

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS JABOTICABAL

**ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E MILHO NA
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO: UMA ABORDAGEM
ANTIOXIDANTE**

Mirela Vantini Checchio

Bióloga

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E MILHO NA
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO: UMA ABORDAGEM
ANTIOXIDANTE**

Mirela Vantini Checchio

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Lupino Gratão

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2019

C514a

Checchio, Mirela Vantini

Associação entre *Azospirillum brasilense* e milho na tolerância ao estresse salino: uma abordagem antioxidante / Mirela Vantini

Checchio. -- Jaboticabal, 2019

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Priscila Lupino Gratão

1. Estresse abiótico. 2. Salinidade dos solos. 3. Bactéria diazotrófica. 4. Milho. 5. Enzimas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E MILHO NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO: UMA ABORDAGEM ANTIOXIDANTE

AUTORA: MIRELA VANTINI CHECCHIO

ORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO 
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ANDRESSA PERES BINI 
Centro de Cana-Instituto Agronômico-IAC / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO 
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mirela Vantini Checchio, nasceu em 16 de Outubro de 1991 na cidade de Jaboticabal, São Paulo. Ingressou no ano de 2012 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, obtendo os títulos de Bacharel em Ciências Biológicas (2015) e Licenciatura em Ciências Biológicas (2017). Em agosto de 2017 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na mesma universidade (FCAV/UNESP), dedicando-se ao estudo do metabolismo antioxidante de resposta a estresses abióticos em plantas cultivadas desde 2014 sob a orientação da docente Priscila Lupino Gratão.

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas
se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos
erguem desdenhosamente a cabeça para o céu,
enquanto que as cheias as baixam para a terra,
sua mãe.”*

Leonardo da Vinci

Dedicatória

Aos meus Pais,

fonte de ensinamentos dos valores mais genuínos,

Por todo amor e apoio irrestrito.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me conceder a vida com infinita bondade e amor, guiar meus passos e me permitir vivenciar momentos inesquecíveis.

À minha orientadora Priscila, por toda dedicação, conhecimentos e conversas compartilhados ao longo desses cinco anos. Mas, acima de tudo, pela pessoa amiga e inspiradora que é.

À minha querida irmã Michele, pela nossa união e afeto inigualáveis. E pelo meu afilhado Murilo, que sorri com os olhos e me renova de amor e esperança a cada dia.

À minha família, por todo amor e torcida ao longo do caminho. Em especial as minhas tias (Regina e Ednéia) e Mônica pelas orações e cuidado.

Soninha, pelo abraço e carinho que conforta em qualquer momento que poderia “beirar ao caos”.

Aos companheiros que fazem parte da rotina no Laboratório de Fisiologia Vegetal, sempre dispostos a ouvir e ajudar: Kevein, Leticia, Emilaine, Reginaldo, Clebson, Rafael, Carol, Ricardo, Jeferson, Noelle, Milena e Kolima. E a todos que por lá passaram. Em especial, Rita de Cássia, por me auxiliar não só na condução do experimento, mas sim por dividir conhecimentos e me ensinar indiretamente sobre determinação.

Gilmar, pelo companheirismo diário no laboratório, dose de autenticidade emanada e conselhos únicos. E principalmente, pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou.

Mayara, pela amizade e sintonia em vários âmbitos da vida.

Roberta, Fran e Marina Gavassi, pelos desabafos e palavras de conforto nos momentos de aflição e por serem a prova viva de que a amizade nunca foi uma questão de presença física.

Fernanda e Talita, por apoiarmos umas às outras ao longo desses anos e pelos momentos que são infindáveis na memória.

Aos meus amigos do “Glorinha” (eterna Bio 012) que guardo no coração. E a todos os outros que aqui não mencionei por nome, mas que marcaram minha vida em alguma etapa, deixando um pouquinho de si e contribuindo de alguma forma.

Aos colegas e professores da Pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos, conversas e parcerias ao longo do percurso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho,

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A Cultura do Milho: aspectos morfológicos, socioeconômico e fisiológicos	3
2.2 Efeito da salinidade nas plantas	5
2.3 Mecanismos de defesa perante o estresse salino.....	7
2.4 Impactos da salinidade e adubação nitrogenada nos sistemas de produção agrícolas	8
2.5 Uso de bactérias diazotróficas: <i>Azospirillum brasilense</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Condução do experimento.....	12
3.2. Análise de massa seca (MS)	13
3.3. Teor de clorofila e carotenóides.....	13
3.4. Determinação do conteúdo de Na ⁺	14
3.5. Determinação do acúmulo de N	14
3.6. Análise bioquímica	15
3.6.1. Peroxidação lipídica (MDA).....	15
3.6.2. Extração de proteínas e determinação enzimática	15
3.6.3. Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	15
3.6.4. Glutathione Redutase (GR, EC 1.8.1.7)	16
3.6.5. Glutathione Peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9)	16
3.6.6. Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7).....	16
3.7. Análise estatística	17
4. RESULTADOS	17
4.1. Clorofila total e Carotenóides.....	17
4.2. Peroxidação Lipídica – malondialdeído (MDA).....	18
4.3. Enzimas Antioxidantes.....	20
4.3.1. Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	20
4.3.2. Glutathione redutase (GR, EC 1.8.1.7)	22
4.3.3. Glutathione peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9).....	24
4.3.4. Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7).....	25

4.4. Determinação de Na ⁺	27
4.5. Quantificação do acúmulo de N.....	28
4.6. MS dos tecidos vegetais.....	30
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

ASSOCIAÇÃO ENTRE *Azospirillum brasilense* E MILHO NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO: UMA ABORDAGEM ANTIOXIDANTE

RESUMO - Devido às intensas mudanças climáticas globais e atividades antropogênicas, a salinidade tornou-se uma das principais problemáticas limitantes à produção agrícola. Para lidar com essa problemática, o estudo de genótipos e cultivares que sejam tolerantes ao sal, bem como alternativas através de inoculantes torna-se cada vez mais necessário. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta antioxidante através da inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho, e correlacionar a atividade destas enzimas ao aumento na capacidade da planta em tolerar o estresse ocasionado pela salinidade. Os tratamentos foram formados pela combinação de cloreto de sódio (0 e 100 mM de NaCl) via água de irrigação e ausência e presença do inóculo de *A. brasilense*, sendo o experimento conduzido inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os resultados demonstraram diferentes respostas de acordo com as análises de peroxidação lipídica (MDA), quantificação de nitrogênio (N) e sódio (Na⁺), massa seca (MS) e atividades enzimáticas, como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2), guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) e glutathiona peroxidase (GSH-PX, EC. 1.11.1.9). Os resultados mostraram que 100 mM de NaCl ocasionou peroxidação lipídica, com conseqüente aumento do teor de MDA. Entretanto, com a presença da bactéria nesta condição, o teor de MDA foi reduzido, houve aumento do acúmulo de N e as enzimas apresentaram diferenças significativas entre si, com aumentos significativos para GSH-PX e GPOX. Nossos dados sugerem que a presença de *A. brasilense* no milho sob estresse salino pode conferir tolerância a planta e que esta tolerância está relacionada ao sistema de defesa antioxidante, principalmente de GSH-PX e GPOX.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, Estresse abiótico, Indução de tolerância salina, *Zea mays* L.

ASSOCIATION BETWEEN *Azospirillum brasilense* AND MAIZE ON TOLERANCE TO SALINE STRESS: AN ANTIOXIDANT APPROACH

ABSTRACT - Due to intense global climate change and anthropogenic activities, salinity has become one of the main problems limiting agricultural production. To deal with this problem, the study of genotypes and cultivars that are salt tolerant and alternatives through inoculants becomes increasingly necessary. The main of this work was to characterize an antioxidant response through the inoculation of *Azospirillum brasilense* in maize and to correlate the activity of the enzymes with the salt-stress tolerance. The experiment was carried out in a completely randomized design with four replications. The treatments were performed by combination of sodium chloride (0 and 100 mM NaCl) through irrigation water and absence and presence of *A. brasilense* inoculation. Overall results showed different responses according to lipid peroxidation (MDA), nitrogen (N) and Na⁺ contents, dry mass (DM) and enzymatic activities, such as superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) and glutathione peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9). The results showed were that 100 mM NaCl caused lipid peroxidation with consequent increases in MDA content. However, MDA content was reduced and antioxidant enzymes demonstrated significant differences in the presence of the bacteria. Our data suggest that *A. brasilense* may confer plant tolerance in maize to salt stress and acquired tolerance can be related to the antioxidant system, mainly GSH-PX and GPOX.

Keywords: Abiotic stress, Diazotrophic bacterias, Salt tolerance induction, *Zea mays* L.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre o teor de Clorofila Total (A) e Carotenóides (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).18
- Figura 2.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre o conteúdo de MDA nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).20
- Figura 3.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima SOD nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).22
- Figura 4.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GR nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).23
- Figura 5.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GSH-PX nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).25
- Figura 6.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GPOX nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).26
- Figura 7.** Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre o acúmulo de Na^+ nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).28

Figura 8. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre o acúmulo de N nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).....29

Figura 9. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a MS nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).31

1. INTRODUÇÃO

Devido as intensas mudanças climáticas globais e atividades antropogênicas, incluindo práticas de irrigação, a qualidade das terras agrícolas vem sendo afetadas, especialmente pelo aumento da deposição de sal no solo. Desse modo, a salinidade tornou-se um dos principais estresses abióticos que acomete a produtividade e o desenvolvimento de inúmeras culturas mundialmente (Liang et al., 2018).

Sob salinidade, o principal efeito decorrente nas plantas é o estresse osmótico, ocasionado por um desbalanço de íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), afetando instantaneamente a captação de água e outros nutrientes e conseqüentemente o crescimento vegetal (Liang et al., 2018). Posteriormente, quando os níveis de sal atingem um limiar além do qual a planta pode tolerar, ocorre a toxicidade iônica, causando desequilíbrios iônicos através de um intenso influxo de Na^+ (Wu et al., 2017).

Ambas as etapas são reconhecidas como estresses primários e que podem suceder a outras tensões secundárias, à exemplo tem-se o estresse oxidativo que é ocasionado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Gratão et al., 2015; Liang et al., 2018), transcorrendo em danos na membrana citoplasmática e uma série de disfunções em processos metabólicos essenciais (Wang et al., 2017).

Para atenuar as ERO, as enzimas antioxidantes desempenham uma importante resposta nos mecanismos de defesa das plantas perante a salinidade. Algumas enzimas que compõem essa linha de defesa são bem reconhecidas, sendo a superóxido dismutase (SOD, EC, 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.15.1.1), glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2), guaiacol peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7), glutathiona peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9), entre outras (Gratão et al., 2015; Alves et al., 2018). Além disso, mecanismos não enzimáticos também são bem elucidados, envolvendo o ascorbato (AsA), glutathiona (GSH), prolina, flavonóides, alcalóides e carotenóides (Foyer e Noctor, 2013; Gratão et al., 2015).

Uma vez sob estresse salino, a sinalização em cascata é desencadeada e o sistema antioxidante de defesa é constantemente estimulado para lidar com o dano oxidativo. Essa capacidade antioxidante tem sido demonstrada em vários trabalhos, a fim de se obter uma comparação da tolerância à salinidade entre diferentes cultivares (Ashraf et al., 2015; Khalid et al., 2017; Radhakrishnan e Baek, 2017).

O milho (*Zea mays* L.) é intensamente afetado por fatores abióticos e considerado moderadamente sensível ao estresse salino (Ayers e Westcot, 1999), refletindo negativamente em seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, por ser uma das culturas economicamente mais importantes do mundo, exige uma alta demanda de nitrogênio (N) para manter sua produtividade (Caires e Milla., 2016). Com isso, fertilizantes fosfatados são constantemente utilizados, não contribuindo para uma abordagem ecológica sustentável (Hungria et al., 2011), além do alto custo para o produtor.

Alguns estudos foram desenvolvidos visando estratégias de manejo para suprir a demanda de N pelas plantas, onde obtiveram resultados positivos com a prática de inoculação de bactérias diazotróficas, dentre elas a *Azospirillum brasilense* (Hungria, 2011; Portugal et al., 2016), bem reconhecidas por sua capacidade de fixação biológica de N e por promover o crescimento em algumas culturas (Fukami et al., 2016). Resultados satisfatórios foram encontrados como uma melhor arquitetura das raízes e rendimento de grãos (Portugal et al., 2016; Pii et al., 2019), produção de hormônios vegetais (Pereira et al., 2015) e, recentemente estudos voltados para a indução de genes associados à defesa de plantas na tolerância ao estresse (Fukami et al., 2017).

Como uma nova proposta dentro do estudo envolvendo o efeito da associação de bactérias diazotróficas associadas ao milho, a potencialização do sistema antioxidante de resposta poderia estar associada a esta interação, tornando estas plantas mais tolerantes a situações ambientais adversas, como a salinidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta antioxidante através da inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho e correlacionar a atividade destas enzimas ao aumento na capacidade da planta em tolerar o estresse ocasionado pela salinidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura do Milho: aspectos morfológicos, socioeconômico e fisiológicos

O milho (*Zea mays* L.), pertencente à família Poaceae ou Gramineae é uma espécie originária das terras altas do México, expandindo-se posteriormente para as Américas, Europa e Ásia através das relações comerciais (Gong et al., 2015). Sua domesticação a longo prazo modificou o formato de suas origens para uma morfologia atual moderna, bem diferente de sua forma antiga selvagem (teosinte). Atualmente, seu cultivo é possibilitado em climas tropicais, subtropicais e temperados, graças a sua grande adaptabilidade por vários genótipos existentes (CONAB, 2018).

