



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DO PORTA-ENXERTO  
CITRUMELO 'SWINGLE' EM CAMPO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO**

**GIOVANA BETIN PERUCHI**

**Araras  
2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DO PORTA-ENXERTO  
CITRUMELO 'SWINGLE' EM CAMPO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO**

**GIOVANA BETIN PERUCHI**

**ORIENTADOR: PROF. DR. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO  
CO-ORIENTADOR: DR. HELENA SANTIAGO LIMA**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras  
2025

Peruchi, Giovana Betin

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DO  
PORTA-ENXERTO CITRUMELO 'SWINGLE' EM CAMPO  
SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO / Giovana  
Betin Peruchi -- 2025.  
58f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São  
Carlos, campus Araras, Araras  
Orientador (a): Helvécio Della Coletta Filho  
Banca Examinadora: Lucas William Mendes, Marcia  
Maria Rosa Magri  
Bibliografia

1. Microbioma rizosférico. 2. Estresse hídrico. 3.  
Citricultura. I. Peruchi, Giovana Betin. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Giovana Betin Peruchi, realizada em 12/05/2025.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Helvécio Della Coletta Filho (IAC)

Prof. Dr. Lucas William Mendes (CENA/USP)

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

## AGRADECIMENTOS

Ao final desta jornada, é com o coração cheio de gratidão que reconheço e agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Aos meus pais, Marcos e Andresa, e ao meu irmão Pedro, por sempre estarem ao meu lado com amor e palavras de encorajamento nos momentos difíceis. Vocês são minha base e minha inspiração.

Ao meu companheiro Alessandro, por me amar e acreditar em mim mesmo quando eu duvidei e por caminhar comigo todos os dias.

À minha dupla de trabalho, Nathalia Mancine, que esteve comigo desde o início dessa caminhada. Sem você, a minha trajetória durante o mestrado não teria sido a mesma. Obrigada pela parceria, pela amizade, pelos conselhos, pela troca constante e por todo o suporte.

Às minhas companheiras de mestrado, Alessia e Maria Fernanda, pelo companheirismo, pelas risadas, pela amizade e por compartilharem comigo os altos e baixos desse percurso.

Ao meu orientador, Helvécio e à minha coorientadora, Helena, por toda a orientação, paciência e conhecimento compartilhado. Sou profundamente grata por tudo que aprendi com vocês.

Agradeço também a toda equipe do Centro de Citricultura pelo apoio institucional, pelas amizades construídas ao longo do caminho e pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste projeto.

Às instituições FAPESP (processos 2023/13314-5 e 2020/14584-8) e CAPES (processo 88887.808990/2023-00), registro minha sincera gratidão pelo apoio e financiamento concedidos, que foram essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, em especial ao Eduardo e ao Rodrigo, por estarem sempre dispostos a me auxiliar sempre que precisei.

E, por fim, à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por me proporcionar a oportunidade de realizar este mestrado.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1 A citricultura brasileira no contexto de estresse hídrico.....	4
3.2 Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas.....	5
3.3 BPCPs e tolerância ao estresse hídrico.....	6
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
4.1 Área de estudo e coleta das amostras .....	9
4.2 Extração de DNA e sequenciamento.....	10
4.2.1 Solo rizosférico.....	10
4.2.2 Isolados bacterianos.....	11
4.3 Estabelecimento da comunidade bacteriana isolada da rizosfera de plantas de citros.....	12
4.4 Caracterização <i>in vitro</i> para seleção de isolados com características promotoras de crescimento.....	13
4.4.1 Solubilização de fósforo.....	13
4.4.2 Produção de sideróforos.....	14
4.4.3 Produção de Ácido-indol-acético (AIA).....	15
4.4.4 Fixação de nitrogênio.....	15
4.4.5 Detecção do gene <i>dACC</i> .....	16
4.4.6 Produção de biofilme.....	16
4.4.7 Teste estresse hídrico <i>in vitro</i> .....	17
4.5 Caracterização dos isolados <i>in vivo</i> .....	18
4.5.1 Teste de germinação de sementes.....	18
4.5.2 Inoculação em casa de vegetação.....	19
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
5.1 Análise química do solo.....	20
5.2 Composição da comunidade.....	21
5.2.1 Comunidade metataxonômica.....	21
5.2.2 Comunidade recuperada em laboratório.....	25
5.3 Seleção dos isolados a serem caracterizados.....	26
5.4 Caracterização <i>in vitro</i> dos isolados para características promotoras de crescimento.....	28
5.4.1 Quantificação da solubilização de fósforo.....	28

5.4.2	Quantificação da produção de sideróforos.....	29
5.4.3	Quantificação da produção de AIA .....	29
5.4.4	Fixação de nitrogênio.....	30
5.4.5	Detecção do gene <i>dACC</i> .....	31
5.4.6	Produção de biofilme.....	31
5.4.7	Teste de estresse hídrico <i>in vitro</i> .....	32
5.5	Caracterização <i>in vivo</i> .....	36
5.5.1	Teste de germinação de sementes.....	36
5.5.2	Inoculação em casa de vegetação.....	37
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
6.1	Unidade amostral e caracterização da comunidade de rizobactérias.....	39
6.2	Caracterização <i>in vitro</i> .....	42
6.3	Caracterização <i>in vivo</i> .....	43
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>46</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 1.</b> Média dos resultados das análises químicas do solo (n = 5) em função da coleta e nível de estresse hídrico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey a 0,05) .....	20
<b>Tabela 2.</b> Gêneros obtidos no isolamento de amostra de rizosfera de plantas com diferentes níveis de estresse em diferentes coletas (chuva e seca). * Gêneros selecionados para realização da caracterização <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Os Gêneros que apresentaram melhores resultados na primeira caracterização encontram-se sublinhados.....	27
<b>Tabela 3.</b> Compilado de todos os resultados da caracterização <i>in vitro</i> .....	33
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de isolados positivos de cada amostra para cada um dos testes realizados <i>in vitro</i> .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1.</b> A esquerda uma laranjeira com estresse hídrico moderado e a direita laranjeira com estresse acentuado, ambas crescendo no Noroeste paulista sob as mesmas condições de cultivo.....</p>	2
<p><b>Figura 2.</b> Fluxo de trabalho esquematizando a metodologia utilizada neste estudo, abrangendo todas as etapas realizadas durante o experimento.....</p>	9
<p><b>Figura 3.</b> Diagrama de <i>Venn</i> para avaliar gêneros bacterianos exclusivos e compartilhados na comunidade metagenômica rizosférica de plantas com diferentes níveis de estresse hídrico (acentuado e moderado) em diferentes períodos de amostragem (seca e chuva) .....</p>	21
<p><b>Figura 4.</b> Diversidade alfa calculada através do Índice de Shanonn.T <i>student</i>, <math>p &lt; 0,01 (**)</math>. B. Gráfico de ordenação de escala multidimensional não métrica (NMDS) e análises ANOSIM da comunidade bacteriana no solo da rizosfera entre diferentes níveis de estresse hídrico (<math>R^2 = 0,14748</math>, <math>P = 0,001</math>) e coletas (<math>R^2 = 0,27665</math>, <math>P = 0,001</math>). As análises são calculadas na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis gerada a partir de dados 16S a nível de ASV.....</p>	22
<p><b>Figura 5.</b> Abundância relativa dos principais filos identificados na comunidade bacteriana da rizosfera em cada coleta (chuva e seca) em plantas com diferentes níveis de estresse hídrico (moderado e acentuado)..</p>	23
<p><b>Figura 6.</b> Abundância relativa dos 11 principais gêneros identificados na comunidade bacteriana da rizosfera em cada coleta (chuva e seca) em plantas com diferentes níveis de estresse hídrico (moderado e acentuado)..</p>	23

<b>Figura 7.</b> Diferença na abundância relativa de gêneros bacterianos entre solos rizosférico de plantas com estresse hídrico acentuado (vermelho) e moderado (verde). Valores negativos de LDA indicam gêneros diferencialmente abundantes em plantas com estresse acentuado, enquanto valores positivos representam gêneros diferenciais em plantas com estresse moderado.....	24
<b>Figura 8.</b> Fotos das diferentes colônias crescidas nos diferentes meios de cultura.....	25
<b>Figura 9.</b> Diagrama de <i>Venn</i> para avaliar gêneros bacterianos exclusivos e compartilhados entre plantas com diferentes níveis de estresse hídrico (acentuado e moderado) em diferentes períodos de amostragem (seca e chuva) .....	25
<b>Figura 10.</b> Abundância relativa das amostras isoladas da rizosfera de plantas com fenótipo de estresse hídrico acentuado e moderado coletadas na época de seca e chuva.....	26
<b>Figura 11.</b> Gráfico da quantificação da capacidade de solubilização de fosfato tricálcio obtido a partir da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia.....	28
<b>Figura 12.</b> Gráfico da quantificação da produção de sideróforos obtido a partir da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia .....	29
<b>Figura 13.</b> Curva padrão para cálculo da concentração de AIA obtida através de concentrações conhecidas de AIA sintético e reagente de Salkowisky. Gráfico indicando a concentração de AIA (ug/mL) produzida pelos isolados.....	30

<b>Figura 14.</b> C-) Meio Fbn não inoculado. C+) Meio Fbn inoculado com <i>S. meliloti</i> . IAC_520) Exemplo de um isolado que apresentou resultado negativo. IAC_436) Isolado que apresentou resultado positivo.....	30
<b>Figura 15.</b> Gel de agarose 1% em eletroforese das amostras que amplificaram para o gene <i>dACC</i> (680 pb). M: marcador molecular 1kb plus. C-: Controle negativo da reação sem material genético. C+: Controle positivo da reação com uma cepa de <i>Bradyrhizobium</i> .....	31
<b>Figura 16.</b> Gráfico indicando a produção de biofilme. Valores calculados a partir do controle negativo.....	32
<b>Figura 17.</b> A. Isolados crescidos em placa de meio LB 1x B. Isolados crescidos em placa LB 5x. Retângulos brancos indicam os que apresentaram crescimento.....	33
<b>Figura 18.</b> Aumento do índice de velocidade de germinação das sementes de citrumelo ‘Swingle’ na presença dos isolados. Valores expressos em $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$ .....	36
<b>Figura 19.</b> Aumento da biomassa de raiz (A) e porcentagem de água (B) em relação ao controle não inoculado.....	37
<b>Figura 20.</b> A. Aumento de volume de raiz em plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Valores expressos em $\text{Log}_2 \text{Foldchange}$ . B. Aumento da área de superfície da raiz em plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Valores expressos em $\text{Log}_2 \text{Foldchange}$ .....	38

# CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA DO PORTA-ENXERTO CITRUMELO 'SWINGLE' EM CAMPO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO

**Autor: GIOVANA BETIN PERUCHI**

**Orientador: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO**

**Co-orientador: Prof. Dr. HELENA SANTIAGO LIMA**

## RESUMO

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de laranja, as mudanças climáticas, como o aumento da temperatura e da seca, têm causado grandes perdas para a citricultura. O cultivo de citros é majoritariamente realizado por enxertia, sendo o porta-enxerto fundamental na capacidade de retenção hídrica e na resistência a estresses bióticos e abióticos, entre outras características aportadas à copa. O citrumelo 'Swingle' é o porta-enxerto mais utilizado na citricultura brasileira, porém apenas com moderada resistência à seca, que tem, nos últimos anos, impactado a produção de laranjeiras enxertadas neste genótipo. Durante observações em cultivos comerciais, nosso grupo de pesquisa identificou plantas de laranja-doce da variedade Valência enxertadas em citrumelo 'Swingle' que, apesar de estarem sob as mesmas condições ambientais e livres de doenças aparentes, apresentavam sintomas contrastantes de deficiência hídrica. A partir dessa observação, levantou-se a hipótese de que a composição da comunidade bacteriana da rizosfera varia entre plantas com diferentes respostas ao déficit hídrico e que o fenótipo de estresse moderado estaria associado à presença de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs). Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar as populações de rizobactérias em plantas de laranja-doce submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica e selecionar, por meio de sequenciamento e caracterização fisiológica, os isolados com potencial benéfico às plantas. Para isso, foram coletadas amostras de raízes de plantas e solo rizosférico contrastantes para os sintomas de deficiência hídrica em um pomar na região noroeste do Estado de São Paulo. Os isolados bacterianos foram identificados pelo sequenciamento do gene *16S rRNA* e classificados ao nível de gênero por meio de análises de bioinformática. Para a análise metataxonômica, o DNA total da rizosfera foi sequenciado, permitindo a caracterização da diversidade microbiana associada a cada fenótipo de deficiência hídrica. A análise metataxonômica revelou diferenças significativas na composição geral das comunidades bacterianas, incluindo variações na abundância relativa de diferentes filos e gêneros. Além disso, a diversidade beta indicou que as comunidades rizosféricas diferem entre os fenótipos de deficiência hídrica, sugerindo que a microbiota pode estar associada à resposta das plantas ao déficit hídrico. Uma fração dos isolados foi caracterizada *in vitro* quanto à capacidade de solubilização de fósforo, produção de sideróforos e auxinas, além de mecanismos de mitigação de deficiência hídrica, como produção de ACC deaminase, formação de biofilme e crescimento em condições de restrição de disponibilidade de água em meio de cultura. Os isolados provenientes das amostras coletadas em plantas com fenótipo de estresse moderado se destacaram nesses testes, reforçando a hipótese de que a menor susceptibilidade à deficiência hídrica pode estar associada a microrganismos com características promotoras de crescimento. Além disso, testes

de germinação e inoculação em casa de vegetação mostraram que os isolados associados ao fenótipo moderado também tiveram um desempenho superior. Os resultados deste estudo demonstraram que a comunidade de rizobactéria difere entre plantas com distintos níveis de deficiência hídrica e que essa diferença pode estar relacionada à presença de BPCPs, com potencial aplicação em plantas sob cenários de escassez hídrica.

**Palavras-chave:** laranja-doce, rizosfera, microbioma, deficiência hídrica.

# CHARACTERIZATION OF THE RHIZOSPHERE MICROBIOTA OF THE 'SWINGLE' CITRUMELO ROOTSTOCK IN THE FIELD UNDER WATER STRESS CONDITIONS

**Author: GIOVANA BETIN PERUCHI**

**Adviser: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO**

**Co-adviser: Prof. Dr. HELENA SANTIAGO LIMA**

## ABSTRACT

Despite Brazil is the world's largest orange producer, climate change, such as rising temperatures and drought, has caused significant losses for citrus production. Citrus cultivation is predominantly carried out through grafting, with the rootstock playing a fundamental role in water retention capacity and resistance to biotic and abiotic stresses such as other characteristics. Citrumelo 'Swingle' is the most widely used rootstock for citrus plants in Brazil, but its drought resistance is only moderate, and in recent years, it has struggled under adverse growth condition such as drought as consequence of climate change. During observations in commercial orchards, our research group identified sweet orange ("Valencia") trees grafted onto Citrumelo 'Swingle' that, despite being under the same environmental conditions and free from apparent diseases, exhibited contrasting drought stress symptoms. Based on this observation, we hypothesized that the composition of the rhizosphere bacterial community differs between plants with varying responses to water deficit and that the moderate stress phenotype may be associated with the presence of plant growth-promoting bacteria (PGPB). This study aimed to compare rhizobacterial populations in sweet orange plants subjected to different levels of drought stress and to select, through sequencing and physiological characterization, bacterial isolates with potential plant-beneficial traits. To test the hypothesis, root and rhizosphere soil samples were collected from plants with contrasting drought stress symptoms growing in the northwest of São Paulo State. The bacterial isolates were identified by sequencing the 16S rRNA gene and classified at the genus level through bioinformatics analyses. For the metataxonomic analysis, total rhizosphere DNA was sequenced, allowing the characterization of microbial diversity associated with each drought stress phenotype. The metataxonomic analysis revealed significant differences in the overall composition of bacterial communities, including variations in the relative abundance of different phyla and genera. Additionally, beta diversity indicated that rhizosphere communities differ between drought stress phenotypes, suggesting that microbiota may be linked to plant drought responses. Some isolates were characterized *in vitro* for their ability to solubilize phosphorus, produce siderophores and auxins, and mitigate drought stress through ACC deaminase production, biofilm formation, and in medium growth under water-restricted conditions. Isolates from samples with the moderate stress phenotype stood out in these tests, reinforcing the hypothesis that lower susceptibility to water deficit may be associated with microorganisms possessing plant growth-promoting traits. Furthermore, germination and greenhouse inoculation tests showed that isolates associated with the moderate stress phenotype also performed better. The most promising isolates were selected to form a synthetic community, which is currently being tested *in vivo* to evaluate its effect on drought stress mitigation. The results of

this study demonstrate that the rhizosphere community indeed differs between plants experiencing different levels of drought stress and that this difference may be related to the presence of PGPB, with potential applications in crops under drought conditions.

**Key words:** sweet orange, rhizosphere, microbiome, drought stress.

## 1. INTRODUÇÃO

O índice pluviométrico na região do cinturão citrícola (estado de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro) sofreu uma drástica redução entre março de 2021 e maio de 2022 devido ao fenômeno La Niña, ficando 27% abaixo da média histórica de chuvas (FUNDECITRUS, 2022). Além disso, geadas atípicas de alta intensidade inibiram o crescimento das laranjas e contribuíram para o aumento da queda prematura de frutos, reduzindo a quantidade de laranjas colhidas e configurando o segundo ano consecutivo de redução na safra. A região do município de São José do Rio Preto, situada no noroeste do cinturão citrícola, também foi impactada, apresentando índices de chuva abaixo da normal climatológica (1981-2020) (FUNDECITRUS, 2022).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa observou um fenômeno intrigante em um talhão de laranjeiras da variedade Valência enxertadas em citrumelo 'Swingle' no município de Onda Verde/SP, situado na região de São José do Rio Preto. Enquanto a maioria das plantas apresentava sintomas severos de estresse hídrico, uma minoria exibia sintomas moderados (Figura 1). Todas as plantas estavam enxertadas no mesmo porta-enxerto, possuíam a mesma idade e eram conduzidas sob as mesmas condições de manejo, o que levantou o questionamento sobre a possibilidade de que a variação na severidade do estresse hídrico estivesse relacionada à composição da comunidade microbiana da rizosfera.

Evidências crescentes na literatura indicam o papel das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) na atenuação dos efeitos causados por estresses abióticos, como o déficit hídrico. Esses microrganismos benéficos exercem múltiplas funções na promoção do desenvolvimento vegetal, incluindo a solubilização de nutrientes (como fósforo e potássio), a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fitormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas. Além disso, muitas BPCPs expressam a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, que reduz os níveis de etileno, hormônio relacionado à resposta ao estresse, favorecendo o crescimento radicular e aumentando a capacidade de absorção de água e nutrientes pelas plantas (GLICK, 2014; VURUKONDA *et al.*, 2016; NGUMBI e KLOEPPER, 2016; FADIJI e BABALOLA, 2020; NADEEM *et al.*, 2014). Essas interações simbióticas também são capazes de modular respostas fisiológicas das plantas,

induzindo mecanismos de resistência sistêmica que as tornam mais resilientes frente a condições adversas, como a restrição hídrica.

Diante desse cenário, a hipótese do presente trabalho é que plantas com menor severidade aparente de deficiência hídrica apresentam uma microbiota rizosférica diferenciada, enriquecida em BPCPs, o que pode contribuir para uma maior tolerância ao déficit hídrico. Para testar essa hipótese, foram coletadas amostras da rizosfera de dois grupos contrastantes de plantas: um composto por indivíduos com estresse hídrico acentuado e outro por plantas com sintomas moderados. Adicionalmente, análises com marcadores moleculares confirmaram que as plantas menos afetadas possuíam identidade genética compatível com citrumelo 'Swingle', descartando a possibilidade de que as diferenças fenotípicas observadas fossem resultado de variações genéticas do porta-enxerto. Além de permitir a caracterização da comunidade microbiana associada a essas condições contrastantes, os resultados deste estudo poderão futuramente subsidiar o desenvolvimento de comunidades sintéticas aplicáveis não apenas ao cultivo de laranja-doce, mas também a outras culturas sujeitas a restrições hídricas. Ressalta-se que o estudo da microbiota da rizosfera de plantas cítricas, com foco na formulação de bioprodutos, ainda é uma área pouco explorada, mas com grande potencial de aplicação, especialmente frente à crescente demanda por soluções sustentáveis na agricultura.



