

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEANDRO DONIZETE DA SILVA

**EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO EXÓGENO EM PLANTAS DE MILHO
SUBMETIDAS A DEFICIT HÍDRICO**

Alfenas/MG

2021

LEANDRO DONIZETE DA SILVA

EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO EXÓGENO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS
A DEFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Coorientador: Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos-Filho

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Leandro Donizete da

Efeitos do óxido nítrico exógeno em plantas de milho submetidas a deficit hídrico / Leandro Donizete da Silva. -- Alfenas, 2021.

54 f.

Orientador: Breno Régis Santos.

Coorientador: Plínio Rodrigues dos Santos-Filho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, 2021.

1. Estresse hídrico. 2. Estresse oxidativo. 3. Metabolismo antioxidante. I. Santos, Breno Régis, orient. II. Santos-Filho, Plínio Rodrigues dos, coorient. III. Título.

Ficha Catalográfica elaborada por um bibliotecário responsável

Bibliotecário-Documentalista CRB6/XXXX

"EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO EXÓGENO EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS A DEFICIT HÍDRICO"

A Banca examinadora 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: 29 de julho de 2021

Prof. Dr. Breno Régis Santos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Dra. Daniele Maria Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Dra. Neidiquele Maria Silveira

Instituição: Instituto Agronômico de Campinas

 Documento assinado eletronicamente por **Breno Régis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 04/08/2021, às 15:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 Documento assinado eletronicamente por **NEIDIQUELE MARIA SILVEIRA, Usuário Externo**, em 04/08/2021, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 Documento assinado eletronicamente por **Daniele Maria Marques, Usuário Externo**, em 17/08/2021, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

 A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o Assinatura código verificador **0565725** e o código CRC **DBEAB8E5**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bençãos;

Aos meus pais e à minha irmã, pelo amor e apoio incondicionais;

Aos docentes Breno Régis Santos e Plínio Rodrigues dos Santos-Filho, pela confiança, ensinamentos e acolhimento;

Aos professores, técnicos, terceirizados e discentes que me auxiliaram, em especial à equipe do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN), e do Laboratório de Bioquímica e Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas;

À Zezé, por toda a colaboração e amizade;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

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

RESUMO

O estresse hídrico é o evento ambiental que mais impacta no crescimento e desenvolvimento vegetal; além disso, sugere-se que as ocorrências de mudanças do clima vão aumentar as situações de seca nas principais culturas. Por isso, o desenvolvimento de mecanismos que minimizem as consequências e/ou incrementem a tolerância das plantas à seca são bastante importantes. Nessa perspectiva, inclui-se a utilização via aplicação exógena de determinadas moléculas, como a S-nitrosoglutationa (GSNO), doador de óxido nítrico (NO), que promove uma série de efeitos ligados à resposta para a baixa disponibilidade hídrica em determinadas espécies. Pesquisas são desenvolvidas nesse sentido, mas ainda existem lacunas a serem preenchidas. Portanto, este estudo objetivou examinar os efeitos da aplicação exógena de GSNO nos processos de trocas gasosas, teor de clorofila (índice SPAD), e na atividade antioxidante enzimática e concentração de glutatona em folhas e raízes de *Zea mays* L. sob seca. Para isso foi utilizada a cultivar BRS 1030, sensível ao estresse hídrico, semeada em vasos de 12 L. Os tratamentos consistiram em irrigação (manter as plantas a 70% da capacidade de campo do solo (CC)), e estresse (mantidas a 50% da CC), sendo esse último aplicado quando as plantas atingiram o estágio V6 de desenvolvimento. Para termos comparativos, o híbrido de milho DKB 390, tolerante, também foi submetido a essas condições, mas não aspergido com a molécula citada. Depois de 12 horas de imposição do estresse, realizou-se a pulverização das plantas com a S-nitrosoglutationa nas concentrações de 50 e 100 μM a cada 2 dias, ficando 10 dias no total sob estresse. No final desse período as amostras foram coletadas. Os resultados apontaram claramente para uma melhora nos parâmetros de trocas gasosas, com resultados semelhantes dos apresentados pela testemunha sem estresse, bem como também dos teores de glutatona, principalmente nas folhas, de amido, açúcares solúveis e redutores totais, e das atividades de APX e CAT nas raízes. Essas respostas foram dose-dependentes, com melhor performance no tratamento onde foi utilizado 50 μM de GSNO.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Estresse oxidativo. Metabolismo antioxidante.

ABSTRACT

Water stress is the environmental event that most impacts plant growth and development; in addition, it is suggested that the occurrences of climate change will increase drought situations in the main crops. Therefore, the development of mechanisms that minimize the consequences and or increase the tolerance of plants to drought are very important. In this perspective, it is possible to make use of the exogenous application of certain molecules, such as S-nitrosoglutathione (GSNO), a nitric oxide (NO) donor, which promotes a series of effects related to the response to low water availability in certain species. Research is being carried out in this direction, but there are still gaps to be filled. Thus, this study aimed to examine the effects of exogenous application of GSNO on gas exchange processes, chlorophyll content (SPAD index), and on enzymatic antioxidant and glutathione concentration in leaves and roots of *Zea mays* L. under drought. For this purpose, the maize cultivar BRS 1030, sensitive to water stress, was sown in 12 L pots. The treatments consisted of irrigation (keeping the plants at 70% of the field capacity of the soil (CC)), and stress (kept at 50% of the CC), the latter being applied when the plants reached the V6 stage. For comparative terms, the tolerant hybrid DKB 390 was also subjected to these conditions, but not sprayed with the mentioned molecule. After 12 hours of the stress imposition, the plants were sprayed with S-nitrosoglutathione in concentrations of 50 and 100 μM every 2 days, staying 10 days of stress. At the end of this period, samples were collected. The results clearly pointed to an improvement in gas exchange parameters, with results similar to those presented by the control without stress, as well as glutathione contents, mainly in leaves, starch, soluble sugars and total reducing sugars, and in the APX and CAT activities in roots. These responses were dose-dependent, with better performance in the treatment where 50 μM of GSNO was used.

Keywords: Antioxidant Metabolism. Water stress. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Teor relativo de clorofila (índice SPAD).....	27
Figura 2 –	Condutância estomática (g_s - 2A), transpiração (E - 2B), taxa de assimilação de CO_2 (fotossíntese líquida) (A - 2C), e concentração intercelular de CO_2 – (C_i - 2D).....	29
Figura 3 –	Concentrações de glutathiona reduzida (GSH - 3A), glutathiona oxidada (GSSG - 3B), e $pool$ GSH/GSSG (3C).....	32
Figura 4 –	Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX - 4A), catalase (CAT - 4B), guaiacol peroxidase (GPOX - 4C) e superóxido dismutase (SOD - 4D).....	34
Figura 5 –	Conteúdo de açúcares solúveis totais (ASTs - 5A), açúcares redutores totais (ARTs - 5B), e amido (5C).....	37
Figura 6 –	Altura de planta (6A), e diâmetro do caule (6B).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
HClO	Ácido hipocloroso
ARTs	Açúcares redutores totais
ASTs	Açúcares solúveis totais
ASC	Ascorbato
APX	Ascorbato peroxidase
CC	Capacidade de campo
CAT	Catalase
ASC–GSH	Ciclo ascorbato-glutationa
NBT	Cloreto de azul nitrotetrazólio
DH	Deficit hídrico
DHAR	Dehidroascorbato redutase
CO ₂	Dióxido de carbono
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSRs	Glutarredoxinas
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GPOX	Guaiacol peroxidase
ROOH	Hidroperóxido
OH ⁻	Íon hidroxila
MDHAR	Monodehidroascorbato redutase
NR	Nitrato redutase
SNP	Nitroprussiato de sódio
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂	Oxigênio singleto
O ₃	Ozônio

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
PRXs	Peroxirredoxinas
RO•	Radical alcóxi
OH•	Radical hidroxila
HO ₂ •-	Radical peridroxil
HO ₂ •-	Radical peridroxil
ROO•	Radical peroxil
O ₂ •-	Radical superóxido
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase
GSNO	S-nitrosoglutaciona
GSTs	S-transferases
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS.....	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos Específicos.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A CULTURA DO MILHO: ASPECTOS GERAIS.....	14
2.1.1	EFEITOS DO ESTRESSE HÍDRICO NO MILHO.....	14
2.2	ESTRESSE HÍDRICO E MECANISMOS DE RESPOSTA/DEFESA.....	15
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO, EQUILÍBRIO REDOX E SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	17
2.4	ÓXIDO NÍTRICO: CONCEITOS E INTERAÇÕES.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
3.2	TROCAS GASOSAS E TEOR RELATIVO DE CLOROFILA (ÍNDICE SPAD).....	23
3.3	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E OXIDADA (GSSG).....	23
3.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	24
3.5	ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMIDO, DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E REDUTORES TOTAIS.....	25
3.6	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS.....	26
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	ÍNDICE SPAD E TROCAS GASOSAS.....	27
4.2	POOL DE GLUTATIONA.....	31
4.3	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE.....	33
4.4	CONTEÚDO DE AMIDO, DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E REDUTORES TOTAIS.....	36
4.5	ALTURA DE PLANTA E DIÂMETRO DO CAULE.....	39

5	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O enfrentamento de estresses bióticos e abióticos é um dos principais desafios no contexto da produção agrícola, uma vez que tais situações diminuem a capacidade vegetal de expressar seu pleno potencial fisiológico (ANJUM *et al.*, 2011a), e, conseqüentemente, causam a diminuição no crescimento e desenvolvimento das plantas, reduzindo também a produtividade e gerando danos e prejuízos (BASAL; SZABÓ; VERES, 2020).

Na atual conjuntura das mudanças climáticas, o estresse hídrico é, sobretudo, o mais preocupante; sugere-se que há uma tendência de que esses acontecimentos levarão a um aumento na ocorrência, duração e intensidade de períodos de seca (FELLER; VASEVA, 2014; SHAO *et al.*, 2018). Ainda, é apontado que a escassez de água é a ameaça mais crítica ao sistema de produção (FAROOQ *et al.*, 2009b) e à segurança alimentar, principalmente das plantas de interesse econômico (AHMED, 2020), de modo que a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) a considera como a causa mais comum para a falta de alimentos em países em desenvolvimento (RIBAUT *et al.*, 2009).

Dentre essas culturas está a do milho, geograficamente um dos maiores cereais plantados (MUIMBA-KANKOLONGO, 2018), e um dos mais importantes mundialmente (SHAHBAZ; ASHRAF, 2013). Contudo, a planta é uma das mais susceptíveis à seca (BÄNZIGER; ARAUS, 2007; LOBELL *et al.*, 2011), um dos fatores abióticos que mais limita sua produção e a estabilidade de seu rendimento (BARKER *et al.*, 2010).

Portanto, existe e é relevante a necessidade de melhorar a tolerância contra o estresse hídrico e o entendimento e a identificação das características que a favorecem em ordem de incrementar a produtividade agrícola sob condições de baixa disponibilidade de água e o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais tolerantes à seca (ANJUM *et al.*, 2011b; ZHU; BROWN; LYNCH, 2010). Da mesma forma, é crucial incentivar a promoção e o aprimoramento do conhecimento sobre as respostas das plantas a tais condições, que incluem determinadas adaptações morfológicas e fisiológicas, objetivando, dentre outros, aperfeiçoar a capacidade para suportar esses cenários nas principais culturas (BALESTRINI *et al.*, 2018).

Nesse sentido, determinadas substâncias têm sido estudadas com tal finalidade, como o óxido nítrico (NO), por exemplo. Pesquisas recentes têm

demonstrado a relevância do NO como agente regulatório nas respostas vegetais fisiológicas e bioquímicas frente a estresses de diferentes naturezas, logo, induzindo à resistência nas plantas; a molécula está envolvida em vários processos vegetais, os quais incluem a dormência de sementes e germinação, o desenvolvimento radicular, as respostas hormonais, o amadurecimento de frutos e senescência, e floração (SIMONTACCHI *et al.*, 2015), no aumento da biossíntese de metabólitos secundários (HAO *et al.*, 2009), podendo ainda agir como um antioxidante, atuando em sinergia com outras moléculas e inibindo a peroxidação lipídica (RUBBO; BATTHYANY; RADI, 2000), e também como uma molécula sinalizadora para a ativação das defesas contra a oxidação (NEILL *et al.*, 2008).

Previamente em plantas de milho sob seca, verificou-se que o NO exógeno promoveu a redução dos danos oxidativos em função da manutenção e do adicional aumento da atividade de enzimas antioxidantes envolvidas no processo de deficit, bem como melhorarias no status hídrico e no conteúdo de clorofila (AN *et al.*, 2019; MAJEED *et al.*, 2018), além de ter incrementado o desempenho fotossintético e reduzido o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHAO *et al.*, 2018).