O grão do milho é classificado como fruto e constituído por amido, carboidratos e sua parte mais externa – aleurona – rica em proteínas e enzimas. Com relação ao sistema radicular, o milho possui raiz do tipo fasciculada com grande desenvolvimento, sendo compostas por raízes primárias que são desintegradas após o surgimento das raízes secundárias, as quais apresentam uma grande capacidade de ramificação nos solos. Por fim, surgem as raízes adventícias que partem dos primeiros nós do colmo e quando atingem o solo ramificam-se intensamente, garantindo a sustentação física da planta (Barros e Calado, 2014; CONAB, 2018)

O milho é uma planta monóica e protândrica que pode atingir cerca de até 2 metros de altura, com variação de porte em função do próprio híbrido e das condições edafoclimáticas. A parte aérea constitui-se pela inflorescência feminina que gera a espiga, pela inflorescência masculina, exibindo função de sustentação foliar e das partes florais e pelo caule, como órgão de reserva, armazenador de

sacarose. As folhas por sua vez, são estreitas e dispostas nos nós alternadamente, compondo-se por uma bainha invaginante, estreita e de forma lanceolada, com bordo serrilhados e nervura central vigorosa (Barros e Calado, 2014).

Com relação aos aspectos socioeconômicos é notório como uma das culturas de grande relevância e impacto econômico mundial, sendo o terceiro cereal mais importante do mundo (Farooq et al., 2015). Graças ao seu elevado potencial produtivo, valor nutricional e composição química de seus grãos que é responsável por abastecer diversos setores de produção, seja alimentício (cerca de 70% do milho destina-se para alimentação de suínos e aves), biocombustíveis e industrial (Jiang et al., 2017; Souza et al., 2015). No Brasil, a cultura do milho constitui-se como uma das mais importantes atividades do cenário agrícola, sendo cultivada em todos os estados da Federação e comercializado principalmente na forma de grão (Aguiar et al., 2012). Desse modo, o Brasil encontra-se consolidado como terceiro maior produtor mundial e segundo maior exportador (CONAB, 2018).

No entanto, apesar de figurar entre os maiores produtores, o Brasil está muito aquém no que diz respeito à produtividade, visto que seus níveis são baixos quando comparados aos dois maiores produtores mundiais (EUA e China). Dados obtidos pelo USDA indicaram decréscimo do volume de produção da safra de 2017/2018 com relação à anterior. Isso se deve principalmente as mudanças climáticas ocasionadas na época, ao decréscimo de área plantada e conseqüentemente a crescente demanda desses setores para abastecer a população, devido ao elevado consumo pelo brasileiro (CONAB, 2018).

Por outro lado, graças aos avanços da tecnologia, melhoramento e manejo de culturas e dos programas convencionais de reprodução híbrida possibilitou que muitos países alcançassem níveis de produção relevantes (Okumura et al., 2011). Tratando-se dos aspectos fisiológicos, a cultura do milho desempenha uma melhor resposta em solos bem estruturados, com favorável circulação hídrica e do ar, possibilitando uma melhor captação água e nutrientes. É uma cultura exigente em água, mas também é muito eficiente em sua utilização, produzindo uma quantidade de matéria seca muito superior a ademais culturas (Bergamashi et al., 2004).

Outro principal requisito na cultura que interfere em seu desenvolvimento e produtividade é associado a disponibilidade de N. Na planta, o N é o elemento mais influente na produtividade do milho (DeBruin et al, 2017), pois está relacionado a processos essenciais do metabolismo primário, como síntese de proteína, absorção iônica, fotossíntese entre outros, atuando assim, nas moléculas de aminoácidos e proteínas (Okumura et al., 2011). No entanto, a cultivar exige uma elevada quantidade desse nutriente (Caires e Milla, 2016), não sendo suprido totalmente pelo solo. Com isso, para o desenvolvimento da cultura, comumente faz-se o uso de adubação nitrogenada, pois, além de complementar a insuficiência do N, o nutriente ainda proporciona um dos efeitos mais ressaltantes no aumento da produção de grãos, beneficiando também o desenvolvimento da planta (Okumura et al., 2011).

O ciclo produtivo da cultura do milho é negativamente impactado a uma combinação de vários fatores de estresses bióticos e/ou abióticos, responsáveis por perturbações no estado fisiológico normal da planta. Embora pertença ao grupo de plantas com metabolismo fotossintético do tipo C4 sendo consideradas mais eficientes que as plantas C3 na fixação de carbono, diferentes estresses podem gerar efeitos diretos no balanço de carbono e na eficiência de enzimas importantes nessa fixação (pepcase e rubisco). No caso do estresse salino, são observados efeitos deletérios sobre vários parâmetros fisiológicos desde a germinação de sementes até a iniciação floral na cultivar (EMBRAPA, 2004; Liang et al., 2014).

2.2 Efeito da salinidade nas plantas

Os efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento das plantas submetidas a condições salinas podem ser de natureza osmótica, iônica ou oxidativa (Munns e tester, 2008; Kronzucker et al., 2013). Quando os íons dissolvidos no solo entram em contato com o sistema radicular, o primeiro efeito decorrente da salinidade é relacionado à ajustes osmóticos, alterando o balanço hídrico da planta,

em virtude da diminuição do potencial osmótico do solo e conseqüente redução do potencial hídrico (Munns e Tester, 2008; Sabir et al., 2009 Abdelgawad et al., 2016). Os efeitos bem documentados nesse contexto além do fechamento estomático, são a diminuição da turgescência e da expansão foliar (Zhu, 2011).

À medida que os íons Na^+ e Cl^- são absorvidos excessivamente, além do qual a planta consegue tolerar, podem ser ocasionados distúrbios fisiológicos e nutricionais (Hasegawa et al., 2000; Kronzucker et al., 2013; Kiani et al., 2017), perturbações na integridade e funcionalidade da membrana celular e aparato fotossintético (Wu et al., 2017), bem como inativação de enzimas importantes envolvidas em processos essenciais no metabolismo vegetal (Kiani et al., 2017).

O desequilíbrio de íons intracelular ocorre devido os íons Na^+ competir pelos mesmos sítios de absorção e transporte dentro da planta com outros nutrientes, como K^+ , Ca^{2+} , N, P (Wang et al., 2017). Desse modo são bem documentados os efeitos relacionados a uma inibição mais lenta do crescimento, deficiências nutricionais e senescência. Além disso, quando em excesso nos solos esses sais podem ocasionar malefícios indiretos, pois pode haver a formação de complexos entre o Cl^- e cátions como Pb^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} , aumentando assim a disponibilidade de metais tóxicos para as plantas (Almaroai et al., 2014).

O estresse ocasionado pela salinidade também leva a ruptura da homeostase iônica nas células dos vegetais, resultando em dano oxidativo, ou seja, em estresse oxidativo e outros estresses secundários (Liang et al., 2018; Xiong et al., 2018), por conseguinte levando à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Zhu, 2016), tais como superóxido (O_2^-), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\cdot) (Gratão et al., 2005; Gill e Tuteja, 2010).

Uma vez sob estresse salino é desencadeada uma cascata de sinalização em que o sistema antioxidante de defesa é constantemente estimulado para lidar com as lesões oxidativas. Essa capacidade antioxidante vem sendo muito estudada em diversas pesquisas a fim de se obter um comparativo da tolerância salina entre cultivares (Ashrafi et al., 2015; Kiani-Poya, 2015).

2.3 Mecanismos de defesa perante o estresse salino

Após desencadeado a sinalização para as células em decorrência do estresse salino, são ativados sinais secundários em que aumenta-se os níveis de Ca^{2+} dentro da célula podendo suceder em uma reação de fosforilação, ativando proteínas envolvidas na defesa celular. Desse modo, decorre-se uma fase de adaptação das plantas perante o estresse, sendo mediado através de fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes de resposta a esse estresse (Liang et al, 2018). A tolerância ao sal não se refere apenas em tolerar à toxidez do Na^+ pela planta, mas sim a um ajustamento aos seus efeitos secundários.

Além do fechamento estomático, são bem descritos o acúmulo de osmólitos e aumento da atividade de Na^+/H^+ (Kronzucker et al., 2013). Com relação ao ajuste osmótico, envolvido principalmente na fase osmótica, é um fator crítico para manter o turgor da célula visando a manutenção da atividade metabólica pela planta. Desse modo, elas podem sintetizar osmólitos compatíveis como prolina, glicina, betaína e açúcares solúveis para promover esse equilíbrio osmótico no nível celular (Hannachi e Van Labeke., 2013).

A resposta das plantas contra os efeitos deletérios das ERO ocorre através de um sistema de defesa que compreende antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Abbas et al., 2017) capazes de agir contra essas espécies e interromper cascatas de oxidação descontrolada nas células tanto sob condições normais, como quando estimuladas por eventos de estresse (Czarnocka e Karpinski, 2018). Algumas das enzimas antioxidantes presentes nessa linha de defesa enzimática incluem a SOD, APX, CAT, GR, GPOX, GSH-PX entre outras peroxidases (Gratão et al., 2015; Alves et al., 2018). O ácido ascórbico (AsA), tocoferóis, polifenóis e carotenoides compreendem os antioxidantes não enzimáticos (Sharma et al., 2012).

A SOD é reconhecida como a primeira enzima antioxidante a compor a linha de defesa enzimática contra as ERO, atuando na dismutação de ânions superóxido

em excesso nas células (Sharma et al., 2012; Gratão et al., 2015). Em angiospermas, pode ser caracterizada sob três isoformas encontradas em distintas localidades (Yan et al., 2017), sendo nas mitocôndrias e peroxissomos, preferencialmente encontrada a manganês SOD (Mn-SOD) (Ueda et al., 2013), nos cloroplastos a ferro SOD (Fe-SOD) e a cobre/zinco SOD (Cu/Zn-SOD) predominante no citosol, cloroplastos e peroxissomos (Jozefczak et al., 2015).

Sob condições normais do metabolismo celular, as ERO produzidas no cloroplasto são reduzidas a H_2O_2 e O_2 pela SOD, posteriormente o H_2O_2 e seus derivados são removidos ou reduzidos por outras enzimas atuantes, como a APX, CAT, GR ou GPX (Wang et al., 2016). A APX é uma das principais enzimas atuantes nessa remoção do H_2O_2 . A CAT, encontrada principalmente nos peroxissomas vegetais, também é uma das principais enzimas, juntamente com a APX em remover o H_2O_2 . No entanto, elas diferem na sua forma de remoção, pois a CAT requer um substrato redutor (Foyer e Noctor, 2013).

Além disso, para a desintoxicação do H_2O_2 , fitofenólicos também podem agir como antioxidantes pela doação de elétrons para a GPOX. As peroxidases são hemoproteínas que catalisam a oxidação do substrato juntamente à redução do H_2O_2 . O ciclo GPX gera glutathiona reduzida (GSH) da glutathiona oxidada (GSSG) através da GR usando NAD(P)H como agente redutor (Roychoudhury et al., 2015).

Essas enzimas que compõem esses sistemas antioxidantes nas plantas podem responder sendo ativadas em distintos compartimentos subcelulares, dependendo de outros quesitos também, como estágio de desenvolvimento do vegetal, intensidade do estresse e interação com outras moléculas (Sharma et al., 2012). Um aumento da atividade desses sistemas pode ser visto como um dos mecanismos para tolerância ao estresse.

2.4 Impactos da salinidade e adubação nitrogenada nos sistemas de produção agrícolas

O sódio é reconhecido globalmente como o sexto elemento mais abundante, sua deposição no solo acarreta solos salinos, ocupando estes cerca de 8% da superfície da Terra que estão em constante desenvolvimento (Haijiboland, 2013), sendo assim, a salinização um processo natural e contínuo. Porém, tal desenvolvimento também está aliado as mudanças climáticas globais e atividades antropogênicas, principalmente as práticas de irrigação, considerando-a à uma das principais problemáticas limitantes à produção agrícola e afetando cerca de 45 milhões de hectares de terra irrigada (Tavares Filho et al., 2012; Jayakannam et al., 2015).

A problemática das práticas de manejo inadequadas como a irrigação e drenagem nos sistemas agrícolas estão relacionados também a preocupante escassez de recursos hídricos, sendo 1/3 da área global desses recursos atingidas por sais (Payen et al., 2016). No Brasil, os estados de Pernambuco, Ceará e Paraíba tem suas áreas cobertas por altas concentrações de sódio nos solos (Tavares Filho et al., 2012).

