

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**CHRISTIANY CHAGAS TOLEDO**

**Efeito do *priming* com putrescina sobre aspectos bioquímicos e metabólicos durante o desenvolvimento inicial de dois híbridos de milho contrastantes para a tolerância à seca**

**Alfenas/MG**

**2019**

**CHRISTIANY CHAGAS TOLEDO**

**Efeito do *priming* com putrescina sobre aspectos bioquímicos e metabólicos durante o desenvolvimento inicial de dois híbridos de milho contrastantes para a tolerância à seca**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, área de concentração Tecnologias Ambientais para obtenção do título de “Mestre em Ciências Ambientais”.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Colaboradores: Letícia Aparecida Bressanin, Marco Aurélio Leite, Ana Clara Cruz da Silva e Mônica Corrêa Del Peloso.

**Alfenas/MG**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Toledo, Christiany Chagas

T649e Efeito do *priming* com putrescina sobre aspectos bioquímicos e metabólicos durante o desenvolvimento inicial de dois híbridos de milho contrastantes para a tolerância à seca. / Christiany Chagas Toledo – Alfenas, MG, 2019.  
40 f.: il. –

Orientador: Plínio Rodrigues dos Santos Filho.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Poliaminas. 2. Enzimas. 3. Antioxidante. 4. Déficit hídrico. 4. milho.  
I. Santos Filho, Plínio Rodrigues dos. II. Título.

CDD- 581



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG**  
**Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000  
Fone: (35) 3697-4729 (Coordenação) / (35) 3701-9268 (Secretaria)  
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



**CHRISTIANY CHAGAS TOLEDO**

**“Efeito do priming com putrescina sobre aspectos bioquímicos e metabólicos durante o desenvolvimento inicial de dois híbridos de milho contrastantes para a tolerância à seca”**

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 19 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho  
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Breno Régis Santos  
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Douglas José Marques  
Instituição: UFU

Assinatura: 

Dedicada a todas as mulheres que fazem ciência no Brasil.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador Plínio por ter aceitado orientar-me e por ter sido o melhor orientador que alguém poderia ter. Sempre ajudando em tudo, com muita paciência e super solícito em todas as minhas dúvidas, respondendo muito rapidamente. Ao Thiago por aceitar ser meu coorientador e ajudar-me em tudo. Ao João Marcelo Silva por ser uma pessoa incrível na minha vida e acreditar no meu potencial, amparando-me de todas as formas possíveis, tanto de perto quanto de longe. À Letícia Bressanin por permanecer ao meu lado, auxiliando em todo o experimento. Ao Marco Aurélio Leite por colaborar em grande parte dos experimentos e até o fim. À técnica do laboratório de Bioquímica Kris por ajudar-me com os experimentos e os cálculos. Ao meu pai por tornar possível a minha permanência em Alfenas enquanto pôde. À Gabi, técnica do laboratório Biogen e a todos que ajudaram-me financeiramente para que eu pudesse ficar mais um tempinho em Alfenas. À Daniela Braga e a Pâmela Ingrid por oferecerem alimentação. À dona Ciomara por estar sempre pronta para me ouvir. À minha amiga Carol por acreditar em mim. À minha mãe por dar-me força e ser a única pessoa que ainda me mantém viva. Ao meu irmão Marcello que incessantemente falava pra eu não desistir. À minha cachorra Tabah por animar-me a sair da cama quando eu mal conseguia levantar por conta da depressão. À Larissa, que apesar de não termos mais contato, me ajudou muito. À Thamires Nogueira, amiga-irmã da vida. À Unifal por me acolher tão bem desde a graduação. Aos professores pelos ensinamentos. À todas as pessoas que fazem parte do programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e dos Laboratórios de Bioquímica e Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (Biogen). À Embrapa Milho e Sorgo pela parceria na pesquisa. Nessa fase de correção agradeço ao Víctor Amadeu Soler por tornar meus dias melhores, mais suportáveis e também mais maravilhosos. Ao Víctor César por fazer meus dias mais felizes, sempre me fazendo rir. A Jade Del Nero que indicou a psicóloga Manoela Quero, que aceitou me atender gratuitamente e está fazendo uma grande diferença na minha vida. Ao bibliotecário Marlom por ter toda paciência comigo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

## RESUMO

As plantas são constantemente expostas a estresses bióticos e abióticos que afetam a sua produtividade, desenvolvimento e crescimento. O desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante provoca o estresse oxidativo. Este estudo teve como objetivo observar a ação da poliamina putrescina (PUT) e seu efeito no estresse oxidativo em híbridos de milho DKB 390 e BRS 1030 - resistente e sensível, respectivamente - sob condição de déficit hídrico. Foram realizadas análises do crescimento da parte aérea e da raiz, da ação das enzimas ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Também foram avaliados os teores de aminoácidos, amido, açúcares solúveis totais e açúcares redutores. Duas situações foram simuladas para a avaliação dos efeitos desse déficit: uma ausente de limitação hídrica, cujos tratamentos foram água (controle), putrescina 10  $\mu\text{M}$ , putrescina 100  $\mu\text{M}$  e putrescina 500  $\mu\text{M}$ . E outra com indução do déficit hídrico (-0,6 MPa) de manitol nas soluções juntamente com a adição da putrescina nas concentrações putrescina 10  $\mu\text{M}$ , putrescina 100  $\mu\text{M}$  e putrescina 500  $\mu\text{M}$  e um tratamento somente com água e manitol. Tanto a parte aérea quanto as raízes do híbrido DKB cresceram significativamente mais que o BRS, em todos os tratamentos. A enzima SOD teve maior atividade nas raízes de híbridos sensíveis, principalmente sob maiores níveis de putrescina, fora da condição de déficit. A GPX mostrou maior atividade nas raízes de DKB em todos os tratamentos, em comparação ao BRS. Os dois híbridos apresentaram pouca alteração de catalase. Nas raízes, o híbrido DKB teve maior atividade em apenas dois tratamentos. Na parte aérea houve diferença somente em BRS e nenhuma em DKB. Maiores concentrações de aminoácidos foram encontradas tanto nas raízes como na parte aérea de BRS com a aplicação de putrescina sob déficit hídrico. Para os teores de amido, foram notadas diferenças apenas quando comparadas as partes aéreas entre os híbridos na ausência de estresse com putrescina. Em relação aos açúcares solúveis totais, somente as raízes de BRS obtiveram aumento com a aplicação de putrescina sob déficit hídrico. Nos açúcares redutores houve pouca diferença em ambos os híbridos tanto na parte aérea como nas raízes.

**Palavras-chave:** Poliaminas. Enzimas. Antioxidante. Déficit hídrico. Milho.

## ABSTRACT

Plants are constantly exposed to biotic and abiotic stresses that affect their productivity, development and growth. The imbalance between the generation of reactive oxygen species and the performance of antioxidant defense systems causes oxidative stress. This study aimed to observe the action of putrescine polyamine (PUT) and its effect on oxidative stress in hybrid hybrids DKB 390 and BRS 1030 - resistant and sensitive, respectively - under water deficit condition. Analyzes of shoot and root growth, the action of the enzymes ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were performed. The contents of amino acids, starch, total soluble sugars and reducing sugars were also evaluated. Two situations were simulated to assess the effects of this deficit: one without water limitation, whose treatments were water (control), 10  $\mu\text{M}$  putrescine, 100  $\mu\text{M}$  putrescine and 500  $\mu\text{M}$  putrescine. And another with induction of the water deficit (-0.6 MPa) of mannitol in the solutions together with the addition of putrescine in the concentrations of putrescine 10  $\mu\text{M}$ , putrescine 100  $\mu\text{M}$  and putrescine 500  $\mu\text{M}$  and a treatment with only water and mannitol. Both the aerial part and the roots of the DKB hybrid grew significantly more than the BRS, in all treatments. The SOD enzyme had greater activity in the roots of sensitive hybrids, mainly under higher levels of putrescine, outside the deficit condition. GPX showed greater activity on DKB roots in all treatments, compared to BRS. The two hybrids showed little change in catalase. In the roots, the DKB hybrid had greater activity in only two treatments. In the aerial part there was a difference only in BRS and none in DKB. Higher concentrations of amino acids were found both in the roots and in the aerial part of BRS with the application of putrescine under water deficit. For starch contents, differences were noted only when comparing the aerial parts between the hybrids in the absence of stress with putrescine. In relation to total soluble sugars, only the roots of BRS increased with the application of putrescine under water deficit. In reducing sugars, there was little difference in both hybrids in both shoot and roots.

