

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

INTERAÇÃO ENTRE RESPOSTAS ANTIOXIDANTES E *Azospirillum brasilense*
NO MILHO CULTIVADO SOB ESTRESSE SALINO

Fernanda Miotti

Jaboticabal – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Interação entre respostas antioxidantes e *Azospirillum brasilense* no milho cultivado
sob estresse salino

Fernanda Miotti

Orientadora: Prof^a Dr^a Priscila Lupino Gratão
Coorientadora: MsC. Mirela Vantini Checchio

Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Campus de Jaboticabal, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal - SP
2º semestre/2021

M669i Miotti, Fernanda
Interação entre respostas antioxidantes e *Azospirillum brasilense* no milho cultivado sob estresse salino / Fernanda Miotti. -- Jaboticabal, 2021
43 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Priscila Lupino Gratão
Coorientadora: Mirela Vantini Checchio

1. Milho. 2. Bacteria. 3. Enzimas. 4. Antioxidantes. 5. Tolerância. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
Departamento: Biologia Aplicada à Agropecuária



CERTIFICADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Título: Interação entre respostas antioxidantes e *Azospirillum brasilense* no milho cultivado sob estresse salino

Acadêmica: Fernanda Miotti

Curso: Ciências Biológicas

Orientador: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

Coorientadora: Me. Mirela Vantini Checchio

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

Período: 2º semestre de 2021.

CONCEITO: Aprovado

Este trabalho é recomendado para compor a base de dados Repositório: SIM ☐ NÃO ☒
Reprovado ☐

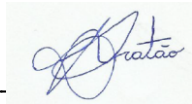
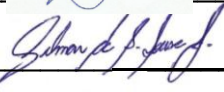
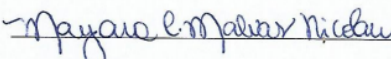
BANCA EXAMINADORA:

Assinaturas

Presidente: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

Membro: Dr. Gilmar da Silveira Sousa Junior

Membro: Me. Mayara Cristina Malvas Nicolau

Jaboticabal: 01/09/2021

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 21/09/2021


Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho
Chefe DBAA

Ao caminho

Ofereço

Dedico este trabalho a toda
minha família, em especial meus pais.

Agradecimentos

E neste momento triste que estamos vivendo, devemos procurar um momento de luz para apreciar as coisas boas que existem em nossas vidas, e demonstrar gratidão por estarmos bem.

Agradeço primeiramente a UNESP, por toda infraestrutura fornecida nestes anos de graduação, e pelos momentos vividos dentro do campus.

Ao CNPq, por todo apoio fornecido neste trabalho.

À Professora Priscila, pela confiança, e oportunidade de poder trabalhar em seu laboratório. Também, pela brilhante orientação durante o desenvolvimento deste projeto. Agradeço por todo apoio e suporte nestes momentos.

À Mirela, pela excelente coorientação, por toda ajuda, conselhos e opiniões, foram muito importantes para que eu chegasse até aqui.

A todos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, por me acolherem, me auxiliarem em todos os momentos que foi preciso, e pela oportunidade de crescer como profissional.

À minha família. Minha mãe por todo apoio, por sempre acreditar em mim, e ser o exemplo de mulher e profissional que eu quero ser. Meu pai, por sempre estar do meu lado e me apoiar nas decisões, um exemplo de bondade que levo pra vida. Meus irmãos, que sempre me ajudaram nos momentos de dificuldade, e por tornarem a minha vida mais leve.

Ao Ricardo, meu porto seguro. Que nunca soltou a minha mão, e me traz o melhor que há em mim. Por todo amor e companheirismo nestes 4 anos juntos.

A todos os amigos que estiveram comigo durante estes 5 anos de

graduação, tanto nos momentos bons, quanto nos momentos ruins, vocês fazem parte da minha trajetória. Em especial, Natália, Bianca, Letícia e Kátia, por todo amor e cumplicidade ao longo destes anos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 A Cultura do Milho.....	14
3.2 Estresse salino.....	16
3.3 Mecanismos Antioxidantes.....	17
3.3.1 Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	18
3.3.2 Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.4.2).....	18
3.3.3 Glutathione Peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9)	18
3.3.4 Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7)	19
3.4 Fertilização Nitrogenada	19
3.5 <i>Azospirillum brasilense</i>	20
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Experimento	22
4.2 Análises	23
4.2.1 Caracterização do estresse oxidativo	23
4.2.2 Determinação do teor de Na ⁺	23
4.3 Análises bioquímicas	23
4.3.1 Extração de enzimas e Determinação de proteínas	23
4.3.2 Superóxido Dismutase (SOD, EC, 1.15.1.1).....	23
4.3.3 Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.4.2).....	24
4.3.4 Glutathione Peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9).....	24
4.3.5 Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7)	24
4.4 Análises estatísticas.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Resultados	25
5.1.1 Caracterização do estresse oxidativo	25
5.1.2 Determinação do teor da Na ⁺	26

5.1.3 Análises bioquímicas	27
5.2 Discussão	31
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS	34

Lista de Abreviações

ABA: ácido abscísico

AsA: ascorbato

ERO: espécie reativa de oxigênio

GPOX: guaiacol peroxidase

GSH: glutathiona

GSH-PX: glutathiona peroxidase

GSSG: glutathiona oxidada

GR: glutathiona redutase

MDA: malondialdeído

SOD: superóxido dismutase

Lista de Figuras

- Figura 1.** 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 ($\pm EP$) **268**
- Figura 2.** 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 ($\pm EP$) **279**
- 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 ($n=4$); barra verticais indicam o erro padrão ($\pm EP$) **30**
- 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 ($\pm EP$)..... **29**
- 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 ($\pm EP$). **30**
- 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 ($\pm EP$) **31**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estádios de desenvolvimento do milho, vegetativo e reprodutivo	17
---	-----------

Interação entre respostas antioxidantes e *Azospirillum brasilense* no milho cultivado sob estresse salino

RESUMO - O estudo de genótipos e cultivares que sejam tolerantes aos impactos da salinidade, bem como o uso de inoculantes torna-se cada vez mais necessário. O objetivo da pesquisa foi avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas da interação entre a inoculação de *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho e o estresse salino, através de uma caracterização da resposta antioxidante condicionada por esta associação. O experimento conduzido foi inteiramente casualizado, 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* com quatro repetições. Os resultados demonstraram diferentes respostas de acordo com as análises de peroxidação lipídica (MDA), teor de sódio (Na⁺), e atividades enzimáticas, como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), glutathione peroxidase (GSH-Px, EC. 1.11.1.9) e guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7). Foi observado 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 Na e na atividade das enzimas GSH-Px e GPOX. Os dados obtidos neste trabalho evidenciaram que a presença de *A. brasilense* no milho sob estresse salino pode conferir tolerância à planta minimizando os efeitos deletérios do estresse salino, e que esta tolerância está relacionada ao sistema de defesa antioxidante, principalmente de GSH-Px e GPOX.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, bactérias promotoras de crescimento, tolerância, *Zea mays* ssp.

Interaction between antioxidant responses and *Azospirillum brasilense* in maize cultivated under salt stress

ABSTRACT - The study of genotypes and cultures that are tolerant to the impacts of salinity, as well as the action of inoculants becomes increasingly necessary. The main of this work was to evaluate the physiological and biochemical responses of the interaction between inoculation of *Azospirillum brasilense* in corn hybrids and salt stress, through a characterization of the antioxidant responses. The experiment conducted was completely randomized, 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), Na⁺ contents, and enzymatic activities, such as superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) and guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7). It was noticed that 100 mM NaCl caused lipid peroxidation, with consequent increases in MDA content. However, MDA content was reduced in inoculated plants, there was an increase in the Na content and activity of GSH-Px and GPOX enzymes. The data obtained in this work showed that the presence of *A. brasilense* can confer tolerance in maize to salt stress and acquired tolerance can be related to the antioxidant defense system, mainly GSH-Px and GPOX.

Keywords: Antioxidant enzymes, growth-promoting bacteria, tolerance, *Zea mays* ssp.

1. INTRODUÇÃO

A ação combinada das mudanças climáticas somadas as atividades antropogênicas afetam desfavoravelmente a qualidade das terras agrícolas, principalmente pelo aumento dos níveis de sal no solo. Esse aumento desfavorável contribuiu para que a salinidade se tornasse um dos principais estresses abióticos, ocasionando sérios prejuízos ao desenvolvimento e produtividade de diversas culturas mundialmente (Liang et al., 2018; Safdar et al., 2019).