Contudo, a maioria dessas pesquisas utilizou o nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de óxido nítrico, que no processo de redução e subsequente decomposição libera cianeto, causando uma pronunciada toxicidade celular (WANG *et al.*, 2002). Por conseguinte, buscando superar essa desvantagem, é lançada mão de outras fontes de NO, tais como a S-nitrosoglutathiona (GSNO).

Estudos com a aplicação exógena dessa substância têm sido publicados recentemente e com resultados promissores em feijão (SILVEIRA *et al.*, 2020), cana-de-açúcar (SILVEIRA *et al.*, 2016, 2017), azevém (RIGUI *et al.*, 2019), entre outras. Entretanto, até o momento, não se tem relatadas investigações dos efeitos de GSNO em *Zea mays* sob seca.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos em parâmetros fisiológicos e bioquímicos da aplicação via pulverização foliar de S-nitrosoglutathiona, doadora de óxido nítrico, em plantas de milho mantidas sob regime de déficit hídrico.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos do presente trabalho incluem:

- a) examinar os efeitos da aplicação exógena de GSNO nos processos de trocas gasosas, teor de clorofila (índice SPAD), e em parâmetros biométricos em híbrido de milho mantido sob déficit hídrico;
- b) determinar a atividade antioxidante enzimática (ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7), e superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)), e quantificar os compostos antioxidantes não enzimáticos (glutathiona reduzida e oxidada), e teores de amido, açúcares solúveis e redutores totais em folhas (parte aérea), e raízes dos híbridos BRS 1030 e DKB 390 de *Zea mays* L. sob diferentes manejos de irrigação, pulverizados ou não com S-nitrosoglutathiona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DO MILHO: ASPECTOS GERAIS

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, originária das terras altas do México entre 7.000 e 10.000 anos atrás (GARCÍA-LARA; SERNA-SALDIVAR, 2019). Suas características de adaptação permitem seu cultivo em altitudes que vão desde o nível do Mar. até mais de 3.600 metros, e do Equador aos limites de regiões temperadas (MAGALHÃES *et al.*, 2002).

Por tratar-se de uma espécie que pode ser cultivada nos mais diferentes cenários agrícolas, já que suporta relativamente bem um amplo espectro de condições climáticas e de solo (FAROOQ *et al.*, 2015), o milho é amplamente difundido geograficamente no Brasil (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). O reflexo disso é a produção no país, que está estimada em 105.481,6 mil toneladas para a safra 2020/2021, numa área plantada de 19.092,4 mil hectares (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021). Assim, fica evidente a importância do grão, tanto pela questão econômica, no que diz respeito às suas propriedades nutricionais e seu uso intenso para a alimentação humana, animal e na indústria como matéria-prima, quanto pela social, por ser um alimento mais econômico, viável de ser produzido e por ser fundamental nos sistemas agroindustriais (GALVÃO *et al.*, 2014).

2.1.1 Efeitos do estresse hídrico no milho

Em cereais, de um modo geral, as principais consequências da seca incluem a redução da taxa de divisão e de expansão celular, do tamanho foliar, da alongação caulinar e radicular, das relações de nutrientes e a ocorrência de perturbações nos processos fotossintéticos - distúrbios nos movimentos estomáticos e síntese de enzimas envolvidas - (FAROOQ *et al.*, 2009b, 2012).

No milho especificamente, esse tipo de estresse diminui a eficiência com a qual a radiação fotossinteticamente ativa absorvida é usada pela cultura para produzir a matéria seca nova, e também pode limitar a produção de grãos reduzindo o índice de colheita (proporção entre a matéria seca dos grãos e a matéria seca total

da planta) (EARL; DAVIS, 2003). Pode igualmente atrasar a floração e a maturidade, influenciar nos períodos fenológicos, e afetar a eficiência hídrica (FARRÉ; FACI, 2006), causar a esterilidade masculina (BARNABÁS; JÄGER; FEHÉR, 2008), e perturbar a receptividade dos estigmas (BASSETTI; WESTGATE, 1993).

Esses efeitos que, como pôde ser visto, tem impactos cumulativos e são capazes de variar em níveis morfológicos a moleculares, são manifestados em todos os estádios fenológicos do crescimento vegetal, qualquer seja o estágio em que ocorram (FAROOQ *et al.*, 2009b). Em síntese, o estresse hídrico tem impactos cumulativos e afeta severamente, reduzindo de forma substancial, as taxas de crescimento, de desenvolvimento, e o acúmulo de biomassa (FAROOQ *et al.*, 2009b; KAMARA *et al.*, 2003).

2.2 ESTRESSE HÍDRICO E MECANISMOS DE RESPOSTA/DEFESA

A água tem diversas funções fisiológicas e ecológicas e, por isso, exerce o papel fundamental para o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Ademais, é o recurso mais abundante, mas também o mais limitante, uma vez que em condições de deficit pode causar situações de estresse na planta (KERBAUY, 2004). Esse último termo pode ser conceituado como qualquer condição do ambiente que impossibilite a planta de atingir seu potencial reprodutivo e crescimento máximo (TAIZ *et al.*, 2017), podendo ainda ser especificado em biótico (o ataque de patógenos e de insetos, a ação antrópica, a herbivoria, a competição entre plantas, etc.), e abiótico (a seca, as temperaturas extremas, a presença de metais pesados, a alta salinidade, a baixa intensidade luminosa, a deficiência nutricional, entre outros) (PALLARDY, 2008).

Quando uma planta enfrenta um estresse hídrico, ela lança mão de um aparato de processos que têm por objetivo fazê-la resistir às condições de seca (CHAVES; MAROCO; PEREIRA, 2003). Essas estratégias incluem alterações em níveis moleculares, celulares e fisiológicos (BARNABÁS; JÄGER; FEHÉR, 2008). Nessa perspectiva, frequentemente ocorrem o aumento da expressão ou indução de genes, a elevação passageira dos níveis de fitormônios, o acúmulo de solutos compatíveis, de proteínas protetoras e de antioxidantes, e a supressão de caminhos que consomem energia (BARTELS; SUNKAR, 2005). São comuns também alterações morfológicas (PIMENTEL, 2004), que incluem a regulação dos padrões

de crescimento radicular, do tamanho foliar (FAROOQ *et al.*, 2012; SINCLAIR; MUCHOW, 2001), e de mudanças nas transições entre fases fenológicas (DE MICCO; ARONNE, 2012).

O processo de respostas se inicia nas raízes, que agem como sensores do ambiente do solo e sinalizam estresses como o hídrico, por exemplo, na rizosfera (GOODGER; SCHACHTMAN, 2010). Um dos primeiros processos desencadeados quando identificado o déficit hídrico é a biossíntese de ácido abscísico (ABA), que induz uma quantidade considerável de efeitos na planta (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006), dentre os quais, essencialmente, a promoção do fechamento estomático (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Ademais, os movimentos de abertura e fechamento estomatal, além dos níveis de ABA, estão também relacionados com outros fitormônios (principalmente as citocininas e o etileno), a luminosidade, a concentração interna de CO₂, a temperatura foliar (FELLER; VASEVA, 2014), e com as mudanças no turgor das células-guarda em relação às células epidérmicas (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Desse modo, as mudanças na disponibilidade de água levam a alterações nos gradientes hidráulicos e na pressão de turgor dentro das plantas (SCHARWIES; DINNENY, 2019). Os mesmos autores apontam que déficits severos resultam na perda desse turgor em tecidos inteiros, uma vez que quando os potenciais hídricos da planta caem, a água sai das células e a pressão de turgescência diminui.

A consequência desse processo é a diminuição do volume e a contração celular, que promove um estresse osmótico nas células (ZHU, 2016). O resultante aumento da concentração de solutos, principalmente de íons, restringe majoritariamente a respiração mitocondrial e as reações secundárias da fotossíntese (LARCHER, 2000).

Continuamente, o fechamento do ostíolo afeta diretamente essa última, inibindo-a, conseqüentemente reduzindo a síntese de carboidratos e interrompendo a divisão e a expansão das células, que não conseguem manter seus sistemas em funcionamento (BARNABÁS; JÄGER; FEHÉR, 2008; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Outros motivos para o declínio da taxa fotossintética em função do estresse hídrico ainda podem ser incluídos, tais como a diminuição na interceptação de luz à medida que a expansão foliar é reduzida, ou pela senescência das folhas, e a redução na fixação de carbono por unidade de área foliar conforme, além do fechamento estomático, ocorrem danificações de foto-oxidação no mecanismo fotossintético

(BRUCE; EDMEADES; BARKER, 2002). Estresses muito severos inclusive promovem o declínio na taxa fotossintética em virtude do decréscimo na atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) (BOTA; MEDRANO; FLEXAS, 2004).

O metabolismo de aminoácidos e das proteínas também é abalado. A redução da síntese dessas, independente da intensidade do estresse, provoca a diminuição da divisão celular e pode causar anomalias cromossômicas (LARCHER, 2000). Uma das enzimas amplamente influenciadas é a nitrato redutase, que reduz o nitrato a nitrito no processo de assimilação por parte da célula vegetal e é um importante contribuinte ao ajuste osmótico em plantas submetidas a deficit hídrico (LARCHER, 2000; ROUPHAEL *et al.*, 2012; TAIZ *et al.*, 2017).

Além disso, já se relatou que em condições de seca, os níveis de poliaminas podem sofrer alterações (CAPELL; BASSIE; CHRISTOU, 2004). Essas são aminas orgânicas, nitrogenadas e biogênicas (MATTOO; UPADHYAY; RUDRABHATLA, 2015), e que devido à sua natureza catiônica em pH fisiológico, podem interagir com macromoléculas carregadas negativamente, como os fosfolipídios de membrana, o DNA e as proteínas (AN *et al.*, 2012).

Portanto, em vista do apresentado, torna-se evidente que o entendimento de como as plantas respondem a seca e a outros estresses pode desempenhar um papel importante na estabilização do desempenho produtivo sob tais condições e na proteção da vegetação natural (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Entretanto, reitera-se que o atual entendimento dos mecanismos envolvidos e de estratégias para minimizar os efeitos que os estresses abióticos e bióticos têm na redução do potencial produtivo de culturas ainda são limitados (YAKHIN *et al.*, 2017), principalmente quando se leva em consideração que os efeitos secundários, no caso de deficit hídrico, são mais complexos e ainda envolvem a danificação aos componentes celulares tais como a membrana lipídica, as proteínas e os ácidos nucléicos, a disfunção metabólica, além de estresse oxidativo (ZHU, 2016).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO, EQUILÍBRIO REDOX E SISTEMA ANTIOXIDANTE

Um dos principais reguladores dos diferentes processos das plantas, seja em condições ótimas ou de estresse, é o estado de oxirredução celular, definido como a razão entre as formas oxidadas e reduzidas de diferentes pares redox presentes

dentro da célula; esse sistema é modulado com o propósito de promover a manutenção da homeostase celular, que por sua vez ocorre através do balanço dos níveis de EROs e dos compostos enzimáticos ou não enzimáticos que produzem ou eliminam essas espécies (POTTERS; HOREMANS; JANSEN, 2010; SRIVASTAVA; SUPRASANNA, 2015).

No metabolismo aeróbico, o desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio – EROs – é inevitável (SHARMA *et al.*, 2012). O termo inclui espécies radicalares e não radicalares de oxigênio que são produzidas pela redução parcial do O₂ (CORPAS; GUPTA; PALMA, 2015). A redução de um elétron do gás oxigênio resulta na formação do radical superóxido (O₂•⁻), que pode ser dismutado, resultando na formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ou protonado, gerando o radical peridroxil (HO₂•⁻). Na presença de metais de transição, como ferro e cobre, reações como a de Haber-Weiss ou de tipo Fenton podem acontecer, acarretando no aparecimento do radical hidroxila (OH•) e/ou íons hidroxila (OH⁻), que são as espécies químicas mais reativas no âmbito biológico (SRIVASTAVA; SUPRASANNA, 2015).

Os mesmos autores discorrem ainda que o oxigênio singlete (¹O₂) é outra forma de ERO, produzido pela fotoexcitação da clorofila, onde um elétron é elevado a um orbital maior de energia. Podem ser citadas aqui também como exemplos o radical peridroxil (HO₂•⁻), o hidroperóxido (ROOH), o radical peroxil (ROO•), o radical alcóxi (RO•), o ozônio (O₃), o ácido hipocloroso (HClO), entre outras; (CORPAS; GUPTA; PALMA, 2015; GILL; TUTEJA, 2010; NEILL *et al.*, 2008).