Keywords: Polyamines. Enzymes. Antioxidant. Water deficit. *Zea mays*.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Crescimento de plântulas de milho dos híbridos DKB e BRS.....	20
FIGURA 2 - Atividade da enzima APX .....	21
PRANCHA 1 - Atividade das enzimas SOD, GPX e CAT .....	23
PRANCHA 2 - Teor de aminoácidos, amido, açúcares solúveis totais e redutores...	26

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1	OBJETIVO .....	9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
2.1	Cultura do milho .....	10
2.2	Déficit hídrico.....	11
2.3	Mecanismos de tolerância .....	12
2.4	Estresse Oxidativo.....	13
2.5	Poliaminas.....	14
2.6	Priming de sementes.....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
3.1	Material vegetal e curva de embebição .....	16
3.2	Priming de sementes e condições de cultivo.....	16
3.3	Análise das enzimas do sistema antioxidante .....	17
3.4	Análise dos aminoácidos, açúcares e amido .....	18
3.5	Análise do conteúdo de aminoácidos .....	18
3.6	Análise dos açúcares solúveis totais e amido .....	18
3.7	Análises estatísticas .....	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse hídrico juntamente com o aumento da temperatura, resultante das mudanças climáticas provoca um impacto negativo no rendimento das culturas e no futuro este impacto poderá ser mais severo (TUBEROSA *et al.*, 2002). Estima-se que a população mundial atinja 9,7 bilhões de pessoas até 2050 e aproximadamente 49% das regiões afetadas pelo déficit hídrico poderão ser utilizadas para cultivo (ROSEGRANT, 2016). Assim, uma compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância das plantas ao estresse hídrico é fundamental. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formas parcialmente reduzidas ou ativadas de oxigênio atmosférico. São consideradas subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico que acompanham a vida na terra desde o surgimento dos organismos fotossintéticos que evoluem com oxigênio, cerca de 2,2 a 2,7 bilhões de anos atrás (MITTLER *et al.*, 2011).

A produção de EROs é importante em diversos processos da célula como a sinalização celular e defesa contra infecção, porém está mais relacionada a danos aos elementos celulares (POSPÍŠIL, 2009). Quando não neutralizadas, as concentrações aumentadas de EROs podem levar a destruição oxidativa da célula causando danos às membranas, proteínas, moléculas de DNA e RNA em um processo denominado estresse oxidativo (MITTLER, 2002). Entretanto, enzimas desintoxicantes de EROs que atuam nas células atenuam esse processo (MITTLER *et al.*, 2004).

No sistema vegetal estão presentes diversas substâncias endógenas que são indutoras ou modeladoras para a realização de processos fisiológicos. A poliamina é uma delas, sendo caracterizada por carga positiva, com a capacidade de se ligar a diferentes macromoléculas; como fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, resíduos constituintes da parede e outras porções com domínio carregado negativamente. O principal funcionamento das poliaminas está atribuído à estabilização da membrana biológica, propensas a danos oxidativos sob diferentes estresses abióticos (ALCAZAR *et al.*, 2006). No presente trabalho foi utilizada a poliamina putrescina.

A putrescina é considerada a poliamina mais comum, e é produzida diretamente a partir da ornitina ácida não protogênica, por meio da atividade da ornitina descarboxilase ou indiretamente através da arginina descarboxilase

(ALCÁZAR *et al.*, 2010). Foi relatado que a putrescina aumenta a resistência das plantas em diferentes estresses abióticos e bióticos (CAPELL; BASSIE; CHRISTOU, 2004). O teor total de putrescina nas plantas está diretamente relacionado à tolerância a seca. Independentemente da quantidade de espermidina e espermina a putrescina oferece melhoria da resistência à seca nas plantas (ALCÁZAR *et al.*, 2010).

Também foi relatado que o acúmulo de putrescina aumenta a tolerância à seca, uma vez que os níveis de espermina e espermidina não aumentaram durante o período de desidratação (ESPASANDINS *et al.*, 2014). Acredita-se que a biossíntese de poliaminas, especialmente a de putrescina, pode melhorar a tolerância abiótica ao estresse das plantas em comparação com as não tolerantes (HUSSAIN *et al.*, 2011). O efeito direto de putrescina na manutenção da integridade da membrana tem uma capacidade distinta de estabilizar a estrutura das membranas da célula vegetal durante estresses bióticos e/ou abióticos (TASSONI; ANTOGNONI; BAGNI, 1996; SCHUBER, 1989). Esses efeitos podem ser alcançados por meio de suas propriedades antioxidantes e neutralizantes ácidas (BORELL *et al.*, 1997; ZHAO; YANG, 2008).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Buscar um melhor uso da água a fim de atingir boas técnicas de manejo do sistema solo-água-planta-atmosfera em resposta à oscilação de níveis hídricos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Verificar se o milho pode adquirir uma maior tolerância ao déficit hídrico por meio da poliamina putrescina, visto que déficit hídrico é o estresse que mais afeta a produtividade das culturas no mundo e é esperado que as secas aumentem em intensidade e frequência em razão das mudanças climáticas globais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CULTURA DO MILHO

O milho é uma monocotiledônea que ocorre na família das gramíneas (Poaceae), tribo Maydeae, gênero *Zea*, cientificamente intitulado de *Zea mays* L. e está distribuído em todas as partes do globo (FANCELLI; DOURADO NETO, 2003). O mais antigo espécime de milho é originário de Guilá Naquitz, Estado de Oaxaca, México (PIPERNO; FLANNERY, 2001). Sua domesticação aconteceu entre 5.000 a 10.000 anos atrás, possivelmente no Vale de Oxaca (Estado de Oxaca), Vale de Balsas (Estados de Michoacán e Guerrero) e estado de Tamaulipas posteriormente atingindo o sudoeste dos Estados Unidos (WANG *et al.*, 1999; PIPERNO; FLANNERY, 2001; SMITH, 2001). Pesquisas utilizando espécimes oriundas dos seus locais de origem e sua domesticação realizada inicialmente com células, enzimas e genes, demonstraram a origem tendendo para *Zea mays* subespécie *parviglumis*, (PIPERNO; FLANNERY, 2001).

O milho é um alimento consumido em todos os continentes. Na Europa e América do Norte é utilizado na fabricação bebidas e alimentos como cerveja, “snacks” e cereais matinais (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). ALAM *et al.* (2003) demonstraram que o milho possui um nível superior de proteínas dentre os cereais quando comparado ao arroz, por exemplo, entre outros. É classificado como uma das culturas essenciais praticadas no mundo e são cultivados aproximadamente 150,4 milhões de hectares todos os anos, resultando em aproximadamente de 812 milhões de toneladas.

O Brasil encontra-se como 3º maior produtor de milho no mundo e 2º maior exportador (CONAB, 2018). O milho, distribuído entre a primeira, segunda e terceira safras, deverá alcançar 98,4 milhões de toneladas (CONAB, 2019). Aproximadamente 70% da produção mundial são destinados à alimentação animal. Em países desenvolvidos essa porcentagem pode chegar a 85%. Somente 15%, de forma direta ou indireta, são destinados ao consumo humano (PAES, 2006).

## 2.2 DÉFICIT HÍDRICO

A fim de aprimorar o emprego da água nas plantas, pesquisadores buscam um melhor entendimento das implicações do estresse hídrico no desenvolvimento, crescimento e produção de culturas. A decorrência dos efeitos de um déficit hídrico está relacionada principalmente com o ciclo fenológico em que a cultura é induzida juntamente com o período de tempo e sua intensidade. A possibilidade em reger estudos com o propósito de se utilizar água nas culturas deve-se aos sistemas de distribuição de água e a sua grande variação de intensidade de execução. De modo que seja possível tanto o excesso quanto os déficits (GOMIDE; CARVALHO; RODRIGUES, 1989).

Uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos produtores de milho é a seca, que diminui a taxa fotossintética posterior ao florescimento. Isso promove adaptações nas estratégias metabólicas da espécie como armazenamento de nutrientes na região do colmo, com posterior utilização no enchimento dos grãos de acordo com o grau do estresse vivenciado (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). Devido à deficiência hídrica em determinadas localidades brasileiras tornam-se necessário estudos criteriosos para uso eficaz da água (HALE; ORCUTT, 1987). O impacto negativo dos veranicos prejudica o desenvolvimento da cultura do milho podendo causar redução no crescimento radicular devido à natureza ácida dos solos (CHAPMAN *et al.*, 2000). Através das condições de nível de estresse da cultura, solo, estágio fisiológico e clima, as relações fonte-dreno podem ser modificadas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). O rendimento dos grãos de milho foram consideravelmente afetados pelo estresse hídrico segundo ÇAKIR (2004) e BEIRAGI *et al.* (2011).

O déficit hídrico é responsável pelo menor número de grãos por espiga e também o número de espigas por planta. Estes são os mais prejudicados visto que esta fase é um período crítico da cultura (BERGAMASCHI *et al.*, 2004). Estudos realizados por BEIRAGI *et al.* (2011) demonstraram que quando a porção de água no solo atingiu 80%, foi verificada uma redução média de 71,54% no rendimento dos grãos. As linhagens tolerantes à deficiência hídrica demonstraram uma maior eficiência no uso da água (MAGALHÃES *et al.*, 2009). A perturbação de diversos processos biológicos pode ser atribuída ao estresse hídrico causando um impacto negativo no crescimento das plantas; limitando o fator de acoplamento, o ATP e

inibindo a fotossíntese. (TEZARA *et al.*, 1999) podendo prejudicar a condutância estomática e diminuir o acesso ao CO<sub>2</sub> (TAIZ; ZEIGER, 2002). Além disso, o fornecimento eficiente de água é essencial para a extensibilidade da parede celular e o turgor celular, fundamentais para o desenvolvimento e o crescimento natural das plantas (BLUM, 2011).

### 2.3 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA

As plantas respondem e se adaptam às tensões ambientais por meio de diferentes processos bioquímicos, fisiológicos e moleculares. Para um aperfeiçoamento da produtividade das culturas é útil entender as respostas das plantas às condições adversas (LAWLOR, 2012). Ao longo da evolução as plantas aprimoraram diversas habilidades de defesa, como manutenção de um elevado potencial hídrico dos tecidos e sincronização das fases mais sensíveis do desenvolvimento, como a fase reprodutiva.

As plantas também podem conciliar a aquisição aprimorada de água empregando um sistema radicular profundo com a diminuição da perda de água limitando a transpiração. Mecanismos de tolerância à seca incluem a manutenção do turgor por meio do arranjo osmótico, melhora da elasticidade celular e redução do tamanho das células, assim como a tolerância à dessecação via tolerância protoplasmática (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). A ativação da respiração, o fechamento estomático, a repressão do crescimento celular e da fotossíntese são alguns exemplos dessas respostas. Podem ocorrer acúmulo de osmólitos e proteínas (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003; BARTELS; SUNKAR, 2005; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

Os mecanismos reguladores compreendem sensores de estresse, vias de sinalização, que incluem um circuito de reações protéico-proteicas, fatores de transcrição, motores e por fim as proteínas ou metabólitos de saída. As principais características de tolerância ao estresse, segundo as abordagens clássicas de reprodução são os locos de características quantitativas (QTLs), dificultando a seleção genética de características (BARTELS; SUNKAR, 2005). A contribuição relativa de distintas respostas à tolerância e a importância de uma determinada

resposta ao estresse de uma determinada espécie encontram-se bastante desconhecidas (BOSCAIU; VICENTE, 2017).

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são átomos ou moléculas extremamente reativas. Isso ocorre devido ao não emparelhamento e número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Devido a sua capacidade de reagir com qualquer composto em sua última camada, ele passa a ter função de oxidação. Os radicais livres agem como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações químicas no decorrer dos processos metabólicos. É um processo fisiológico e constante que realiza funções biológicas essenciais para o metabolismo, contudo pode tornar deletério quando em excesso (MÉNDEZ; RODRÍGUEZ, 1997).

As plantas são especialmente prolíficas na produção de espécies reativas de oxigênio em virtude do aparato fotossintético. Com isso, os mecanismos de defesa antioxidante também precisam ser efetivos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SHAMI; MOREIRA, 2004). De fato, os antioxidantes encontrados em diversos alimentos possuem a função de agir indiretamente em sistemas enzimáticos, neutralizar a ação, prevenir e reparar os danos provocados pelos radicais livres. A vitamina E, a glutathione, os carotenóides, o ácido úrico e a vitamina C possuem ação antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; PAPAS, 1999).

O equilíbrio entre a produção e desintoxicação de EROs é sustentada por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MITTLER, 2002). Os componentes enzimáticos compreendem várias enzimas antioxidantes como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX), a guaiacol peroxidase e a ascorbato peroxidase (APX) (ASADA, 1999; MITTLER, 2002; MITTLER *et al.*, 2004). Os componentes não enzimáticos incluem os principais tampões redox celulares ascorbato (AsA) e glutathione (GSH) bem como tocoferol, carotenóides e compostos fenólicos (MITTLER *et al.*, 2004; GRATÃO *et al.*, 2005; SCANDALIOS, 2005). A diminuição do dano oxidativo está intimamente relacionada ao aumento das atividades enzimáticas. Quanto maior o nível de tolerância contra estresses abióticos mais altos os níveis de expressão de enzimas



antioxidantes. A proteção contra danos oxidativos se deve a ativação de algumas enzimas (ROSA *et al.*, 2010; BONIFACIO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*; 2012).

## 2.5 POLIAMINAS

As poliaminas são moléculas pequenas, policatiônicas e essenciais para o crescimento e a sobrevivência de todos os organismos. Nas plantas, a putrescina, a espermidina e a espermina são as mais abundantes. Estão envolvidas em vários processos de crescimento e desenvolvimento incluindo estimulação da divisão celular, resposta a estresses ambientais, regulação da rizogênese, embriogênese, desenvolvimento floral e senescência (EVANS; MALMBERG, 1989; KAKKAR; SAWHNEY, 2002; KUSANO *et al.*, 2008; ALCAZAR *et al.*, 2010; TAKAHASHI; KAKEHI, 2010). As poliaminas estão presentes em um grupo maior chamado de aminas bioativas. São produzidas a partir dos aminoácidos arginina e ornitina sendo a putrescina a precursora obrigatória na formação das demais poliaminas (HALÁSZ *et al.*, 1994; GLORIA, 2005).

A natureza catiônica da poliaminas lhes permite interagir com várias macromoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e fosfolipídios (TUN *et al.*, 2006). Interage também com hormônios e moléculas sinalizadoras. Elas regulam processos e eventos fisiológicos e de desenvolvimento (TUN *et al.*, 2006; ARASIMOWICZ-JELONEK; FLORYSZAK-WIECZOREK; KUBIS', 2009; LI; GONG; XU, 2014). Essas moléculas evitam a perda de água durante a fotossíntese e podem ser encontradas nos tilacóides do cloroplasto. São essenciais na síntese de proteínas contribuindo no processo de tradução (KOTAKIS *et al.*, 2014).

Embora as poliaminas sejam encontradas em todos os domínios da vida, a mais abundante na natureza é o 1,4-diaminobutano, comumente chamado de putrescina (PUT), que, juntamente com 1,5-diaminopentano, cadaverina (CAD), deve seu nome ao odor nocivo de cadáveres em putrefação. A putrescina pode ter uma função na manutenção do pH intracelular durante a germinação de sementes. A larga escala de hidrólise de macromoléculas no endosperma pode causar um desbalanço na concentração de H<sup>+</sup> intracelular e o concomitante acúmulo de putrescina pode ser um mecanismo compensatório para a manutenção do pH intracelular (GALSTON; KAURSAWHNEY, 1995). Tem sido demonstrado que as

poliaminas são alguns dos principais atores durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como resposta a estresses abióticos e bióticos (JIMENEZ-BREMONT *et al.*, 2014; MINOCHA; MAJUMDAR; MINOCHA, 2014; TIBURCIO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015).