Os efeitos deletérios incidentes no crescimento e desenvolvimento das plantas submetidas a essas condições salinas podem ser de natureza osmótica, iônica ou oxidativa (Hasanuzzaman et al., 2020). O principal efeito da salinidade quando em contato com o sistema radicular está relacionado a ajustes osmóticos, decorrentes do desbalanço de íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), que levam a diminuição do potencial osmótico do solo, e por conseguinte afetam o balanço hídrico e nutricional da planta (Zhao et al., 2020).

Quando o nível de sal atinge um limiar além do qual a planta é capaz de suportar, podem ser ocasionados outros distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Arif et al., 2020). Além do desbalanço nutricional, danos na integridade e funcionalidade da membrana, aparato fotossintético (Wu et al., 2017) e inativação de enzimas envolvidas em processos essenciais no metabolismo vegetal podem ocorrer (Kiani et al., 2017).

Ambos os estágios citados são estresses primários, que podem levar a estresses secundários, sendo o estresse oxidativo evidenciado neste último caso, provocado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Gratão et al., 2015; Liang et al., 2018). Essa superprodução pode ocasionar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e uma série de disfunções no metabolismo, sendo deletérios e levar até a morte do vegetal (Arif et al., 2020).

As enzimas antioxidantes desempenham uma importante resposta de defesa a fim de minimizar as ERO na presença do estresse salino. Algumas dessas enzimas que estão na linha de defesa são muito conhecidas, como a superóxido dismutase (SOD, EC, 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.15.1.1), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), glutathione peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9), guaiacol

peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7), entre outras (Gratão et al., 2015; Alves et al., 2018). Além disso, mecanismos não enzimáticos também são bem elucidados, como prolina, flavonoides e carotenoides (Gratão et al., 2015).

Esses sistemas, aliado a outras respostas fisiológicas vêm sendo muito investigados em pesquisas e correlacionados com a tolerância salina (Kiani-Poya, 2015). O milho (*Zea mays* L.) à exemplo, é uma cultura considerada moderadamente tolerante à salinidade (Richards, 1974) o que afeta seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, para manter seus níveis de produtividade destacando-se como uma das culturas mais importantes do mundo, necessita de alta demanda de nitrogênio (N) no seu cultivo e desenvolvimento. Sendo assim, são utilizados constantemente fertilizantes nitrogenados para suprir essa alta demanda de N, não contribuindo para uma abordagem ecológica favorável, além do alto custo para o produtor (Caires & Milla, 2016; Pereira & Tozoni, 2017).

Nesse contexto, pesquisas são desenvolvidas utilizando a inoculação de bactérias diazotróficas, reconhecidas pela capacidade de fixação biológica de N e promoção do crescimento vegetal em gramíneas. Um exemplo são as bactérias do gênero *Azospirillum brasilense*, que tem sido amplamente estudada, através do desenvolvimento da formulação líquida do inóculo com as cepas de interesse, outros resultados positivos foram obtidos além da promoção do crescimento e da capacidade de fixação biológica de N em plantas (Fukami et al., 2016).

Alguns destes efeitos documentados são evidenciados como uma melhor arquitetura das raízes e rendimento de grãos (Portugal et al., 2016; Pii et al., 2019; Raffi & Charyulu, 2021), e recentemente, indução de genes associados à defesa de plantas na tolerância e resistência sistêmica ao estresse (Fukami et al., 2017).

Assim, a inoculação de bactérias diazotróficas pode ser uma possível alternativa econômica e ecológica, comparada aos fertilizantes nitrogenados utilizados nesta cultura (Pereira & Tozoni, 2017; Vidotti et al., 2019). Neste sentido, como uma nova proposta dentro do estudo envolvendo o efeito da associação de bactérias diazotróficas associadas ao milho sob estresse salino, nossa hipótese foi que a potencialização dos sistemas antioxidantes de resposta

poderia estar associados nesta interação, tornando estas plantas mais tolerantes aos efeitos adversos do estresse salino.

2. OBJETIVO

O objetivo da pesquisa foi avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas da interação entre a inoculação de *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho e o estresse salino, através de uma caracterização da resposta antioxidante condicionada por esta associação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Cultura do Milho

O milho é um dos cereais mais utilizados para a alimentação humana e animal, sendo provável que seu cultivo tenha surgido há aproximadamente 8 mil anos na América Central ou no México (Magalhães, Durães & Rodrigues, 2015), utilizado como base na alimentação de povos antigos, como os maias, incas e astecas, até mesmo pelos índios brasileiros, e como costume em rituais religiosos destes povos. O grão se difundiu pelo mundo após a chegada dos europeus à América, que levaram o cereal para a Europa, e posteriormente este foi transportado até a Ásia pelos portugueses (Coelho, 2018). Hoje sua produção é difundida por todo o mundo, graças às diferentes cultivares que possibilitam o cultivo nos mais diferentes ambientes, seja nas terras frias do hemisfério norte, até locais elevados, acima de 3600 metros do nível do mar (Barros & Calado, 2014).

Pertencente à Poaceae, tribo *Maydeae*, espécie *Zea mays* L. Sua semente é classificada como cariopse, pois é dividida em três porções: pericarpo, endosperma e embrião (Barros & Calado, 2014). Possui a raiz fasciculada bem desenvolvida e extensa, apresenta raízes adventícias, que surgem nos primeiros nós do colmo e realizam a função de auxiliar na sustentação da planta. Seu caule é do tipo colmo, dividido em nós e entrenós, atuando como reserva de sacarose. As folhas possuem características comuns entre as gramíneas, estreitas, com nervuras paralelas, limbo verde escuro, com formato lanceolado e borda serrilhada. Como o milho é uma planta monoica suas inflorescências possuem tanto os órgãos reprodutores femininos como os masculinos, sendo que a parte masculina, os estames, ficam inseridos no topo do colmo. Já a inflorescência feminina, constitui os estigmas e os ovários, gerando as espigas (Barros & Calado, 2014).

É considerada a planta mais eficiente em armazenar energia, pois uma semente com menos de 0,4 gramas dará origem a uma planta com cerca de 3 metros de altura, em um prazo de nove semanas, gerando a mais de 800 grãos iguais àquele que a originou. As necessidades hídricas do milho giram em torno de 600mm por todo seu ciclo, sendo que apenas 1% da água absorvida do solo é retida pela planta para suprir suas necessidades nutricionais, já os outros 99%

são perdidos pela evapotranspiração. A importância do conteúdo de água na planta está intimamente relacionada com a fotossíntese, pois a falta de água implicaria em uma baixa disponibilidade de CO₂ para que a planta possa realizar a fotossíntese. Além de interferir em outros processos fisiológicos, como a síntese de RNA e proteínas, e na manutenção do turgor das células pelo acúmulo de solutos (Magalhães & Durães, 2006).

Seu crescimento e desenvolvimento é dividido em fases, apresentando diferentes demandas de água e nutrientes. Apesar de todas essas etapas seguirem um padrão, cada uma delas ocorrem em intervalos de tempo distintos. É possível realizar a distinção de cada uma destas fases através de um sistema de identificação, que é dividido em: Vegetativo (V) e Reprodutivo (R) (Magalhães & Durães, 2006).

Tabela 2: Estádios de desenvolvimento do milho, vegetativo e reprodutivo. Fonte: EMBRAPA.

Vegetativo	Reprodutivo
V _E (emergência)	R ₁ (embonecamento e polinização)
V ₁ (1ª folha desenvolvida)	R ₂ (bolha d'água)
V ₂ (2ª folha desenvolvida)	R ₃ (grão leitoso)
V ₃ (3ª folha desenvolvida)	R ₄ (grão pastoso)
V ₄ (4ª folha desenvolvida)	R ₅ (formação de dente)
V _n (nª folha desenvolvida)	R ₆ (maturidade fisiológica)
V _T (pendoamento)	-

Com relação aos aspectos socioeconômicos da cultura, o Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de milho, posicionando-se atrás dos Estados Unidos e da China. Sua estimativa de produção na safra de 2020/2021 correspondeu a 86,7 milhões de toneladas produzidas em 19,82 milhões de hectares (CONAB, 2021), se compararmos com a safra de 2019/2020 houve uma

queda na produção de 15,5%, e um aumento de 7% na área plantada (CONAB, 2021). Segundo a Associação Nacional dos Exportadores de Cereais (ANEC), até abril de 2021 o Brasil já exportou 2,8 milhões de toneladas de grãos de milho, apresentando um aumento de 1,064 milhões de toneladas em comparação com o mesmo período de 2020. Sendo que, 27% desse total é exportado para o Egito, o maior consumidor do grão brasileiro, seguido pelo Vietnã com 15% (ANEC, 2020).

