

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/08/2020.

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	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
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	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 <sup>+</sup> .....	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
<b>4. RESULTADOS</b> .....	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 <sup>+</sup> .....	27
4.5. Quantificação do acúmulo de N.....	28
4.6. MS dos tecidos vegetais.....	30
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 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<sup>+</sup>), 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 consequente 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<sup>+</sup> 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 ( $\text{Na}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ), 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  $\text{Na}^+$  (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), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), guaiacol peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7), glutathione 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), glutathione (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.

## 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-  $\alpha$ -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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.