

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**GIOVANA ESTEVES**

**POLIAMINAS NA MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE  
MILHO**

**ALFENAS/MG  
2022**

**GIOVANA ESTEVES**

**POLIAMINAS NA MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE  
MILHO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas -MG. Área de concentração: Tecnologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Breno Regis Santos

Coorientador: Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho

Colaborador: Thiago Corrêa de Souza

**ALFENAS/MG**

**2022**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Esteves, Giovana.

Poliaminas na mitigação do estresse hídrico em plantas de milho /  
Giovana Esteves. - Alfenas, MG, 2022.  
61 f. : il. -

Orientador(a): Breno Régis Santos.

Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de  
Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Fisiologia Vegetal. 2. Espermina. 3. Espermidina. 4. Regulação  
Osmótica. I. Santos, Breno Régis, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

## GIOVANA ESTEVES

## " POLIAMINAS NA MITIGAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO "

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 29 de julho de 2022.

Prof. Dr. Breno Régis Santos  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Dra. Kamila Rezende Dázio de Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Dra. Marina de Lima Nogueira  
Instituição: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz São Dimas (ESALQ)

Dr. Renan Terassi Pinto  
Instituição: Universidade Federal de Lavras (UFLA)

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva  
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS)

[https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=873898&infra\\_sistema=10000100&infra\\_unidade\\_atual=220000559&infra\\_hash=e3...](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=873898&infra_sistema=10000100&infra_unidade_atual=220000559&infra_hash=e3...) 1/2



Documento assinado eletronicamente por **Renan Terassi Pinto**, **Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 12:30, 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 **Kamila Rezende Dázio de Souza**, **Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 12:30, 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 **Marina de Lima Nogueira**, **Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 13:01, 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 **Breno Régis Santos**, **Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 13:18, 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 **ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA**, **Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 13:46, 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\\_organ\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_organ_acesso_externo=0), informando o código verificador **0781902** e o código CRC **FC9CCF54**.

*Aos meus pais, irmã,  
cunhado, namorado, todos os amigos e  
colegas que confiaram na minha  
capacidade de atingir mais um  
objetivo.*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

A cada dia levantamos para ir em busca de nossos objetivos, encontramos diversas pedras as quais devemos saber quando pular, desviar ou levá-la junto de nós, pois podem ser importantes mais à frente no caminho. Mesmo assim, o importante é não desistir da jornada.

Nesta jornada tenho muito a agradecer primeiramente à Deus, pelo dom da vida e por iluminar meu caminho me dando forças para seguir sempre em frente.

Aos meus pais pelo amor incondicional e apoio. Nada disso seria possível sem os valores que me foram impressos desde a infância para perseverar e cumprir com meus deveres e responsabilidades.

À minha irmã e meu cunhado que estão sempre dispostos a me ajudar, independente da hora ou lugar, agradeço o carinho e atenção.

Ao meu namorado pela incrível paciência, por me apoiar independentemente das minhas decisões, por todo amor e carinho, agradeço.

À minha queridíssima amiga Mariana Azevedo, são 10 anos de amizade, apoio consideração, carinho e muitas alegrias. Espero que se estenda por muitas décadas mais.

Aos colegas de laboratório, Arlinda, Guilherme, Iris, Jessica, obrigada por tornarem os dias de trabalho mais divertidos, muitas histórias, músicas e risadas.

À Ana Lúcia, uma verdadeira mãezona do laboratório, sempre disposta ajudar de toda forma possível, além de se preocupar com a saúde física e mental de cada um de nós, agradeço.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador Breno, depois de anos ainda é a melhor pessoa para se conversar principalmente quando tudo parece perdido. São de pessoas como você, que veem o melhor da vida, que precisamos ao nosso lado. Muito obrigada pelos conselhos ensinamentos e principalmente por me incentivar a continuar sempre.

Ao meu coorientador Plínio agradeço a paciência, os ensinamentos e a disposição. Uma pessoa extremamente realista e pratica, muito importante para manter o foco e tomar decisões.

Ao programa de pós-graduação PPGCA e a UNIFAL pela oportunidade. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Ao apoio da Fapemig - Código de financiamento APQ-01671-17-1. Agradeço também à Embrapa Milho e Sorgo, pesquisador Paulo César Magalhães pelo fornecimento das sementes e auxílio na interpretação dos dados.

Por fim a todos que de forma direta ou indireta ajudaram nesta caminhada meu agradecimento!

## RESUMO

Plantas são organismos sésseis capazes de se adaptar a diversas condições ambientais. Entretanto, as mudanças climáticas tais como o aumento da temperatura, distribuição irregular de chuvas, elevação do nível do mar, tem influenciado na produção de alimentos. Dentre essas mudanças a mais severa para produção é o déficit hídrico gerado pelas secas prolongadas. Sendo o milho (*Zea mays* L) um cereal que sofre grandes perdas com o déficit hídrico no Brasil e no mundo. Sua produção brasileira em 2022 atingiu 112,3 milhões de toneladas, podendo atingir quedas de até 100% devido à falta de água nas diferentes etapas de desenvolvimento. É um vegetal de importância para a alimentação de humanos e animais, além do seu apelo econômico para biocombustível. Buscando uma maneira de assegurar um bom desenvolvimento da cultura mesmo sob estresse hídrico, utilizou-se as priming de poliaminas, espermina e espermidina em sementes de milho. Foi utilizado o híbrido BRS 1030, sensível à seca. As sementes de milho foram submetidas ao priming com espermina ou espermidina, transferidas para caixas do tipo gerbox contendo areia e manitol para mimetizar o efeito de estresse hídrico (seca) e posteriormente cultivadas durante 15 dias em câmara do tipo BOD com temperatura de 30 °C e fotoperíodo de 12/12. Avaliou-se desenvolvimento da planta através de sua emergência e crescimento, parâmetros de fluorescência da clorofila a parâmetros bioquímicos como atividade enzimática, acúmulo de açúcares e influência das poliaminas na divisão celular das pontas de raiz. Com isso verificou-se que não há diferença na porcentagem de germinação, entretanto uso de poliaminas, afeta a velocidade de germinação. A espermina favorece o desenvolvimento das raízes e portando os parâmetros relacionados a ela como comprimento e volume radicular, aumento das concentrações de açúcares nas raízes. Enquanto a espermidina age principalmente na parte aérea favorecendo o desenvolvimento e protegendo o fotossistema. Ambas as poliaminas aumentam a atividade enzimática antioxidativa. Entretanto a ação das poliaminas separadamente é mais efetiva quando a planta se encontra em condições ótimas de hidratação. Conclui-se que a espermina e a espermidina usadas isoladamente, nas concentrações de 10 e 50 µM não são capazes de mitigar efetivamente os efeitos do estresse hídrico, porém é de interesse o estudo da combinação delas uma vez que agem de forma distinta no desenvolvimento vegetal.

Palavras-chave: Fisiologia Vegetal; Espermina; Espermidina; Regulação Osmótica

## ABSTRACT

Plants are sessile organisms capable of adapting to different environmental conditions. However, climate changes such as temperature increase, irregular rainfall distribution, sea level rise, have influenced food production. Among these changes, the most severe for production is the water deficit generated by prolonged droughts. Corn (*Zea mays* L) is a cereal that suffers great losses with water deficit in Brazil and in the world. Its Brazilian production in 2022 reached 112.3 million tons, and could reach drops of up to 100% due to the lack of water in the different stages of development. It is an important vegetable for feeding humans and animals, in addition to its economic appeal for biofuel. Seeking a way to ensure a good development of the culture even under water stress, the priming of polyamines, spermine and spermidine were used in corn seeds. The drought sensitive hybrid BRS 1030 was used. Corn seeds were priming with spermine or spermidine, transferred to gerbox-type boxes containing sand and mannitol to mimic the effect of water stress (drought) and then cultivated for 15 days in a BOD-type chamber at 30 °C. and photoperiod of 12/12. Plant development was evaluated through its emergence and growth, chlorophyll fluorescence parameters and biochemical parameters such as enzymatic activity, sugar accumulation and influence of polyamines on cell division at root tips. With this it was verified that there is no difference in the germination percentage, however the use of polyamines affects the germination speed. Spermine favors the development of roots and carrying parameters related to it, such as length and root volume, increases the concentrations of sugars in the roots. While spermidine acts mainly on the shoot favoring development and protecting the photosystem. Both polyamines enhance antioxidative enzyme activity. However, the action of the polyamines separately is more effective when the plant is in optimal hydration conditions. It is concluded that spermine and spermidine used alone, at concentrations of 10 and 50  $\mu$ M are not capable of effectively mitigating the effects of water stress, but the study of their combination is of interest since they act differently on plant development.

Keywords: Plant Physiology; Spermine; Spermidine; Osmotic Regulation.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.1	MILHO .....	12
2.2	DEFICIT HIDRICO .....	16
2.3	POLIAMINAS .....	18
2.4	PRIMING .....	22
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>27</b>
5.1	MATERIAL VEGETAL .....	27
5.2	ANÁLISE DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO .....	29
5.3	ANÁLISE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	29
5.4	ANÁLISE DE AÇUCARES TOTAIS E REDUTORES .....	29
5.5	ANÁLISE DE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA .....	30
5.6	ANÁLISE DE ENZIMÁTICA .....	30
5.7	ANÁLISE DE CITOGENÉTICA .....	31
5.8	ANÁLISE DOS DADOS .....	32
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Para que as plantas possam produzir de forma ideal, em quantidade e qualidade, são necessárias condições adequadas de temperatura, luminosidade e umidade. Entretanto, mediante as mudanças climáticas é esperado uma maior variabilidade das chuvas. Ou seja, eventos de seca mais frequentes e chuvas intensas, o que pode ser devastador para todo o agroecossistema (ABDALLAH; MASHAHEET; BURKEY, 2021; HUNT; CELESTINA; KIRKEGAARD, 2020; ZHIÑA *et al.*, 2019). Estudos que tem com finalidade entender os efeitos de tais mudanças climáticas vêm sendo evidenciados nos diversos países do mundo, sendo foco principal de diversas agências de pesquisa e financiamento, principalmente em países desenvolvidos.

O desafio enfrentado pelo setor agropecuário nos cenários de mudanças climáticas, é garantir alimentos em quantidade e qualidade para população mundial crescente, protegendo o meio ambiente e o funcionamento de seus ecossistemas (ROSENZWEIG *et al.*, 2007). Pesquisas demonstram que o aumento da temperatura e os padrões incertos de chuva têm impactos adversos nas fases de desenvolvimento, crescimento e rendimento das culturas, e esses impactos já são mais pronunciados em regiões áridas e semiáridas (CHATTHA *et al.*, 2021; ULLAH *et al.*, 2019; YASIN *et al.*, 2022).

A seca é considerada uma restrição abiótica primária, que afeta a produção agrícola em todo o mundo. Com o clima esperado para se tornar cada vez mais seco e mais quente em algumas regiões do globo terrestre, a situação pode ser ainda mais exacerbada à medida que a competição pela água se intensifica entre as pessoas e as culturas (RUXTON *et al.*, 2014). A mudança climática global reduzirá a produtividade das culturas mais valiosas e induzirá impacto negativo na aptidão ecológica causando perdas significativas nas grandes culturas (FERGUSON, 2019).

Dentre essas culturas podemos destacar o milho que tem sido afetado negativamente pelas mudanças climáticas e com previsões futuras de interferir ainda mais nas próximas safras (YASIN *et al.*, 2022).

Por se tratar de um grão amplamente utilizado no mundo para alimentação humana, produção de ração e de biocombustível, o milho é amplamente produzido no Brasil. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o milho alcançou a produção de 115.602,1 mil toneladas de grãos na safra de 2021/2022, ficando atrás apenas da produção de soja (CONAB, 2022). Sendo assim, a produção do milho é de extrema importância econômica e social. Mediante as eminentes mudanças climáticas que podem afetar sua produção, faz-se

necessária a busca por métodos capazes de mitigar os efeitos dos estresses abióticos como por exemplo o priming.

Com o intuito de conhecer melhores estratégias para mitigar os efeitos do déficit hídrico em plantas, tem se buscado técnicas que sejam capazes de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal sob as mais variadas circunstâncias. Entre elas destaca-se o priming, que é a hidratação das sementes em água ou solução de baixo potencial osmótico para iniciar o metabolismo germinativo sem protrusão de radícula (HASANUZZAMAN; FOTOPOULOS, 2019).

O Priming é uma técnica de hidratação controlada de sementes que assegura germinação aumentada e uniforme, reduz o tempo de embebição (BROCKLEHURST; DEARMAN, 1983), aumenta a ativação de enzimas pré-germinativas, aumenta a produção de metabólitos (HUSSAIN *et al.*, 2016), regula a osmose, induz atividade antioxidante, solubilização de proteínas de armazenamento e minimiza a peroxidação lipídica (IŞERI; SAHIN; HABERAL, 2014). Além disso, essa técnica é capaz de aumentar significativamente a quantidade de mitocôndrias e melhorar a regulação de proteínas para a divisão celular ( $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina). Para mais, o priming induz mudanças celulares nas sementes, como a síntese de novo de ácidos nucleicos e proteínas; produção de ATP (trifosfato de adenosina); ativação de esteróis e fosfolípidios; e reparar o DNA danificado durante a debulha (MARTHANDAN; GEETHA; KUMUTHA, 2020).

Diversas substâncias podem ser aplicadas na técnica do priming, como as poliaminas (PAs), moléculas policatiônicas capazes de auxiliar no desenvolvimento vegetal visto sua ligação com as membranas celulares, trazendo maior estabilidade para a mesma. Também tem capacidade de interação com moléculas de RNA e auxiliam na síntese de proteínas. As poliaminas são moléculas promissoras, que tem sido usadas para melhorar o crescimento das plantas e o desempenho fisiológico em condições de estresse (HASSAN, 2020; NAHAR *et al.*, 2016). Dentre as poliaminas as mais encontradas nos vegetais estão: putrescina, espermina e espermidina (ALCÁZAR; TIBURCIO, 2018).

As poliaminas ainda tem a propriedade de eliminar radicais livres e alterar a expressão gênica. As poliaminas têm uma ampla gama de funções no crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo embriogênese, organogênese, germinação de sementes, floração, reprodução sexual, senescência e desenvolvimento e amadurecimento de frutos (BIONDI *et al.*, 2022; HODGES, 2004).

Na busca por métodos para melhorar o crescimento e desenvolvimento de plantas de milho, o presente trabalho analisa a influência do uso de priming de espermina e espermidina no desenvolvimento inicial de plantas de milho sob estresse hídrico.

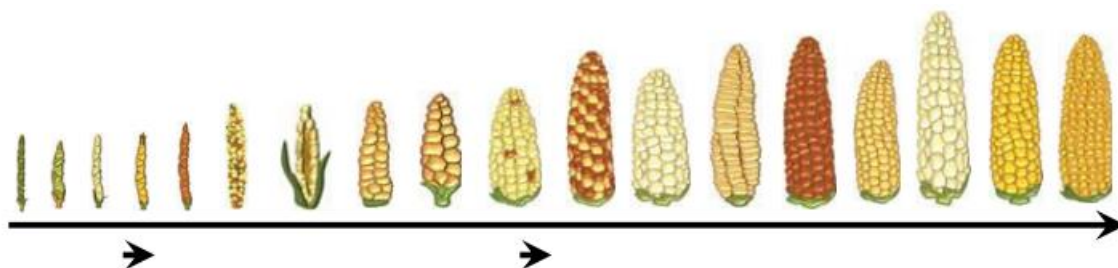
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MILHO

As plantas formam a base da alimentação humana, a dieta é rica em frutas, verduras, legumes e cereais. Dessa forma é necessária grande produção vegetal para suprir as necessidades de uma população tão grande que estima-se chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050 de acordo com as projeções da ONU (Organização das Nações Unidas) (ONU, 2019). Dentre esses vegetais se destaca o milho (*Zea mays* L), cereal amplamente consumido principalmente em países em desenvolvimento. Podendo chegar a 56% das calorias da dieta diária de uma pessoa (PRASANNA, B. M. *et al.*, 2001) e 70% da sua produção é destinada a produção de ração animal (SAEED *et al.*, 2021).

O milho é um cereal produzido anualmente pertencente à família Gramineae/ Poaceae. De acordo com Hodges (2004), a forma mais antiga de milho surgiu através da hibridização natural de duas ou três gramíneas nativas do México e da Guatemala, sendo inicialmente formado por grãos muito pequenos (Figura 1). Estudos moleculares realizados, comprovam que o milho foi domesticado a partir do teosinto *Z. mays Parviglumis* (DÍAZ; TABERNER; VILAPLANA, 2020). Acredita-se que a espécie tem sido cultivada a mais de 6000 anos. A primeira referência escrita data de 1502, com a vinda desses grãos da África ocidental trazidos por comerciantes portugueses.