Para manter estes níveis de produtividade altos, batendo recordes anuais de produção, o milho necessita de grandes quantidades de nitrogênio (N) no seu cultivo e desenvolvimento (Caires & Milla, 2016). No entanto, frente a alguns estresses abióticos, a produtividade pode ser afetada, como é o caso do estresse salino (Soltabayeva et al., 2021).

3.2 Estresse salino

O estresse salino é considerado um dos maiores estresses ambientais que atinge áreas de plantio irrigadas, principalmente em regiões áridas ou semiáridas (Farhangi-Abriz, 2020) sendo responsável pela redução considerável no rendimento das produções agrícolas por todo o mundo, além de dificultar o avanço sustentável da agricultura moderna (Arif et al., 2020). Suas principais causas estão ligadas às altas concentrações de sais no solo e na água utilizada para irrigação, como também aos sistemas de drenagem e irrigação de baixa qualidade (Zhao et al., 2020). É estimado que em uma escala global aproximadamente 1 bilhão de hectares sejam afetados pela salinidade, um dos causadores do estresse salino nas plantas (Soltabayeva et al., 2021).

A baixa na produtividade causada por essa condição está atrelada ao fato de que, em condições de estresse salino, o crescimento e desenvolvimento das plantas pode ser comprometido (Safdar et al., 2019). Entre os danos gerados, estão a menor taxa fotossintética, redução de clorofila, proteínas totais, biomassa, área foliar, amplitude da raiz, condutância estomática e absorção de água (Arif et al., 2020; Hasanuzzaman et al., 2020; Soltabayeva et al., 2021).

A redução da taxa fotossintética ocorre junto com a baixa na transpiração, restrição da condutância estomática e dos pigmentos fotossintéticos (Arif et al., 2020). Como a fotossíntese é um processo muito sensível à salinidade, a exposição da planta à estas condições leva a queda na atividade do fotossistema II ao desintegrar os centros de reação do mesmo. Além disso, diminui o potencial

hídrico do solo e das folhas, que leva a distúrbios nas relações hídricas, reduzindo o turgor da planta e restringindo a absorção de água.

Com o acúmulo de sais nas células, ocorre o desbalanço de íons, que é caracterizado pela alta concentração de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), e inibição na absorção de potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}). Desta forma, este desbalanço causa a chamada toxicidade iônica, que irá afetar negativamente a absorção de minerais pelos tecidos, e outros danos em decorrência do estresse oxidativo (Arif et al., 2020), como a peroxidação lipídica

O estresse oxidativo é causado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO, podem ser moléculas de oxigênio “singlet” ($^1\text{O}_2$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroxila (OH). Podem ser produzidas em diversas organelas, como na mitocôndria, peroxissomo, apoplasto e cloroplasto. Quando em baixas concentrações, em condições normais, possuem a função de sinalização e regulação durante o crescimento e desenvolvimento da planta (Hasanuzzaman et al., 2020; Riffat & Ahmad, 2020). Já em condições de estresse, a produção das ERO aumenta, causando danos em componentes moleculares e celulares em consequência da oxidação de algumas biomoléculas, como lipídios, proteínas, enzimas e DNA (Sachdev et al., 2021).

Para combater o estresse oxidativo causado pela superprodução de ERO, as plantas possuem um escudo de proteção: o sistema antioxidante. Este possui uma rede potente e complexa de defesa, com componentes enzimáticos e não enzimáticos, que podem contribuir na tolerância da planta a condições adversas ao identificar, minimizar e/ou eliminar as concentrações excessivas de ERO (Hasanuzzaman et al., 2020).

3.3 Mecanismos Antioxidantes

O sistema antioxidante é o principal mecanismo de defesa das plantas em condições de estresses abióticos, considerado um potente inibidor e eliminador de ERO (Arif et al., 2020). Este é formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que realizam a desintoxicação das ERO, diminuindo e controlando sua concentração, responsáveis pela melhora no dano causado pelo estresse oxidativo (Sachdev et al., 2021).

O ascorbato (AsA), a glutatona (GSH), o β -caroteno, o α -tocoferol, os carotenoides e a prolina, são os principais agentes não enzimáticos do

maquinário antioxidante (Dvorák et al., 2020; Sachdev et al., 2021), que evitam a formação de radicais livres, pelo sequestro ou degradação destes, assim, prevenindo os possíveis danos celulares (Barbosa et al., 2014).

A GSH participa da degradação do H_2O_2 através de uma reação catalisada pela enzima Glutathione Peroxidase (GSH-Px). Participa do ciclo Ascorbato-Glutathione (AsA-GSH), juntamente com o AsA, operando no cloroplasto, plastídio, mitocôndria e peroxissomos combatendo a superprodução de ERO (Sachdev et al., 2021). Já o ascorbato, é considerado um poderoso antioxidante que realiza a doação de elétrons em diversas reações metabólicas, contribuindo também para a remoção do H_2O_2 (Sharma et al., 2012).

Entre as principais classes de enzimas que compõem a linha de defesa antioxidante enzimática que atuam na desintoxicação de ERO, podemos citar a Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.4.2), Glutathione Peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) e a Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) (Gill & Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2020).

3.3.1 Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A SOD é uma metaloenzima encontrada em 3 isoformas: Cu/Zn-SOD; Mn-SOD e Fe-SOD. Atua na linha de frente na defesa contra a superprodução de ERO (Hasanuzzaman et al., 2020), catalisando o excedente de radicais livres O_2^- , reduzindo um radical em H_2O_2 e oxidando outro em O_2 (Sachdev et al., 2021).

3.3.2 Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.4.2)

A GR é uma flavoproteína essencial para o ciclo Asa-GSH, que regula a homeostase redox (Gill & Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2020). Sua atividade depende da ação combinada do pH, da concentração de NADPH e do dissulfeto de glutathione (GSSG). Capaz de catalisar a conversão de glutathione oxidado (GSSG) em sua forma reduzida, utilizando NADPH como doador de elétrons, mantendo o equilíbrio entre a proporção GSH/GSSG necessária para desintoxicação de H_2O_2 (Sachdev et al., 2021; Sharma et al., 2012).

3.3.3 Glutathione Peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

Classe de isoenzimas que utilizam a glutathione para reduzir o H_2O_2 , protegendo as células do dano oxidativo. Considerada uma enzima reguladora redox (Gill & Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2020).

3.3.4 Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7)

Considerada uma enzima importante no combate a estresses abióticos, utilizando o H_2O_2 . Em algumas espécies de plantas, quando expostas ao estresse salino, pode ocorrer um aumento de sua atividade tanto nas folhas, como nas raízes para reduzir os danos oxidativos causados por esta condição (Gill & Tuteja, 2010).

3.4 Fertilização Nitrogenada

Um dos macronutrientes mais importantes e limitantes na produção do milho é o Nitrogênio (N). Nutriente mineral essencial para a cultura que está presente na composição de aminoácidos, proteínas, clorofila e enzimas. Além de desempenhar um papel essencial na síntese de proteínas, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (Anas et al., 2020; Okumura et al., 2011). O N é responsável por atuar em diversas funções da planta, como crescimento, desenvolvimento, metabolismo e alocação de recursos (Ahmed et al., 2017). Este afeta, ainda, na produtividade do grão, influenciando no peso dos grãos, número de espigas por planta, altura da planta adulta, peso e comprimento das espigas, diâmetro do colmo, e na produção de matéria seca (Okumura et al., 2011).

No entanto, em torno de 98% do N presente no solo está disponível na forma orgânica, desta forma, somente 2% se apresenta na forma inorgânica, seja na forma de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-), pronto para ser absorvido pelas plantas. As formas inorgânicas se formam a partir da mineralização que ocorre pela hidrólise enzimática produzida pela atividade da microbiota do solo, ou pela aplicação de fertilizantes químicos (Okumura et al., 2011).