Com esse cenário progressivo da salinização que poderá comprometer mais terras aráveis nos próximos 25 anos, e levando em consideração o crescimento exponencial populacional (Melorose et al., 2015), aumentar a produção de alimentos por área através de um sistema de produção mais sustentável, torna-se um desafio preocupante (Soares et al., 2018). Mundialmente, 52% da alimentação da população é dependente de cereais (FAO, 2015).

Estudos mostram com relação a produtividade nos anos de 2005/2007, os volumes de produção terão que sofrer um aumento de 60% para suprir a demanda de alimentos para a população até 2050 (Van Ittersum et al., 2013). Regiões áridas e semiáridas são preocupantes nesse sentido, pois ocupam 40% da área terrestre e são comumente afetadas pelo estresse salino (Abdul Qados, 2011).

No cultivo de leguminosas alimentares por exemplo, a salinidade pode reduzir significativamente o conteúdo de aminoácidos totais, carboidratos, proteínas, porcentagem de óleo e polissacarídeos em decorrência da redução da fotossíntese, estresse osmótico e desequilíbrio de íons e nutrientes (Farooq et al., 2019). Além disso, a sobrevivência na cadeia alimentar de organismos em níveis tróficos

superiores, como herbívoros e predadores também são afetados, visto que o estresse salino pode alterar a química da planta hospedeira (Awmack and Leather, 2006).

Outra problemática comumente vista nos sistemas de produção agrícola é com relação a dependência do uso de fertilização nitrogenada. Sua ausência no manejo de culturas, principalmente em milho, arroz e trigo implica na redução do abastecimento da alimentação para menos da metade da população mundial atual (Connor, 2008). No entanto, embora a utilização de fertilização química favoreça o desenvolvimento e rendimento de culturas (Sun et al., 2015), seu uso intensivo torna-se cada vez mais alarmante, visto que mais de 100 milhões de toneladas de N são produzidas industrialmente utilizando-se fontes de energia fósseis, não contribuindo em uma abordagem ecológica favorável.

Alguns autores relatam que além dos impactos negativos como compactação do solo e escoamento de nutrientes (Yang et al., 2015) a fertilização intensiva de N resultou na diminuição da diversidade bacteriana do solo (Liu e Greaver, 2010; Sun et al., 2015; Zeng et al., 2016). Não há um consenso entre os autores com relação a isso, alguns mencionam que não afeta diretamente as taxas de bactérias, já outras pesquisas (citadas anteriormente) ressaltam tal diminuição. Mais pesquisas são necessárias para uma melhor elucidação do tema.

Segundo Ladha et al (2016), para contornar essa problemática da dependência de fertilizantes nitrogenados no cultivo do milho, duas alternativas são relevantes, sendo uma delas a aplicação de bactérias diazotróficas para atuarem na fixação de N.

2.5 Uso de bactérias diazotróficas: *Azospirillum brasilense*

Os efeitos benéficos dos microrganismos sobre o crescimento das plantas já são bem documentados. Dentre esses microrganismos, o gênero *Azospirillum*

(classe Alphaproteobacteria), compreendem as bactérias diazotróficas associadas a gramíneas mais bem estudadas atualmente relacionadas a promoção do crescimento em plantas (Bashan e de-Bashan, 2010; Hungria, 2011; Cassán et al., 2014) apresentando capacidade de fixação biológica de N (Fukami et al., 2016).

A partir dessas descobertas isolando bactérias e identificando mecanismos promissores no crescimento de planta, tornou-se viável a inoculação de algumas cepas (por exemplo, Ab-V5 e Ab-V6) com viés comercial, intensificando assim as pesquisas nesse contexto para fins agrícolas (Cássan et al., 2016). Entre as principais espécies do gênero estão *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum halopraeferens* e *Azospirillum oryzae*, podendo este gênero ser associado a mais de 113 espécies vegetais de 35 famílias botânicas (Pereg et al., 2016).

Dentre as espécies que compõe o gênero, a *Azospirillum brasilense* destaca-se entre as de maior potencial podendo gerar diversos estímulos no crescimento das plantas, como no incremento na produção de grãos e gramíneas importantes no mercado agrícola sob condições ambientais adversas (MOREIRA et al., 2013). Também estão relacionadas a biossíntese e liberação de moléculas orgânicas e produção de hormônios vegetais (Pereira et al., 2015; Vejan et al., 2016), desenvolvimento acentuado da parte radicular (Kazi et al., 2016) e recentemente, na indução de genes associados a defesa da planta na tolerância ao estresse (Fukami et al., 2017, 2018).

Embora o aporte de informações genômicas sobre o gênero esteja crescendo, as respostas à inoculação ainda são inconsistentes, não havendo um consenso exato de como a *Azospirillum* interage inicialmente com o sistema radicular nas plantas, bem como os mecanismos relacionados nessa associação bactéria-planta (Gualpa et al., 2019). Mas, sabe-se que sua colonização e sobrevivência na rizosfera exibem estreita relação com a motilidade e quimiotaxia, possibilitando a locomoção em direção às raízes, logo, dos exsudados radiculares (fonte de carbono e energia).

Além disso, a *Azospirillum* possui flagelos polares que facilitam sua movimentação em direção ao ambiente mais favorável, desempenhando funções

também em vários processos de anexação na comunicação bactéria-planta (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). Após colonizado as raízes, podem interferir no metabolismo da planta tanto na disponibilidade de nutrientes e fitohormônios, auxinas (IAA) por exemplo, como na indução de respostas de defesa contra fitopatógenos (Glick 2012, Tortora et al., 2012).

Não há evidências que sugiram malefícios da associação de *Azospirillum* as plantas, sendo assim definida como uma relação de mutualismo das células da bactéria ao hospedeiro (Pereg et al., 2016). No entanto, os resultados positivos da associação planta-bactéria encontrados na literatura dependem dos fatores bióticos e abióticos (HUNGRIA, 2011).

Além disso, o efeito promotor do crescimento do *Azospirillum* pode não estar apenas relacionado a um único mecanismo, segundo a “Teoria do mecanismo Múltiplo” proposta por Bashan e Levanony, essas bactérias podem ter uma associação planta-bactéria positiva devido a vários fatores (Bashan e Levanony, 1990). Dessa forma, existem inúmeras lacunas impostas nessa associação, principalmente relacionados as inúmeras combinações entre as cepas bacterianas e suas espécies ou genótipos de plantas impostas nessa associação (Pereg et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Biologia Aplicado à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-UNESP). O

híbrido comercial de milho (2A401PW) foi adquirido pelo Departamento de Produção Vegetal da mesma Universidade (FCAV-UNESP). O experimento realizado foi em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os tratamentos foram formados pela combinação de cloreto de sódio (0 e 100 Mm de NaCl) e ausência e presença de inoculação de *A. brasilense*. A inoculação foi realizada inicialmente nas sementes e após 15 dias de semeadura foi feita uma segunda inoculação (via solo) nos tratamentos que receberam a inoculação da bactéria, onde também se iniciou a aplicação do NaCl (100 mM) via água de irrigação.

A semeadura foi realizada em vasos com capacidade 5 litros, contendo uma mistura comercial de substrato (Plantmax HT Eucatex, Brasil) e suplementadas com pó de coco de baixa condutividade elétrica ($1,1 \text{ dS m}^{-1}$) (Nunes, 2000, Amafibra®). Já a inoculação com *Azospirillum brasilense* foi realizada utilizando-se um produto comercial, contendo as cepas AbV5 e AbV6 (QualyFix Gramínea, Brasilquímica). As taxas de dosagem foram as recomendadas pelo fabricante e corresponderam a 100 mL por 25 kg de sementes para inoculação via sementes e 600 mL / ha para inoculação via solo. As plantas foram conduzidas até o estágio V5 com irrigação diária e uniforme. Ao final do experimento (32 dias) foi determinado o teor de clorofila e carotenoides, massa seca e acúmulo de Na^+ . As plantas de milho (raízes e folhas) foram coletadas, imediatamente lavadas, imersas em N_2 líquido e armazenada a -80°C para posterior análises de peroxidação lipídica, extração enzimática e determinação de proteínas totais e análises de sistemas antioxidantes.

3.2. Análise de massa seca (MS)

Os tecidos vegetais (raíz e parte aérea) foram coletados e armazenados em estufa por 72 horas à 70°C . A medida da massa seca foi realizada utilizando-se uma balança analítica com precisão de 0,01 g e os resultados expressos em g planta^{-1} .

3.3. Teor de clorofila e carotenóides

A quantificação do teor de clorofila e carotenoides foi realizada através da mensuração e adição de discos foliares em tubos contendo 80% de acetona na ausência de luz e mantidos por 48 horas sob refrigeração. Posteriormente, a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-640) nos seguintes comprimentos de onda: 663 nm (clorofila a), 647 (clorofila b) e 470 nm [carotenoides: caroteno (c) + xantofila (x)]. Os conteúdos de clorofila (chl) e carotenoides (car) foram calculados como descrito por Lichtenthaler (1987): $Chl = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647}$; $Cl\ b = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663}$; $Chl\ total\ a + b = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{647}$; $Carro\ c + x = (1000 A_{470} - 1,82 Chla - 85,02 Chlb) / 198$. A concentração de pigmento foi expressa em microgramas de pigmento por grama de peso fresco de tecido ($\mu g\ g^{-1}$ massa fresca).

3.4. Determinação do conteúdo de Na^+

Para a determinação do teor de sódio do material vegetal (raiz, folha), foi realizada a digestão com uma mistura de ácidos nítrico e perclórico (Carmo et al., 2000). As concentrações de Na^+ foram determinadas pelo método de espectrofotometria de emissão de chama utilizando um fotômetro de chama (Micronal - B462). As concentrações de Na^+ são expressas em $mg\ kg^{-1}$ de massa seca.

3.5. Determinação do acúmulo de N

A partir da massa seca dos tecidos vegetais, a moagem foi realizada e amostras foram obtidas para a determinação do acúmulo de N conforme método descrito por Miyazawa et al (1992).

3.6. Análise bioquímica

3.6.1. Peroxidação lipídica (MDA)

A peroxidação lipídica foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de equivalentes de malondialdeído (MDA) foi calculada usando um coeficiente de extinção de $1,55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com leituras entre 535 e 600 nm (Gratão et al. 2012). Os resultados são expressos em $\mu\text{mol} / \text{mg}^{-1}$ de massa fresca.

3.6.2. Extração de proteínas e determinação enzimática

Os tecidos vegetais coletados foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido e homogeneizados com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e 4% de polivinilpolipirrolidona insolúvel. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante a -80°C para uso nos ensaios enzimáticos (Azevedo et al., 1998). A quantificação de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.6.3. Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A determinação da atividade da enzima SOD ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) seguiu o protocolo desenvolvido por Giannopolitis e Ries (1977). O meio de ensaio foi composto por tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 50 mM de metionina, 10 mM de EDTA, 1 mM de cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT), 0,1 mM de riboflavina e por último o extrato vegetal. A solução foi colocada para reagir sob uma lâmpada fluorescente a 25°C por 5 minutos. A reação resultou na formação do composto de formazana azul e a absorbância foi lida no comprimento de onda de 560 nm.

3.6.4. Glutationa Redutase (GR, EC 1.8.1.7)

A atividade de GR ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi determinada a partir de uma mistura de tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) e 500 μl de DTNB em banho-maria a 30°C. Antes da leitura, GSH oxidado (1 mM), NADPH (0,1 mM) e o extrato (50 μl) foram adicionados (Cakmak e Horst, 1991). A absorbância foi lida no comprimento de onda de 412 nm.

3.6.5. Glutationa Peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9)

A atividade de GPX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi determinada em meio de reação com tampão fosfato de potássio (100 mM), EDTA (3 mM), 0,24 U GR / mL, GSH (10 mM) e azida sódica (1 mM). A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a reação foi catalisada pela adição de 1,5 mM de NADPH e 1,5 mM de H₂O₂. A oxidação foi monitorada durante 5 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM cm⁻¹ (Anderson e Davis, 2004).

3.6.6. Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7)

A atividade de GPOX foi determinada numa mistura contendo tampão fosfato-citrato pH 5,0 (fosfato de sódio dibásico 0,2 M: ácido cítrico 0,1 M), 0,5% de guaiacol e o extrato. Posteriormente a solução foi agitada em vortex com a adição de H₂O₂ e incubados a 30°C durante 15 minutos. A reação foi interrompida por transferência imediata para um banho de água gelada, seguida pela adição de 2% de solução de metabissulfito de sódio (Monteiro et al. 2011). A atividade foi avaliada monitorizando a absorbância no comprimento de onda de 450 nm.

3.7. Análise estatística

Todos os ensaios realizados no presente trabalho foram analisados por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa AGROESTAT (Barbosa e Júnior, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Clorofila total e Carotenóides

Com relação aos dados observados, ocorreu aumento no teor dos pigmentos nas plantas expostas ao sal independente da presença de *Azospirillum brasilense*, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 1). Exceto para carotenóides em que o tratamento NaCl + *A. brasilense* não apresenta diferença estatística quando comparado ao controle (Figura 1. B).

No entanto, para ambos os pigmentos, na presença de *Azospirillum brasilense* o teor é menor quando comparado as plantas estressadas não-inoculadas (NaCl). Houve decréscimo no teor dos pigmentos apenas quando as plantas estão inoculadas na ausência de NaCl (Controle + *A. brasilense*) (Figura 1.)