**Figura 1.** A esquerda uma laranjeira com deficiência hídrica moderada e a direita laranjeira com deficiência acentuada, ambas crescendo no Noroeste paulista sob as mesmas condições de cultivo.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

Isolar e comparar populações de rizobactérias em plantas de *Citrus sinensis* da variedade Valência enxertadas no porta-enxerto citrumelo 'Swingle', cultivadas a campo e com respostas contrastantes a escassez hídrica, a fim de selecionar rizobactérias com potencial benéfico ao hospedeiro.

### Específicos

- Estabelecer uma coleção de bactérias cultiváveis representativa da microbiota presente na rizosfera de plantas de citros adultas com diferentes níveis de deficiência hídrica;
- Identificar e caracterizar os isolados da coleção de rizobactérias obtidas por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- Caracterizar a comunidade bacteriana de amostras de solo coletadas de plantas com diferentes níveis de deficiência hídrica nos períodos de seca e chuva por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- Testar, sob condições *in vitro*, os isolados selecionados para as características de solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, produção de biofilme, aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase e produção de ácido indolacético;
- Avaliar sob condições *in vivo* a influência das rizobactérias isoladas na germinação e desenvolvimento de plântulas de citrumelo 'Swingle';

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. A citricultura brasileira no contexto de deficiência hídrica

O Brasil domina o mercado global de suco de laranja, respondendo por mais de 80% das exportações mundiais e cerca de 30% da produção total da fruta (FAOSTAT, 2024). A maior parte da produção nacional de laranja, cerca de 79%, concentra-se no cinturão citrícola, que abrange o estado de São Paulo e a região do Triângulo/Sudoeste Mineiro (FUNDECITRUS, 2022). O cultivo de citros é realizado através de enxertia, onde o porta-enxerto desempenha um papel fundamental na sustentação da planta, na absorção de água, nutrientes, produção de hormônios e na interação com o solo, afetando diretamente a fisiologia da cultura. Enquanto as copas são escolhidas com base na qualidade e produtividade dos frutos, os porta-enxertos são selecionados principalmente pela resistência e eficiência do sistema radicular (COHEN e NAOR, 2002). A capacidade de retenção hídrica e a resistência a estresses bióticos e abióticos variam de acordo com o porta-enxerto utilizado (SYVERTSEN e LEVY, 2005). O citrumelo 'Swingle' possui resistência moderada a seca (Pompeu Jr *et al.*, 2004). Plantas enxertadas em citrumelo 'Swingle' são produtivas em solos arenosos ou argilosos, não têm bom desempenho em solos com pH elevado ou mal drenados, e são moderadamente resistentes à seca e à geada (WUTSCHER, 1990). Atualmente, o cultivo comercial de citros enfrenta diversos desafios no campo, especialmente no que se refere ao fornecimento adequado de nutrientes na rizosfera e influência de estresses bióticos e abióticos (SRIVASTAVA *et al.*, 2022). Alguns dos fatores abióticos mais prejudiciais à produção de citros incluem variações extremas de temperatura, seca, alagamento e salinidade. A safra de 2021/22 enfrentou condições climáticas totalmente atípicas, com a pior seca de quase um século e geadas de alta intensidade (FUNDECITRUS, 2021). Os pomares que mais sofreram com a seca foram aqueles cultivados em regiões mais críticas, sem irrigação, adensados e com laranjeiras enxertadas em citrumelo 'Swingle' (FUNDECITRUS, 2021). De acordo com a estimativa de safra realizada no cinturão citrícola em 2024, a produção de laranja vem sofrendo redução gradual. Entre 1994/95 e 2003/04, a média de colheita foi de 351 milhões de caixas, diminuindo para 337 milhões na década seguinte (2004/05 a 2013/14) e chegando a 308 milhões na década mais recente (2014/15 a 2023/24). A redução contínua na produção é, em grande parte, consequência das condições climáticas que se tornam cada vez mais adversas para

o cultivo da laranja (FUNDECITRUS, 2024). Isso destaca a necessidade urgente de estratégias inovadoras para mitigar o estresse das plantas e aumentar a resiliência das culturas (LIMA, *et al.*, 2024).

Uma estratégia viável para reduzir esses impactos é a aplicação de inoculantes microbianos contendo bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) (ARMANHI, *et al.*, 2021). O uso de BPCPs rizosféricas na formulação de biofertilizantes pode aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo e proteger as plantas de danos em condições de estresse hídrico, proporcionando melhora considerável na eficiência de utilização da água (CANDIDO *et al.*, 2013).

### **3.2. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas**

A rizosfera pode ser definida como a zona do solo que circunda e é influenciada pelas raízes das plantas, sendo habitada por um número expressivo de microrganismos e invertebrados, podendo ser considerada um dos nichos mais dinâmicos da terra (PHILIPPOT *et al.*, 2013). A comunidade microbiana residente neste nicho é estruturada de forma diferente daquela encontrada no solo não rizosférico, uma vez que esta sofre influência direta das raízes (ANDREOTTI *et al.*, 2014). As plantas evoluíram para permitir que a rizosfera fosse atrativa aos microrganismos que influenciam o desenvolvimento das plantas (MENDES *et al.*, 2011).

Dessa forma, as condições locais encontradas na rizosfera são consideradas ambientes ótimos para a replicação de organismos que apresentam características relacionadas ao crescimento das plantas, assim como fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e inibição do crescimento de patógenos (ANDREOTTI *et al.*, 2014; TSOLAKIDOU, *et al.*, 2019). Os exsudatos liberados pelas raízes são ricos em carboidratos e aminoácidos e servem como fonte nutritiva para diversos microrganismos como bactérias, fungos, oomicetos e *Archaea* (YARYURA *et al.*, 2008; PHILIPPOT, *et al.*, 2013), sendo as bactérias, os microrganismos que possuem maior abundância na rizosfera, ocupando aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes (GRAY e SMITH, 2005).

As bactérias classificadas como promotoras de crescimento em plantas (BPCPs), produzem substâncias que favorecem o desenvolvimento das plantas (CAMELE *et al.*, 2019). As BPCPs são capazes de sintetizar fitormônios, regular genes responsivos

ao estresse, aumentar a resistência a estresses bióticos e/ou abióticos, alterar a morfologia radicular, fixar nitrogênio, solubilizar fósforo e produzir sideróforos (MIRANSARI, 2014; VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015; CHUKWUNEME *et al.*, 2020). Também são capazes de induzir resistência sistêmica contra os fitopatógenos através da secreção de substâncias e proteger a planta hospedeira (GUPTA *et al.*, 2015; KHANDELVAL, *et al.*, 2021). De maneira geral, esses microrganismos desempenham um papel fundamental no ecossistema das plantas, atuando como biofertilizantes que estimulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Além disso, podem contribuir para a resistência das plantas a estresses abióticos, como por exemplo a seca. Dessa forma, além de seu papel na nutrição e proteção das plantas, os PGPRs também desempenham funções essenciais na adaptação ao estresse hídrico, regulando processos fisiológicos que favorecem a sobrevivência em condições de baixa disponibilidade de água.

### **3.2. BPCPs e tolerância ao estresse hídrico**

Em plantas sob condições de déficit hídrico ocorre o acúmulo de ácido abscísico (ABA) e etileno nas raízes resultando em efeitos inibidores no desenvolvimento e crescimento. Esses fitormônios atuam no retardo do crescimento, diminuição da abertura estomática e diminuição da taxa fotossintética, como uma alternativa para reduzir a perda de água através da transpiração. Porém tais mudanças acarretam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem promover danos ao DNA e nas membranas celulares. (TAIZ *et al.*, 2017). BPCPs podem desempenhar um papel significativo na mitigação desses danos, por meio da indução de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que são favoráveis ao aumento de tolerância ao déficit hídrico (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014). Tais alterações podem estar relacionadas a produção de fitohormônios, produção de aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, redução do nível de etileno nas raízes, resistência sistêmica induzida e produção de exopolissacarídeos (DIMKPA *et al.*, 2009; VURUKONDA *et al.*, 2016).

De acordo com Bresson, *et al.* (2013), plantas inoculadas com BPCPs tendem a ser mais tolerantes ao déficit hídrico, uma vez que as rizobactérias estimulam a regulação estomática para manter altos níveis do potencial hídrico nas folhas, induzindo alterações coordenadas na transpiração, conteúdo de ácido abscísico

(ABA) e fotossíntese, resultando em maior eficiência do uso da água em plantas submetidas ao déficit hídrico. Castro, *et al.* (2018) relatou que rizobactérias atenuaram os danos do déficit hídrico em mudas de açaízeiro (*Euterpe oleracea Mart.*) por alívio do estresse oxidativo e manutenção do desempenho fotossintético. Em videira foram observadas reduções de até 10% na taxa de perda de água quando inoculadas com *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens* (SALOMON *et al.*, 2014). Benefícios semelhantes aos citados para as espécies anuais têm sido evidenciados Creus, *et al.* (2004) observaram que em trigo a presença de bactérias do gênero *Azospirillum* acarretaram a manutenção da pressão de turgor celular e ajuste na pressão osmótica sob condições de estresse hídrico, assim como atuou positivamente a absorção de nutrientes como o K, Mg e Ca.

Dentre os efeitos benéficos das BPCPs frente ao estresse hídrico, destaca-se a produção de exopolissacarídeos (EPS) e da enzima aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase. (KAUSHAL e WANI, 2016; KUMAR e VERMA, 2018). Os EPS secretados por algumas bactérias, juntamente com ácidos nucleicos e proteínas, compõem a estrutura conhecida como biofilme (FLEMMING e WINGENDER, 2010). A presença de EPS desempenha um papel crucial frente a estresse hídrico, garantindo um microambiente hidratado e podendo aumentar significativamente o volume de poros e a agregação do solo da rizosfera, possibilitando maior tolerância ao estresse hídrico em razão da melhoria das condições do solo (DONOT *et al.*, 2012; VURUKONDA *et al.*, 2016; PORTO *et al.*, 2022).

Já a enzima ACC deaminase, atua na degradação de ACC em amônia e  $\alpha$ -acetobutirato. Como ACC é sabidamente um precursor imediato do etileno, na presença desta enzima ocorre redução dos níveis de etileno nas plantas acarretando um maior crescimento vegetal (GLICK, 2014; PORTO, *et al.*, 2022). Dessa forma, as BPCPs capazes de produzir ACC deaminase podem promover maior crescimento das raízes, melhorando a captação de água. Os principais gêneros de bactérias envolvidos na mitigação do estresse hídrico em diferentes culturas são *Azospirillum*, *Phyllobacterium*, *Achromobacter*, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azospirillum* e *Bacillus* (AHLUWALIA *et al.*, 2020).

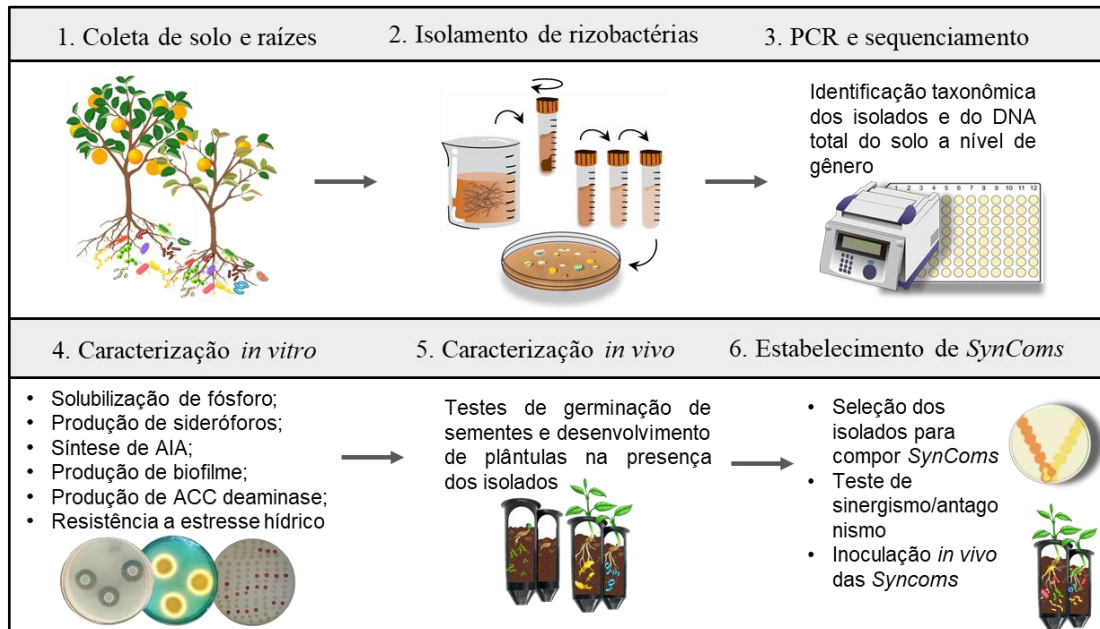
O déficit hídrico tem significativo impacto (direto e indireto) nos setores ecológico, agrícola e econômico (CHIANG, *et al.*, 2021). Avaliações de predições da ocorrência de déficit hídrico realizadas por Ndehedehe *et al.* (2023), a nível global, indicam que

a expansão contínua de áreas afetadas pode persistir além de 2030. Além disso, as projeções climáticas futuras sugerem aumento tanto na frequência como na severidade da seca nas Américas. No âmbito nacional, as projeções futuras relacionadas às mudanças climáticas apontam para expansão das áreas semiáridas e subúmidas em todo o território brasileiro, com estimativa de uma a redução de -2 a -3% na precipitação da região Sudeste até o final do século (MORAES, 2021). Nesse contexto, a promessa do impacto positivo das rizobactérias promotoras de crescimento na mitigação da seca merece atenção, visando sua disponibilização comercial para agricultores em todo o mundo (AHLUWALIA *et al.*, 2020). Explorar o potencial do microbioma vegetal, surge como uma estratégia viável para fortalecer a resiliência das plantas à seca na agricultura sustentável, oferecendo uma alternativa de baixo custo e ambientalmente responsável (ALI *et al.*, 2022).

Dentro do contexto de utilizar bactérias promotoras de crescimento para mitigar estresses e reduzir prejuízos, tem-se utilizado não somente microrganismos isolados, mas também consórcios microbianos. A utilização de consórcios microbianos pode fornecer uma solução de longo prazo não apenas contra estresses abióticos e bióticos, mas também podem garantir estabilidade futura da produção (ALI, *et al.*, 2022). De acordo com Martins, *et al* (2023), o número de microrganismos presentes em uma *SynCom* pode variar de 2 a 23, sendo que mais da metade dos estudos utilizaram entre 2 e 5. Isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* são os mais utilizados. Convencionalmente, a seleção de microrganismos para a saúde das plantas segue a abordagem de triagem *in vitro*, visando a seleção de táxons microbianos bem conhecidos para o controle de um patógeno, ou visando melhorar algumas características fenotípicas das plantas, como crescimento da planta, fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios (DE SOUZA *et al.*, 2020; GLICK, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 2, está apresentado o fluxo de trabalho esquematizando a metodologia que foi realizada durante o presente trabalho.



**Figura 2.** Fluxo de trabalho esquematizando a metodologia utilizada neste estudo, abrangendo todas as etapas realizadas durante o experimento.

### 4.1. Área de estudo e coleta das amostras

A amostragem foi realizada em plantas localizadas em um mesmo talhão em uma fazenda no noroeste paulista ( $-20^{\circ}34'28.24''S$  e  $-49^{\circ}15'31.75''W$ ). O pomar caracteriza-se por cultivo intensivo não irrigado de variedade Valência enxertado em porta-enxerto citrumelo 'Swingle' com 12 anos de idade. O solo do local de amostragem é caracterizado como PV3 - 43 Argissolo Vermelho Amarelo Eutrófico, A moderado, de textura média ou média argilosa (EMBRAPA, 2013). As coletas ocorreram em dois períodos no ano, representando períodos de baixa (seca) e alta precipitação (chuva). Foram selecionadas dez plantas, sendo cinco com fenótipos de severo déficit hídrico e queda acentuada de folhas e frutos, e cinco com sintomas moderados de estresse (Figura 1). Todas as plantas não apresentavam sintomas aparentes de qualquer outro estresse biótico. Raízes de aproximadamente 1 a 5 mm de diâmetro foram coletadas entre 5 e 15 cm de profundidade. O solo presente na

superfície das raízes foi removido agitando-se as raízes, as quais foram imersas em tampão PBS (*phosphate-buffered saline*) em sacos plásticos e transportadas ao laboratório em caixa de isopor e posteriormente submetidas a refrigeração até o isolamento. Amostras de solos rizosférico também foram utilizadas para acessar a comunidade metagenômica através do sequenciamento do DNA total. Ainda, na mesma profundidade de coleta das raízes, amostras de solo também foram coletadas e enviadas para análise química.

## 4.2. Extração de DNA e sequenciamento

### 4.2.1. Solo rizosférico

O DNA total dos solos coletados no sistema radicular das plantas amostradas foram extraídos usando o kit *FastDNA spin kit for Soil* (MPbio), seguindo as recomendações do fabricante e enviados para sequenciamento NGS usando a plataforma Illumina NovaSeq x 250pb PE. Um total de 20 amostras (5 para cada condição) foram sequenciadas para a região V4-V5 do gene 16S rRNA (515F 5'GTGCCAGCMGCCGCGGTAA3' e 907R 5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT3') para sequenciamento de bactérias na empresa Novogene (<http://www.novogene.com/>).

O resultado do sequenciamento foi processado seguindo a metodologia de Lima, *et al* (2024), utilizando o ambiente R (*version 4.0*) utilizando o pacote DADA2 (versão 1.18.). O parâmetro erro esperado ( $\text{maxEE} = 2$ ) foi usado para remover *reads* de baixa qualidade. Um modelo de erro foi utilizado para realizar a inferência das *Amplicon sequence variant* (ASV) (Callahan *et al.*, 2017). As *reads forward* e *reverse* foram alinhados e as quimeras removidas. O banco de dados Silva versão 138 (<http://www.arb-silva.de>) foi utilizado para afiliar taxonomia.

Para visualizar a dissimilaridade entre as amostras utilizou-se uma ordenação multidimensional não paramétrica (NMDS), baseado na matriz de dissimilaridade Bray-Curtis, a nível de ASV. Para verificar a separação dos grupos no NMDS, a *Permutational Multivariate Analysis of Variance* (PERMANOVA) foi realizada. Para mensurar a diversidade amostral, o índice de Shannon foi calculado. As diferenças da abundância das ASV entre as amostras foram testadas usando Kruskal-Wallis e o p-valor ajustado por FDR. Todas as análises estatísticas foram realizadas no R (*version 4.0*) (R *core team*, 2021) com o suporte dos pacotes Vegan (OKSANEN *et al.*, 2013), McToolsR e Phyloseq (MCMURDIE *et al.*, 2013). A análise de

biomarcadores diferenciais foi realizada por meio do método LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size), utilizando dados de abundância absoluta a nível de gênero. A análise foi conduzida na plataforma *Galaxy* (<http://mbac.gmu.edu:8080/>), considerando uma prevalência mínima de 10 amostras e um limiar de detecção de 10%.

#### 4.2.2. Isolados bacterianos

Para extração do DNA total dos isolados foram selecionados aleatoriamente 200 isolados de cada fenótipo e de cada coleta, totalizando 800 isolados dispostos em 8 placas de 96 poços. A extração foi realizada com o kit de extração de *Wizard Genomic DNA Kit* (*Promega Corporation*) de acordo com o protocolo de instruções do fabricante e armazenado em placas de 96 poços a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir do DNA obtido, a identificação dos isolados foi realizada seguindo a metodologia de PCR multiplex descrita por Armanhi *et al.* (2018). A amplificação da região V4–V5 do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos foi estabelecida utilizando-se duas etapas de amplificação. Na primeira etapa os iniciadores 515Y –GTGYCAGCMGCCGCGGTAA e 926r –CCGYCAATTYMTTTRAGTTT foram usados onde nos iniciadores reverso (926r) estão os códigos (*barcodes*) para identificação de placas. Oito diferentes primers foram utilizados para identificar as placas e as sequências dos primers utilizados estão apresentadas na tabela S1 do apêndice. As amplificações foram estabelecidas utilizando-se a enzima GoTaq G2 DNA Polymerase (*Promega Corp.*) para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 10  $\mu\text{M}$  dos iniciadores, 10mM de cada dNTP e 4 $\mu\text{L}$  do DNA. As amplificações foram realizadas numa ciclagem de 20X (95  $^{\circ}\text{C}$ , 55  $^{\circ}\text{C}$  e 72  $^{\circ}\text{C}$  - 30 segs. em cada etapa) precedida por desnaturação inicial a 95  $^{\circ}\text{C}$  (5 min).

