

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae*
ASSOCIADA A GENÓTIPO DE TRIGO SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO
E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Marechal Cândido Rondon

2015

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae*
ASSOCIADA A GENÓTIPO DE TRIGO SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO
E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Magister Scientiae.

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
Coorientadores: Prof^ª. Dr^ª Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães**

Marechal Cândido Rondon

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR.,
Brasil)

H497e	Hendges, Flávia, B. Efeito antioxidante da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> associada a genótipo de trigo submetido ao déficit hídrico e fertilização nitrogenada / Flávia, B. Hendges. – Marechal Cândido Rondon, 2015. 63 p.
	Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa Coorientadores: Prof ^a Dr ^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
	Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2015.
	1. Trigo. 2. Fertilizantes nitrogenados. I. Costa, Antonio Carlos Torres. II. Vendruscolo, Eliane Cristina Gruszka. III. Guimarães, Vandeir Francisco. IV. Título.

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

**EFEITO ANTIOXIDANTE DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae*
ASSOCIADA A GENÓTIPO DE TRIGO SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO E
ADUBAÇÃO NITROGENADA**

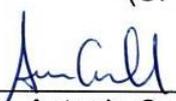
Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, para obtenção do título
de Magister Scientiae.

APROVADA: 30 de julho de 2015


Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos
(UFPR)


Prof. Dr. Vander Francisco Guimarães
(Coorientador)
(UNIOESTE)


Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo
(Coorientadora)
(UFPR)


Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
(Orientador)
(UNIOESTE)



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Tecnóloga em Biotecnologia **Flávia Bordignon Hendges**. Aos trinta dias do mês de julho de 2015, às 08h, sob a presidência do Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa da Dissertação da Tecnóloga em Biotecnologia Flávia Bordignon Hendges, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRA EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos (UFPR), Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Unioeste), Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo (UFPR) e Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa (Orientador).

Iniciados os trabalhos, o candidato apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Efeito antioxidante da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* associada a genótipo de trigo submetido ao déficit hídrico e adubação nitrogenada"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos.....Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Coorientador).....Aprovado
Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo (Coorientadora).....Aprovado
Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa (Orientador).....Aprovado

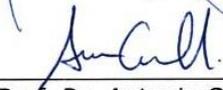
Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRA EM AGRONOMIA"**, área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 30 de julho de 2015.


Prof.^a Dr.^a Marise Fonseca dos Santos

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
(Coorientador)


Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo
(Coorientadora)


Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
(Orientador)

*À Deus pelo dom da vida,
À minha família, minha base
sempre disposta a ajudar
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo de forma especial a DEUS, pela oportunidade de concluir mais esta etapa, por sempre estar ao meu lado e no comando de tudo, me guiando e iluminando.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e coordenação do curso de pós-graduação em Agronomia - PPGA.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPQ/INCT pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa, pela orientação, dedicação e sugestões durante a realização do mestrado.

À minha Coorientadora Prof^a. Dr^a. Eliane Vendruscolo por todos os ensinamentos, incentivo e também amizade possibilitando a realização deste trabalho, em especial por ser capaz de acreditar em meu potencial. Sempre disponível e disposta a ajudar, estendendo as mãos nos momentos mais difíceis, mostrando-me o caminho correto querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Agradeço de forma especial à Prof^a. Dr^a. Marise Fonseca dos Santos, que não mediu esforços para me ajudar, agradeço por todas as contribuições, sempre com uma solução simples para os meus problemas enzimáticos que pareciam ser gigantes. Obrigada professoras por esses dois anos de convivência, confiança e dedicação.

À UFPR - Setor Palotina, em especial ao LABIOGEN, pela concessão do Laboratório, infraestrutura e por possibilitar minha capacitação. Ao Prof. Dr. Robson Missio pelo empréstimo da casa de vegetação durante todo o experimento.

Ao meu querido esposo, Leonel, por ser tão importante na minha vida. Pelo apoio incondicional, presente em todos os momentos sempre ao meu lado, me incentivando a estudar e a buscar mais e mais, fazendo-me acreditar que sou capaz de muito mais que imagino. Agradeço de forma especial a ajuda em todas etapas desde regar os vasos até a formatação deste trabalho, Te Amo! Este trabalho foi concretizado devido a ter você sempre comigo, seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho! Esta conquista também é sua.

Aos meus pais Pedro Bordignon e Nelci Bordignon que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes e me deram carinho para continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento. São meus guias, proporcionaram-me a dádiva da vida, obrigada pelo apoio em mais uma etapa importante e principalmente por serem os responsáveis pela minha educação, mostrando sempre que a honestidade e humildade são virtudes essenciais. Às minhas irmãs Daniela Bordignon Benitti e Débora Cristina Bordignon, meu cunhado Vânio Benitti, que sempre entenderam a correria quando não era possível estarmos juntos. Aos meus queridos sogros Lademir e Loiva. Obrigado a todos por acreditarem em meu potencial.

Aos professores do Programa de Mestrado pelos ensinamentos passados em sala de aula e fora dela, em especial Antonio Carlos Torres da Costa, Eliane C. G. Vendruscolo, José Barbosa Duarte Júnior e em particular ao Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães pela coorientação neste trabalho pelo apoio e sugestões.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, pela concessão das sementes para esta pesquisa.

Aos técnicos da UFPR pelo companheirismo e por toda ajuda necessária, principalmente por disponibilizar os laboratórios, vidrarias e demais materiais que eram necessários.

Agradeço de forma especial aos amigos tive a oportunidade de fazer durante o período do mestrado em especial minhas grandes amigas Cassia, Leidilaine e Julia com quem convivi em todos os momentos durante esse tempo. Foram vocês que estavam ao meu lado nos momentos difíceis, e proporcionaram-me momentos de descontração, me ajudaram, e me ensinaram o valor da verdadeira amizade e espontaneidade.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e não foram mencionados.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
Mas pensar o que ninguém ainda pensou
Sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

HENDGES, Flávia, B. Universidade Estadual do Paraná, julho de 2015. **Efeito antioxidante da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* associada a genótipo de trigo submetido ao déficit hídrico e fertilização nitrogenada.** Orientador: Antonio Carlos Torres da Costa. Coorientadores: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo e Vandeir Francisco Guimarães.

As plantas estão constantemente expostas a uma grande variedade de estresses ambientais que ocasionam reduções na produtividade. Plantas submetidas a déficit hídrico sofrem alterações na estrutura bioquímica de suas células, entre elas a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres e a planta, em resposta a esses radicais livres, sintetizam agentes antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante da inoculação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* associada ao genótipo de trigo CD 120 submetidas ao déficit hídrico e a adubação nitrogenada em cobertura. Foram avaliados parâmetros fisiológicos como índice de estabilidade de membrana (IEM), teor relativo de água (TRA), biomassa fresca e seca e atividade enzimática das enzimas antioxidantes: Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Ascorbato Peroxidase (APX) e Glutathione S-Transferase (GST), além de teores de prolina e peroxidação lipídica (MDA). O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4x2 com 3 repetições, sendo que o primeiro fator refere-se as condições de inoculação/fertilização (C0: controle, C1: fertilização com sulfato de amônio, C2: inoculação com a bactéria e C3: fertilização combinada com inoculação) e o segundo fator refere-se as condições hídricas com ou sem estresse (no estádio do emborrachamento as plantas foram submetidas a déficit hídrico por 8 dias enquanto que as plantas controle permaneciam sendo irrigadas normalmente). Plantas inoculadas com *H. seropedicae* submetidas ao estresse hídrico, apresentaram menores acréscimos no IEM (19%), no MDA (41%) e prolina (6,7 vezes) em comparação com o controle (30%, 70% e 25 vezes, respectivamente). Em relação ao efeito antioxidante, a seca promoveu redução acentuada da atividade específica da CAT independentemente das condições de fertilização/inoculação aplicadas. Para a SOD, plantas estressadas e na presença da bactéria, aumentaram os níveis desta enzima, e para a GST, o efeito foi inverso. Porém, a atividade da APX permaneceu inalterada, tanto pela aplicação do estresse quanto pela presença da inoculação. A presença bacteriana aumentou a biomassa seca e fresca e a massa de 100 grãos. Apesar do pouco efeito antioxidante observado não houve dano ao tecido e não houve efeito na produtividade sob condição de déficit hídrico, contudo o efeito antioxidante, este não foi capaz de restabelecer.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. Enzimas antioxidantes. Restrição hídrica. Bactérias diazotróficas.

ABSTRACT

HENDGES, Flávia, B. state University of Western Paraná, in July de 2015. **Antioxidant effect of *Herbaspirillum seropedicae* bacteria associated with wheat genotype subjected to water deficit and nitrogen fertilization.** Advisor: Antonio Carlos Torres da Costa. Co-Advisors: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo e Vandeir Francisco Guimarães.

Plants are constantly exposed to a variety of environmental stresses which cause reductions in productivity. Plants subjected to water stress undergo changes in the biochemical structure of your cells, including the production of reactive oxygen species (ROS) or free radicals and the plant in response to these free radicals, synthesize antioxidants. The objective of this study was to evaluate the antioxidant effect of inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* bacteria associated with the wheat genotypes CD 120 submitted to drought and nitrogen fertilization. They were assessed physiological parameters such as membrane stability index (IEM), relative water content (RWA), fresh and dry biomass and enzymatic activity of antioxidant enzymes: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and Glutathione S-transferase (GST), and proline contents and lipid peroxidation (MDA). The design was completely randomized in 4x2 factorial design with three replications, the first factor relates to the conditions of inoculation / fertilization (C0: control, C1: fertilization with ammonium sulfate, C2: inoculation with bacteria and C3: fertilization combined with inoculation) and the second factor relates to the water conditions with or without stress (at booting stage of the plants were submitted to water deficit for 8 days while the control plants were still being irrigated usually). Plants inoculated with *H. seropedicae* subjected to drought stress, show lower increases in IEM (19%) in the MDA (41%) and proline (6.7 times) compared with the control (30%, 70% and 25 times, respectively). Regarding the antioxidant effect, the drought caused greater reduction in specific activity of CAT regardless of fertilization conditions / applied inoculation. For SOD stressed plants and in the presence of bacteria, the levels of enzyme increased, and GST, the effect was reversed. However, the activity of APX remained unchanged, both the application of stress as the presence of inoculation. Bacterial presence increased the fresh and dry biomass and weight of 100 grains. Although little antioxidant effect observed there was no damage to the tissue and had no effect on yield under water stress conditions, yet the antioxidant effect, this was not capable of restoring.

Keywords: *Triticum aestivum*. Antioxidant enzymes. Water restriction. Diazotrophs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Benefícios da interação de BPCV com plantas hospedeiras.....	31
Figura 2: Parâmetros fisiológicos avaliados.....	41
Figura 3: Atividade enzimática de plantas de trigo CD120 irrigadas e submetidas à estresse hídrico.	43
Figura 4: Parametros Biofísicos: Teores de prolina e MDA.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos realizados com diferentes tipos de estresses com inoculação de bactéria e avaliação de atividade das enzimas antioxidantes.	33
Tabela 2: Parâmetros produtivos avaliados na cultivar de trigo CD 120, submetida ao déficit hídrico, no município de Palotina - 2014.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 A CULTURA DO TRIGO.....	18
2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS	19
2.3 FISIOLÓGIA DO DÉFICIT HÍDRICO	20
2.4 ENZIMAS E METABÓLITOS LIGADOS AO ESTRESSE.....	23
2.4.1 Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)	23
2.4.2 Ascorbato Peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11).....	24
2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)	25
2.4.4 Glutathione S-Transferase (GST) (EC 2.5.1.18).....	26
2.4.4 Prolina.....	27
2.5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV) .	28
2.6 PROMOÇÃO DA TOLERÂNCIA À SECA PELAS BACTÉRIAS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 CULTIVO EM VIVEIRO	34
3.2 PREPARO DO INÓCULO.....	35
3.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	35
3.4 ENSAIOS FISIOLÓGICOS	37
3.5 AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO.....	39
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4. RESULTADOS.....	40
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO	53
7. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

O trigo, juntamente com milho e arroz, provê 50% das calorias da dieta humana e se constitui como uma fonte alimentar crítica em regiões de alto crescimento populacional como Ásia, África e Oriente Médio (DONN et al., 2014). O incremento de produtividade nesta cultura ocorre a taxas de 0,9% ao ano e deverá aumentar a 1,5%. Porém este incremento está muito abaixo da demanda do crescimento populacional estimada para 9,4 bilhões de pessoas até 2050 (FISCHER; EDMEADES, 2010; CHAKRABORTY et al., 2013).

Os estresses abióticos e bióticos são os principais responsáveis por limitar os incrementos na produtividade das culturas ao longo dos anos. As plantas podem estar constantemente expostas a uma grande variedade de estresses ambientais que ocasionam reduções em seu crescimento, desenvolvimento e produtividade (NAVEED et al., 2014; LABUDDA; AZAM, 2014).

Os estresses abióticos e bióticos em geral, desencadeiam uma reação oxidativa que pode danificar os componentes celulares e causar sua disfunção (DEMIDCHIK, 2015). Com isso, ocorre a perturbação do equilíbrio metabólico das células, levando à superprodução de espécies reativas de oxigênio (denominadas EROs). Essas espécies são altamente reativas e tóxicas, as quais podem causar danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (HUANG et al., 2012).

As EROs podem desempenhar um duplo papel na bioquímica e fisiologia vegetal. São consideradas importantes moléculas de sinalização secundárias, produtos tóxicos do metabolismo aeróbico que se acumulam no interior das células durante o estresse oxidativo, bem como, produtos de certos processos metabólicos, além de surgir em alguns sistemas específicos sob fino controle celular. Como exemplo destas espécies reativas tem-se o radical superóxido ($O^{\bullet-}_2$), radicais hidroxila (OH^{\bullet}), oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais de peróxido ($O_2^{\bullet-}$). Geralmente são gerados nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (GILL; TUTEJA, 2010; HUANG et al., 2012; LABUDDA; AZAM, 2014) e o estresse oxidativo aconteceria por um desbalanço entre a formação das EROs e os mecanismos de detoxificação. Deste modo, enzimas detoxificadoras tem um papel central na tolerância a estresses, especialmente durante a seca (ZIMMERMANN; ZENTGRAF, 2005; SIMOVA-STOILOVA et al., 2009).