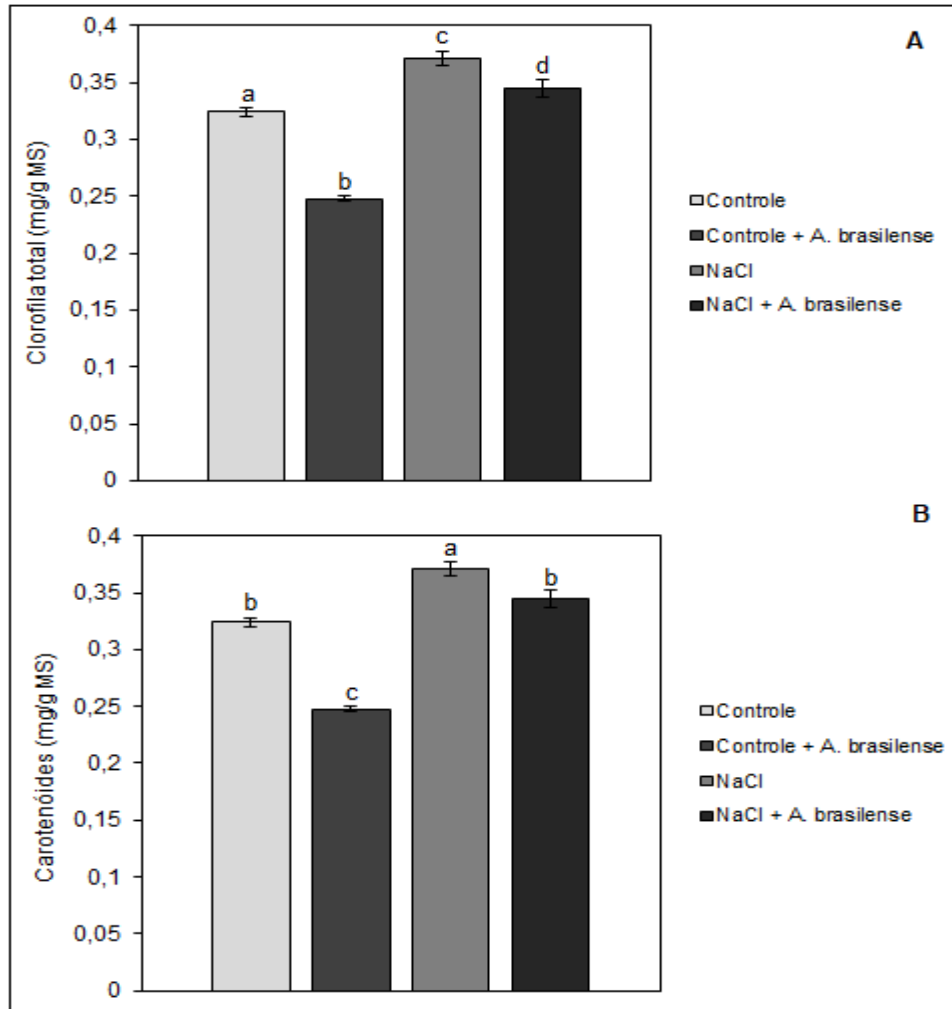


Figura 1. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre o teor de Clorofila Total (A) e Carotenóides (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

4.2. Peroxidação Lipídica – malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica, expressa como teor de MDA é um indicativo de dano na membrana. Com relação aos dados obtidos no sistema radicular (Figura 2. A), o

maior teor foi observado no tratamento exposto a salinidade sem inoculação, comparado aos demais tratamentos. Com relação a inoculação de *Azospirillum brasilense* na ausência (Controle + *A. brasilense*) e presença de sal (NaCl + *A. brasilense*), entre si não apresentaram diferença estatística. No entanto, quando comparados ao tratamento na condição salina (NaCl) exibiram diminuição nos teores de MDA.

Nas folhas (Figura 2. B), o teor de MDA também foi maior na condição salina (NaCl). No entanto, nas plantas inoculadas sob mesma condição esse teor é significativamente diminuído (NaCl + *A. brasilense*), sendo este teor menor que os demais tratamentos. Com relação a inoculação na ausência de salinidade (Controle + *A. brasilense*), não houve diferença estatística quando comparadas as plantas controle.

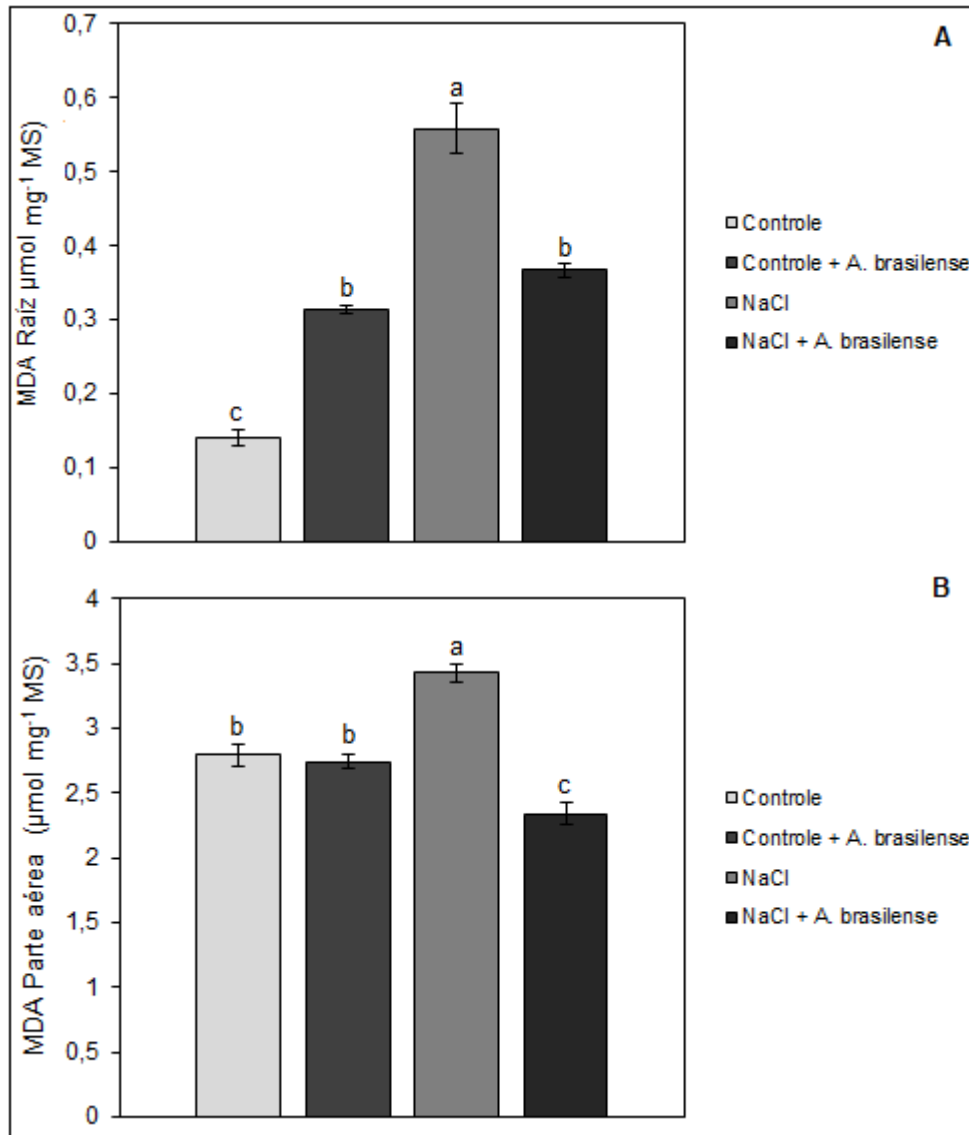


Figura 2. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre o conteúdo de MDA nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm \text{EP}$).

4.3. Enzimas Antioxidantes

4.3.1. Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Os dados referentes a SOD nas raízes (Figura 3. A), evidenciam que a inoculação de *Azospirillum brasilense* sob condição de estresse salino (NaCl + *A. brasilense*) exibiu um decréscimo significativo quando comparado aos demais tratamentos. No entanto, a presença da bactéria na ausência do estressor (Controle + *A. brasilense*) exibiu a maior atividade enzimática comparada aos demais tratamentos.

Com relação as folhas, os tratamentos se diferenciaram entre si, sendo observado o maior aumento da atividade de SOD no tratamento exposto ao sal e sem inoculação, seguido pelo tratamento não exposto ao sal e inoculado (Controle + *A. brasilense*). A menor atividade da enzima foi vista no tratamento em que havia NaCl e *Azospirillum brasilense* em conjunto (Figura 3. B).

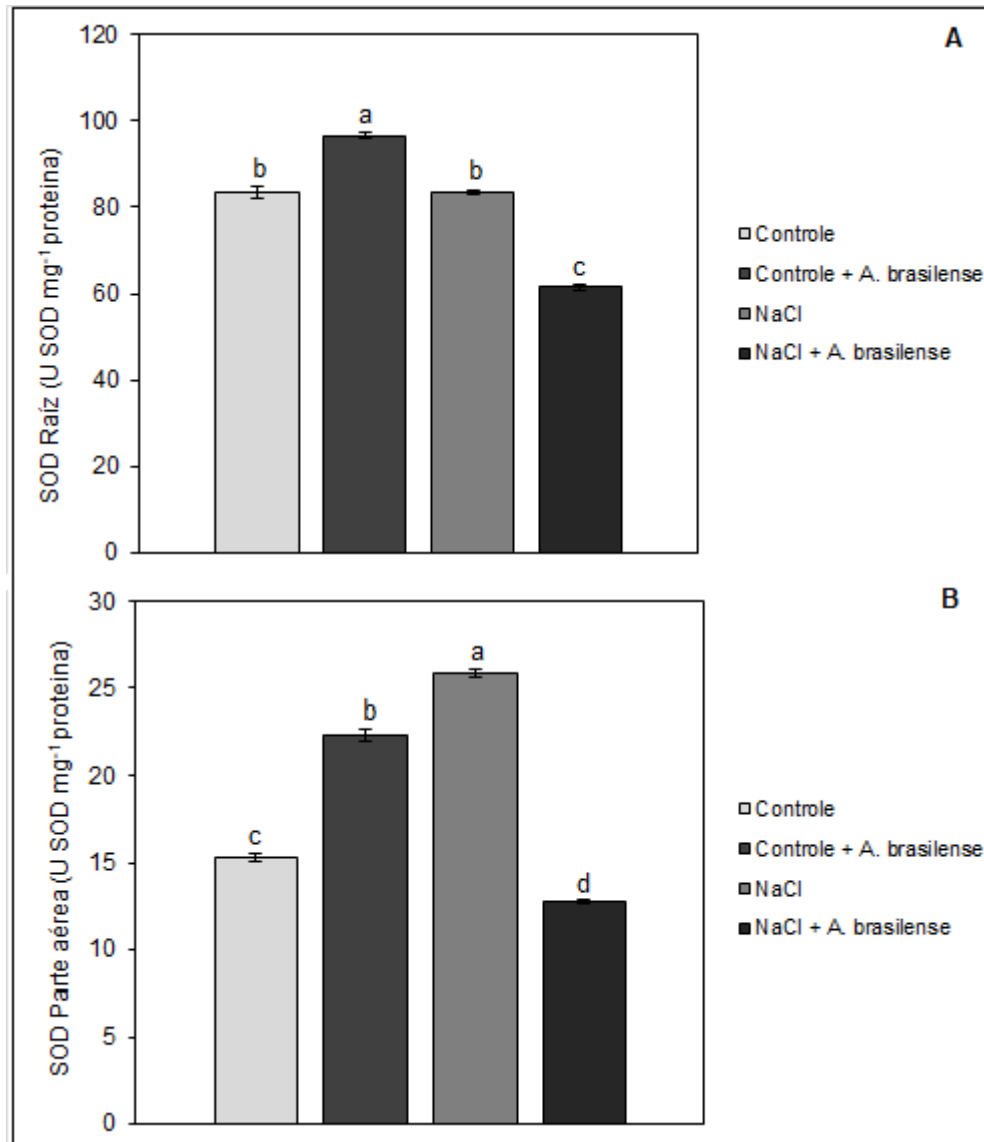


Figura 3. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima SOD nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

4.3.2. Glutationa redutase (GR, EC 1.8.1.7)

Os dados obtidos de GR na raiz (Figura 4. A) mostram que o aumento da atividade da enzima ocorreu apenas no tratamento em que as plantas foram expostas a salinidade e sem a inoculação de *Azospirillum brasilense*. Os demais

tratamentos não apresentaram diferença estatística. Nas folhas (Figura 4. B), os tratamentos diferiram entre si, sendo a maior atividade de GR observada no tratamento em que foi exposto ao NaCl e sem inoculação da bactéria, seguido pelo tratamento exposto ao NaCl e inoculado.