Os produtos da PCR da primeira etapa foram agrupados e purificados usando-se o sistema *ExoSap PCR Cleanup* (Thermo Fischer Scientific). Na segunda etapa de amplificação utilizou-se iniciadores *forward* e *reverse* Nextera XT DNA Library Prep Kit (FC-120-1012; Illumina, San Diego, CA, USA), os iniciadores *forward* (i5 - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA) possuem 8 diferentes *barcodes*, compostos por 8 pares de bases, para identificação das linhas (Tabela S2) e os iniciadores reverso (i7 - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGA) possuem 12 *barcodes*, compostos por 8 pares de base, para as colunas (Tabela S3), completando a identificação para uma placa de 96 poços (Armanhi *et al.*, 2016). As amplificações

foram padronizadas usando-se a enzima VeriFi Hot Start Polimerase (PCR Biosystems, UK) para um volume final de 20  $\mu$ L contendo 10  $\mu$ M dos iniciadores, 10mM de cada dNTP e 3 $\mu$ L do DNA purificado. Utilizou-se ciclagens com 30X (95 °C - 15 seg., 58 °C - 30 segs. e 72 °C - 45 segs.) precedida por desnaturação inicial a 95 °C (12 min) e extensão final a 72 °C - 45 segs.

Ao final do todo o processo de amplificação, os produtos da PCR foram agrupados em um único tubo tipo *ependorf*, purificados para eliminação de resíduos das reações, quantificado e enviado para sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq paired-end 250x250pb. O resultado do sequenciamento foi processado utilizando o ambiente R (*version* 4.0) utilizando o pacote DADA2 (versão 1.18). O parâmetro erro esperado ( $\text{maxEE} = 2$ ) foi usado para remover *reads* de baixa qualidade. Um modelo de erro foi utilizado para realizar a inferência das *Amplicon sequence variant* (ASV) (Callahan *et al.*, 2017). As *reads forward* e *reverse* foram alinhados e as quimeras removidas e o banco de dados Silva versão 138 (<http://www.arb-silva.de>) foi utilizado para afiliar taxonomia.

#### **4.3. Estabelecimento da comunidade bacteriana isolada da rizosfera de plantas de citros**

O isolamento da comunidade microbiana foi realizado seguindo a mesma estratégia usada por Armanhi *et al.* (2016 e 2018) com modificações propostas por Lima, *et al* (2024). Em condições assépticas, as amostras foram adicionadas em erlenmeyer contendo solução de PBS suplementado com 0,05% de *Tween* 20 e permaneceram sob agitação por 90 min a 150 rpm. Em seguida foi retirada uma alíquota de 40 mL de cada amostra e as soluções foram centrifugadas a 200 rpm por 20 min. Após a centrifugação as amostras foram diluídas serialmente em tampão PBS e plaqueadas em quatro diferentes meios de cultura: 1. PSM - *Pseudomonas syringae* medium (15 g de sacarose, 3,5 g de peptona, 0,38 g de fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 0,1 g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 15 g de ágar,  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1L); 2. TWYE - tap water yeast extract (0,25g de extrato de levedura, 0,5 g de fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 15 g de ágar e  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1L); 3. R2A - Reasoner's 2A agar (0,5g de proteose peptone, 0,5 g de casaminoácidos, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de glicose, 0,5 g de amido solúvel, 0,3 g de fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 0,024 g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 0,3 g de piruvato de sódio

(C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>), 15 g de ágar e H<sub>2</sub>O q.s.p. 1L); 4. TSA (Trypticase Soy Agar) (15g triptona, 5g peptona de soja, 5g NaCl, 15 g ágar, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L). Após o plaqueamento, os isolados foram selecionados considerando-se aspectos morfológicos das colônias, transferindo-os para placas de 96 poços contendo LB líquido e mantidos sob agitação por 2 dias a 28 °C. As culturas microbianas crescidas foram armazenadas a - 80 °C em meio LB (Luria-Bertani) líquido suplementado com glicerol 50% 1:1 (v/v) como criopreservante.

#### **4.4. Caracterização *in vitro* para seleção de isolados com características promotoras de crescimento**

Com base na taxonomia obtida nas etapas realizadas no item 4.3.1, isolados pertencentes aos gêneros que se encontravam representados por uma única ASV, foram selecionados, totalizando 40 isolados. Para início da caracterização, os isolados foram recuperados da cultura permanente em meio LB e incubados a 28 °C por 24h. Após o crescimento, os inóculos foram plaqueados em meio LB para verificar se estavam de fato isolados, ou seja, se apresentavam colônias de morfologia única. Após esse processo, um novo inóculo foi realizado e preservado com glicerol 50% no freezer -80 para condução dos testes. Para a realização dos ensaios *in vitro*, 200 µL da cultura permanente de cada isolado foi recuperada em 2 mL de meio LB e incubada a 30°C e 160 rpm por aproximadamente 24 horas. Após este período, a densidade óptica foi padronizada para OD<sub>600nm</sub>= 0,5. O pré - inóculo preparado foi utilizado para realização das metodologias descritas do item 4.4.1 a 4.4.7. Os gêneros nos quais seus representantes apresentaram melhores resultados, foram posteriormente selecionados. Todos os isolados pertencentes a estes gêneros foram submetidos aos mesmos testes, totalizando mais 40 isolados. Portanto, no final, foram caracterizados *in vitro* um total de 80 isolados.

##### **4.4.1. Solubilização de fósforo**

Para a seleção de linhagens solubilizadoras de fosfato a metodologia de Freitas *et al.* (1997) foi utilizada, utilizando caldo BD (Caldo de Batata-Dextrose, Kasvi®). Após a autoclavagem, o meio BD deve ser resfriado e as soluções de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10% (50 mL/L) e CaCl<sub>2</sub> 10% (10 mL/L) são adicionadas. As soluções não podem ser

autoclavadas e devem ser esterilizadas separadamente por filtração em membrana de 0,22 µm. Quando  $K_2HPO_4$  e  $CaCl_2$  entram em contato ocorre a formação de  $Ca_3(PO_4)_2$  (fonte de fósforo insolúvel) tornando o meio turvo. Em placas de Petri de 6 cm de diâmetro, foram pipetados 3 *spots* de 10 µL cada. As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C. Se após o crescimento das colônias houver formação de halo translúcido, o isolado é considerado capaz de solubilizar a fonte de fosfato presente no meio. A capacidade de solubilização foi quantificada através da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia e para cada isolado foi utilizada a média dos 3 *spots*. Os halos e colônias foram medidos através do software *ImageJ* (version 1.8.0).

#### 4.4.2. Produção de sideróforos

Para esse teste, o meio de cultura CAS agár, proposto por Schwyn and Neilands (1987) foi utilizado. Para preparo do meio, inicialmente, 20 g de LB broth (Sigma) e 30,24 g de PIPES foram adicionados em 890 mL de água. O pH foi ajustado para 6,8 com pastilhas de NaOH.z. Separadamente, as seguintes soluções foram preparadas: 1) *Solução férrica* (0,027 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  e 30 µL de HCl em 10 mL de água destilada); 2) *Solução CAS* (60,5 mg de azul de cromoazurol em 50 mL de água destilada) e 3) *Solução CTAB* (72,88 mg de CTAB em 40 mL de água destilada). Após o preparo, a solução de CTAB foi lentamente adicionada a solução CAS juntamente com 10 mL da solução férrica. Quando a solução férrica é adicionada, a solução CAS sofre alteração da cor laranja para azul. Os 110 mL totais foram filtrados no fluxo laminar em membrana de 0,45 µm e adicionados ao meio LB com PIPES previamente autoclavado e resfriado.

Para realização do ensaio, 10 µL do inóculo previamente preparado foi plaqueado em triplicata em placas de 6 cm de diâmetro. As placas foram incubadas por 72 horas a 30°C. Passado esse período, as colônias que apresentarem um halo cor de laranja ao seu redor serão consideradas produtoras de sideróforos. A capacidade de produção de sideróforos foi quantificada da mesma forma que a solubilização de fosfato.

#### 4.4.3. Produção de Ácido-indol-acético (AIA)

Inicialmente uma solução estoque de triptofano a 50 mM (10,2g/L) foi preparada e 100 mL dessa solução foi adicionada em 900 mL de meio BD (Caldo de Batata-Dextrose, Kasvi®) para obter concentração final de 5mM. Em tubos falcon de 15mL foram adicionados 2 mL de BD + triptofano 5mM e 200 uL do inóculo previamente preparado. Os tubos foram incubados a 30°C em agitação a 160 rpm por 48 horas. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. Segundo a metodologia adaptada de Bric *et al.* (1991) 150 uL do sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato. O mesmo volume do reagente de Salkowski (3,5 mL de HCL; 1,35 g de FeCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O; completar volume para 10 mL com água destilada) foi adicionado e a placa foi mantida por 30 min em temperatura ambiente sob proteção da luz. Após esse período a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm foi realizada.

Para quantificação da produção de AIA uma curva padrão foi realizada e através da equação de regressão linear obtida das concentrações de AIA sintético (Sigma) iguais a 0, 50, 150, 250, 350 ,450 µg/mL e interpolados com as respectivas absorbâncias a 540 nm. O reagente apresenta coloração amarelada e em contato com a AIA sofre alteração de cor para rosa/vermelho, portanto caso haja alteração de coloração o isolado é considerado produtor de AIA.

#### 4.4.4. Fixação de nitrogênio

A metodologia proposta por Döbereiner, *et al* (1995) foi utilizada. Inicialmente, o meio de cultura NFb foi preparado adicionando 5 g/L de ácido málico; 0,5 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 0,1 g/L de NaCl; 0,02 g/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 2 mL/L de solução de micronutrientes (0,04 g/L de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,12 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,40 g/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,0 g/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O e 1,175 g/L de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) e 4,5 g/L de KOH. Devido ao alto valor de pH, os componentes devem ser adicionados na ordem acima para evitar a precipitação de Fe e outros sais e o pH ajustado para 6,5. Após o preparo adiciona-se 1,8 g de ágar para que o meio se apresente de forma semissólida e posteriormente é autoclavado. Depois de autoclavado, adicionou-se ao meio de cultura, 2 mL/L de solução de azul de bromotimol (5 g/L de azul de bromotimol em KOH 0,2 N); 4 mL/L de solução de ácido Fe-etilendiaminotetracético (EDTA) (16,4 g/L

Fe-EDTA); 1 mL/L de solução vitamínica (10 mg de biotina e 20 mg de piridoxal-HCl em 100 mL de água destilada), filtrados no fluxo laminar em membrana de 0,45 nm. O meio de cultura é transferido para tubos de ensaio de 50 mL previamente autoclavados. Em seguida, 10 uL do inóculo previamente preparado foi adicionado ao meio e os tubos de ensaio foram mantidos a 28°C por 48 horas em BOD.

As análises de fixação de nitrogênio foram realizadas em triplicata de forma qualitativa em meio Fbn. Uma estirpe de *Sinorhizobium meliloti*, sabidamente fixadora de nitrogênio, foi utilizada como controle positivo. O meio não inoculado foi utilizado como controle negativo. Os isolados que se assemelharam ao controle positivo, apresentando névoa de crescimento e alteração na coloração do meio, foram considerados positivos.

#### **4.4.5. Detecção do gene *dACC***

Para detectar o gene que codifica a enzima ACC deaminase, uma PCR convencional foi realizada para detecção do gene *dACC* com os *primers acdSf3* e *acdSr3* descritos por Li, *et al* (2015). Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *Bradyrhizobium* previamente conhecida como produtora da enzima. A PCR foi iniciada com uma etapa de desnaturação de 4 min a 95 °C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, anelamento a 53 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 1 min, e concluída com uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram detectados usando eletroforese em gel de agarose 1%. Isolados com ampliações cujo fragmento (banda) têm o mesmo tamanho do controle positivo foram considerados como produtores da enzima ACC deaminase.

#### **4.4.6. Produção de biofilme**

Para realizar a quantificação de produção de biofilme, o método de cristal violeta proposto por Djordjevic *et al.*, 2002 foi utilizado. Inicialmente um pré-inóculo foi realizado em 5 mL de meio de cultura LB (*Tryptone Soya Broth*) e incubado por 24 horas a 20°C e 180 rpm. Passado esse período, as culturas bacterianas foram transferidas para 5 mL de meio LB e novamente incubados *overnight* a 28° C e 180 rpm até atingir  $DO_{600\text{ nm}} = 1$ . Posteriormente, foram adicionados 50 uL das culturas crescidas e 150 uL de meio LB nos poços de placas de microtitulação de 96 poços.

As placas foram ser seladas com *Parafilm* e incubadas por 48h a 28 °C. Após o crescimento, o conteúdo da placa foi removido dos poços e as placas foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril para remover bactérias fracamente associadas a parede dos poços. Após as lavagens, as placas foram mantidas na bancada à temperatura ambiente até a secagem. Após a secagem, cada poço foi corado com 150 µL de solução de cristal violeta 0,1% por 45 min. Após a coloração, as placas serão lavadas cinco vezes com água destilada autoclavada. A análise quantitativa da produção de biofilme foi realizada pela adição de 200 µL de etanol 95% para descolorir os poços. 100 µL microlitros de cada poço foram transferidos para uma nova placa de microtitulação e quantificada por fotometria em comprimento de onda de 595 nm. O mesmo processo foi realizado com poços contendo apenas meio de cultura como controle negativo.

A análise dos resultados foi realizada de acordo com Xu, *et al.* (2016). Inicialmente a ODc foi calculada através da média da OD do controle somada a 3 vezes o desvio padrão do controle. O valor de cada amostra foi determinado da seguinte maneira: Produção de biofilme =  $OD \text{ amostra} - ODc / ODc$ . A partir dos valores obtidos a seguinte classificação foi adotada: valores < 0 = não produziram biofilme; valores > 1 = fraco produtores; valores > 2 = produtores moderados e valores > 4 = forte produtores.

#### **4.4.7. Teste estresse hídrico *in vitro***

O estresse hídrico *in vitro* foi induzido seguindo a hipótese proposta por Gonzalez, *et al.* (2024), aumentando tanto a concentração de ágar quanto a de nutrientes. O meio de cultura LB foi utilizado em cinco diferentes concentrações de ágar e nutrientes, sendo 1x (mantido como controle), 1,25 x, 1,67x, 2,5x, e 5x. Inicialmente, um inóculo foi preparado para os 80 isolados em meio LB líquido, 180 rpm, 30°C A DO foi ajustada para 0,5 e 0,5 e 5 µL de cada isolado foi pipetado em triplicata em cada um dos 5 meios de cultura com diferentes concentrações. As placas foram mantidas na BOD a 28°C durante 48h.

## 4.5. Caracterização dos isolados *in vivo*

### 4.5.1. Teste de germinação de sementes

Para determinar a influência que isolados bacterianos podem ter no potencial máximo de germinação de sementes de Citrumelo Swigle, o qual pode ser usado para estimar o valor para semeadura em campo, foi realizado um teste de germinação em papel *germitest*. O teste de germinação foi realizado usando as regras para análise de sementes proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ([https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_sementes.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf) - acessado em 24/05/2024), com modificações baseando-se no protocolo proposto por Carvalho *et. al* (2021). Inicialmente, as sementes foram esterilizadas por 20 min em solução de 5.0% (v/v) hipoclorito de sódio (Clorox Co) e 0.01% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich) e lavadas três vezes em água destilada autoclavada. Depois desse processo, as sementes foram imersas em água autoclavada e incubadas 10° no escuro para todas atingirem o teor de 100% de umidade.

Após a padronização da umidade, as sementes foram retiradas da água e imersas por 40 min no inóculo dos isolados preparado previamente em meio LB e padronizados a  $DO_{600nm} = 1$ . Para cada tratamento foram utilizadas 30 sementes e passado o período de imersão as sementes foram retiradas e deixadas na bancada em temperatura ambiente para secagem. Após a secagem, os papéis *germitests* foram umedecidos com água destilada autoclavada 2,4 x do peso do papel em mL. As sementes foram dispostas na forma de sanduiche nos papéis usando-se 2 embaixo e um sobre as sementes, os quais foram enrolados, envolvidos com plástico transparente e incubados em BOD a 27°. Após quarenta dias da montagem do teste, foram realizadas avaliações semanais durante 5 semanas, através da contagem do número de sementes germinadas. Na última avaliação, o índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado de acordo Brown e Mayer (1986). Ao final do experimento, a parte aérea e raiz das plântulas foram medidas e pesadas. A partir desses dados, a porcentagem de água e biomassa foram calculadas. A biomassa foi determinada através do peso seco das raízes das plântulas e a porcentagem de água foi calculada, sendo % de água =  $(\text{Peso fresco}/\text{Peso fresco}-\text{Peso seco}) \times 100$ . Os valores obtidos. Para comparar cada isolado com o controle, foi calculado o valor de *fold-change* ( $\log_2$  da razão do valor obtido em cada tratamento pelo controle).

#### 4.5.2. Testes em casa de vegetação

Uma caracterização com os primeiros 40 isolados selecionados foi realizada em casa de vegetação. Inicialmente sementes do porta enxerto da variedade citrumelo 'Swingle' foram semeadas em tubetes contendo substrato de fibra de coco. Em cada tubete foram semeadas 3 sementes. Após aproximadamente 60 dias, quando as plântulas atingiram tamanho de aproximadamente 5 cm o desbaste foi realizado, deixando apenas uma plântula por tubete. Para cada um dos 40 isolados foram realizadas 10 réplicas. Após o desbaste, 1 mL do inóculo com  $DO_{600nm} = 1$  foi pipetado em cada réplica. Passados 7 dias da inoculação, 5 réplicas de cada tratamento foram retiradas para análises fenotípicas, sendo peso seco, peso fresco e altura. As outras cinco réplicas foram mantidas em casa de vegetação e uma nova inoculação foi realizada, da mesma forma que a primeira. Após 90 dias, as plantas restantes foram utilizadas para uma segunda avaliação. Nessa avaliação as raízes foram *scaneadas* e parâmetros das raízes como diâmetro, volume, comprimento e área de superfície foram mensurados através do software *WinRhizo* (Regent Instruments - [https://regent.qc.ca/assets/winrhizo\\_software.html](https://regent.qc.ca/assets/winrhizo_software.html)).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise química do solo

A análise química do solo foi realizada para verificar a homogeneidade nos parâmetros químicos do solo das plantas coletadas com diferentes níveis de deficiência hídrica. Na tabela 1 estão apresentadas as médias das cinco plantas coletadas para cada nível de estresse nas duas coletas realizadas.

**Tabela 1.** Média dos resultados das análises químicas do solo (n = 5) em função da coleta e nível de deficiência hídrica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey a 0,05).