O uso destes fertilizantes sintéticos é amplamente difundido entre os produtores, sendo que sua utilização pode aumentar os índices de produtividade das plantas (Ahmed et al., 2017). Nos últimos 30 anos a aplicação de N vem aumentando exponencialmente (Sun et al., 2020). Segundo a Associação Internacional de Fertilizantes (IFA), na safra 20/21 haverá um aumento de 1,6% no uso de fertilizantes nitrogenados, chegando a uma demanda mundial de 108.4 Mt (IFA Market Intelligence, 2020).

Desta forma, a dose de fertilizante aplicada deve ser exata, pois em baixas quantidade causa uma queda na produtividade da cultura, e caso seja excessiva

causa sérios danos ao solo e ao meio ambiente, além de não ser rentável para os produtores (Anas et al., 2020; Okumura et al., 2011). A aplicação excessiva pode causar a acidificação do solo, o que torna o ambiente inóspito para as plantas, tendo impactos negativos no crescimento e desenvolvimento das plantas (Sun et al., 2020). O nitrato é o produto formado pelos fertilizantes nitrogenados, a porção que não é absorvida pelas plantas será lixiviada para os cursos de água e porções de águas subterrâneas (Ahmed et al., 2017).

O excesso de N em ambientes aquáticos pode gerar eutrofização, e assim limitando a quantidade de oxigênio para os organismos do local. A contaminação de fontes de água utilizadas para consumo, e de alimentos que recebem a fertilização nitrogenada, são as principais causas de exposição humana, podendo causar problemas de saúde, como câncer, hipertensão, defeitos do tubo neural, diabetes e síndrome do bebê azul (metemoglobinemia) (Ahmed et al., 2017).

Portanto, é pertinente o uso de alternativas mais baratas, e menos poluentes ao meio ambiente, visando a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados. Assim, uma forma de assimilação do nitrogênio pelas plantas é a inoculação de bactérias diazotróficas, que aumentam a produtividade e melhoram o crescimento vegetal em gramíneas (Fukami et al., 2016).

3.5 *Azospirillum brasilense*

A *Azospirillum brasilense* pertence a classe das bactérias diazotróficas, também classificadas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB), são microrganismos que podem viver em simbiose com as plantas e auxiliam no processo de fixação biológica de nitrogênio (Santos et al., 2018). São utilizadas como biofertilizantes, já que o método de inoculação tem se mostrado uma alternativa para alcançar uma agricultura mais sustentável, com baixos custos ambientais e econômicos, além de diminuir o uso de fertilizantes sintéticos (Oliveira et al., 2017).

As PGPBs têm sido muito estudadas por possuírem muitos efeitos benéficos às plantas, além da fixação biológica de nitrogênio (Vidotti et al., 2019). Dentre esses efeitos podemos citar o aumento no comprimento e na densidade dos tricomas nas raízes, maior número de raízes secundárias, aumento na área total (Latef et al., 2020), e expansão das raízes, o que acarreta uma maior exploração do solo atingindo camadas mais profundas em busca de água e

nutrientes (Vidotti et al., 2019). Além do aumento da biomassa, altura da planta, tamanho das folhas, absorção de nutrientes, conteúdo de nitrogênio nos tecidos, e a ativação da produção de fitormônios (Raffi & Charyulu, 2021).

A inoculação de *A. brasilense* em cereais, em especial o milho, demonstrou um aumento na produtividade de 10 a 15%, com um rendimento 30% maior nos grãos, reduzindo a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados em 25%, além de propiciar um aumento no crescimento da planta, aprimorando características bioquímicas, e melhorando a eficiência no uso de nitrogênio sob condições de déficit do mesmo (Latef et al., 2020; Vidotti et al., 2019).

4. METODOLOGIA

4.1 Experimento

O trabalho foi realizado no departamento de Biologia aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal – SP. Foi utilizado o híbrido comercial de milho (2A401PW), adquirido no Departamento de Produção Vegetal da FCAV-UNESP. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, sendo eles: controle, controle com inoculação de *A. brasilense*; estresse salino por cloreto de sódio (100 Mm de NaCl); e estresse salino com inoculação de *A. brasilense*, contendo 4 repetições por tratamento. A inoculação foi realizada nas sementes e após 15 dias da semeadura (via solo), nos tratamentos que receberam a inoculação da mesma. A aplicação do estresse salino (100 Mm de NaCl) iniciou simultaneamente a segunda inoculação, via água de irrigação, sendo feita diariamente até o momento da coleta.

Os híbridos foram semeados em vasos com capacidade de 5 litros, contendo uma mistura comercial de substrato (Plantmax HT Eucatex, Brasil) e suplementados com pó de coco de baixa condutividade elétrica (1,1dS m⁻¹) (Nunes, 2000, Amafibra®). Na inoculação com *A. brasilense* foi utilizado um produto comercial, contendo cepas AbV5 e AbV6 (QualyFix Gramínea, Brasilquímica), com as dosagens recomendadas pelo fabricante que correspondem a 100 mL por 25 kg de sementes para inoculação via sementes e 600 mL/ha para inoculação via solo. As plantas foram cultivadas até o estágio V5 com irrigação diária e uniforme. No fim do experimento, 32 dias após a semeadura, foi determinado a massa fresca e seca, e o teor de Na⁺. As raízes e as folhas foram coletadas, lavadas, e imersas em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para posterior análises de extração de proteínas totais e determinação dos sistemas antioxidantes.

4.2 Análises

4.2.1 Caracterização do estresse oxidativo

Para a caracterização do estresse foi realizada a análise de peroxidação lipídica, pela quantificação do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), destacando entre estas o malondialdeído (MDA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 535 a 600 nm (Gratão *et al.*, 2015)

4.2.2 Determinação do teor de Na⁺

Na determinação do teor de sódio nas raízes e folhas, foi realizada a digestão com uma mistura de ácidos nítrico e perclórico (Carmo *et al.*, 2000). Foram determinadas pelo método de espectrofotometria de emissão de chama utilizando um fotômetro de chama (Micronal – B462). As concentrações são expressas em mg kg⁻¹ de massa seca.

4.3 Análises bioquímicas

4.3.1 Extração de enzimas e Determinação de proteínas

As folhas e raízes frescas são homogeneizadas, em um cadinho resfriado com o auxílio de um pilão, usando um tampão de extração contendo 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,5), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM, DL-ditiotreitol 3 mM, e 5% (w / v) de PVPP insolúvel em um volume 3: 1 / peso fresco razão (Boaretto *et al.* 2014). O homogeneizado é centrifugado a 11.000 × g (30 min), e o sobrenadante armazenado a - 80 ° C para determinação das atividades enzimáticas. A concentração de proteína é determinada seguindo o método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

4.3.2 Superóxido Dismutase (SOD, EC, 1.15.1.1)

A atividade enzimática da SOD ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi determinada seguindo o protocolo desenvolvido por Giannopolitis e Ries (1997). O meio do 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 reagiu 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.

4.3.3 Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.4.2)

A determinação da atividade de GR ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi realizada 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.

4.3.4 Glutathione Peroxidase (GSH-PX, EC 1.11.1.9)

A determinação da atividade de GPX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi feita 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 (mM). Essa mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a reação catalisada pela adição de 1,5 mM de NADPH e 1,5 mM de H_2O_2 . Monitoramos a oxidação por 5 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM cm^{-1} (Anderson & Davis, 2004).

4.3.5 Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7)

Para determinar a atividade enzimática da GPOX foi utilizado uma mistura contendo tampão fosfato-citrato com pH 5,0 (fosfato de sódio dibásico 0,2 M: ácido cítrico 0,1M), 0,5% de guaiacol e o extrato. Então a solução foi agitada em vortex com adição de H_2O_2 e incubados a 30°C durante 15 minutos. A reação foi interrompida por transferência imediata para um banho de água gelada, após foi adicionado 2% de solução de metabissulfito de sódio (Monteiro et al. 2011). A atividade foi avaliada monitorando a absorbância no comprimento de onda de 450 nm.