## 2.6 PRIMING DE SEMENTES

O *priming* de sementes é uma técnica de hidratação controlada que promove a introdução de moléculas com a finalidade de iniciar processos metabólicos sem que haja a germinação das sementes. Assim, conciliando e padronizando o período de germinação, além de ser um dos tratamentos mais efetivos em curto prazo (FAROOQ *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2015). Os estudos realizados na última década indicam evidências que o *priming* é uma abordagem eficiente para estimular respostas de defesa celular relacionadas a estresses bióticos e abióticos. As vias de sinalização celular são ativadas através do estresse abiótico, acarretando uma resposta contrária ao estresse. De forma semelhante à técnica de *priming* de sementes emprega-se a mesma via de sinalização para sensibilizar, provocando o acúmulo de proteínas sinalizadoras inativas. Desse modo, quando a semente sensibilizada é submetida a um estresse acontece uma segunda cascata de sinalização, aumentando o sinal da transdução e ocasionando uma ativação mais rápida das respostas de defesa (CONRATH *et al.*, 2006)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E CURVA DE EMBEBIÇÃO

Para a realização deste experimento foram utilizados dois híbridos de milho: um resistente (DKB 390) e outro sensível (BRS 1030) expostos ao estresse hídrico. Para estabelecimento da curva de embebição foram utilizadas 4 repetições para cada híbrido, contendo 25 sementes cada, em placas de Petri forradas com papel filtro previamente pesado e umedecido com água destilada (2,5 vezes o peso seco do papel). As placas contendo as sementes permaneceram em câmara de germinação do tipo B.O.D., sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro a 30°C. A avaliação das placas se deu a cada 6 horas. Dessa forma, as sementes eram levemente secas e pesadas, e os papéis filtro eram trocados e novamente umedecidos. Esta avaliação prosseguiu até que se verificasse rompimento do tegumento (ÁVILA; BRACCINI DE LUCCA; SCAPIM, 2007).

#### 3.2 PRIMING DAS SEMENTES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Após o estabelecimento da curva de embebição, as sementes foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de putrescina (0, 10, 100 e 500  $\mu\text{M}$ ) por 20 horas. Em seguida, 25 sementes foram dispostas em rolos compostos por três folhas de papel Germitest® umedecidos com água e solução de manitol a -0,6 MPa em volume correspondente a 2,5 vezes o peso do rolo de papel de acordo com a Regra de Análise de Sementes (2017). Os rolos montados foram dispostos em béqueres, cada béquer perfazendo um tratamento com 4 rolos (ou seja, 4 repetições) e os sistemas foram fechados em sacos plásticos para evitar a evaporação da água. A germinação foi monitorada por 7 dias, e as observações realizadas e notadas a cada 12 horas. As sementes foram dispostas em rolos de papel (MAPA, 2017).

O comprimento da raiz principal e da parte aérea foram medidos com o paquímetro digital (Digimess Digital Caliper) após 7 dias de germinação. Parte aérea e raízes foram separadas e armazenadas em biofreezer a -80°C para análises posteriores.

### 3.3 ANÁLISES DAS ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE

Amostras da parte aérea e raízes foram homogeneizadas em quatro volumes de tampão fosfato 50 mM pH 7,5 contendo 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 5% de polivinilpirrolidona (PVPP) em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos e o sobrenadante usado para determinação da atividade enzimática. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) usando albumina soro bovina como padrão e a atividade enzimática de acordo com GARCÍA-LIMONES *et al.*, (2002).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada por sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do nitro blue tetrazolium. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 50 mM pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 13 mM de metionina, 75  $\mu$ M de NBT, 2  $\mu$ M de riboflavina e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de riboflavina e a absorbância determinada após 12 minutos de incubação a temperatura ambiente sob luz contínua. Uma unidade de SOD foi definida pela quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do NBT.

A atividade da guaiacol peroxidase (GPX) foi determinada através do acompanhamento da mudança de absorbância a 470 nm causada pela redução do guaiacol ( $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 100 mM pH 6,5, 15 mM de Guaiacol, 0,05% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e diferentes concentrações do extrato enzimático.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  acompanhado pela queda da absorbância a 240 nm. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 50 mM pH 7,0, 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade de CAT foi definida pela quantidade de enzima necessária para decompor  $1 \mu\text{mol min}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela diminuição da absorbância do ascorbato ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 290 nm. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato 50 mM pH 7,0, ascorbato de sódio 0,25 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uma unidade de APX foi definida pela quantidade de enzima que oxida  $1 \mu\text{mol min}^{-1}$  de ascorbato.

### 3.4 ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E AMIDO

Amostras da parte aérea e raízes (200mg) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Para extração dos metabólitos o material vegetal foi macerado em 2 ml de solução de metanol/clorofórmio/água (12:5:3, v/v) e incubado a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 1.500G por 30 minutos e o sobrenadante foi misturado com clorofórmio e água (4:1:1,5, v/v). A fase aquosa foi usada para análise de aminoácidos e açúcares solúveis totais. O amido foi extraído a partir do pellet oriundo da centrifugação pela incubação com ácido perclórico 30%. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da análise (MCCREADY *et al.*, 1950; YEMM; WILLIS, 1954; PUIATTI; SODEK, 1999).

### 3.5 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS

O conteúdo total de aminoácidos foi determinado de acordo com Yemm e Cocking (1955). Alíquotas dos extratos foram adicionadas a água destilada totalizando 1 ml. Posteriormente 1,7 ml dos seguintes reagentes foram adicionados: tampão citrato de sódio 0,2 M pH 5 (0,5ml), ninhidrina 5% em metilcelossolve (0,2 ml) e KCN 2% em metilcelossolve (1 ml). Essa mistura foi submetida a agitação e aquecida a 100°C por 20 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, 1,3 ml de etanol 60% foi adicionado às amostras e a absorbância a 570 nm determinada. Foi realizada a quantificação com base em curva padrão de glicina previamente plotada.

### 3.6 ANÁLISE DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E AMIDO

Os açúcares solúveis totais foram determinados através de alíquotas da fração aquosa obtida, misturadas a água totalizando 1 ml e misturadas a 2 ml do reagente de antrona (20 mg de antrona, 500 µL de água e 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). As amostras foram agitadas e posteriormente aquecidas a 100°C por 5 minutos. A

absorbância foi determinada em 620 nm e a quantificação feita com base em curva padrão de glicose (YEMM; WILLIS, 1954).

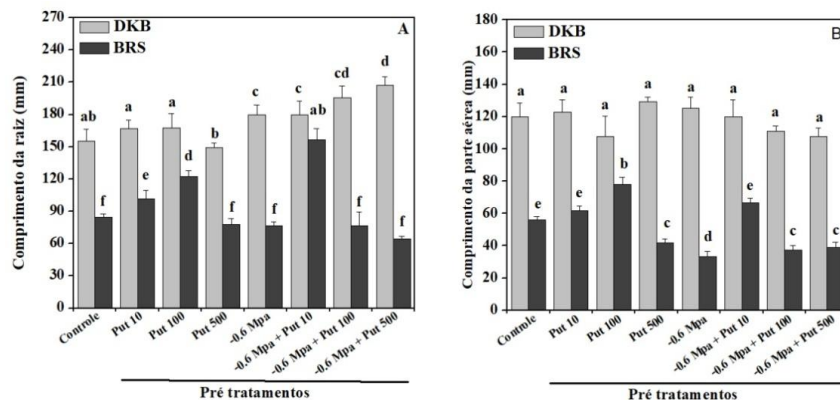
O conteúdo de amido foi determinado com o precipitado obtido da extração dos metabólitos primários foi adicionado 1 ml de ácido perclórico 30%. As amostras foram agitadas ocasionalmente por 10 minutos e a partir da solução obtida foi determinado o teor de amido pela reação com antrona da mesma forma como descrito acima (MCCREADY *et al.*, 1950).