Variável *	Coleta Seca		Coleta Chuva	
	Deficiência hídrica		Deficiência hídrica	
	Moderada	Acentuada	Moderada	Acentuada
M.O. (g/dm <sup>3</sup> )	15.20 a ± 5.36	12.6 a ± 1.14	18.2 a ± 10.71	19 a ± 5.8
pH (CaCl <sub>2</sub> 0,01 M)	5.94 a ± 1.51	5.76 a ± 0.16	6.12 a ± 0.26	6.2 a ± 0.29
P (mg/dm <sup>3</sup> )	79.6 a ± 38.1	75.2 a ± 8.44	100.6 a ± 23.6	122.2 a ± 23
K (mmolc/dm <sup>3</sup> )	2.72 a ± 1.30	3.96 a ± 0.52	3.18 a ± 0.39	3.2 a ± 0.58
Ca (mmolc/dm <sup>3</sup> )	96.6 a ± 40.5	82.20 a ± 9.12	154.8 a ± 111.4	211.8 a ± 57
Mg (mmolc/dm <sup>3</sup> )	45.4 a ± 19.0	41.4 a ± 8.71	67 a ± 45.3	107.2 a ± 34.2
H + Al (mmolc/dm <sup>3</sup> )	10.4 a ± 0.89	10.4 a ± 1.51	10 a ± 0.7	9.8 a ± 0.84
S.B. (mmolc/dm <sup>3</sup> )	144.7 a ± 59.8	127.5 a ± 17.9	225 a ± 156.3	322.2 a ± 91
C.T.C. (mmolc/dm <sup>3</sup> )	155 a ± 60	138 a ± 17.94	235 a ± 155.7	332 a ± 90.7
V%	92.6 a ± 2.97	92.4 a ± 1.52	94.2 a ± 3.27	96.8 a ± 1.3
B (mg/dm <sup>3</sup> )	1.06 a ± 0.58	1.04 a ± 0.39	1.01 a ± 0.91	0.78 a ± 0.25
Cu (DTPA pH 7.3)	18 a ± 3.64	14.08 b ± 0.64	20.12 a ± 3.67	20.34 a ± 3.46
Fe (DTPA pH 7.3)	11.8 a ± 1.64	10.6 a ± 2.7	11.4 a ± 1.52	9.8 a ± 1.1
Mn (DTPA pH 7.3)	8.34 a ± 1.66	6 a ± 0.90	12.06 a ± 3.65	9.88 a ± 1.96
Zn (DTPA pH 7.3)	20.5 a ± 8.02	12.08 b ± 1.37	26.06 a ± 13.73	29.16 a ± 7.57

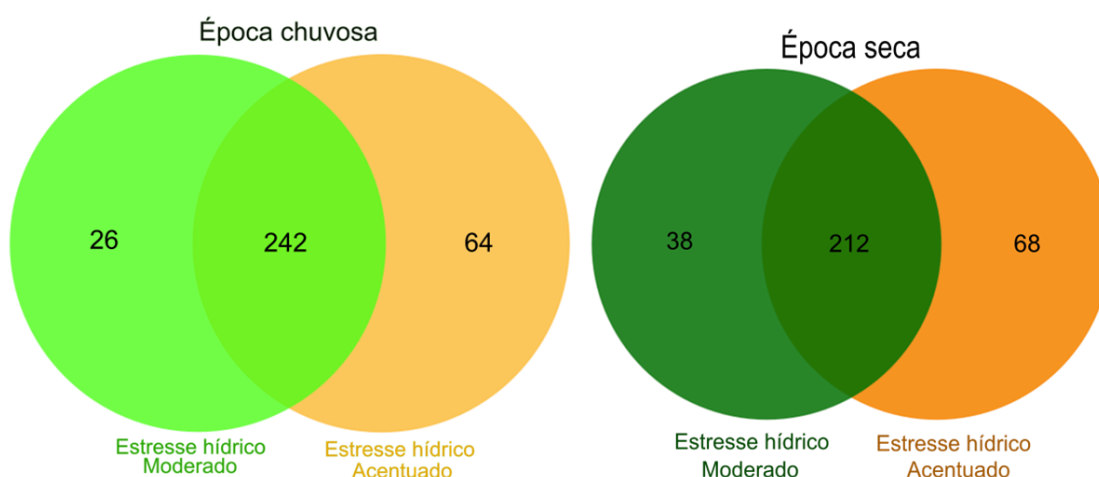
\* M.O. = Matéria orgânica, pH (CaCl<sub>2</sub> 0,01 M) = Potencial hidrogeniônico em solução de cloreto de cálcio, P = Fósforo, K = Potássio, Ca = Cálcio, Mg = Magnésio, H + Al = Acidez potencial, S.B = Troca de bases, C.T.C. = Capacidade de troca de cátions, V% = Saturação por bases, B = Boro, Cu = Cobre, Fe = Ferro, Mn = Manganês, Zn = Zinco.

Analisando os resultados obtidos na análise, observa-se que 87,5% das variáveis químicas analisadas não apresentaram diferença significativa entre as amostras com diferentes níveis de estresse hídrico em nenhuma das duas coletas retratando uma homogeneidade experimental.

## 5.2. Composição da comunidade

### 5.2.1. Comunidade do solo rizosférico

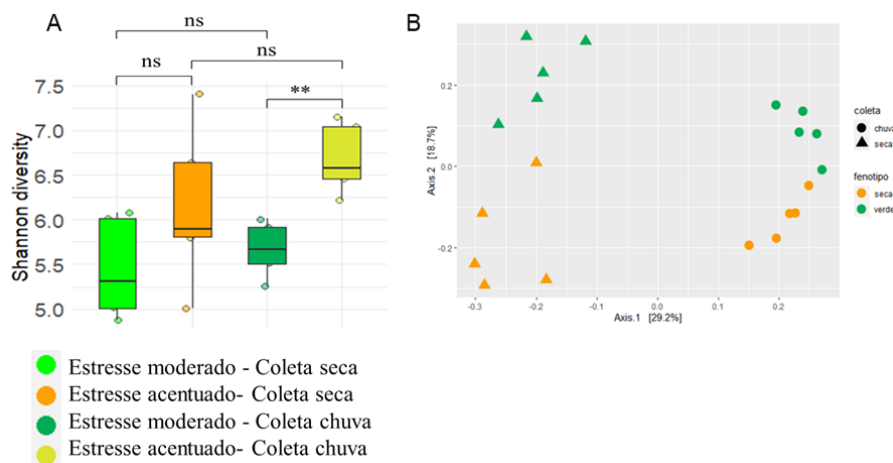
A partir do sequenciamento do DNA total extraído de amostras do solo rizosférico, a comunidade metataxonômica das amostras foi acessada. O compartilhamento de gêneros bacterianos entre amostras com diferentes fenótipos de deficiência hídrica em cada época de coleta está representado nos diagramas de *Venn* da Figura 3. A porcentagem de gêneros compartilhados entre os dois níveis de estresse hídrico foi maior durante a estação chuvosa (81,7%) em comparação à estação seca (70,7%).



**Figura 3.** Diagramas de *Venn* representando os gêneros bacterianos exclusivos e compartilhados na comunidade metataxonômica da rizosféra de plantas com diferentes fenótipos de deficiência hídrica (acentuado e moderado), nas épocas de coleta definidas como estação seca e chuvosa.

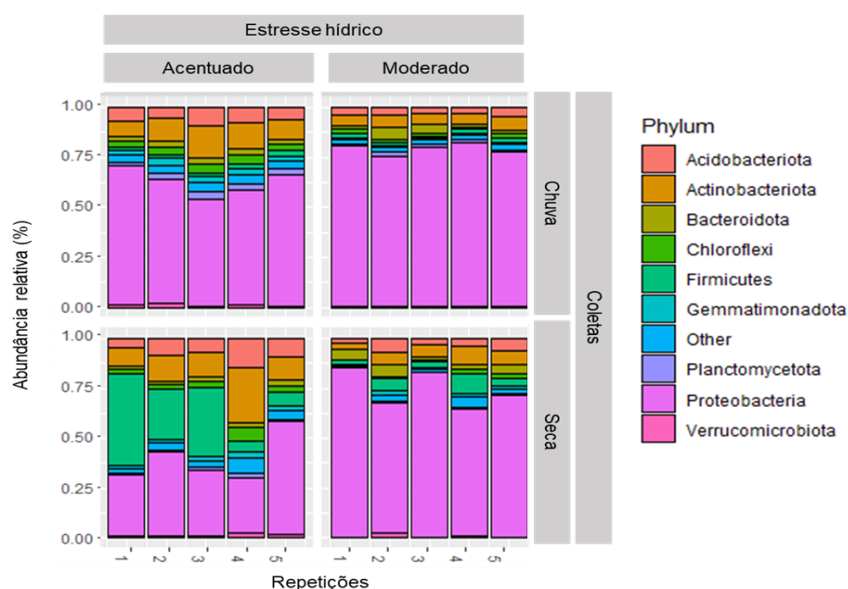
A diversidade alfa e beta das amostras foi mensurada e está apresentada na figura 4. Com relação a diversidade alfa (Figura 4A) não foi observada diferença significativa entre as amostras coletadas na época seca, apenas entre as amostras coletadas na época de chuva. A análise de diversidade beta, representada pela ordenação NMDS (Figura 4B), demonstrou diferenças significativas na composição da comunidade bacteriana do solo rizosférico entre os diferentes níveis de deficiência hídrica e épocas de coleta. A análise ANOSIM indicou que o estado da planta (estresse moderado ou severo) explicou aproximadamente 14,7% da variação na estrutura das comunidades microbianas, enquanto a época de coleta teve um efeito

ainda mais pronunciado, explicando cerca de 27,7% da variação. Esses resultados indicam que, embora o nível de estresse hídrico tenha influenciado a composição microbiana, a sazonalidade exerceu um papel ainda mais determinante na modulação da comunidade bacteriana da rizosfera.

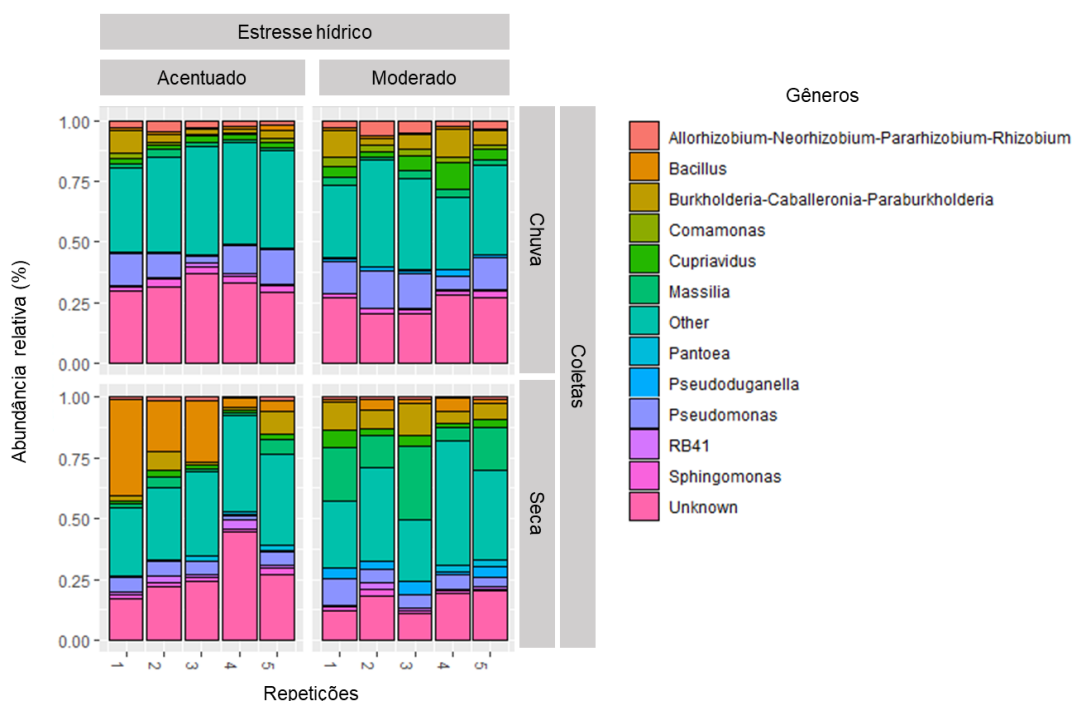


**Figura 4. A.** Diversidade alfa calculada através do índice de Shannon. T student,  $p < 0,01 (**)$ . **B.** Gráfico de ordenação de escala multidimensional não métrica (NMDS) e análises ANOSIM da comunidade bacteriana no solo da rizosfera entre diferentes níveis de deficiência hídrica ( $R^2 = 0,14748$ ,  $P = 0,001$ ) e coletas ( $R^2 = 0,27665$ ,  $P = 0,001$ ). As análises são calculadas na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis gerada a partir de dados 16S rRNA a nível de ASV.

A abundância relativa das amostras foi determinada a nível de filo (Figura 5) e gênero (Figura 6). A nível de filo, observou-se uma clara dominância do filo *Proteobacteria* em todas as amostras. Na amostragem realizada sob deficiência hídrica acentuada coletada na época seca, observou-se um aumento na diversidade de filós, com destaque para a presença mais expressiva de *Chloroflexi*, *Bacteroidota* e *Firmicutes*. Já a nível de gênero, o gráfico de abundância relativa revela dominância do gênero *Pseudomonas* em praticamente todas as amostras, independentemente do nível de estresse hídrico ou da época de coleta. No entanto, na coleta realizada durante a época seca em plantas sob estresse hídrico acentuado, observou-se uma maior equitabilidade entre os diferentes gêneros bacterianos. Nessa condição, gêneros como *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Massilia* e *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* aparecem com maior proporção relativa.



**Figura 5.** Abundância relativa dos principais filos identificados na comunidade bacteriana da rizosfera em cada coleta (chuva e seca) em plantas com diferentes níveis de estresse hídrico (moderado e acentuado).

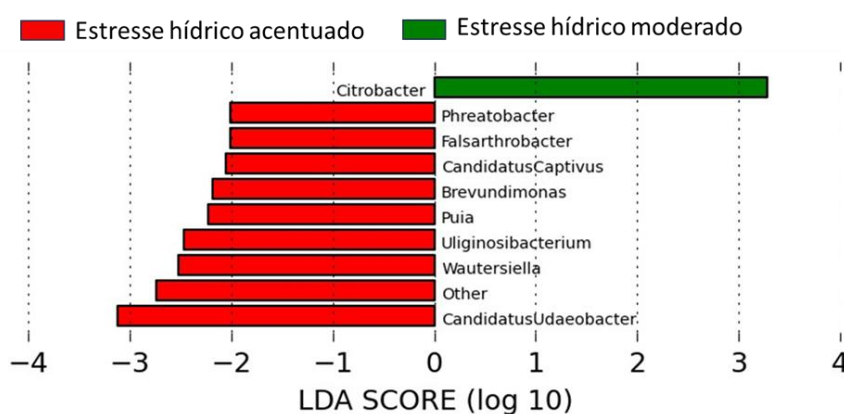


**Figura 6.** Abundância relativa dos 11 principais gêneros identificados na comunidade bacteriana da rizosfera em cada coleta (chuva e seca) em plantas com diferentes níveis de deficiência hídrica (moderada e acentuada).

A análise discriminante linear (LDA) de biomarcadores diferenciais utilizando o método LefSe (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*) está apresentada na figura 7. A análise foi realizada comparando-se, a nível de gênero, amostras de solo rizosférico de plantas com deficiência hídrica acentuada com as mostrando deficiência moderada, independente da época de coleta. Observou-se um número maior de

biomarcadores associados a deficiência hídrica acentuada (n=9) em comparação a moderada, que apresentou somente o gênero *Citrobacter*.

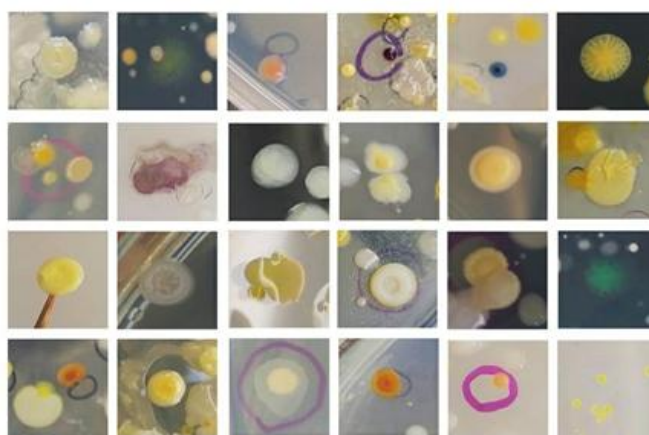
A mesma análise foi realizada separadamente para cada época de coleta, comparando os dois fenótipos (deficiência hídrica acentuada e moderada) nas condições de seca e chuva. Na análise estratificada por época de coleta, observou-se perfis microbianos distintos entre os dois fenótipos de deficiência hídrica, tanto na estação seca (Figura S1 – Apêndice) quanto na estação chuvosa (Figura S2 – Apêndice). Nas duas épocas de coleta, o fenótipo de estresse acentuado apresentou um número expressivamente maior de biomarcadores diferenciais em comparação ao estresse moderado. Na estação seca, foram identificados 88 biomarcadores associados ao grupo com estresse acentuado, enquanto 23 biomarcadores foram detectados no grupo com estresse moderado. Dentre eles destacam-se os gêneros *Massilia*, *Pseudoguganella*, *Lelliota*, *Cryseobacterium*, *Duganella* e *Pseudocitrobacter* com maior LDA score em plantas com fenótipo moderado; e *Bacillus*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Gaiella* e *Nocardioides* no fenótipo acentuado. Já na estação chuvosa, o grupo com estresse acentuado apresentou 117 biomarcadores, ao passo que o grupo com estresse moderado apresentou 18 biomarcadores. Destacando-se os gêneros *Enterobacter*, *Cupriavidrius*, *Comamonas*, *Pseudoduganella*, *Duganella* e *Citrobacter* com maior LDA score em plantas com fenótipo moderado; e *Sphingomonas*, *Microvirga*, *Pseudolabrys*, *Predomicrobium*, *Gemmatimonas* e *Solilubrobacter*.



**Figura 7.** Diferença na abundância de gêneros bacterianos entre solos rizosféricos de plantas com fenótipo de deficiência hídrica acentuada (vermelho) e moderado (verde). Valores negativos de LDA indicam gêneros diferencialmente abundantes em plantas com estresse acentuado, enquanto valores positivos representam gêneros diferenciais em plantas com estresse moderado. Foram considerados apenas os gêneros com valor de escore LDA > 2,0 e prevalência ≥ 10%

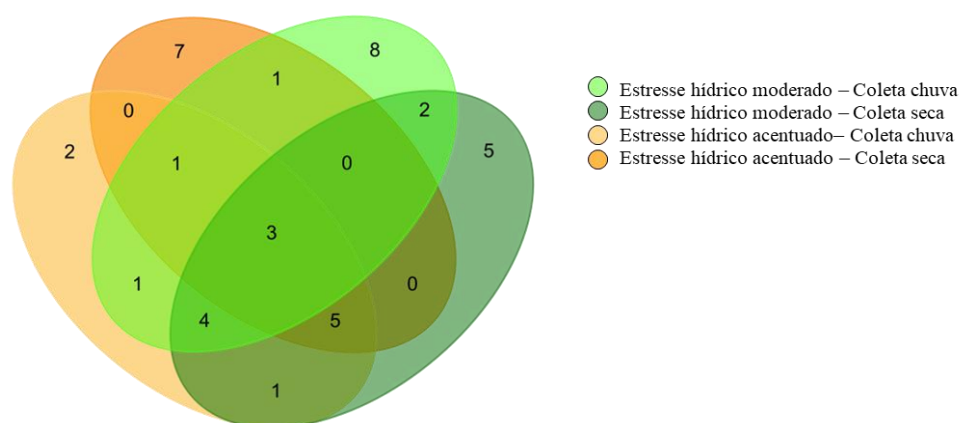
### 5.2.2. Comunidade recuperada em laboratório

Com o isolamento foram obtidos um total de 4682 isolados. Na Figura 8 estão apresentados exemplos das diferentes morfologias de colônias obtidas no isolamento. Conforme descrito no item 4.3.1. da metodologia, apenas 15% da coleção foi sequenciada. Após o sequenciamento e análise taxonômica, um total de 40 gêneros diferentes foram identificados.