4.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software AGROESTAT (Barbosa & Junior, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

5.1.1 Caracterização do estresse oxidativo

A peroxidação lipídica, expressa como teor de MDA é um indicativo de dano na membrana. Os dados obtidos no sistema radicular (Figura 1A) demonstraram maior concentração no tratamento exposto à salinidade sem inoculação. Os tratamentos em que foi feita a inoculação, sendo na ausência (Controle + *A. brasilense*) ou na presença de sal (NaCl + *A. brasilense*), não apresentaram diferença estatística. Entretanto, em comparação aos tratamentos que receberam o estresse salino (NaCl), houve diminuição no teor de MDA.

Na parte aérea (Figura 1B), também foi demonstrado maior concentração de MDA na condição de estresse salino (NaCl). As plantas que estavam na mesma condição de estresse, mas foram inoculadas (NaCl + *A. brasilense*) apresentaram um teor consideravelmente menor, sendo a menor concentração entre todos os tratamentos. Já as plantas inoculadas que não foram expostas ao estresse (Controle + *A. brasilense*) não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle.

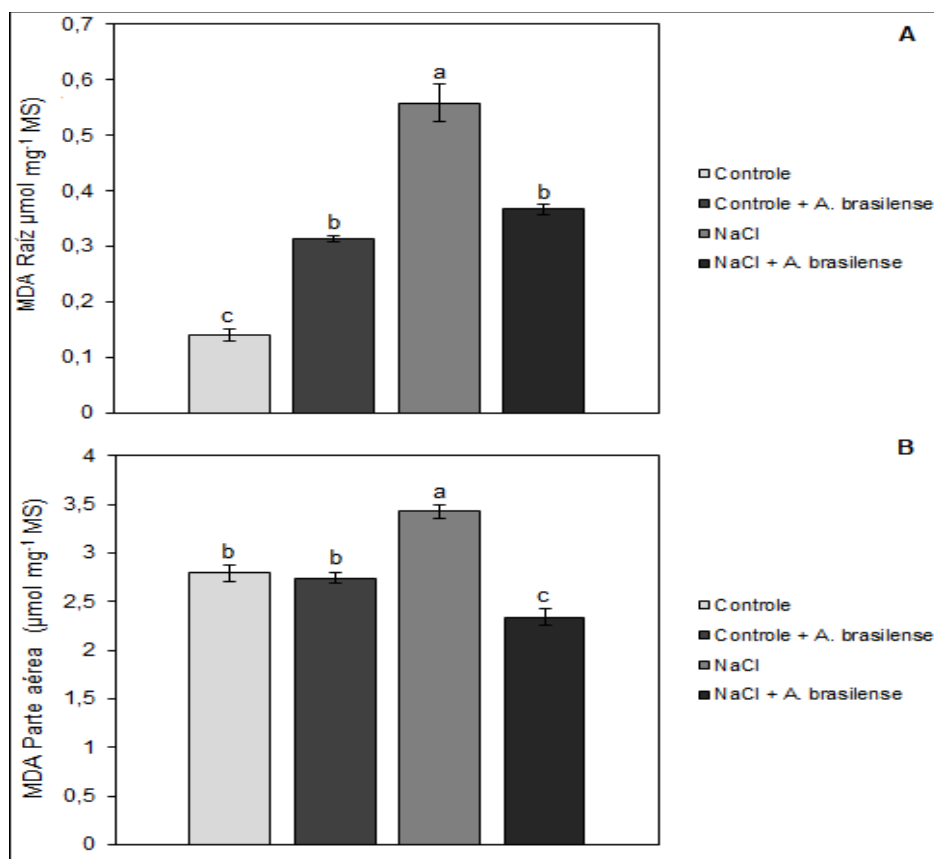


Figura 1. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre o conteúdo de MDA nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n=4$); barras verticais indicam o erro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

5.1.2 Determinação do teor da Na^+

Nas raízes (Figura 2A) os maiores valores observados foram nos tratamentos expostos à salinidade independente da inoculação de *A. brasilense*. Porém, ao comparar com a condição 100 mM NaCl, o maior teor foi observado na presença de *A. brasilense*. Não foi observado diferença estatística entre o tratamento sem estresse com inoculação do tratamento controle.

Na parte aérea (Figura 2B), a maior teor de Na^+ foi observada no tratamento em que as plantas foram expostas ao estresse salino, mas não foram inoculadas. Já as plantas que estavam na condição de 100 mM NaCl apresentaram o segundo teor mais alto de Na^+ . No entanto, as plantas que foram inoculadas e foram expostas a salinidade apresentaram um decréscimo no teor de sal. Por fim, os tratamentos sem salinidade não demonstraram diferenças estatísticas.

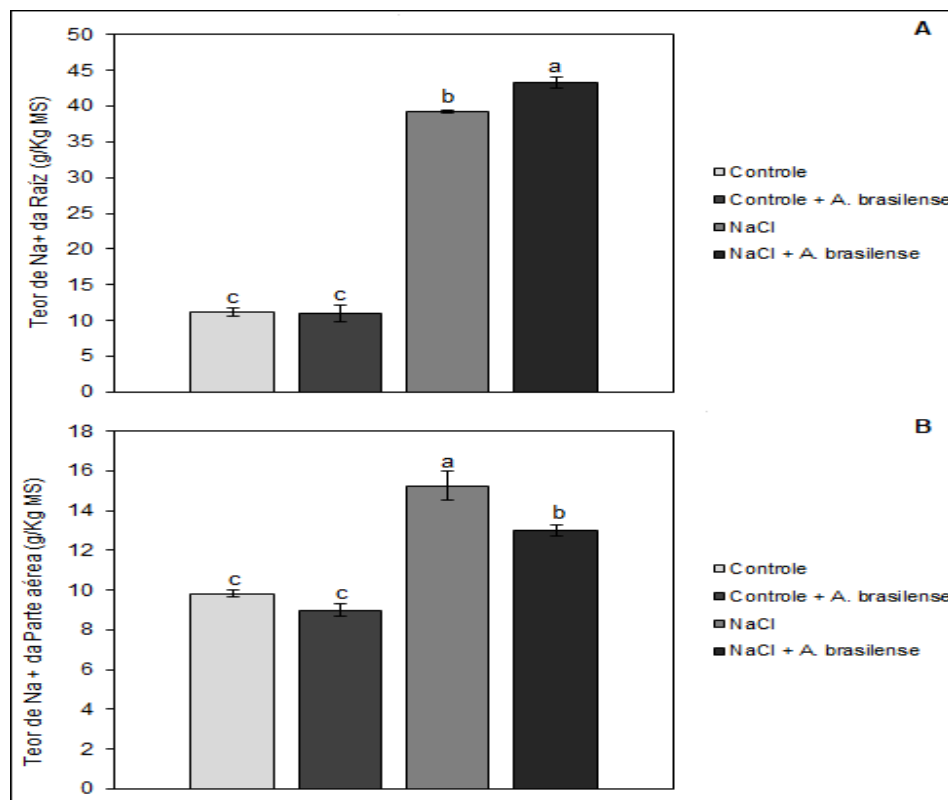


Figura 2. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre o acúmulo de Na⁺ nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n = 4$); barras verticais indicam o erro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

5.1.3 Análises bioquímicas

5.1.3.1 Superóxido Dismutase (SOD, EC, 1.15.1.1)

Nas raízes (Figura 2A), houve decréscimo na atividade enzimática da SOD no tratamento de estresse por sal com inoculação (NaCl + *A. brasilense*). Em contrapartida, a maior taxa de atividade foi observada no tratamento Controle com inoculação de *A. brasilense*. Ambos, controle e estresse salino sem inoculação, não apresentarem diferenças estatísticas.

Nas folhas (Figura 3B) ocorreu diferença estatística entre todos os tratamentos. Sendo que, similar as raízes, a menor taxa de atividade enzimática ocorre no tratamento NaCl + *A. brasilense*. Podemos observar o maior índice no tratamento em que as plantas receberam o estresse, mas não foram inoculadas, seguida pelo tratamento controle com inoculação.