Dentre as enzimas detoxificadoras, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) tem como ação promover a dismutação. A SOD do radical superóxido em H_2O_2 e a CAT do H_2O_2 em H_2O e O_2 ; a ascorbato peroxidase (APX) faz a remoção do H_2O_2 em H_2O e oxida o ácido ascórbico. A enzima glutathione S-transferase (GST) atua indiretamente como um carreador não catalítico que facilita a distribuição e transporte de várias moléculas em conjunto com a glutathione peroxidase (GPX) que quebra o H_2O_2 e os hidroperóxidos lipídicos (GILL; TUTEJA, 2010; LABUDDA; AZAM, 2014).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) colonizam a rizosfera de diversas espécies de plantas podendo estimular o crescimento do hospedeiro, além de conferir alterações físicas ou químicas relativas a indução de resistência na planta de forma a suprimir doenças. Porém, alguns relatos apontam o uso de BPCV como indutores de tolerância a estresses abióticos, como a seca, salinidade e deficiência ou excesso de nutrientes (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; CHAKRABORTY et al., 2013).

Mecanismos exatos de tolerância das plantas ao estresse por meio de BPCV permanecem de modo especulativo, porém algumas explicações incluem: (1) a produção de hormônios como o ácido abscísico, ácido giberélico, citocininas e auxinas (AHMAD; KIBRET, 2013); (2) produção de enzimas essenciais, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase para reduzir os níveis de etileno na raiz durante o desenvolvimento de plantas (GLICK, 2005); (3) indução de resistência sistêmica por compostos produzidos por bactérias; (4) solubilização de fosfatos contribuindo com a nutrição vegetal (GLICK, 2012; NICO et al., 2012); (5) formação de biofilme bacteriano ou matriz extracelular que pela presença de macromoléculas (açúcares, oligo e polissacarídeos) aumenta a hidratação e nutrição da raiz, sendo que a capacidade de retenção de água de alguns polissacarídeos podem exceder várias vezes a sua massa (YANG et al., 2009; TIMMUSK et al., 2014) e (6) melhoria na textura e estrutura dos solos (MAPELLI et al., 2012).

Diversos trabalhos relatam o efeito benéfico das rizobactérias aumentando a tolerância das plantas à seca. Especialmente no trigo, já foram avaliadas várias estirpes: *Azospirillum brasilense* (CAMILIOS-NETO et al., 2014), *Burkholderia phytofirmans* (NAVEED et al., 2014), *Pseudomonas chlororaphis* (CARLIER et al., 2008) e *Bacillus amyloliquefaciens* (KASIM et al., 2013).

Entre as betaproteobacteria, o gênero *Herbaspirillum* (*H. seropedicae*) tem o potencial de associação com diversos gêneros de poaceas (JAMES; OLIVARES, 1997;

FERNANDES et al., 2013; NEIVERTH et al., 2014). Porém, estudos com o intuito de averiguar o efeito desta bactéria inoculada em plantas de trigo submetidas à seca ainda não foram realizados.

Diante do que foi exposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* associada ao genótipo de trigo CD 120 submetido ao déficit hídrico e adubação nitrogenada em cobertura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO TRIGO

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma planta de ciclo anual, originária de clima frio, sendo cultivada durante o período compreendido entre o inverno e a primavera (EMBRAPA, 2014). É uma poacea e estima-se que existam cerca de 30 tipos de trigos, geneticamente diferentes, sendo que metade pode ser cultivada e o restante cresce de forma selvagem. Porém, 90% de todo trigo cultivado no mundo provém de três espécies *Triticum aestivum*, *Triticum compactum* e *Triticum durum*, cada uma destas espécies é mais adequada a um tipo de alimento, sendo o *Triticum aestivum*, o mais cultivado do planeta (ABITRIGO, 2014).

Este cereal tem o potencial de manter suas características nutricionais mesmo quando armazenado por longo tempo. O amido e as proteínas presentes no grão constituem uma fonte de alimento importante pelo fato de fácil armazenamento (sem exigir cuidados contínuos) além de ser um alimento rico em energia e qualidade, teve papel importante nos primeiros assentamentos humanos e no desenvolvimento das civilizações (SWINDEN, 2006; EMBRAPA, 2015).

Os maiores produtores de trigo no mundo são a União Europeia, a China e a Índia (ODEPA, 2014). Dados oficiais da CONAB (2014), safra 2013/2014 apontou uma estimativa maior da área cultivada com o trigo no Brasil de 20,7% (457,8 mil ha), em relação a safra 2012/2013. A produtividade na safra 2012/2013 foi de 2.502 kg ha⁻¹ e na safra 2013/2014 de 2.816kg ha⁻¹, sendo o incremento de 12,4% (311 kg ha⁻¹).

A produção de trigo no país concentra-se na região Sul, nos estados de Paraná, 47,2% e Rio Grande do Sul, 44,2%. A participação de outros estados é da ordem de 8,6%. Essa participação é distribuída entre Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2014). Segundo projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), o consumo interno brasileiro é de 10,7 milhões de toneladas e a produção nacional deste grão atinge cerca de 5 milhões de toneladas, sendo necessário o suprimento deste déficit na produção através dos países produtores, tornando o país o 3º maior importador de trigo (ODEPA, 2014; MINGOTI et al., 2014).

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria do Trigo (ABITRIGO, 2011) o Paraná é o estado que mais produz o grão, atingindo safras frequentemente acima de 3 milhões de toneladas. No Paraná, o aumento da área cultivada com trigo foi de 203,1 mil ha, sendo 26,3% de incremento, porém apesar deste aumento a ocorrência de clima atípico (da sementeira a colheita), resultou em enormes perdas, resultando em uma queda na produção de 15,2% e redução na produtividade de 32,9% (CONAB, 2014).

Para a safra 2014/2015, estima-se uma produção de 7,5 milhões de toneladas, porém de acordo com a demanda interna é projetada a necessidade de importar 5,5 milhões de toneladas do grão. Os principais países exportadores para o Brasil são Argentina e Estados Unidos (CONAB, 2014).

No Paraná, a região Oeste do estado é caracterizada por apresentar alta aptidão para a cultura do trigo, devido a particularidades como altitude, solo, clima, relevo e também pela elevada concentração de unidades industriais em seu entorno. Entretanto, em decorrência de grandes variações climáticas observadas com frequência na região durante o período de inverno, nota-se uma série de frustrações de safras (SANTOS, 2013).

2.2 ESTRESSES ABIÓTICOS

O ambiente é raramente ideal para o crescimento de plantas em ambas as comunidades naturais e agrícolas (KRISHANIA et al., 2013). As plantas são consideradas como organismos sésseis e são expostas a um ambiente em constante mudança, incluindo um diversificado leque de fatores bióticos e abióticos (KEUNEN et al., 2013).

O estresse é um fenômeno fisiológico e bioquímico das plantas, que envolve alterações na estrutura e função em todos os níveis da organização, a partir de moléculas grandes como proteínas e lipídios, e agregações deles em membranas, para as mais complexas organelas (cloroplastos, mitocôndrias) e depois para células, tecidos e órgãos, através de toda a planta (LAWLOR, 2013). Estes fenômenos podem limitar o crescimento, a reprodução, o rendimento e qualidade dos grãos (MHAMDI et al., 2010).

Existe uma variedade de estresses ambientais que afetam as plantas (KRISHANIA et al., 2013). Entende-se como estresse biótico as interações com outros

organismos, como por exemplo, infecção por herbívoros, efeitos de simbiose ou parasitismo, além de, danos mecânicos, podas e chuvas de granizo que acabam por danificar as plantas causando ferimentos (KRISHANIA et al., 2013). Estresses abióticos são aqueles que regulam o crescimento das plantas como: luminosidade (intensidade), disponibilidade de nutrientes minerais (limitação ou excesso- toxicidade, salinidade), temperatura (calor ou frio) e disponibilidade hídrica (seca ou inundações) (DOLFREUS 2014). Dentre os fatores abióticos, a seca e a salinidade são os que causam maiores prejuízos (KRISHANIA et al., 2013).

2.3 FISILOGIA DO DÉFICIT HÍDRICO

O déficit hídrico é considerado uma perda moderada de água, que conduz ao fechamento estomático e a limitação das trocas gasosas. Geralmente o estresse hídrico ocorre quando a água disponível no solo é reduzida, e as condições atmosféricas causam a perda contínua de água da planta, pela transpiração ou evaporação induzindo a murcha, danos às membranas celulares e, finalmente, a morte celular (JALEEL et al., 2009).

À medida que o conteúdo de água disponível no solo torna-se reduzido, o crescimento e desenvolvimento da planta pode ser inibido. A planta como estratégia de adaptação ao período de restrição hídrica redistribuí os recursos para toda a planta, afetando por conseguinte a produtividade da cultura. O estresse hídrico ocasiona efeitos negativos sobre o crescimento celular, podendo ainda levar à ruptura de proteínas de membrana e decréscimos nos teores de clorofila e perda de capacidade de germinação (JALEEL et al., 2009).

Mecanismos complexos de percepção da disponibilidade de água em ambientes e reprogramação do metabolismo e crescimento em resposta ao estresse hídrico levam a uma variedade de alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas em nível molecular. As plantas podem evitar ou reduzir o déficit hídrico através do desenvolvimento de um sistema radicular profundo, diminuindo o crescimento de ramos, passando por senescência foliar e dormência, e pelo fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água (MACHADO et al., 2009; CLAEYS; INZÉ, 2013; ZHAO et al., 2014).

Os efeitos do déficit hídrico variam em função de sua intensidade (duração), da velocidade de imposição do estresse e do estágio de desenvolvimento da planta em que a seca ocorre (MARQUES, et al., 2011).

Mecanismos de prevenção de déficit tem por objetivo equilibrar a absorção de água e perda de água. A absorção de água pode ser reforçada pelo acúmulo de solutos para reduzir o potencial de água dos tecidos e melhorar o crescimento de raízes (VENDRUSCOLO et al., 2007; CLAEYS; INZÉ, 2013).

A seca pode formar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A formação das EROs está relacionada com a produção de energia necessária para os processos de desenvolvimento da planta (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Nestes mecanismos, os vegetais necessitam de oxigênio (O_2). A molécula de O_2 é um radical livre e tem dois elétrons desemparelhados. Para a molécula de O_2 tornar-se reativa é necessária uma entrada de energia, ocorrendo a restrição da rotação de spins, levando à geração das EROs, que pode danificar as células. EROs e radicais livres promovem o estresse oxidativo através da oxidação de compostos de células. Esta energia vem de uma série de reações químicas e bioquímicas cujos elétrons são altamente energizados provenientes da cadeia de transporte de elétrons (CTE), raios ultravioletas, irradiação ionizante entre outras (GILL; TUTEJA, 2010; DEMIDCHIK, 2015).

Organelas com intensa taxa de fluxo de elétrons ou atividade metabólica altamente oxidante, como por exemplo, cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomos são uma importante fonte de geração de EROs nas células vegetais (GILL; TUTEJA, 2010). As EROs mais comumente formadas em condições normais são O_2^- e H_2O_2 , podendo serem atribuídas ao resultado de extravazamento de elétrons a partir da fotossíntese e da cadeia de transporte de elétrons.

A salinidade, seca ou estresses osmóticos, levam ao fechamento estomático resultando em menor concentração intercelular de CO_2 no cloroplasto, favorecendo a formação de 1O_2 (ABOGADALLAH, 2010; GILL; TUTEJA, 2010). O aparecimento das EROs provocam a oxidação dos componentes celulares, dificultando as atividades metabólicas, afetando a integridade das organelas (SUZUKI et al., 2011). As EROs podem surgir como um subproduto tóxico devido a uma perturbação no metabolismo energético e/ou podem ser produzidas para fins de sinalização (GROß et al., 2013).

As condições de estresse hídrico promovem um maior acúmulo destas espécies, pois o oxigênio molecular (O_2) atua como receptor de elétrons. O oxigênio singlete (1O_2), o radical hidroxila (OH), o radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) são todos compostos fortemente oxidantes e, conseqüentemente, potencialmente prejudiciais à integridade celular (FILIPPOU et al., 2011; GILL; TUTEJA, 2010; GROß et al., 2013).

As características principais do estresse oxidativo são: (1) aumento da carga oxidativa (produção avançada de EROs); (2) potencial de oxidação descontrolado devido a taxas de produção superiores as taxas de metabolismo; (3) dano oxidativo aos componentes celulares, o que supõe que a taxa de oxidação seja superior a reparação ou substituição; e (4) acúmulo de componentes celulares danificados de alguma forma que levam à perda de função e eventual morte (FOYER; NOCTOR, 2012).

As EROs podem ser extremamente reativas, especialmente oxigênio singlete e o radical hidroxila e, ao contrário do oxigênio atmosférico, podem oxidar vários componentes celulares como proteínas e lipídios, DNA e RNA (CRUZ, 2008; MHAMDI et al., 2010).

Todas as EROs (com exceção do H₂O₂) apresentam vida curta (2-4 µs) com isso seu dano é principalmente nos locais de sua produção. Somente o H₂O₂ (um mili segundo) pode se difundir e penetrar nas membranas e funcionar como uma molécula sinal, ativando vias de sinalização responsivas ao estresse do sistema de defesa (CRUZ, 2008; SIMOVA-STOILOVA et al., 2009). H₂O₂ é a EROs mais estável, sendo formado na reação do oxigênio singlete com radical superóxido e, como um produto de dismutação espontânea de O₂ (GROß et al., 2013).

As EROs atuam com um duplo papel agindo como molécula sinalizadora: indicador de estresse celular e mensageiro secundário envolvidos na resposta ao estresse, via de transdução de sinal e ativação dos sistemas de defesa (enzimas antioxidantes) (SIMOVA-STOILOVA et al., 2009). A homeostase e proteção das proteínas e membranas de reparação de danos são iniciadas pelos sinais de estresse primário (por exemplo, osmótica e efeitos iônicos, ou temperatura, mudanças fluidez da membrana) que por sua vez desencadeiam o processo de sinalização e transcrição controle no local. Alterações irreversíveis da homeostase celular e a destruição das proteínas e das membranas funcionais e estruturais podem ser causadas por uma resposta inadequada a um ou vários passos na sinalização e ativação do gene que resulta em morte celular (KRISHANIA et al., 2013; COHEN et al., 2015).

As espécies reativas de oxigênio causam estresse aos sistemas biológicos. Estresse por sua vez, induz a produção de EROs. Conseqüentemente, um mecanismo para interromper o processo autocatalítico, é necessário. Sob circunstâncias normais, as

concentrações de radicais de oxigênio permanecem baixas por causa da atividade de enzimas de antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase. Sob estresse ocorre a acumulação de solutos compatíveis (como a prolina), além do aumento nas atividades de enzimas antioxidantes (MATYSIK et al., 2002).

2.4 ENZIMAS E METABÓLITOS LIGADOS AO ESTRESSE

Em condições normais, as plantas apresentam um sistema antioxidante que tem a capacidade de sequestrar EROs visando minimizar o dano oxidativo. Com o aumento do estresse oxidativo em plantas, uma série de enzimas antioxidantes são induzidas (ORTIZ et al., 2015). As enzimas antioxidantes desempenham um papel fundamental para diminuir os efeitos do estresse oxidativo sendo as principais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona S-transferase (GST) e peroxidase (POD) e somados a uma variedade de moléculas não enzimáticas (glutatona, ascorbato, α -tocoferol, prolina, carotenóides e flavonóides) que possuem um papel importante na neutralização das EROs (ASHRAF, 2009; ABOGADALLAH, 2010; TSENG et al., 2007; ZHANG et al., 2014).