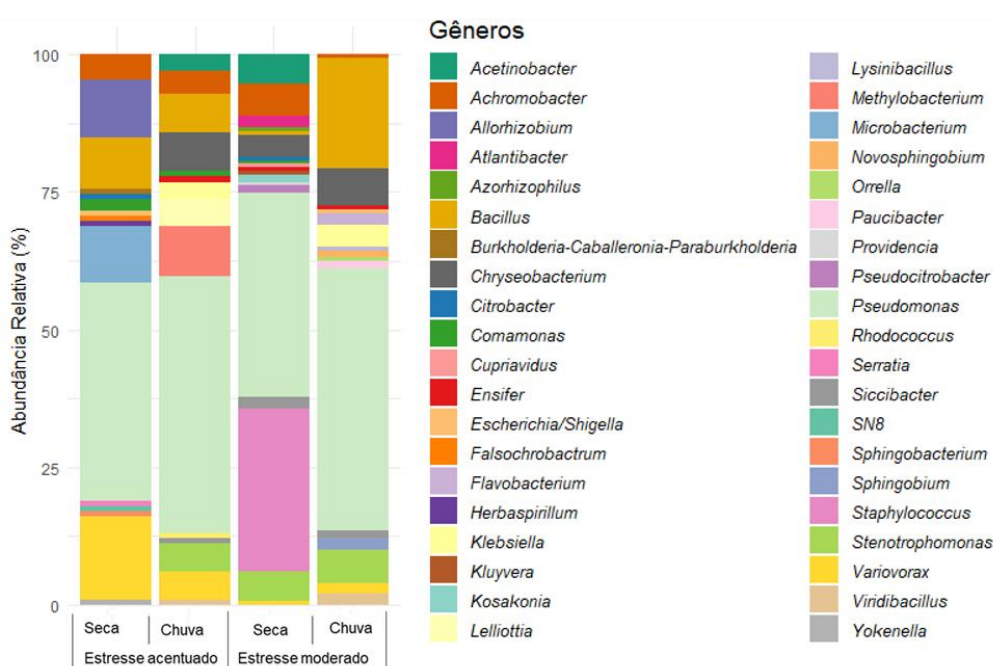
**Figura 8.** Fotos das diferentes colônias crescidas nos diferentes meios de cultura.

Conforme observado na Figura 9, as amostras de diferentes fenótipos coletadas nas diferentes épocas do ano compartilham apenas três gêneros entre si, sendo eles *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*. Os gêneros exclusivos de cada amostra estão apresentados na Tabela S1 (apêndice).



**Figura 9.** Diagrama de Venn para avaliar gêneros bacterianos exclusivos e compartilhados entre plantas com diferentes níveis de estresse hídrico (acentuado e moderado) em diferentes períodos de amostragem (seca e chuva).

As amostras obtidas das plantas sob deficiência moderada coletadas na época de chuva apresentaram maior riqueza a nível de gênero. E as amostras mostrando nível de deficiência hídrica acentuada tanto na época seca quanto na chuvosa são as que compartilham o maior número de gêneros entre si. A partir do número de ASVs obtidos em cada uma das condições (deficiência hídrica e épocas de coleta), a abundância relativa das amostras foi determinada a nível de gênero e está representada na figura 10. A abundância absoluta dos gêneros estão apresentadas na tabela S2 (Apêndice). Bactérias do gênero *Pseudomonas* foram as mais prevalentes em todas as condições.



**Figura 10.** Abundância relativa das amostras isoladas da rizosfera de plantas com fenótipo de estresse hídrico acentuado e moderado coletadas na época de seca e chuva.

### 5.3. Seleção dos isolados a serem caracterizados

Para iniciar a caracterização dos isolados *in vitro* e *in vivo*, foram selecionados um representante de cada gênero para cada amostra. Inicialmente foram selecionados representantes de cada gênero que estavam de fato isolados, ou seja, amostras que apresentaram *reads* correspondentes a um único ASV. Como um segundo critério de seleção, foi avaliado na literatura se esses gêneros já foram descritos como tendo o potencial de promoção de crescimento de plantas. Depois dessa triagem foi obtido um número de 40 isolados pertencentes a 40 gêneros. Todos

os gêneros obtidos e selecionados estão apresentados na tabela 2. Os demais 18 gêneros não atenderam ao primeiro critério de seleção pois apresentaram representantes em de dois ou mais microrganismos (diferentes ASVs), portanto diferentes gêneros foram co-isolados. A primeira caracterização foi realizada com os 40 isolados pré-selecionados. Uma segunda caracterização foi posteriormente realizada elegendo-se todos os representantes (isolados) dos gêneros que apresentaram os melhores resultados e que se encontravam de forma isolada.

**Tabela 2.** Gêneros obtidos no isolamento de amostra da rizosfera de plantas com diferentes níveis de estresse em diferentes coletas (chuva e seca).

Período de coleta			
Chuva		Seca	
Fenótipo de deficiência hídrica			
Acentuado	Moderado	Acentuado	Moderado
<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<u><i>Achromobacter</i></u> *	<u><i>Achromobacter</i></u> *
<i>Acinetobacter</i>	<i>Atlantibacter</i>	<u><i>Allo-Neo-Para-Rhizobium</i></u> *	<u><i>Acinetobacter</i></u> *
<i>Atlantibacter</i>	<i>Azorhizophilus</i>	<u><i>Bacillus</i></u> *	<i>Atlantibacter</i>
<u><i>Bacillus</i></u> *	<i>Bacillus</i>	<u><i>Ensifer</i></u> *	<i>Azorhizophilus</i>
<u><i>Chryseobacterium</i></u> *	<i>Burkholderia</i>	<i>Escherichia/Shigella</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<u><i>Chryseobacterium</i></u> *
<u><i>Ensifer</i></u> *	<i>Citrobacter</i>	<u><i>Lelliottia</i></u> *	<i>Citrobacter</i>
<i>Klebsiella</i>	<u><i>Comamonas</i></u> *	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Comamonas</i>
<i>Lelliottia</i>	<u><i>Escherichia/Shigella</i></u> *	<u><i>Microbacterium</i></u> *	<i>Cupriavidus</i>
<u><i>Methylobacterium</i></u> *	<i>Falsochrobactrum</i>	<u><i>Novosphingobium</i></u> *	<u><i>Ensifer</i></u> *
<u><i>Pseudomonas</i></u> *	<u><i>Flavobacterium</i></u> *	<i>Orrella</i>	<i>Kluyvera</i>
<u><i>Rhodococcus</i></u> *	<i>Herbaspirillum</i>	<u><i>Paucibacter</i></u> *	<u><i>Kosakonia</i></u> *
<i>Siccibacter</i>	<u><i>Klebsiella</i></u> *	<u><i>Pseudomonas</i></u> *	<u><i>Lelliottia</i></u> *
<i>Staphylococcus</i>	<u><i>Pseudomonas</i></u> *	<i>Siccibacter</i>	<i>Providencia</i>
<u><i>Stenotrophomonas</i></u> *	<u><i>Serratia</i></u> *	<u><i>Sphingobium</i></u> *	<i>Pseudocitrobacter</i>
<u><i>Variovorax</i></u> *	SN8	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> *
<i>Viridibacillus</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<u><i>Variovorax</i></u> *	<i>Siccibacter</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>		<u><i>Staphylococcus</i></u> *
	<i>Viridibacillus</i>		<u><i>Serratia</i></u> *
	<i>Yokenella</i>		<u><i>Stenotrophomonas</i></u> *
			<i>Variovorax</i>

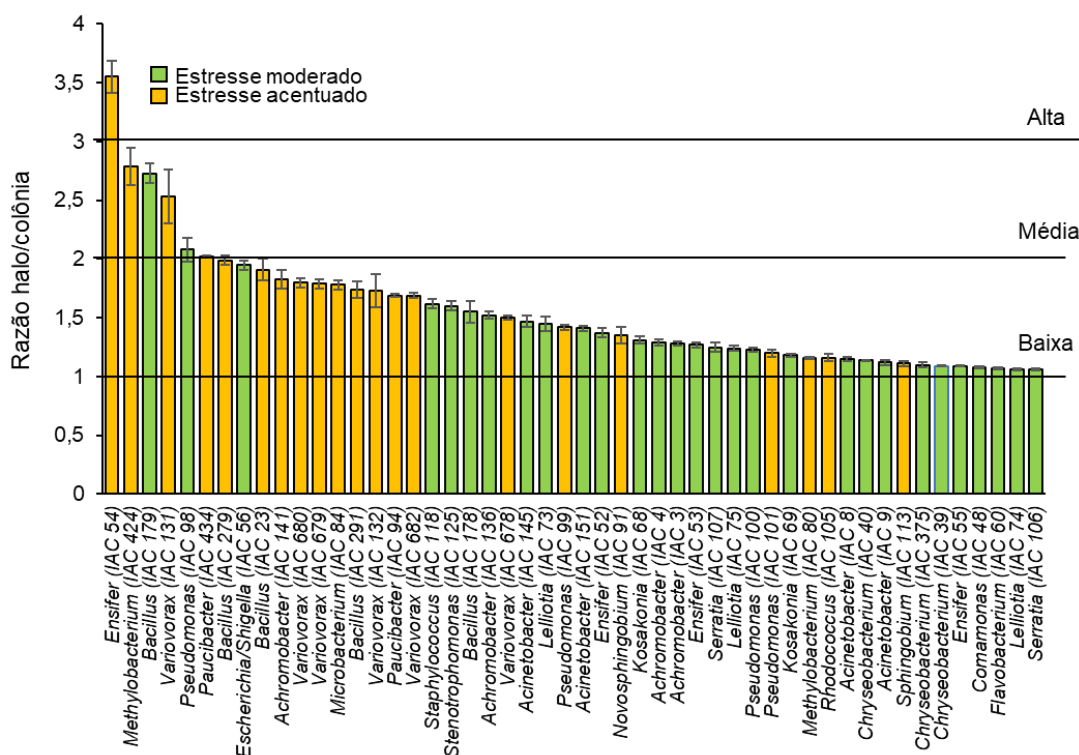
\* Gêneros selecionados para realização da caracterização *in vitro* e *in vivo*. Os gêneros que apresentaram melhores resultados na primeira caracterização encontram-se sublinhados.

A nível de gênero, a comunidade selecionada para ser caracterizada *in vitro*, representou 8,75% da comunidade core obtida nas análises de metataxonômica.

## 5.4. Caracterização *in vitro* dos isolados para características promotoras de crescimento

### 5.4.1. Quantificação da solubilização de fósforo

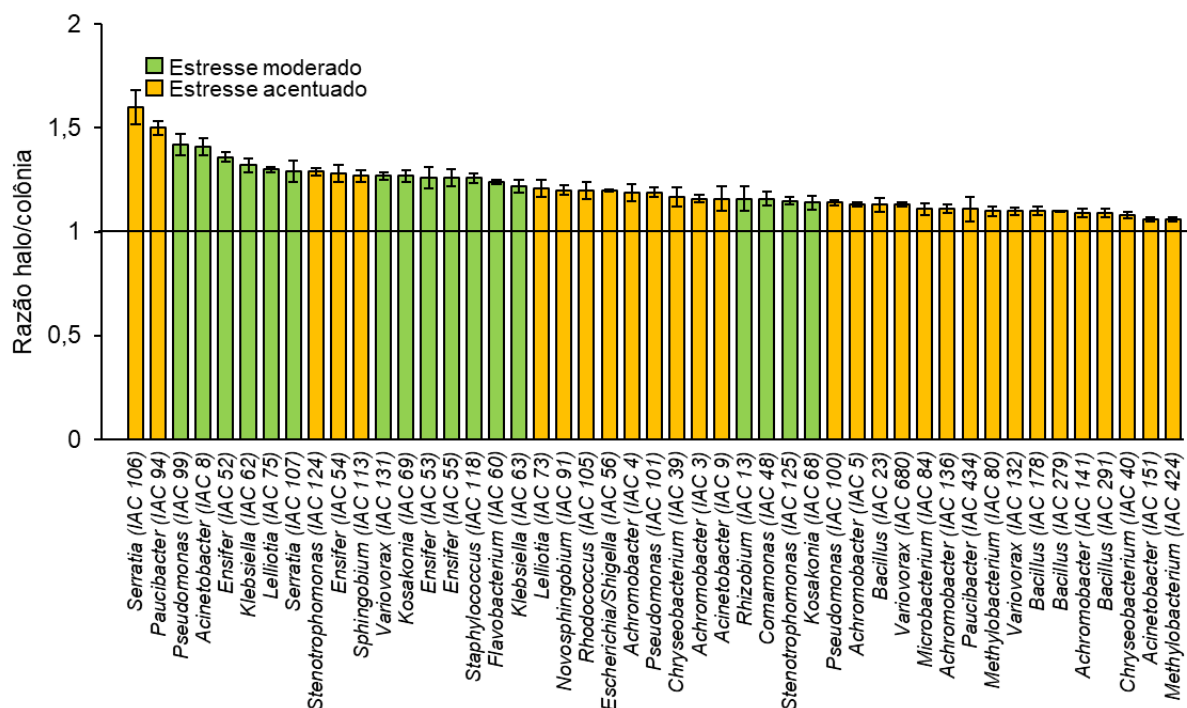
Os resultados da avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio pelos isolados bacterianos estão representados na Figura 11. Apenas o isolado *Ensifer* (IAC 54), oriundo da amostra com fenótipo de deficiência hídrica acentuada e coletado na época seca, apresentou alto índice de solubilização de fosfato. Cinco outros isolados também oriundos de amostras com fenótipo de deficiência hídrica acentuada e coletado na época seca apresentaram índice médio de solubilização: *Methylobacterium* (IAC 424), *Variovorax* (IAC 131) e *Paucibacter* (IAC 434). Inclui-se a estes o gênero *Pseudomonas* (IAC 98), oriundo da mesma época de coleta, porém de plantas com fenótipo de estresse moderado; e *Bacillus* (IAC 179), isolado de amostra coletada na época de chuva de plantas mostrando estresse moderado de deficiência hídrica.



**Figura 11.** Gráfico da quantificação da capacidade de solubilização de fosfato tricálcio obtido a partir da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia.

### 5.4.2. Quantificação da produção de sideróforos

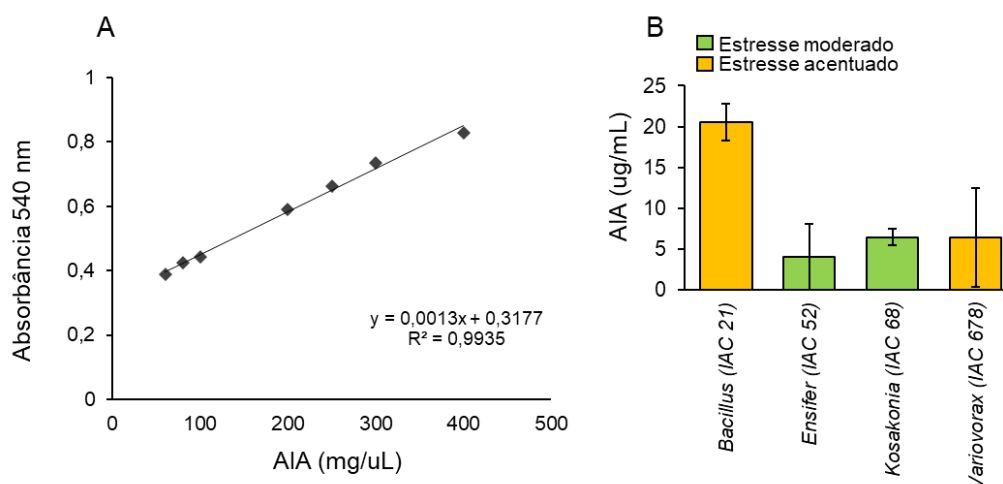
O isolado que se destacou nesse teste, apresentando maior halo de produção foi o IAC 106 pertencente ao gênero *Serratia* oriundo de plantas com fenótipo moderado de deficiência hídrica (Figura 12).



**Figura 12.** Gráfico da quantificação da produção de sideróforos obtido a partir da razão do diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia.

### 5.4.3. Quantificação da produção de AIA

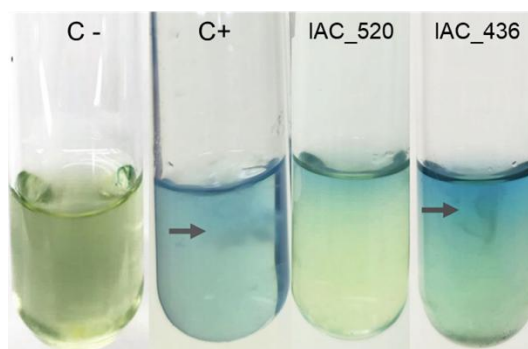
Inicialmente, para quantificar a produção de AIA dos isolados foi realizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de AIA sintético (Figura 13A). A partir desta foi realizado a quantificação do produzido pelos isolados (Figura 13A). Destacase o isolado IAC 21 do gênero *Bacillus*, com produção de AIA significativamente superior aos demais (Figura 13B).



**Figura 13.** AIA como índice de classificação de BPCP. **A.** Curva padrão para cálculo da concentração de AIA obtida através de concentrações conhecidas de AIA sintético e reagente de Salkowisky. **B.** Gráfico indicando a concentração de AIA (ug/mL) produzida pelos isolados.

#### 5.4.4. Fixação de nitrogênio

Na figura 14 estão apresentadas fotos dos controles negativo (C-) e positivo (C+) e um exemplo de isolados considerados positivo (IAC 436) e negativo (IAC 520) para fixação de nitrogênio. A seta está indicando a 'névoa' formada. Dos 80 isolados testados, um total de 51 apresentaram resultado positivo. Os resultados de todos os isolados estão apresentados na tabela 3.



**Figura 14.** Testes para as características de Fixação biológica de Nitrogênio. C-) Meio Fbn não inoculado. C+) Meio Fbn inoculado com *Sinorhizobium meliloti*. IAC\_520) Ilustração do aspecto visual de resultado negativo. IAC\_436) Ilustração do aspecto visual de resultado positivo.

#### 5.4.5. Detecção do gene *dACC*

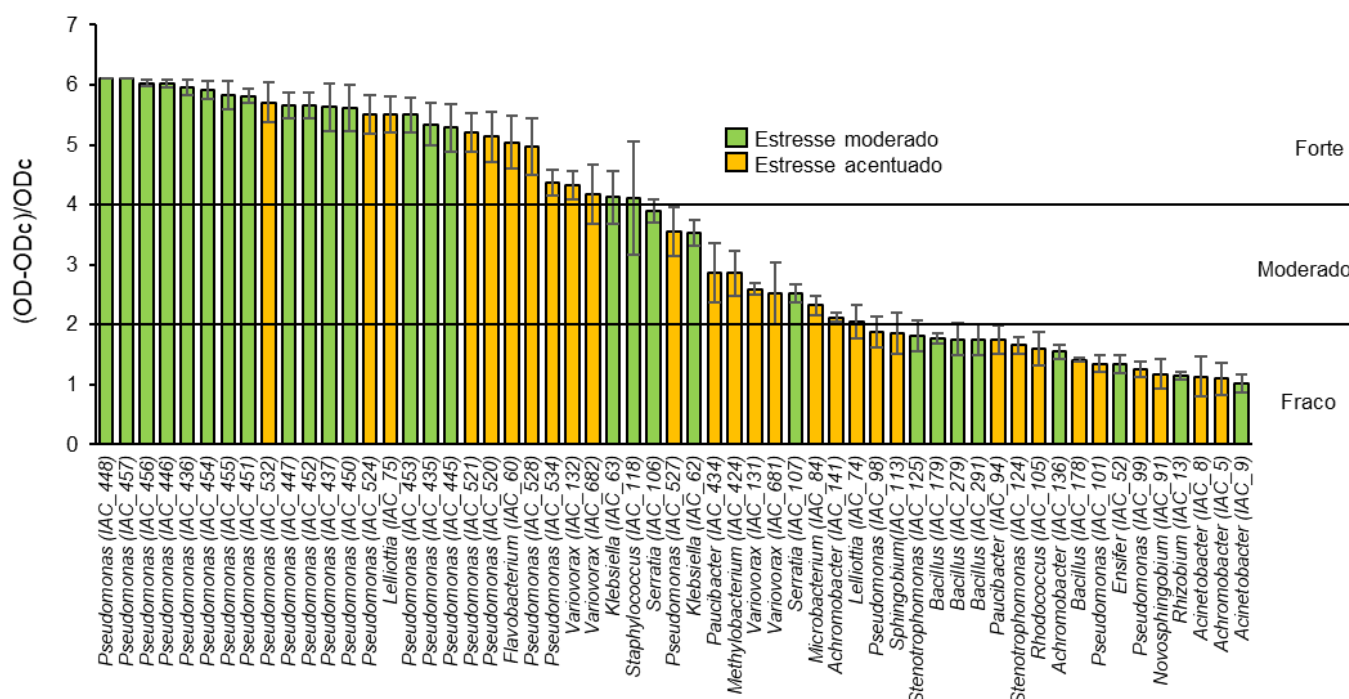
A PCR com primers que amplificam o gene *dACC* foi realizada para os 80 isolados. Destes, apenas 10 amplificaram para esse gene, sendo; *Achromobacter* (IAC 3 e IAC 4), *Acinetobacter* (IAC 8), *Rhizobium* (IAC 13), *Ensifer* (IAC 54), *Kosakonia* (IAC 68 e IAC 69), *Bacillus* (IAC 291), *Variovorax* (IAC 680 e IAC 681) A (Figura 15).



**Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras que amplificaram para o gene *dACC* (680 pb). M: marcador molecular 1kb plus. C-: Controle negativo da reação sem material genético. C+: Controle positivo da reação com *Bradyrhizobium*.

#### 5.4.6. Produção de biofilme

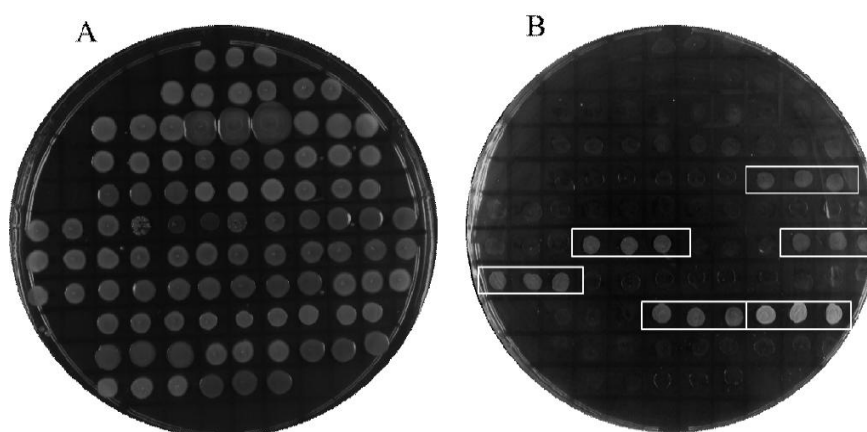
Dos 80 isolados testados, 73 apresentaram produção de biofilme. Os isolados foram categorizados em forte, moderado e fraco produtores de biofilme (Figura 16), de acordo com Xu, *et al.* (2016).



**Figura 16.** Gráfico indicando a produção de biofilme. Valores calculados a partir do controle negativo.  $ODc = OD \text{ controle negativo} + 3 * \text{desvio padrão do controle negativo}$ . Valores no eixo y são resultado da subtração da OD de cada isolado pela  $ODc/ODc$ .

#### 5.4.7. Teste de estresse hídrico *in vitro*

Como todos os isolados testados cresceram nos meios de cultura LB com concentrações de ágar e nutrientes até 2,5 x, estabeleceu-se que o crescimento na concentração 5X de ágar foi considerado como critério de seleção. Na figura 17 está apresentado um exemplo dos isolados que apresentaram crescimento no meio 5x. Todos os resultados estão apresentados na tabela 3. Os gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobium*, *Achromobacter*, *Variovorax* e *Staphylococcus*, se destacaram ao serem submetidos a estresse hídrico *in vitro*, apresentando bom crescimento no meio de concentração 5x (Tabela 3). No geral, isolados oriundos das amostras de plantas com fenótipo de estresse acentuado coletado na época seca se destacaram nesse teste, onde 63,3% dos isolados cresceram em meio com 5x a concentração de ágar e nutrientes (Tabela 4), indicando maior tolerância a seca por estas bactérias.



**Figura 17.** A. Isolados crescidos em placa de meio LB 1x B. Isolados crescidos em placa LB 5x. Retângulos brancos indicam os que apresentaram crescimento.

A somatória dos resultados de todas as características testadas para a seleção das BPCP encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Compilado de todos os resultados da caracterização *in vitro*.

Estresse Hídrico	Coleta	Id	Gênero	Características promotoras de crescimento						
				Gerais				Estresse hídrico		
				Fix. de N	Sol. de Fosfato*	Prod. de AIA**	Prod. De Sider.***	Prod. De Biofilme****	PCR ACC	Estresse hídrico
Acentuado	Chuva	IAC_23	<i>Bacillus</i>	-	+	-	+	+	-	++
		IAC_40	<i>Chryseobacterium</i>	-	+	-	+	-	-	-
		IAC_55	<i>Ensifer</i>	+	+	-	+	+	-	-
		IAC_80	<i>Methylobacterium</i>	-	+	-	+	-	-	-
		IAC_101	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	+	+	-	-
		IAC_105	<i>Rhodococcus</i>	+	+	-	+	+	-	-
		IAC_124	<i>Stenotrophomonas</i>	+	-	-	+	+	-	+++
		IAC_132	<i>Variovorax</i>	+	+	-	+	++	-	+
		IAC_277	<i>Bacillus</i>	-	-	-	+	-	-	+
		IAC_279	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	+	-	-
		IAC_291	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	+	+	+++
		IAC_520	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	++	-	-
		IAC_521	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	++	-	++
		IAC_524	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	++	-	-
		IAC_678	<i>Variovorax</i>	-	+	+	-	-	-	-
Seca		IAC_5	<i>Achromobacter</i>	-	-	-	+	+	-	++
		IAC_13	<i>Allor-Neo-Para-Rhizobium</i>	-	-	-	+	+	+	-
		IAC_21	<i>Bacillus</i>	-	-	+++	-	-	-	-

	IAC_54	<i>Ensifer</i>	+	+++	-	+	-	+	++
	IAC_75	<i>Lelliottia</i>	+	+	-	+	++	-	+
	IAC_84	<i>Microbacterium</i>	-	+	-	+	+	-	-
	IAC_91	<i>Novosphingobium</i>	-	-	-	+	+	-	-
	IAC_94	<i>Paucibacter</i>	+	+	-	+	+	-	++
	IAC_99	<i>Pseudomonas</i>	+	+	-	+	+	-	+
	IAC_113	<i>Sphingobium</i>	+	+	-	+	+	-	+++
	IAC_131	<i>Variovorax</i>	+	++	-	+	+	-	++
	IAC_141	<i>Achromobacter</i>	+	+	-	+	+	-	++
	IAC_424	<i>Methylobacterium</i>	+	++	-	+	+	-	-
	IAC_434	<i>Paucibacter</i>	-	++	-	+	+	-	++
	IAC_527	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	+	-	-
	IAC_528	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	++	-	-
	IAC_532	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	++	-	+
	IAC_534	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	++	-	+++
	IAC_679	<i>Variovorax</i>	-	+	-	-	-	-	-
	IAC_680	<i>Variovorax</i>	-	+	-	+	-	+	+
	IAC_681	<i>Variovorax</i>	+	-	-	-	+	+	+
	IAC_682	<i>Variovorax</i>	-	+	-	+	+	-	+++
	IAC_48	<i>Comamonas</i>	+	+	-	+	-	-	-
	IAC_56	<i>Escherichia/Shigella</i>	+	+	-	+	-	-	++
	IAC_60	<i>Flavobacterium</i>	+	-	-	+	++	-	-
	IAC_62	<i>Klebsiella</i>	+	-	-	+	+	-	-
	IAC_63	<i>Klebsiella</i>	+	-	-	+	+	-	-
	IAC_100	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	+	+	-	-
	IAC_107	<i>Serratia</i>	+	+	-	+	+	-	-
	IAC_178	<i>Bacillus</i>	+	+	-	+	+	-	-
	IAC_179	<i>Bacillus</i>	+	++	-	-	+	-	-
	IAC_375	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	-	-	-	-	-
	IAC_442	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-
Moderado	Chuva	IAC_445	-	-	-	-	++	-	+++
		IAC_446	+	-	-	-	+++	-	-
		IAC_447	+	-	-	-	++	-	-
		IAC_448	-	-	-	-	+++	-	-
		IAC_450	+	-	-	-	++	-	-
		IAC_451	-	-	-	-	++	-	+
		IAC_452	+	-	-	-	++	-	+
		IAC_453	-	-	-	-	++	-	+
		IAC_454	-	-	-	-	++	-	+
		IAC_455	+	-	-	-	++	-	+
		IAC_456	-	-	-	-	+++	-	+
		IAC_457	+	-	-	-	+++	-	+
	Seca	IAC_125	+	+	-	+	+	-	-

IAC_3	<i>Achromobacter</i>	-	+	-	+	+	+	-
IAC_4	<i>Achromobacter</i>	-	+	-	+	-	+	+
IAC_8	<i>Acinetobacter</i>	-	+	-	+	+	+	-
IAC_9	<i>Acinetobacter</i>	-	+	-	+	+	-	+
IAC_39	<i>Chryseobacterium</i>	+	+	-	+	-	-	-
IAC_52	<i>Ensifer</i>	+	+	+	+	+	-	-
IAC_53	<i>Ensifer</i>	+	+	-	+	-	-	-
IAC_68	<i>Kosakonia</i>	+	+	+	+	-	+	+
IAC_69	<i>Kosakonia</i>	+	+	-	+	-	+	+
IAC_73	<i>Lelliottia</i>	+	+	-	+	-	-	-
IAC_74	<i>Lelliottia</i>	+	+	-	-	+	-	-
IAC_98	<i>Pseudomonas</i>	+	++	-	-	+	-	-
IAC_106	<i>Serratia</i>	+	+	-	+	+	-	-
IAC_118	<i>Staphylococcus</i>	+	+	-	+	+	-	+++
IAC_136	<i>Achromobacter</i>	+	+	-	+	+	-	+++
IAC_145	<i>Acinetobacter</i>	+	+	-	-	+	-	-
IAC_435	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	++	-	+++
IAC_436	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	++	-	+++
IAC_437	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	++	-	+++

\* Índice de solubilização (IS) > 3 = +++; RS > 2 = ++; IS > 1 = +; IS < 1 = -.

\*\* Produção de sideróforo (PS) > 1 = +; (PS) < 1 = -;

\*\*\* [AIA] > 10 ug/mL = +++; [AIA] > 5 ug/mL = ++; [AIA] > 1 < 5 ug/mL = +; [AIA] < 1 ug/mL = -.

\*\*\*\* Forte (4x>ODc) = +++; Moderado (2x>ODc) = ++; Fraco (1x>ODc) = +.

A partir dos resultados obtidos na caracterização *in vitro* (Tabela 3), a porcentagem de resultados positivos foi calculada para cada um dos testes (Tabela 4).

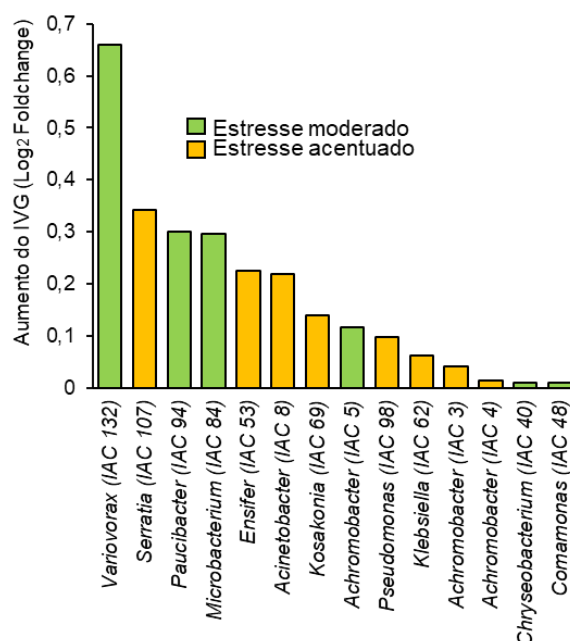
**Tabela 4.** Porcentagem de isolados positivos de cada amostra para cada um dos testes realizados *in vitro*

Fenótipo de estresse hídrico	Data de coleta	Características promotoras de crescimento						
		Gerais				Estresse hídrico		
		Fix de N	Sol. de Fosfato	Prod. de AIA	Prod. De Sider.	Prod. De Biofilme	PCR ACC	Estresse Hídrico
Acentuado	Chuva	60%	60%	6,66%	73,3%	73,3%	6,66%	33,33%
	Seca	50%	59%	4,54%	68,2%	81,8%	22,7%	63,6%
Moderado	Chuva	65,2%	26,1%	0%	34,7%	82,6%	0%	39,1%
	Seca	80%	85%	10%	70%	70%	25%	45%

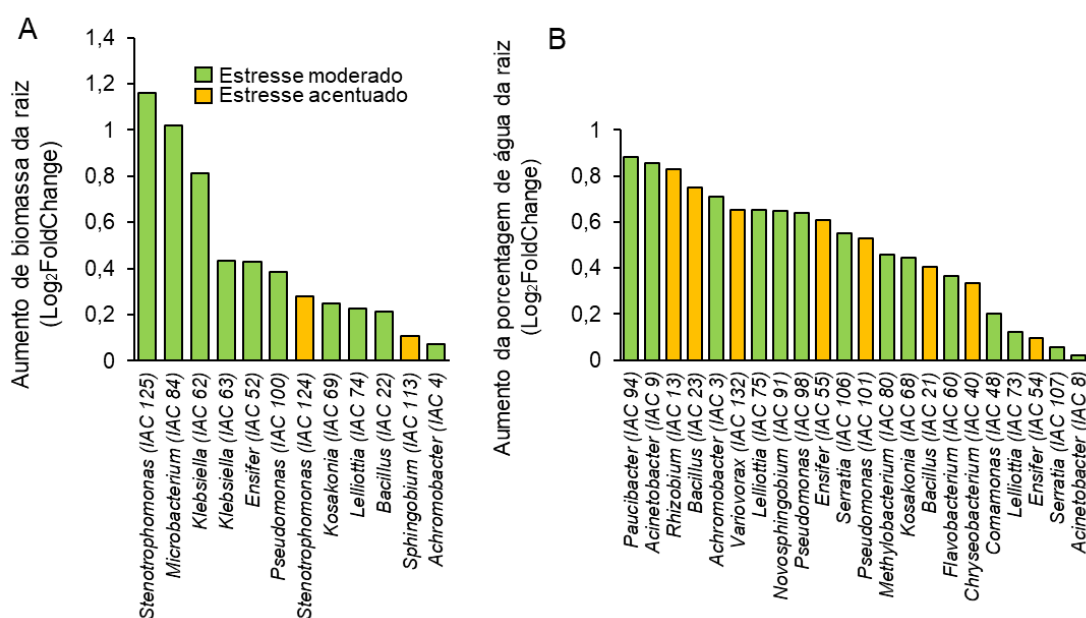
## 5.5. Caracterização *in vivo*

### 5.5.1. Teste de germinação de sementes

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado para analisar o efeito dos isolados na germinação de sementes. As sementes sem a adição de nenhum microrganismo, mantidas como controle, apresentaram IVG de 1.313. Para comparar cada isolado com o controle, foi calculado o valor de *fold-change* para cada isolado. O *fold change* foi calculado através do  $\log_2$  da razão do valor obtido em cada tratamento pelo controle. Dos isolados testados, 24% apresentaram valores de *fold-change* superior a 0, ou seja, apresentaram aumento do IVG. O isolado pertencente ao gênero *Variovorax* (IAC 132) destacou-se apresentando o maior aumento (Figura 18). Dos isolados testados, 30% promoveram aumento de biomassa do sistema radicular em comparação à testemunha (Figura 19A), enquanto que 55% dos isolados testados promoveram aumento da porcentagem de água (Figura 19B).



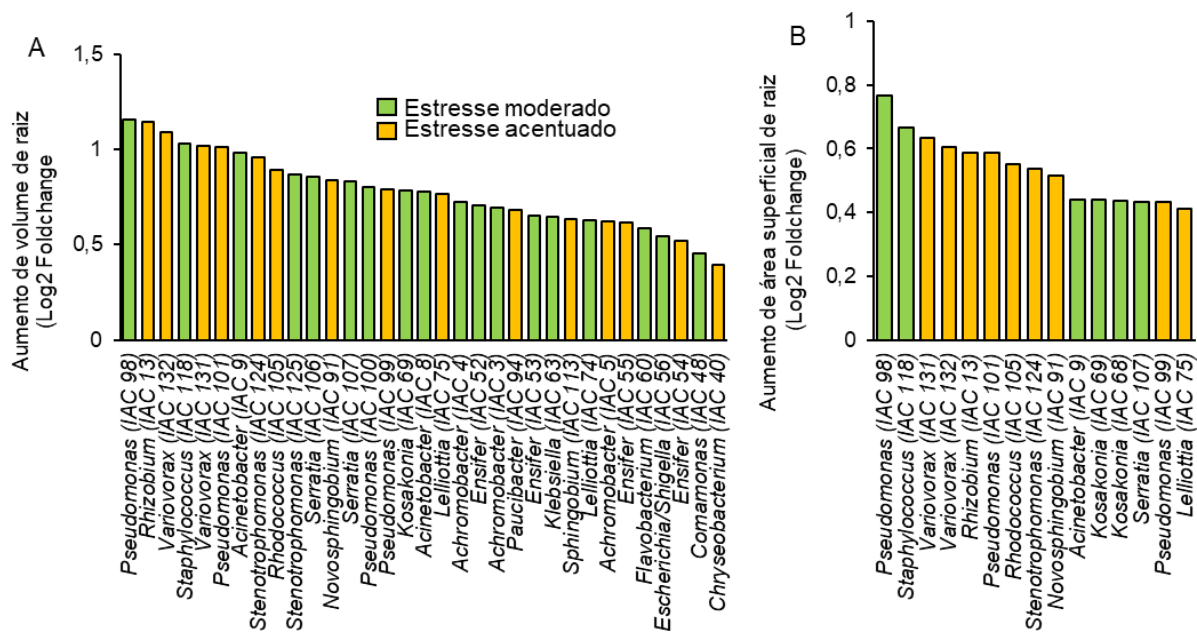
**Figura 18.** Aumento do índice de velocidade de germinação das sementes de citrumelo 'Swingle' na presença dos isolados. Valores expressos em  $\log_2$  FoldChange.



**Figura 19.** Aumento da biomassa de raiz (A) e porcentagem de água (B) em relação ao controle não inoculado. Valores expressos em Log<sub>2</sub>FoldChange.

### 5.5.2. Inoculação em plantas sob casa de vegetação

A inoculação em casa de vegetação foi realizada com os mesmos 40 isolados utilizados no teste de germinação. Ao final do experimento, o volume, área de superfície, comprimento e o número de pontas das raízes foi mensurado e comparado ao controle não inoculado. As análises morfológicas das raízes foram realizadas com o sistema de análise de imagem *WinRhizo*. Dos 40 isolados testados, 33 promoveram aumento no volume de raiz (Figura 20A), e 15 aumentaram a área de superfície (Figura 20B). Com relação ao comprimento de raiz, apenas dois isolados promoveram aumento, sendo eles, *Pseudomonas* (IAC 98) e *Staphylococcus* (IAC 118), ambos pertencentes a amostras de estresse moderado. O aumento de pontas de raízes foi promovido por dois isolados, sendo eles *Stenotrophomonas* (IAC 124) e *Variovorax* (IAC 132), pertencentes a amostras com estresse acentuado.



**Figura 20.A.** Aumento de volume de raiz em plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Valores expressos em Log<sub>2</sub> Foldchange. **B.** Aumento da área de superfície da raiz em plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado. Valores expressos em Log<sub>2</sub> Foldchange.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Unidade amostral e caracterização da comunidade de rizobactérias

Dentre os diversos fatores que podem estar envolvidos em respostas diferenciais de espécies de plantas à escassez hídrica citam-se o próprio genótipo do hospedeiro, o manejo da cultura e o solo. As análises de *fingerprint* de DNA com primers randômicos (CARVALHO *et al.*, 2019) mostraram que o porta-enxerto de todas as plantas coletadas apresentaram *fingerprint* semelhante ao do citrumelo Swingle (dados não mostrados), reforçando se tratar da mesma variedade de porta-enxerto para todas as plantas amostradas. Também, o talhão de citros no qual as plantas foram selecionadas esteve sob o mesmo padrão de manejo adotado na fazenda. Finalmente, a análise química do solo revelou uma homogeneidade de 87.5% entre os teores dos elementos entre as diferentes amostras (Tabela 1), enfatizando que as variações fenotípicas observadas nas plantas não estariam relacionadas a fatores químicos e/ou físicos do solo. Tais fatos suportam a hipótese da presença de BPCP como atenuadoras da deficiência hídrica em algumas plantas (Figura 1).