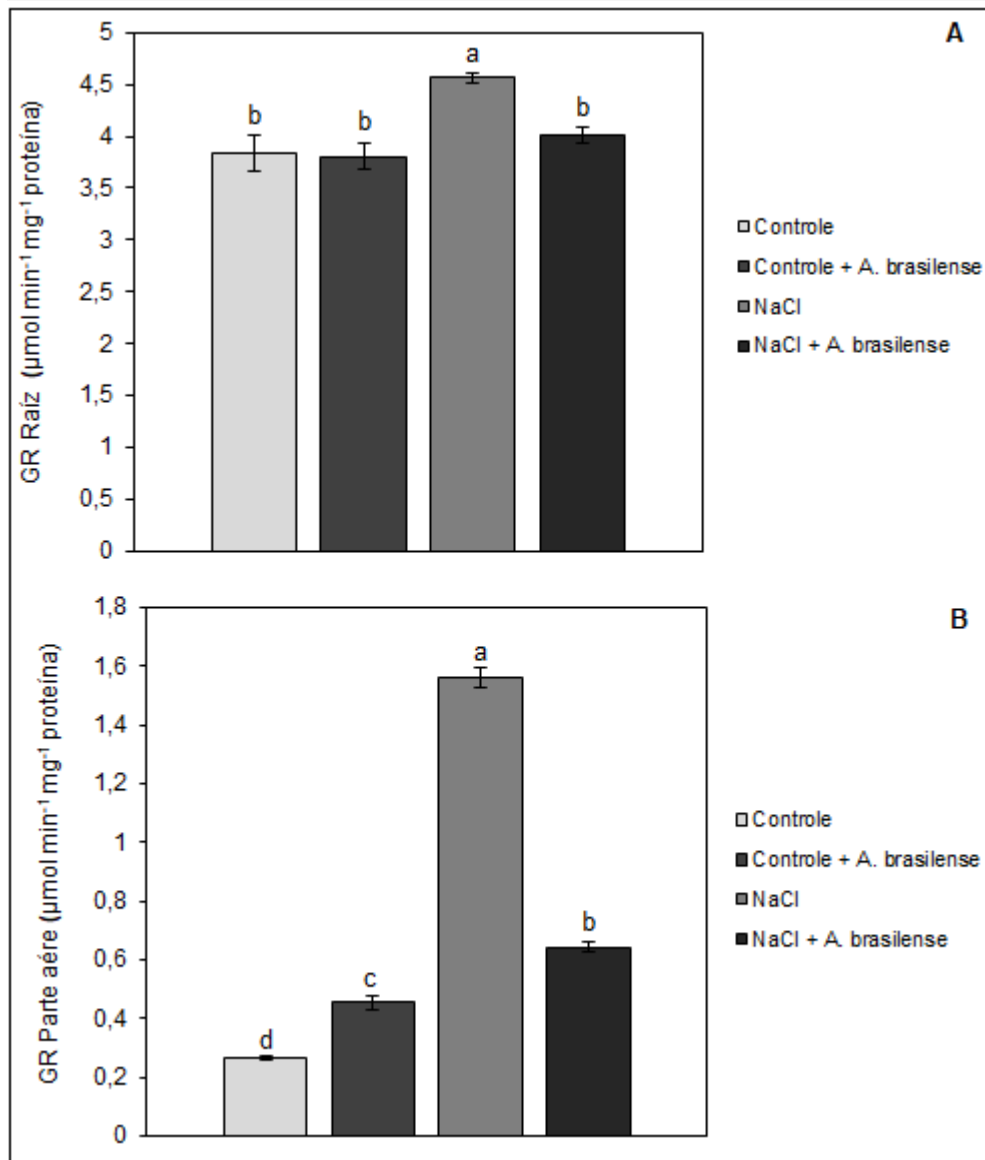


Figura 4. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GR nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

4.3.3. Glutationa peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9)

Com relação os dados antioxidantes observados no sistema radicular (Figura 5. A), a presença de *Azospirillum brasilense* propiciou as maiores atividades de GSH-PX independente do NaCl quando comparado aos demais tratamentos. Curiosamente, a inoculação de *A. brasilense* nas plantas expostas na presença e ausência de NaCl não diferem entre si estatisticamente.

Nas folhas (Figura 5. B), o maior aumento da atividade de GSH-PX ocorreu nas plantas inoculadas sob condição de NaCl quando comparadas as plantas controle. Com relação aos demais tratamentos, não houve diferença estatística entre inoculação e NaCl quando comparados.

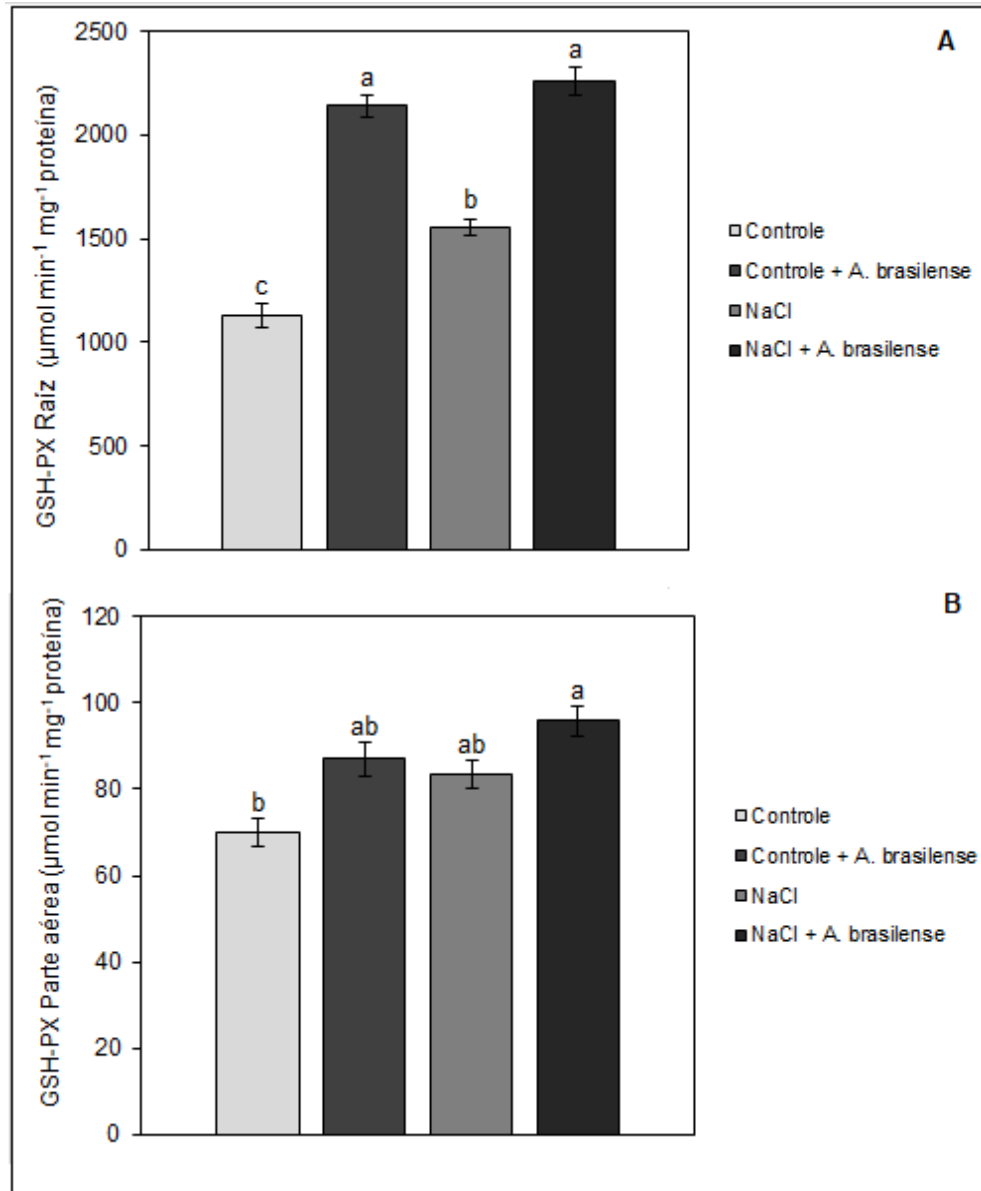


Figura 5. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GSH-PX nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

4.3.4. Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7)

Os dados obtidos de GPOX foram consistentes e similares em ambos os tecidos avaliados (Figura 6. AB), ocorrendo aumento da atividade de GPOX sob

NaCl independente da inoculação, quando comparados ao tratamento controle. No entanto, houve aumento significativo da atividade enzimática quando as plantas estavam inoculadas com *Azospirillum brasilense* e expostas a salinidade em comparação as plantas não inoculadas nessa mesma condição e aos demais tratamentos.

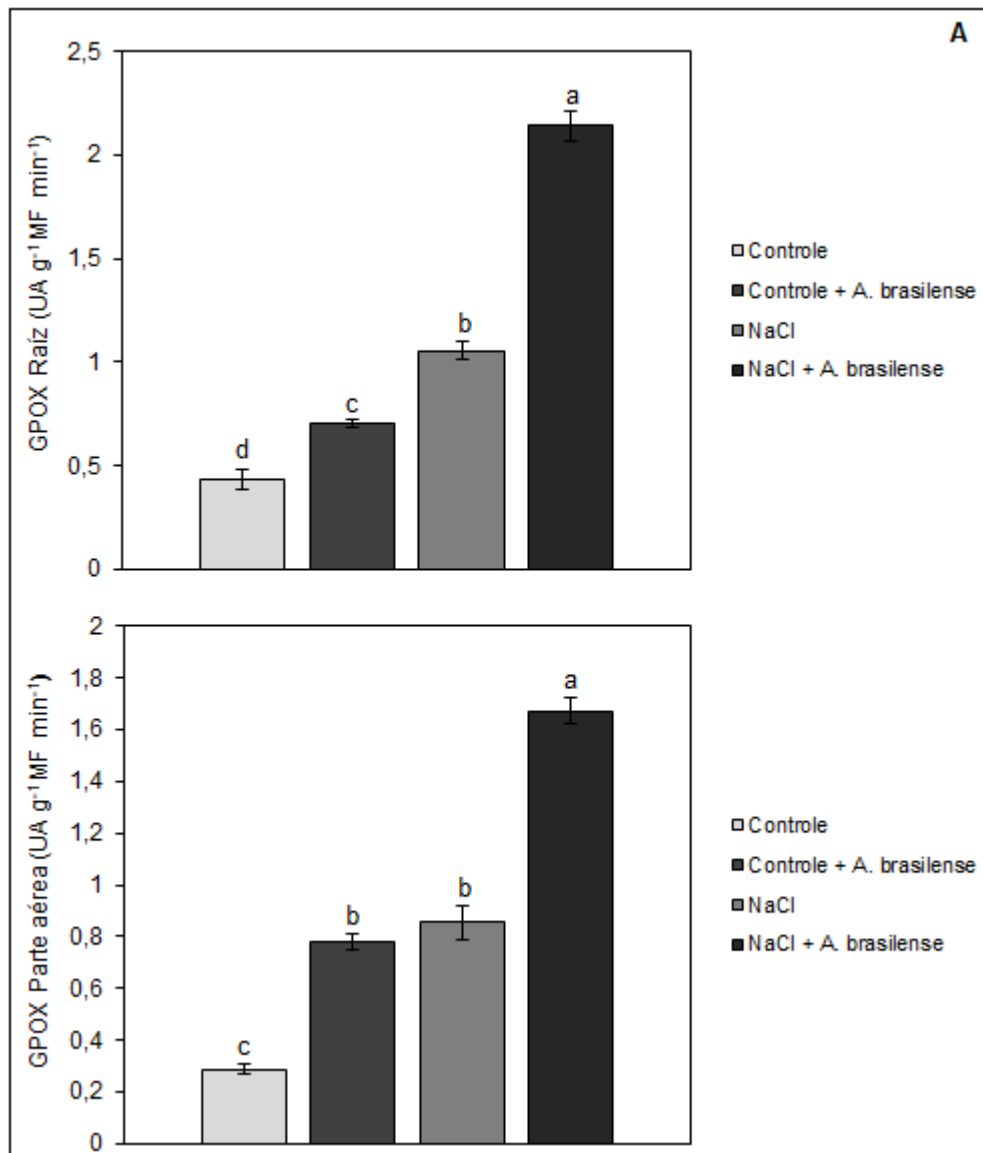


Figura 6. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GPOX nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

4.4. Determinação de Na⁺

Com relação ao acúmulo de Na⁺ nas raízes (Figura 7. A), os maiores valores foram observados nos tratamentos expostos a salinidade independente da inoculação de *Azospirillum brasilense* comparado aos demais tratamentos. No entanto, quando comparado a essa condição (100 mM NaCl), o maior acúmulo foi observado na presença da bactéria (NaCl + *A. brasilense*). Já na ausência de salinidade, não houve diferença estatística do tratamento inoculado (Controle + *A. brasilense*) comparado ao controle.

Nas folhas (Figura 7. B), o maior acúmulo de Na⁺ foi observado nas plantas não inoculadas expostas a salinidade, seguidas pelas plantas inoculadas nessa mesma condição (100 mM NaCl), quando comparado ao tratamento controle. No entanto, quando comparado as plantas sob salinidade, ocorreu decréscimo do conteúdo de Na⁺ nesse tratamento (NaCl+ *A. brasilense*). Com relação aos tratamentos sem salinidade, não houve diferença estatística entre eles.