A eliminação das EROs em relação a outros processos envolvidos na tolerância aos estresses (especificamente ao sal), bem como a importância relativa de cada tipo de atividade enzimática (SOD, CAT, APX, entre outras) necessárias para a eliminação das EROs variam de uma planta para outra de acordo com as taxas de geração das EROs e as principais fontes de EROs e, conseqüentemente, o tipo de atividade antioxidante necessária (ABOGADALLAH et al., 2010).

2.4.1 Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

As catalases têm um papel importante no sistema de defesa da planta contra o estresse oxidativo (ASHRAF, 2009). A reação típica da catalase é a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 para a água e O_2 ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (MHAMDI et al., 2010). A enzima catalase tem uma das maiores taxas de rotatividade para todas as enzimas: uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto. É importante na remoção de H_2O_2 gerado nos peroxissomas por

oxidases envolvidos na β -oxidação dos ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo da purina (GILL; TUTEJA, 2010).

O H_2O_2 pode ser desintoxicado das células por dois grupos de enzimas: as catalases e peroxidases, como por exemplo, a APX. As catalases apresentam uma menor afinidade a H_2O_2 em relação as peroxidases. Dessa forma, a CAT é sugerida para ser envolvido na eliminação em massa de H_2O_2 enquanto que peroxidases (POD) estão envolvidas em uma regulação fina de H_2O_2 . Com base nas propriedades cinéticas da enzima a remoção de grandes quantidades de H_2O_2 é uma função típica da CAT (ABOGADALLAH et al., 2010, MHAMDI et al., 2010).

Catalases são produzidas principalmente nos peroxisomos e glioxissomos (ASHRAF, 2009). O principal local de ação CAT é conhecido por ser os peroxisomos onde o H_2O_2 ocorre, proveniente da fase da fotorrespiração (ABOGADALLAH et al., 2010). Como a CAT localiza-se predominantemente nos peroxisomos, uma atividade satisfatória desta enzima torna-se importante para metabolizar H_2O_2 proveniente da fotorrespiração, o qual, pode ser produzido em taxas mais elevadas em caso de déficit hídrico (NOCTOR et al., 2014).

Em plantas sob estresse houve um incremento notável nos índices da atividade da enzima catalase, em particular nas folhas cloróticas. Tal fato sugere também um forte aumento na concentração de H_2O_2 , resultante do aumento da fotorrespiração e/ou difusão para outros compartimentos celulares. O acúmulo de H_2O_2 pode levar ao estresse oxidativo, desse modo, torna-se o interesse da planta para regular os níveis de H_2O_2 sob condições de estresse em vez de removê-lo completamente (ABOGADALLAH et al., 2010).

A perda de atividade das enzimas peroxidases devido a produção excessiva de H_2O_2 nas folhas cloróticas que danificam as enzimas e/ou regulamentam para baixo sua expressão, resulta em acúmulo de EROs. Isto, por sua vez, resulta na indução de atividade de CAT que pode eliminar os EROs mas não pode manter níveis equilibrados de espécies reativas de oxigênio nos tecidos estressados e assim, podem reduzir mas não impede o estresse oxidativo (ABOGADALLAH et al., 2010).

2.4.2 Ascorbato Peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11)

A ascorbato peroxidase (APX) desempenha o papel mais importante na detoxificação de ROS, protegendo as células. Esta enzima tem uma maior afinidade

para H_2O_2 (μM) do que a CAT e POD (mM) e pode ter um papel mais importante na gestão de EROs durante o estresse. Uma maior expressão da APX em plantas foi demonstrada durante diferentes condições de estresse (GILL; TUTEJA, 2010).

Esta enzima exerce um papel vital na defesa da planta contra o estresse oxidativo por eliminação H_2O_2 em diferentes compartimentos celulares (ZHANG et al., 2014). APX são as principais enzimas relacionadas com a eliminação de H_2O_2 no cloroplasto e citosol das células de plantas (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). São responsáveis por catalisar a oxidação do ácido ascórbico com o peróxido de hidrogênio ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$) originando o radical monodehidroascorbato (MDA) (GILL; TUTEJA, 2010). Com base na localização da enzima dentro da célula, quatro tipos diferentes de APX foram identificados, sendo elas: a forma solúvel do estroma do cloroplasto (sAPX), a forma ligada ao cloroplasto tilacóide (tAPX), a forma citosólica (cAPX), e a forma ligada a membrana glioxisoma (gmAPX) (ASHRAF, 2009).

É uma enzima do ciclo ascorbato-glutationa, a APX reduz H_2O_2 e faz a desintoxicação utilizando ascorbato como um substrato doador de elétrons (NEHNEVAJOVA et al., 2012).

2.4.3 Superóxido Dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

A superóxido dismutase (SOD) é considerada como antioxidante enzimática intracelular mais eficaz, sendo onipresente em todos os organismos aeróbios e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo mediada por EROs. A SOD atua removendo o radical superóxido (O^{\bullet}_2) catalisando sua dismutação a H_2O_2 . A reação mediada por esta enzima tem uma taxa mais rápida do que dismutação espontânea, cerca de 10.000 vezes. Devido ao potencial desta enzima em catalisar a dismutação do radical superóxido à oxigênio molecular e H_2O_2 , esta enzima é considerada o antioxidante enzimático intracelular mais eficaz (GILL; TUTEJA, 2010; ZHANG et al., 2014).

A SOD promove a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 , o qual é decomposto por uma variedade de peroxidases em água, utilizando vários substratos redutores no cloroplasto (ABOGADALLAH et al., 2010).

Uma vez que as SODs são metaloproteínas, estas possuem diferentes isoformas, com base nas espécies metálicas presentes nos seus locais ativos. As isoformas mais comuns de SOD conhecidos na literatura são a superóxido dismutase contendo os

seguintes elementos: cobre-zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD), ferro (Fe-SOD) e níquel (Ni-SOD) (ASHRAF, 2009).

A SOD juntamente com a CAT são responsáveis pela inativação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) respectivamente, e desse modo impedem a formação da configuração mais reativa de EROs, o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (KAMAL et al., 2012).

2.4.4 Glutationa S-Tranferase (GST) (EC 2.5.1.18)

As Glutationas S-transferases (GST) estão classificadas como enzimas do metabolismo secundário, e formam um grupo grande e diverso de enzimas que catalisam a conjugação de substratos xenobióticos eletrofílicos com o tripéptido glutationa. GST são conhecidas por funções como: desintoxicação de herbicidas, manutenção da homeostase hormonal em plantas, sequestro vacuolar de antocianina, metabolismo da tirosina, a desintoxicação de hidroperóxidos, regulação da apoptose e na resposta de aumento da tolerância contra vários estresses bióticos e abióticos (DIXON et al., 2010; GILL; TUTEJA, 2010; AHMAD et al., 2014).

GST apresenta um inusitado papel nas plantas: promover a desintoxicação de compostos que estão envolvidos em danos no DNA, RNA ou proteínas. Além disso, têm sido observado que a GST pode resultar em ser um regulador negativo, e que com o seu silenciamento faz uma planta resistente ao patógeno (DIXON et al., 2010).

GST apresentam-se em isoformas que representam um grupo grande e variável de enzimas antioxidantes, que atuam na desintoxicação de xenobióticos orgânicos halogenados que catalisam a sua conjugação com a glutationa (NEHNEVAJOVA et al., 2012). A glutationa (GSH), um tripeptídeo que contém cisteína, é um dos metabolitos cruciais em plantas. Ocorre abundantemente na forma reduzida em tecidos de plantas e está localizada em todos os compartimentos da célula, como citosol, retículo endoplasmático, vacúolos, mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomas, bem como apoplasto. A glutationa redutase catalisa a redução da GSH, uma molécula envolvida em muitos processos reguladores e antioxidantes metabólicas em plantas. A forma reduzida da GSH é necessária para a manutenção do estado redox intracelular, de modo a compensar todos os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo induzido pelo estresse. A GSH é produto da GST, que desempenha um papel importante na desintoxicação de

redutase desidroascorbato (DHAR) e xenobióticos (ASHRAF, 2009). Em plantas, a enzima GSH é um dos antioxidantes mais importantes (AHMAD et al., 2014).

2.4.4 Prolina

A ação sincronizada de vários antioxidantes e osmoprotetores como a prolina podem contribuir para a superação dos estresse oxidativo (AL-WHAIBI et al., 2012).

Encontrados em todos os organismos vivos, os osmoprotetores são considerados como altamente solúveis, aminoácidos de baixo peso molecular, não possuem carga ao pH fisiológico e não são tóxicos mesmo que tenham sido acumulados em concentrações elevadas. A prolina é um desses osmoprotetores, por aumentar a pressão osmótica do citoplasma, reter a água celular, a fim de manter as atividades bioquímicas no interior de células de plantas, além de estabilizar membranas e proteínas sob condições de seca (ABDELKADER et al., 2010).

Plantas podem acumular prolina como resposta aos diferentes tipos de estresse como salinidade, seca, altas e baixas temperaturas, metais pesados, ataque de patógenos, anaerobiose, deficiência de nutrientes, poluição atmosférica e radiação UV. (VERBRUGGEN, HERMANS, 2008; MATTIOLI et al., 2009). O acúmulo de prolina em condições de estresse abiótico pode variar, dependendo da espécie e do grau de estresse aplicado podendo aumentar em 100 vezes comparada às plantas controle (KARATAS et al., 2014).

A prolina apresenta uma elevada capacidade para extinguir as EROs, como oxigênio singleto e radical hidroxila. Esta capacidade pode ser entendida por meio de suas propriedades químicas, isto porque a prolina é capaz de formar complexos de transferência de carga e pode eficazmente acabar com o oxigênio singleto. Além disso, a prolina reage com OH^{\bullet} perante captação de hidrogênio, formando um radical mais estável. Deste modo, o acúmulo de prolina em quantidades elevadas em plantas sob diferentes tipos de estresse poderia ser bem compreendida por sua propriedade para eliminar espécies reativas de oxigênio (MATYSIK et al., 2002; RODRIGUEZ, REDMAN, 2005; KOHLER et al., 2009).

O conceito de prolina atuar como um antioxidante tem sido frequentemente referenciado durante os últimos 20 anos, porém propostas sobre um mecanismo detalhado de sua reação com OH^{\bullet} e as características físico-químicas das espécies envolvidas ao longo dos caminhos possíveis de reação ainda são escassos. Alguns

autores atribuem a prolina a categoria de antioxidantes não enzimáticos (SIGNORELLI et al., 2014).

2.5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

O sistema radicular pode ser visto como uma fábrica de produtos químicos que proporciona interações subterrâneas, incluindo associações simbióticas com microrganismos benéficos (como rizóbios, micorrizas, bactérias endofíticas e BPCV) além de interações com outras plantas parasitas, micróbios patogênicos e herbívoros invertebrados. As plantas são capazes de liberar uma vasta gama de compostos, afim de combater microrganismos patogênicos e atrair os benéficos. Dentre estes compostos podemos citar açúcares, polissacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos graxos, esteróis, compostos fenólicos, enzimas, proteínas, reguladores de crescimento de plantas e metabólitos secundários (BADRI et al., 2009).

As bactérias geralmente não encontram-se uniformemente distribuídas no solo. A concentração de bactérias localizada no entorno das raízes (rizosfera) é tipicamente muito maior do que no resto do solo (GLICK, 2012). Aproximadamente de 2-5% das rizobactérias quando reintroduzidas em solos, por meio da inoculação de plantas, contendo microflora competitiva exercem um efeito benéfico sobre o crescimento da planta e são denominados como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) (PAUL; LADE, 2014).

Particularmente, as bactérias do solo possuem a capacidade de crescer rapidamente e utilizar como fontes de nutrientes, uma gama muito ampla de diferentes substâncias. Ao mesmo tempo que muitas bactérias estão dispersas, ligadas às partículas do solo, muitas interagem com as raízes das plantas (GLICK, 2014).

O uso BPCV é uma alternativa potencial para diminuir o impacto ambiental negativo resultante do uso contínuo de fertilizantes químicos, herbicidas e pesticidas. As BPCV possuem a capacidade de fixar e solubilizar nutrientes minerais indisponíveis para as plantas, desse modo, podem atuar como biofertilizantes (WEYENS et al., 2009; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

As bactérias que promovem o crescimento vegetal incluem aquelas que são de vida livre, aquelas que formam relações simbióticas específicas com plantas, também estão incluídos endófitos bacterianos que podem colonizar alguns ou uma porção dos

tecidos interiores de uma planta e cianobactérias onde diversos gêneros podem causar efeitos sobre o crescimento da planta (GLICK, 2012; NADEEM et al., 2014). Podem ainda ser classificados em simbiontes, cujas bactérias diazotróficas vivem em estreita associação com plantas, conduzindo à formação de nódulos em raízes ou nodulação, e aqueles que são apenas associados com as plantas (WEYENS, et al., 2009).

Estas bactérias têm um papel de melhorar o estado nutricional das plantas hospedeiras por meio de fixação de nitrogênio (FBN), por aumentar a disponibilidade de nutrientes na rizosfera, por promover aumento da área de superfície da raiz, ou por melhorar simbiose benéfica do hospedeiro ou também, através da produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular (como o ácido indol acético). Normalmente, a promoção de crescimento é devido a uma combinação destes modos de ação. Além disso, a inoculação com BPCV pode aumentar a absorção de vários outros nutrientes, tais como Ca, K, Fe, Cu, Mn e Zn (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014)

Cerca de 78% da atmosfera da terra é nitrogênio. Este elemento encontra-se indisponível para os vegetais sendo considerado muitas vezes um fator limitante para o crescimento (WEYENS et al., 2009; AHMAD et al., 2014; VELIVELLI et al., 2015). Para ser assimilado pelas plantas o nitrogênio precisa estar na forma de nitrato de amônia. As plantas superiores não podem realizar este processo na ausência de bactérias diazotróficas (WEYENS et al., 2009).

O gênero *Azospirillum* concentra a maior parte dos estudos relacionados com bactérias diazotróficas associativas (DE SOUZA MOREIRA et al., 2010). Essas bactérias possuem a enzima nitrogenase, uma enzima sensível ao oxigênio (O₂) que catalisa a redução do nitrogênio atmosférico em amônia.