Figura 1 – Evolução do milho a partir do teosinto: mudanças estruturais na espiga do milho ao longo do tempo.



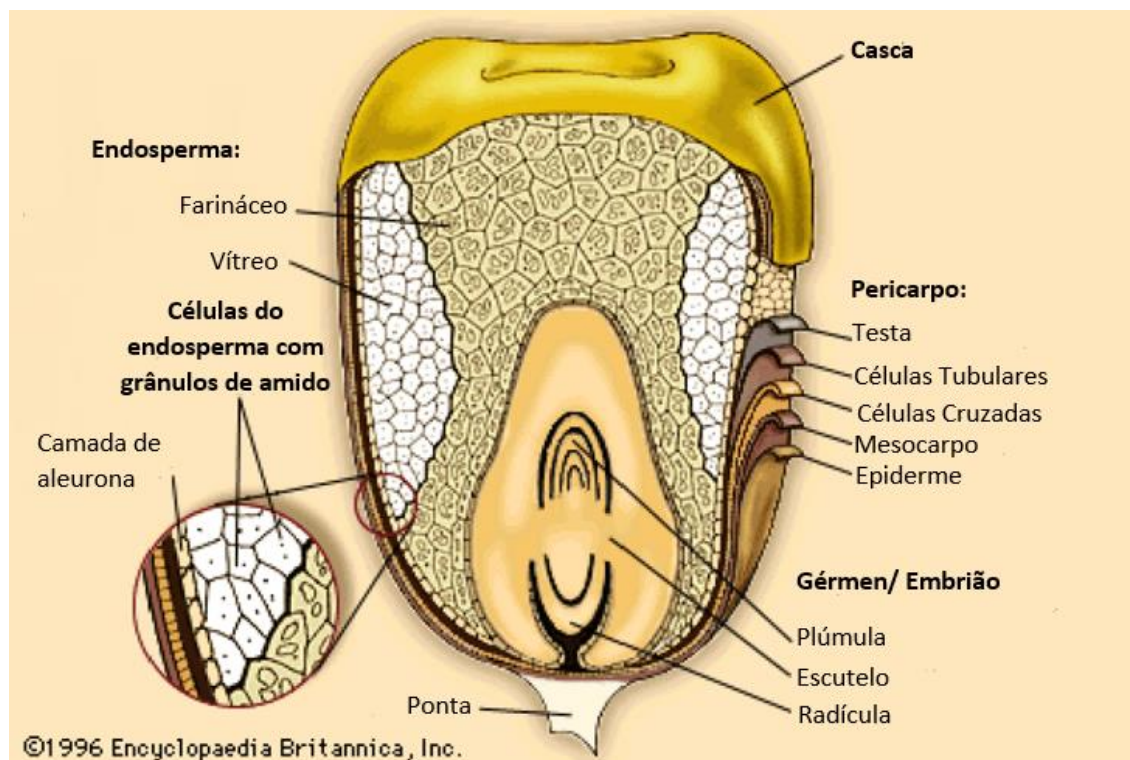
Fonte: KISTLER *et al.*, 2018 e PRESOTO, 2020

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) o milho alcançou a produção de 115.602,1 mil toneladas de grãos na safra de 2021/2022 ficando atrás apenas da produção de soja (CONAB, 2022). Dessa forma verifica-se a importância da cultura para o agronegócio, onde ocupa 21.238,9 mil ha de áreas plantadas.

O grão de milho é botanicamente chamado de cariopse e é um fruto monospermo, seco e indeiscente, com o pericarpo delgado e soldado ao tegumento da semente, característica comum da família Gramineae/ Poaceae. Em geral, os grãos de milho são brancos ou amarelos, mas podem apresentar coloração do preto ao vermelho. O peso do grão varia entre 250 e 3060 mg e apresenta cerca de 72% de amido, 9,5% de proteínas, e 9% de fibra e 4% de óleo. (PAES, 2006).

Suas cariopses são formadas por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Figura 2), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão.

Figura 2 – Estrutura do grão de milho



Fonte: Adaptado de BRITANNICA (1996)

O endosperma é responsável por cerca de 83% do peso seco do grão, e é formado principalmente por amido (88%), organizado na forma de grânulos. No endosperma estão também presentes as proteínas de reserva (8%) do tipo prolaminas, chamadas zeínas.

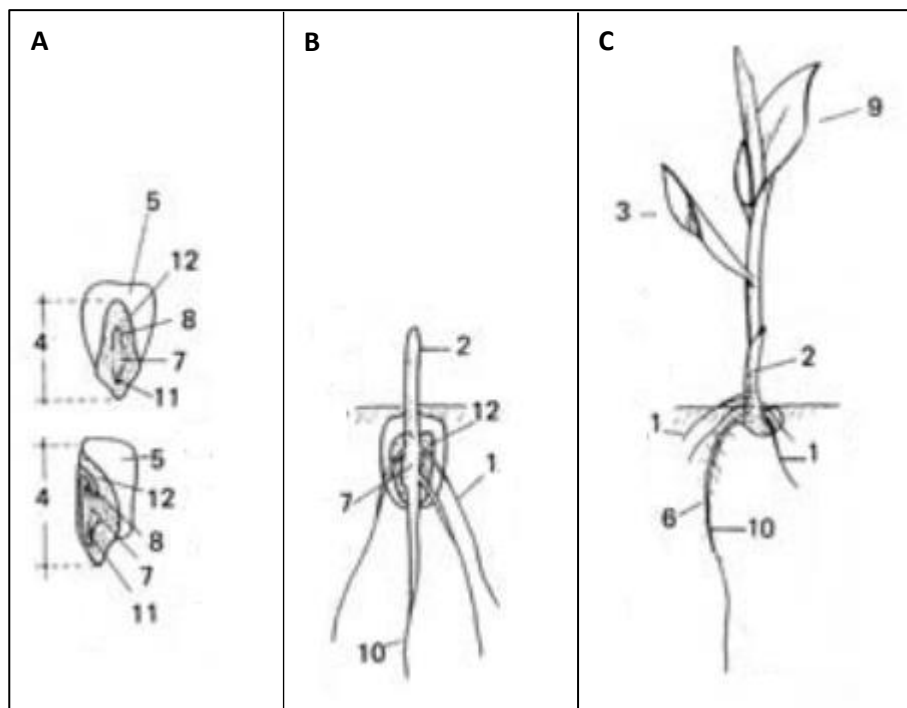
As zeínas ou prolaminas são responsáveis pela formação dos corpos proteicos que compõem a matriz que envolve os grânulos de amido dentro das células no endosperma. E dessa forma, através das diferentes distribuições dos grânulos de amido e da matriz proteica, o endosperma pode ser classificado em farináceo ou vítreo (PAES, 2006).

Essa denominação tem relação com o aspecto do endosperma quando em relação à luz. No endosperma farináceo, os grânulos de amido são arredondados e estão dispersos, não havendo matriz proteica circundando essas estruturas, o resultado disso é que após a secagem do grão surgem espaços vagos onde antes havia água para o desenvolvimento do grão e consequentemente a luz pode passar por esses espaços vazios (PAES, 2006).

Já para o endosperma vítreo a matriz proteica é densa, com corpos proteicos estruturados, que circundam os grânulos de amido de formato poligonal, não permitindo espaços entre estas estruturas. Resultando na ausência de espaços entre os grânulos de amido e a matriz proteica e promovendo a reflexão da luz, resultando em aspecto vítreo ao endosperma (PAES, 2006).

Esses grãos de milho apresentam germinação do tipo hipógea (Figura 3), que é a germinação na qual os cotilédones ou uma estrutura semelhante, como o escutelo, permanecem no solo ou na superfície do mesmo e dentro da semente. O eixo é elevado acima do nível do solo pelo o epicótilo.

Figura 3 – Germinação Hipógea de *Zea mays*



Fonte: Adaptado de BRASIL (2009)

Legenda: A – Semente com Embrião

B – Plântula

C – Desenvolvimento Posterior

1- Raiz Adventícia;

5- Endosperma;

9- Folha Primária

2- Coleótilo;

6- Pelo Radicular;

10- Raiz Primária;

3- Cotilédone;

7- Mesocótilo;

11- Radícula;

4- Embrião;

8- Plúmula;

12- Escutelo

Seu desenvolvimento é dividido em estágio vegetativo e reprodutivo. Esses estádios ainda são subdivididos. Nas subdivisões dos estádios vegetativos esses são designados numericamente como V1, V2, V3 até V(n); em que (n) representa a última folha emitida antes do pendoamento (Vt). O primeiro e o último estádios V são representados, respectivamente, por (VE, emergência) e (Vt, pendoamento). Para contar a folha deve-se observar a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo, dessa forma, a primeira folha de cima para baixo, com o colar visível, é considerada completamente desenvolvida e, assim, é contada como tal (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Já os estádios reprodutivos são subdivididos em R1, Embonecamento; R2, Bolha d'água; R3, Leitoso; R4, Pastoso; R5, Formação de dente e R6, Maturidade Fisiológica essas subdivisões se dão em relação a textura do grão de milho (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

As plantas apresentam sistema radicular complexo fasciculado que consiste em uma raiz primária que se desenvolve da radícula, raízes seminais (raízes adventícias que se ramificam a partir do nó escutelar) e raízes coronais de origem pós-embrionária. As raízes primárias e seminais são altamente ramificadas. Já as raízes coronais, também conhecidas como “raízes-escora”, são adventícias derivadas dos nós inferiores do caule. Ao contrário das raízes primárias e seminais as raízes coronais não são importantes nas plântulas, mas continuam a se formar, se desenvolver e se ramificar durante o crescimento vegetativo. Assim, o sistema de raízes coronais constitui a grande maioria do sistema de raízes nos indivíduos adultos do milho (TAIZ *et al.*, 2017).

Nutricionalmente falando o milho contém as vitaminas A, B, C e E, incluindo sais minerais e oligoelementos essenciais como caroteno, tiamina, ácido ascórbico e tocoferol. Entretanto, a redução no acúmulo de polissacarídeos, principalmente amido, após a colheita leva ao aumento no teor de proteínas no endosperma (MISRA; MERTZ; GLOVER, 1975).

O milho é uma espécie diplóide ( $2n = 20$ ) seu genoma apresenta 40.000 genes em 10 pares de cromossomos (NANNAS; KELLY DAWE, 2015). Por apresentar elevado número de genes duplicados ou quadruplicados, as possibilidades de surgir variações genéticas benéficas aumentam e diminui o impacto de mutação prejudiciais, sendo assim, de grande interesse para programas de melhoramento. O Instituto Agrônomo de Campinas, por exemplo, iniciou seus estudos sobre hibridização em 1932 e em 1935 foi publicado o boletim técnico descrevendo a autofecundação de 3 variedades comerciais (KRUG; VIÉGAS; PAOLIÉRI, 1943). Até hoje são realizados estudos de melhoramento genético da espécie.

Para que se tenha um bom programa de melhoramento é preciso ter grande variedade de germoplasma, e para o milho é composto pelo germoplasma de raças crioulas, populações



adaptadas e materiais exóticos introduzidos, sendo caracterizado pela ampla variabilidade genética (PATERNIANI *et al.*, 2019). Por mais que as populações crioulas, raças locais ou variedades sejam menos produtivas que as cultivares comerciais, estas populações são fontes de variabilidade genética que podem ser exploradas na busca por genes de tolerância aos fatores abióticos, pelo elevado potencial de adaptação que apresentam para condições ambientais específicas (MIRANDA; MIRANDA, 1993). Sendo um dos empecilhos para o cultivo da espécie a falta de água que pode influenciar de forma negativa a produção, há estudos tanto de híbridos que sejam capazes de resistir ao estresse hídrico quanto moléculas que possam minimizar os seus efeitos, entre outras características de interesse.

O híbrido BRS 1030 por exemplo é um híbrido simples lançado pela Embrapa em 2004 que se destaca pela alta produtividade e a alta sanidade foliar. Apresenta excelente estabilidade produtiva e resistência ao acamamento e quebraamento do colmo, podendo ser cultivado tanto em áreas acima e abaixo de 700 m de altitude. Se trata de um híbrido de porte baixo atingindo até 2,2 m de altura e características que despertam o interesse do produtor e do mercado, como, tipo de grão semiduro e coloração de grãos laranja (PARENTONI *et al.*, 2004). Entretanto, esse híbrido não é tolerante ao estresse hídrico.

## 2.2 DÉFICIT HÍDRICO

A água é o fator que inicia a germinação e está envolvida direta e indiretamente em todas as demais etapas do metabolismo germinativo. Sua participação é decisiva nas reações enzimáticas, na solubilização e transporte de metabólitos, como reagente na digestão hidrolítica de tecidos de reserva da semente (BOTELHO; PEREZ, 2001). Dessa forma, potenciais osmóticos muito negativos do solo, tendem a atrasar e diminuir a porcentagem de germinação. O grau mínimo de umidade que deve ser atingido pela semente para que ocorra a germinação, depende de sua composição química e da permeabilidade do tegumento (BRADFORD, 1990).

As mudanças climáticas são consideradas um problema ambiental global, sendo a seca um dos principais efeitos decorrentes dessas mudanças. Ela ocorre devido à escassez de água disponível, que depende de muitos fatores, como: chuva, capacidade de retenção, escassez de umidade do solo, quantidade e distribuição de água durante o crescimento da cultura, o que pode restringir o potencial de rendimento da cultura (GHORBANI; IZADPANA, 2018; RAPPARINI; PEÑUELAS, 2014; TAHAEI *et al.*, 2022). Com isso, afeta negativamente a agricultura, resultando em baixa produtividade das culturas, o que aumenta a ocorrência de

problemas de escassez de alimentos. Portanto, estudar métodos para aumentar a tolerância das plantas à seca é uma das prioridades dos cientistas de plantas (MAJEED *et al.*, 2020).

A diminuição de água disponível no solo é chamada de déficit hídrico, que pode ocorrer em consequência da falta de água ou do potencial matricial do solo e levar a efeitos negativos, cuja reversibilidade vai depender do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta. Com a falta de água, existe conflito entre a conservação da água pela planta e a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> para produção de carboidratos, uma vez que ao abrir os estômatos para a assimilação do gás carbônico aumenta a taxa de transpiração (TAIZ *et al.*, 2017).

O estresse osmótico acarretado pela seca diminui principalmente a absorção de água pelas plantas; desencadeia desequilíbrios fisiológicos e bioquímicos, levando à redução de turgor e de crescimento, fechamento estomático, diminuição da fotossíntese e transpiração, diminuição da capacidade celular e aumento do estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2021; JANDA *et al.*, 2007; RAMACHANDRA; VISWANATHA, 2004; XIA *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

A tolerância à seca em plantas pode ser alcançada através de mudanças bioquímicas (AHLUWALIA; SINGH; BHATIA, 2021). O acúmulo de osmólitos, por exemplo, é uma das alterações bioquímicas comuns em células vegetais submetidas à seca (SOUSA *et al.*, 2022). Já a homeostase equilibrada dos íons é muito importante para que as células vegetais controlem a perda de água das células por meio do estresse hídrico. Tal capacidade é verificada em plantas com alta tolerância à seca (PATEL; FATNANI; KUMAR, 2021).

Outra alteração causada por estresses ambientais é a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). E para evitar os possíveis danos causados por essas EROs ocorre o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (CHALLABATHULA *et al.*, 2022).

Entre essas enzimas, existe a superóxido dismutase (SOD) que é uma enzima que simultaneamente oxida e reduz o ânion superóxido para produzir peróxido de hidrogênio e oxigênio, seguindo a equação:  $O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ . A ascorbato- peroxidase (APX) que catalisa a destruição de peróxido de hidrogênio, usando ácido ascórbico como agente redutor na seguinte reação:  $2 \text{ L-ascorbato} + H_2O_2 + 2 H^+ \rightarrow 2 \text{ monodehidroascorbato} + 2 H_2O$ . A catalase (CAT) catalisa a destoxificação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, nos peroxissomos, de acordo com a reação:  $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ . Por fim, a glutathiona peroxidase catalisa a destoxificação de peróxido de hidrogênio, usando glutathiona reduzida (GSH) como agente redutor:  $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$  (TAIZ *et al.*, 2017)

Neste ciclo, que leva à redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , a glutatona oxidada (GSSG) é formada e reciclada de volta para GSH pela ação da glutatona redutase (GR), usando NADPH como redutor. As atividades de GR aprimoradas em resposta ao estresse hídrico servem para manter a proporção de glutatona reduzida para oxidada e, assim, o potencial redox da glutatona, cuja ocorrência é relatada em várias espécies de plantas, incluindo o milho (AHMAD *et al.*, 2016).