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises de variância de uma via foram utilizadas para cada um dos tratamentos, em cada um dos parâmetros avaliados. Diferenças significativas ( $p < 5\%$ ) foram analisadas *a posteriori* pelo teste de Tukey. O desenho experimental foi de amostras totalmente aleatorizadas, testando-se oito tratamentos (*i.e.* oito níveis, ortogonais, fixos: putrescina em 0, 10, 100 e 500  $\mu\text{M}$ , e putrescina na presença de estresse hídrico em 0, 10, 100 e 500  $\mu\text{M}$ ), sobre os parâmetros de produtividade (sistema radicular e parte aérea), atividade enzimática, síntese de aminoácidos e produção de açúcares (totais e solúveis).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

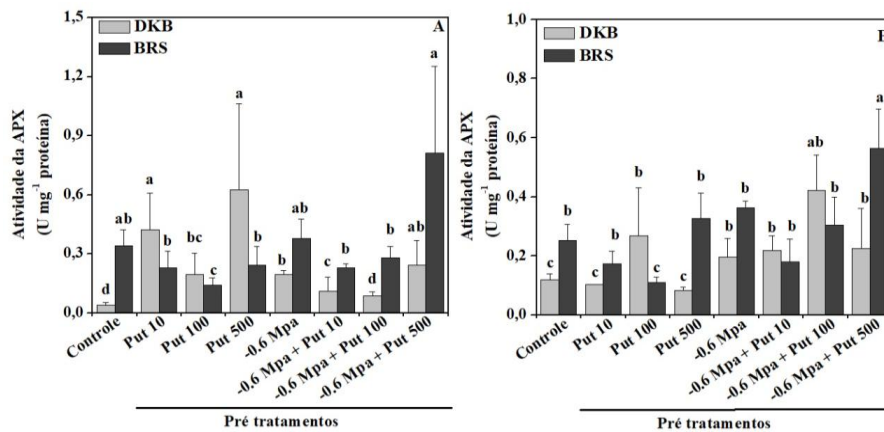
Comparado ao BRS 1030, os resultados dos comprimentos de raiz e parte aérea de DKB 390 são estatisticamente maiores (Figura 1). Quando submetido ao déficit hídrico e com aumento da concentração putrescina, DKB apresentou maior crescimento no comprimento na porção radicular. Com o objetivo de estabelecimento inicial, plantas tolerantes tendem a estimular seu crescimento radicular atingindo camadas mais profundas do solo (FAROOQ *et al.*, 2009). Essa característica é evidenciada em DKB quando demonstrado o aumento no comprimento da raiz comparada ao controle exposto ao déficit hídrico (DE SOUZA *et al.*, 2014). Sob déficit hídrico, a atividade da putrescina no híbrido BRS foi benéfica devido ao pré-tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de putrescina que intensificou o crescimento da raiz (KUMAR *et al.*, 1997); indicando um aumento no comprimento em valores aproximados ao DKB. Com a diferença significativa entre as plantas neste estudo, o híbrido DKB pode ser classificado como controle positivo em caráter de sua tolerância, de modo que tratamentos que aproximam o BRS do DKB são indícios de promoção de tolerância. Da mesma forma que na raiz, o DKB apresentou o comprimento da parte aérea maior quando comparado ao BRS. Não houve mudança no comprimento foliar do híbrido DKB com os pré-tratamentos utilizando putrescina, porém tiveram influência em BRS. Sob déficit hídrico, o tratamento com 10  $\mu\text{M}$  restabeleceu o comprimento da parte aérea em relação ao BRS controle.



**Figura 1** - Comprimento de plântulas de milho dos híbridos DKB e BRS: Raiz (A), parte aérea (B). Comprimento da raiz primária e parte aérea (em mm). Letras diferentes indicam diferença significativa

Fonte: Autora (2019)

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes, não foi possível observar um efeito claro da putrescina sobre a atividade da APX (Figura 2) ou estabelecer um padrão para a atividade da APX em nenhum dos tratamentos, em nenhuma das partes avaliadas em DKB ou em BRS. Porém, quando comparadas as raízes dos híbridos, nos tratamentos com putrescina sem estresse, a atividade da APX aumentou no DKB, mas não no BRS, sendo que o contrário ocorreu na presença do estresse hídrico. Resultados semelhantes foram observados em trabalho feito por GHOSH; ADAK (2016). Na parte aérea, novamente a atividade foi maior no BRS nos tratamentos com déficit hídrico. Já na ausência do estresse o comportamento dos híbridos foi semelhante e houve incremento da atividade da enzima na presença da putrescina. As peroxidases oxidam substratos variados utilizando  $H_2O_2$  ou orgânicos hidroperóxidos resultantes do metabolismo celular. Em situação de estresse, tais espécies reativas são produzidas em maior quantidade, e demandam maior atividade e produção destas enzimas (KOUA *et al.*, 2009). BRAGA *et al.* (2017) demonstraram alta atividade da APX nas plantas de girassol em situação de estresse. Entretanto, seus experimentos tiveram duração de 33 dias, o que pode ser um período mais apropriado que o do presente estudo (i.e. 7 dias).



**Figura 2** - Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em híbridos de milho: sensível (BRS) e resistente (DKB). Raiz (A), parte aérea (B). Letras diferentes indicam diferença significativa.

Fonte: Autora (2019)

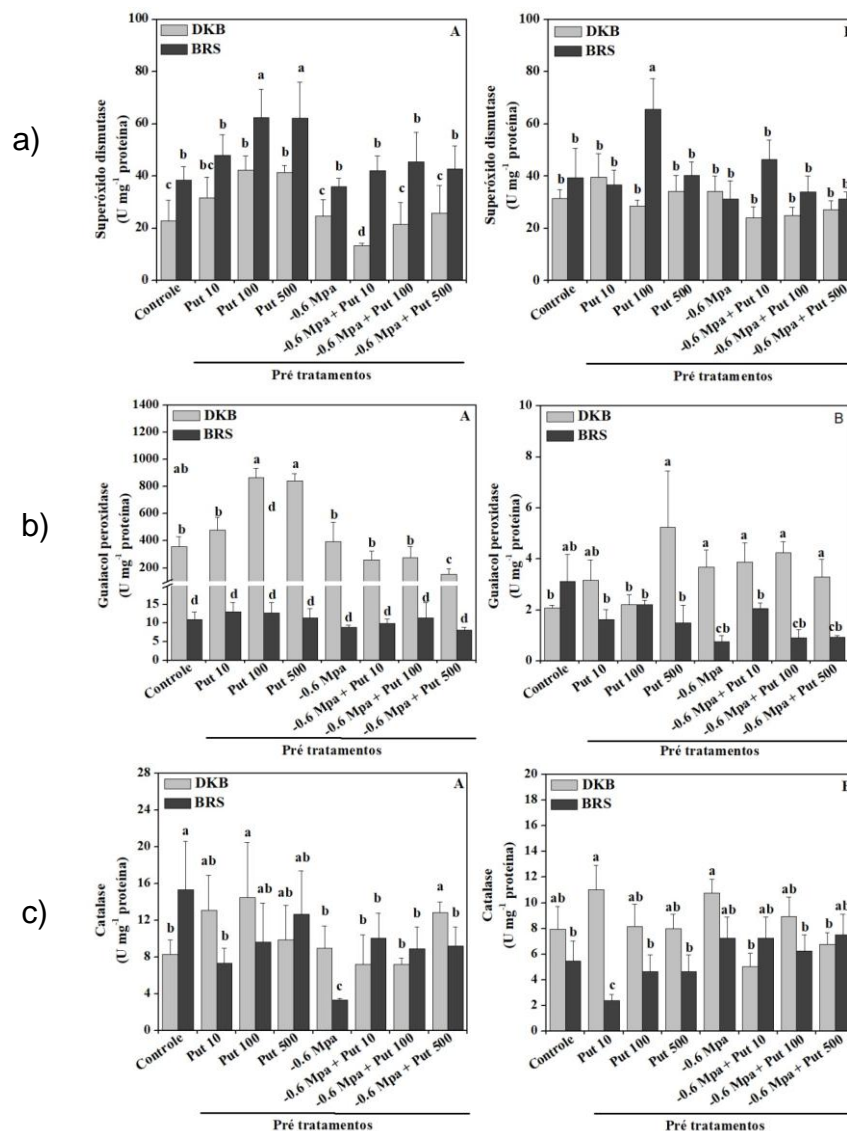


Com relação à superóxido dismutase (SOD), pode-se notar que o *priming* favoreceu a atividade dessa enzima nas raízes dos dois híbridos, na ausência de estresse causando aumento da atividade de maneira dependente da concentração de putrescina empregada. Contudo, na presença do estresse houve aumento de atividade da SOD apenas no BRS. Já na parte aérea houve diferença apenas na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , sem estresse (Prancha 1). Os demais tratamentos foram todos estatisticamente iguais. Em experimentos realizados com girassol por BRAGA *et al.* (2017), a atividade desta enzima também se mostrou mais elevada tanto em plantas em condições de controle como de estresse hídrico, o que evidencia sua maior importância em processos antioxidantes. CARNEIRO *et al.* (2011) também demonstraram o aumento da atividade da SOD em situação de estresse. GHOSH; ADAK (2016) em seus experimentos atribuíram o aumento da atividade da SOD à desativação do  $\text{O}_2$  nos cultivares em condição de estresse.