A interação planta-bactéria fornece nitrogênio reduzido para as plantas que é necessário para a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos e em troca, as plantas fornecem as bactérias compostos de carbono fixos, tais como açúcares. A interação entre os organismos é um processo multi-etapas, que envolvem a detecção e a secreção de moléculas específicas por ambas as partes (PELEG-GROSSMAN et al., 2012).

Algumas características são essenciais na utilização de BPCV, uma destas é que, a bactéria deve ser capaz de sobreviver no solo rizosférico onde as comunidades microbianas podem ser afetadas por uma ampla gama de fatores, como propriedades do solo, tipo de planta ou práticas agronômicas que determinam a presença ou a predominância de determinados tipos de bactérias. Torna-se indispensável o uso correto de BPCV combinado de forma adequada com a planta e condição ambiental para

alcançar os melhores resultados no crescimento vegetal. Dessa forma, esforços gradativos devem ser empregados no desenvolvimento de inoculantes que facilitam a persistência ambiental das BPCV e este fato permitiria diminuir a quantidade de fertilizantes químicos e pesticidas utilizados para melhorar a fertilidade do solo e produtividade da cultura (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

2.6 PROMOÇÃO DA TOLERÂNCIA À SECA PELAS BACTÉRIAS

O solo é visto como uma fonte viva de microrganismos que competem por água, nutrientes e espaço limitado, como bactérias e fungos (VELIVELLI et al., 2015). A rizosfera da planta constitui um sistema biológico diversificado contendo muitos microrganismos benéficos e também patogênicos. As interações entre os diferentes microrganismos e as raízes das plantas constituem uma importante área de pesquisa para o desenvolvimento das plantas e fisiologia do estresse (PELEG-GROSSMAN et al., 2012).

As BPCV colonizam a rizosfera de diversas espécies de plantas e podem conferir efeitos benéficos além de, provocar alterações físicas ou químicas relativas a indução de resistência na planta de forma a suprimir doenças, porém poucos relatos apontam o uso destas bactérias como indutores de tolerância a estresses abióticos, como a seca, salinidade e deficiência ou excesso de nutrientes (CHAKRABORTY et al., 2013).

Bactérias estão envolvidas na regulação positiva de genes, em resposta ao estresse oxidativo. Os produtos desta regulação funcionam tanto para proteger as células dos possíveis efeitos causados pelas EROS ou reparar quaisquer danos resultantes (TU et al., 2012).

Diretamente, os efeitos ocorrem através de mecanismos relacionados com a produção de hormônios vegetais (como auxinas e giberelinas) ou regulando a produção de fitohormônios pela planta. Alguns exemplos destes hormônios vegetais incluem o etileno (ET), ácido abscísico (ABA), auxinas (AUX), citocininas (CIT), giberelinas (GAs) entre outros. ABA é capaz de regulamentar a perda de água, sendo importante para as plantas que estão em condições de seca (VELIVELLI et al., 2015). Além disso, podem afetar a disponibilidade de nutrientes por meio da intervenção direta nos ciclos biogeoquímicos, como por exemplo, a FBN e solubilização de nutrientes importantes,

tais como o fósforo e ferro pela formação de sideróforos (CAMELO et al., 2011; GLICK, 2012; AHMAD et al., 2014; ISLAM et al., 2014).

Os métodos indiretos de promoção do crescimento vegetal podem contribuir através da indução de resistência sistêmica à patógenos, controle biológico de doenças, diminuindo os efeitos inibidores de diversos patógenos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas nas formas de agentes de biocontrole, além de produção de antibióticos e sideróforos (CAMELO et al., 2011; GLICK, 2012; AHMAD et al., 2014). Estes mecanismos auxiliam a planta a manter seu crescimento em ambiente de estresse por mitigar o impacto negativo do estresse sobre o crescimento e desenvolvimento da planta (NADEEM et al., 2014) (Figura 1).

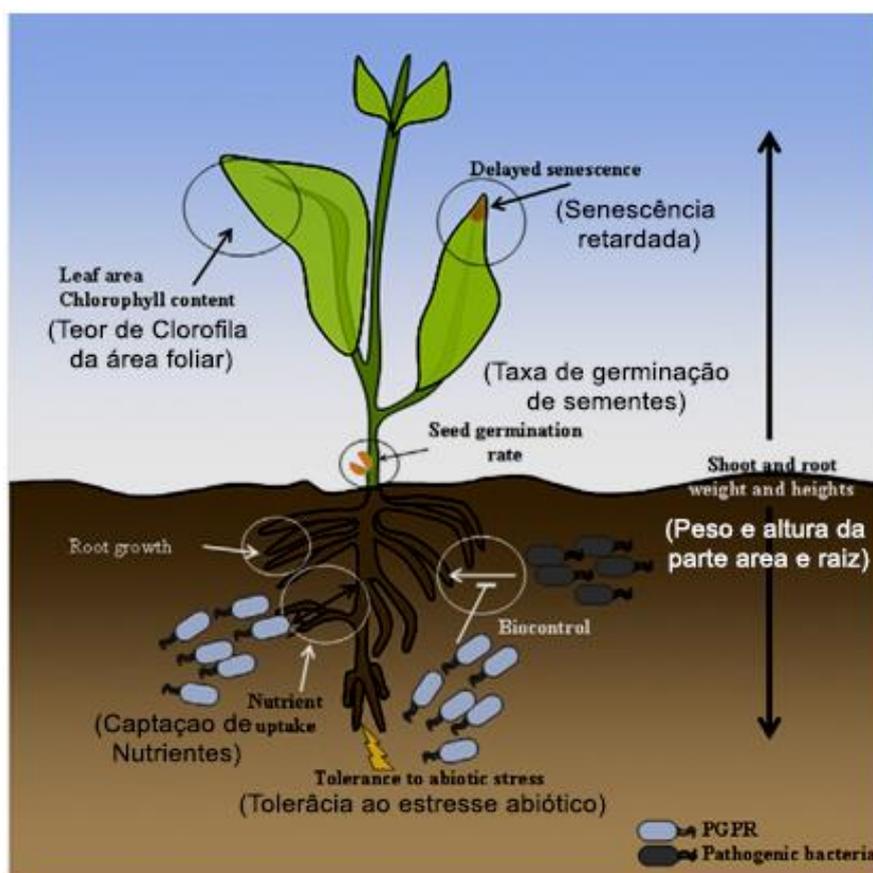


Figura 1. Benefícios da interação de BPCV com plantas hospedeiras. Dentre estes benefícios citados na literatura, incluem aumento da taxa de germinação das sementes, o crescimento das raízes, o rendimento, a área foliar, teor de clorofila, a absorção de nutrientes, teor de proteína, atividade hídrica, tolerância a estresse abiótico, pesos de raiz e parte aérea, biocontrole, e senescência retardada.

Fonte: Pérez-Montañó et al., (2014).

Embora uma variedade de exemplos de tolerância a estresses abióticos mediada por bactérias pode ser encontrada na literatura, os modos de ação em grande parte

permanecem ainda desconhecidos, porque a maioria dos estudos concentram-se apenas em avaliar os efeitos promotores do crescimento de plantas (DIMPKA et al., 2009).

Algumas estirpes de BPCV têm a capacidade de proteger as plantas contra os efeitos nocivos da alta de concentração de sais em solos. Alguns mecanismos empregados pelas bactérias podem estar presentes em uma estirpe particular de bactérias, enquanto ausentes nos outros. Por exemplo, algumas estirpes de *Pseudomonas* têm a capacidade de reduzir a concentração de etileno induzida pelo estresse, através da atividade da enzima ACC-desaminase e também diminuir a disponibilidade de Na⁺ através da produção de exopolissacáridos (NADEEM et al., 2014).

A inoculação de plantas com BPCV pode afetar a atividade das enzimas antioxidantes vegetais. Kohler et al., (2009) procurando investigar a influência da inoculação com BPCV *Pseudomonas mendocina*, isoladamente ou em combinação com um fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* ou *Glomus mosseae* em plantas de alface, observaram que a inoculação com esta bactéria promoveu uma diminuição de 55% na atividade da CAT em relação às plantas controle.

Gusain et al., (2015) trabalhando com algumas estirpes de BPCV como: *Pseudomonas fluorescência*, *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas synxantha*, *Bacillus cereus* e *Arthrobacter nitroguajacolicus* em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) sob diferentes níveis de estresse hídrico relatou que a maioria das plantas inoculadas com BPCV, em ambas cultivares avaliadas, apresentaram, maiores teores de prolina, maiores atividades específicas das enzimas SOD, CAT, POD e APX além de menores níveis de H₂O₂ e malondialdeído (MDA) em folhas sob todos níveis de estresse aplicado.

Islam et al., (2014) observaram em plantas de trigo inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* e submetidas ao estresse por metais tóxicos (Zn) que após 45 dias da sementeira, as plantas apresentaram os níveis de CAT, SOD e POD alterados significativamente devido a presença do metal e da inoculação. Foi observado decréscimos na atividade da CAT enquanto que os valores de SOD e POD apresentaram-se maiores em comparação ao controle. Além disso, baixos danos às membranas celulares em termos de conteúdo de MDA e H₂O₂ em plantas inoculadas com *P. aeruginosa* foi positivamente associado à uma alta atividade antioxidante.

Na literatura, diversos trabalhos quantificando a atividade enzimática do sistema antioxidante mediante a inoculação de bactérias e sob estresses abióticos podem ser encontrados (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos realizados com diferentes tipos de estresses com inoculação de bactéria e avaliação de atividade das enzimas antioxidantes.

Atividade Enzimática	Estresse Aplicado	Bactéria	Referência
Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD)	Hídrico/ Salino/ Metais Pesados	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus firmus</i>	Gururani et al., (2013)
CAT e SOD	Hídrico	<i>Proteus penneri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i>	Naseem, Bano, (2014)
CAT, SOD e APX	Osmótico	<i>Bacillus safensis</i> , <i>Ochrobactrum pseudogregnonense</i>	Chakraborty et al., (2013)
CAT e APX	Hídrico	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	Naveed et al., (2014)
CAT, SOD e APX	Hídrico	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus sp.</i>	Armada et al., (2014)
CAT, SOD e APX	Salino	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bayasl et al., (2007)
APX	Hídrico	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Azospirillum brasilense</i>	Kasim et al., (2013)
SOD e APX	Osmótico/ Hídrico	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Rhizophagus intraradices</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Ortiz et al., (2015)
CAT e SOD	Hídrico	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Timmusk et al., (2014)
CAT e SOD	Salino	<i>Pseudomonas sp.</i>	Fu et al., (2010)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO EM VIVEIRO

O experimento foi realizado em viveiro coberto com telado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizada no município de Palotina-PR, no período de abril a julho de 2014, em vasos plásticos com aproximadamente 10 kg de solo. O solo utilizado foi um LATOSSOLO VERMELHO Eutrófico, com as seguintes propriedades químicas: pH = 5,10; P = 4,27 mg dm⁻³; K = 0,29 cmol dm⁻³; Ca = 4,19 cmol dm⁻³; Mg = 1,28 cmol dm⁻³; H+Al = 6,43 cmol dm⁻³; Cu = 11,30 mg dm⁻³; Mn = 56 mg dm⁻³; Fe = 45,20 mg dm⁻³; Zn = 4,00 mg dm⁻³; SB = 5,76 cmol dm⁻³; MO = 24,61 g dm⁻³. Com base nos resultados da análise de solo, foi feita a adubação de base com 400 kg ha⁻¹ de NPK (4-20-20) e de cobertura com Sulfato de Amônio (NH₄SO₄): 50 kg de N ha⁻¹, além de calagem com calcário dolomítico, sendo colocado 10g por vaso.

A cultivar utilizada neste trabalho foi lançada em 2009 pela COODETEC, e indicada para plantio no Paraná em 2013 (IAPAR, 2013). Como característica, apresenta alto potencial produtivo e ampla adaptação, ciclo médio (120 dias) e as plantas são consideradas de estatura média (média de 84 cm).

No viveiro, os vasos foram dispostos em um delineamento inteiramente ao acaso, de modo a terem as mesmas condições de radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar, em esquema fatorial 4x2 com 3 repetições, sendo que o primeiro fator refere-se as condições de inoculação/fertilização: controle, fertilização com Sulfato de Amônio, inoculação com a bactéria e fertilização combinada com inoculação e o segundo fator refere-se as condições hídricas com ou sem estresse. Seis sementes de trigo do genótipo CD120 foram semeadas por vaso.

Foram aplicadas as seguintes condições de inoculação/fertilização: C0- controle sem inoculação, C1- plantas fertilizadas com Sulfato de Amônio, C2- plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* (10⁶ células/sementes) e C3- plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* e fertilizadas com Sulfato de Amônio. Realizou-se o desbaste no estágio de perfilhamento (Zadoks 21) (ZADOKS, et al., 1974), cerca de trinta dias após a germinação deixando-se apenas 3 plantas por vaso. Os vasos foram irrigados diariamente de forma manual, até a capacidade de campo (escoamento).

O estresse hídrico foi aplicado na fase de emborrachamento 75 dias após a germinação (estádio Zadoks 45) (ZADOKS, et al., 1974), com a restrição total da

irrigação pelo período de 8 dias. Para a quantificação da atividade enzimática, folhas foram coletadas no primeiro dia de estresse (Tempo 0) e no oitavo dia de estresse hídrico (Tempo 8).

3.2 PREPARO DO INÓCULO

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 foi mantida em meio de cultura sólido em placa específico para seu crescimento (NFb – malato) através de sucessivas passagens em placa e mantida em estufa de crescimento a 28°C. O inóculo foi preparado retirando-se uma colônia da bactéria e transferindo-a para um pré-inóculo com 5mL de meio DIGS (MOUTIA, et al., 2003) em tubos falcon de 50 mL, e mantidos a 28°C a 120 rpm em uma incubadora tipo Shaker. Após 24 h, o crescimento foi quantificado por turbidimetria (Espectrofotômetro marca HOMIS modelo SF 200-DM Digital) em 600 nm. Para o preparo do inóculo 1,0 mL de pré-inóculo, com aproximadamente 1,0 unidade de densidade ótica (D.O), foi transferido para erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio NFb – malato por aproximadamente 22 h. O cultivo foi utilizado para inoculação nas sementes de trigo quando atingiu a fase exponencial do crescimento e medida a turbidez.

3.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Para realização dos ensaios da atividade enzimática da Catalase (CAT EC 1.11.1.6) seguiu-se o protocolo de Havir; Mchale, (1987), e para Superóxido Dismutase (SOD EC 1.15.1.1) seguiu-se o protocolo proposto por Van Rossum et al., (1997), ambos adequados para correlação linear da atividade enzimática do extrato vegetal. Para os ensaios bioquímicos utilizou-se a folha bandeira das plantas de trigo. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para apresentar 50% de dismutação do radical superóxido.