Nas plantas, de forma natural, as EROs são formadas em diferentes organelas, como as mitocôndrias, os cloroplastos, os peroxissomos, e no lado extracelular da membrana plasmática (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Essas moléculas possuem uma vasta gama de efeitos nos vegetais, que potencialmente podem ser deletérios ou não de acordo com suas concentrações, ou seja, do estado redox da célula. Geralmente, em menores quantidades, algumas delas desempenham um papel importante de sinalização no crescimento, desenvolvimento, resposta a estímulos bióticos e abióticos, e morte celular programada. Já em maiores concentrações causam danos severos às macromoléculas (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006; GILL; TUTEJA, 2010; NEILL *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2012; SRIVASTAVA; SUPRASANNA, 2015).

Para evitar esse tipo de situação, a planta conta com um robusto aparato

antioxidante, que impede os potenciais efeitos indesejados das espécies reativas de oxigênio ao mesmo que modula suas funções de sinalização (CORPAS; GUPTA; PALMA, 2015). Esse sistema dispõe de componentes enzimáticos – p. e. SOD, CAT, APX, GPOX, glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9), monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4), e dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1) –, e não enzimáticos – ácido ascórbico, glutathione, prolina, α -tocoferóis, carotenoides, flavonoides, entre outros – (SADEGHIPOUR, 2016; UPADHYAYA; HOSSAIN, 2016).

No contexto das rotas das EROs e sua remoção, a SOD atua como a principal eliminadora dos radicais superóxidos, cuja ação enzimática resulta na formação de O_2 ou H_2O_2 , espécies menos prejudiciais. Com base no íon metálico em seu sítio ativo, a SOD é classificada como cobre-zinco SOD (Cu/Zn SOD), encontrada no citosol e cloroplasto, manganês SOD (Mn SOD), na mitocôndria e peroxissomos, e ferro SOD (Fe SOD) (AHMAD *et al.*, 2010).

O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é convertido inicialmente pela APX em água e O_2 ; o excedente não convertido por essa primeira enzima também pode ser catalisado por outras várias peroxidases fora do ciclo ascorbato-glutathione, como a CAT e GPOX. As isoformas de APX estão majoritariamente no citosol e cloroplastos, enquanto as de CAT são encontradas nos peroxissomos, e de GPOX no citosol (AHMAD *et al.*, 2010).

Assim, a desintoxicação de H_2O_2 pela APX no ciclo ascorbato-glutathione (ASC–GSH) utiliza ascorbato (ASC) como o doador de elétrons, que é então oxidado a monodehidroascorbato no processo. A regeneração do ASC pode ser do MDHA, realizada pela MDHAR, usando o poder redutor de NADPH, ou pela DHAR, que reduz o dehidroascorbato, uma molécula que surge da conversão espontânea de MDHA; a DHAR utiliza a glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, que, por sua vez, é convertida em glutathione oxidada (GSSG). A reação final do ciclo é catalisada pela glutathione redutase, levando à conversão de GSSG de volta em GSH com o poder redutor de NADPH. Ainda, a GSH também pode atuar como poder redutor de enzimas como as glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18), Glutarredoxinas (GSRs, EC 1.20.4.1), e Peroxirredoxinas (PRXs, EC 1.11.1.15), que igualmente convertem H_2O_2 em H_2O (AHMAD *et al.*, 2010; CASSIA *et al.*, 2018; FOYER; NOCTOR, 2011; SRIVASTAVA; SUPRASANNA, 2015).

Entre os não enzimáticos, a glutathione é uma molécula que recentemente vem

ganhando importância e atraído atenção em razão das suas funções na resistência/tolerância das plantas frente a estresses ambientais (CHATTOPADHYAY, 2016). Ela pode funcionar, além de como visto acima (indiretamente, como agente redutor), também de modo não enzimático (diretamente, como um antioxidante), eliminando as espécies reativas de oxigênio, inclusive radicais hidroxila) (CRUZ DE CARVALHO, 2008; FOYER; NOCTOR, 2011).

Entretanto, em determinadas condições ambientais, como as de déficit hídrico, sabe-se que há um desbalanço no equilíbrio redox celular, em razão do favorecimento da produção de EROs, que não conseguem ser removidas completamente por essas moléculas antioxidantes. A essa situação dá-se o nome estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2012).

Entre as perturbações fisiológicas causadas à célula sob estresse oxidativo estão a oxidação de DNA, RNA e carboidratos, peroxidação lipídica em membrana celular, danos em proteínas, inibição de enzimas e, em último caso, a morte das células (GILL; TUTEJA, 2010).

Ainda, sob condições que limitam a assimilação de CO₂, como a seca, sabe-se que a taxa potencial de produção de NADPH geralmente excede a taxa real de consumo de energia redutora. Qualquer diminuição da taxa de transporte de elétrons, especialmente sob condições de alta luminosidade, aumentará expressivamente a chance de produção excessiva de EROs (KOYRO; HUCHZERMEYER; ZÖRB, 2014).

2.4 ÓXIDO NÍTRICO: CONCEITOS E INTERAÇÕES

Lipofílico, diatômico e incolor, o gás óxido nítrico, ou monóxido de nitrogênio (NO), pertence às moléculas do tipo radical livre porque tem um elétron não emparelhado em um de seus orbitais (CORPAS *et al.*, 2011; LAMATTINA *et al.*, 2003; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2003). O NO não necessita de transportador para atravessar membranas, se difundindo muito rapidamente por causa de sua natureza gasosa, além de poder reagir com certa quantidade de macromoléculas, como as proteínas, os lipídeos, os ácidos nucleicos, entre outras (CORPAS *et al.*, 2011; DOMINGOS *et al.*, 2015).

O óxido nítrico endogenamente pode ser gerado por mecanismos enzimáticos, os quais incluem as óxido nítrico sintases (NOS) e a nitrato redutase

(NR), e não enzimáticos (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2003). Os mesmos autores mencionam que a presença dessas primeiras em plantas foi suMar.izada pelo uso e eficácia de uma série de inibidores de NOS, dos quais a aminoguanidina foi considerada a mais eficaz; essas moléculas catalisam a formação de NO a partir da L-arginina, que sofre uma oxidação de cinco elétrons à L-citrulina, sendo indispensáveis para a reação NADPH e oxigênio molecular. Já a nitrato redutase gera NO usando como substratos o NO_2^- e NADH (YAMASAKI; SAKIHAMA; TAKAHASHI, 1999).

Em relação aos não enzimáticos, sabe-se que os ciclos de nitrificação e de desnitrificação fornecem o NO como um subproduto da oxidação do N_2O para a atmosfera; ademais, a redução não enzimática do nitrito pode levar à formação de NO, e essa reação é favorecida por pH ácido quando o nitrito pode desmutar em NO e nitrato, assim como o nitrito pode também ser reduzido quimicamente pelo ácido ascórbico em pH de 3 a 6 produzindo o NO e ácido dehidroascórbico (CORPAS *et al.*, 2007). Além disso, Cooney *et al.* (1994), sugerem a formação de óxido nítrico através da redução mediada por luz de N_2O por carotenoides.

Em relação à seca, os papéis do óxido nítrico estão associados às respostas que induzem alterações fitormonais e fisiológicas, com destaque para os movimentos estomatais, bem como bioquímicas e nas rotas de sinalização, desencadeando a diminuição das injúrias celulares (MATA; LAMATTINA, 2001; SHAPIRO, 2005; XIONG *et al.*, 2012). Sendo assim, Neill *et al.* (2008) reiteram que o NO é um fator chave na tolerância celular ao estresse oxidativo induzido por inúmeras condições desfavoráveis, incluindo o deficit hídrico, por atuar de forma efetiva no controle das EROs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas as sementes do híbrido de milho BRS 1030, sensível à seca, e do DKB 390, tolerante (SOUZA *et al.*, 2013a, 2013b) oriundas do Programa de Melhoramento da Embrapa e da empresa Dekalb®, respectivamente. Para o cultivo foram utilizados vasos de 12 litros preenchidos previamente com solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico. Em cada vaso foram mantidas duas plantas. A adubação foi feita de acordo com a recomendação da análise química do solo e todos os tratamentos fitossanitários necessários à cultura aplicados. Foram impostos dois tratamentos hídricos – irrigado e estressado –. Para isso, em primeiro lugar determinou-se a CC: um vaso perfurado foi preenchido com o solo seco (as aberturas foram cobertas com tecido para evitar que o substrato saísse), e esse conjunto foi pesado. Em seguida, foi acrescentada água até a saturação completa. O vaso foi então suspenso até que todo o excesso de líquido saísse, quando, nesse instante, foi novamente pesado. A capacidade de campo foi calculada como a diferença entre o peso úmido menos o peso seco. Assim, a reposição de água foi feita para manter o valor de CC em 70% nos tratamentos irrigados e 50% nos estressados, sendo esse último aplicado quando as plantas atingiram o estágio V6 de desenvolvimento. Com 12 horas de imposição da seca, as plantas do híbrido sensível foram pulverizadas com o doador de óxido nítrico GSNO a 50 e 100 μM a cada 2 dias, permanecendo no total 10 dias sob estresse. Amostras de folhas e raízes foram coletadas ao fim desse período e mantidas em ultrafreezer (-86°C) para as análises posteriores.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições cada, e consistiram em ambos os híbridos mantidos a 70% da capacidade de campo (“DKB Irrigado” e “BRS Irrigado”), a 50% da CC (Imposição do estresse hídrico – “DKB DH” e “BRS DH”), e o híbrido BRS sob deficit hídrico (DH) pulverizado com as duas concentrações de S-nitrosoglutationa (“BRS DH + 50 GSNO” e “BRS DH + 100 GSNO”), totalizando 30 unidades experimentais. O híbrido DKB 390 foi utilizado principalmente para servir como parâmetro comparativo em contraste com o BRS, tanto em relação aos efeitos do NO exógeno quanto aos da

seca. As testemunhas foram aspergidas com água destilada.

3.2 TROCAS GASOSAS E TEOR RELATIVO DE CLOROFILA (ÍNDICE SPAD)

As medidas de trocas gasosas foram feitas através de um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, Model LI-6400XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). Todas as medidas foram realizadas no período da manhã entre 8 e 11h em uma folha totalmente expandida (folha da espiga). Os parâmetros avaliados foram a taxa fotossintética foliar (A), a condutância estomática (g_s), a concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E). As medidas foram feitas em uma área foliar de 2 cm^2 , a densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de $1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, e a temperatura foliar foi controlada (29° C). O índice SPAD foi determinado por um clorofilômetro portátil. As leituras também foram na folha da espiga e realizadas na parte da manhã.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E OXIDADA (GSSG)

A análise dos teores de GSH e GSSG foi feita através de fluorescência, de acordo com o método descrito por HISSIN e HILF (1976), e ARAVIND e PRASAD (2005). Resumidamente, 250 mg de material vegetal (folhas e raízes) foi macerado sob banho de gelo em 250 μL de H_3PO_3 25% (p/v) e 750 μL de tampão fosfato de sódio-EDTA 100 mM pH 8,0. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 0° C . O sobrenadante foi utilizado para as estimativas de glutaciona reduzida e oxidada em um espectrofotômetro de fluorescência da Mar.ca Cary Eclipse.

No caso da GSH, a mistura final (2,0 mL) conteve 100 μL do sobrenadante obtido anteriormente, 1,8 mL do mesmo tampão utilizado na extração e 100 μL de O-ftalaldeído na concentração de 1 mg mL^{-1} . Depois de completa agitação e incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, essa solução foi transferida para uma cubeta de quartzo e a fluorescência foi medida a 420 nm depois de excitação a 350 nm.

Para a GSSG, uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi incubado em temperatura ambiente com 20 μL de N-etilmaleimida 40 mM por 30 minutos para interagir com a glutaciona reduzida presente no sobrenadante. Posteriormente, a

essa mistura, adicionou-se 380 μL de NaOH 0,1 N e, dessa diluição, retirou-se 200 μL para a realização das medidas de glutathiona oxidada, performando o mesmo procedimento estabelecido para a GSH, exceto que 1700 μL de NaOH 0,1 N foi utilizado ao invés do tampão fosfato de sódio-EDTA.