A ocorrência de períodos de estresse hídrico tem mostrado alterações abruptas nas alocações de carbono (C) nas plantas e no solo (ORAM *et al.*, 2023). Nas plantas a alocação do C no sistema radicular por meio da exsudação é a maior fonte de energia da microbiota rizosférica e alterações na exsudação provavelmente tem impacto na composição e funcionamento da comunidade microbiana (Williams e Vries, 2020). Portanto, o maior compartilhamento de gêneros bacterianos na estação chuvosa entre as plantas com diferentes fenótipos de deficiência hídrica visto no presente trabalho estaria associado a maior dispersão de carbono no solo em função da lâmina de água e intensidade de exsudados radiculares (Figura 3). A prevalência do filo *Proteobacteria* e a presença do gênero *Pseudomonas* em todas as condições de amostragem (Figuras 5 e 6) são comuns a rizobactérias de citros nas mais diferentes condições de cultivo (Cherni *et al.* 2019; Penyalver *et al.* 2022; Srivastava *et al.* 2022). O filo *Proteobacteria* mostrou-se susceptível ao estresse hídrico quando colonizando gramíneas (Oram *et al.*, 2025), em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 5), onde observou-se uma drástica diminuição da abundância deste gênero nas plantas com fenótipo de estresse hídrico acentuado

amostrada durante o período de seca. Por outro lado, nestas condições, em geral houve um aumento na frequência do filo *Firmicutes* em concordância com Bazany, *et al* (2022) que relatou o aumento na abundância desse filo em plantas de beterraba e milho submetidas a estresse hídrico. A nível de gênero o aumento da frequência de *Bacillus* está em concordância com Kavamura *et al.* (2013) e Santos-Medellín *et al.* (2017) que demonstraram aumento na frequência deste gênero sob condições de estresse hídrico. Interessantemente, um maior número de gêneros bacterianos foi significativamente encontrado nas plantas com fenótipos de estresse hídrico acentuado, independentemente do período de amostragem (Figura 7, Figuras S1 e S2). Embora não avaliado, pressupõe-se que alterações na exsudação no sistema radicular destas plantas possam ter contribuído para um recrutamento de um maior número de gêneros bacterianos, porém, estes, não necessariamente com atividades funcionais claramente responsivas a melhoria da tolerância da planta ao estresse hídrico. A própria condição de estresse ou competição entre as bactérias poderia ter levado a esta neutralidade na resposta. Ainda mais intrigante é a presença significativa e única do gênero *Citrobacter* no sistema radicular das plantas com fenótipo de estresse moderado (Figura 7). Embora este gênero esteja a problemas de saúde humana (JABEEN *et al.* 2022), uma espécie (*Citrobacter werkmanii*) foi associada a efeitos benéficos em plantas sob condições de estresse (AJIMAL *et al.* 2022). Apesar desta variação em termos de número de gêneros entre as condições experimentais, a riqueza e a equitabilidade (*Shannon index*) não foi significativamente diferente, exceto para as das amostras coletadas no período chuvoso, com destaque para o alto valor do índice na condição do hospedeiro com fenótipo de estresse acentuado (Figura 4A). É conhecido que períodos de estresse hídrico influenciam a composição da comunidade microbiana (Oram *et al.*, 2025) levando a uma redução de diversidade microbiana do solo (Xie *et al.* 2021). Porém, com um aumento da riqueza (*richness*) após sucessivos períodos de estresse hídrico (de Souza *et al.*, 2024). De acordo com Bazany, *et al* (2022), mudanças na comunidade microbiana da rizosfera sob estresse da seca dependem da influência da planta hospedeira e do solo circundante. No presente trabalho sugere-se que esta maior diversidade de rizobactérias em plantas com fenótipo de estresse hídrico acentuado provavelmente seja em função de exsudados liberados no sistema radicular destas plantas. A maior diversidade microbiana, por vezes, associada a um sistema mais resiliente, pode sinalizar um microbioma desbalanceado ou em estado de transição, contrastando com

a comunidade mais coesa observada em plantas com estresse moderado. A interação entre a planta e seu microbioma pode se tornar desbalanceada sob condições extremas de estresse, como a seca (FITZPATRICK, *et al.*, 2019; ORAM *et al.*, 2025) e funcionalmente menos coesa, o que pode resultar em uma resposta fisiológica mais desorganizada, refletindo o fenótipo observado. Igualmente obtido para outras culturas e condições (WANG & ZHOU, 2024; GEORGE *et al.*, 2024), uma clara estruturação da comunidade rizosférica em função do ambiente e do hospedeiro foi observado (Figura 4B).

De acordo com Penyalver *et al.* (2022), o microbioma global da rizosfera cítrica é composto principalmente pelos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Cupriavidus*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Cellvibrio*, *Sphingomonas*, *Variovorax* e *Paraburkholderia*. Além disso, Srivastava *et al.* (2022) realizaram uma análise abrangente da composição estrutural e funcional do microbioma da rizosfera cítrica em diferentes regiões biogeográficas de seis continentes, revelando que a composição do microbioma central da rizosfera cítrica inclui, predominantemente, os gêneros *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cellvibrio*, *Cupriavidus*, *Mesorhizobium*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Variovorax*. No presente estudo, todos esses gêneros foram encontrados no microbioma rizosférico total, presentes em todas as condições amostrais, com exceção do gênero *Cellvibrio*, que não foi detectado na amostra com estresse hídrico acentuado durante a coleta na época seca. A prevalência gênero *Pseudomonas* em todas as condições amostrais (Figura 6) vem ser similar aos resultados de Penyalver, *et al* (2022), que observaram dominância deste gênero em amostras de rizosfera de citrus coletadas na Espanha. Também, Cherni *et. al* (2019) observaram dominância do gênero *Pseudomonas* na microbiota isolada de plantas cítricas em solo semi-árido na região de Sidi bouzid na Tunísia.

Por fim, a abundância relativa da comunidade recuperada em laboratório revelou variações no padrão de distribuição dos gêneros entre os diferentes fenótipos de estresse hídrico e épocas de coleta (Figura 10). Assim como na comunidade do solo rizosférico, o gênero *Pseudomonas* foi dominante em todas as condições avaliadas. No contexto de estresse moderado durante a estação seca os gêneros *Staphylococcus*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium* e *Stenotrophomonas* destacaram-se, apresentando maior abundância absoluta nessas amostras (Tabela S1). Dentre esses gêneros, dados de literatura mostraram que *Stenotrophomonas*

conferiu tolerância ao estresse hídrico. Segundo Kasim *et al.* (2022), a inoculação com a cepa *Stenotrophomonas maltophilia* B11 foi capaz de reduzir os danos induzidos pela seca em plantas de trigo, aumentando o teor relativo de água nas folhas, atividade de enzimas antioxidantes e acúmulo de prolina. Dentre esses gêneros, *Chryseobacterium* e *Staphylococcus* apresentaram diferença significativa na análise de abundância diferencial da comunidade metataxonômica, sendo considerados biomarcadores dessas amostras.

## 6.2. Caracterização *in vitro*

Na somatória dos resultados de todos os testes realizados *in vitro*, os isolados oriundos de amostras de plantas de estresse hídrico moderado coletados na época seca se destacaram em quatro dos sete testes realizados sendo; fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de AIA e detecção do gene *dACC* (Tabela 4). Esses mecanismos são amplamente descritos na literatura como estratégias microbianas eficazes na mitigação do estresse hídrico em plantas. Microrganismos fixadores de nitrogênio, por exemplo, aumentam a disponibilidade desse nutriente essencial em condições adversas (DING *et al.*, 2018). Em relação à solubilização de fosfato, estudos demonstram que rizobactérias como *Bacillus polymyxa* são capazes de aumentar a disponibilidade de fósforo no solo e, conseqüentemente, promover o desenvolvimento radicular e a tolerância ao estresse hídrico, como observado em plantas de tomate submetidas à seca, que apresentaram acúmulo elevado de prolina como resposta adaptativa (SHINTU & JAYARAM, 2015). A produção de ácido indolacético (AIA) estimula o crescimento de raízes, ampliando a exploração do solo por água e nutrientes (VURUKONDA *et al.*, 2016). Além disso, a presença do gene *dACC*, responsável pela produção da enzima ACC desaminase, contribui para a redução dos níveis de etileno, hormônio associado à resposta ao estresse, favorecendo a manutenção do crescimento vegetal sob déficit hídrico (GLICK, 2014). Dessa forma, a expressão dessas características pode ter desempenhado um papel fundamental na adaptação das plantas a condições de seca, resultando em um fenótipo moderado frente a deficiência hídrica.

Nos testes de produção de sideróforos e biofilme não houve um claro domínio quanto a origem dos isolados (Tabela 4). No entanto, os isolados obtidos de plantas com severo fenótipo de estresse hídrico coletados na época de chuva destacaram-se

na produção de sideróforos. No teste de biofilme, os melhores resultados foram obtidos em amostras pertencentes ao estresse moderado na época chuvosa, composto majoritariamente por representantes do gênero *Pseudomonas*.

Já o teste de estresse hídrico *in vitro* foi dominado pelos isolados pertencentes a amostras com estresse acentuado na época seca. Racionalmente, espera-se que bactérias que estavam presentes na rizosfera de plantas sob deficiência hídrica tenham maior resistência a maior pressão osmótica. Possivelmente, o microambiente da rizosfera de plantas com estresse acentuado seja diferente daquele observado em plantas com estresse moderado, talvez menos favorável do ponto de vista microbiológico, o que poderia selecionar microrganismos mais adaptados à limitação hídrica. Já nas rizosferas associadas a plantas com estresse moderado, o ambiente poderia ser relativamente mais estável, favorecendo comunidades microbianas que não necessitam ativar mecanismos intensos de tolerância à seca. Ainda não está claro o que poderia gerar essas diferenças de microambiente, considerando que todas as plantas estavam submetidas às mesmas condições ambientais.

### **6.3. Caracterização *in vivo***

O aumento na velocidade de germinação de sementes promovido por algumas rizobactérias é um indicativo de que essas podem atuar, direta ou indiretamente, na ativação de processos metabólicos relacionados à germinação. Dentre esses mecanismos, destaca-se a produção de fitormônios como o ácido indolacético (AIA), que atua na promoção do crescimento radicular e no alongamento celular. Stroschein *et al.* (2011) demonstraram que rizóbios isolados de nódulos de alfafa, identificados como *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium* sp., foram capazes de produzir quantidades expressivas de AIA e promoveram o aumento na velocidade de germinação e no desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. Esses resultados reforçam o papel funcional dessas bactérias na regulação do crescimento vegetal por meio da síntese de fitormônios. Dentre os isolados avaliados, destacaram-se principalmente aqueles oriundos de plantas com estresse hídrico moderado, com ênfase para o isolado *Variovorax* (IAC 132), que apresentou o maior valor observado. O gênero *Variovorax* já é conhecido na literatura como potencializados do aumento de germinação de sementes. Flores-Duarte, *et al* (2022) observaram aumento do índice de velocidade de germinação e aumento de biomassa em plantas de alfafa inoculadas com

*Variovorax*. Do mesmo modo os resultados obtidos por Acuña, *et al.* (2024) mostraram que a germinação e desenvolvimento inicial foram potencializados em sementes de trigo inoculadas com bactérias do gênero *Variovorax*. Ainda com relação ao teste de germinação, diversos isolados foram capazes de promover o aumento da biomassa e da porcentagem de água nas raízes das plântulas, em comparação ao controle não inoculado. De maneira geral, isolados provenientes de plantas sob estresse hídrico moderado apresentaram maior eficiência na promoção do acúmulo de biomassa. Por outro lado, no parâmetro de retenção de água nas raízes, observou-se um desempenho positivo entre isolados de ambos os fenótipos avaliados

Os resultados obtidos em casa de vegetação evidenciam que isolados bacterianos foram capazes de promover o aumento do volume radicular, área de superfície, comprimento e número de pontas de raízes, quando comparados ao controle não inoculado. Esse efeito é um indicativo de que os microrganismos avaliados possuem características benéficas associadas à promoção do crescimento vegetal, possivelmente relacionadas à produção de fitormônios, solubilização de nutrientes ou mecanismos indiretos, como indução de tolerância a estresses. Dentre os isolados avaliados, destacam-se *Pseudomonas* (IAC 98) e *Variovorax* (IAC 132), que promoveram aumento em três parâmetros distintos do sistema radicular. O isolado *Pseudomonas* (IAC 98), oriundo de plantas sob estresse moderado, promoveu aumento de volume, comprimento e a área de superfície das raízes. O gênero *Pseudomonas* é amplamente descrito na literatura como promotor de crescimento. Chu *et al.* (2020) demonstraram que a inoculação com a cepa *Pseudomonas* PS01, isolada da rizosfera de milho, promoveu alterações significativas na arquitetura do sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*, incluindo o aumento no comprimento das raízes e no número de raízes laterais. Além do efeito positivo do isolado *Variovorax* (IAC 132), este também germinação das sementes, houve contribuição deste para o incremento do volume, área de superfície e do número de pontas das raízes, evidenciando sua atuação abrangente tanto nas fases iniciais quanto nos estágios mais avançados do desenvolvimento das plantas. Jiang *et al.* (2012) observaram que a inoculação da estirpe 5C-2 de *Variovorax paradoxus* melhorou a absorção de nutrientes e o desenvolvimento do sistema radicular em plantas de ervilha (*Pisum sativum*) em campo.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram que os diferentes fenótipos das plantas de estresse hídrico e as condições sazonais pode ser fatores determinantes na composição da comunidade microbiana rizosférica do porta-enxerto citrumelo 'Swingle'. A comunidade bacteriana associada às plantas sob deficiência hídrica e com fenótipo severo apresentou maior diversidade alfa, enquanto a comunidade coletada durante a época chuvosa exibiu maior similaridade na composição, independentemente do nível de estresse hídrico das plantas. A análise diferencial de abundância revelou a presença de microrganismos específicos associados a cada condição hídrica, destacando potenciais bioindicadores de adaptação ao estresse.

Todas as comunidades bacterianas analisadas apresentaram isolados com pelo menos uma característica promotora de crescimento. Os isolados obtidos de plantas com fenótipo moderado de deficiência hídrica coletado durante a época seca foram os que apresentaram os maiores índices de relacionados as BCPP testados *in vitro* (4 de 7), sugerindo estar diretamente relacionadas à mitigação do estresse hídrico. Esses isolados também apresentaram desempenho superior nos testes de germinação de sementes, reforçando seu potencial como agentes benéficos para o desenvolvimento vegetal. Dessa forma, este estudo contribui para a compreensão da interação entre a microbiota rizosférica e as condições ambientais, além de abrir perspectivas para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas à sustentabilidade agrícola em cenários de deficiência hídrica.

## 8. LITERATURA CITADA

- ACUÑA, J. *et al.* Variovorax sp. strain P1R9 applied individually or as part of bacterial consortia enhances wheat germination under salt stress conditions. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, p. 2070, 2024.
- AHLUWALIA, O., SINGH, P. C., & BHATIA, R. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. **Resources, Environment and Sustainability**, v. 5, p. 100032, 2020.
- AJMAL, A. W. *et al.* Heavy metal-resistant plant growth-promoting citrobacter werkmanii strain WWN1 and enterobacter cloacae strain JWM6 enhance wheat (*Triticum aestivum* L.) growth by modulating physiological attributes and some key antioxidants under multi-metal stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 815704, 2022.
- ALI, S. *et al.* Deciphering the plant microbiome to improve drought tolerance: mechanisms and perspectives. **Environmental and Experimental Botany**, v. 201, p. 104933, 2022.
- ARMANHI, J.S.L.; DE SOUZA, R.S.C.; DE ARAÚJO, L.M., *et al.* Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. **Sci Rep**, v. 6, p. 1–9, 2016.
- ARMANHI J. S. L, DE SOUZA R. S. C., DAMASCENO N. B., *et al.* A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. **Front Plant Sci**, v. 8, p. 1–17, 2018.
- ARMANHI, J. S. L.; SOUZA, R. S. C.; BIAZOTTI, B. B.; YASSITEPE, J. E. D. C. T.; ARRUDA, P. Modulating drought stress response of maize by a synthetic bacterial community. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, article 747541, 2021.
- BAZANY, Kathryn E. *et al.* Water deficit affects inter-kingdom microbial connections in plant rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 3722-3734, 2022.
- BRESSON, J. *et al.* The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved

- drought tolerance in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 200, n. 2, p. 558–569, 2013.
- BRIC, J.M., BOSTOCK, R.M., SILVERSTONE, S.E., SILVERSTONET, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 57, p. 535–538, 1991.
- CALLAHAN; B.J., MCMURDIE P.J., HOLMES S.P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal.**; v. 11, n. 12, p. 2639-2643, 2017.
- CAMELE, I.; ELSHAFIE, H. S.; CAPUTO, L.; SAKR, S. H.; DE FEO, V. *Bacillus mojavensis*: biofilm formation and biochemical investigation of its bioactive metabolites. **Journal of Biological Research**, v. 92, n. 1, p. 39–45, 2019.
- CANDIDO, V. *et al.* Growth and yield promoting effect of artificial mycorrhization combined with different fertiliser rates on field-grown tomato. **Italian Journal of Agronomy**, v. 8, n. 3, p. e22, 2013.
- CARVALHO, S. A. *et al.* Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, p. e-422, 2019.
- CARVALHO, M.S., ANDRADE, A. C., GUILHERME, D. O., MARQUES, R. R. Utilização de Stimulate® para germinação de sementes de porta-enxerto de *Poncirus trifoliata*, variedade *Flying dragon*. **Revista agrária acadêmica**. v. 4, n. 3, p. 33-39, 2021.
- CASTRO, G. L. S. **Rizobactérias promovem crescimento, aliviam os efeitos do déficit hídrico e reduzem antracnose em mudas de açaizeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2018.
- CHERNI, M. *et al.* Soil parameters drive the diversity of *Citrus sinensis* rhizosphere microbiota which exhibits a potential in plant drought stress alleviation. **Applied Soil Ecology**, v. 135, p. 182-193, 2019.
- CHIANG, F., MAZDIYASNI, O. & AGHAKOUCHAK, A. Evidence of anthropogenic impacts on global drought frequency, duration, and intensity. **Nat. Commun.** v. 12, n. 2754, 2021.
- CHU, Thanh Nguyen; BUI, Le Van; HOANG, Minh Thi Thanh. *Pseudomonas* PS01 isolated from maize rhizosphere alters root system architecture and promotes plant growth. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 471, 2020.

- CHUKWUNEME, C. F. BABALOLA, O. O., KUTU, F. R., & OJUEDERIE, O. B. Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. **Journal of Plant Interactions**, v. 15, n. 1, p. 93–105, 2020.
- CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in Azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 2, p. 273-281, 2004.
- DE SOUZA, Y. P. A. *et al.* The effect of successive summer drought periods on bacterial diversity along a plant species richness gradient. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 100, n. 8, p. fiae096, 2024.
- DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 1, p. 1682–1694, 2009.
- DING, L. *et al.* Is nitrogen a key determinant of water transport and photosynthesis in higher plants upon drought stress?. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1143, 2018.
- DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. **Como Isolar E Identificar Bactérias Diazotróficas De Plantas não-leguminosas Brasília**, Embrapa-SP: Itaguaí Embrapa-CNPAB. pp. 60, 1995.
- DONOT, F. *et al.* Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.
- DWORKIN, M.; FOSTER, J. W. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. **Journal of bacteriology**, v. 75, n. 5, p. 592-603, 1958.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos**: Rio de Janeiro, v. 3, 2013.
- FADIJI, Ayomide Emmanuel; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 467, 2020.