A atividade enzimática procedeu-se da seguinte forma: 0,5g de amostra foliar foi macerada com nitrogênio líquido e transferida para um tubo Falcon de 15mL, ao qual foram adicionados 125µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5mM, 50µL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1Mm, 500µL de glicerol à 10% e 4,325mL de tampão fosfato de potássio 0,1M, completando assim, um volume final de 5ml.

Em seguida, o material vegetal foi centrifugado a 12.000g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, coletou-se 2ml do sobrenadante, o qual foi colocado no gelo e mantido durante todo o procedimento.

Para CAT, a mistura reacional incluiu 600µL de tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,0 previamente aquecido em banho-maria a 30°C, 175µL de água de alta qualidade, 150µL de peróxido de hidrogênio e 75µL do extrato vegetal preparado anteriormente, para as duas enzimas.

A atividade enzimática foi tomada de 10 em 10 segundos através da leitura da absorbância no espectrofotômetro no decorrer de 3 min. O comprimento de onda utilizado para a CAT foi 260nm e para a SOD 630nm.

A mistura reacional da SOD foi preparada com os seguintes reagentes: 50µL de tampão fosfato de potássio 1M, pH 7,8, 100µL EDTA 1mM, 50µL Triton X-100 0,25%, 100µL L-metionina 130mM, 100µL Nitro Azul de Tetrazólio (NBT) 750mM, 515µL água de alta qualidade, 75µL extrato vegetal e 10µL Riboflavina 100mM, completando o volume de 1mL nas duas reações. Após o preparo a reação foi mantida no escuro por 5 min, em seguida procedeu-se a leitura. Manteve-se sob forte incidência de luz por 1 min e seguiu nova leitura. Foram realizadas 5 leituras, cada uma delas após 1 min sob a incidência de luz e homogeneização da reação.

Também foram realizados os ensaios para Ascorbato peroxidase (APX EC 1.11.1.7) e Glutathione S-transferase (GST EC 2.5.1.18) proposto por Venisse et al., (2001), onde 0,5g de material foliar foi usado nas análises e na determinação das enzimas. Para a ascorbato peroxidase foram utilizados 30 µL de extrato vegetal adequados para correlação linear da atividade enzimática como modificação no protocolo.

A amostra foi macerada com nitrogênio líquido e transferida para um tubo Falcon de 15ml, ao qual foram adicionados 5µL de Triton X-100, 50µL de fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) 1mM, 4,95ml de tampão fosfato de sódio pH 7,5, 0,04g (8%) de polivinilpirolidona (PVP) e 0,03g de polietilenoglicol (PEG), completando assim, um volume final de 5ml.

O material vegetal processado foi centrifugado por 20 min a 4°C. Após a centrifugação, coletou-se 2ml do sobrenadante, o qual foi colocado e mantido em gelo durante todo o procedimento.

A enzima APX foi quantificada segundo a mistura reacional contendo: 100µL de tampão Tris/HCl pH7,8, 864µL de água de alta qualidade, 5µL de ácido ascórbico,

16µL de peróxido de hidrogênio e 15µL do extrato vegetal preparado anteriormente, para as duas enzimas.

Para medição da atividade enzimática da GST a mistura foi preparada utilizando 990µL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,5, 5µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, 5µL de Glutathione reduzida e 50µL extrato vegetal previamente preparado. O volume final foi de 1mL nas duas reações.

Atividade enzimática deu-se por meio da leitura da absorbância no espectrofotômetro no decorrer de 3 min. O comprimento de onda utilizado para a APX foi 290nm e para a GST 340nm.

As proteínas contidas nas amostras foram quantificadas pelo método colorímetro proposto por Lowry, et al., (1951).

3.4 ENSAIOS FISIOLÓGICOS

Para avaliação dos índices fisiológicos, foram realizadas medições para verificar o estado de água nas folhas, estas foram monitoradas por meio do Teor Relativo de Água (TRA), seguindo recomendações de Schonfeld et al., (1988), onde folhas bandeiras foram retiradas nos dias 0 e 8 após o início da restrição hídrica. Três amostras de folhas coletadas da mesma planta foram cortadas em forma de segmentos de tamanho uniforme. Obteve-se a massa fresca (MF) e em 40 mL de água destilada e autoclavada os discos foliares foram adicionados aos recipientes de vidro (50 mL de capacidade) que foram fechados e incubados no escuro em sala de cultura de crescimento vegetal com temperatura de 25°C por 24 h. Após esse período os discos foliares foram dispostos em papel toalha para retirada do excesso de água. Obteve-se a massa túrgida (MT), em seguida os discos foram dispostos em envelopes de papel alumínio e levados a estufa à 72°C por 24 h, para obtenção da massa seca (MS). O teor relativo de água foi calculado pela fórmula:

Teor Relativo de Água:

$$TRA \% = \left(\frac{MF - MS}{MT - MS} \right) \times 100$$

Outro índice avaliado foi a estabilidade de membrana celular que foi determinado indiretamente pela medida da condutividade elétrica, seguindo o protocolo de Chandra Babu et al., (2004). Três amostras de folhas coletadas da mesma planta foram cortadas em forma de disco de tamanho uniforme e foram lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada para remover eletrólitos aderidos à superfície. Em um recipiente (50 mL de capacidade) foram adicionadas 40 mL de água destilada e autoclavada e os discos foliares foram imersos. Os frascos foram fechados e incubados no escuro por 24 h em sala de cultura de crescimento vegetal à 25°C. A condutância foi medida usando o condutímetro (modelo Micronal B331). Após a medição inicial (C_1), os tubos foram autoclavados por 20 min sob pressão de 120 psi. Os valores finais (C_2) da condutividade elétrica foram então obtidos após esfriamento dos recipientes de vidro. O índice de estabilidade de membrana foi calculado usando a seguinte fórmula:

Índice de Estabilidade de Membrana:

$$IEM \% = \left(1 - \frac{C_1}{C_2} \right) \times 100$$

Para determinar a massa fresca, utilizaram-se plantas, e estas tiveram a parte aérea separada das raízes. As raízes foram lavadas em água destilada e secas em papel toalha para obter-se a massa fresca. Obteve-se também a massa fresca da parte aérea. Após a obtenção da massa fresca, as raízes e parte aérea foram identificadas e acondicionadas em envelopes de papel e posteriormente colocadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar a 72°C por 72 h para determinação da massa seca das raízes e da parte aérea. Este ensaio foi realizado com 3 repetições para cada tratamento.

A avaliação do nível de peroxidação de lipídios foi medida em termos de concentração de MDA (malondialdeído), usando a reação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA) proposta por Sairam et al., (2002). O MDA é um produto citotóxico de peroxidação de lipídios, é utilizado como um indicador da produção de radicais livres (COHEN, et al., 2015).

Para a realização desse protocolo foram pesados 0,5 g de material foliar, os quais foram macerados com 5mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O homogenato foi, então, centrifugado a 15.000 g por 15 min a 4°C. Foram aliqüotados 1,25mL do

sobrenadante, aos quais adicionou-se 2,5mL de 0,5% TBA em 20% de TCA. Em seguida, a amostra foi aquecida a 100°C por 30 min e, rapidamente arrefecida num banho de gelo. Seguiu-se uma nova centrifugação, a 10.000 g por 10 min a 4°C para remover a turbidez suspensa. O sobrenadante de absorbância foi registrado a 532 nm. O valor para a absorção não-específica a 600 nm foi subtraído. O teor de MDA foi calculado utilizando o coeficiente de extinção de 155 mmol⁻¹cm⁻¹.

Os conteúdos de prolina em tecidos vegetais foram quantificados pelo método de Bates et al., (1973). Como o conteúdo de prolina pode variar de folha para folha e também de acordo com a idade da planta, as precauções foram tomadas para selecionar sempre as folhas bandeiras de todas as plantas. Após a pesagem de 0,5 g de amostra foliar, esta foi macerada em 5mL de ácido sulfossalicílico e após, centrifugada a 5.000 g por 5 min a 4°C. Retirou-se 250µL do sobrenadante, que foi adicionado a 500µL de ninhidrina ácida e 500µL de ácido acético glacial.

As amostras foram levadas ao aquecimento de modo que permanecessem a 100°C por 1 h, então foram incubadas no gelo. Em seguida, adicionou-se 2mL de tolueno a cada uma delas e agitou-se vigorosamente no vórtex por cerca de 20 seg. Em seguida, procedeu-se a leitura no espectrofotômetro ao comprimento de onda de 520 nm da fase aquosa (pigmentada), utilizando como branco o tolueno. Também foram preparadas soluções para a determinação da curva padrão dos reagentes utilizados neste ensaio.

3.5 AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DE PRODUÇÃO

Ao final do ciclo da cultura foram determinados os componentes de produção: número de espigas/planta, número de grãos/espigas/planta, peso 100 grãos (g) e peso total de grãos por planta (g).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo programa estatístico GENES (CRUZ, 2006), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

Os dados obtidos dos diferentes parâmetros avaliados para o tempo 0 (sem déficit) foram similares entre todas as plantas (controle e inoculadas) demonstrando normalização da atividade enzimática (Dados não mostrados).

Os dados obtidos para os parâmetros fisiológicos das plantas estressadas estão demonstrados na Figura 2. Os níveis de TRA% após 8 dias de restrição hídrica variaram significativamente entre 91% e 94%, nas plantas irrigadas em todas as condições de fertilização/inoculação e nas plantas submetidas ao estresse hídrico variaram entre 70% e 77%. A redução dos índices de TRA% nas plantas demonstram o efeito do estresse hídrico nas plantas avaliadas (Figura 2A).

As plantas estressadas apresentaram uma redução no IEM% na ordem de 19% a 30% (nos tratamentos inoculados com *H. seropedicae*, controle e Sulfato de Amônio). Plantas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram níveis de IEM% superiores significativos em relação ao controle, demonstrando efeito positivo da inoculação da bactéria na manutenção da integridade das membranas (Figura 2B).

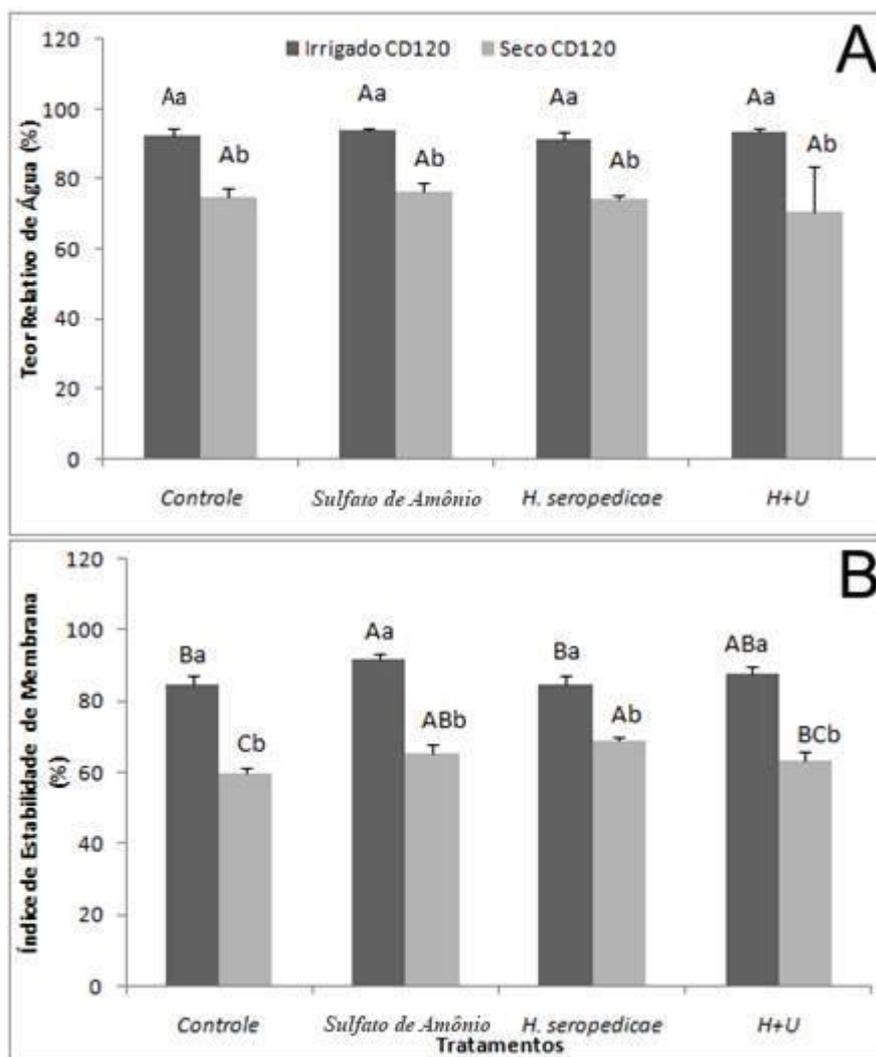


Figura 2. A- Teor Relativo de Água (TRA %) e B- Índice de Estabilidade de Membrana (IEM %).

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre condições de fertilização/inoculação aplicadas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre condições hídricas avaliadas (irrigado e seco).

Em relação as atividades enzimáticas, os dados obtidos estão demonstrados na Figura 3. Plantas irrigadas da cv CD120 apresentaram maior atividade da CAT. Porém, o maior incremento foi observado com a inoculação da bactéria. Plantas inoculadas e submetidas à seca apresentaram os menores valores de atividade específica comparados às plantas irrigadas e nos tratamentos inoculados com *H. seropedicae* (C2) e *H. seropedicae* + Sulfato de Amônio (C3) esta diminuição foi significativamente menor (Figura 3A).

Em relação à SOD, plantas irrigadas e, plantas em presença de adubo nitrogenado apresentaram valores maiores da atividade da SOD em relação ao seco demonstrando um perfil enzimático distinto para a condição de estresse. Os tratamentos com a presença de *H. seropedicae* e submetidos à seca apresentaram maiores níveis de SOD (Figura 3B).

Em relação aos níveis de APX, não foram observadas diferenças significativas para esta enzima entre as duas condições hídricas avaliadas. Apenas, os dados apontaram para uma redução numérica dos níveis desta enzima na presença da bactéria inoculada (Figura 3C).

A mesma tendência de diminuição na atividade enzimática foi observada para a enzima GST onde plantas estressadas e inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram níveis menores de atividade, comparada ao controle e fertilização com Sulfato de Amônio (Figura 3D).