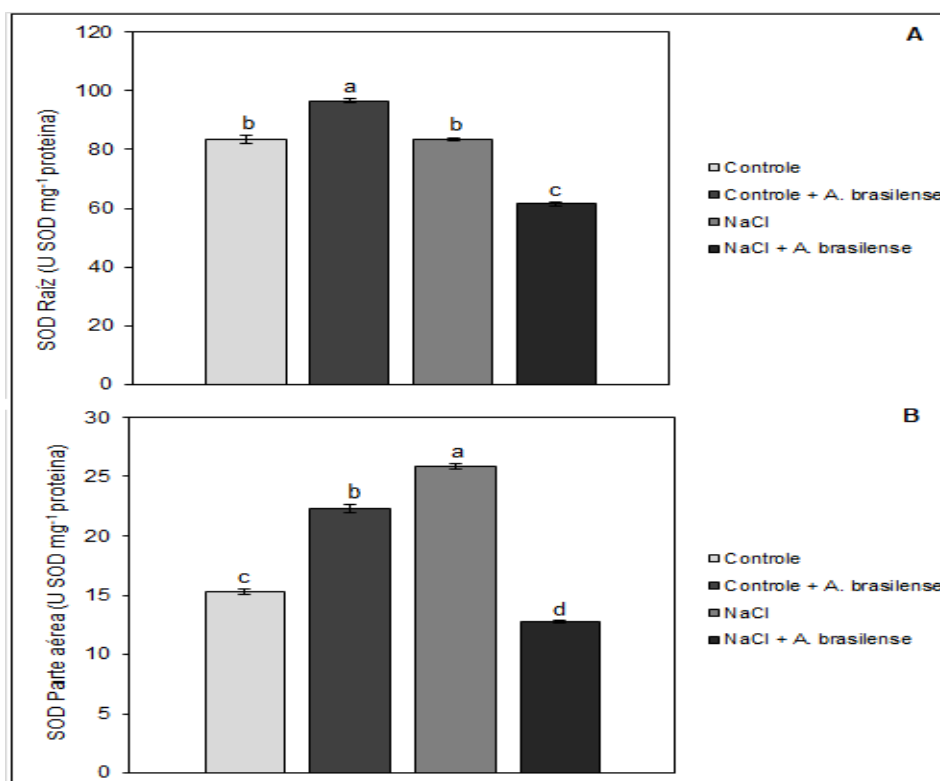


Figura 3. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima SOD nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n=4$); barra verticais indicam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

5.1.3.2 Glutathiona Redutase (GR, EC 1.6.4.2)

Entre os dados das raízes (Figura 4A), o único tratamento que apresentou diferença estatística foi o qual as plantas foram condicionadas ao estresse salino.

Já na parte aérea (Figura 4B), todos os tratamentos se diferenciam entre si. Assim, observamos as menores taxas de atividade enzimática no tratamento controle, seguida pelos tratamentos Controle + *A. brasilense* e NaCl + *A. brasilense*, que apresentaram um acréscimo. Por fim, a maior taxa de atividade foi observada no tratamento que as plantas foram expostas ao estresse salino.

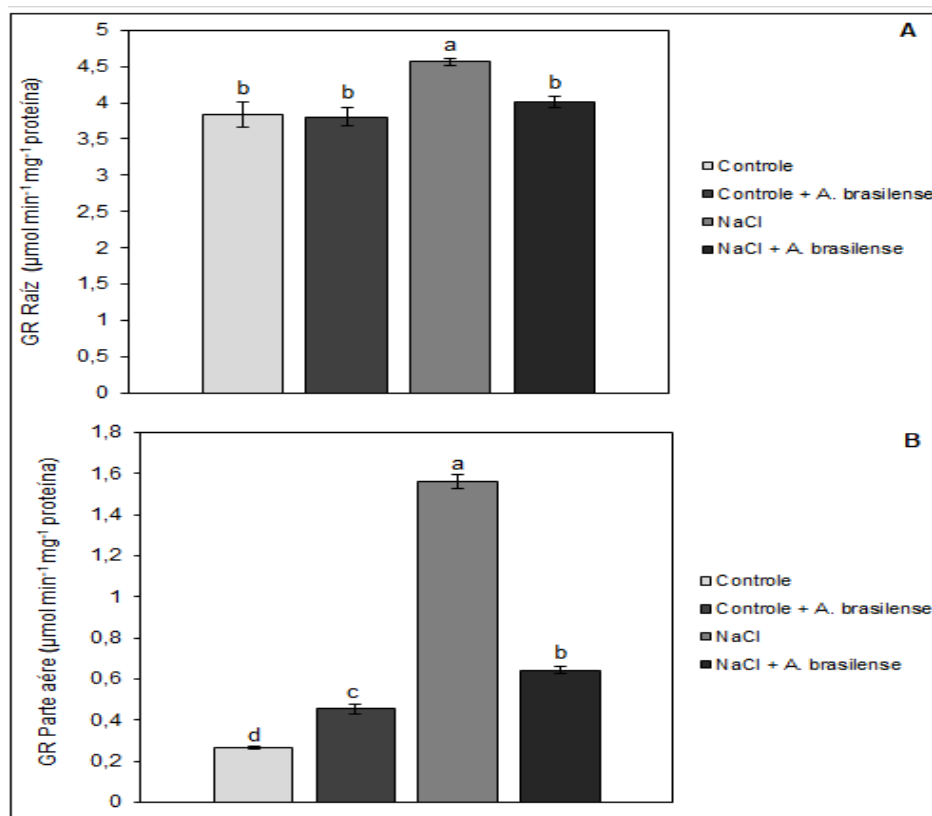


Figura 4. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GR nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n=4$); barras verticais indicam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

5.1.3.3 Glutathiona Peroxidase (GSH-Px, EC 11.11.1.9)

Nas raízes (Figura 5A), as maiores taxas de atividade enzimática foram observadas nos tratamentos com inoculação da bactéria, com e sem NaCl. O menor índice de atividade foi encontrado no tratamento controle.

Na parte aérea (Figura 5B), apesar dos tratamentos Controle + *A. brasilense* e NaCl não apresentarem diferença entre si, tiveram taxas de atividade enzimática mais altas se comparadas as plantas controle. No entanto, a maior taxa encontrada foi no tratamento de estresse salino com inoculação da bactéria.

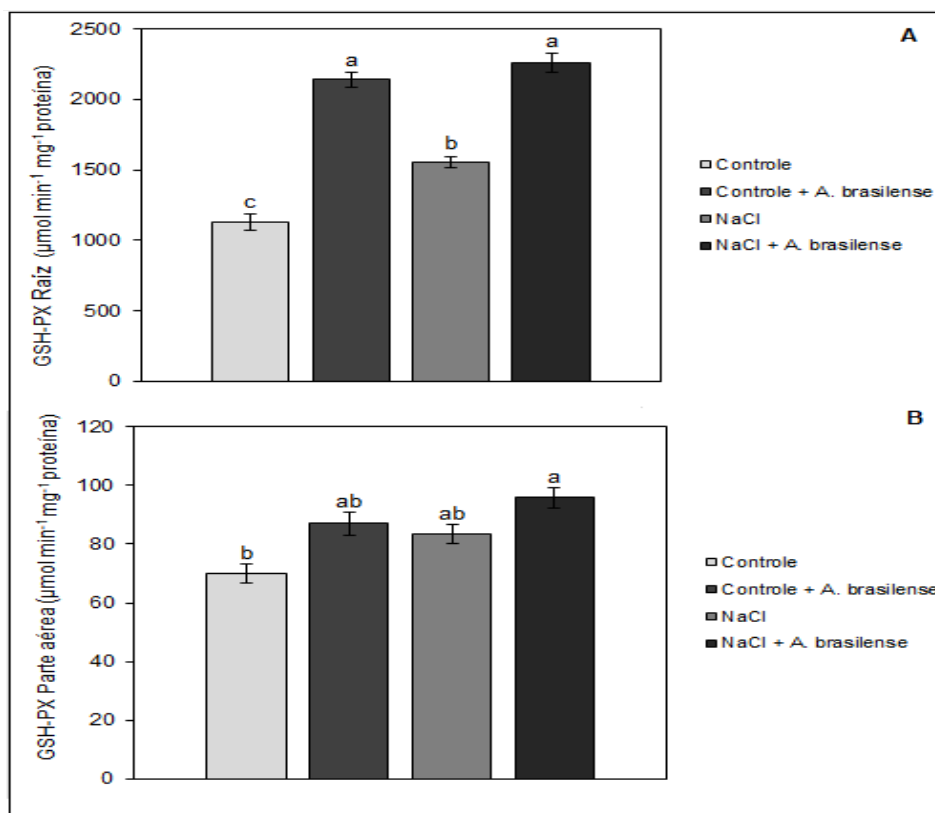


Figura 5. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GSH-Px nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n=4$); barras verticais indicam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

5.1.3.4 Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC, 1.11.1.7)

Tanto nas raízes (Figura 6A) como nas folhas (Figura 6B) os resultados da atividade enzimática da GPOX foram semelhantes. Observou-se que as maiores taxas em ambos os tecidos foram encontradas no tratamento NaCl + *A. brasilense*, quando comparadas com os demais tratamentos.