As concentrações totais de GSH e GSSG foram determinadas por meio de curva de calibração utilizando-se de padrões autênticos de glutathiona reduzida e oxidada, sendo o resultado expresso em $\mu\text{M mg}^{-1}$ de matéria fresca.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE

Amostras de folhas e raízes (350 mg) foram homogeneizadas em 4 volumes de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 contendo 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 5 mM de ascorbato em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 17.000 g por 10 minutos a 0 °C 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 e extração de acordo com García-Limones *et al.* (2009).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada por sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT). A mistura de reação foi formada de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, 0,15 mM de EDTA, 14 mM de metionina, 75 μM de NBT, 20 μM de riboflavina e 100 μL de sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de riboflavina, e a absorbância foi 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 (GPOX) 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 de potássio 100 mM pH 6,5, 15 mM de Guaiacol, 0,05% (v/v) de H_2O_2 e diferentes concentrações do extrato enzimático. Os resultados foram expressos em mmol de H_2O_2 consumido mg^{-1} proteína min^{-1} .

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo consumo de H_2O_2 acompanhado pela queda da absorbância a 240 nm. A mistura de reação foi

formada por tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, 20 mM de H₂O₂ e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do peróxido de hidrogênio ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em μmol de H₂O₂ consumido mg^{-1} proteína min^{-1} .

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela diminuição da absorvância do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 290 nm. A mistura de reação foi formada por tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, ascorbato de sódio 0,25 mM, H₂O₂ 0,25 mM e diferentes volumes do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição do peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em mmol de ascorbato consumido mg^{-1} proteína min^{-1} .

3.5 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMIDO, DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E REDUTORES TOTAIS

Amostras de folhas e raízes (150 mg), foram homogeneizadas sob banho de gelo com 1,5 mL de solução de metanol/clorofórmio/água (12:5:3, v/v), e incubadas em temperatura ambiente por 24 h. Em seguida, foram centrifugadas a 1500 g por 30 minutos a 4 °C e, posteriormente, o sobrenadante foi coletado e acrescido de solução de clorofórmio e água (4:1:1,5, v/v). Para as análises de açúcares solúveis (ASTs), e redutores totais (ARTs), foi utilizada a fase aquosa dessa mistura e, para amido, o pellet (ou precipitado), obtido da centrifugação.

Para a quantificação dos ARTs utilizou-se do método descrito por Miller (1959). Brevemente, uma alíquota da fase aquosa e água destilada (somando 750 μL) foi acrescentada a 500 μL de uma solução composta por 10 mL de NaOH 2N, 0,5 g de ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS), e 15 g de tartarato de sódio e potássio. As amostras foram então agitadas em vortex e depois aquecidas em banho Maria a 100 °C por 5 minutos. Posteriormente, em temperatura ambiente, adicionou-se 3750 μL de água destilada, e procedeu-se a leitura da absorvância em 540 nm.

A análise da concentração dos ASTs nos tecidos vegetais foi elaborada adicionando uma alíquota da fase aquosa e água destilada (somando 1 mL), com 2 mL de reagente de antrona (preparado com 20 mg de antrona, 500 μL de água e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado). As amostras foram agitadas em vortex e depois aquecidas em banho Maria a 100 °C por 3 minutos. Posteriormente, em temperatura ambiente, a leitura da absorvância foi realizada a 620 nm (YEMM; WILLIS, 1954).

Já os teores de amido foram determinados de acordo com Mccready *et al.* (1950). Adicionou-se 1 mL de ácido perclórico 30% (v/v) ao precipitado oriundo da extração e, em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por aproximadamente 5 minutos. A fase líquida da solução obtida foi utilizada para reagir com antrona da mesma forma como referido acima.

Todos os valores para esses metabólitos foram verificados a partir de construção de curva-padrão utilizando-se de glicose, e expressos em mg g⁻¹ de matéria fresca.

3.6 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Analisou-se a altura de plantas, medida utilizando uma fita métrica graduada em centímetros, da superfície do solo até a base da última folha, e o diâmetro de caule, verificado aproximadamente 3 cm acima da superfície do solo, por meio de um paquímetro digital graduado.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

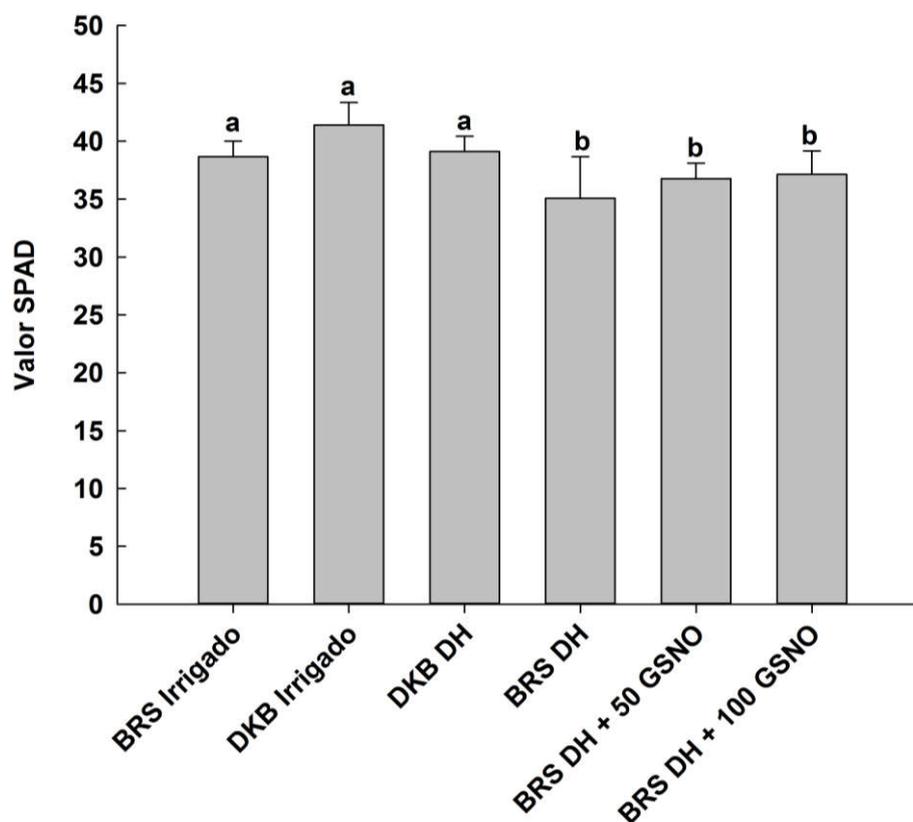
Os resultados de cada um dos parâmetros avaliados foram submetidos quanto a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) no programa SigmaPlot v. 14.0 (Systat Software Inc. San Jose, CA, USA), e, em seguida, a análise de variância (ANOVA), no software Sisvar v. 5.6 (Universidade Federal de Lavras, Brasil), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 0,05 de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÍNDICE SPAD E TROCAS GASOSAS

No híbrido sensível (diferentemente do DKB), comparado com aquele nas quais as plantas foram mantidas bem hidratadas, verifica-se que no tratamento onde ocorreu a imposição da seca houve uma redução do conteúdo relativo do pigmento; as aplicações de GSNO não promoveram a conservação do parâmetro nos tecidos foliares (Fig. 1).

Figura 1 - Teor relativo de clorofila (índice SPAD). As barras indicam o valor médio (n=5), e os respectivos desvios-padrões em folhas de milho bem hidratadas (mantidas a 70% da capacidade de campo – DKB Irrigado e BRS Irrigado), submetidas à estresse hídrico (mantidas a 50% da capacidade de campo – DKB DH e BRS DH), e submetidas à seca + aspergidas com diferentes concentrações (expressas em μM) de S-nitrosoglutationa (GSNO) (BRS DH + 50 ou 100 GSNO). Letras iguais apontam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.



Fonte: do autor.

No processo fotossintético, as clorofilas (*a* e *b*) são os pigmentos mais importantes, já que são essenciais para a conversão de energia física em química;

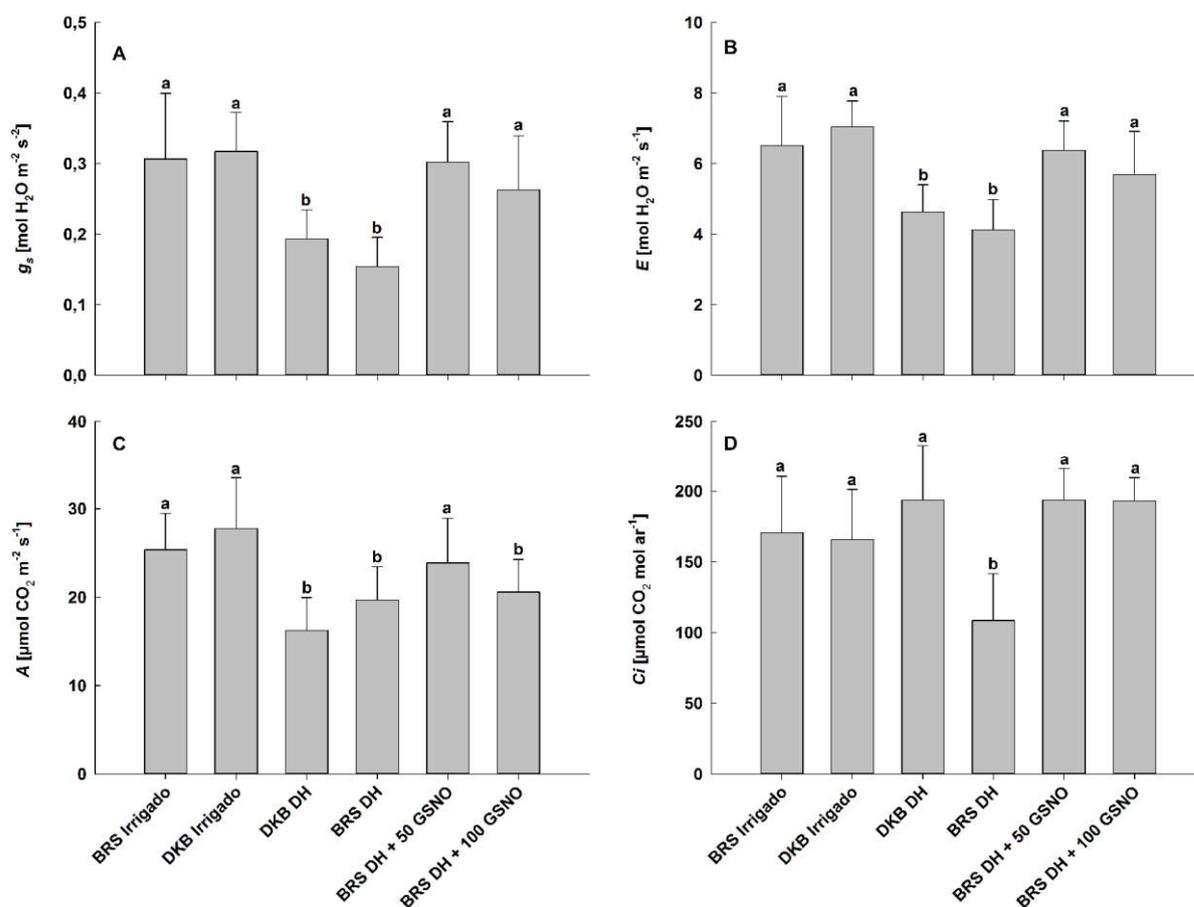
no mesmo sentido, representam importantes parâmetros na perspectiva da ecofisiologia aplicada (RICHARDSON; DUGAN; BERLYN, 2002). Há um consenso de que a qualidade espectral da luz refletida das folhas, manifestada na cor das mesmas, é considerada um indicador de estresse vegetal; logo, a medição dessa característica em tecidos foliares fornece informações importantes sobre as relações entre as plantas e seu ambiente, bem como de consequentes respostas fisiológicas referentes à tais condições (CARTER; KNAPP, 2001; NEMESKÉRI; HELYES, 2019).

Como resultado da exposição a fatores de estresse, há uma tendência à degradação e inibição de biossíntese dos pigmentos fotossintéticos (IWUALA *et al.*, 2020; SAHAY *et al.*, 2020), como também já foi relatado um aumento na expressão da enzima clorofilase (BALI *et al.*, 2019). Em suma, as folhas propendem a perder clorofila, e essas a terem suas propriedades de absorção comprometidas (CARTER; KNAPP, 2001), diretamente afetando, portanto, os índices SPAD (Fig. 1).

Os resultados dos tratamentos demonstram que a aplicação exógena de GSNO não atenuou a degradação de clorofila nas plantas de milho sob condições de déficit, os quais estão em contraste com estudos anteriores realizados em cana-de-açúcar (SILVEIRA *et al.*, 2016, 2017).