Contrariamente ao observado com a SOD, no caso da guaiacol peroxidase (GPX) a atividade foi maior nas raízes do DKB quando comparado ao BRS tanto na ausência quanto na presença do estresse. Importante mencionar também que, na ausência do estresse, o *priming* causou aumento na atividade da GPX no DKB, mas quando submetidos ao déficit hídrico não houve aumento da atividade da enzima. No caso do BRS não houve qualquer diferença entre os tratamentos. Na parte aérea, a atividade da GPX foi semelhante entre os híbridos na ausência do estresse, enquanto sob déficit hídrico houve aumento no DKB e certa diminuição no BRS (Prancha 1). Resultado semelhante foi encontrado por BRAGA *et al.* (2017) em experimentos com girassol. Em estudos realizados por GHOSH; ADAK (2016) em cultivares de arroz, a putrescina melhorou a atividade da GPX. Segundo SANKAR *et al.* (2007) a redução das atividades de CAT e GPX podem ser justificadas porque as plantas usam outros componentes enzimáticos e/ou não enzimáticos para neutralizar as várias EROs.

A catalase sofreu pouca alteração com a aplicação de putrescina nos tratamentos das duas variedades. Em raízes de BRS de maneira geral, a presença de putrescina e putrescina sob déficit hídrico apresentou diminuição da atividade da catalase com relação ao controle. Em DKB a atividade foi maior apenas no tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de putrescina e no estressado com 500  $\mu\text{M}$  de putrescina. Na parte aérea, com exceção do tratamento com 10  $\mu\text{M}$  de putrescina, não houve diferença no BRS, em relação ao controle. No DKB, não houve nenhuma diferença

(Prancha 1). Segundo RIZHSKY *et al.* (2002), plantas com baixa atividade de catalase apresentam sintomas de estresse menos graves que plantas que não possuem essa enzima. Em experimentos realizados em cultivares de arroz por GHOSH; ADAK (2016) foi demonstrada pouca variação de catalase com indução putrescina. De acordo com PEREIRA *et al.* (2012) a atividade da CAT varia dependendo da duração e intensidade do estresse. Em situações de déficit moderado de água, a atividade da CAT aumenta, no entanto, quando o estresse se torna mais grave, a atividade é revertida.



**Prancha 1** - (a) Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), (b) GPX estabelecida pela atividade antioxidante do guaiacol e (c) atividade de CAT estabelecida pela atividade antioxidante de catalase em híbridos de milho: sensível (BRS) e resistente (DKB). Raiz (A), parte aérea (B). Letras diferentes indicam diferença significativa.

Os teores de aminoácidos aumentaram em raízes de DKB sob a aplicação de putrescina com e sem estresse e em raízes de BRS com putrescina sob estresse. Comparativamente, DKB apresentou maiores níveis apenas nos tratamentos de putrescina sem estresse. A parte aérea de BRS evidenciou maiores concentrações somente com putrescina sob estresse. Na aplicação de putrescina à 500  $\mu\text{M}$  em raízes e em condições de estresse hídrico, os níveis não diferiram significativamente entre os híbridos.

Com relação à parte aérea, as únicas diferenças foram observadas sob os tratamentos “putrescina 10  $\mu\text{M}$ ” e “-0,6 Mpa + putrescina 10  $\mu\text{M}$ ”, o que pode indicar maior influência desta concentração de putrescina em particular (Prancha 2). Embora o híbrido DKB seja a variedade resistente no experimento, os níveis de aminoácidos se mantiveram iguais tanto em raízes quanto na parte aérea dos dois híbridos, quando sob estresse hídrico isoladamente.

Normalmente, o acúmulo de osmólitos como proteínas e aminoácidos são indicadores de tolerância ao déficit hídrico (FUMIS; PEDRAS, 2002; MURAKEÖZY *et al.*, 2003; ASHRAF; HARRIS, 2004) atuando como controladores do equilíbrio iônico, da abertura estomática e pH celular, reservatório de nitrogênio e como sistema antioxidante (BOHNERT; JENSEN, 1996; ASHRAF; HARRIS, 2004; ASHRAF *et al.*, 2011).

Para os teores de amido, apenas a comparação das partes aéreas dos híbridos aplicados de putrescina sem estresse apresentaram diferenças (*i.e.* BRS > DKB). Em tese, as poliaminas podem conferir acúmulo de amido na raiz, aumentando a resistência ao estresse hídrico pela redução do potencial osmótico da célula (CHIMENTI; MARCANTONIO; HALL, 2006; FAROOQ *et al.*, 2009). Tal tendência foi observada, mesmo de maneira não significativa para os dois híbridos, com aumento de amido quando na aplicação crescente da putrescina sob estresse hídrico.

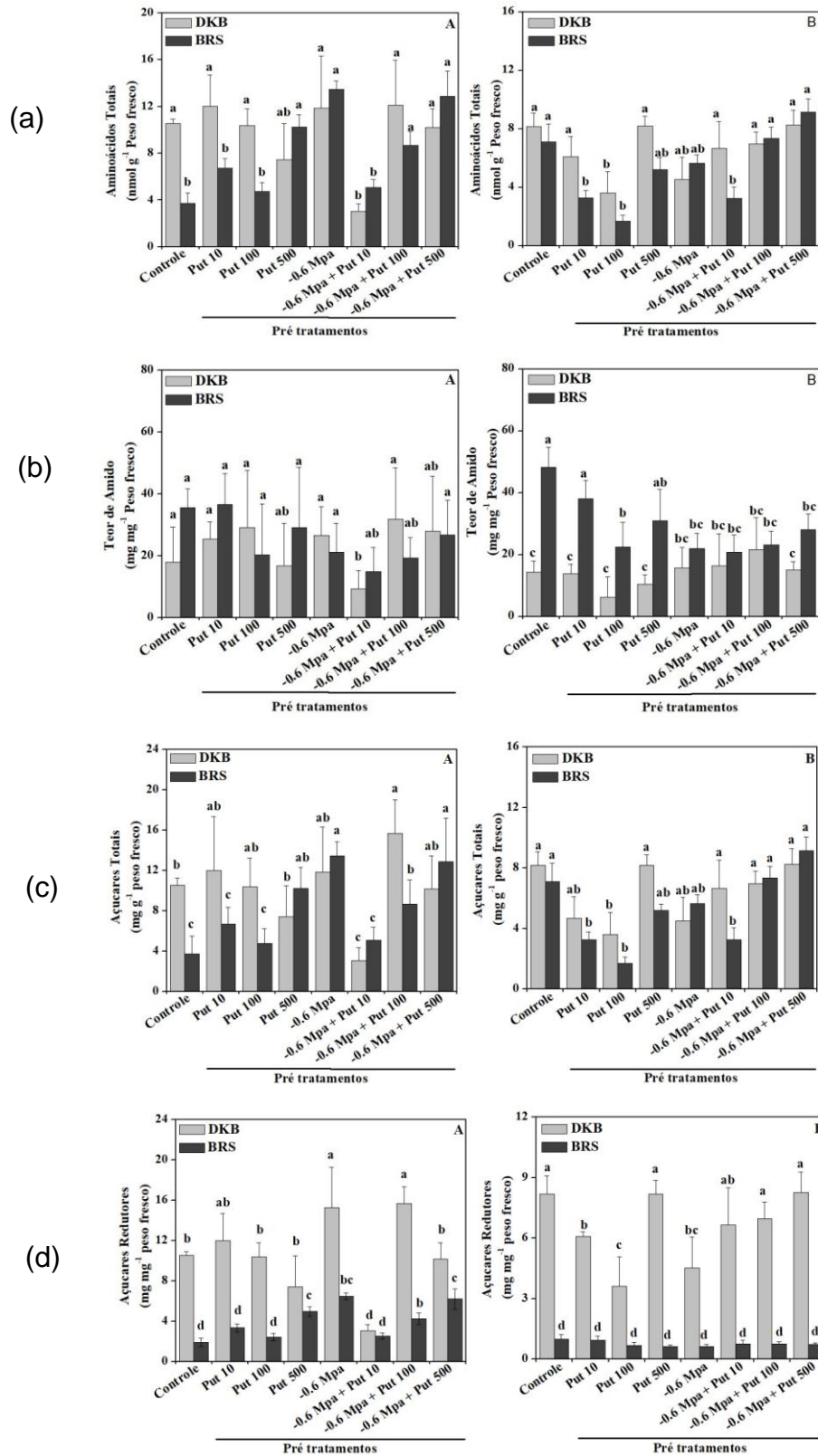
Apenas raízes de BRS sob estresse hídrico com aplicação de putrescina tiveram aumento nos níveis de açúcares solúveis totais. Raízes de DKB com putrescina sem estresse apresentaram maiores níveis que as de BRS. Sob estresse, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de putrescina induz à queda dos níveis nos dois híbridos, que voltam a se elevar nas concentrações de 100 e 500  $\mu\text{M}$  em BRS. Na parte