Para a cultura do milho a seca é um dos fatores que pode acarretar grandes prejuízos no desenvolvimento da planta levando a redução da produtividade de grãos de até 100% (PATERNIANI *et al.*, 2019). Barker *et al.* (2005), atribuem uma perda média anual de 15% na produtividade de milho causada pela seca em regiões temperadas e 17% em regiões tropicais. E essa influência do estresse hídrico é ainda mais agravada quando o milho é semeado durante a segunda safra, pois fica sujeito a maior instabilidade climática, já que a safrinha abrange o final do período chuvoso.

Para mitigar os efeitos do estresse hídrico, a planta recorre a mecanismos fisiológicos tais como o ajustamento osmótico, mecanismo onde ocorre o acúmulo de solutos osmoticamente ativos (por exemplo, ácidos orgânicos, açúcares, íons) na célula, o que gera um gradiente no potencial hídrico da célula que aumenta o turgor celular na presença de água disponível (BARKER *et al.*, 2005; TRINDADE; MEAGZ, 2019).

Através do ajuste osmótico a atividade meristemática e a expansão da área foliar são mantidas enquanto retarda a senescência foliar, e permite a manutenção da abertura estomática, do crescimento e da fotossíntese (CHAVES, 1991; PATAKAS *et al.*, 2002; VIEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007). Essas alterações podem então ter observadas a níveis celulares de divisão.

São encontrados diversos trabalhos na literatura buscando melhor entendimento e formas de mitigar os efeitos do estresse hídrico (AVRAMOVA *et al.*, 2016; BADR *et al.*, 2020; CHLOUPEK *et al.*, 2010; HALL *et al.*, 1982; HERRERO; JOHNSON, 1981; LECOEUR; SINCLAIR, 1996; LIU *et al.*, 2015; MESSMER *et al.*, 2009; PATAKAS *et al.*, 2002; RUXTON *et al.*, 2014; VIEIRA JÚNIOR *et al.*, 2007; WEBBER *et al.*, 2018). Para isso, buscam-se moléculas que sejam capazes de auxiliar no desenvolvimento das plantas mesmo sob condições de seca como reguladores de crescimento, aminoácidos, poliaminas entre outras.

### 2.3 POLIAMINAS

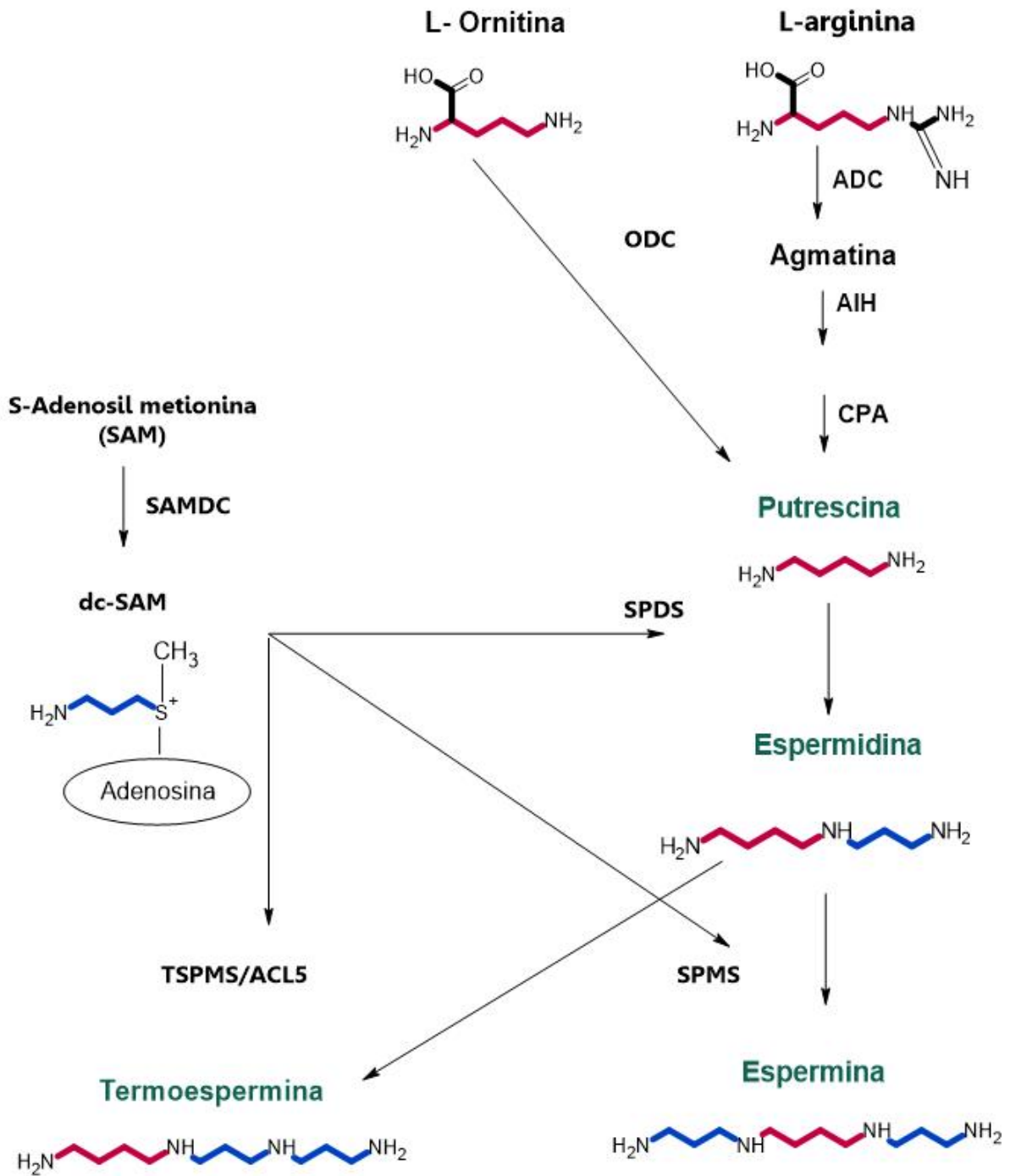
Poliaminas (PAs) são compostos pequenos, policatiônicos, alifáticos presentes em plantas. Esses compostos são responsáveis pela modulação de importantes processos biológicos

e acredita-se desempenharem papéis importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal (ABDALLAH; MASHAHEET; BURKEY, 2021; BIONDI *et al.*, 2022; HASSAN, 2020; LIJIE LI *et al.*, 2018).

A influência no desenvolvimento das plantas através da estimulação com poliaminas, foi observada em diversos sistemas biológicos e pode ser atribuído a sua ligação iônica com ácidos nucleicos, estabelecida com base na cristalografia de raios X (SMITH, 1985). Tal ligação pode ser explicada pelo fato de que as poliaminas são totalmente protonadas sob condições fisiológicas, podendo assim interagir com ácidos nucleicos, participando assim da regulação de muitos processos metabólicos, incluindo síntese de proteínas, transcrição, modificação de RNA e modulação da atividade enzimática (BIONDI *et al.*, 2022; MIYAMOTO *et al.*, 1993; TAKAHASHI; KAKEHI, 2010; WATANABE *et al.*, 1991).

Dentre as poliaminas, as que mais se destacam no reino vegetal são a putrescina (Put) espermina (Spm) e a espermidina (Spd). A Figura 4 abaixo mostra a síntese das poliaminas onde a putrescina é sintetizada diretamente a partir da ornitina pela ornitina descarboxilase (ODC), arginina ou S-adenosil metionina sendo essa transformação dependente da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC). Essas duas enzimas, ODC e SAMDC, são limitantes da biossíntese de poliaminas. A espermidina é sintetizada a partir da putrescina e a espermina a partir da espermidina, por transferência da porção aminopropila da S-adenosilmetionina descarboxilada. As enzimas que catalisam essas reações são a espermidina sintase (SPDS) e a espermina (SPMS) sintase (BIONDI *et al.*, 2022; TAKAHASHI; KAKEHI, 2010).

Figura 4 - Vias biosintéticas de poliaminas em plantas



Fonte: ESTEVES, G.(2022)

Abreviaturas:

ACL5: ACAULIS5;

ADC:arginina descarboxilase;

AIH: agmatina iminohidrolase;

CPA: N-carbamoilputrescina amidohidrolase;

ODC: ornitina descarboxilase;

SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilase;

SPDS: espermidina sintase;

SPMS: espermina sintase;

TSPMS: termospermina sintase.

Por se tratarem de compostos nitrogenados, a síntese das poliaminas em plantas está relacionada aos aminoácidos básicos arginina e ornitina e, conseqüentemente, ao ácido glutâmico, um componente intermediário no metabolismo do nitrogênio. Sendo assim, em alguns sistemas biológicos, as poliaminas parecem servir como Fontes de nitrogênio. Devido ao seu acúmulo em quantidades relativamente grandes, até milimolar, a concentração de poliaminas pode afetar o equilíbrio de nitrogênio solúvel total nas células; e agindo dessa forma ora como compostos de armazenamento ora liberando o nitrogênio armazenado (ALCÁZAR; TIBURCIO, 2018; BOTELHO; PEREZ, 2001).

As poliaminas ainda tem a propriedade de interagir com membranas celulares, eliminar radicais livres e alterar a expressão gênica. As poliaminas têm uma ampla gama de funções no crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo embriogênese, organogênese, germinação de sementes, floração, reprodução sexual, senescência e desenvolvimento e amadurecimento de frutos. (BIONDI *et al.*, 2022; HODGES, 2004). O conteúdo e a concentração de poliaminas, em sementes maduras, varia de acordo com a espécie, havendo distribuição entre os órgãos de reserva (cotilédones e endosperma) e eixo embrionário; evidências indicam que o conteúdo de poliaminas aumenta durante os estágios iniciais de germinação (MATILLA, 1996).

No caso do amadurecimento dos grãos de milho Cao *et al.* (2010) observaram que as concentrações de Putrescina diminuem em comparação a aumentos contínuos das concentrações de espermidina e espermina. Eles atribuem essa variação a probabilidade de que a putrescina seja transformada pela espermidina e espermina sintase durante esse período. Isso leva a crer que posteriormente para o sucesso de germinação e crescimento das plantas de milho seja importante essa maior concentração de espermina e espermidina (CAO *et al.*, 2010).

Há estudos que sugerem que pelo fato de as poliaminas interagirem com grupos aniônicos nas membranas, elas sejam capazes de prevenir vazamentos e levar a uma estabilização em condições de estresse. Assim, garantem proteção contra estresses ambientais como salinidade, resfriamento, exposição ao ozônio e deficiência de potássio (BOU CHÉREAU *et al.*, 1999 , Gao *et al.*, 2009 ).

Para testar esse efeito de proteção das poliaminas sobre estresses ambientais pode-se então fazer usos de técnicas de aplicação dessas moléculas tais como: o priming, aplicação direta no solo ou substrato de cultivo, aplicação por aspersão nas folhas, cultivo em hidroponia entre outros, buscando um desenvolvimento normal das plantas mediante tais intemperes.

## 2.4 PRIMING

Posterior ao plantio, as sementes permanecem no solo por um determinado período para absorver água e alguns nutrientes essenciais para o seu crescimento. O Priming de sementes é uma técnica que visa reduzir esse tempo tornando a germinação mais rápida e uniforme. Além de reduzir a sensibilidade da semente a fatores ambientais externos (AFZAL *et al.*, 2016). A técnica de priming apresenta baixo custo e consiste em submeter sementes a uma hidratação controlada com o intuito de desencadear o processo metabólico de germinação, evitando o surgimento de radicais livres no interior das células, que pode ser prejudicial ao seu desenvolvimento. As sementes funcionam bem em condições normais e estressantes (AHMED; EL-MAHDY, 2022). Entretanto, o tratamento de priming deve ser interrompido antes que ocorra a perda da tolerância à dessecação ou seja a protusão da radícula (PAPARELLA *et al.*, 2015).

Tal técnica é aplicada com o propósito principal de melhorar a germinação e o desenvolvimento inicial das plantas. Entre os benefícios atrelados ao uso do priming pode-se destacar a emergência síncrona e rápida, a redução da foto e termo dormências, uma maior faixa de temperaturas de germinação além de uma melhor capacidade de competir com plantas daninhas e patógenos (ELLIS; BUTCHER, 1988; HILL *et al.*, 2007).

Além do mais, o priming de sementes assegura uma germinação aumentada e uniforme, reduz o tempo de embebição (BROCKLEHURST; DEARMAN, 1983), aumenta a ativação de enzimas pré-germinativas, aumenta a produção de metabólitos (HUSSAIN *et al.*, 2016), repara o DNA danificado (FAROOQ *et al.*, 2009), regula a osmose, induz atividade antioxidante e solubilização de proteínas de armazenamento e minimiza a peroxidação lipídica (IŞERI; SAHIN; HABERAL, 2014). Além disso, essa técnica é capaz de aumentar significativamente a quantidade de mitocôndrias e melhorar a regulação de proteínas para a divisão celular ( $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina). Para mais, o priming induz mudanças celulares nas sementes, como a síntese de novo de ácidos nucleicos e proteínas; produção de ATP (trifosfato de adenosina); ativação de esteróis e fosfolipídios; e reparar o DNA danificado durante a debulha (MARTHANDAN; GEETHA; KUMUTHA, 2020).

Segundo Evenari (1984) o uso de priming para melhorar a germinação e o crescimento das sementes datam os antigos gregos. Historicamente falando há relatos de que Teofrasto (371-287 a.C.), observou que sementes de pepino quando embebidas em água resultavam em germinação mais rápida e uniforme em comparação com sementes não preparadas (Theophrastus, *Inquiry into Plants*, Book VII, I.6). Também o naturalista romano Gaius Plinius

Secundus (23-79 d.C.) relatou em sua Enciclopédia os efeitos positivos da pré-embebição de sementes de pepino em mel e água para germinação de sementes. Posteriormente, em 1539-1619, o botânico francês Oliver de Serres relatou sobre a semente embebida em água de esterco por 2 dias e depois seca antes da semeadura como uma forma eficaz de tratamento de sementes para melhor crescimento das culturas, entre outros.

Existem diferentes tipos de priming que podem ser aplicados em sementes (MICKKY, 2022). O mais comum é o priming químico, eficiente em melhorar a tolerância ao estresse da cultura por meio de vários métodos, como hidrocondicionamento, halopriming, osmopriming, hormopriming, redox priming, nutripriming, nanopriming e outros (BHANUPRAKASH; YOGEESSHA, 2016). O priming físico também é eficaz, e o método mais comum é o thermopriming (IQBAL; ASHRAF, 2010). O terceiro tipo é o priming biológico que compreende o fitopriming onde as sementes são preparadas em um extrato vegetal (FAROOQ *et al.*, 2018) e biopriming onde microrganismos promotores de crescimento de plantas são o agente de iniciação (KHAN; BANO; BABAR, 2019).

A germinação das sementes ocorre em três estágios: embebição, germinação e crescimento. Durante a primeira fase, a embebição, ocorre a captação de água e a promoção da síntese de proteínas e atividades respiratórias através do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (PAPARELLA *et al.*, 2015). A segunda fase, a germinação, está relacionada ao início de diferentes atividades fisiológicas ligadas à germinação, como síntese de proteínas, síntese de mitocôndrias e alteração de açúcares solúveis (VARIER; VARI; DADLANI, 2010).

O fator crítico durante o priming das sementes é a absorção controlada de água durante o segundo estágio, pois a germinação é muito mais sensível aos fatores ambientais do que o terceiro estágio (CÔME; THÉVENOT, 1982). Portanto, as sementes que passam pelo priming podem germinar em condições ambientais mais variadas em comparação com sementes não tratadas (CORBINEAU; CÔME, 2006). Desta maneira, a tecnologia de priming tem sido adotada como uma nova técnica para obter uma colheita uniforme em espera de várias empresas agrícolas e de sementes (PAPARELLA *et al.*, 2015).

Um dos indicadores para maior produtividade de uma cultura é a germinação. Dessa forma o principal foco para o aumento da produtividade do milho é promover a germinação do milho (AHMED; EL-MAHDY, 2022). Uma das consequências da duração prolongada da germinação é, conseqüentemente, a emergência tardia das plântulas como resultado da interação direta com bactérias patogênicas do solo (MARON *et al.*, 2013). O priming, portanto, seria uma alternativa para evitar danos à produção.



Ao tratar sementes de trigo com extrato de milho verde e poliaminas, Alharby *et al.* (2021) observaram aumento da tolerância ao estresse hídrico através do aumento da eficiência fotossintética, da estabilidade da membrana, do teor relativo de água e o acúmulo de antioxidantes, osmoprotetores, *trans* - e *cis* -zeatina, poliaminas e suas expressões gênicas, além da diminuição dos níveis de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a peroxidação lipídica e o vazamento de eletrólitos foram diminuídos.

Há relatos de trabalho que obtiveram sucesso ao utilizar priming com poliaminas para aumentar a tolerância de plantas ao estresse ambiental como por exemplo Paul e Roychoudhury (2016), que submeteram sementes de arroz ao condicionamento com espermina e, conseqüentemente, obtiveram maior tolerância ao estresse salino. Os danos oxidativos foram minimizados, houve a modulação de antioxidantes, osmólitos e sistemas de fotossíntese; aumento da ativação de enzimas antioxidantes; e redução dos níveis de  $H_2O_2$  e MDA.