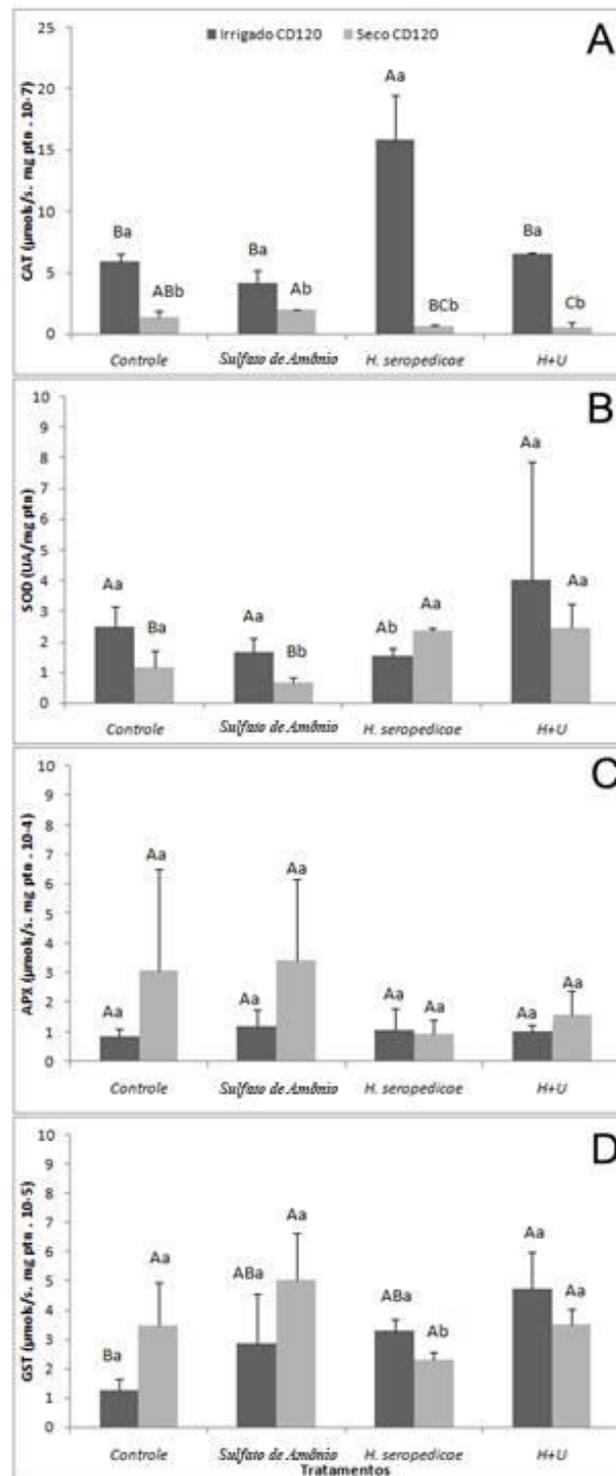


Figura 3.Atividade enzimática de plantas de trigo CD120 irrigadas e submetidas à estresse hídrico.

A- Catalase (CAT) ($\mu\text{mol}/\text{segundo}$), B- Superóxido Dismutase (SOD) (UA), C- Ascorbato Peroxidase (APX) ($\mu\text{mol}/\text{segundo}$) e em D- Glutationa S- transferase (GST) ($\mu\text{mol}/\text{segundo}$).

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre condições de fertilização/inoculação aplicadas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre condições hídricas avaliadas (irrigado e seco).

Os dados obtidos para a prolina apontam diferenças entre as condições irrigado e estressado. Plantas controle submetidas à seca apresentaram um acréscimo nos valores de prolina na ordem de 25 vezes em relação as plantas irrigadas, demonstrando a importância desse osmólito durante o estresse hídrico. Para a condição inoculada essa diferença foi apenas de 6,7 vezes em relação as plantas irrigadas onde a presença da bactéria foi capaz de reduzir o teor de prolina em 4 vezes (Figura 4A). Resultados similares foram encontrados por Arshad et al., (2007) que trabalhando com plantas de milho inoculadas com BPCV, encontraram concentrações significativamente menores de prolina em plantas submetidas a estresse salino quando inoculadas. De acordo com os autores, o menor acúmulo de prolina nas plantas indica que a inoculação com bactérias foi capaz de reduzir a severidade do estresse salino.

Os níveis de MDA após a seca foram maiores nas plantas estressadas, demonstrando a formação de EROS (espécies reativas de oxigênio), porém não houve diferença significativa entre as condições de fertilização/inoculação. Os aumentos nos teores foram na ordem de 29 a 41% (Figura 4B).

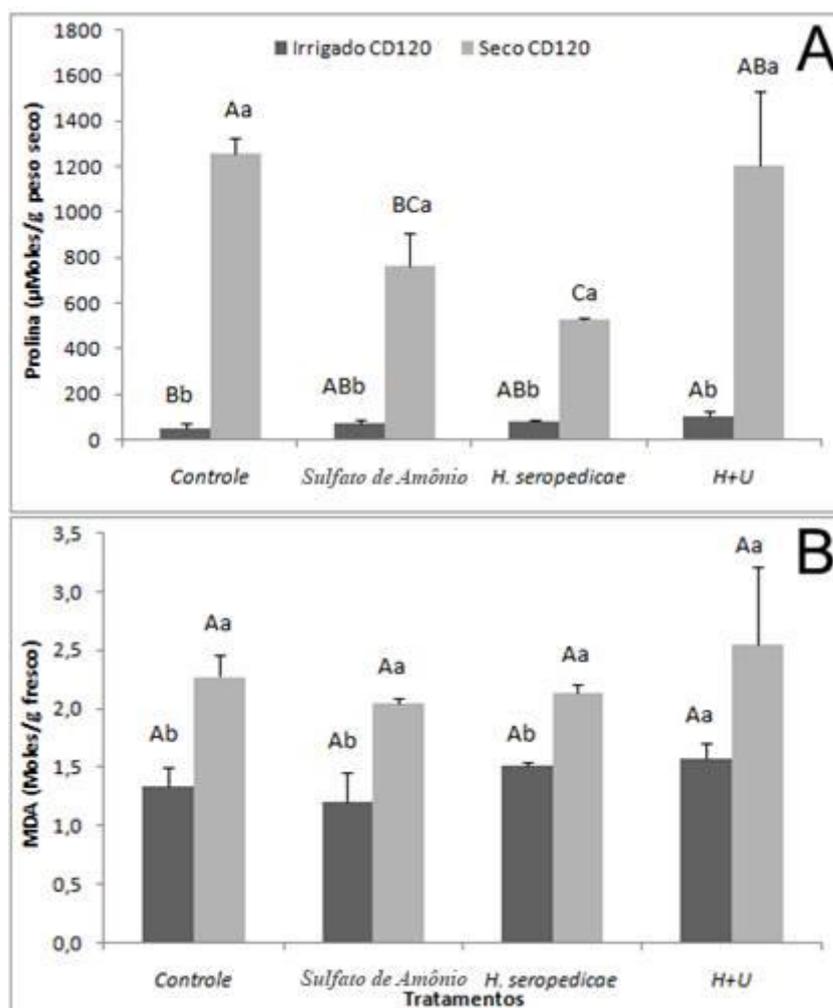


Figura 4. Teores de prolina e MDA. A- Níveis de prolina ($\mu\text{moles/g}$ peso seco) e B- Concentração de Malondialdeído (MDA) (Moles/g peso fresco).

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre condições de fertilização/inoculação aplicadas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre condições hídricas avaliadas (irrigado e seco).

Com relação aos componentes de produção, a seca promoveu uma redução significativa em todos os parâmetros avaliados nas diferentes condições de fertilização/inoculação avaliadas (Tabela 2). Porém, a presença da bactéria inoculada promoveu um aumento na massa de 100 grãos comparadas às plantas controle e fertilizadas com Sulfato de Amônio, demonstrando o efeito positivo da bactéria *H. seropedicae* em plantas sob restrição hídrica (Tabela 2).

Como era esperado, a restrição hídrica promoveu a redução dos valores de biomassa nas plantas. Quando fertilizados com Sulfato de Amônio e submetidos à seca, a biomassa fresca foi superior aos demais tratamentos. A mesma tendência foi observada para a massa seca (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros produtivos avaliados na cultivar de trigo CD 120, submetida ao déficit hídrico, no município de Palotina - 2014.

Altura da planta (cm)									Comprimento da espiga (cm)							
Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		
	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco
CD120	65,95 ^{Aa}	61,67 ^{Aa}	63,7 ^{Aa}	48,2 ^{Bb}	66,45 ^{Aa}	59,53 ^{Ab}	62,93 ^{Aa}	51,73 ^{Ab}	8,6 ^{ABa}	6,98 ^{Ab}	8,97 ^{Aa}	6,12 ^{Ab}	8,15 ^{Ba}	6,94 ^{Ab}	9,06 ^{Aa}	6,53 ^{Ab}
Números de espigas/ planta									Números de grãos por espiga/ planta							
Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		
	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco
CD120	3,87 ^{Ca}	2,13 ^{Bb}	6,0 ^{ABa}	6,07 ^{Aa}	4,87 ^{BCa}	3,0 ^{Bb}	6,93 ^{Aa}	5,27 ^{Ab}	34,6 ^{Aa}	21,59 ^{Ab}	28,24 ^{Ba}	16,32 ^{Ab}	32,17 ^{ABa}	21,95 ^{Ab}	27,65 ^{Ba}	17,05 ^{Ab}
Massa de 100 grãos(g)									Massa total de grãos/planta (g)							
Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		
	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco
CD120	2,51 ^{Aa}	1,28 ^{ABb}	2,35 ^{ABa}	1,01 ^{Bb}	2,21 ^{Ba}	1,51 ^{Ab}	2,39 ^{ABa}	0,91 ^{Bb}	2,78 ^{Ca}	1,28 ^{Ab}	3,89 ^{ABa}	1,29 ^{Ab}	3,10 ^{BCa}	1,65 ^{Ab}	4,35 ^{Aa}	1,02 ^{Ab}
Massa fresca (g)									Massa seca (g)							
Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		Controle		Sulfato de Amônio		<i>H. seropedicae</i>		<i>H. seropedicae</i> + Sulfato de Amônio		
	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco	Irrigado	Seco
CD120	9,98 ^{Ca}	2,58 ^{Cb}	17,52 ^{Ba}	10,75 ^{Ab}	6,37 ^{Ca}	3,11 ^{Cb}	22,57 ^{Aa}	7,64 ^{Bb}	1,40 ^{Ba}	0,45 ^{Cb}	2,21 ^{Aa}	1,06 ^{Ab}	1,26 ^{Ba}	0,60 ^{BCb}	2,34 ^{Aa}	0,72 ^{Bb}

Cada valor representa a média \pm S.E (n=15), seguidas da mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente pelo Tukey ($p \leq 0,05$) entrediferentes condições de fertilização/inoculação
 Cada valor representa a média \pm S.E (n=15), seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo Tukey ($p \leq 0,05$) entre as condições hídricas avaliadas.

5. DISCUSSÃO

As plantas são capazes de desenvolver mecanismos específicos para combater os estresses bióticos e abióticos, contudo, as populações microbianas benéficas presentes na rizosfera desempenham um papel significativo na redução da intensidade desses estresses (NADEEM et al., 2014).

Na literatura, podem ser encontradas respostas distintas das BPCV em plantas submetidas ao estresse osmótico e que variam em função da estirpe ou estirpes, presença ativa de enzimas antioxidantes, espécie vegetal ou cultivar/variedade, tipo do tecido, tipo de estresse, da intensidade e duração do estresse e dos níveis de geração das EROs (ABOGADALLAH, 2010; FILIPPOU et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2013; ROLLI et al., 2014).

Lemos et al., (2011) e Simova-Stoilova et al., (2009) citam que a ocorrência de restrição hídrica no período de florescimento e enchimento de grãos promoveu as maiores perdas à produtividade das plantas de trigo, apesar de que na literatura, são observados vários trabalhos sobre a atividade antioxidante das bactérias em trigo submetidos à restrição hídrica avaliados na fase inicial da cultura, tornando difícil a comparação (KASIM et al., 2013; CHAKRABORTY et al., 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam um efeito positivo da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* em plantas estressadas da cv CD120, que apresentaram um TRA 18% maior. Chakraborty et al.,(2013)observaram em trigo aumentos de 1,29 vezes no conteúdo de água das células em plântulas de trigo 30 dias após a semeadura submetidas ao estresse de 9 dias, inoculadas com *Bacillus safensis* e *Ochrobactrum pseudogregnonense*.

Timmusk et al., (2014) observaram índices de sobrevivência (80%) maiores em plântulas de trigo inoculadas com *Bacillus thuringiensis* submetidas à seca. Kim et al., (2014) observaram que a presença de *Bacillus phytofirmans* em plantas de trigo no florescimento e submetidas à restrição hídrica promoveram índices similares de TRA entre plantas irrigadas e estressadas.

O MDA é considerado como um biomarcador do estresse oxidativo (FILIPPOU et al., 2011). A restrição hídrica pode aumentar a formação de EROs, provocando a peroxidação lipídica, alterando a permeabilidade das membranas e sua composição (KARATAS et al., 2014). Em relação ao IEM, plantas controle tiveram redução

acentuada de permeabilidade da membrana e a inoculação permitiu ao cv CD120 manter intacta as suas membranas apesar dos níveis de MDA terem aumentado 8%, não sendo suficiente para romper as células.

A prolina pode aumentar o turgor no citoplasma, retendo a água celular, a fim de manter as atividades bioquímicas no interior das células da planta e estabilizar membranas e proteínas sob condições de seca (ABDELKADER et al., 2010; GURURANI et al., 2013). Os resultados obtidos permitem concluir variações nos níveis de prolina nas plantas de trigo irrigadas e submetidas a estresse hídrico, e ainda valores menores na presença da bactéria. A maior redução deste osmólito durante o florescimento poderia ser explicada pelo fato da prolina migrar para a formação dos botões florais (NANJO et al., 1999). A presença da bactéria permitiria esta migração tendo em vista que os índices de estabilidade de membrana apresentaram-se maiores, resultando em um aumento na massa de 100 grãos nesta cultivar.

Kohler et al.,(2009), sugerem que a prolina pode atuar como um sequestrante de radicais livres. Os autores observaram em plantas de alface inoculadas e não inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares isolados ou em combinação (*Glomus intraradices* e *Glomus mosseae*) e BPCV (*Pseudomonas mendocina*), que as plantas inoculadas mostraram uma supressão de enzimas antioxidantes (CAT e POX) possivelmente devido ao acúmulo de menores níveis de prolina. Como indicado acima, esta diminuição na atividade enzimática em plantas inoculadas pode ser parcialmente explicada pelo fato de que essas plantas foram submetidas a um estresse oxidativo inferior sob condições de salinidade moderada. Os autores concluem que a bactéria promotora do crescimento vegetal *P. mendocina*, foi mais eficaz do que o fungo micorrizíco na minimização dos efeitos negativos do estresse.