Em relação aos parâmetros de trocas gasosas, de modo geral, quando comparados com os tratamentos em que as plantas permaneceram a 70% da capacidade de campo, foram reduzidos naqueles onde foi imposta a limitação de água. O uso de S-nitrosoglutathione, em ambas as concentrações, acarretou em valores superiores em todos os parâmetros de trocas gasosas quando comparados com ambos os híbridos sob seca, exceto para C_i do DKB e da fotossíntese líquida (A) na concentração de 100 μM , e iguais estatisticamente a ambas testemunhas sem estresse (BRS e DKB Irrigado), indicando um efeito positivo no uso dessa molécula para a manutenção de tais aspectos fisiológicos (Fig. 2).

(fotossíntese líquida) – A (2C), e concentração intercelular de CO_2 – C_i (2D). As barras indicam o valor médio ($n=5$), e os respectivos desvios-padrões dos resultados em plantas de milho bem hidratadas (mantidas a 70% da capacidade de campo – DKB Irrigado e BRS Irrigado), submetidas à estresse hídrico (mantidas a 50% da capacidade de campo – DKB DH e BRS DH), e submetidas à seca + aspergidas com diferentes concentrações (expressas em μM) de S-nitrosoglutationa (GNSO) (BRS DH + 50 ou 100 GSNO). Letras iguais apontam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.



Fonte: do autor.

A imposição de estresse hídrico reduz a taxa fotossintética, seja limitando aspectos como a expansão foliar e o número de folhas, ou afetando fatores estomatais e não estomatais (processos bioquímicos). Sugere-se que a seca perturba o equilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante. Essas primeiras se acumulam, induzindo o estresse oxidativo e, simultaneamente, o déficit hídrico induz a biossíntese de ácido abscísico (ABA), que diminui a condutância estomática para minimizar as perdas transpiratórias (FAROOQ *et al.*, 2012; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006).

Com o fechamento estomático, o influxo de CO_2 e o CO_2 intercelular da folha

diminuem, bem como há a restrição na sua difusão na folha, o que não apenas reduz a carboxilação diretamente, mas também promove a fotorrespiração e direciona mais elétrons para formar as espécies reativas de oxigênio (CHAVES *et al.*, 2002; FAROOQ *et al.*, 2012). Esse comportamento pode ter sido expressado no presente estudo, uma vez que todos os parâmetros de trocas gasosas foram reduzidos na testemunha submetida à seca (BRS DH), quando comparados com os resultados da testemunha mantida bem hidratada (BRS Irrigado) (Fig. 2).

A aplicação de óxido nítrico igualmente compensou os efeitos negativos nos parâmetros de trocas gasosas nas condições de estresse (Fig. 2). Tal resultado está em consonância com outros trabalhos que estudaram situações de limitação hídrica, realizados com diferentes espécies, como cambre (BATISTA *et al.*, 2018), arroz, (FAROOQ *et al.*, 2009a), mostarda (SAHAY *et al.*, 2020) e cardo Mariano (ZANGANI *et al.*, 2018), por exemplo.

O aumento da taxa de assimilação de CO₂ promovido pelo óxido nítrico está ligado, dentre outros, por um incremento na atividade da enzima RuBisCO e com o movimento dos estômatos, portanto, com a manutenção do carbono intercelular e o aumento na disponibilidade de substrato para a carboxilação (SAHAY *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2014). Esse aspecto regulatório é de extrema importância porque restrições na difusão de dióxido de carbono representam um dos principais fatores para a limitação fotossintética (FLEXAS *et al.*, 2012).

Assim sendo, uma possível razão para a manutenção da condutância estomática nas plantas aspergidas com GSNO é que se especula que o NO liberado pela S-nitrosoglutathione tem como alvo proteínas quinases que levam à inibição do fechamento estomático induzido pelo ácido abscísico (SILVEIRA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015).

Uma outra possibilidade é que a suplementação com NO pode ter restaurado os parâmetros de trocas gasosas ao incrementar a absorção de nutrientes minerais (AHMAD *et al.*, 2018). Pesquisas apontam que o óxido nítrico exógeno aumenta a disponibilidade e evita a deficiência de determinados micro nutrientes com funções importantes nos processos fotossintéticos em *Lolium perene* sob estresse por cádmio (WANG *et al.*, 2013) e cobre (DONG *et al.*, 2014), respectivamente.

4.2 POOL DE GLUTATIONA

Em relação à parte aérea não houve diferença para os níveis de GSH entre os tratamentos. Também, a imposição do DH promoveu um incremento nos teores de GSSG no híbrido DKB e no BRS onde foi feita a pulverização com 100 μM de S-nitrosoglutathione. Além disso, o estresse hídrico diminuiu o *pool* GSH/GSSG nas folhas de ambos os híbridos, mas a aplicação de GSNO na concentração de 50 μM elevou o parâmetro no BRS (Fig. 3).

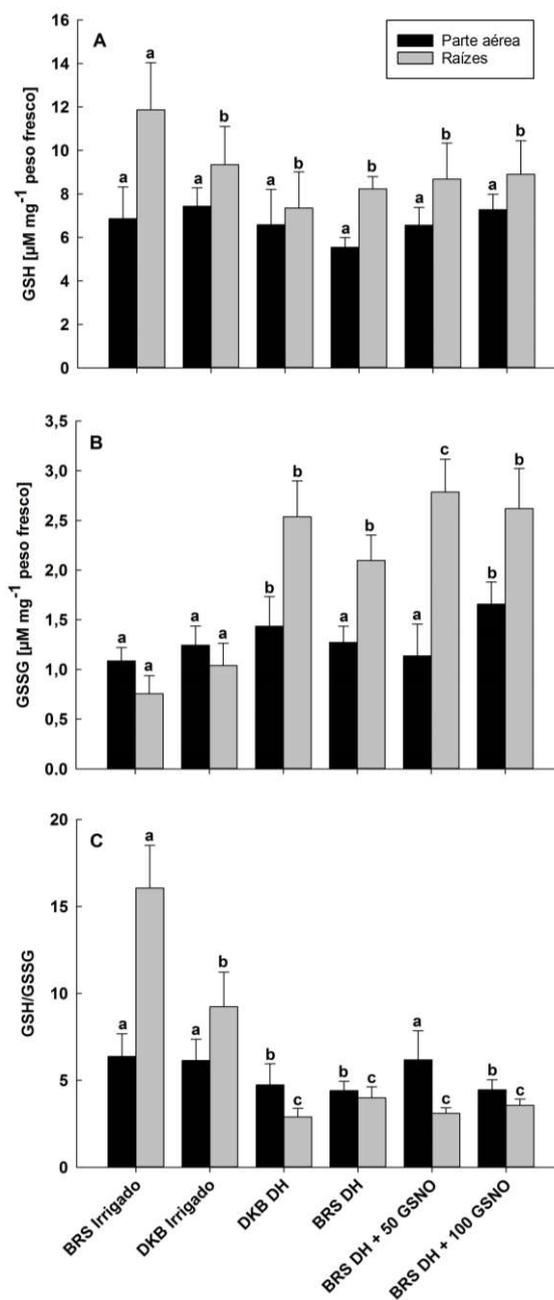
Já nas raízes, o estresse hídrico reduziu a GSH no híbrido sensível, mas sem efeitos para o DKB, que apresentou resultados estatisticamente equivalentes aos dos outros tratamentos; em relação a glutathione oxidada, houve um aumento de sua concentração nos tratamentos onde foi imposto o estresse hídrico, independente da aplicação ou não da GSNO; Contudo, a relação GSH/GSSG se mostrou superior nos tratamentos onde as plantas foram mantidas bem hidratadas, com destaque para o BRS em relação a todos os demais (Fig. 3).

Resultados semelhantes foram encontrados em mudas de trigo sob seca por Hasanuzzaman *et al.* (2018); os autores sugerem que o estresse desencadeia a oxidação de GSH no processo de eliminação das espécies reativas de oxigênio, por isso diminuindo as concentrações dessa e aumentando as de GSSG. Além disso, indica-se que a GSSG aumenta porque esse tipo de situação possivelmente promove a atividade da DHAR, GPX e de GST (FOYER; NOCTOR, 2011; HASANUZZAMAN *et al.*, 2017).

Outro ponto é que a atividade da glutathione reductase, enzima presente principalmente nos cloroplastos e que reduz glutathione dissulfeto a GSH também é afetada pelo DH (BIDABADI; VANDERWEIDE; SABBATINI, 2020; HASANUZZAMAN *et al.*, 2018). Todos esses processos, portanto, afetam igualmente a razão GSH/GSSG, que decresce, e isso pode ser devido tanto à remoção de EROs na forma de conjugados de glutathione ou à degradação de GSH (SZALAI *et al.*, 2009).

Contudo, neste trabalho, o uso do NO exógeno nas plantas estressadas, sobretudo nas folhas, acarretou na conservação desses parâmetros. Nesse sentido, demonstra-se que a molécula modula os componentes antioxidantes, como a glutathione, a fim de eliminar as espécies reativas de oxigênio e manter o metabolismo ótimo (AHMAD *et al.*, 2010).

Figura 3 - Concentrações de glutatona reduzida (GSH) (3A), glutatona oxidada (GSSG) (3B), e *pool* GSH/GSSG (3C). As barras indicam o valor médio (n=5), e os respectivos desvios-padrões dos resultados em plantas de milho bem hidratadas (mantidas a 70% da capacidade de campo – DKB Irrigado e BRS Irrigado), submetidas à estresse hídrico (mantidas a 50% da capacidade de campo – DKB DH e BRS DH), e submetidas à seca + aspergidas com diferentes concentrações (expressas em μM) de S-nitrosoglutatona (GNSO) (BRS DH + 50 ou 100 GSNO). Letras iguais apontam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.



Fonte: do autor.

Assim, denotam-se que os efeitos do óxido nítrico no *pool* de glutatona em situações de estresse hídrico possam estar ligados a um possível aumento na atividade da GR, ou seja, da manutenção dos teores de GSH, redução dos de

GSSG e, conseqüentemente, do par GSH/GSSG (HASANUZZAMAN *et al.*, 2018). De acordo, explica-se que os níveis de glutathiona reduzida nas organelas celulares são mantidos principalmente pela atividade da glutathiona redutase, e que em plântulas de colza (*Brassica napus* cv. BINA Sarisha 3) sob seca, o NO exógeno também elevou o parâmetro (HASANUZZAMAN *et al.*, 2017).

Além disso, já foi demonstrado que o óxido nítrico, em situação de estresse e através da GSNO, atua regulando positivamente a biossíntese de GSH e a proporção GSH/GSSG por meio de um feedback positivo na enzima γ -glutamil-cisteína-sintetase (γ -ECS), que catalisa a primeira reação para a geração de GSH (KOVACS; DURNER; LINDERMAYR, 2015).

Esse aspecto regulatório, no presente trabalho visualizado nos tecidos foliares das plantas de milho sob seca aspergidas com GSNO, é de suma relevância porque aponta a relevância do estado redox da GSH como um mecanismo que reflete a gravidade das condições de estresse (POTTERS; HOREMANS; JANSEN, 2010). Portanto, dado sua importância, o estado redox da glutathiona (GSH/GSSG) foi proposto como um biomarcador para o estado de oxirredução celular (KRANNER *et al.*, 2006). Como afinal enfatizam Sharma *et al.* (2012), o balanço entre a GSH e a sua forma dissulfeto é um componente central na manutenção do equilíbrio redox da célula.

Nesse sentido, inúmeros estudos em diversas espécies indicam que uma alta proporção GSH/GSSG, mantida pelo aumento da síntese de GSH e ou da diminuição de GSSG, pode ser necessária para a proteção eficiente de plantas contra o acúmulo de EROs induzido por estresse abiótico (SZALAI *et al.*, 2009). Os mesmos autores discorrem ainda que o estado redox de GSH/GSSG se difere nos vários órgãos, tecidos, células e compartimentos, mudando durante o crescimento e desenvolvimento das plantas.