- FAN, W. *et al.* Drought-induced recruitment of specific root-associated bacteria enhances adaptation of alfalfa to drought stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1114400, 2023.
- FITZPATRICK, Connor R.; MUSTAFA, Zainab; VILIUNAS, Joani. Soil microbes alter plant fitness under competition and drought. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 32, n. 5, p. 438-450, 2019.
- FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- FLORES-DUARTE, N. J. *et al.* Improved Medicago sativa nodulation under stress assisted by Variovorax sp. endophytes. **Plants**, v. 11, n. 8, p. 1091, 2022.
- FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biol. Fert. Soils**, v. 24, n. 4, p. 358-364, 1997.
- FUNDECITRUS. **Sumário executivo da safra de laranja 2021/22 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Araraquara: Fundecitrus, 2021.em: [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/2021\\_05\\_27\\_Executive\\_Summary\\_of\\_Orange\\_Crop\\_Forecast\\_for\\_the\\_2021-2022\\_Season.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2021_05_27_Executive_Summary_of_Orange_Crop_Forecast_for_the_2021-2022_Season.pdf) . Acesso em: 07 abr. 2025.
- FUNDECITRUS. **Estimativa da safra de laranja 2024/25 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: cenário em maio/2024**. Araraquara: Fundecitrus, 2024. Disponível em: [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes\\_relatorios/2024\\_05\\_10\\_Estimativa\\_do\\_Cinturao\\_Citricola\\_2024-2025.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2024_05_10_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2024-2025.pdf) . Acesso em: 08 abr. 2025.
- GEORGE, T. S. *et al.* Bottom-up perspective—The role of roots and rhizosphere in climate change adaptation and mitigation in agroecosystems. **Plant and soil**, v. 500, n. 1, p. 297-323, 2024.
- GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63-68, 1998.

- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.
- GONZALEZ, S. *et al.* Arabidopsis transcriptome responses to low water potential using high-throughput plate assays. **eLife**, v. 12, p. RP84747, 2024.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 37, p. 395-412, 2005.
- GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K., & SINGH, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2015.
- HOLOCHOVÁ, P. *et al.* Description of *Massilia rubra* sp. nov., *Massilia aquatica* sp. nov., *Massilia mucilaginoso* sp. nov., *Massilia frigida* sp. nov., and one *Massilia* genomospecies isolated from Antarctic streams, lakes and regoliths. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 126112, 2020.
- JABEEN, I. *et al.* A brief insight into *Citrobacter* species—a growing threat to public health. **Frontiers in Antibiotics**, v. 2, p. 1276982, 2023.
- JIANG, F. *et al.* Multiple impacts of the plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 18, p. 6421-6430, 2012.
- KASIM, W. A. *et al.* Enhancement of drought tolerance in *Triticum aestivum* L. seedlings using *Azospirillum brasilense* NO40 and *Stenotrophomonas maltophilia* B11. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 45, n. 1, p. 95, 2021.
- KAUSHAL, M., WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Ann. Microbiol**, v. 66, p. 35–42, 2016.
- KAVAMURA, V. N. *et al.* Soares. DMI, 2013. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. e73606.
- KUMAR, A., VERMA, J. P. Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? **Microbiológico Research**, v. 207, p. 41–52, 2018.

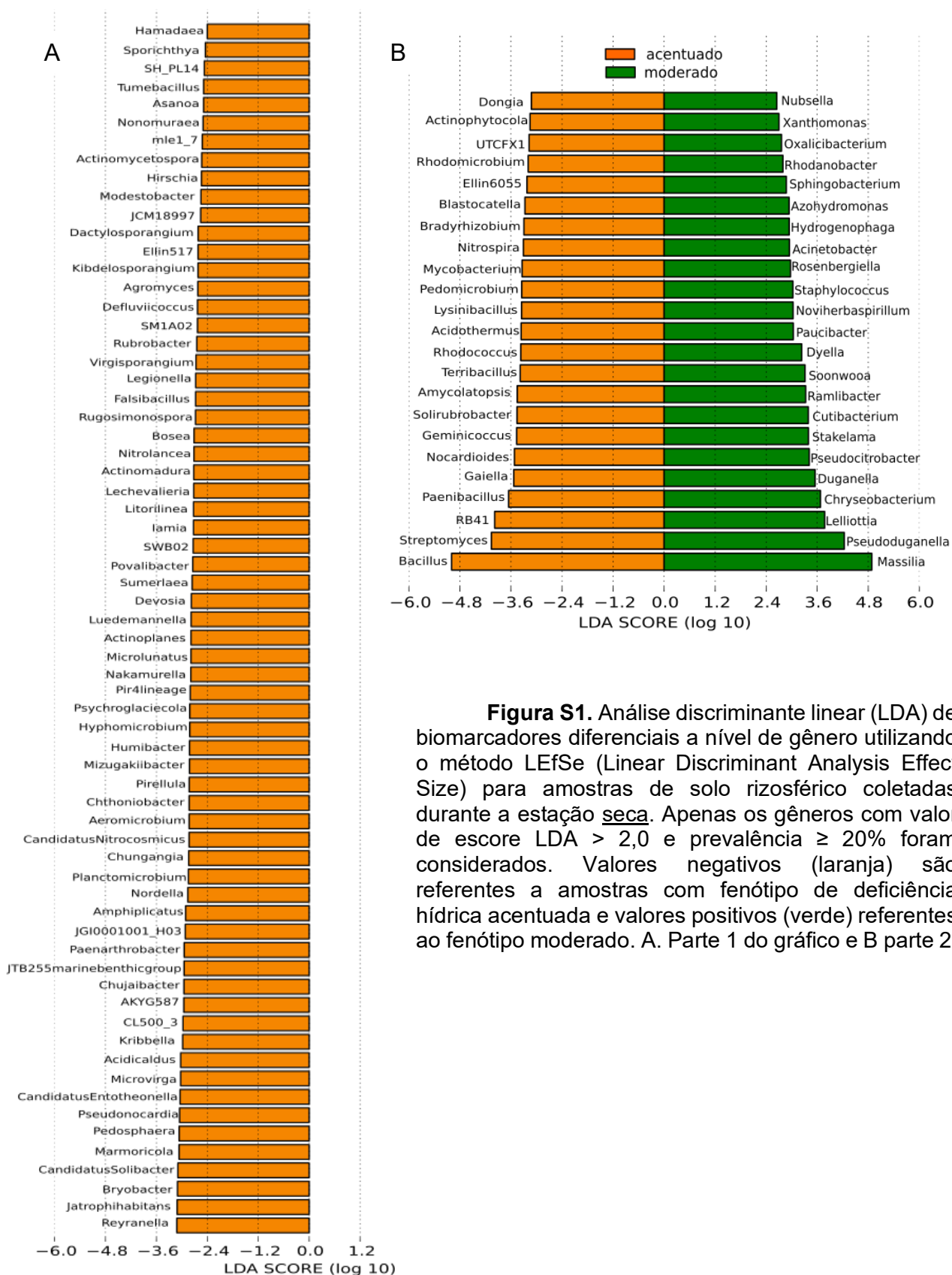
- LI, ZHENGYI *et al.* Differentiation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC deaminase. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 10, p. 112, 2015.
- MARTINS, Samuel J. *et al.* The use of synthetic microbial communities to improve plant health. **Phytopathology**, v. 113, n. 8, p. 1369-1379, 2023.
- MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J.H.; PICENO, Y.M.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p.1097-100, 2011.
- MCMURDIE, P. J., & HOLMES, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.
- MIRANSARI, M. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n. 14, p. 2227-2235, 2014.
- MORAES, J. B. **Áreas suscetíveis à desertificação no Brasil e projeções para cenários de mudanças climáticas**. Dissertação (Mestrado em práticas e desenvolvimento sustentável). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.
- NADEEM, Sajid Mahmood *et al.* The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 429-448, 2014.
- NDEHEDEHE, C. E.; FERREIRA, V. G.; ADEYERI, O.E.; CORREA, F.M.; USMAN, M.; OUSSOU, F.E.; KALU, I.; OKWUASHI, O.; ONOJEGHUO, A.O.; GETIRANA, A; DEWAN, A. Global assessment of drought characteristics in the Anthropocene, **Resources, Environment and Sustainability**, v. 12, n.100105, 2023.
- NGUMBI, Esther; KLOEPPER, Joseph. Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 109-125, 2016.
- OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P. R., O'HARA, R. B.; OKSANEN, M. J. Package 'vegan'. **Community ecology package**, version, v. 2, n. 9, p. 1-295, 2013

- ORAM, N. J. *et al.* Plant community composition and traits modulate the impacts of drought intensity on soil microbial community composition and function. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 200, p. 109644, 2025.
- ORAM, N. J. *et al.* Drought intensity alters productivity, carbon allocation and plant nitrogen uptake in fast versus slow grassland communities. **Journal of Ecology**, v. 111, n. 8, p. 1681-1699, 2023.
- OU, Y.; PENTON, C.R.; GEISEN, S.; *et al.* Deciphering Underlying Drivers of Disease Suppressiveness Against Pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Front Microbiol**, v.10, p.1–12, 2019.
- PENYALVER, Ramón *et al.* From the bacterial citrus microbiome to the selection of potentially host-beneficial microbes. **New Biotechnology**, v. 70, p. 116-128, 2022.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W.H. VAN DER. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.
- POMPEU JUNIOR, J.; SALVA, R.; BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. *Laranja*, v.25, p.413-422, 2004
- PORTO, E. M. V.; TEIXEIRA, F. A.; FRIES, D. D.; JARDIM, R. R.; AMARO, H. T. R.; SANTOS FILHO, J. R.; SANTOS, J. P. dos; JESUS, F. M.; SILVA, H. S.; VIEIRA, T. M. Plant growth-promoting microorganisms as mitigators of water stress in pastures: a narrative review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, 2022.
- PRADHAN, S.; TYAGI, R.; SHARMA, S. Combating biotic stresses in plants by synthetic microbial communities: Principles, applications and challenges. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 5, p. 2742-2759, 2022.
- SALOMON, M. V.; BOTTINI, R.; SOUZA FILHO, G. A. de; COHEN, A. C.; MORENO, D.; GIL, M.; PICCOLI, P. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 4, p. 359-374, 2014.

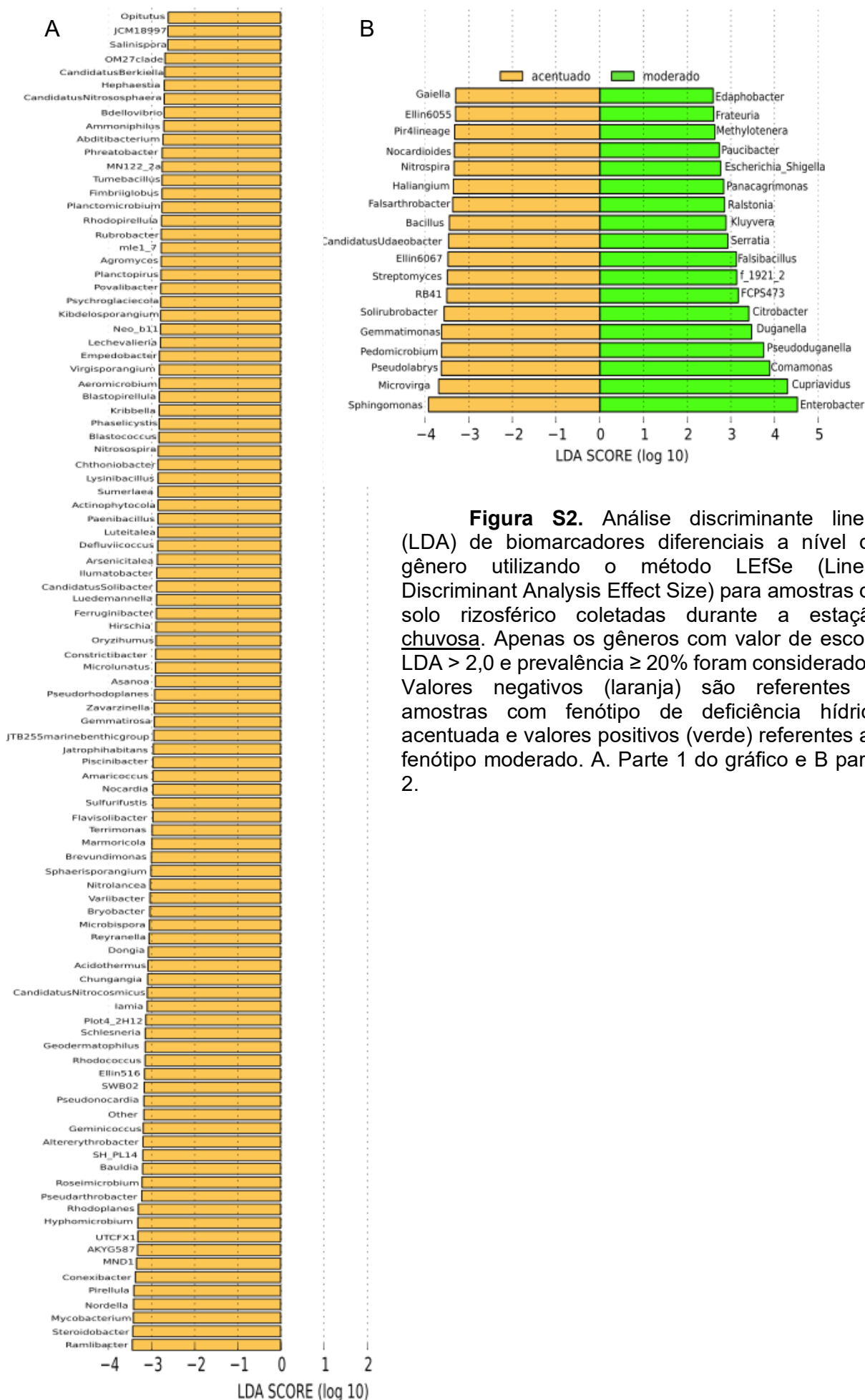
- SANTOS-MEDELLÍN, Christian et al. Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes. **MBio**, v. 8, n. 4, p. 10.1128/mbio.00764-17, 2017.
- SARAVANAKUMAR, D.; KAVINO, M.; RAGUCHANDER, T. *et al.* Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. **Acta Physiol Plant**, v.720, n. 33, p. 203–209, 2011.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.
- SHINTU, P. V.; JAYARAM, K. M. Phosphate solubilising bacteria (*Bacillus polymyxa*)- An effective approach to mitigate drought in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Trop. Plant Res**, v. 2, n. 1, p. 2349-9265, 2015.
- SRIVASTAVA, A. K. *et al.* Bioprospecting microbiome for soil and plant health management amidst Huanglongbing threat in citrus: A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 858842, 2022.
- STROSCHEIN, M. R. D. *et al.* Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Ciência Rural*, v. 41, p. 1738-1743, 2011.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., & MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.
- TARIQ, A. *et al.* Engineering Synthetic Microbial Communities: Diversity and Applications in Soil for Plant Resilience. **Agronomy**, v. 15, n. 3, p. 513, 2025.
- TSOLAKIDOU, M.D.; STRINGLIS, I. A.; FANEGA-SLEZIAK, N. *et al.* Rhizosphere-enriched microbes as a pool to design synthetic communities for reproducible beneficial outputs. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 95, p. 1–14, 2019.
- VANDENKOORNHUYSE, P.; QUAISER, A.; DUHAMEL, M.; LE VAN, A. E.; DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, p. 1196–1206, 2015.
- VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13-24, 2016.
- XIE, Jianbo et al. Drought stress triggers shifts in the root microbial community and alters functional categories in the microbial gene pool. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 744897, 2021.

- XU, Z. *et al.* Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. **Current microbiology**, v. 73, p. 474-482, 2016.
- WANG, S.; OUYANG, L.; JU, X. *et al.* Survey of Plant Drought-Resistance Promoting Bacteria from *Populus euphratica* Tree Living in Arid Area. **Indian J Microbiol**, v. 54, p. 419–426, 2014.
- WANG, Y.; ZOU, Q. Deciphering microbial adaptation in the rhizosphere: Insights into niche preference, functional profiles, and cross-kingdom Co-occurrences. **Microbial Ecology**, v. 87, n. 1, p. 74, 2024.
- WILLIAMS, A.; DE VRIES, F. T. Plant root exudation under drought: implications for ecosystem functioning. **New Phytologist**, v. 225, n. 5, p. 1899-1905, 2020.
- YARYURA, P. M. *et al.* Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. **Current microbiology**, v. 56, n. 6, p. 625–632, 2008.
- ZHENG, B.X., BI, Q.F., HAO, X.L., ZHOU, G.W., YANG, X.R. *Massilia phosphatilytica* *sp. nov.*, a phosphate solubilizing bacteria isolated from a long term fertilized soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 67, 2514–2519, 2017

## APÊNDICES



**Figura S1.** Análise discriminante linear (LDA) de biomarcadores diferenciais a nível de gênero utilizando o método LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) para amostras de solo rizosférico coletadas durante a estação seca. Apenas os gêneros com valor de escore LDA > 2,0 e prevalência ≥ 20% foram considerados. Valores negativos (laranja) são referentes a amostras com fenótipo de deficiência hídrica acentuada e valores positivos (verde) referentes ao fenótipo moderado. A. Parte 1 do gráfico e B parte 2.



**Tabela S1.** Abundância absoluta dos gêneros obtidos no sequenciamento das rizobactérias isoladas de plantas com diferentes níveis de deficiência hídrica coletadas na época seca e chuvosa.

Gênero	Coleta seca		Coleta chuva		Total
	Estresse moderado	Estresse acentuado	Estresse moderado	Estresse acentuado	
<i>Achromobacter</i>	7	5	4	0	16
<i>Acinetobacter</i>	7	0	3	10	20
<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	0	11	0	0	11
<i>Atlantibacter</i>	2	0	1	1	4
<i>Azorhizophilus</i>	1	0	0	1	2
<i>Bacillus</i>	1	5	5	22	33
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0	0	0	1	1
<i>Chryseobacterium</i>	6	0	7	10	23
<i>Citrobacter</i>	1	0	0	1	2
<i>Comamonas</i>	1	1	0	2	4
<i>Cupriavidus</i>	1	0	0	0	1
<i>Ensifer</i>	1	1	1	0	3
<i>Escherichia/Shigella</i>	0	1	0	1	2
<i>Falsochrobactrum</i>	0	0	0	1	1
<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	3	3
<i>Herbaspirillum</i>	0	0	0	1	1
<i>Klebsiella</i>	0	1	1	5	7
<i>Kluyvera</i>	1	0	0	0	1
<i>Kosakonia</i>	2	0	0	0	2
<i>Lelliottia</i>	4	1	4	0	9
<i>Lysinibacillus</i>	0	1	0	0	1
<i>Microbacterium</i>	0	11	0	0	11
<i>Methylobacterium</i>	0	0	9	0	9
<i>Novosphingobium</i>	0	2	0	0	2
<i>Orrella</i>	0	1	0	0	1
<i>Paucibacter</i>	0	2	0	0	2
<i>Providencia</i>	1	0	0	0	1
<i>Pseudocitrobacter</i>	2	0	0	0	2
<i>Pseudomonas</i>	50	38	42	67	197

<i>Rhodococcus</i>	0	0	1	0	1
<i>Serratia</i>	0	0	0	1	1
<i>Siccibacter</i>	3	2	1	0	6
SN8	0	0	0	1	1
<i>Sphingobacterium</i>	0	0	0	1	1
<i>Sphingobium</i>	0	3	0	0	3
<i>Staphylococcus</i>	45	0	1	0	46
<i>Stenotrophomonas</i>	8	1	3	8	20
<i>Variovorax</i>	1	16	4	0	21
<i>Viridibacillus</i>	0	0	1	3	4
<i>Yokenella</i>	0	0	0	1	1

**Tabela S2.** Gêneros exclusivos identificados em cada amostra obtidos a partir do isolamento bacteriano.

Coleta seca		Coleta chuva	
Estresse moderado	Estresse acentuado	Estresse moderado	Estresse acentuado
<i>Pseudocitrobacter</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>Falsibacillus</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Kluyvera</i>	<i>Lysinibacillus</i>	SN8	<i>Rhodococcus</i>
<i>Kosakonia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Providencia</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Falsochromobacterium</i>	
	<i>Orrella</i>	<i>Herbaspirillum</i>	
	<i>Paucibacter</i>	<i>Serratia</i>	
		<i>Yokenella</i>	