Li *et al.* (2014) conseguiram aumentar a resistência ao estresse hídrico em trevo branco fazendo um priming com espermidina aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, o ciclo ascorbato-glutationa e a eliminação de EROs e diminuindo os níveis de peroxidação lipídica, além de melhorar a estabilidade da membrana celular e o metabolismo do amido.

Dessa forma, é possível notar que os estudos utilizando poliaminas como mitigadoras dos efeitos causados por estresses ambientais se mostram eficientes em diversas culturas.

### 3 JUSTIFICATIVA

A seca é considerada um dos estresses abióticos mais destrutivos em todo o mundo, levando a uma queda acentuada na produção agrícola. Como resultado do aquecimento global, a escassez de água se agravou nos últimos anos, representando uma séria ameaça à produção de alimentos e à sustentabilidade da agricultura, bem como à segurança alimentar global (AHMAD *et al.*, 2022).

O estresse hídrico costuma ser o principal fator de perdas para a cultura do milho (WEBBER *et al.*, 2018). De acordo com FAO (2021), mesmo que um grande número de culturas seja cultivado e colhido em todo o mundo, apenas quatro culturas individuais representaram metade da produção global de culturas primárias em 2019: cana-de-açúcar (21% do total, com 1,9 bilhão de toneladas), milho (12%, com 1,1 bilhão de toneladas), arroz (8%, com 0,8 bilhão de toneladas) e trigo (8%, com 0,8 bilhão de toneladas). Tornando o milho a segunda maior cultura mundial.

A manutenção da produtividade das culturas para as gerações futuras pode ser alcançada através do desenvolvimento de variedades de culturas tolerantes à seca e ao calor a partir de recursos genéticos de plantas (FERGUSON, 2019) ou tratamentos com moléculas capazes de mitigar os efeitos desses estresses abióticos, como é o caso das poliaminas.

Em estudo sobre concentrações de poliaminas durante a germinação de sementes, Villanueva e Huang (1993) relataram que durante o processo de quebra de dormência de sementes e no início do processo de embebição, as concentrações de poliaminas aumentam e ficam semelhantes às de RNA, DNA e proteínas, sugerindo que as poliaminas estejam envolvidas nos estádios iniciais da germinação e sejam essenciais ao processo.

Aliado a essa essencialidade das poliaminas, Cao *et al.* (2010) observaram um aumento de espermidina e espermina no amadurecimento das sementes de milho, levando a crer na importância de altas concentrações de espermina e espermidina para o desenvolvimento do milho. Dessa forma a espermina e espermidina se tornam uma excelente alternativa para teste de melhora na eficiência de germinação e desenvolvimento de plantas de milho, espécie de grande importância econômica. Assim, surge a oportunidade de aplicação dessas moléculas em sementes, via priming, visando mitigar os efeitos da seca sobre a germinação e o crescimento inicial em um híbrido de milho sensível à seca.

#### **4 OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi verificar se as poliaminas exercem influência sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plantas de milho sensível a seca mesmo estando sob estresse hídrico.

## 5 MATERIAIS E METODOS

### 5.1 MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram realizados utilizando sementes de milho híbrido BRS 1030, sensível aos efeitos de seca. As sementes foram lavadas e passaram por desinfestação em hipoclorito de sódio 2,5% durante 5 minutos. Posteriormente, passaram por um priming de 20 horas. Foram utilizadas as poliaminas espermina (SPM) e espermidina (SPD).

Testes preliminares foram realizados utilizando as concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de ambas poliaminas e diferentes pressões osmóticas (0; -1,0; -1,5 e -2,0 MPa). Mediante estes resultados foram escolhidas as condições experimentais.

Os testes foram conduzidos com as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  de espermina e espermidina e a ausência de poliaminas foi utilizada como controle. O processo de priming foi realizado com imersão das sementes em água ou solução contendo as poliaminas durante 20 horas antes de serem colocadas para germinar em areia.

Foram utilizadas caixas do tipo gerbox contendo areia umedecida a 60% da capacidade de campo (CC) com água, ou solução de manitol  $73,597\text{g.L}^{-1}$ , resultando em um potencial osmótico de -1MPa de acordo com Ávila *et al.* (2007). Foram utilizadas 4 repetições e cada repetição composta por uma gerbox contendo 12 sementes de milho. O cultivo foi realizado em estufa incubadora do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) durante 15 dias com temperatura de 30°C.

Foi realizado um experimento para cada uma das poliaminas isoladamente.

#### 1) Experimento espermina:

- a) Controle positivo, composto por areia umedecida com água e sementes submetidas priming com água (Controle água);
- b) Controle negativo, composto por areia umedecida com manitol e sementes submetidas priming com água (Controle manitol);
- c) Sementes tratadas com espermina 10  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com água (Água + [10 $\mu\text{mol}$  SPM]);
- d) Sementes tratadas com espermina 10  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com manitol (Manitol + [10 $\mu\text{mol}$  SPM]);
- e) Sementes tratadas com espermina 50  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com água (Água + [50 $\mu\text{mol}$  SPM]);

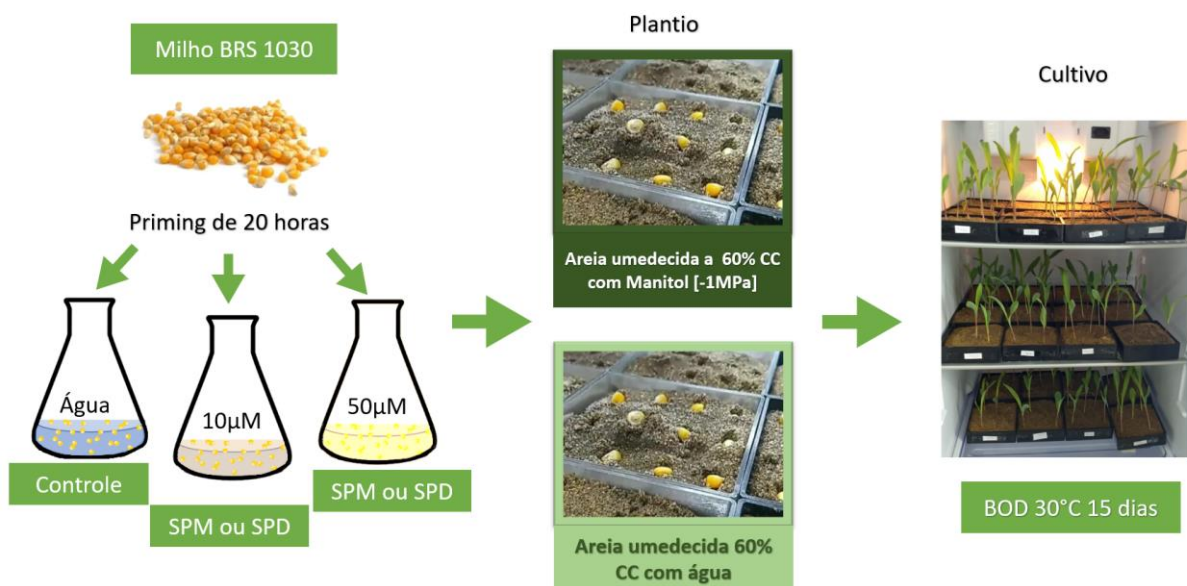
f) Sementes tratadas com espermina 50  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com manitol (Manitol + [50 $\mu\text{mol}$  SPM]).

2) Experimento espermidina:

- a) Controle positivo, composto por areia umedecida com água e sementes submetidas priming com água (Controle água);
- b) Controle negativo, composto por areia umedecida com manitol e sementes submetidas priming com água (Controle manitol);
- c) Sementes tratadas com espermidina 10  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com água (Água + [10 $\mu\text{mol}$  SPD]);
- d) Sementes tratadas com espermidina 10  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com manitol (Manitol + [10 $\mu\text{mol}$  SPD]);
- e) Sementes tratadas com espermidina 50  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com água (Água + [50 $\mu\text{mol}$  SPD]);
- f) Sementes tratadas com espermidina 50  $\mu\text{M}$  germinadas em areia umedecida com manitol (Manitol + [50 $\mu\text{mol}$  SPM]).

A plotagem do experimento está representada no esquema 1 abaixo.

Esquema 1 – Metodologia aplicada para influência de priming com poliaminas sobre o desenvolvimento inicial de milho.



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

## 5.2 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO

Foram tomadas medidas das plantas de milho quanto à altura da parte aérea e o comprimento de raiz com auxílio de uma régua, assim como suas respectivas massas frescas em balança analítica. Foi analisada também o diâmetro do colmo do milho com o auxílio de um paquímetro digital e o volume das raízes através do deslocamento de água em uma proveta.

## 5.3 ANÁLISE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Para análise da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o aparelho Fluorcam 800MF da Photon Systems Instruments. As folhas do milho passaram por 30 minutos de adaptação ao escuro, e em seguida foram medidos os parâmetros de fluorescência mínima (F<sub>0</sub>) fluorescência máxima (F<sub>m</sub>) eficiência máxima do fotossistema -PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), a extinção fotoquímica (qP), extinção não fotoquímica (NPQ) a taxa de transporte de elétrons (RFD e o rendimento fotoquímico efetivo (Q<sub>y</sub>) .

## 5.4 ANÁLISE DE AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES

Para a determinação de açúcares totais e redutores, 200mg de material vegetal foram pulverizados com auxílio de almofariz e pistilo e acrescentou-se metanol, clorofórmio e água na proporção 12:4:3. Posteriormente, o material foi deixado em repouso durante 24h seguido de centrifugação. O sobrenadante foi retirado e misturado com clorofórmio e água na proporção 3:1 e mantido mais 24 horas em repouso. Por fim, a fração orgânica foi utilizada para análise de açúcares totais e redutores.

Para açúcares redutores foi utilizado o método de Miller (1959) em uma reação com ácido 3,5 dinitrosalicílico na presença do tartarato de sódio e potássio (sal de Rochelle) em meio alcalino. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Para os açúcares totais foi utilizado o método de antrona baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico concentrado sobre os carboidratos. Ambas as curvas de calibração foram preparadas com glicose.

## 5.5 ANÁLISE DE GLUTATIONA REDUZIDA E OXIDADA

Foram pulverizados 250mg de material vegetal e adicionado ácido fosforoso a 25% (m/V) e tampão fosfato de sódio 100mM pH 8,0. Posteriormente foi feita a centrifugação e o sobrenadante utilizado para a análise de glutathiona reduzida e oxidada.

Para a glutathiona reduzida foi feita a reação com oftaldeído e para a oxidada primeiramente foi utilizado hidróxido de sódio e oftaldeído. Ambos foram analisados em equipamento do tipo fluorímetro dando a amostra excitada em 350nm e a leitura em 420nm seguindo o método de Hissin e Hilf (1976).

## 5.6 ANÁLISE ENZIMÁTICA

Para análise de enzimas seguiu-se o método de Garcia-limões (2002), onde utilizou-se 350mg de material vegetal pulverizado em tampão fosfato de potássio pH 7,5 EDTA 1mM e PMSF 1mM além de ascorbato 5mM. Após a centrifugação o sobrenadante foi utilizado para a estimativa da atividade das enzimas Ascorbato peroxidase (APX), Catalase (CAT), Guaiacol Peroxidase (GPOX) e Superóxido Dismutase (SOD).

### *a) Atividade da APX*

Utilizou-se tampão fosfato de potássio a 50mM com pH 7,0, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como substrato da enzima e ascorbato de sódio 25mM como cofator cuja queda de concentração foi avaliada durante 2 minutos e meio sob leitura em espectrofotômetro em 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Onde 1 unidade de APX é capaz de oxidar  $1\mu\text{mol}$  por minuto de ascorbato.

### *b) Atividade da CAT*

Foi utilizado tampão fosfato de potássio a 50mM com pH 7,0 e como substrato utilizou-se 20 mM de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), cuja redução da concentração foi observada com a leitura da absorbância em espectrofotômetro durante 3 minutos a 240nm ( $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Sendo necessária 1 unidade de CAT para decompor  $1\mu\text{mol}$  por minuto de peróxido de hidrogênio.

### *c) Atividade da GPOX*

O ensaio de cinética foi realizado com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5, guaiacol a 15mM e 0,05% de peróxido de hidrogênio (v/v). A oxidação do guaiacol foi observada pelo decaimento da leitura de absorvância durante 3 minutos em espectrofotômetro a 470nm ( $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Definindo-se, para essas condições, que para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de guaiacol oxidado por minuto é necessária uma unidade de GPOX.

### *d) Análise da SOD*

Para a análise da cinética da SOD foi utilizado tampão fosfato de potássio a 50mM pH 7,8, EDTA a 0,1mM, metionina a 13 mM NBT (nitrobluetetrazolium). As amostras foram incubadas durante 12 minutos sob luz contínua. A leitura da absorvância se deu na faixa de 560nm onde 1 unidade de SOD inibe a redução de NBT em 50%.

Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado o método de Bradford para quantificar as proteínas totais das amostras. Foi dissolvido 100mg de Coomassie blue G250 em 50 mL de 95% etanol. A solução foi misturada a 100 ml de ácido fosfórico a 85% e em seguida o volume foi completado para 1 litro. Após 24 horas de agitação foi realizada a filtração e o filtrado foi utilizado para a quantificação de proteínas (KRUGER, 1994).

## 5.7 ANÁLISE DE CITOGENÉTICA

As sementes que haviam passado pelo priming de 20 horas com poliaminas ou não foram germinadas em papel germiteste umedecido, com três vezes o peso do papel, com manitol a pressão osmótica de -1MPa ou água destilada. As radículas foram coletadas a cada 24 horas e fixadas em Carnoy (1:3 – ácido acético: álcool).

As radículas fixadas em Carnoy foram lavadas com água destilada durante 5 minutos por 3 vezes. Posteriormente foi adicionado ácido clorídrico a 45% (v/v) e foram incubadas a 60°C durante 8 minutos. Repetiu-se o ciclo de lavagem e foi adicionado o Schiff para a coloração. Permaneceram 45 minutos em contato com o corante e então as pontas das raízes foram utilizadas para preparação das lâminas através de esmagamento e espalhamento das células.



Para a contagem das células foi utilizado microscópio e um contador de células. Foram analisados 15 campos contendo 100 células cada um para definir a porcentagem das células em divisão celular (GUERRA; SOUZA, 2002).

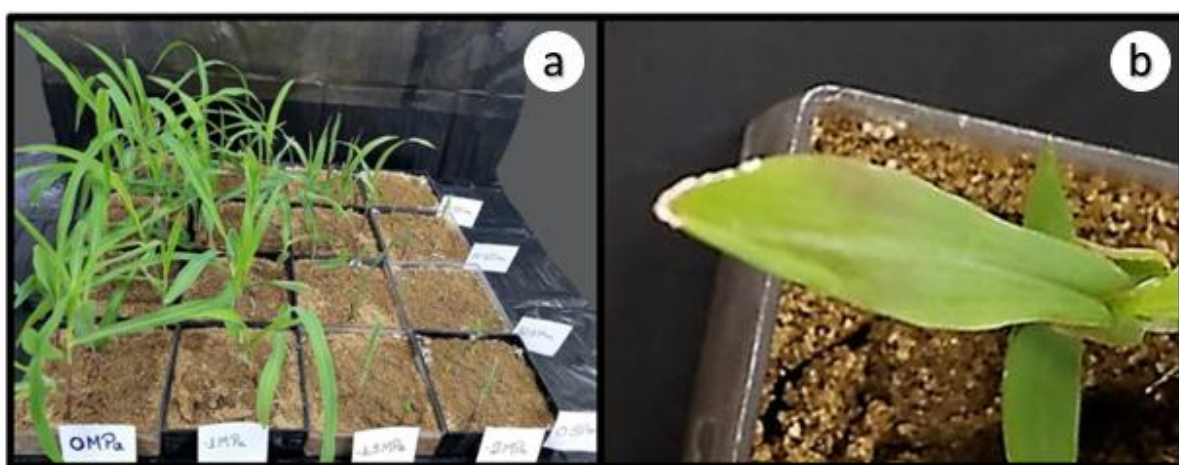
## 5.8 ANÁLISE DOS DADOS

Todo o experimento foi realizado seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e passou por análise de variância do tipo ANOVA pelo teste de comparação de medias scott-knott a 5% de significância. Utilizando o programa de análise estatística R.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os testes preliminares, observou-se que os resultados obtidos com 50 e 100 $\mu$ M eram iguais, optou-se então por testar apenas as concentrações de 10 e 50  $\mu$ M. Já em relação ao potencial osmótico verificou-se que a partir de -1,5 MPa as plantas não se desenvolviam adequadamente, impossibilitando as análises subsequentes, pois as folhas apresentavam enrolamento (Foto 1a) além de em alguns casos ocorrer a translocação do manitol para a parte aérea (Foto 1b). justificando as concentrações utilizadas para a realização dos experimentos.