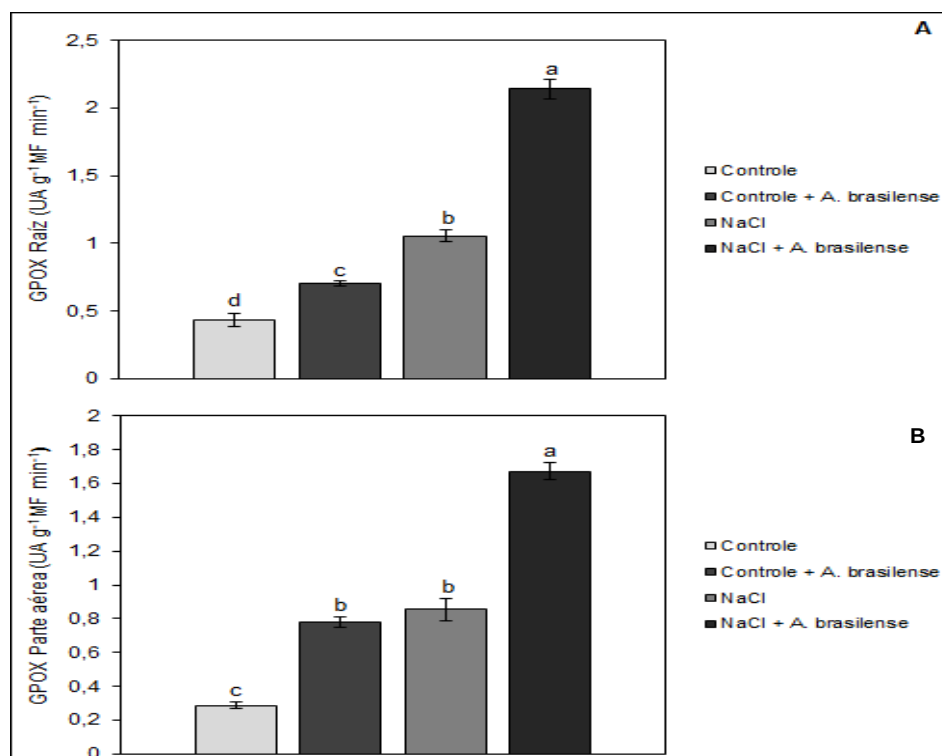


Figura 6. Efeito da inoculação de *A. brasilense* e estresse salino sobre a atividade da enzima GPOX nas raízes (A) e folhas (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os valores representam médias de quatro repetições ($n=4$); barras verticais indicam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

5.2 Discussão

A fisiologia das plantas permite que elas se mantenham em equilíbrio com a produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO), pela ação coordenada de componentes do maquinário antioxidante (Sharma et al., 2012; Hasanuzzaman et al., 2020). Em baixas concentrações, as ERO possuem a função de sinalização e regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Riffat & Ahmad, 2020). No entanto, em condições de estresse essa produção é amplificada, e o excesso destas moléculas causam danos a membrana celular, danificando os lipídios de membrana, além de ocasionar oxidação de proteínas, DNA, entre outros malefícios as células (Liang et al., 2018). Uma vez que estes danos são mensurados pelo conteúdo de MDA (Figura 1), com base nas análises realizadas, os dados demonstram que a concentração de sal utilizada (100mM), foi suficiente para causar impactos negativos na planta, tanto nas raízes como nas folhas quando comparadas ao controle.

Isso ocorre, pois, a salinidade é um dos principais estressores que causam modificações severas no metabolismo da planta, como distúrbios nas relações hídricas, estresse osmótico, estresse oxidativo, além do desbalanço iônico (Arif et al., 2020; Zhao et al., 2020). Assim, o acúmulo de MDA (Figura 1) atua como um indicativo do estresse gerado, já que esta molécula é um dos aldeídos formados pela peroxidação lipídica (Soltabayeva et al., 2021). Por outro lado, as plantas que foram inoculadas apresentaram redução no acúmulo de MDA nos tecidos. Portanto, é possível que a inoculação de *A. brasilense* possa ter aumentado a tolerância ao sal, reduzindo o acúmulo do MDA, evitando os danos tóxicos causados pelo acúmulo de Na^+ (Wu et al., 2017).

Como era esperado, houve o acúmulo de Na^+ (Figura 2) nas plantas sob condição estressante. No entanto, os tecidos avaliados demonstraram respostas diferentes com a inoculação da bactéria, havendo um acúmulo maior nas raízes e decréscimo nas folhas. Isso ocorreu, pois no milho, o redirecionamento do Na^+ nos tecidos via floema é considerado um dos mecanismos mais eficientes na proteção das células foliares contra toxicidade salina. Sendo que, o Na^+ é absorvido da parte aérea e transportado para as raízes, de maior para menor concentração (Xiong et al., 2018). Ainda, existem outros mecanismos de interação bactéria/estresse, que irão agir para aumentar a tolerância das plantas ao estresse. No entanto, estes diferentes mecanismos variam de acordo com a espécie e cultivar, podendo agir simultaneamente para conferir tolerância, ou atuar de forma específica para diferentes condições estressantes (Roy et al., 2014).

Estudos recentes relatam que a inoculação com *Azospirillum* spp. pode alterar a interação bactéria-planta sob condição de estresse, o que induz a síntese de enzimas antioxidantes, minimizando os efeitos negativos causados por ERO (Fukami et al. 2017, Fukami et al. 2018). Portanto, a interação plantas de milho e *A. Brasilense* demonstra a diminuição dos danos ocasionados pela peroxidação lipídica à membrana, o que pode estar relacionada à indução de sistemas de defesa antioxidante.

Os resultados demonstraram uma redução da atividade da SOD (Figura 3) nas plantas submetidas à condição salina e inoculadas com a bactéria, tanto nas raízes como nas folhas. No entanto, na ausência do estresse salino, as plantas

inoculadas demonstraram maior atividade enzimática, e desta forma, não houve uma associação suficiente para amenizar o efeito deletério causado pelo estresse no sistema antioxidante. Apesar desta enzima ser a primeira na linha de defesa do mecanismo antioxidante (Hasanuzzaman et al., 2020), convertendo as ERO em H_2O_2 e O_2 , moléculas que são menos tóxicas a planta (Sachdev et al., 2021), é provável que a resposta desta enzima não tenha sido suficiente para atenuar os efeitos causado pela ERO na associação bactéria/estresse.

As enzimas GR (Figura 4) e a GSH-Px (Figura 5) auxiliam na redução da glutathiona oxidada (GSSG), que está presente no ciclo ascorbato (AsA) / glutathiona (GSH). Esses compostos são considerados os principais antioxidantes solúveis não enzimáticos, que atuam na desintoxicação de ERO, interagindo entre si pelo ciclo AsA/GSH. Assim, em condições normais na presença da GR, as plantas são capazes de manter o conteúdo de GSH e GSSG, reduzindo o GSH utilizando moléculas de NADPH como doador de elétrons (Szarka et al., 2012), mantendo um equilíbrio necessário para a desintoxicação de H_2O_2 (Sachdev et al., 2021)

Os resultados da enzima GR (Figura 4) demonstraram maior atividade nas folhas do que nas raízes, o que pode estar relacionado ao mecanismo de tolerância ao sal através do redirecionamento Na^+ das raízes para as folhas. Já a GSH-Px (Figura 5) está presente em outras funções importantes nas plantas, como cascatas salinas, sinalização de ácido abscísico e homeostase redox (Zhai et al., 2013). Isto possivelmente explica o aumento da atividade da enzima nas plantas inoculadas com *A. brasilense*, reduzindo as cascatas salinas, atenuando o dano oxidativo causado pelo estresse salino.