aérea, a única condição em que se observou diferença foi em “-0,6 Mpa + 10 µM putrescina” (Prancha 2). Níveis de sacarose tendem a aumentar nas raízes sob estresse hídrico, como mecanismo ajuste osmótico (CHAVES, 1991), e isso foi observado para os dois híbridos do experimento.

Porém, merece atenção o fato de que a parte aérea de DKB sob estresse e tratadas com 10 µM de putrescina acumularam mais açúcares que as raízes. Essa resposta pode estar associada à tolerância ao estresse, pois o acúmulo desses solutos orgânicos pode regular o potencial osmótico das células, levando a melhorar a absorção de água sob estresse hídrico (ZHANG *et al.*, 2010; IBRAHIM; FAISAL; SHEHATA, 2016). Além disso, esses solutos também podem proteger as enzimas e macromoléculas das células vegetais da oxidação por EROs (FAROOQ *et al.*, 2012)

Açúcares redutores estiveram presentes em quantidades significativamente maiores nas raízes e na parte aérea do híbrido resistente em todos os tratamentos, com exceção de “-0,6 + Put 10”. Ainda, tanto em raízes como na parte aérea, os níveis apresentaram pouca variação tanto no híbrido sensível como no resistente (Prancha 2).

Conforme mencionado acima, um dos fatores de tolerância a seca é o acúmulo de osmólitos (BOHNERT; JENSEN, 1996; HASEGAWA *et al.*, 2000; FAROOQ *et al.*, 2009), especialmente mono e oligossacarídeos que podem ser mobilizados a partir das reservas de amido, possibilitando a manutenção do turgor nas regiões de crescimento da parte aérea e da raiz (CHAVES, 1991). Dessa forma as reservas de açúcares redutores podem ter sido utilizadas em prol do crescimento radicular, notoriamente na variedade DKB (resistente). É possível então, que parte da tolerância do DKB esteja relacionada à capacidade de mobilização das reservas de açúcares.



**Prancha 2** - (a) Teor de aminoácidos totais, (b) teor de amido, (c) teor de açúcares totais e (d) teor de açúcares redutores. Raiz (A), parte aérea (B). Letras diferentes indicam diferença significativa.

Fonte: Autora (2019)

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como esperado, híbridos resistentes ao estresse hídrico apresentaram melhor desempenho que os não resistentes. A aplicação da putrescina (em aplicações crescentes) em plantas sob estresse hídrico promoveu um aumento na produtividade radicular dos híbridos resistentes. Nos híbridos não resistentes, a resposta (tanto do sistema radicular quanto da parte aérea) foi dependente da dosagem.

Quanto às atividades enzimáticas, produção de aminoácidos e açúcares, híbridos não resistentes foram mais responsivos aos tratamentos, com resultados positivos em sua maioria. Portanto, a aplicação da putrescina se mostrou benéfica tanto em híbridos de milho resistentes quanto não resistentes ao estresse hídrico. A concentração de putrescina que apresentou melhores resultados foi a de 100  $\mu\text{M}$  de putrescina, embora mais estudos sejam necessários para melhor aferição das concentrações apropriadas.

## REFERÊNCIAS

ALAM, M. et al. **Effect of rate of nitrogen fertilizer and population density on the yield and yield attributes of maize (*Zea mays* L.)**. Pakistan Journal of Biological Sciences, v. 6, n. 20, p. 1770-1773, 2003.

ALCAZAR, R. et al. **Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress**. Biotechnology Letters, v. 28, n. 23, p. 1867-1876, 2006.

\_\_\_\_\_. et al. **Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance**. Planta, v. 231, n. 6, p. 1237-1249, 2010.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; KUBIS', J. **Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber**. Journal Plant Growth Regulation, v. 28, n. 2, p. 177-186, 2009.

ASADA, K. **The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons**. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 50, n. 1, p. 601-639, 1999.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. **Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants**. Plant Science, v. 166, n. 1, p. 3-16, 2004.

ASHRAF. et al. **Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients**. Advances in Agronomy, v. 111, p. 249-296, 2011.

ÁVILA, R. M.; BRACCINI DE LUCCA, A.; SCAPIM, C. A. **Teste de comprimento de plântulas sob estresse hídrico na avaliação do potencial fisiológico das sementes de milho**. Revista Brasileira de Sementes, v. 29, n. 2, p.117-124, 2007.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. **Drought and salt tolerance in plants**. Journal Critical Reviews in Plant Sciences, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BEIRAGI, M. A. et al. **A study of morphological basis of corn (*Zea mays L.*) yield under drought stress condition using correlation and path coefficient analysis.** Journal of Cereals and Oilseeds, v. 2, n. 2, p. 32-37, 2011.

BERGAMASCHI, H. et al. **Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 9, p. 831-839, 2004.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLUM, A. **Drought resistance – is it really a complex trait?** Functional Plant Biology, v. 38, n. 10, p. 753-757, 2011.

BONIFACIO, A. et al. **Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress.** Plant, Cell & Environment, v. 34, n. 10, p.1705-1722, 2011.

BORELL, A. et al. **Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves.** Physiologia Plantarum, v. 99, n. 3, p. 385-390, 1997.

BOSCAIU, M.; VICENTE, O. **Mechanisms of drought and salt stress tolerance in plants.** Journal of Biotechnology, v. 256, p. S7, 2017.

BRAGA, B. B. et al. **Efeitos da suplementação com resíduo da atividade da carcinicultura em plantas de girassol submetidas a condições de estresse hídrico.** Irriga, v. 22, n.3, p. 591-605, 2017.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. **Strategies for engineering water-stress tolerance in plants.** Trends in Biotechnology, v. 14, n. 3, p. 89-97, 1996.

ÇAKIR, R. **Effect of water stress at different development stages on vegetative and reproductive growth of corn.** Field Crops Research, v. 89, n. 1, p. 1-16, 2004.

CAPELL, T.; BASSIE, L.; CHRISTOU, P. **Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 101, n. 26, p. 9909-9914, 2004.



CARNEIRO, M. M. L. C. et al. **Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino.** Revista Brasileira de Sementes, v. 33, n. 4, p. 752-761, 2011.

CHAPMAN, S. et al. **Genotype by environment interactions affecting grain sorghum. II. Frequencies of different seasonal patterns of drought stress are related to location effects on hybrid yields.** Australian Journal Agricultural Research, v. 51, n. 2, p. 209-221, 2000.

CHAVES, M. M. **Effects of water deficits on carbon assimilation.** Journal of Experimental Botany, v. 42, n. 234, p. 1-16, 1991.

CHIMENTI, C. A.; MARCANTONIO, M.; HALL, A. J. **Divergent selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) in both early growth and flowering phases.** Field Crops Research, v. 95, n. 2-3, p. 305-315, 2006.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento - Perspectivas para a agropecuária,** v. 6, 2018.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento - SAFRA 2019/20,** v. 7, 2019.

CONRATH, U. et al. **Priming: Getting Ready for Battle.** Molecular Plant-Microbe Interaction, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

DE SOUZA, T. C. et al. **ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity.** Plant growth regulation, v. 73, n. 3, p. 205-217, 2014.