Foto 1 – plantas de milho BRS1030 após 15 dias de cultivo em câmara do tipo BOD a 30°C.



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Plantas de milho cultivadas sob pressões osmóticas 0;-1,0;-1,5 e -2,0 MPa.

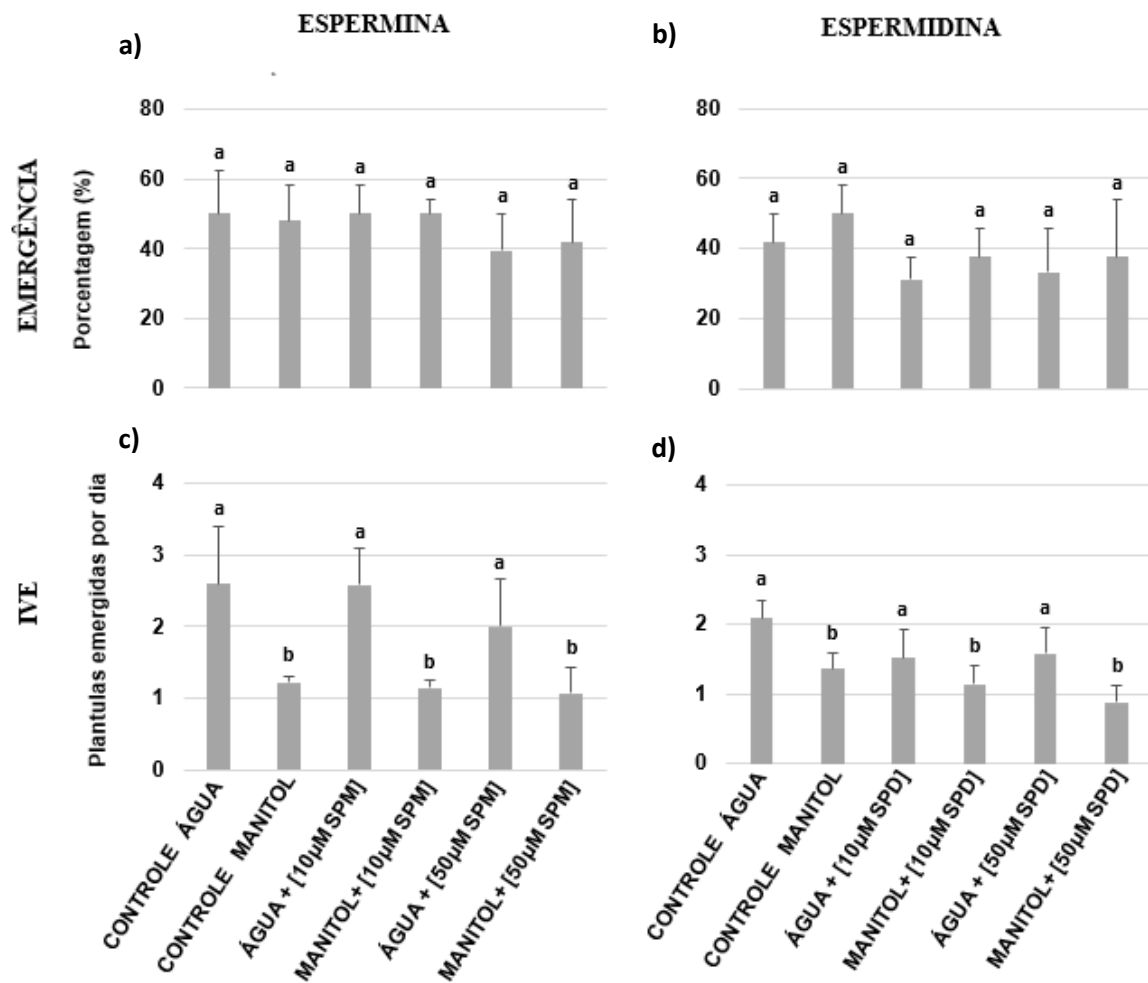
b) Foco na folha de milho que apresenta translocação de manitol.

Para a análise de emergência pode-se observar pela Prancha1 que a porcentagem de emergência (1a e 1b) não houve variação significativa entre os tratamentos, o que é esperado uma vez que a porcentagem de emergência é um parâmetro pouco sensível ao estresse imposto. O fato de todas as sementes terem sido submetida ao processo de pré hidratação garantiu que as sementes tivessem água suficiente para finalizar o processo de germinação.

Já para o Índice de Velocidade de Emergência (1c e 1d) houve uma interferência significativa quando se tratavam das sementes expostas ao estresse hídrico, ocorrendo uma redução desse parâmetro para todos os tratamentos que foram estressados e as poliaminas não foram capazes de reverter essa situação. Sendo importante ressaltar que todos os tratamentos sob estresse não apresentaram variação entre eles. Com isso os tratamentos com as poliaminas

não causaram modificações nos processos germinativos em condições normais e nem em condições de estresse.

Prancha 1 – Porcentagem de emergência e Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Porcentagem de emergência em plantas de milho tratadas com espermina.

b) Porcentagem de emergência em plantas de milho tratadas com espermidina.

c) Índice de Velocidade de Emergência de plantas tratadas com espermina.

d) Índice de Velocidade de Emergência de plantas tratadas com espermidina.

Observa-se assim que não há variação na quantidade de plantas emergidas, mas sim na velocidade que elas emergem. Demonstrando a maior influência do estresse hídrico no atraso

da germinação das sementes (LIU *et al.*, 2015). De acordo com Heydecker (1977), ao ser submetido ao estresse ambiental primeiramente ocorre um decréscimo na velocidade de germinação e só posteriormente a porcentagem de germinação das sementes é afetada. Assim como os dados acima apontam.

Isso ocorre pois o início da germinação depende quase que exclusivamente da entrada de água na semente para que possam iniciar as reações químicas, atividade enzimáticas para aproveitamento do endosperma como fonte de nutriente para o desenvolvimento do embrião.

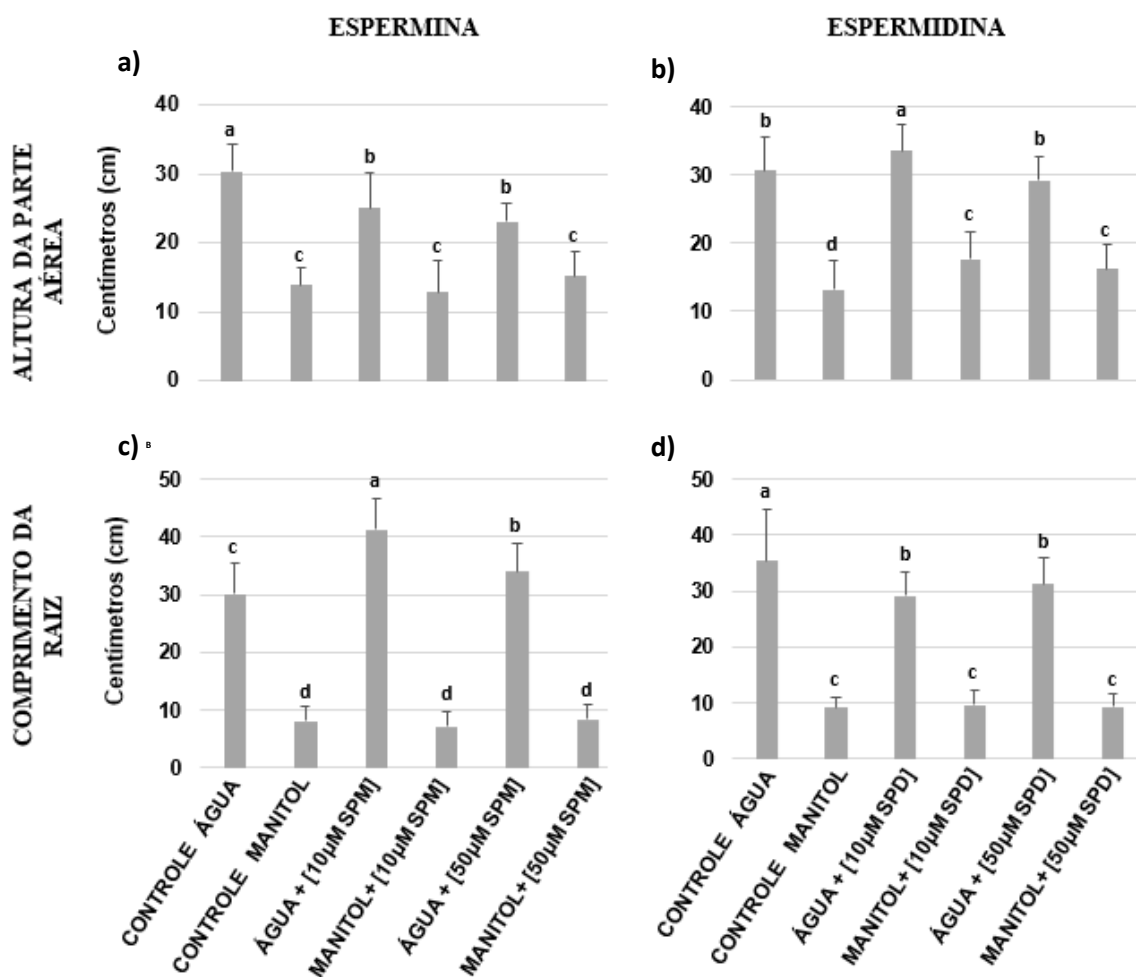
Para a avaliação do crescimento, na Prancha 2 verificamos que a altura da parte aérea (2a) não é influenciada pela espermina quando submetida ao estresse hídrico, uma vez que as maiores plantas foram do controle positivo com uma média de 30cm de altura. Entretanto sua presença parece diminuir o desenvolvimento da parte aérea já que mesmo hidratada as plantas permanecem menores. Para o caso de estarem sobre o efeito do estresse hídrico tanto o controle negativo quando com a presença de espermina não ocorre um bom desenvolvimento da parte aérea.

A espermidina (2b) induziu o crescimento da parte aérea das plantas quando utilizada sem estar sob estresse atingindo uma média de 33,49 cm, superando o controle positivo. Quando colocada sob estresse hídrico, com manitol, a espermidina é capaz de agir, superando significativamente a altura de suas plantas com as do controle negativo, demonstrando potencial para auxiliar no desenvolvimento vegetal em condições adversas.

Para o comprimento da raiz verifica-se que ao contrário do que ocorre na parte aérea, a espermina (2c) age aumentando o comprimento quando usada com água, atingindo 41,31 e 34,03 cm de comprimento para 10 e 50  $\mu$ M de espermina respectivamente, superando e muito o controle positivo (30,12 cm) e negativo (8,03cm), porém não tem efeito sob estresse.

A espermidina (2d) não apresenta um bom desempenho, não sendo capaz de auxiliar no crescimento da raiz quando se encontra sob estresse e inclusive tornando o comprimento inferior ao controle positivo.

Prancha 2 – Altura da Parte Aérea e comprimento de Raiz plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Altura da Parte aérea em plantas milho tratadas com espermina.

b) Altura da Parte aérea em plantas de milho tratadas com espermidina.

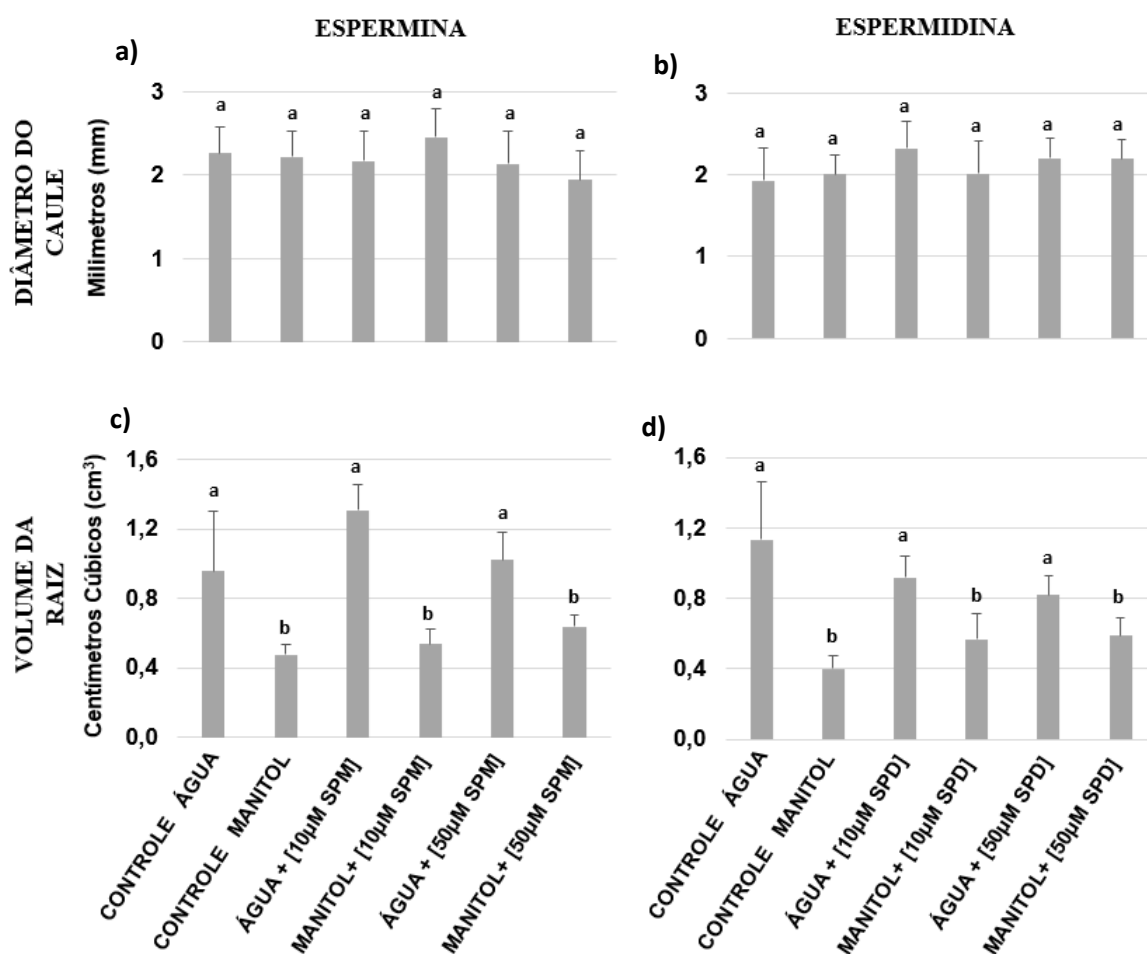
c) Comprimento da raiz de plantas de milho tratadas com espermina.

d) Comprimento da raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

O comportamento contrário observado entre as poliaminas sugere que elas têm ações diferentes durante o desenvolvimento. Os baixos valores obtidos para a altura da parte aérea e comprimento de raiz podem ser explicados uma vez que o crescimento das plantas ocorre através da divisão celular meristemática seguida pelo alongamento celular. Ao ser submetida ao estresse hídrico e conseqüentemente ocorrer a interrupção do fornecimento de água às células meristemáticas, o alongamento celular é severamente inibido, reduzindo a divisão celular e, portanto, o crescimento das plantas (ZIA *et al.*, 2021).

O diâmetro do colmo Prancha 3 permanece sem alterações significativas independentemente do tratamento (3a e 3b) verifica-se a não influência dos tratamentos. Já o volume de raízes (3c e 3d) é maior nas plantas hidratadas, independente da presença ou não de poliaminas. Novamente não sendo capazes de auxilia no desenvolvimento quando imposto o estresse hídrico, situação observada por não diferir estatisticamente do controle negativo.

Prancha 3 – Diâmetro do colmo (mm) e volume das Raízes (cm<sup>3</sup>) de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Diâmetro do caule em plantas milho tratadas com espermina.

b) Diâmetro do caule em plantas de milho tratadas com espermidina.

c) Volume da raiz de plantas de milho tratadas com espermina.