Em relação à GPOX (Figura 6), plantas sob condição do estresse salino e inoculadas com a bactéria exibiram aumento na atividade enzimática, comparado aos outros tratamentos. Em algumas espécies de plantas sua atividade é aumentada em condições de estresse (Gill & Tuteja, 2010). Assim, esse aumento pode ser justificado pela ação da GPOX tanto na eliminação efetiva das ERO, quanto no crescimento das plantas (Sharma et al., 2012), sendo possível que a bactéria tenha impulsionado a eliminação dessas moléculas.

Com os dados apresentados, foi possível observar um efeito benéfico da inoculação de *A. brasilense* no milho sob a condição estressante. No entanto,

ainda é preciso realizar mais pesquisas para esclarecer os mecanismos que estão envolvidos nessa interação entre estresse/bactéria que pode conferir tolerância das plantas aos efeitos do estresse salino.

6. CONCLUSÃO

Assim, foi possível concluir que, a presença de *A. brasilense* no milho em condições de estresse salino pode ocasionar o aumento da tolerância nas plantas, minimizando os danos oxidativos e aumentando as respostas antioxidantes de GSH-Px e GPOX.

7. REFERÊNCIAS

Ahmed M., Rauf M., Mukhtar Z., Saeed N. A. Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 26983-26987, 2017.

Associação Nacional dos Exportadores de Cereais (ANEC). Maize Export Statistics. Disponível em: <https://anec.com.br/article/anec-142021-accumulated-exports>. Acessado em: 25/05/2021

Anderson J.V., Davis D.G. Abiotic stress alters transcript profiles activity of glutathione S transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum** 120: 421-433. 2004.

Alves R.C., Medeiros A.S., Nicolau M.C.M., Neto A.P., Oliveira F.A., Lima L.W., Tezotto T., Gratão P.L. The partial root-zone saline irrigation system and antioxidant responses in tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 127: 366-379. 2018.

Anas M., Liao, F., Verma K. K., Sarwar M. A., Mahmood A., Chen Z. L., Li Q., Zeng X., Liu Y., Li Y. R. Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. **Biological Research**, v. 53, n. 1, p. 1-20, 2020.

Arif Y., Singh P., Siddiqui H., Bajguz A., Hayat S. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 64-77, 2020.

Barbosa M. R., Silva M. M. D. A., Willadino L., Ulisses C., Camara T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

Barbosa J. C, Maldonado JR., W. Agronomic experimentation and AgroEstat: system for statistical analysis of agronomic trials. **Jaboticabal, BR: Multipress**. 396p. ISBN:978-85-68020-01-2. 2015.

Barros J. F., & Calado J. G. A cultura do milho. 2014.

Boaretto L.F., Carvalho G., Borgo L., Creste S., Landell M.G.A., Mazzafera P., Azevedo R.A. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non- tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiol Biochem** 74:165–175. 2014

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254. 1976.

Caires E. F. & Milla R. Adubação nitrogenada em cobertura para o cultivo de milho com alto potencial produtivo em sistema de plantio direto de longa duração. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 87-95, 2016.

Cakmak I., & Horst W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83(3), 463-468. 1991.

Carmo C.A.F.S., Araújo W.S., Bernardi A.C.C., Saldanha M.F.C. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na embrapa solos. **Embrapa Solos** (Circula técnica 6), 46. 2000.

Coêlho J. D. Produção de grãos: feijão, milho e soja. 2018.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 10 décimo primeiro levantamento, agosto. 2021

Dvorak P., Krasnylenko Y., Zeiner A., Samaj J., & Takac T. Signaling toward ROS-scavenging enzymes in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2178, 2020.

Farhangi-Abriz S., Tavasolee A., Ghassemi-Golezani K., Torabian S., Monirifar H., Rahmani H. A. Growth-promoting bacteria and natural regulators

mitigate salt toxicity and improve rapeseed plant performance. **Protoplasma**, v. 257, n. 4, p. 1035-1047, 2020.

Fukami J., Nogueira M. A., Araujo R. S., Hungria M. Assessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **Amb Express**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

Fukami J., Ollero F.J., Megías M., Hungria M. 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. 2017.

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

Giannopolitis C.N. & Ries S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** 59: 309-314. 1977.

Gill S. S., & Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

Gratão P.L., Monteiro C.C., Tezotto T., Carvalho R.F., Alves L.R., Peter L.J., Azevedo R.A., Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biometals**. 28, 803-816. 2015.

Hasanuzzaman M., Bhuyan M. H. M., Parvin K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Hossen, S., Zulfikar, F., Alam, M., Fujita, M. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8695, 2020.

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

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

Latef A. A. H. A., Alhmad M. F. A., Kordrostami M., Abo-Baker A. B. A. E., & Zakir A. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 3, p. 1293-1306, 2020.

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

Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids; pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** 148: 350-382. 1987.

Magalhaes P. C., & Durães F. O. Fisiologia da produção de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

Magalhães P. C., Durães F. O., & Rodrigues J. D. S. Ecofisiologia. **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2015.

Monteiro C.C., Carvalho R.F., Gratão P.L., Carvalho G., Tezoto T., Medici L.O., Peres L.E.P., Azevedo R.A. Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutante subjected to cádmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany** 71: 306-320. 2011.

Pereira L. C., & de Lelis Tozoni M. Inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* associado à fertilização nitrogenada na cultura do milho. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. n-31, 2017.

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

Portugal J.R., Arf O., Peres A.R., Gitti D.C., Rodrigues R.A.F., Garcia N.F.S., Gare L. *Azospirillum brasilense* promotes increment in corn production. **African Journal of Agricultural Research** 11:1688-1698. 2016.

Oliveira A. L., Santos O. J., Marcelino P. R., Milani K. M., Zuluaga M. Y., Zucareli C., & Gonçalves L. S. Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1873, 2017.

Okumura R. S., de Cinque Mariano D., & Zaccheo P. V. C. Use of nitrogen fertilizer in corn: Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2011.

Raffi M. M., & Charyulu P. B. B. N. Azospirillum-biofertilizer for sustainable cereal crop production: Current status. In: **Recent developments in applied microbiology and biochemistry**. Academic Press. p. 193-209. 2021.

Richards L.A. Suelos salinos y sodicos: Diagnostico y rehabilitacion. 6.ed. México: Editorial Limusa.172p. 1974.

Riffat A. & Ahmad M. S. A. Regulation of antioxidant activity in maize (Zea mays L.) by exogenous application of sulfur under saline conditions. **Turkish Journal of Botany**, v. 44, n. 1, p. 62-75, 2020.

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

Sachdev S., Ansari S. A., Ansari M. I., Fujita M., & Hasanuzzaman M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 277, 2021.

Safdar H., Amin A., Shafiq Y., Ali A., Yasin R., Shoukat A., Hussan M. U., Sarwar M. I. A review: Impact of salinity on plant growth. **Nat. Sci**, v. 17, n. 1, p. 34-40, 2019.

Santos A. D. A., Silveira J. A. G. D., Bonifacio A., Rodrigues A. C., & Figueiredo M. D. V. B. Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt stress. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 3, p. 513-521, 2018.

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., & Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, 2012.

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

Soltabayeva A., Ongaltay A., Omondi J. O., & Srivastava S. Morphological, Physiological and Molecular Markers for Salt-Stressed Plants. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 243, 2021.

Sun J., Li W., Li C., Chang W., Zhang S., Zeng Y., Zeng C. & Peng, M. Effect of different rates of nitrogen fertilization on crop yield, soil properties and leaf physiological attributes in banana under subtropical regions of China. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2083, 2020.

Vidotti M. S., Matias F. I., Alves F. C., Pérez-Rodríguez P., Beltran G. A., Burgueño J., Crossa J. & Fritsche-Neto, R. Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: Insights into genetic control, heterosis and genomic prediction. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0217571, 2019.

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

Xiong X., Liu N., Wei Y., Bi Y., Luo J., Xu R., Zhou J., Zhang Y. 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. 2018.

Zhai C.Z., Zhao L., Yin L.J., Chen M., Wang Q.Y., Li L.C., Xu S.C., Ma Z. Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H₂O₂ tolerances in Arabidopsis. **PloS One** 8. 2013.

Zhao C., Zhang H., Song C., Zhu J. K., & Shabala S. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. **The innovation**, v. 1, n. 1, p. 100017, 2020.