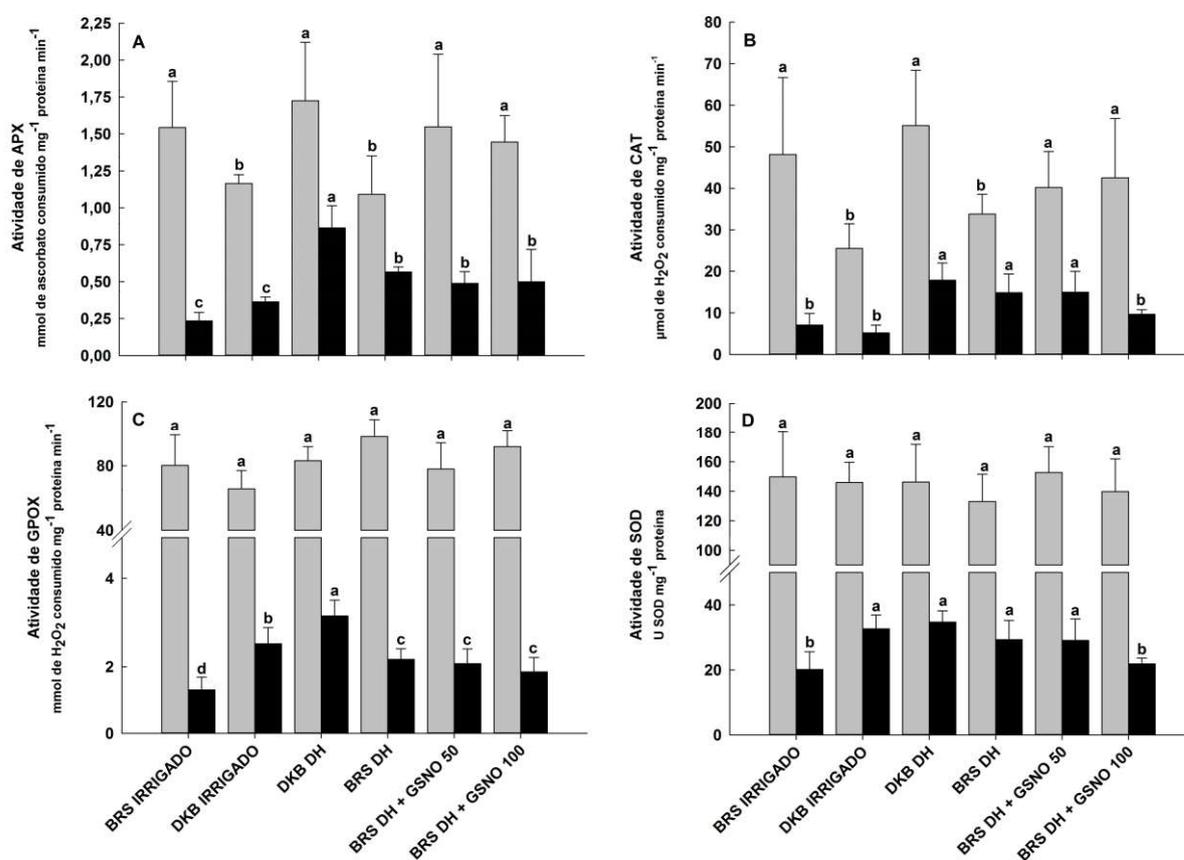
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

Nas raízes, não houveram diferenças entre os tratamentos para a GPOX e SOD; entretanto, a imposição do DH aumentou a atividade da APX e SOD no híbrido tolerante e diminuiu no sensível. Nos tratamentos onde houve a pulverização com GSNO, para essas mesmas duas últimas enzimas, ocorreu um incremento em relação ao BRS DH, com resultados estatisticamente iguais aos das plantas

mantidas hidratadas.

Já nas folhas, o estresse hídrico elevou a atividade de todas as enzimas antioxidantes analisadas quando comparadas aos respectivos tratamentos mantidos com 70% da CC, tanto no híbrido sensível quanto no tolerante, exceto da SOD do DKB. O tratamento BRS DH + GSNO 50 μM apresentou resultados estatisticamente iguais aos do BRS DH e também maiores em comparação ao BRS Irrigado, enquanto os daquele onde utilizou-se a S-nitrosoglutationa a 100 μM foram menores para SOD e CAT.

Figura 4 - Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) (4A), catalase (CAT) (4B), guaiacol peroxidase (GPOX) (4C) e superóxido dismutase (SOD) (4D). As barras representam o valor médio ($n=5$), e os respectivos desvios-padrões dos resultados em plantas bem hidratadas (mantidas a 70% da capacidade de campo – DKB Irrigado e BRS Irrigado), submetidas à estresse hídrico (mantidas a 50% da capacidade de campo – DKB DH e BRS DH), e submetidas à seca + aspergidas com diferentes concentrações (expressas em μM) de S-nitrosoglutationa (GSNO) (BRS DH + 50 ou 100 GSNO). Letras iguais apontam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.



Fonte: do autor.

Explica-se que em resposta a estresses ambientais, como o hídrico, uma das

estratégias das plantas para reduzir os efeitos deletérios das EROs é aumentar e intensificar os mecanismos antioxidantes enzimáticos (SAMARAH, 2016). Nesse sentido, menciona-se que ocorre a ativação da expressão de vários genes envolvidos nesses processos de defesa (SONI *et al.*, 2015), incluindo daqueles envolvidos na biossíntese das enzimas aqui analisadas (HARB; AWAD; SAMARAH, 2015; LIU *et al.*, 2020).

Contudo, os níveis de resposta dependem de vários fatores, como por exemplo a espécie envolvida, o estado metabólico da planta e a intensidade e duração do estresse (AHMAD *et al.*, 2014). Por isso, nessa perspectiva, enquanto em determinadas plantas o DH aumenta a atividade enzimática antioxidante, em folhas e ou raízes (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014; FARAJI; SEPEHRI, 2020; IRANI; VALIZADEHKAJI; NAEINI, 2021), e em outras ele não apresenta efeito algum ou ainda diminui seus valores (HAMURCU *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2017).

Propõe-se que o desenvolvimento da tolerância à seca das plantas está relacionado com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Nesta pesquisa, a modulação positiva da ascorbato peroxidase e catalase nas raízes do híbrido sensível destaca os resultados da aplicação exógena de GSNO via pulverização foliar, e demonstra seu potencial efeito de sinalização sob condições de seca. Sendo assim, uma das hipóteses para essa resposta é atribuída à regulação positiva dos genes codificadores dessas enzimas antioxidantes promovida pelo NO em condições de estresse abiótico (AHMAD *et al.*, 2016).

Resultados que corroboram com esse aspecto foram encontrados em cana-de-açúcar; nas raízes, a aplicação exógena de S-nitrosoglutathione elevou a atividade da CAT no tratamento com a doadora de NO em relação ao controle sob estresse hídrico, mas sem efeitos para a APX (que decresce), e SOD (que aumenta), comparando com as plantas mantidas bem hidratadas (SILVEIRA *et al.*, 2017).

Diferente do encontrado aqui, em folhas de mudas de trigo sob estresse hídrico, a aplicação de óxido nítrico aumentou a atividade da SOD, CAT e APX em comparação ao controle sob déficit hídrico (FARAJI; SEPEHRI, 2020). Em tomateiro, um comportamento semelhante foi encontrado, mas os efeitos foram, de modo geral, dependentes da concentração utilizada do doador (ELKELISH *et al.*, 2021). Em híbridos contrastantes a seca de melancia, contrariamente, não houveram diferenças em parte aérea para a atividade da SOD e CAT, comparando os

tratamentos com a testemunha estressada (em nenhum deles), e nem da APX no híbrido sensível e da GPOX no tolerante (HAMURCU *et al.*, 2020).

Como é possível notar, o uso do óxido nítrico exógeno em condições de estresse abióticos pode ter efeitos variados na atividade enzimática antioxidante das plantas, que se diferenciam de acordo com genótipo utilizado, o tipo de enzima e de estresse ambiental (HAMURCU *et al.*, 2020).

4.4 CONTEÚDO DE AMIDO, DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E REDUTORES TOTAIS

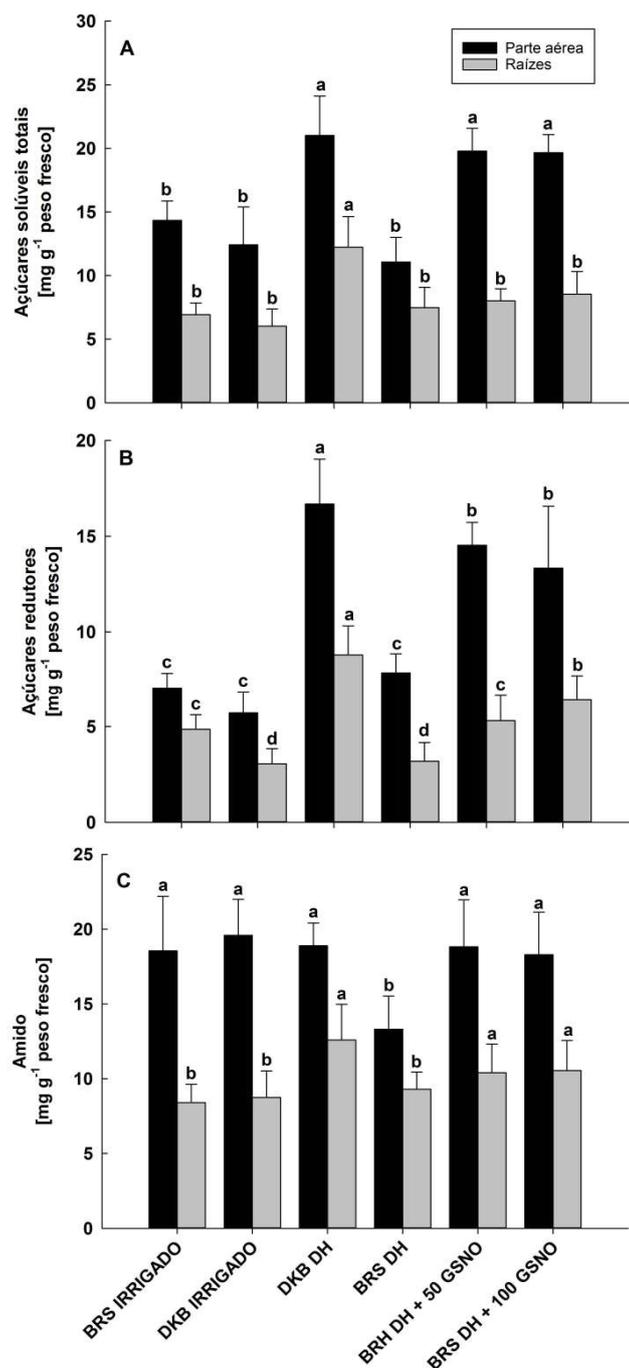
A imposição do déficit hídrico promoveu um aumento dos ASTs, tanto em raízes quanto em parte aérea no híbrido tolerante, mas sem impactos no híbrido sensível. A pulverização com GSNO, de qualquer forma, elevou os ASTs na parte aérea do BRS 1030 em referência à testemunha (Fig. 5A).

De forma semelhante, é possível notar que o regime de limitação de água aumentou os valores dos ARTs no DKB, mas diminui nas raízes do híbrido sensível. Nessa perspectiva, a S-nitrosoglutationa promoveu a manutenção das concentrações de ARTs em relação ao controle mantido sob seca (Fig. 5B).

Sobre o amido, vê-se que a seca reduziu seus valores nas folhas do híbrido sensível, mas aumentou nas raízes do tolerante, sobre os respectivos controles bem hidratados. As aplicações com a molécula doadora de NO, tanto em parte aérea quanto raiz, elevaram esse parâmetro em relação ao tratamento BRS DH (Fig. 5B).

A exposição à limitação hídrica resulta na remoção de água do citoplasma, ou seja, causa a desidratação celular, diminuindo os volumes do citosol e vacúolo (VAN OOSTEN *et al.*, 2016). Assim, as plantas desencadeiam mecanismos para resistir a tal situação, incluindo o ajuste osmótico; para regular esse comportamento, determinadas vias de sinalização, como a dos açúcares solúveis, são envolvidas, intermediando a expressão de genes relacionados à resposta à falta de água (SAMARAH, 2016).

Figura 5 – Conteúdo de açúcares solúveis totais (ASTs - A), açúcares redutores totais (ARTs - B), e amido (C). As barras indicam o valor médio (n=5), e os respectivos desvios-padrões dos resultados em plantas de milho bem hidratadas (mantidas a 70% da capacidade de campo – DKB Irrigado e BRS Irrigado), submetidas à estresse hídrico (mantidas a 50% da capacidade de campo – DKB DH e BRS DH), e submetidas à seca + aspergidas com diferentes concentrações (expressas em μM) de S-nitrosoglutationa (GNSO) (BRS DH + 50 ou 100 GSNO). Letras iguais apontam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.



Fonte: do autor.

Tendo em vista o metabolismo de carboidratos, relata-se que plantas sob tais

condições elevam os níveis de determinados carboidratos solúveis em água e polióis, buscando se ajustar osmoticamente para minimizar a perda de pressão de turgor na célula (MATA *et al.*, 2016; SONI *et al.*, 2015).