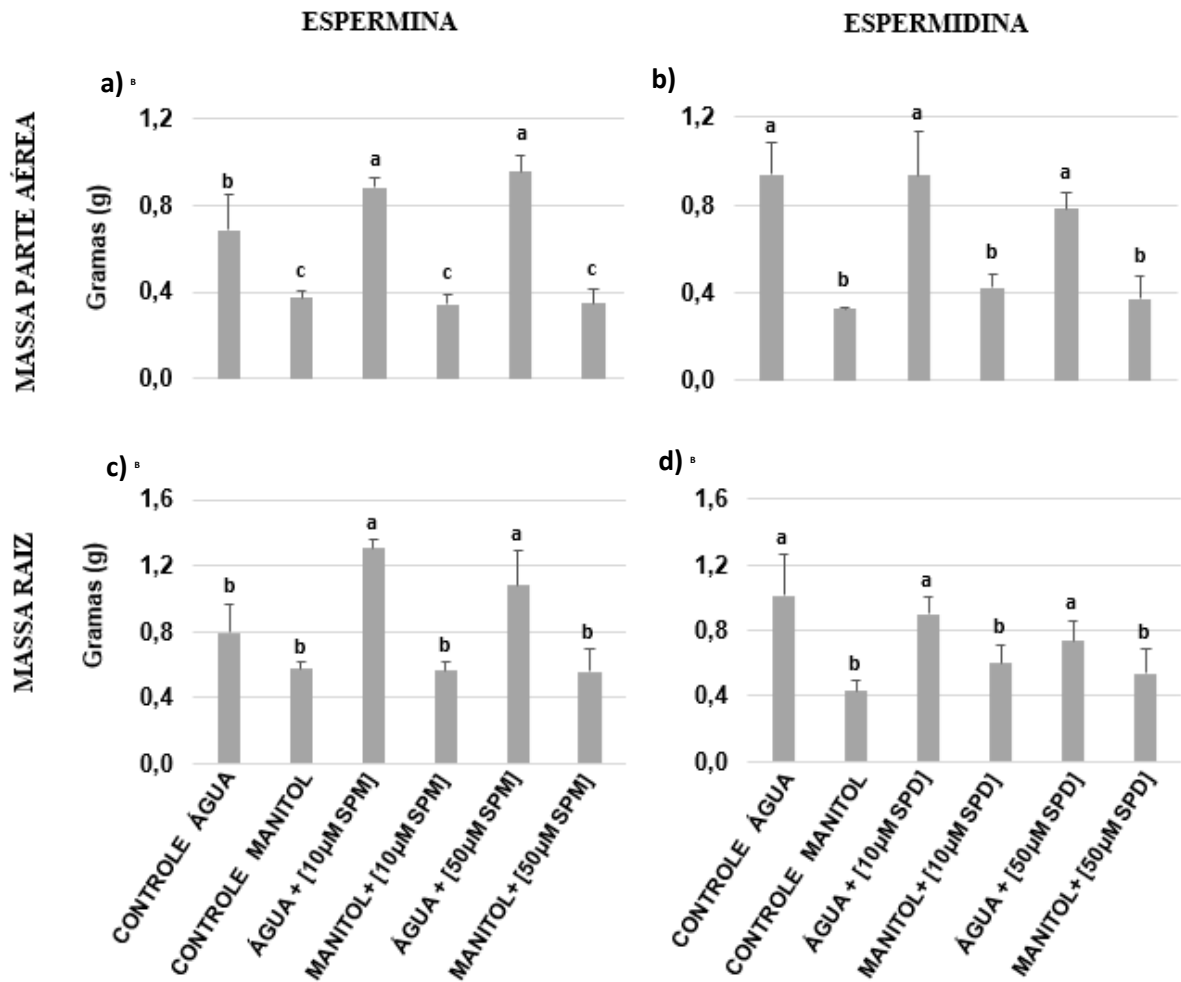
d) Volume da raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

Geralmente, em plantas submetidas ao déficit hídrico o crescimento da raiz é favorecido em relação ao crescimento da parte aérea (KIM *et al.*, 2020). Esta é uma das estratégias de sobrevivência, onde a planta investe em raízes para aumentar o contato com o solo e conseqüentemente a absorção de água. Por se tratar de um híbrido sensível a seca, não verificamos esse comportamento no controle negativo.

Para os parâmetros de massa fresca (Prancha 4) observa-se que a espermina (4a e 4c) leva a um aumento de massa expressivo em comparação com o controle quando usada sem o estresse hídrico tanto da parte aérea quanto da raiz. Já sob estresse ela não é capaz de auxiliar no aumento de massa, igualando significativamente ao controle negativo.

A espermidina(4b e 4d) por outro lado não foi capaz de superar, mas se igualou, significativamente falando, com o desenvolvimento das plantas controle quando hidratadas, e se não favorecendo o valor de massa quando submetida ao estresse se igualando ao controle negativo. Tais observações valem tanto para parte aérea quanto raiz.

Prancha 4 – Massa fresca da Parte Aérea (g) e Raízes (g) de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Massa fresca da parte aérea de plantas milho tratadas com espermina.

b) Massa fresca da parte aérea plantas de milho tratadas com espermidina.

c) Massa fresca da raiz de plantas de milho tratadas com espermina.

d) Massa fresca da raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

Em geral o milho é capaz de tolerar um nível elevado de estresse e manter o crescimento das suas raízes e partes aéreas a níveis de estresse que são inibitórios para plantas C3, como o trigo (*Triticum aestivum*) (NAYYAR, 2003; SIDDIQUE; HAMID; ISLAM, 1999). Entretanto para o crescimento inicial nessas condições de estresse aplicadas houve uma redução na massa e nem mesmo o uso de poliaminas foi capaz de reverter tal situação. Mas a espermina aumenta a massa fresca do milho quando utilizada na ausência do déficit hídrico.

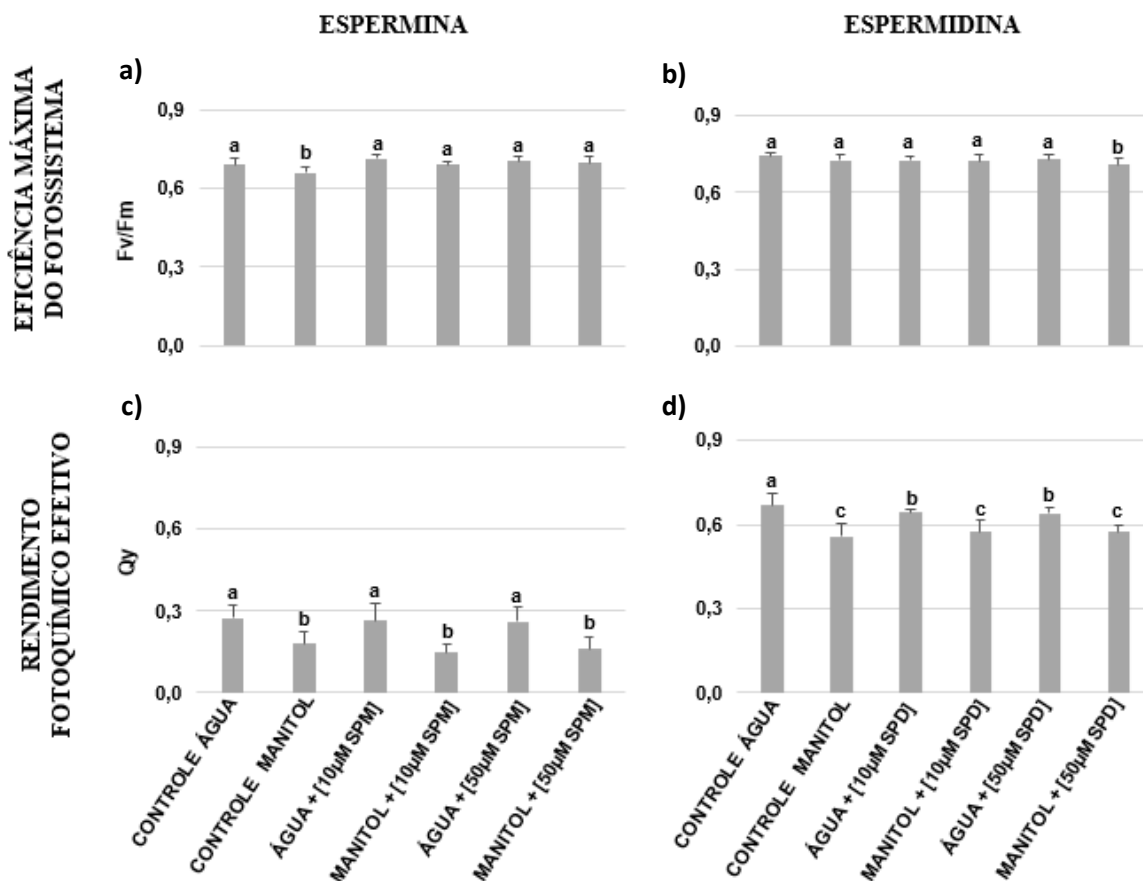


Para os cereais, o bom desempenho do crescimento das plantas é associado com sistemas radiculares bem desenvolvidos, bem como características de plântulas precoces os quais podem ajudar a melhorar a tolerância ao estresse (AHMED *et al.*, 2019; AVRAMOVA *et al.*, 2016; CHLOUPEK *et al.*, 2010). As raízes são um importante órgão de absorção das plantas, o nível desenvolvido das raízes é um dos principais índices de resistência à seca. Do ponto de vista fisiológico, uma ótima relação raiz-parte aérea é benéfica para aliviar o estresse hídrico (LIU *et al.*, 2015). Porém nas concentrações e condições testadas as poliaminas não atribuíram essa característica.

Uma vez que cada uma das poliaminas age influenciado a parte aérea (espermidina) e a outra no desenvolvimento de raiz (espermina), a combinação das duas poderia ser um tratamento capaz de minimizar os danos causados pelo déficit hídrico.

Para os parâmetros de fluorescência da clorofila (Prancha 5), podemos observar que a eficiência máxima do fotossistema ( $F_v/F_m$ ) foi afetada, ficando entre 0,66 e 0,71 para espermina (5A) e 0,70 e 0,74 para espermidina(5B). Tais valores não eram esperados para o tratamento controle, uma vez que de acordo com Bolhar-Nordenkampf *et al.* (1989) quando a planta está com seu aparelho fotossintético intacto, a razão  $F_v/F_m$  deve variar entre 0,75 e 0,85 enquanto queda nesta razão indicaria a presença de dano fotoinibitório nos centros de reação do PSII. Tal relação baixa pode estar relacionada ao fato de as plantas terem cerca de 15 dias ou até mesmo pelo fato de terem sido cultivadas em câmara do tipo BOD.

Prancha 5 – Eficiência máxima do fotossistema ( $F_v/F_m$ ) e rendimento fotoquímico efetivo ( $Q_y$ ) de plantas de milho BRS1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50 $\mu$ M] mensurados na FluorCam 800MF da Photon Systems Instruments.



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Eficiência máxima do fotossistema de plantas milho tratadas com espermina.

b) Eficiência máxima do fotossistema de plantas milho tratadas com espermidina.

c) Rendimento fotoquímico efetivo de plantas de milho tratadas com espermina.

d) Rendimento fotoquímico efetivo de plantas de milho tratadas com espermidina.

Os resultados sobre a relação  $F_v/F_m$  obtidos sob a redução do potencial hídrico são contraditórias em literatura. Lichtenthaler e Miehé (1997) afirmam que, em geral, as plantas apresentam sintomas característicos em seu aparato fotossintético, tal como rápido decréscimo na relação  $F_v/F_m$  sempre que o solo seca, como em milho (CRUZ, 2006). Em contrapartida, Ghannoum *et al.* (2003) não encontraram alterações significativas na relação  $F_v/F_m$  em quatro espécies de gramíneas de ciclo C<sub>4</sub>, indicando que a capacidade de transporte de elétrons não foi alterada em função do estresse hídrico. Há também relatos que a fluorescência máxima da

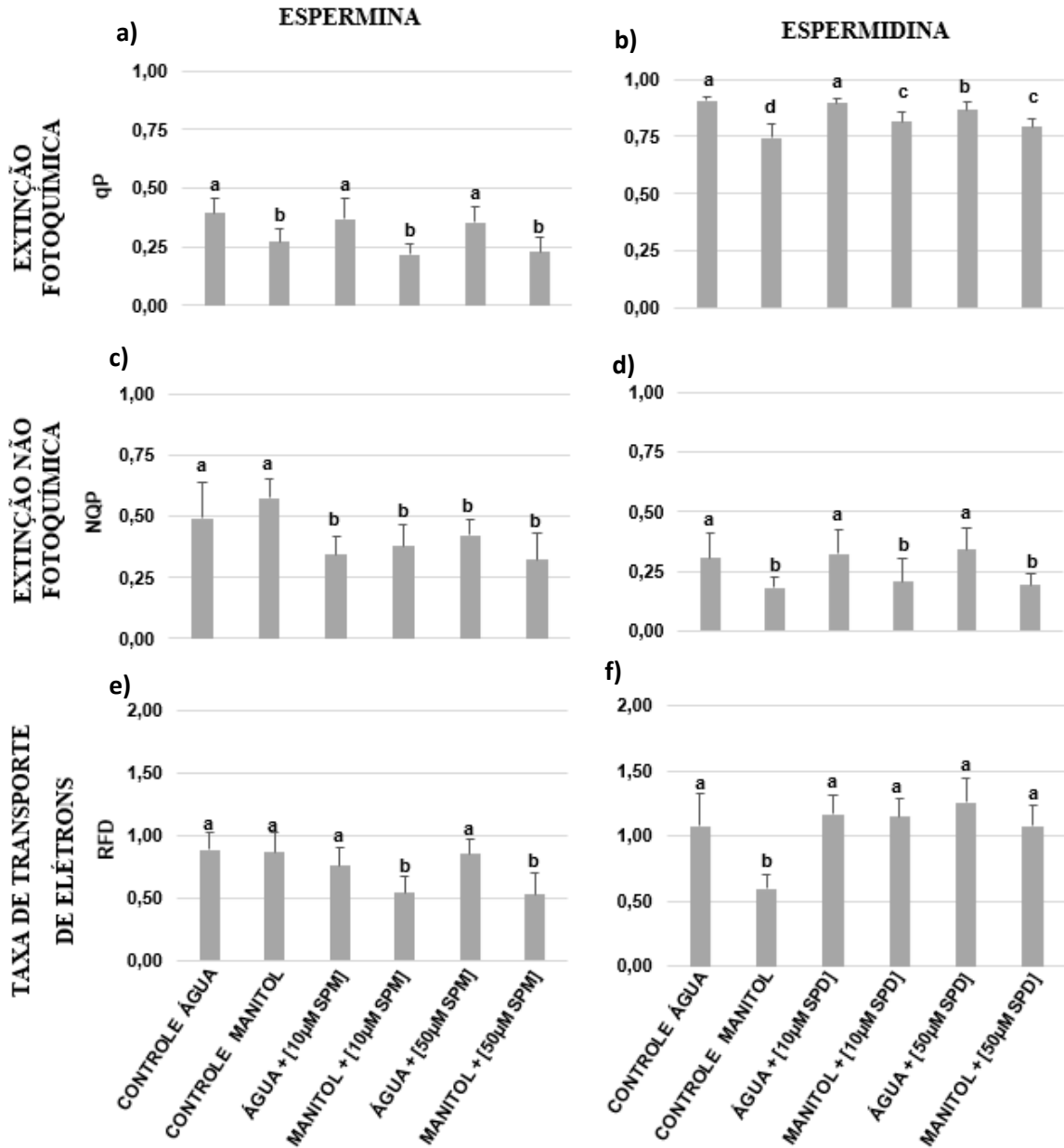
clorofila a é afetada apenas após longo tempo de exposição ao estresse hídrico (SHIN *et al.*, 2021); o que explicaria a similaridade dos resultados dos tratamentos com o controle.

Para o rendimento quântico efetivo, as plantas tratadas com espermina (5c) sob o estresse hídrico, a poliamina não é capaz de influenciar neste parâmetro mantendo os valores estatisticamente iguais aos do controle, tanto positivo quanto negativo. Já para espermidina (5d) aparentemente traz um leve decréscimo quando aplicada em plantas bem hidratadas e quando sob estresse não diferencia estatisticamente do controle negativo.

O rendimento da fluorescência da clorofila a é uma técnica que mensura o nível de excitação da energia no sistema de pigmentos que dirigem a fotossíntese e fornece subsídios para estimar a inibição ou o dano no processo de transferência de elétrons no fotossistema II (PSII) (BOLHAR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). Geralmente, condições de estresse ambiental podem afetar os eventos nos tilacóides, interferindo assim na eficiência da fotossíntese, comprometendo o transporte de elétrons, e limitando a produção de ATP e NADPH<sub>2</sub> (KRAUSE, 1991; TATAGIBA; PEZZOPANE; REIS, 2015).

Os valores encontrados para o coeficiente de extinção fotoquímica (qP) na Prancha 6 para a espermina (6a) demonstram que não há ação da espermina sobre esse parâmetro com os valores se mantendo iguais aos dos controles. Já o tratamento com espermidina (6b) parece afetar negativamente ocorrendo redução desse parâmetro quando usada em plantas bem hidratadas uma vez que os valores são inferiores ao controle positivo e não exercendo ação sob estresse, se igualando ao controle negativo.