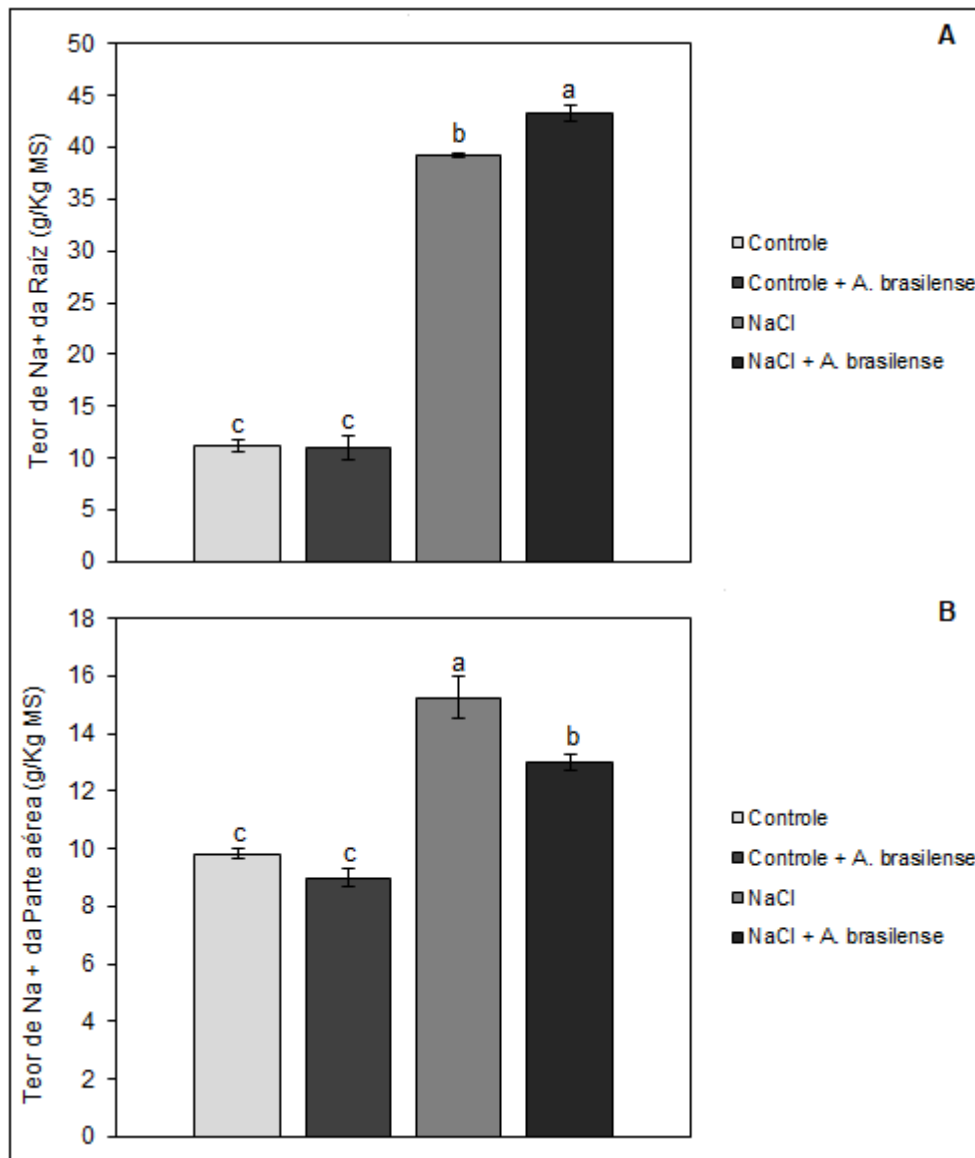


Figura 7. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre o acúmulo de Na⁺ nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Os valores representam médias de quatro repetições (n= 4); barras verticais indicam o erro padrão (±EP).

4.5. Quantificação do acúmulo de N

Os dados obtidos do acúmulo de N no sistema radicular (Figura 8. A) evidenciaram o maior acúmulo no tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* na presença do estressor (NaCl + *A. brasilense*) e o menor acúmulo no tratamento

não inoculado na presença do estressor, comparados ao controle. Embora os tratamentos sem NaCl não apresentem diferença estatística entre si, é interessante notar que até na presença do NaCl o acúmulo de N foi significativamente maior do que quando comparado ao tratamento apenas inoculado.

Nas folhas (Figura 8. B) o maior acúmulo de N também fora nos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense*, comparado ao tratamento com NaCl e sem inoculação.

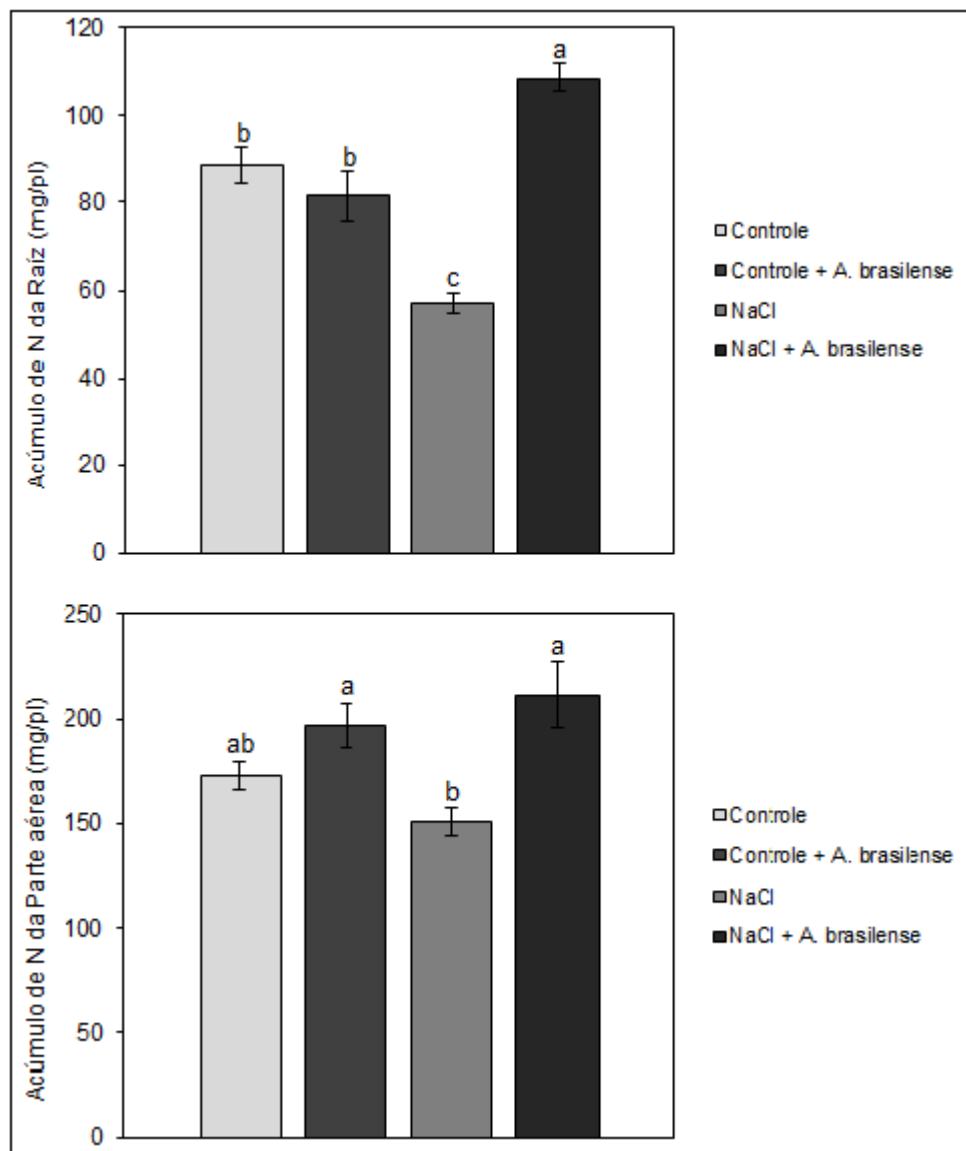


Figura 8. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre o acúmulo de N nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não

diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

4.6. MS dos tecidos vegetais

Os dados de MS obtidos nesse trabalho nas raízes (Figura 9. A) e parte aérea (Figura 9. B) corroboram com o que é descrito na literatura, em que 100 mM de NaCl é suficiente para ocasionar o estresse nas plantas, acarretando a redução da MS, independente da inoculação. No sistema radicular, embora os tratamentos inoculados não apresentem maior MS que as plantas controle, houve um maior aumento de MS no tratamento inoculado na presença do sal (NaCl + *A. brasilense*) quando comparado ao tratamento nessa mesma condição (100 mM NaCl) sem a presença da bactéria, nesse mesmo contexto, não houve diferença estatística com relação a parte aérea.

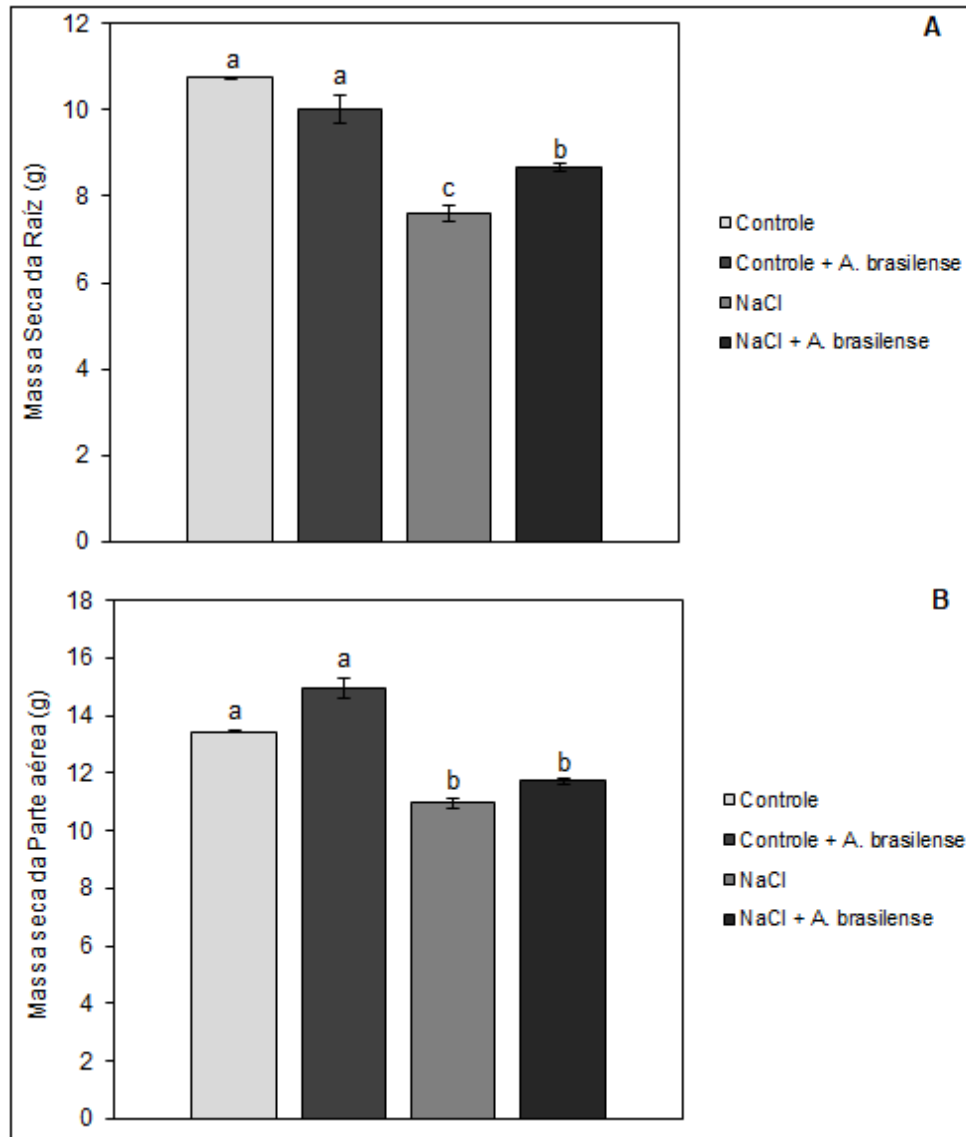


Figura 9. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* e estresse salino sobre a MS nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$).

5. DISCUSSÃO

Dentre os efeitos diversos ocasionados pela salinidade nas plantas, a fotossíntese e sua relação com os pigmentos fotossintéticos, como clorofila total e carotenóides são diretamente afetados, podendo haver decréscimo no conteúdo, refletindo por sua vez no crescimento vegetal (Gomes et al., 2017). Neste trabalho, os resultados foram opostos, mostrando que sob 100 mM de NaCl, tanto as plantas não-inoculadas quanto as inoculadas com *Azospirillum brasilense* tiveram um considerável aumento no conteúdo desses pigmentos quando comparados ao controle (0 mM de NaCl).

