0,0947	<b>0,0223</b>	99,93
Seca	- 0,0533	<b>0,0224</b>	99,27

Porém, aos 30 dias (Figura 1), observou-se uma normalidade em relação aos valores de condutância estomática, sugerindo uma possível forma de adaptação das plantas ao estresse. Os valores de transpiração (Figura 2) mostraram-se reduzidos em plantas inoculadas sob estresse salino e em plantas submetidas à salinidade e à seca, aos 15, 20 e 30 dias de tratamento. A redução da perda de água pela transpiração, durante os estresses salino e

hídrico, já é descrito na literatura (SILVA et al., 2007; MUNNS, 2002). Porém, a presença da bactéria, em plantas sob estresse hídrico, não influenciou as taxas de transpiração, ao longo dos 30 dias de tratamento, quando comparadas às plantas não inoculadas e submetidas à seca. Tal resultado indica que a bactéria interfere na resposta da planta em condições de déficit hídrico, impedindo a redução da transpiração.



**Figura 2.** Transpiração (E) em plantas de cana-de-açúcar submetidas aos diferentes tratamentos. As abreviações Inoc.+Sal e Inoc.+Seca representam os tratamentos combinados Inoculada e Sal, Inoculada e Seca, respectivamente. As leituras foram realizadas após 15, 20 e 30 dias de tratamento. As barras representam o valor médio ( $n=6$ )  $\pm$  desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas pelo método de agrupamento Scott-Knott ( $p<0,05$ ).

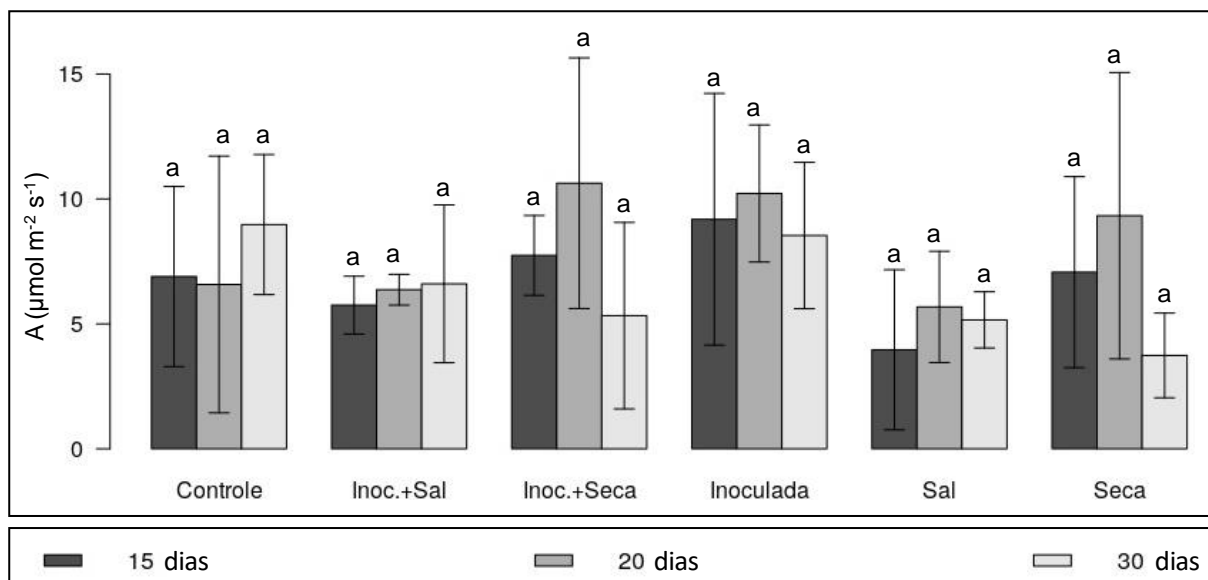
Foi realizada a análise de regressão, em função do tempo, para a variável transpiração (Tabela 3) e observou-se que há uma diferença de  $0,2713 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nos valores de transpiração.

**Tabela 3.** Análise de regressão para a variável transpiração.

Modelo de Regressão Linear		$Y_i = \beta_0 + \beta_1.t + \epsilon_i$
$\beta_0$	$\beta_1$	$R^2$ (%)
4,3781	0,2713	88,72

Quanto à fotossíntese líquida, não houve diferença significativa entre os tratamentos, ao longo do período experimental (Figura 3).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* interferiu na fisiologia de resposta aos estresses salino e hídrico, em plantas de cana-de-açúcar, alterando os parâmetros de condutância estomática e transpiração. Nesse sentido, seriam necessários estudos posteriores para um melhor entendimento dessa interação planta-bactéria.