Prancha 6 – Extinção fotoquímica (qP), Extinção não fotoquímica (NPQ) e Taxa de transferência de elétrons (RFD) de plantas de milho BRS1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM] mensurados na Fluorcam 800MF da Photon Systems Instruments.



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Extinção fotoquímica de plantas milho tratadas com espermina.

b) Extinção fotoquímica de plantas de milho tratadas com espermidina.

c) Extinção não fotoquímica de plantas de milho tratadas com espermina.

d) Extinção não fotoquímica de plantas de milho tratadas com espermidina.

e) Taxa de transporte de elétrons de plantas milho tratadas com espermina.

f) Taxa de transporte de elétrons de plantas milho tratadas com espermidina.

A espermina (6c) apresenta valores de NQP mais baixos que os controles positivo e negativo. Já a espermidina (6d) as plantas hidratadas se igualaram ao controle positivo.

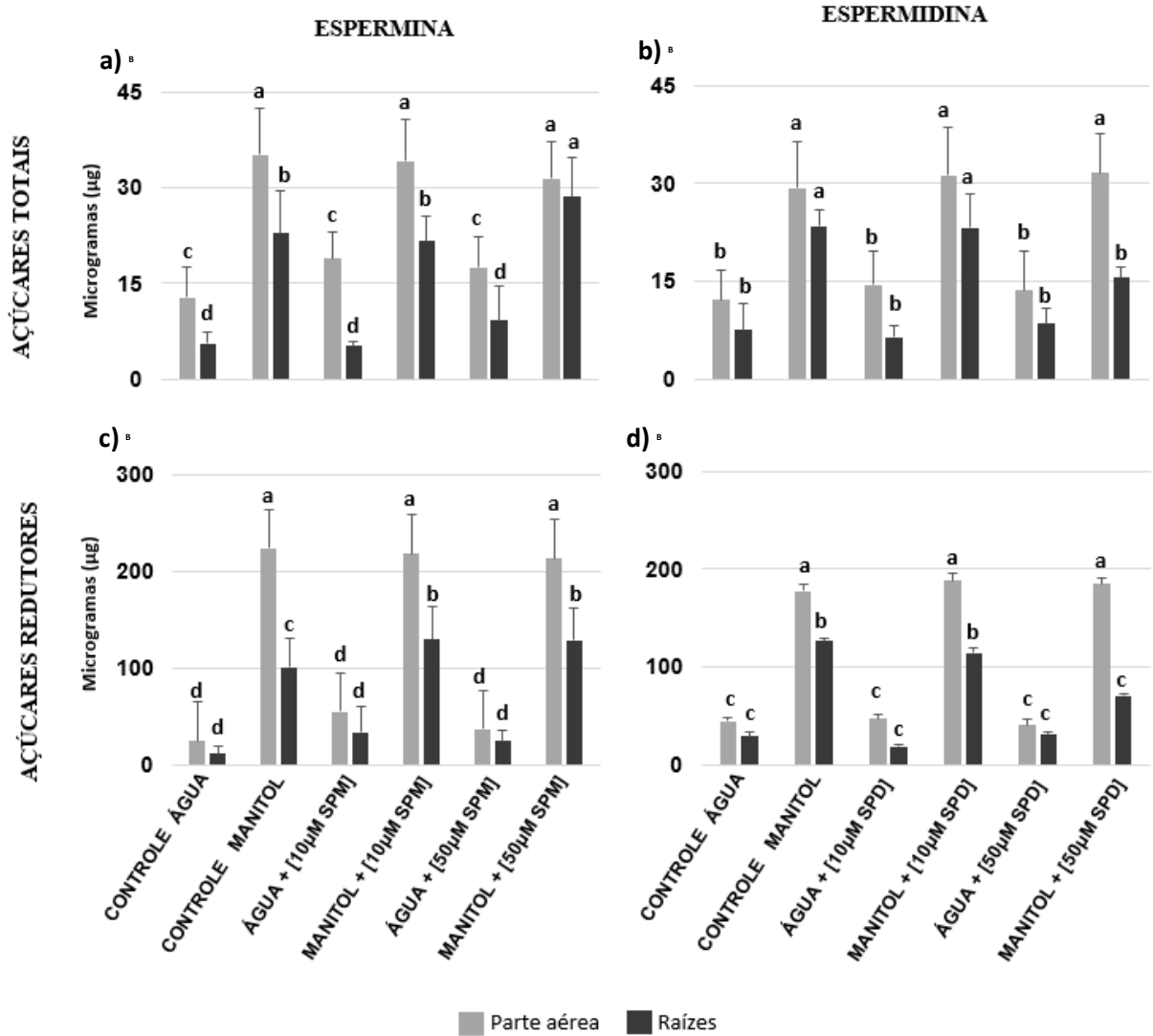
Para a taxa de transporte de elétrons (RFD) quando tratadas com espermina (6e) e submetidas ao estresse as plantas apresentam valores mais baixos até mesmo que o controle negativo. Espermidina (6f) todos os valores são superiores ao controle negativo.

O quenching fotoquímico (qP) representa a dissipação da fluorescência da clorofila associada às reações fotoquímicas, relacionado com a quantificação da energia de excitação capturada pelos centros de reação abertos (Quinona a oxidada), a fração “aberta” do PSII em relação à fração total desse fotossistema.

A extinção não fotoquímica (NQP) é a quantidade de energia que é perdida na forma principalmente de calor, o que não é bom para as plantas que deveriam aproveitar ao máximo a energia que atinge os centros de reação. Avaliando os resultados observa-se que a espermidina foi mais eficiente para evitar danos ao fotossistema, pois apresentou valores mais altos de qP e mais baixos de NQP demonstrando um bom funcionamento do fotossistema. Isso corrobora com os dados de biometria onde a espermidina influencia mais no desenvolvimento da parte aérea.

Os açúcares totais e redutores (Prancha 7) se apresentam em maior concentração na parte aérea das plantas estressadas e independentemente da poliamina utilizada, espermina (7a e 7c) ou espermidina (7b e 7d) a média é significativamente igual ao controle negativo. Com relação a concentração desses açúcares na raiz verificamos que os valores são maiores que o controle negativo quando se tem o uso de espermina, superando inclusive o controle negativo. Em geral é esperado pois o aumento dos teores de açúcares são um mecanismo de defesa das plantas ao estresse hídrico, tais resultados evidenciam a ação observada nos parâmetros biométricos de influência da espermina na raiz do milho.

Prancha 7 – Açúcares totais e redutores ( $\mu\text{g}$ ) de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50 $\mu\text{M}$ ].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

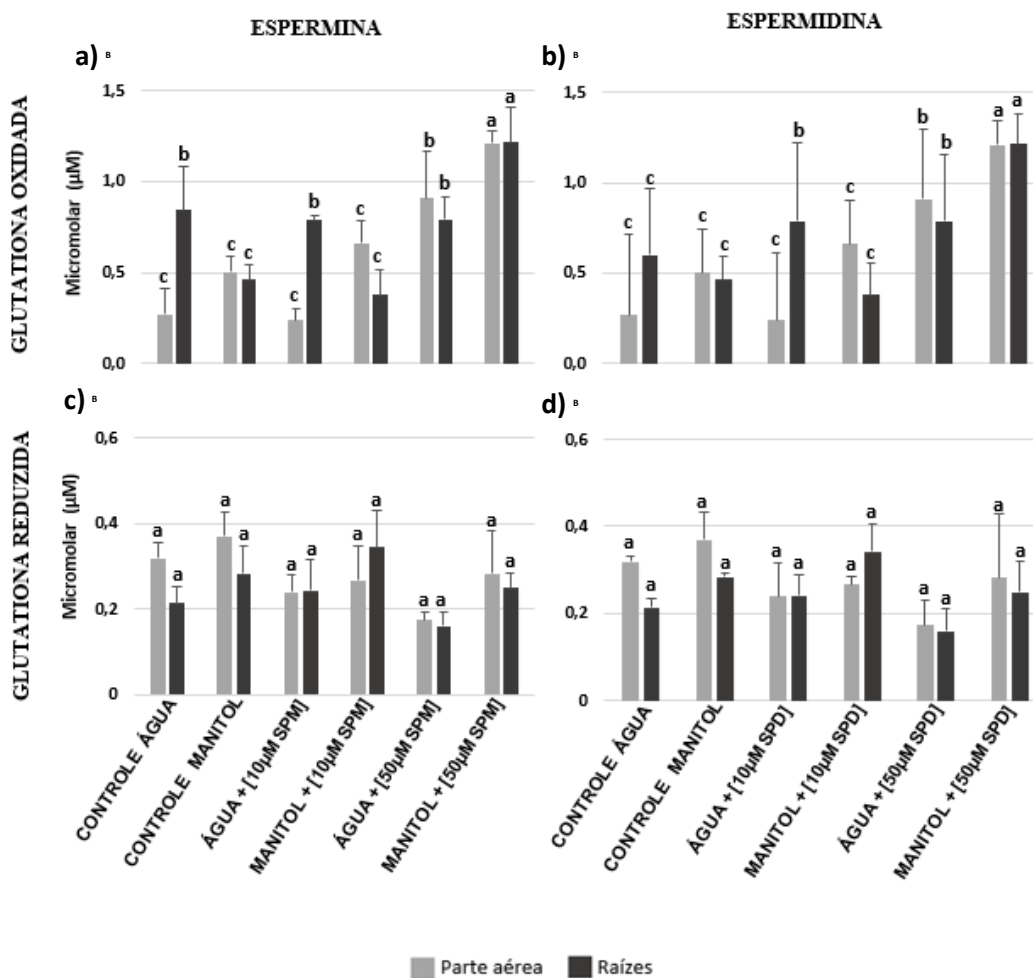
- Legenda: a) Concentração de açúcares totais da parte aérea e raiz de plantas milho tratadas com espermina.  
 b) Concentração de açúcares totais da parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.  
 c) Concentração de açúcares redutores da parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermina.  
 d) Concentração de açúcares redutores da parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

Esse alta concentração de açúcares está relacionada à compensação osmótica onde a planta busca aumentar o potencial na folha através de açúcares. Isso ocorre para que mesmo com o potencial hídrico da rizosfera (o microambiente que envolve a raiz) mais baixo devido ao déficit hídrico, as plantas continuem a absorver água desde que o potencial da planta seja mais baixo (mais negativo) do que na água do solo. Ou seja, o ajuste osmótico é a capacidade das células vegetais de acumular solutos e usá-los para baixar o potencial da durante períodos de estresse (TAIZ *et al.*, 2017). Isso demonstra que as plantas reagiram ao fator estressante do déficit hídrico.

Além dessa função de agente osmótico, acredita-se que sob estresse hídrico os açúcares solúveis possam funcionar como osmoprotetores (BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995; INGRAM; BARTELS, 1996; TAN *et al.*, 2006). Dessa maneira são capazes de estabilizar proteínas e membranas, provavelmente substituindo a água na formação de ligações de hidrogênio por resíduos polipeptídicos polares e grupos fosfolípídios fosfato (CROWE; HOEKSTRA; CROWE, 1992; STRAUSS; HAUSER, 1986; TAN *et al.*, 2006).

Avaliando as formas de combate as espécies reativas de oxigênio que são formadas pelo estresse hídrico, as concentrações de glutatona oxidada (Prancha 8) são maiores nos tratamentos estressados e tratados com 50 $\mu$ M de ambas poliaminas (8A e 8B) tanto na parte aérea quanto nas raízes. Já a glutatona reduzida (8C e 8D), não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Prancha 8 – Concentração de Glutaciona oxidada e reduzida ( $\mu\text{M}$ ) de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50 $\mu\text{M}$ ].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Concentração de glutaciona oxidada da parte aérea e raiz de plantas milho tratadas com espermina.

b) Concentração de glutaciona oxidada da parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

c) Concentração de glutaciona reduzida da parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermina.

d) Concentração de glutaciona reduzida da parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutaciona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis muito altos (SIES; MOSS, 1978). No caso do milho



tratado com as poliaminas isso não ocorreu uma vez que os valores de glutathiona oxidada são maiores.

A glutathiona e suas enzimas metabólicas interagem com os reguladores de crescimento das plantas, que são considerados vitais para o estabelecimento da planta (HASANUZZAMAN *et al.*, 2017). A elevação do nível de Glutathiona reduzida endógeno aumenta a divisão celular na região meristemática da raiz e esse alongamento é uma importante adaptação morfológica à seca (VERNOUX *et al.*, 2000; ZIA *et al.*, 2021 ).

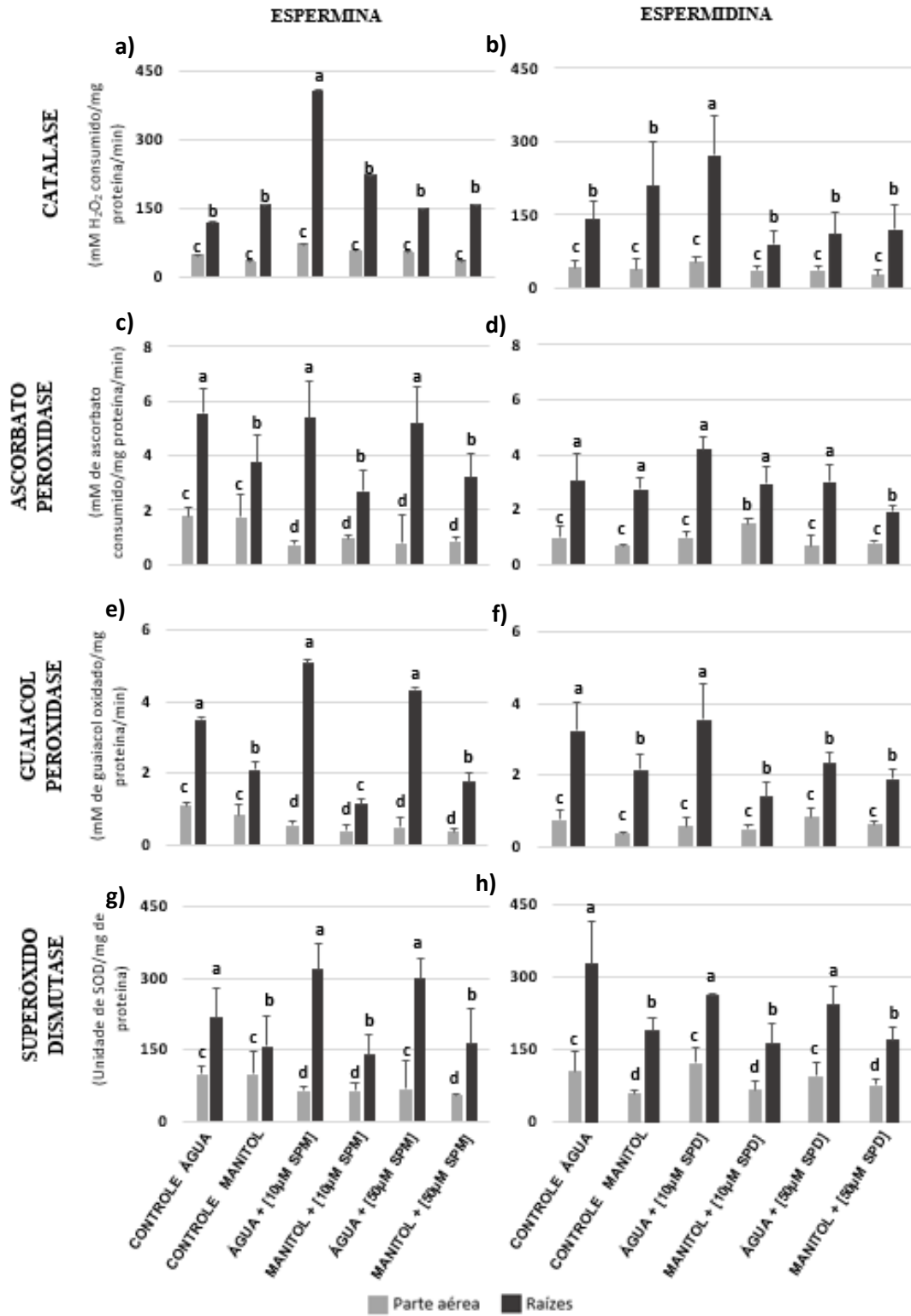
Estudos confirmaram que níveis elevados de glutathiona reduzida endógenos podem conferir tolerância ao estresse hídrico e melhorar os danos induzidos por EROs. Glutathiona e seus antioxidantes relacionados foram observados para reduzir o estresse osmótico em milho e em plantas de trigo. Onde o aumento da atividade da glutathiona redutase é proporcional ao aumento de estresse hídrico (KOCSY; SZALAI; GALIBA, 2002).

Ainda Koffler *et al.* (2014) demonstraram os papéis de sinalização da glutathiona reduzida em *Arabidopsis thaliana* sob estresse hídrico. Os autores concluíram que a glutathiona reduzida foi usada para indicar o estresse hídrico percebido pelas raízes às folhas em momentos iniciais.