O acúmulo líquido de metabólitos osmoprotetores reduz o potencial osmótico na célula e, conseqüentemente, seu potencial hídrico, e aumenta a turgescência, ao mesmo tempo em que conserva o aparato celular dos efeitos da desidratação, protegendo a membrana ao interagir com complexos proteicos e enzimas, combatendo o estresse oxidativo através da eliminação das EROs e reestabelecendo a homeostase, mas sem interferir em outros sistemas do metabolismo (KOSOVÁ *et al.*, 2016; MATA *et al.*, 2016; VAN OOSTEN *et al.*, 2016).

Além disso, os solutos compatíveis podem ter um papel regulatório de sinalização do estresse, afetando e promovendo outras respostas relacionadas (KOSOVÁ *et al.*, 2016). Os mesmos autores destacam ainda que em plantas como a de milho esse é um aspecto bastante importante, uma vez que os açúcares são os principais osmólitos que se concentram nos espaços celulares dos cereais durante a seca.

Neste estudo, a resposta do híbrido DKB - de acúmulo de açúcares e amido -, corrobora com o aspecto de relação entre esse tipo de comportamento com uma maior tolerância ao estresse hídrico, que também já foi estabelecida em amendoim (PADMAVATHI; RAO, 2013), e trigo (GUPTA; THIND; BAINS, 2014).

Ademais, menciona-se que a biossíntese e acúmulo de osmólitos são processos promissores, e reconhecidos como de importância fundamental, no que diz respeito à adaptação das plantas a diferentes estresses ambientais (PARREIRA *et al.*, 2016; VAN OOSTEN *et al.*, 2016). No presente trabalho, o aumento dos teores de açúcares mediado pelo óxido nítrico exógeno ressalta os efeitos positivos da molécula na diminuição dos danos da seca em plantas de milho.

Nesse sentido, o priming de sementes em trigo (HAMEED *et al.*, 2021), e a pulverização foliar com nitroprussiato de sódio em tomateiro (ELKELISH *et al.*, 2021), sob deficit hídrico também promoveram o aumento dos teores de ASTs em relação ao tratamento controle nas folhas de ambas as espécies, colaborando com os resultados aqui encontrados. Os primeiros autores pontuam que essa reação provavelmente esteja ligada a um aumento verificado na atividade da enzima α -amilase promovido pelo NO exógeno - que ainda elevou também os ARTs -, enquanto os segundos sugerem uma relação com o incremento na fotossíntese

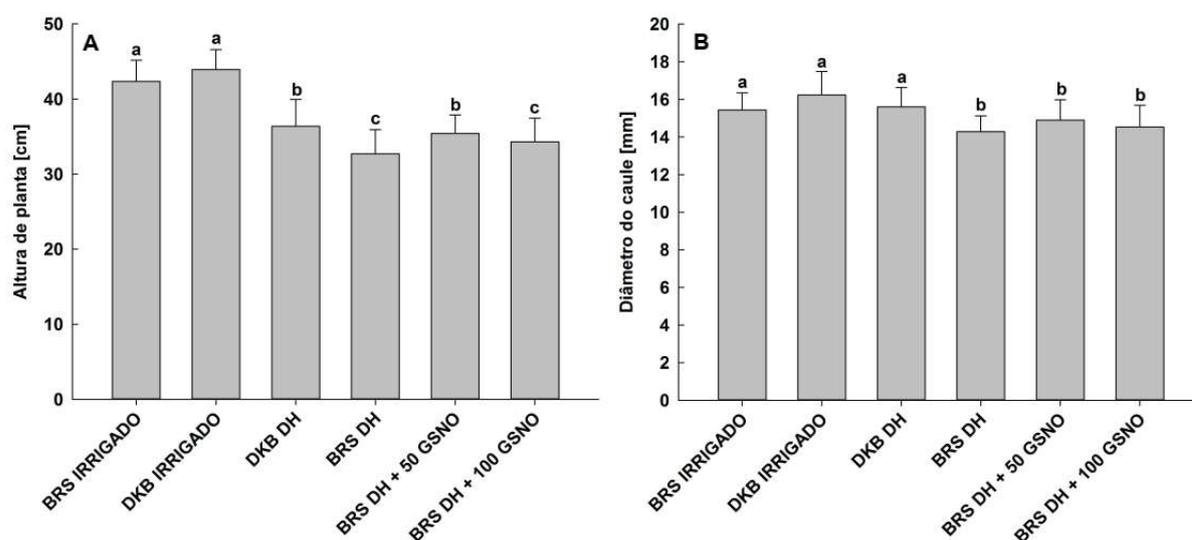
proporcionado pelo óxido nítrico.

Como no presente trabalho as concentrações de amido não foram reduzidas, possivelmente o resultado apresentado pelas plantas de milho esteja mais ligado com essa segunda hipótese. E ainda nessa perspectiva, o aumento promovido pelo óxido nítrico desse metabólito em situações de estresse abiótico é relatado em alfafa (ZHAO *et al.*, 2020), mas uma queda é apresentada em *Tagetes erecta* L. (LIAO *et al.*, 2012). Essa resposta pode estar atrelada à regulação de determinados genes envolvidos no metabolismo dos carboidratos, que levam ao acúmulo de amido em plantas sob tais condições (ZHAO *et al.*, 2020).

4.5 ALTURA DE PLANTA E DIÂMETRO DO CAULE

A seca reduziu a altura das plantas nos dois híbridos. A pulverização com GSNO na menor concentração, entretanto, elevou esse parâmetro quando comparado com a testemunha sob deficit (Fig. 6A). Em relação ao diâmetro do caule, houve redução no híbrido sensível, independentemente da aplicação ou não de S-nitrosoglutaciona (Fig. 6B).

Figura 6 – Altura de planta (A), e diâmetro do caule (B). As barras indicam o valor médio (n=5), e os respectivos desvios-padrões dos resultados em plantas de milho bem hidratadas (mantidas a 70% da capacidade de campo – DKB Irrigado e BRS Irrigado), submetidas à estresse hídrico (mantidas a 50% da capacidade de campo – DKB DH e BRS DH), e submetidas à seca + aspergidas com diferentes concentrações (expressas em μM) de S-nitrosoglutaciona (GSNO) (BRS DH + 50 ou 100 GSNO). Letras iguais apontam que os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,05 de significância.



Fonte: do autor.

A restrição hídrica no estágio vegetativo impacta diretamente na altura da planta de milho (SODERLUND; OWENS; FAGAN, 2014). Assim, a manutenção promovida pela GSNO dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos aqui analisados provavelmente contribuiu para elevar esse aspecto.

Finalizando, é importante relatar aqui que os efeitos e as respostas fisiológicas promovidas pelo NO exógeno são dependentes da concentração utilizada (MISRA *et al.*, 2014; SANTISREE; BHATNAGAR-MATHUR; SHARMA, 2015), bem como da espécie vegetal (SHAO *et al.*, 2018). No contexto desta pesquisa, a aplicação de 50 μM apresentou melhores desempenhos, fisiológico e bioquimicamente, enquanto que o uso de 100 μM de GSNO expressou um efeito inibitório. Nesse sentido, em concentrações mais altas, o NO pode ferir proteínas, membranas e ácidos nucleicos e resultar em rápida diminuição de diversos processos metabólicos (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011).

5 CONCLUSÕES

A pulverização com GSNO, majoritariamente na concentração de 50 μM , suscitou a manutenção dos parâmetros de trocas gasosas, bem como também das concentrações de glutathiona reduzida, oxidada e da razão GSH/GSSG, os teores de amido, açúcares solúveis e redutores totais, e a atividade de APX e CAT nos tecidos radiculares, assim, promovendo o aumento a tolerância ao estresse hídrico no híbrido sensível.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, P. *et al.* Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 161–175, 2010.
- AHMAD, P. *et al.* Drought stress induced oxidative damage and antioxidants in plants. *In*: AHMAD P. (Org.). **Oxidative damage to plants**. Elsevier, 2014. p. 345–367.
- AHMAD, P. *et al.* Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–11, Mar. 2016.
- AHMAD, P. *et al.* Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato. **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 79–93, 2018.
- AHMED, S. M. Impacts of drought, food security policy and climate change on performance of irrigation schemes in Sub-saharan Africa: The case of Sudan. **Agricultural Water Management**, v. 232, p. 106064, Sept. 2020.
- AJITHKUMAR, I. P.; PANNEERSELVAM, R. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* Roth. under drought stress. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 587–595, 2014.
- AN, Z. F. *et al.* Role of polyamines and phospholipase D in maize (*Zea mays* L.) response to drought stress. **South African Journal of Botany**, v. 83, p. 145–150, Nov. 2012.
- AN, Z. F. *et al.* Production of nitric oxide and phosphatidic acid is involved in activation of plasma membrane h⁺-atpase in maize root tips in simulated drought stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 66, n. 1, p. 50–58, 2019.
- ANJUM, S. A. *et al.* Morphological , physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011a.
- ANJUM, S. A. *et al.* Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 3, p. 177–185, 2011b.
- ARAVIND, P.; PRASAD, M. N. V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 107–116, Feb. 2005.
- BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 311, 2006.

BALESTRINI, R. *et al.* Improvement of plant performance under water deficit with the employment of biological and chemical priming agents. **Journal of Agricultural Science**, v. 156, n. 5, p. 680–688, 2018.

BALI, S. *et al.* Jasmonic acid application triggers detoxification of lead (Pb) toxicity in tomato through the modifications of secondary metabolites and gene expression. **Chemosphere**, v. 235, p. 734–748, Nov. 2019.

BÄNZIGER, M.; ARAUS, J. L. Recent advances in breeding maize for drought and salinity stress tolerance. **Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops**, n. 1999, p. 587–601, 2007.

BARKER, T. *et al.* Improving drought tolerance in maize. *In*: JANICK, J. (Org.). **Plant breeding reviews**. Oxford: John Wiley, 2010, p. 173–253, v. 25.

BARNABÁS, B.; JÄGER, K.; FEHÉR, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, n. 1, p. 11–38, 2008.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 1, p. 23–58, Feb. 2005.

BASAL, O.; SZABÓ, A.; VERES, S. PEG-induced drought stress effects on soybean germination parameters. **Journal of Plant Nutrition**, v. 43, n. 12, p. 1768–1779, 2020.

BASSETTI, P.; WESTGATE, M. E. Water deficit affects receptivity of maize silks. **Crop Science**, v. 33, n. 2, p. 279, 1993.

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, 2014.

BATISTA, P. F. *et al.* Nitric oxide mitigates the effect of water deficit in *Crambe abyssinica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 129, p. 310–322, May 2018.

BIDABADI, S. S.; VANDERWEIDE, J.; SABBATINI, P. Exogenous melatonin improves glutathione content, redox state and increases essential oil production in two *Salvia* species under drought stress. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**, v. 162, n. 3, p. 671–681, June 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, May 1976.

BRUCE, W. B.; EDMEADES, G. O.; BARKER, T. C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 13–25, 2002.

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, June 2004.

CARTER, G. A.; KNAPP, A. K. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 677–684, 2001.

CASSIA, R. *et al.* Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO₂ and NO, friends and foes of plant oxidative stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–11, Mar. 2018.

CHATTOPADHYAY, S. Interplay among glutathione, salicylic acid, and ethylene to combat environmental stress. *In*: HOSSAIN, M., A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 145–161, v. 1.

CHAVES, M. M. *et al.* How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907–916, 2002.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 3, p. 239–264, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (BRASIL). **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/35818f9638f460b06b8d623d8963949bb1aa0>. Acesso em: 25 mar. 2021.

COONEY, R. V. *et al.* Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 5, p. 460–462, May 1994.

CORPAS, F. J. *et al.* Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. **Plant Stress**, v. 1, n. 1, p. 37–41, 2007.

CORPAS, F. J. *et al.* Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 604–611, 2011.

CORPAS, F. J.; GUPTA, D. K.; PALMA, J. M. Production sites of reactive oxygen species (ros) in organelles from plant cells. *In*: GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (Orgs.). **Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress**. Cham: Springer International, 2015. p. 1–22.

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

DE MICCO, V.; ARONNE, G. Morpho-anatomical traits for plant adaptation to drought. *In: AROCA, R. (Org.). Plant responses to drought stress*. Berlin: Springer, 2012. p. 37–61.

DOMINGOS, P. *et al.* Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p. 506–520, 2015.

DONG, Y. *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 402–411, 2014.

EARL, H. J.; DAVIS, R. F. Effect of drought stress on leaf and whole canopy radiation use efficiency and yield of maize. **Agronomy Journal**, v. 95, n. 3, p. 688–696, 2003.

ELKELISH, A. *et al.* Exogenous application of nitric oxide mitigates water stress and reduces natural viral disease incidence of tomato plants subjected to deficit irrigation. **Agronomy**, v. 11, n. 1, p. 87, 5 Jan. 2021.