Embora esteja bem documentado que o estresse salino ocasiona à redução do conteúdo de clorofila em diversas culturas, e que esse decréscimo é considerado um importante marcador bioquímico para a tolerância ao sal, alguns estudos também sugerem que necessariamente nem sempre esse acúmulo está associado à tolerância salina, dependendo de outros parâmetros envolvidos, como a diversidade de cultivares e/ou espécies vegetais estudadas bem como a amplitude dessa redução (Ashraf e Harris, 2013).

Os carotenóides são fundamentais no processo de fotoproteção fotossintética, atuando como poderosos antioxidantes. Os dados de carotenóides neste estudo se assemelham aos de clorofila, em que o maior aumento do teor ocorreu sob condição de 100 mM de NaCl em plantas não inoculadas (Fig 1-B). Esse aumento pode ser atribuído ao papel dos carotenóides como precursores na sinalização em condições estressantes, como o estresse salino (Ashraf e Harris, 2013). Neste trabalho, esse aumento é verificado em todos os tratamentos expostos a salinidade, sendo assim, o fator sal um interferente no aumento de carotenóides em ambas as situações (inoculado e não inoculado).

Mas, nas plantas inoculadas sob essa condição (100 mM NaCl), o teor se manteve quando comparado ao tratamento controle. Provavelmente isso possa estar relacionado a capacidade das bactérias em sintetizar e secretar diversas

substâncias úteis para conferir a tolerância salina em diversas culturas. Visto que as bactérias são capazes de aumentar seu pool intracelular de solutos acumulando grandes quantidades de osmólitos orgânicos. No milho, o ácido indolacético (AIA) é uma das substâncias que podem ser secretadas pelas bactérias e com isso, atenuar os efeitos do estresse, regulando os processos fisiológicos das células vegetais, como a fotossíntese (Radhakrishnan e Baek, 2017).

Inevitavelmente, em condições normais, as plantas sintetizam um diminuto nível de metabólitos de oxigênio advindos de processos essenciais no metabolismo celular que são potencialmente tóxicos, mantendo o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO (Sharma et al., 2012; Das e Roychoudhury, 2014). No entanto, por serem organismos sésseis e estarem expostas a diversos fatores externos, como perante a salinidade dos solos, conseqüentemente, as plantas sofrem um desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas ERO, acumulando-o nas células vegetais. Esse excesso é capaz de danificar os lipídios da membrana, destruindo sua integridade (Halo et al., 2015; Liang et al., 2018).

Como principal produto dessa peroxidação lipídica, tem-se o MDA, na qual seu conteúdo reflete o grau de dano na membrana celular. Nessa situação, a concentração de sal utilizada (100 mM) foi suficiente para ocasionar a peroxidação lipídica, uma vez que tanto nas raízes quanto nas folhas o MDA aumentou nessa condição quando comparado as plantas cultivadas na ausência de NaCl. A salinidade é um dos principais estresses responsáveis pelas mudanças na atividade metabólica das plantas (Singh et al, 2013), ocasionando acúmulo de MDA em plantas estressadas (Singh et al., 2013).

Em contrapartida, os níveis de MDA foram reduzidos significativamente em ambos os tecidos com a inoculação de *Azospirillum brasilense* nessa mesma condição (100 mM NaCl). Desse modo, a inoculação de *A. brasilense* pode ter induzido a tolerância ao sal no milho, suprimindo o acúmulo de MDA nas plantas para recuperá-las dos efeitos tóxicos ocasionados pelo Na⁺, conseqüentemente reduzindo a peroxidação lipídica (Wu et al., 2014).

Além do mais, isso nos sugere que essa associação positiva (estresse salino/bactéria) em reduzir os danos na membrana perante o estresse,

possivelmente esteja correlacionado de alguma forma com os sistemas antioxidantes de defesa. Um aumento da atividade desses sistemas pode ser visto como um dos mecanismos para tolerância Bianco e Defez (2009) relataram essa correlação como um indicativo da mitigação do estresse salino, visto que na inoculação bacteriana em solos salinos foi evidenciado uma maior atividade de enzimas atuantes na eliminação de ERO.

Estudos recentes também expuseram que a promoção do crescimento que *Azospirillum brasilense* (cepas Ab-V5 e Ab-V6) confere ao milho possa estar conexo à indução de genes de defesa de plantas, proporcionando tolerância a estresses abióticos (Fukami et al., 2017, 2018a). Buscando elucidar as respostas envolvidas nessa associação correlativa positiva de *A. brasilense* no milho sob condições de estresse, quatro sistemas antioxidantes (SOD, GR, GSH-PX, GPOX) foram avaliados nesse trabalho.

Embora a SOD seja uma das primeiras enzimas a compor a linha de defesa, atuando na remoção do radical superóxido (Sharma et al., 2012; Gratão et al., 2015), sua atividade foi reduzida na presença da bactéria quando submetida a condição de estresse em ambos os tecidos vegetais. Já na ausência do estressor, a inoculação propiciou as maiores atividades da enzima. Neste caso, a associação não foi suficiente para reverter o efeito deletério do estresse sob o sistema antioxidante. Provavelmente não estando totalmente relacionada a atenuação do desequilíbrio ocasionado pelas ERO nessa associação (bactéria/estresse). No trabalho de Fukami et al (2018), também não foram vistas atividades de SOD relacionada à inoculação no sistema radicular.

A GR também apresentou dados similares a SOD com relação a diminuição da atividade enzimática na presença da bactéria. Embora não haja diferença estatisticamente é possível notar a partir do gráfico de raíz que as plantas inoculadas na presença do estressor exibiram uma diminuta atividade em relação ao tratamento controle. Nas folhas esse mesmo dado é ainda mais evidenciado, havendo diferença estatística. Ou seja, o ciclo ascorbato (AsA)/glutathiona (GSH) pode estar envolvido nessa remoção de ERO, podendo haver outras enzimas nesse ciclo atuantes (Alves et al., 2018).

Além disso, essa maior atividade enzimática nas folhas do que nas raízes pode estar relacionado a um mecanismo de tolerar ao sal através do redirecionamento do Na^+ da parte aérea para as raízes (Xu et al., 2018). Alguns trabalhos mostraram que o aumento da tolerância ao sal está correlacionado com a redução do acúmulo de Na^+ nas folhas (Zhang e Shi, 2013; Xiong et al; 2018).

A atividade de GSH-PX foi essencial para validar o que havíamos mencionado anteriormente, que as respostas das alterações enzimáticas dessa associação (bactéria/estresse), teriam alguma relação com o ciclo ascorbato (AsA)/glutathione (GSH). Ambos são considerados principais antioxidantes solúveis, na qual atuam no manejo de ERO interagindo entre si pelo ciclo AsA-GSH. Em condições normais, as plantas mantêm a proporção de GSH e glutathione reduzida (GSSG), reduzindo o GSH. Com a presença de GR, o GSSG reduz ainda mais a GSH reduzida à custa das moléculas de NADPH (Szarka et al., 2012). Já a GSH-PX também está relacionada a papéis importantes nas plantas, como cascatas salinas, sinalização de ABA e homeostase redox (Zhai et al., 2013). Isso nos mostra que o aumento da atividade de GSH-PX (Fig. 5) com a inoculação de *Azospirillum brasilense* pode ter reduzido as cascatas salinas, minimizando o dano oxidativo perante o estresse salino.

Assim, como a GSH-PX, GPOX também foi uma enzima antioxidante altamente responsiva, visto que, os tratamentos inoculados na condição salina exibiram as mais altas atividades enzimáticas, diante de todos os outros tratamentos. Supostamente, a atividade pode ser justificada pela GPOX estar envolvida na eliminação efetiva do H_2O_2 , bem como no crescimento de plantas (Sharma et al., 2012), dessa forma, podendo *Azospirillum brasilense* ter impulsionado essa eliminação.

Uma vez sob elevados níveis de salinidade, outros mecanismos de resposta além dos sistemas antioxidantes podem ser ativados. Dependendo do teor de Na^+ que é acumulado e absorvido pelas raízes, são ocasionados uma série de danos e mudanças fisiológicas, bioquímicas e metabólicas nas plantas expostas a essa condição. Conforme ocorre o aumento de sal o potencial osmótico é reduzido, motivando de forma imediata o efluxo de água da célula, influenciando no acúmulo

de íons e conseqüentemente no crescimento vegetal (Hannachi e Van Labeke, 2018).

Corroborando com a literatura, houve aumento no acúmulo de Na^+ nas plantas expostas a salinidade. No entanto, os tecidos analisados tiveram respostas inversas com a inoculação sob NaCl, havendo aumento nas raízes e decréscimo do conteúdo na parte aérea. Como já mencionado anteriormente, as plantas podem exibir distintos mecanismos para tolerância ao sal. Em várias espécies, dentre elas o milho, o redirecionamento do Na^+ nos tecidos vegetais via floema tem sido descrito como um dos mecanismos eficientes na proteção das células foliares contra a toxidez salina (Xiong et al., 2018; Xu et al., 2018). Esse mecanismo de ação é mediado pelo transportador de potássio de alta afinidade (AtHKT1) que recircula através do floema, o Na^+ absorvido da parte aérea (maior concentração salina) para as raízes (baixo teor salino) (Xiong et al., 2018).

De fato, pode haver outros mecanismos em resposta à essa interação (bactéria/estresse), visto que as espécies e/ou cultivares de plantas podem exibir distintos mecanismos para a tolerância ao sal, e esses mecanismos não necessariamente são específicos e únicos em uma determinada planta. Assim como as estratégias podem atuar de forma concomitante e/ou também serem ativadas e eficazes em circunstâncias específicas (Roy et al., 2014).

Nesse sentido, dentre outros mecanismos, as plantas também podem eliminar essas cargas de Na^+ das células da raiz (Xiong et al., 2018). Dessa maneira, as distintas cepas de *Azospirillum brasilense* podem apresentar diferentes mecanismos osmorregulatórios para lidar e sobreviver perante a concentração de íons salinos no solo. Com isso, podem ter sido capazes de absorver os osmólitos exsudados pelas raízes, podendo também sintetizar outros solutos compatíveis, como prolina, giberelina, açúcar, auxiliando também na mobilização de nutrientes do solo, conseqüentemente favorecendo a disponibilidade destes para o crescimento das plantas (Upadhyay e Singh, 2015; Radhakrishnan e Baek, 2017).

Uma vez que a disponibilidade de nutrientes nos solos é afetada pela deposição de sal, refletem instantaneamente no crescimento e desenvolvimento do vegetal. Corroborando com trabalhos anteriores e recentes, a inoculação de *A.*

brasilense auxiliou no acúmulo de N nas plantas, principalmente na condição estressora (Hungria et al., 2011; Fukami et al., 2016, 2018; Pii et al., 2019).

Embora os resultados das plantas inoculadas não tenham apresentado incremento de MS (Fig. 9) foi notável que a inoculação com as cepas AbV5-AbV6 via semente e via solo auxiliou no crescimento e desenvolvimento das plantas na condição estressora, uma vez que os dados nos mostram um maior aumento de MS dessas plantas (NaCl + *A. brasilense*) quando comparadas as plantas estressadas não-inoculadas, principalmente no sistema radicular. Isso é reflexo da melhor arquitetura radicular que *Azospirillum brasilense* promove, favorecendo no aumento do número de raízes laterais e pelos radiculares, conseqüentemente aumentando a superfície de raiz disponível, favorecendo uma melhor absorção de nutrientes e estado de água para a planta e possibilitando sua adaptação na condição salina (Hungria et al., 2011; Pii et al., 2019).

Vale ressaltar também que a resposta do genótipo utilizado, inoculação e estágio vegetativo do milho é heterogênea de acordo com as diversas formas de aplicação de inoculantes utilizada. Resultados obtidos em experimento com variedades de milho apresentaram diferença significativa quando se utilizou inoculação via solo quando as plantas atingiam estágio vegetativo V3 à V5 (Revolti, 2018).

Mediante o exposto, os resultados evidenciam uma correlação dessa associação (estresse/bactéria) em conferir a tolerância salina. Bem como, o efeito benéfico da inoculação de *Azospirillum brasilense* no milho sob estresse. Estes estudos reforçam a importância de se combater as restrições do desenvolvimento de cultivares sob condições limitantes de crescimento através do uso da microbiota vegetal e na busca de genótipos mais tolerantes (Zeffa et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

A presença de *Azospirillum brasilense* no milho sob estresse salino pode conferir tolerância as plantas sob salinidade, uma vez que proporcionou a redução dos danos oxidativos (peroxidação lipídica) e aumentou as respostas antioxidantes de GSH-PX e GPOX, além de maior incremento de massa seca sob condição estressora no sistema radicular e uma maior fixação de nitrogênio.

7. REFERÊNCIAS

Abdul Qados AMS (2011) Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L). **J. Saudi. Soc. Agric Sci** 10: 7-15.

Almaroai YA, Usman ARA, Ahmad M, Moon DH, Cho JS, Joo YK, Jeon C, Lee SS, Ok, YS (2014) Effects of biochar, cow bone, and eggshell on Pb availability to maize in contaminated soil irrigated with saline water. **Environmental Earth Sciences** 71(3): 1289-1296.