ESPASANDINS, F. D. et al. **Transcriptional regulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene by putrescine accumulation positively modulates ABA synthesis and drought tolerance in *Lotus tenuis* plants.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 76, p. 29-35, 2014.

EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L. **Do polyamines have roles in plant development?** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 40, n. 1, p. 235-269, 1989.

FANCELLI, M. A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, p. 21-54, 2000.

\_\_\_\_\_. **Milho: estratégias e manejo para alta produtividade**. ESALQ/USP. Departamento de Produção Vegetal, p.174-197, 2003.

FAROOQ, M. et al. **Plant drought stress: effects, mechanisms and management**. Sustainable Agriculture, p. 153-188, 2009.

\_\_\_\_\_. **Drought stress in plants: an overview**. Plant Responses to Drought Stress, p. 1-33, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativos**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. **Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.

GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. **Polyamines as endogenous growth regulators**. Plant Hormones, p. 158-178, 1995.

GARCÍA-LIMONES, C. et al. **Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris***. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 61, n. 6, p. 325-337, 2002.

GLORIA, M. B. A. **Bioactive amines**. Handbook of Food Science, New York: Taylor & Francis, v.1, p. 1-38, 2005.

GHOSH, N.; ADAK, K. M. **Effects of putrescine on anti-oxidative enzymes in two rice cultivars subjected to salinity**. Advances in Crop Science and Technology, v. 4, n. 2, p. 1-9, 2016.

GOMIDE, R. L. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; RODRIGUES, G. C. **Utilização da linha central de aspersores no estudo do gradiente de aplicação de água sobre as culturas**. Embrapa Cerrados, p. 14, 1989.

GRATÃO, P. L. et al. **Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier**. Functional Plant Biology, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

HALÁSZ, A. et al. **Biogenic amines and their production by microorganisms in food**. Trends in Food Science Technology, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.

HALE, M. G.; ORCUTT, D. M. **The physiology of plants under stress**, New York: John Willey & Sons, p. 206, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview**. Methods Enzymology, v. 186, p. 1-85, 1990.

HASEGAWA, P. M. et al. **Plant cellular and molecular responses to high salinity**. Annual Review of Plant Biology, v. 51, n. 1, p. 463-499, 2000.

HUSSAIN, S. S. et al. **Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants**. Biotechnology Advances, v. 29, n. 3, p. 300-311, 2011.

IBRAHIM, M. F. M.; FAISAL, A.; SHEHATA, S. A. **Calcium chloride alleviates water stress in sunflower plants through modifying some physio-biochemical parameters**. American Eurasian Journal Agricultural & Environmental Sciences, v. 16, n. 4, p. 677-693, 2016.

JIMENEZ-BREMONT, J. F. et al. **Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions**. Frontiers in Plant Science, v. 5, p. 1-14, 2014.

KAKKAR, R. K.; SAWHNEY, V. K. **Polyamine research in plants - a changing perspective**. Physiologia Plantarum, v. 116, n. 3, p. 281-292, 2002.

KOTAKIS, C. et al. **Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress**. Journal of Plant Physiology, v. 171, n. 2, p. 48-51, 2014.

KOUA, D. et al. **PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification**. Nucleic Acids Research, v. 37, p. 261-266, 2009.

KUMAR, A. et al. **Recent advances in polyamine research**. Trends in Plant Science, v. 2, n. 4, p. 124-130, 1997.

KUSANO, T. et al. **Polyamines: essential factors for growth and survival**. Planta, v. 228, n. 3, p. 367-381, 2008.

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, p. 83-108, 2012.

LI, X.; GONG, B.; XU, K. **Interaction of nitric oxide and polyamines involves antioxidants and physiological strategies against chilling-induced oxidative damage in *Zingiber officinale* Roscoe**. Scientia Horticulturae, v. 170, p. 237-248, 2014.

LIU, J. -H. et al. **Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation**. Frontiers in Plant Science, v. 6, p. 1-10, 2015.

MCCREADY, R. M. et al. **Determination of starch and amylase in vegetables**. Analytical Chemistry, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, 1950.

MAGALHÃES, P. C. et al. **Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas a baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 8, n. 3, p. 223-232, 2009.

MÉNDEZ FILHO, J. D.; RODRÍGUEZ, H. G. R. **Sobre los beneficios de los radicales libres**. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, v. 35, n. 4, p. 309-13, 1997.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regra de Análise de sementes**, Brasil, 2017.

MINOCHA, R.; MAJUMDAR, R.; MINOCHA, S. C. **Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship**. Frontiers in Plant Science, v. 5, p. 1-17, 2014.

MITTLER, R. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance**. Trends in Plant Science, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER. et al. **Reactive oxygen gene network of plants**. Trends in Plant Science, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.

\_\_\_\_\_. et al. **ROS signaling: the new wave?** Trends in Plant Science, v. 16, n. 6, p. 300-309, 2011.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. **Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence?** Plant Disease, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.

MURAKEÖZY, E. P. et al. **Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary**. Journal of Plant Physiology, v. 160, n. 4, p. 395-401, 2003.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Circular Técnica 75, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Embrapa Milho e Sorgo, p.1-6, 2006.

PAPAS, A. M. **Diet and antioxidant status**. Food Chemical Toxicology, v. 37, p. 999-1007, 1999.

PEREIRA, J. W. L. et al. **Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado**. Revista Ciência Agronômica, v. 43, n. 4, p. 766-773, 2012.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. **The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 98, n. 4, p. 2101-2103, 2001.

POSPÍŠIL, P. **Production of reactive oxygen species by photosystem II**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1787, n. 10, p. 1151-1160, 2009.

PUIATTI, M.; SODEK, L. **Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean**. Plant Physiology and Biochemistry, v. 37, n. 10, p. 767-773, 1999.

RIBEIRO, C. W. et al. **Modulation of genes related to specific metabolic pathways in response to cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants.** *Plant Biology*, v. 14, n. 6, p. 944-955, 2012.

RIZHSKY, L. et al. **Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase.** *The Plant Journal*, v. 32, n. 3, p. 329-342, 2002.

ROSA, S. B. et al. **Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice.** *Phytochemistry*, v. 71, n. 5-6, p. 548-558, 2010.

ROSEGRANT, M. W. **Challenges and policies for global water and food security.** *Econ. Rev.* p. 5-20, 2016.

SANKAR, B. et al. **Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 60, n. 2, p. 229-235, 2007.

SCANDALIOS, J. G. **Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses.** *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHUBER, F. **Influence of polyamines on membrane functions.** *Biochemical Journal*, v. 260, n. 1, p. 1-10, 1989.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. **Licopeno como agente antioxidante.** *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. **Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses.** *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, n. 5, p. 410-417, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Gene networks involved in drought stress response and tolerance.** *Journal Experimental Botany*, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SMITH, B. D. **Documenting plant domestication: the consilience of biological and archaeological approaches**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 98, n. 4, p. 1324-1326, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc, p. 539-558, 2002.

TAKAHASHI, T.; KAKEHI, J. **Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses**. Annals of Botany, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2010.

TASSONI, A.; ANTOGNONI, F.; BAGNI, N. **Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls**. Plant Physiology, v. 110, n. 3, p. 817-824, 1996.

TEZARA, W. et al. **Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP**. Nature, v. 401, n. 6756, p. 914-917, 1999.

TIBURCIO, A. et al. **The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress**. Planta, v. 240, n. 1, p. 1-18, 2014.

TUBEROSA, R. et al. **Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes**. Plant Molecular Biology, v. 48, p. 697-712, 2002.

TUN, N. N. et al. **Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings**. Plant & Cell Physiology, v. 47, n. 3, p. 346-354, 2006.

WANG, R. L. et al. **The limits of selection during maize domestication**. Nature, v. 398, n. 6724, p. 236-239, 1999.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. **The determination of amino-acids with ninhydrin**. The Analyst, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. **The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone**. Biochemical Journal, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. **Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters.** Trends in Plant Science, v. 10, n. 2, p. 88-94, 2005.

ZHAO, H.; YANG, H. **Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd.** Scientia Horticulturae, v. 116, n. 4, p. 442-447, 2008.

ZHENG, M. et al. **Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress.** Plant Growth Regulation, v. 78, n. 2, p. 167-178, 2015.

ZHANG, Y. et al. **Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions.** New Forests, v. 40, n. 3, p. 261-271, 2010.