**Figura 3.** Fotossíntese líquida (A) em plantas de cana-de-açúcar submetidas aos diferentes tratamentos. As abreviações Inoc.+Sal e Inoc.+Seca representam os tratamentos combinados Inoculada e Sal, Inoculada e Seca, respectivamente. As leituras foram realizadas após 15, 20 e 30 dias de tratamento. As barras representam o valor médio ( $n=6$ )  $\pm$  desvio-padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas pelo método de agrupamento Scott-Knott ( $p<0,05$ ).

## CONCLUSÃO

Plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, quando submetidas aos estresses salino e hídrico, não apresentaram alteração das taxas de condutância estomática.

Com relação aos valores de transpiração, os resultados indicaram que a bactéria interferiu na

resposta das plantas de cana-de-açúcar, em condições de déficit hídrico, impedindo a redução da transpiração.

A presença da bactéria *G. diazotrophicus* não provocou alterações nas taxas de fotossíntese líquida em nenhum dos tratamentos avaliados.

## REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S.; BODDEY, L. H. BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and soil*, The Hague, v. 252, p. 139-149, 2003.

BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P.N. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 65, n. 5, p. 497-503, 2004.

COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Azospirillum brasilense Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant growth regulation*, v. 54, n. 2, p. 97-103, 2008.

COHEN, A. C.; TRAVAGLIA, C.N.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, v. 87, n.5, p. 455-462, 2009.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in

plant growth. *Trends in microbiology*, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

INTORNE, A.C.; OLIVEIRA, M.V.V.; PEREIRA, L.M.; SOUZA FILHO, G.A. Essential role of the czc determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Int microbiol*, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2012.

KRAUSE, L. G. T. *Influência das relações DQQ/N e So/Xo na atividade de microorganismos desnitrificantes.* (Dissertação de Mestrado) 2006.

LEE, Y.; KIM, Y. J.; KIM, M. H.; KWAK, J. M. MAPK cascades in guard cell signal transduction. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 80, 2016.

LIM, C.; BAEK, W.; JUNG, J.; KIM, J. H.; LEE, S. Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 7, p. 15251-15270, 2015.

LIN, C.; CHEN, S. New functions of an old kinase MPK4 in guard cells. *Plant signaling e behavior*, v. 13, n. 5, p. e1477908, 2018.

MARASCO, R.; ROLLI, E.; ETTUOMI B.; VIGANI, G.; MAPELLI, F.; BORIN, S.; ABOU-HADID, A.F.; EL-BEHAIRY, U. A.; SORLINI, C.; CHERIF, A.; ZOCCHI, G.; DAFFONCHIO, D. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS one*, v. 7, n. 10, p. e48479, 2012.

MEI, C.; FLINN, B. S. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent patents on biotechnology*, v. 4, n. 1, p. 81-95, 2010.

MELOTTO, M.; ZHANG, L.; OBLESSUC, P. R.; HE, S. Y. Stomatal defense a decade later. *Plant physiology*, v. 174, n. 2, p. 561-571, 2017.

MUANGTHONG, A.; YOUNG, S.; RERKASEM, B. Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. *Tropical life sciences research*, v. 26, n. 1, p. 41, 2015.

MUNNS, R. *Comparative physiology of salt and water stress*. *Plant, cell and environment*, v.25, p.239-250, 2002.

MURATA, Y.; MORI, I. C.; MUNEMASA, S. Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annual review of plant biology*, v. 66, p. 369-392, 2015.

PEARCE, S. C. Field experimentation with fruit trees and perennial plants. *Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops*, Kent, 1953.

QI, X.; FU, Y.; WANG, R. Y.; NG, C. N.; DANG, H.; HE, Y. Improving the sustainability of agricultural land use: An integrated framework for the conflict between food security and environmental deterioration. *Applied geography*, v. 90, p. 214-223, 2018.

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology*, v. 61, p. 217-224, 2012.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa phytopathologica*, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SCHROEDER, J. I.; KWAK, J. M.; ALLEN, G. J. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, v. 410, n. 6826, p. 327, 2001.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W. REIS, V.M. Produtividade e diluição isotópica de <sup>15</sup>N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 9, p. 1594-1601, 2016.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, p. 507-512, 1974.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.19, n.3, p.193-201, 2007

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. *Principles and procedures in Statistics: a biometrical approach*. McGraw-Hill, New York, NY. 1980.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. Los Baños, International Rice Research Institute, Philippines, p. 83, 1985.