FARAJI, J.; SEPEHRI, A. Exogenous nitric oxide improves the protective effects of tio₂ nanoparticles on growth, antioxidant system, and photosynthetic performance of wheat seedlings under drought stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 703–714, 2020.

FAROOQ, M. *et al.* Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, n. 4, p. 254–261, 2009a.

FAROOQ, M. *et al.* Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, n. 1, p. 185–212, Mar.. 2009b.

FAROOQ, M. *et al.* Drought stress in plants: an overview. *In: AROCA, R. (Org.). Plant responses to drought stress*. Berlin: Springer, 2012. p. 1–33.

FAROOQ, M. *et al.* Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 461–481, 2015.

FARRÉ, I.; FACI, J. M. Comparative response of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) to deficit irrigation in a Mediterranean environment. **Agricultural Water Management**, v. 83, n. 1–2, p. 135–143, 2006.

FELLER, U.; VASEVA, I. I. Extreme climatic events: Impacts of drought and high temperature on physiological processes in agronomically important plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1–17, Oct. 2014.

FLEXAS, J. *et al.* The response of photosynthesis to soil water stress. *In: AROCA, R. (Org.). Plant responses to drought stress*. Berlin: Springer, 2012. p. 129–144.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 2–18, 2011.

GALVÃO, J. C. C. *et al.* Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819–828, 2014.

GARCÍA-LARA, S.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Corn history and culture. **Corn**, p. 1–18, 2019.

GARCÍA-LIMONES, C. *et al.* Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. **Plant Biology**, v. 11, n. 2, p. 194–203, Mar. 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.

GOODGER, J. Q. D.; SCHACHTMAN, D. P. Distance signal produced by water-stressed roots. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 10, p. 1298–1301, 2010.

GUPTA, N.; THIND, S. K.; BAINS, N. S. Glycine betaine application modifies biochemical attributes of osmotic adjustment in drought stressed wheat. **Plant Growth Regulation**, v. 72, n. 3, p. 221–228, 2014.

HAMEED, A. *et al.* Sodium nitroprusside mediated priming memory invokes water-deficit stress acclimation in wheat plants through physio-biochemical alterations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 160, p. 329–340, Mar. 2021.

HAMURCU, M. *et al.* Nitric oxide regulates watermelon (*Citrullus lanatus*) responses to drought stress. **3 Biotech**, p. 1–14, 2020.

HAO, G. *et al.* Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, n. 2, p. 175–185, 2009.

HARB, A.; AWAD, D.; SAMARAH, N. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. **Journal of Plant Interactions**, v. 10, n. 1, p. 109–116, 2015.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Nitric oxide pretreatment enhances antioxidant defense and glyoxalase systems to confer peg-induced oxidative stress in rapeseed. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 323–331, 2017.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Exogenous nitric oxide donor and arginine provide protection against short-term drought stress in wheat seedlings. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 6, p. 993–1004, 2018.

HERNÁNDEZ, I. *et al.* Antioxidant defenses against drought stress. *In*: AROCA, R. (Org.). **Plant responses to drought stress**. Berlin: Springer, 2012. p. 231–258.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, July. 1976.

IRANI, H.; VALIZADEHKAJI, B.; NAEINI, M. R. Biostimulant-induced drought tolerance in grapevine is associated with physiological and biochemical changes. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2021.

IWUALA, E. *et al.* Drought stress modulates expression of aquaporin gene and photosynthetic efficiency in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. genotypes. **Current Plant Biology**, v. 21, p. 100131, Sept. 2020.

KAMARA, A. Y. *et al.* The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. **Journal of Agricultural Science**, v. 141, n. 1, p. 43–50, 2003.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOSOVÁ, K. *et al.* Drought stress response in common wheat, durum wheat, and barley: transcriptomics, proteomics, metabolomics, physiology, and breeding for an enhanced drought tolerance. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 277–314, v. 2.

KOVACS, I.; DURNER, J.; LINDERMAYR, C. Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 208, n. 3, p. 860–872, 2015.

KOYRO, H.; HUCHZERMEYER, B.; ZÖRB, C. Effects of hyperosmotic salinity on protein patterns and enzyme activities. *In*: PESSARAKLI, M. (Org.). **Handbook of plant and crop physiology**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

KRANNER, I. *et al.* Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 12, p. 2155–2165, June 2006.

LAMATTINA, L. *et al.* Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 109–136, 2003.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000.

LIAO, W.-B. *et al.* Nitric oxide and hydrogen peroxide alleviate drought stress in *Marigold* explants and promote its adventitious root development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 58, p. 6–15, 2012.

LIU, G. *et al.* Comparative transcriptomic and physiological analyses of contrasting hybrid cultivars ND476 and ZX978 identify important differentially expressed genes and pathways regulating drought stress tolerance in maize. **Genes and Genomics**, v. 42, n. 8, p. 937–955, 2020.

LOBELL, D. B. *et al.* Nonlinear heat effects on African maize as evidenced by historical yield trials. **Nature Climate Change**, v. 1, n. 1, p. 42–45, 13 abr. 2011.

MAGALHÃES, P. C. *et al.* **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2002. Circular Técnica n° 22.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–158, 2005.

MAJEED, S. *et al.* Effect of exogenous nitric oxide on sulfur and nitrate assimilation pathway enzymes in maize (*Zea mays* L.) under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 12, p. 1–14, 2018.

MATA, A. T. *et al.* Drought stress tolerance in plants: insights from metabolomics. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 187–216, v. 2.

MATA, C. G.; LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1196–1204, 2001.

MATTOO, A. K.; UPADHYAY, R. K.; RUDRABHATLA, S. Abiotic stress in crops: candidate genes, osmolytes, polyamines, and biotechnological intervention. *In*: PANDEY, G. K. (Org.). **Elucidation of abiotic stress signaling in plants**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 415–437.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MISRA, A. N. *et al.* Action and target sites of nitric oxide in chloroplasts. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 35–45, 2014.

MUIMBA-KANKOLONGO, A. Cereal Production. *In*: MUIMBA-KANKOLONGO, A. (Org.). **Food crop production by smallholder farmers in Southern Africa**. London: Elsevier, 2018. p. 73–121.

NEILL, S. *et al.* Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 165–176, 2008.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytologist**, v. 159, n. 1, p. 11–35, 2003.

NEMESKÉRI, E.; HELYES, L. Physiological responses of selected vegetable crop species to water stress. **Agronomy**, v. 9, n. 8, p. 1-19, 2019.

PADMAVATHI, T. A. V.; RAO, D. M. Differential accumulation of osmolytes in 4 cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought stress. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 151–159, 2013.

PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. 3. ed. San Diego: Academic, 2008.

PARREIRA, J. R. *et al.* Systems biology approaches to improve drought stress tolerance in plants: state of the art and future challenges. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 433–471, v. 2.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004.

POTTERS, G.; HOREMANS, N.; JANSEN, M. A. K. The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 292–300, 2010.

RIBAUT, J. *et al.* **Handbook of Maize: Its Biology**. New York: Springer New York, 2009.

RICHARDSON, A. D.; DUGAN, S. P.; BERLYN, G. P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. **New Phytologist**, v. 153, n. 1, p. 185–194, 2002.

RIGUI, A. P. *et al.* Fructan and antioxidant metabolisms in plants of *Lolium perenne* under drought are modulated by exogenous nitric oxide. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 145, p. 205–215, July 2019.

ROUPHAEL, Y. *et al.* Chapter 7: Effects of drought on nutrient uptake and assimilation in vegetable crops. *In*: AROCA, R. (Org.). **Plant responses to drought stress: from morphological to molecular features**. Berlin: Springer, 2012.

RUBBO, H.; BATTHYANY, C.; RADI, R. Nitric oxide: oxygen radical interactions in atherosclerosis. **Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 167–175, 2000.

SADEGHIPOUR, O. Pretreatment with nitric oxide reduces lead toxicity in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Archives of Biological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 165–175, 2016.

SAHAY, S. *et al.* Photosynthetic activity and RAPD profile of polyethylene glycol treated *B. juncea* L. under nitric oxide and abscisic acid application. **Journal of Biotechnology**, v. 313, p. 29–38, Mar. 2020.

SAMARAH, N. H. Understanding how plants respond to drought stress at the molecular and whole plant levels. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 1–37.

SANTISREE, P.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: do we have all the answers? **Plant Science**, v. 239, p. 44–55, 2015.

SCHARWIES, J. D.; DINNENY, J. R. Water transport, perception, and response in plants. **Journal of Plant Research**, v. 132, n. 3, p. 311–324, 2019.

SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M. Improving Salinity Tolerance in Cereals. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 4, p. 237–249, 2013.

SHAO, R. *et al.* Proteomics analysis reveals that nitric oxide regulates photosynthesis of maize seedlings under water deficiency. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 81, p. 46–56, Sept. 2018.

SHAPIRO, A. D. Nitric oxide signaling in plants. **Vitamins and Hormones**, v. 72, n. 05, p. 339–398, 2005.

SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, Apr. 2012.

SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; BASALAH, M. O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. **Protoplasma**, v. 248, n. 3, p. 447–455, 2011.

SILVEIRA, N. M. *et al.* Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v. 244, n. 1, p. 181–190, 2016.

SILVEIRA, N. M. *et al.* S-nitrosoglutathione spraying improves stomatal conductance, Rubisco activity and antioxidant defense in both leaves and roots of sugarcane plants under water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 160, n. 4, p. 383–395, 2017.

SILVEIRA, N. M. *et al.* Germination and initial growth of common bean plants under water deficit as affected by seed treatment with S-nitrosoglutathione and calcium chloride. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 32, n. 1, p. 49–62, 2020.

SIMONTACCHI, M. *et al.* Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–19, Nov. 2015.

SINCLAIR, T. R.; MUCHOW, R. C. System analysis of plant traits to increase grain yield on limited water supplies. **Agronomy Journal**, v. 93, n. 2, p. 263–270, Mar. 2001.

SODERLUND, S.; OWENS, F. N.; FAGAN, C. Development of and field experience with drought-tolerant maize. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 7, p. 2823–2831, 2014.

SONI, P. *et al.* Towards understanding abiotic stress signaling in plants: convergence of genomic, transcriptomic, proteomic, and metabolomic approaches. *In*: PANDEY, G. K. (Org.). **Elucidation of abiotic stress signaling in plants**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 3–40.

SOUZA, T. *et al.* The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 515–527, 15 Feb. 2013a.

SOUZA, T. C. *et al.* Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3201–3211, Nov. 2013b.

SRIVASTAVA, A. K.; SUPRASANNA, P. Redox-Regulated Mechanisms: Implications for Enhancing Plant Stress Tolerance and Crop Yield. *In*: PANDEY, G. K. (Org.). **Elucidation of abiotic stress signaling in plants**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 191–205.

- SZALAI, G. *et al.* Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 1, p. 66–80, Mar. 2009.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2017.
- UPADHYAYA, C. P.; HOSSAIN, M. A. Transgenic plants for higher antioxidant content and drought stress tolerance. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 473–511, v. 2.
- VAN OOSTEN, M. J. *et al.* Genetics of drought stress tolerance in crop plants. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* (Orgs.). **Drought stress tolerance in plants**. Cham: Springer International, 2016. p. 39–70.
- WANG, P. *et al.* Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 2, p. 613–618, 2015.
- WANG, P. G. *et al.* Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1091–1134, Apr. 2002.
- WANG, Q. *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass. **Plant Growth Regulation**, v. 69, n. 1, p. 11–20, 2013.
- XIONG, J. *et al.* Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. **Journal of Plant Research**, v. 125, n. 1, p. 155–164, Jan. 2012.
- YAKHIN, O. I. *et al.* Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, Jan. 2017.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 781–803, 2006.
- YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 4, p. 128–129, Apr. 1999.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508–514, July. 1954.
- ZANGANI, E. *et al.* Protective effects of nitric oxide on photosynthetic stability and performance of *Silybum Mar.ianum* under water deficit conditions. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 2, p. 555–564, 2018.
- ZHAO, Y. *et al.* Transcriptional analysis reveals sodium nitroprusside affects alfalfa in response to PEG-induced osmotic stress at germination stage. **Protoplasma**, v. 257, n. 5, p. 1345–1358, 2020.

ZHOU, S. *et al.* Short-term water stress impacts on stomatal, mesophyll and biochemical limitations to photosynthesis differ consistently among tree species from contrasting climates. **Tree Physiology**, v. 34, n. 10, p. 1035–1046, 2014.

ZHU, J.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 5, p. 740–749, 2010.

ZHU, J. K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016.