Os dados obtidos discordam de Chakraborty et al., (2013) que relataram níveis maiores de prolina em variedades de trigo inoculadas com *B. safensis* e *O. pseudogronense* isoladas de locais salinos. Gururani et al., (2013) observaram aumentos nos níveis de prolina na ordem de 1,5 a 2,6 vezes pela presença de rizobactérias em consórcio em plantas de batata submetidas a estresse osmótico e presença de metais pesados.

O sistema antioxidante desempenha um papel importante na tolerância das plantas contra as condições de estresse, e concentrações elevadas destas enzimas antioxidantes têm sido relatadas em espécies tolerantes em comparação com aqueles sensíveis (GILL; TUTEJA, 2010). A tolerância das plantas a esses estresses (hídrico,

salinidade, metais tóxicos) estariam correlacionados com o aumento dos níveis de enzimas detoxificadoras de EROs (CAT, APX, SOD, CAT, DHAR, GR e GST), implicando que a inoculação com estirpes de BPCV desencadeia vias abióticas de defesa relacionadas com o estresse sob condições estressadas (TUNC-OZDEMIR et al., 2009; GURURANI et al., 2013).

A CAT é uma importante enzima antioxidante que decompõe H_2O_2 em H_2O . Hasanuzzaman et al., (2011) em plântulas de trigo submetidas a estresse salino não verificaram mudanças nos níveis da CAT, cujos valores nas plantas controle foram de aproximadamente $60 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Neste trabalho, plantas controle irrigadas em florescimento apresentaram uma atividade de $2,6.10^{-7} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, valor muito abaixo do encontrado pelo autor acima citado. Embora a metodologia fosse a mesma, as fases fenológicas das plantas amostradas foram diferentes. Filippou et al., (2011) observaram que a expressão gênica da CAT obtida em plantas de *Medicago trunculata* submetidas a 9 dias de estresse apontam para diminuição dos transcritos proporcional ao número de dias a submissão ao estresse hídrico.

Os valores de atividade específica da SOD apresentaram alterações em plantas inoculadas e submetidas à seca. Esse comportamento diferiu do observado por Armada et al., (2014) que não observaram variações em plantas de *Lavandula dentata* e *Salvia officinalis* submetidas a estresse salino, demonstrando um papel insignificante desta enzima nos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo. Porém, Simova-Stoilova et al., (2009) observaram em plantas de trigo altos níveis da atividade das enzimas SOD e CAT proporcional ao período de estresse e esses autores correlacionaram os níveis do estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes com a tolerância ou a susceptibilidade dos genótipos de trigo à seca. Pode-se concluir que a cv CD120 seria suscetível à seca uma vez que apresentou menor indução da atividade de CAT (SIMOVA-STOILOVA et al., 2009). Todavia, pelo fato da CAT ter baixa afinidade por H_2O_2 e ser incapaz de baixar os níveis de EROs a níveis normais fisiológicos, as plantas podem sofrer estresse oxidativo mesmo na presença de alta concentração de CAT (ABOGADALLAH, 2010).

Por outro lado, os dados obtidos neste trabalho corroboram com Chakraborty et al., (2013), que relatam níveis decrescentes da CAT à medida da continuidade do estresse em genótipos de trigo suscetíveis, porém a inoculação com um consórcio de bactérias (*B. safensis* e *O.pseudogregnonense*) promoveu um aumento significativo nos níveis da CAT e SOD.

A enzima APX está relacionada com uma fina regulação do EROs e a perda da sua atividade resulta em um acúmulo de EROs em altos níveis e na indução da CAT. Chakraborty et al.,(2013)observaram que os níveis de APX eram menores em cultivares suscetíveis à seca, enquanto que nas tolerantes esses índices foram aumentados apontando ser esta enzima fundamental na obtenção da tolerância pelas plantas. Altos níveis de APX induzidos pelas bactérias poderiam ser benéficos para manter o sistema antioxidante ativo no vegetal. Kasim et al.,(2013) observaram resultados similares de redução dos níveis de APX em plântulas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus amyloliquefaciens* e submetidas a 5 dias de estresse hídrico. Os autores enfatizam a hipótese da inoculação reduzir os níveis de EROs nas plantas estressadas devido a uma menor atividade enzimática antioxidante fortemente correlacionada com aumento na fotossíntese e crescimento. Citam também, uma alta correlação negativa entre atividade da APX e conteúdo de água (0,98) das folhas estressadas e a inoculação reduziu esta correlação (0,85 e 0,88 para *B. amyloliquefaciens* e *A. brasilense*, respectivamente).

Joshi et al., (2011) relatam que dentre as enzimas do complexo antioxidante, a APX apresenta o papel mais importante no metabolismo do H₂O₂ durante o estresse comparado à CAT e a outras enzimas do sistema glutaciona, por proteger os cloroplastos das EROs durante a seca (KOUSSEVITZKY et al., 2008). Nos resultados obtidos foram observadas diferenças entre as condições aplicadas. Plantas controle da cv CD120 apresentaram um aumento da ordem de 3,5 vezes em plantas submetidas a estresse hídrico. Estes dados foram similares aos encontrados por Hasanuzzaman et al., (2011) em plântulas de trigo com 6 dias, submetidas a 300 mM de NaCl. Houve uma diminuição numérica nos teores de APX quando as plantas foram inoculadas com a bactéria (*H. seropedicae*), o que demonstra o efeito da bactéria sobre os níveis dessa enzima.

De acordo com Bhatt et al., (2011) o aumento da atividade da SOD é positivamente correlacionada com um menor risco de dano celular. No entanto, o H₂O₂ é um subproduto da atividade da SOD. Em pH fisiológico, o H₂O₂ existe numa forma neutra e, portanto, pode facilmente penetrar através das membranas biológicas. Os autores citam um aumento significativo na atividade específica da SOD de 47% sob estresse, em variedades de milho. Porém, os autores comentam que uma alta atividade da SOD não necessariamente está correlacionada positivamente com uma maior tolerância das plantas ao estresse. Todavia, um aumento na atividade da SOD poderia

ser causada por um aumento nas EROs acompanhada de um aumento nas atividades das enzimas metabolizadoras de H₂O₂ como a APX. Neste trabalho, as enzimas foram inversamente proporcionais durante o período de seca e na presença da bactéria.

Poucos trabalhos estão disponíveis no envolvimento da GST em resposta à seca. KojićD. et al., (2012) detectaram atividade da GST apenas em raízes de milho submetidas a seca. Gallé et al., (2009) em trigo observaram diferenças na expressão e atividade desta enzima em genótipos de trigo em fase de enchimento de grãos durante a seca e, concluíram que uma alta concentração da GST estaria correlacionada com cultivares tolerantes (LABUDDA; AZAM, 2014). Os dados obtidos neste trabalho concordam com Filippou et al.,(2011) onde os níveis da GST não variaram entre plantas estressadas e não estressadas, possivelmente explicada pelo fato da planta responder mais a fertilização/inoculação como um agente estressante.

Embora os resultados obtidos apontem para níveis distintos de enzimas entre condições de fertilização/inoculação e condição hídrica (irrigado e estressado), porém não conclusivos, os efeitos observados pela presença da bactéria *H. seropedicae* poderiam ser explicados pela alteração e promoção de um sistema radicular maior e mais denso, com uma superfície maior de raízes laterais. Outros autores observaram o efeito benéfico das bactérias no sistema radicular, aumentando assim a absorção de água e nutrientes o que poderia explicar os valores altos de TRA encontrados nas plantas inoculadas e submetidas a restrição hídrica, onde o CD120 apresentou a manutenção da integridade da membrana plasmática celular, níveis maiores porém não significativos da enzima APX, e um maior IEM em relação ao controle estressado (NEIVERTH et al., 2014; TIMMUSK et al., 2014). Plantas com um sistema radicular mais profundo manteriam seus teores de água devido a absorção contínua de água.

A seca reduz significativamente a massa fresca e seca que está correlacionada com o declínio de água das células (KASIM et al., 2013). Neiverth et al., (2014) observaram pouca variação na massa fresca e seca de plantas de trigo de diferentes genótipos submetidas à inoculação com *H. seropedicae*. Naveed et al., (2014), avaliaram o efeito da inoculação em trigo com *Burkholderia phytofirmans* submetidas ao estresse hídrico em diferentes estádios de crescimento (perfilhamento e floração) e como resultados foi observado que o estresse hídrico afetou negativamente os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de crescimento de plântulas de trigo.

São escassos os trabalhos na literatura que determinem o grau de influência das BPCV em plantas de trigo e ainda submetidas à seca. Apesar da não significância dos

resultados de produção nas plantas inoculadas, estes apontam incrementos em todos os parâmetros avaliados, sendo de destaque a biomassa seca e fresca e a massa de 100 grãos superior pela presença de bactéria e sob estresse hídrico apresentaram acréscimos pela presença específica da bactéria em ambas as condições avaliadas.

6. CONCLUSÃO

Plantas inoculadas com *H. seropedicae* submetidas ao estresse hídrico, apresentaram menores acréscimos no IEM (19%), no MDA (41%) e prolina (6,7 vezes) em comparação com o controle (30%, 70% e 25 vezes, respectivamente).

Em relação ao efeito antioxidante, a seca promoveu redução acentuada da atividade específica da CAT independentemente das condições de fertilização/inoculação aplicadas. Para a SOD, plantas estressadas e na presença da bactéria, aumentaram os níveis desta enzima, e para a GST, o efeito foi inverso. Porém, a atividade da APX permaneceu inalterada, tanto pela aplicação do estresse quanto pela presença da inoculação.

A presença bacteriana aumentou a biomassa seca e fresca e a massa de 100 grãos.

Apesar do pouco efeito antioxidante observado não houve dano ao tecido e não houve efeito na produtividade sob condição de déficit hídrico, contudo o efeito antioxidante, este não foi capaz de restabelecer.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, A. F., HASSANEIN, A., ABO-ALY M. M., ATTIA, M. S., BAKIR E. M. Screening the bio-safety of wheat produced from pretreated grains to enhance tolerance against drought using physiological and spectroscopic methods. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.7, p.1827-1835. 2010.
- ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. 2015. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/index.php?mpg=02.00.00>. Acesso em: 20 de maio de 2014.
- ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. **O Triticulor e o Mercado**. São Paulo, Julho de 2011, 44p. 2011.
- ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, v.5, n.4, p.369-374. 2010.
- ABOGADALLAH, G. M., SERAG, M. M., QUICK W. P. Fine and coarse regulation of reactive oxygen species in the salt tolerant mutants of barnyard grass and their wild-type parents under salt stress. **Physiologia Plantarum**, v.138, n.1, p.60-73. 2010.
- AHEMAD, M., KIBRET, E. M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v.26, n.1, p.1-20. 2013.
- AHMAD, I., AKHTAR, M., ZAHIR, Z. A., NAVEED, M., MITTER, B., SESSITSCH, A. Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, n.18, p.11054-11065. 2014.
- AL-WHAIBI, M. H., SIDDIQUI, M. H., BASALAH M. O. Salicylic acid and calcium-induced protection of wheat against salinity. **Protoplasma**, v.249, n.3, p.769-778. 2012.
- ARMADA, E., ROLDÁN, A., AZCON R. Differential Activity of Autochthonous Bacteria in Controlling Drought Stress in Native Lavandula and Salvia Plants Species Under Drought Conditions in Natural Arid Soil. **Microbial Ecology**, v.67, n.2, p.410-420. 2014.
- ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1, 2009/2, p.84-93. 2009.
- BADRI, D. V., WEIR, T. L., LELIE, D. V. D., VIVANCO J. M. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, n.6, p.642-650. 2009.
- BATES, L. S., WALDREN, R. P., TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, n.1, p.205-207. 1973.
- BAYSAL, Ö., GÜRSOY, Z. Y., ÖRNEK, H., ÇETINEL, B., SILVA, J. A. T. da. Enhanced systemic resistance to bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by dl-β-aminobutyric acid under salt stress. **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 3, p. 493-506, 2007.

BHATT, D., NEGI, M., SHARMA, P., SAXENA, S. C., DOBRIYAL, A. K., ARORA, S. Responses to drought induced oxidative stress in five finger millet varieties differing in their geographical distribution. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.17, n.4, p.347-353. 2011.

BHATTACHARYYA, P. N., JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.4, p.1327-1350.2012.

CAMELO, M. R., VERA, S. P., BONILLA, B. R. R. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v.12, n.2, p.159-166. 2011.

CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., SANTOS, L. C. C. B., VALDAMERI, G., DONATTI, L., FAORO, H., WEISS, V. A., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v.15:378 , p.378. 2014.

CARLIER, E., ROVERA, M., JAUME, A. R., ROSAS, B. S. Improvement of growth, under field conditions, of wheat inoculated with *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.11, p.2653-2658. 2008.

CHAKRABORTY, U., CHAKRABORTY, B. N., CHAKRABORTY, A. P., DEY, P. L. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.789-803. 2013.

CHANDRA BABU, R., ZHANG, J., BLUM, A., DAVID HO, T. H., WU, R. , NGUYEN, H. T. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. **Plant Science**, v.166, n.4, p.855-862. 2004.

CLAEYS, H., INZÉ, D. The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water-Limiting Conditions. **Plant Physiology**, v.162, n.4, p.1768-1779. 2013.

COHEN, A. C., BOTTINI, R., PONTIN, M., BERLI, F. J., MORENO, D., BOCCANLANDRO, H., TRAVAGLIA, C. N., PICCOL, P. N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia Plantarum**, v.153, n.1, p.79-90. 2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.1 - Safra 2013/14, n.11 - Décimo Primeiro Levantamento, Brasília, p. 1-82, ago. 2014.

CRUZ DE CARVALHO, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, n.3, p.156-165. 2008.

- CRUZ, C. D. **Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes**. Viçosa: UFV - Universidade Federal de Viçosa, v.1. 2006. 285 p.
- DE SOUZA MOREIRA, F. M., SILVA, K. da, NÓBREGA, R. S. A., CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74. 2010.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, n.0, p.212-228. 2015.
- DIMPKA, C., WEINAND, T., ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant Cell Environment**, v.32, p.1682 - 1694. 2009.
- DIXON, D. P., SKIPSEY, M., EDWARDS, R. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v.71, n.4, p.338-350. 2010.
- DOLFERUS, R. To grow or not to grow: A stressful decision for plants. **Plant Science**, v.229, n.0, p.247-261. 2014.
- DONN, S., KIRKEGAARD, J. A., PERERA, G., RICHARDSON, A. E., WATTM. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. **Environmental Microbiology**, p.1-12. 2014.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/trigo1>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2015.
- EMBRAPA/CNPT. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Cultura do Trigo. 2014. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em: 27 de janeiro de 2014.
- FERNANDES JUNIOR, P. I., PEREIRA, G. M. D., PERIN, L., SILVA, L. M. da, BARAÚNA, A. C., ALVES, F. M., PASSOS, S. R., ZILLI, J. E. Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biología Tropical**, v.61, p.991-999. 2013.
- FILIPPOU, P., ANTONIOU, C., FOTOPOULOS, V. Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, n.2, p.270-277. 2011.
- FISCHER, R. A., EDMEADES, G. O. Breeding and cereal yield progress. **Crop Science**, v.50, n.1, p. 85-98. 2010.
- FOYER, C. H., NOCTOR, G. Managing the cellular redox hub in photosynthetic organisms. **Plant, Cell & Environment**, v.35, n.2, p.199-201. 2012.
- FU, Q., LIU, C., DING, N., LIN, Y., GUOB. Ameliorative effects of inoculation with the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* sp. DW1 on growth of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress. **Agricultural Water Management**, v.97, n.12, p. 1994-2000. 2010.