Alves RC, Medeiros AS, Nicolau MCM, Neto AP, Oliveira FA., Lima LW, Tezotto T, Gratão PL (2018) The partial root-zone saline irrigation system and antioxidant responses in tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 127: 366-379.

Anderson JV, Davis, DG (2004) Abiotic stress alters transcript profiles activity of glutathione S transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum** 120: 421-433.

Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica** 51 (2): 163-190.

Ayers RS e Westcost DW (1999) A qualidade da água na agricultura. **Campina grande** 153.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidante enzymes to transfer from elevated carbono dioxide toa ir and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum** 104: 280-292.

Banerjee A e Roychoudhury A (2015) WRKT Proteins: Signaling and Regulation of Expression during abiotic stress responses. **The Scietific World Journal** 1-17.

Barbosa J, Junior M (2010) Agrostat–Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.0. Departamento de Ciências Exatas–Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal–Brasil.

Barassi CA, Sueldo RJ, Creus CM, Carrozzi L, Casanovas EM, Pereyra MA (2008) Potential of *Azospirillum* in optimizing plant growth under adverse conditions. In: Cassán, F.D.; Garcia de Salomone, I. editors, *Azospirillum* ssp.: **Cell physiology, plant interactions and agronomic research** 49-59.

Barros JFC e Calado JG (2014) **A Cultura do Milho** 51f. Texto de apoio para as Unidades Curriculares de Sistemas e Tecnologias Agropecuárias, Tecnologia do Solo e das Culturas, Noções básicas de Agricultura e Fundamentos de Agricultura Geral – Universidade de Évora.

Bergamaschi H, Dalmago GA, Bergonci JI, Bianchi CAM, Muller AG, Comiran F, Heckler BMM (2004) Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39:831-839.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 71: 248-254.

Caires EF, Milla R (2016) Adubação nitrogenada em cobertura para o cultivo de milho com alto potencial produtivo em sistema de plantio direto de longa duração. **Bragantia** 75 (1): 87-95.

Cakmak I, Horst WJ, (1991) Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 834: 463-468.

Carmo CAFS, Araújo WS, Bernardi ACC, Saldanha MFC (2000) Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na embrapa solos. **Embrapa Solos** (Circula técnica 6), 46.

Cassán F, Diaz-Zorita M (2016) *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field **Soil Biol. Biochem.** 103: 117-130.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos** (2018) 5:132.

Czarnocka C, Karpinski S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine** 122: 4-40.

DeBruin JL, Schussler JR, Mo H, Cooper M (2017) Grain Yield and Nitrogen Accumulation in Maize Hybrids Released during 1934 to 2013 in the US Midwest. **Crop Science** 57: 1431.

Farooq M, Hussain M, Usman M, Farooq S, Alghamdi SS, Siddique KHM (2019) Impact of Abiotic Stress on Grain Composition and Quality in Food Legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 66: 8887-8897.

Foyer CH, Noctor G (2013) Redox signaling in plants. **Antioxidant Redox Signal** 18(16): 2087-90.

Fukami J, Nogueira MA, Araújo RS, Hungria M (2016) Accessing inoculation methods of maize and wheat *Azospirillum brasilense*. **AMB Express** 6: 413-425.

Fukami J, Ollero FJ, Megías M, Hungria M (2017) Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **Journal List** 7: 153.

Fukami J, Ollero AJ, Osa CI, Valderrama-Fernandez R, Nogueira MA, Megías M, Hungria M (2018) Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology** 200: 191-203.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59 (2): 309-314.

Gill SS e Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crops plants. **Plant Physiology Biochemistry** 48:909-930.

Gomes MAC, Pestana IA, Santa-Catarina C, Hauser-Davis RA, Suzuki MS (2017) Salinity effects on photosynthetic pigments, proline, biomass and nitric oxide in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologia Brasiliensia** 29: 1-13.

Gong F, Wu X, Zhang H, Chen Y (2015) Making better maize plants for sustainable grain production in a changing climate. **Frontiers in Plant Science** 6:835.

Gualpa J, Lopez G, Nieves S, Coniglio A, Halliday N, Cámara M, Cassán F (2019). *Azospirillum brasilense* Az39, a model rhizobacterium with AHL quorum-quenching capacity. **Journal Appl Microbiol** 126 (6): 1850-1860.

Glick BR. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica** 1-5.

Gratão PL, Monteiro, CC, Carvalho RF, Tezzoto T, Piotto FA, Peres LEP, Azevedo RA (2012) Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 56: 79-96.

Gratão, PL, Monteiro, CC, Tezotto, T, Carvalho, RF, Alves, LR, Peter, LJ, Azevedo, RA (2015). Cadmium stress antioxidante responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biomaterials** 28: 803-816.

Hajiboland R (2013) Role of arbuscular mycorrhiza in amelioration of salinity. In: Ahmad P, Azooz M, Prasad M (eds) Salt stress in Plants. **Springer**, New York 301-354.

Hannachi S, Van Labeke M C (2018) Salt stress affects germination, seedling growth and physiological responses differentially in eggplant cultivars (*Solanum melongena* L.). **Scientia Horticulturae** 228: 56-65.

Hasegawa PM, Bressnan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** 51:463-499.

Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja** 325: 36.

Jayakannan M, Bose J, Babourina O, Rengel Z, Shabala S (2015) Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. **Plant Growth Regulation** 76(1): 25-40.

Jozefczak M, Bohler S, Schat H, Horemans N, Guisez Y, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2015). Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of *Arabidopsis* to cadmium. **Ann Bot** 116: 601-612.

Kiani M, Forest R, Tipton SM, Keller MW (2017) Coupon specimen-based approach for the simulation of crossbore stress and strain state. **Research Article** 52(2).

Kiani-Poya A, Roessner U, Jayasinghe NS, Lutz A, Rupasinghe T, Bazihizina N, Bohm J, Alharbi S, Hedrich R, Shabala S. (2017) Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species. **Plant, Cell and Environment** 40:1900-1915.

Khalid M, Biliar M, Hassani D, Iqbal HMN, Wang H, Huang D (2017) Mitigation of salt stress in white clover (*Trifolium repens*) by *Azospirillum brasilense* and its inoculation effect. **Botanical Studies** 58:5, 1-7.

Kronzucker HJ, Oskun D, Schulze LM, Wong JR, Britto DT (2013) Sodium as nutrient and toxicant. **Plant and Soil** 369:1-23.

Ladha JK, Tirol-Padre A, Reddy CK, Cassman KG, Verma S, Powlson DS, Van Kessel C, Richter DB, Chakraborty D, Pathak H (2016) Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems **Scientific Reports** 6:19355.

Liang W, Cui W, Ma X, Wang G, Huang Z (2014) Function of wheat Ta-UnP gene in enhancing salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* and rice. **Biochem. Biophys. Res. Co.** 450: 794-801.

Liang W, Ma X, Wan P, Liu L (2018) Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 495(1): 286-291.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148: 350-382.

Liu L e Greaver TL (2010) A global perspective on belowground carbon dynamics under nitrogen enrichment. **Ecology Letters** 13: 819-828.

Melrose J, Perroy R, Careas S (2015) World population prospects. **United Nations**, 1: 587-592.

Miyazawa M, Pavan MA, Muraoka T, Carmo CAF de S do, Mello W J (1999) Análises químicas de tecido vegetal. In: Silva, F.C. da. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Rio de Janeiro: Embrapa Solos / Campinas: Embrapa Informática Agropecuária. 171-223.

Monteiro CC, Carvalho RF, Gratão PL, Carvalho G, Tezoto T, Medici LO, Peres LEP, Azevedo RA (2011) Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutante subjected to cádmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany** 71: 306-320.

Munns R e Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. **Annu Rev Plant Biol** 59:651-681.

Okumura RS, Mariano DC, Zaccheo PVC (2011) Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia** 4(2):226-244.

Payen S, Basset-Mens C, Núñez M, Follain S, Grunberger O, Marlet S, Perret S, Roux P (2016) Salinisation impacts in life cycle assessment: a review of challenges and options towards their consistent integration. **International Journal of Life Cycle Assessment** 21(4): 577-594.

Pereg L, de-Bashan LE, Bashan Y (2016) Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil** 399: 389-414.

Pereira LM, Pereira EM, Revolti LTM, Zingaretti SM, Môro GV (2015) Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agrônômica** 46(3): 630-637.

Portugal JR, Arf O, Peres AR, Gitti DC, Rodrigues RAF, Garcia NFS, Gare L (2016) *Azospirillum brasilense* promotes increment in corn production. **African Journal of Agricultural Research** 11:1688-1698.

Pii Y, Aldrighetti A; Valentinuzzi F, Mimmo T, Cesco S (2019) *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **J. Exp. Bot** 70 (4): 1313-1324.

Radhakrishnan R, Baek KH (2017) Physiological and biochemical perspectives of non-salt tolerant plants during bacterial interaction against soil salinity. **Plant Physiology and Biochemistry** 116: 116-126.

Revolti LTM, Caprio CH, Mingotte FLC, Môro GV (2018) *Azospirillum* spp. Potential for maize growth and yield. **African Journal of Biotechnology** 17(18): 574-585.

Roy SJ, Negrão S, Tester M (2014) Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 115-124.

Sabir P, Ashraf M, Hussain M, Jamil A (2009) Relationship of photosynthetic pigments and water relations with salt tolerance of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) accessions. **Pak. J. Bot** 41: 2957-2964.

Singh PK, Singh R, Singh S (2013) Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plant grown under salt stress. **Physiol. Mol. Biol. Plants** 19(1): 53-59.

Soares ALC, Geilfus C, Carpentier S (2018) Genotype- Specific Growth and Proteomic Responses of Salt Stress. **Front Plant Sci** 9:661.

Souza EJ, Cunha FF, Magalhães FF, Silva TR, Santos OF (2015) Effect of irrigation and nitrogen fertilization on agronomic traits of sweet corn. **Pesq. Agropec. Trop.** 45(3): 282-290.

Sun C, Gao X, Fu J, Zhou J, Wu X (2015) Metabolic response of maize (*Zea mays* L.) plants to combined drought and salt stress. **Plant and Soil** 388:99-117.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany** 1-26.

Szarka A, Tomasskovics B, Bánhegyi G (2012) The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. **Int. J. Mol. Sci.** 13: 4458-4483.

Tavares Filho AN, Barros MFC, Rolim MM, Silva EFF (2012) Incorporação de gesso para correção da salinidade e sodicidade de solos salinos-sódicos. **Revista Brasileira de engenharia agrícola e ambiental** 16(3): 247-252.

Tortora ML, Diaz-Ricci JC, Pedraza RO (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology** 193: 275-286.

Van Ittersun MK et al (2013) Yield gap analysis with local to global relevance – a review. **Field Crops Research** 143: 4-17.

Wang N, Qiao W, Liu X, Shi J, Xu Q, Zhou H, Yan G, Huang Q (2017) Relative contribution of Na⁺/K⁺ homeostasis, photochemical efficiency and antioxidant defense system to differential salt tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. **Plant Physiol. Biochem.** 119: 121-131.

Wu W, Zhang Q, Ervin EH, Yang Z, Zhang X (2017) Physiological mechanism of enhancing salt stress tolerance of perennial ryegrass by 24-epibrassinolide. **Front. Plant. Sci.** 8: 10-17.

Xiong X, Liu N, Wei Y, Bi Y, Luo J, Xu R, Zhou J, Zhang Y (2018) Effects of nonuniform root zone salinity on growth, ion regulation, and antioxidant defense system in two alfalfa cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry** 132: 434-444.

Yan K, Zhao S, Bian L, Chen X (2017) Saline stress enhanced accumulation of leaf phenolics in honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) without induction of oxidative stress. **Plant Physiol. Biochem.** 112: 326-334.

Yang B, Xiong ZQ, Wang JY, Xu X, Huang QW, Shen QR (2015) Mitigating net global warming potential and green-house gas intensities by substituting chemical nitrogen fertilizers with organic fertilization strategies in rice-wheat annual rotation systems in China: A 3-years field experiment. **Ecol. Eng.** 81: 289-297.

Zeffa DM, Perini LJ, Silva MB, De Souza NV, Scapim CA, Oliveira ALM, Amaral Júnior ATD, Gonçalves LSA (2019) *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **Plos one** 14(4).

Zeng J, Liu X, Song L, Lin X, Zhang H, Shen C, Haiyan C (2016) Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. **Soil Biology and Biochemistry** 92: 41-49.

Zhai CZ, Zhao L, Yin LJ, Chen M, Wang QY, Li LC, Xu SC, Ma Z (2013) Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H₂O₂ tolerances in Arabidopsis. **Plos One** 8.

Zhang L, Zhang G, Wang Y, Zhou Z, Meng Y, Chen B (2013) Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. **Journal Plant Res.** 126: 293– 304.

Zhu X, Song F, Liu S (2011) Arbuscular mycorrhiza impacts on drought stress of maize plants by lipid peroxidation, proline content and activity of antioxidant system. **Journal of Food, Agriculture and Environment** 9(2): 583-587.