GALLÉ, Á., CSISZÁR, J., SECENJI, M., GUÓTH, A., CSEUZ, L., TARI, I., GYÖRGYÉY, J., ERDEI, L. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, v.166, n.17, p.1878-1891. 2009.

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.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v.169, n.1, p.30-39. 2014.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v.251, n.1, Oct 1, p.1-7. 2005.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v.2012, p.15. 2012.

GROß, F., DURNER, J., GAUPELS, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.419. 2013.

GURURANI, M. A., UPADHYAYA, C. P., BASKAR, V., VENKATESH, J., NOOKARAJU, A., PARK, S. W. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in *Solanum tuberosum* Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and Improved Photosynthetic Performance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, n.2, p.245-258. 2013.

GUSAIN, Y. S., SINGH, U. S., SHARMA, A. K. Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.9, p.764-773. 2015.

HASANUZZAMAN, M., HOSSAIN, M. A., FUJITA, M. Nitric oxide modulates antioxidant defense and the methylglyoxal detoxification system and reduces salinity-induced damage of wheat seedlings. **Plant Biotechnology Reports**, v.5, n.4, p.353-365. 2011.

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v.84, n.2, p.450-455. 1987.

HUANG, G. T., MA, S. L., BAI, L. P., ZHANG, L., MA, H., JIA, P., LIU, J., ZHONG, M., GUO, Z. F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biology Reports**, v.39, n.2, p.969-987. 2012.

IAPAR. Informações técnicas para trigo e triticale – safra 2013. **Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale**, Londrina, PR, 29 de julho a 2 de agosto de 2012. – Londrina, PR: Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), 2013. 220 p.

ISLAM, F., YASMEEN, T. ALI, Q. ALI, S., ARIF, M. S., HUSSAIN, S., RIZVI, H. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.104, n.0, p.285-293.2014.

JALEEL, C. A., MANIVANNAN, P., WAHID, A., FAROOQ, M., AL-JUBURI, H.J., SOMASUNDARAM, R., VAM, R. P. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.11, p.100-105. 2009.

JAMES, E. K., OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 17(1):77–119. 1997.

JOSHI, P. K., SAXENA, S. C., ARORA, S. Characterization of *Brassica juncea* antioxidant potential under salinity stress. **Acta Physiologia e Plantarum**, v.33, n.3, p.811-822. 2011.

KAMAL, A. H. M., CHO, K., KIM D. E., UOZUMI, N., CHUNG, K.Y., LEE, S.Y., CHOI, J. S., CHO, S. W., SHIN, C. S., WOO, S. H. Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. **Molecular Biology Reports**, v.39, n.9, p.9059-9074. 2012.

KARATAS, I., ÖZTÜRK, L., DEMIR, Y., UNLÜKARA, A., KURUNÇ, A., DÜZDEMİR, O. Alterations in antioxidant enzyme activities and proline content in pea leaves under long-term drought stress. **Toxicology And Industrial Health**, v.30, n.8, p.693-700. 2014.

KARUPPANAPANDIAN, T., MOON, J. C., KIM, C., MANOHARAN, K., KIMW. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6, p.709. 2011.

KASIM, W. A., OSMAN, M. E., OMAR, M. N., EL-DAIM, I. A. A., BEJAI, S., MEIJER, J. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. **J Plant Growth Regulation**. v.32, p.122-130. 2013.

KEUNEN, E. L. S., PESHEV, D., VANGRONSVELD, J., VAN DEN ENDE, W., CUYPERS, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell & Environment**, v.36, n.7, p.1242-1255. 2013.

KIM, Y., KHAN, A., WAQAS, M., SHIM, J. K., KIM, D. H., LEE, K. Y., LEE, I. J. Silicon Application to Rice Root Zone Influenced the Phytohormonal and Antioxidant Responses Under Salinity Stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.33, n.2, p.137-149. 2014.

KOHLER, J., HERNÁNDEZ, J. A., CARAVACA, F., ROLDÁN, A. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, p.245-252. 2009.

KOJIĆ D., PAJEVIĆ S., JOVANOVIĆ-GALOVIĆ, A., PURAĆ, J., PAMER, E., ŠKONDRIĆ, S., MILOVAC, S., POPOVIĆ, Ž., GRUBOR-LAJŠIĆ, G. Efficacy of natural aluminosilicates in moderating drought effects on the morphological and physiological parameters of maize plants (*Zea mays* L.). **Journal of soil science and plant nutrition**, v.12, p.113-123. 2012.

KOUSSEVITZKY, S., SUZUKI, N., HUNTINGTON, S., ARMIJO, L., SHA, W., CORTES, D., SHULAEV, V., MITTLER, R. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34197–34203, 2008.

KRISHANIA, S., DWIVEDI, P., AGARWAL, K. Strategies of adaptation and injury exhibited by plants under a variety of external conditions: a short review. **Comunicata Scientiae**, v.4, n.2, p.103-110. 2013.

LABUDDA, M., SAFIUL AZAM, F. M. Glutathione-dependent responses of plants to drought: a review. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.83, p.3-12. 2014.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.1, 2013, p.83-108. 2013.

LEMO, J. M., VENDRUSCOLO, E. C. G., SCHUSTER, I., DOS SANTOS, M. F. Physiological and Biochemical Responses of Wheat Subjected to Water Deficit Stress at Different Phenological Stages of Development. **Journal of Agricultural Science and Technology B**, v.1, n.8, p.22-30. 2011.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-75. 1951.

MACHADO, R. S., RIBEIRO, R. V., MARCHIORI, P. E. R., MACHADO, D. F. S. P., MACHADO, E. C., LANDELL, M. G. de A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p.1575-1582. 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2013/2014 a 2023/2024 projeções de longo prazo**. Brasília, Setembro de 2014, 100p. 2014.

MAPELLI, F., MARASCO, R., BALLOI, A., ROLLI, E., CAPPITELLI, F., DAFFONCHIO, D., BORIN, S. Mineral-microbe interactions: biotechnological potential of bioweathering. **Journal of biotechnology**, v.157, n.4, p.473-481. 2012.

MARQUES, P. A. A., BORTOLO, D. P. G., SANTOS, A. C. P. Produtividade de inflorescências de calêndula sob irrigação suplementar na região do oeste paulista. **Irriga**, v.16, n.2. 2011.

MATTIOLI, R., COSTANTINO, P., TROVATO, M. Proline accumulation in plants: Not only stress. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.11, p.1016-1018. 2009.

MATYSIK, J., BHALU, B. MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v.82, n.5, p.525-532. 2002.

MHAMDI, A., QUEVAL, G., CHAOUCH, S., VANDERAUWERA, S., VAN BREUSEGEM, F., NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n. 15, 2010, p. 4197-4220. 2010.

MOUTIA, J. F. Y., UMRIT, G., SAUMTALLY, A. S., KEE KWONG, K. F. The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in mauritius: Preliminary results. AMAS 2003. **Food and Agricultural Research Council, Réduit**, Mauritius, p.29-39. 2003.

NADEEM, S. M., AHMAD, M., ZAHIR, Z. A, JAVAID, A., ASHRA, F. M. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, v.32, n.2, p.429-448. 2014.

NADEEM, S. M., ZAHIR, Z. A., NAVEED M, ARSHAD, M. Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.1141-1149, 2007.

NANJO, T., KOBAYASHI, M., YOSHIBA, Y., SANADA, Y., WADA, K., TSUKAYA, H., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v.18, n.2, p.185-193. 1999.

NASEEM, H., BANO, A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 689-701, 2014.

NAVEED, M., HUSSAIN, M. B., ZAHIR A. Z., MITTER, B., SESSITSCH, A. Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Plant Growth Regulation**, v.73, n.2, p.121-131. 2014.

NEHNEVAJOVA, E., LYUBENOVA, L., HERZIG, R., SCHRÖDER, P., SCHWITZGUÉBEL, J. P., SCHMÜLLING, T. Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adult sunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, v.76, n.0, p.39-48. 2012.

NEIVERTH, A., DELAI, S., GARCIA, D. M., SAATKAMP, K., SOUZA, E. M. DE, PEDROSA, F. DE O., GUIMARÃES, V. F., DOS SANTOS, M. F., VENDRUSCOLO, E. C. G., COSTA, A. C. T. da. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **European Journal of Soil Biology**, v.64, n.0, 2014, p.1-5. 2014.

NICO, M., RIBAUDO, C. M., GORI, J. I., CANTORE, M. L., CURÁ, J. A. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v.61, n.0, p.190-195. 2012.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, v.144, p.1636-1648. 2014.

ODEPA. **Boletín de Trigo – Enero 2014**. Santiago: Publicación de la Oficina de Estudios e Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. 2014. 32p.

ORTIZ, N., ARMADA, E., DUQUE, E., ROLDÁN, A., AZCÓN, R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. **Journal of Plant Physiology**, v.174, n.0, p.87-96. 2015.

PAUL, D., LADE, H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.34, n.4, p.737-752. 2014.

PELEG-GROSSMAN, S., MELAMED-BOOK, N., LEVINE, A. ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. **Plant Signaling & Behavior**, v.7, n.3, p.409-415. 2012.

PÉREZ-MONTAÑO, F., ALÍAS-VILLEGAS, C., BELLOGÍN, R. A., CERRO, P. DEL, ESPUNY, M. R., JIMÉNEZ-GUERRERO, I., LÓPEZ-BAENA, F. J., OLLERO, F. J., CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v.169, n.5-6, p.325-336. 2014.

RODRIGUEZ, R., REDMAN, R. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.9, p.3175-3176.2005.

ROLLI, E., MARASCO, R. VIGANI, G., ETTOUMI, B., MAPELLI, F., DEANGELIS, M. L., GANDOLFI, C., CASATI, E., PREVITALI, F., GERBINO, R., CEI, F. P., BORIN, S., SORLINI, C., ZOCCHI, G., DAFFONCHIO, D. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. **Environmental Microbiology**, p.1-16. 2014.

SAIRAM, R. K., RAO, K. V., SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, v.163, n.5, p.1037-1046. 2002.

SANTOS, P. R. R., FERREIRA, D. T. L., OLIVEIRA, P. S. R. Produção de massa verde e massa seca em linhagens de trigo com aptidão para duplo propósito. **Revista Acta Iguazu**, v. 2, p. 14, 2013.

SCHONFELD, M. A., JOHNSON, R. C., CARVER, B. F., MORNHINWEG, D. W. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. **Crop Science**, v.28, n.3, p.526-531. 1988.

SIGNORELLI, S., COITIÑO, E. L., BORSANI, O., MONZA, J. Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 1, p. 37-47, 2013.

SIMOVA-STOILOVA, L., DEMIREVSKA, K., PETROVA, T., TSENOV, N., FELLER, U. Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. **Plant Growth Regulation**, v.58, n.1, p.107-117. 2009.

SUZUKI, N., KOUSSEVITZKY, S., MITTLER, R., MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v.35, n.2, p.259-270. 2011.

SWINDEN, L. B. **Effect of processing on the distribution of cadmium in wheaten products**. 2006, 294p.Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Molecular Sciences, Victoria University, Victoria, Australia.2006.

TIMMUSK, S., EL-DAIM, I. A. A., COPOLOVICI, L., TANILAS, T., KÄNNASTE, A., BEHERS, L., NEVO, E., SEISENBAEVA, G., STENSTRÖM, E., NIINEMETS,Ü. Drought-Tolerance of Wheat Improved by Rhizosphere Bacteria from Harsh Environments: Enhanced Biomass Production and Reduced Emissions of Stress Volatiles. **PLoS one**, v.9, n.5, p.e96086. 2014.

TSENG, M. J., LIU, C. W., YIU, J. C. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, n.10, p.822-833. 2007.

TU, W. Y., POHL, S., SUMMPUNN, P., HERING, S., KERSTAN, S., HARWOOD, C. R. Comparative analysis of the responses of related pathogenic and environmental bacteria to oxidative stress. **Microbiology**, v.158, p.636-647. 2012.

TUNC-OZDEMIR, M., MILLER, G., SONG, L., KIM, J., SODEK, A., KOUSSEVITZKY, S., MISRA, A. N., MITTLER R., SHINTANI, D. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. **Plant physiology**, v.151, n.1, p.421-432. 2009.

VAN ROSSUM, M. W. P. C., ALBERDA, M., VAN DER PLASL. H. W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, v.130, n.2, p.207-216. 1997.

VELIVELLI, S. S., SESSITSCH, A., PRESTWICH, B. D. The Role of Microbial Inoculants in Integrated Crop Management Systems. **Potato Research**, p.1-19. 2015.

VENDRUSCOLO, E. C. G., SCHUSTER, I., PILEGGI, M., SCAPIM, C. A.,

MOLINARI, H. B., MARUR, C. J., VIEIRA, L. G. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.164, n.10, p.1367-1376. 2007.

VENISSE, J. S., GULLNER, G., BRISSET, M. N. Evidence for the Involvement of an Oxidative Stress in the Initiation of Infection of Pear by *Erwinia amylovora*. **Plant Physiology**, v.125, n.4, p.2164-2172. 2001.

VERBRUGGEN, N., HERMANS, E. C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v.35, n.4, p.753-759. 2008.

WEYENS, N., VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S., NEWMAN, L., VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.10, p.591-598. 2009.

YANG, J., KLOEPPER, J. W., RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v.14, n.1, p.1-4. 2009.

ZADOKS, C. J., CHANG, T. T., KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v.14, n.5, p.415-421. 1974.

ZHANG, L., MA, H., CHEN, T., PEN, J., YU, S., ZHAO, X. Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity. **PLOS ONE**, v.9, n.11, p.e112807. 2014.

ZHAO, P., LIU, P., SHAO, J., LI, C., WANG, B., GUO, X., YAN, B., XIA, Y., PENG, M. Analysis of different strategies adapted by two cassava cultivars in response to drought stress: ensuring survival or continuing growth. **Journal of Experimental Botany**, December 29, 2014. 2014.

ZIMMERMANN, P., ZENTGRAF, U. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.10, n.3, p.515-534. 2005.