Analisando os resultados percebe-se que as concentrações enzimáticas (Prancha 9) são superiores nas raízes para todas as enzimas. Isso era esperado uma vez que essas enzimas funcionam como mecanismo para diminuir danos causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs).

Para a espermina e espermidina todas as concentrações enzimáticas se mostram mais altas nas raízes de plantas que germinaram de sementes tratadas com 10 ou 50 $\mu$ M e areia umedecida com água sendo superiores ou iguais ao controle.

Prancha 9 - Concentrações enzimáticas de Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), Guaiacol Peroxidase (GPOX) e Superóxido Dismutase (SOD) de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM].



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

- Legenda: a) Atividade enzimática da catalase na parte aérea e raiz de plantas milho tratadas com espermina.
- b) Atividade enzimática da catalase na parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.
- c) Atividade enzimática da ascorbato peroxidase na parte aérea e raiz de plantas milho tratadas com espermina.
- d) Atividade enzimática da ascorbato peroxidase na parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.
- e) Atividade enzimática da guaiacol peroxidase na parte aérea e raiz de plantas milho tratadas com espermina.
- f) Atividade enzimática da guaiacol peroxidase na parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.
- g) Atividade enzimática da superóxido dismutase na parte aérea e raiz de plantas milho tratadas com espermina.
- h) Atividade enzimática da superóxido dismutase na parte aérea e raiz de plantas de milho tratadas com espermidina.

O déficit hídrico afeta a condutância estomática, taxa de transporte de elétrons na membrana, difusão de  $\text{CO}_2$ , eficiência de carboxilação e fotossíntese isso leva à geração de EROs (HASANUZZAMAN *et al.*, 2017). Essas EROs são altamente reativas a lipídios de membrana, proteínas e DNA, dessa forma se tornam responsáveis por lesões e danos celulares. Para combater essas moléculas a planta recorre a enzimas como Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) que são indicadores comuns e importantes de avaliação da resistência à seca, onde o aumento da atividade dessas enzimas indicam maior resistência à seca (AHMAD *et al.*, 2021; HASANUZZAMAN *et al.*, 2017; JOHNSON; PUTHUR, 2021; NAHAR *et al.*, 2016).

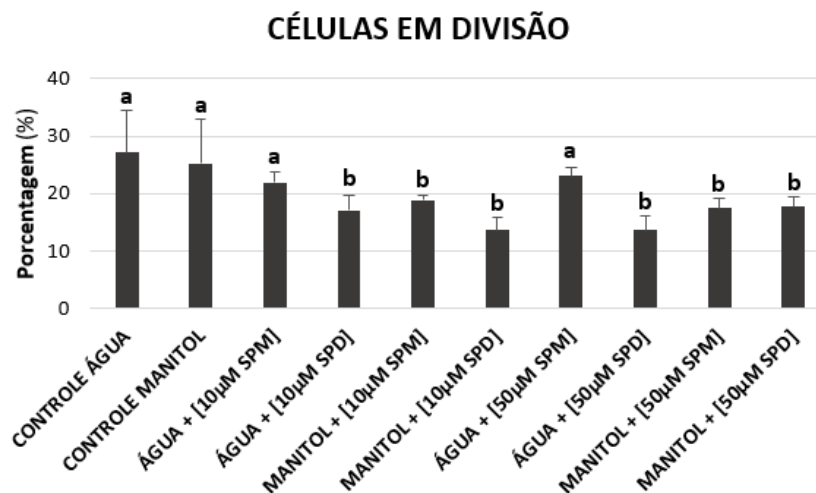
As EROs se acumulam nas células quando sofrem algum tipo de estresse ambiental. Essas células são então detoxificadas por enzimas especializadas e antioxidantes, um processo referido como inativação de EROs. Os antioxidantes biológicos são compostos orgânicos pequenos ou peptídeos pequenos que podem aceitar elétrons de EROs como superóxido ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  e neutralizá-los (TAIZ *et al.*, 2017).

De acordo com Li *et al.* (2014) o priming de sementes de trevo branco (*Trifolium repens*) com espermidina (SPD) induziu tolerância ao estresse hídrico, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, o ciclo ascorbato-glutationa e a eliminação de EROs e diminuindo os níveis de peroxidação lipídica, além de melhorar a estabilidade da membrana celular e o

metabolismo do amido. O mesmo é relatado por Paul e Roychoudhury (2016) que observaram a diminuição os danos oxidativos; modulação de antioxidantes, osmólitos e sistemas de fotossíntese; aumentando a ativação de enzimas antioxidantes; e redução dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA em plantas de arroz que foram tratadas com priming de espermina.(PAUL; ROYCHOUDHURY, 2016)

A espermidina aparentemente influenciou negativamente na divisão celular (Prancha 10) do milho enquanto que a espermina não apresentou nenhuma interferência.

Prancha 10 – Porcentagem de células em divisão de plantas de milho BRS 1030 cultivadas em areia e umedecida com água ou manitol [-1,0MPa] tendo passado por priming de 20 horas com água, ou espermina, ou espermidina [10 e 50µM].

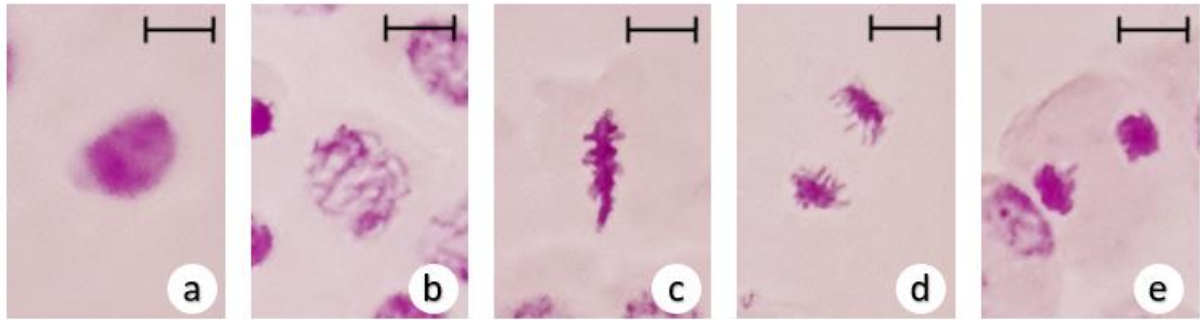


Fonte: ESTEVES, G. (2022)

O que não era esperado, uma vez que as poliaminas estão ligadas a estabilidade da membrana celular e conseqüentemente a divisão celular. Anteriormente foi visto que a espermina levou ao aumento do comprimento de raiz esperava-se um aumento na divisão celular.

Mesmo com essa diminuição das taxas de divisão causada pelo uso da espermidina foram encontradas células normais em divisão (Foto 2), em todos os tratamentos, sem uma taxa expressiva de anormalidades nos tratamentos avaliados, o que nos mostra que os tratamentos não causam danos os cromossomos. Diante de tal resultado pode-se considerar que o aumento do comprimento da raiz observado como uso de espermina possa ter sido consequência de células maiores e mais turgidas ao invés de uma maior quantidade de células.

Foto 2 – Etapas do ciclo de divisão celular de células de ponta de raiz de milho.



Fonte: ESTEVES, G. (2022)

Legenda: a) Interfase  
b) Prófase  
c) Metáfase

d) Anáfase  
e) Telófase  
Barra = 10 $\mu$ m

O estresse por seca causa crescimento e desenvolvimento anormais das plantas, inibindo a proliferação e expansão celular (AHMAD *et al.*, 2022). O fato dessas anormalidades não terem sido encontradas mostra que os tratamentos foram capazes de influenciar positivamente mantendo a normalidade celular.

O fato de as sementes terem passado pelo processo de hidratação controlada de 20 horas antes da plotagem do experimento, favoreceu a fase de embebição, que leva a alocação acelerada de nutrientes para o meristema o que torna possível que a semente autotrófica se torne uma plântula heterotrófica (BAHRABADI *et al.*, 2022; SOLTANI; GHOLIPOOR; ZEINALI, 2006) e não interferindo a protusão da radícula. Tal resultado corrobora com os dados obtidos sobre a porcentagem de germinação que não apresentou queda devido a seca.

## 7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a espermina e a espermidina usadas isoladamente, nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  não são capazes de mitigar efetivamente os efeitos do estresse hídrico, porém podem auxiliar em alguns parâmetros de desenvolvimento do milho sem estresse.

A espermina favorece o desenvolvimento das raízes e portando os parâmetros relacionados a ela como comprimento e volume radicular, aumento das concentrações de açúcares nas raízes. Enquanto a espermidina age principalmente na parte aérea favorecendo o desenvolvimento e protegendo o fotossistema. Ambas as poliaminas aumentam a atividade enzimática antioxidativa. Entretanto a ação das poliaminas separadamente é mais efetiva quando a planta se encontra em condições ótimas de hidratação.

Pelo fato de não apresentarem o mesmo comportamento, auxiliando no desenvolvimento vegetal cada uma a sua maneira é interessante que se estude a combinação delas em busca de uma ação mais efetiva de mitigação dos efeitos causados pela seca.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, A. M.; MASHAHEET, A. M.; BURKEY, K. O. Super absorbent polymers mitigate drought stress in corn (*Zea mays* L.) grown under rainfed conditions. **Agricultural Water Management**, [s.l.] v. 254, p.13, 2021.
- AFZAL, I. *et al.* Recent advances in seed enhancements. In: ARAUJO, S. , & BALESTRAZZI, A. (Ed.). **New challenges in seed biology-basic and translational research driving seed technology**. [s.l.] INTECH, 2016. p. 47–74.
- AHMAD, S. *et al.* Ameliorative effect of melatonin improves drought tolerance by regulating growth, photosynthetic traits and leaf ultrastructure of maize seedlings. **BMC Plant Biology**, [s.l.] v. 21, n. 1, p. 1–14, 2021.
- AHMAD, S. *et al.* Interactive Effects of Melatonin and Nitrogen Improve Drought Tolerance of Maize Seedlings by Regulating Growth and Physiochemical Attributes. **Antioxidants** [s.l.], v. 11, n. 2, 2022.
- AHMED, A. A.; EL-MAHDY, A. A. Improving seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays*, L.) seed by soaking in water and moringa oleifera leaf extract. **Current Chemistry Letters**, [s.l.] v. 11, n. 2, p. 147–156, 2022.
- AHMED, H. G. M. D. *et al.* Selection criteria for drought-tolerant bread wheat genotypes at seedling stage. **Sustainability (Switzerland)**, [s.l.]v. 11, n. 9, p. 1–17, 2019.
- ALCÁZAR, R.; TIBURCIO, A. F. **Polyamines Methods and Protocols**. Barcelona: Springer Nature, 2018.
- ALHARBY, H. F. *et al.* Maize grain extract enriched with polyamines alleviates drought stress in *triticum aestivum* through up-regulation of the ascorbate–glutathione cycle, glyoxalase system, and polyamine gene expression. **Agronomy**, [s.l.] v. 11, n. 5, 2021.
- ÁVILA, M. R. *et al.* Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.] v. 29, p. 98–106, 2007.
- AVRAMOVA, V. *et al.* Screening for drought tolerance of maize hybrids by multi-scale analysis of root and shoot traits at the seedling stage. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.] v. 67, n. 8, p. 2453–2466, 2016.
- BAHRABADI, E. *et al.* Abscisic, gibberellic, and salicylic acids effects on germination indices of corn under salinity and drought stresses. **Journal of Crop Improvement**, [s.l.] v. 36, n. 1, p. 73–89, 2022.
- BHANUPRAKASH, K.; YOGESHHA, H. S. Abiotic stress physiology of horticultural crops. In: **Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops**. Springer India p. 103–117, 2016.
- BIONDI, S. *et al.* The polyamine “multiverse” and stress mitigation in crops: A case study with seed priming in quinoa. **Scientia Horticulturae**, [s.l.] v. 304, n. June, p. 16, 2022.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, [s.l.] v. 7, n. 7, p. 1099–1111, 1995.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. *et al.* Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation. **Functional Ecology**, [s.l.] v. 3, n. 4, p. 497, 1989.

BOTELHO, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. DE A. Estresse hídrico e reguladores de crescimento na germinação de sementes de canafístula. **Scientia Agricola**, [s.l.] v. 58, n. 1, p. 43–49, 2001.

BRADFORD, K. J. A Water Relations Analysis of Seed Germination Rates. **Plant Physiology**, [s.l.] v. 94, n. 2, p. 840–849, 1990.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes**. [s.l.] p. 399, 2009.

BRITANNICA (ED.). **The outer layers and internal structures of a kernel of corn**. Encyclopaedia Britannica, Inc, [s.l.] 1996.

BROCKLEHURST, P. A.; DEARMAN, J. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. I. Laboratory germination. **Annals of Applied Biology**, [s.l.] v. 102, n. 3, p. 577–584, 1983.

CAO, D. D. *et al.* Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of sh2 sweet corn (*Zea mays* L.) seed. **Scientia Horticulturae**, [s.l.] v. 123, n. 3, p. 301–307, 2010.

CHLOUPEK, O. *et al.* Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. **Plant Breeding**, [s.l.] v. 129, n. 6, p. 630–636, 2010.

CÔME, D.; THÉVENOT, C. Environmental control of embryo dormancy and germination. In: **The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination**. [s.l.] p. 271–298, 1982.

CONAB. BRAZILIAN NATIONAL FOOD SUPPLY AGENCY. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Boletim da Safra 2021**, [s.l.] v. 9, p. 60, 2022.

CORBINEAU, F.; CÔME, D. Priming: a technique for improving seed quality. **Seed testing international**, [s.l.] v. 132, p. 38–40, 2006.

CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M. Anhydrobiosis. **Ann. Rev. Physiol**, [s.l.] v. 54, p. 579–599, 1992.

CRUZ, R. F. D. **Indução e recuperação do stresse hídrico em variedades portuguesas de milho**. [s.l.] Universidade do Minho, 2006.

DÍAZ, A.; TABERNER, A.; VILAPLANA, L. The emergence of a new weed in maize plantations: characterization and genetic structure using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [s.l.] v. 67, n. 1, p. 225–239, 2020.



ELLIS, R. H.; BUTCHER, P. D. The effects of priming and “natural” differences in quality amongst onion seed lots on the response of the rate of germination to temperature and the identification of the characteristics under genotypic control. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.] v. 39, n. 7, p. 935–950, 1988.

EVENARI, M. Seed Physiology : Its History from Antiquity to th Beginning of the 20th Century. **Botanical Review**, [s.l.] v. 50, n. 2, p. 119–142, 1984.

FAO. **Alimentação e Agricultura Mundial – Anuário Estatístico 2021**. Roma.: [s.n.].

FAROOQ, M. *et al.* Review article Plant drought stress : e ff ects , mechanisms and management. **Agron. Sustain. Dev**, [s.l.] v. 29, p. 185–212, 2009.

FAROOQ, M. *et al.* Exogenous application of allelopathic water extracts helps improving tolerance against terminal heat and drought stresses in bread wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, [s.l.] v. 204, n. 3, p. 298–312, 2018.

FERGUSON, J. N. Climate change and abiotic stress mechanisms in plants. **Emerging Topics in Life Sciences**, [s.l.] v. 3, n. 2, p. 165–181, 2019.

GHANNOUM, O. *et al.* Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, [s.l.] v. 159, n. 3, p. 599–608, 2003.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. DE. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citgenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, [s.l.] v. 23, n. 2, p. 249–268, 2017.

HASSAN, N. Exogenous application of spermine and putrescine mitigate adversities of drought stress in wheat by protecting membranes and chloroplast ultra-structure. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, [s.l.] v. 26, n. 2, p. 233–245, 2020.

HEYDECKER, W. Stress and seed germination:an agronomic view. In: **The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination**. [s.l.] p. 237–282, 1977

HILL, H. J. *et al.* Primed lettuce seeds exhibit increased sensitivity to moisture during aging. **HortScience**, [s.l.] v. 42, n. 6, p. 1436–1439, 2007.

HODGES, R. . F. G. Estudos de caso no manuseio e armazenamento de mercadorias duráveis. In: **Crop Post-Harvest : Science and Technology**, [s.l.] v. 2 p. 293, 1993.

HUSSAIN, S. *et al.* Physiological and biochemical mechanisms of seed priming-induced chilling tolerance in rice cultivars. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.] v. 7, n. FEB2016, p. 1–14, 2016.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual**

**Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s.l.] v. 47, n. 1, p. 377–403, 1996.

IQBAL, M.; ASHRAF, M. Changes in Hormonal Balance: A Possible Mechanism of Pre-Sowing Chilling-Induced Salt Tolerance in Spring Wheat. **Journal of Agronomy and Crop Science**, [s.l.] v. 196, n. 6, p. 440–454, 2010.

IŞERI, Ö. D.; SAHIN, F. I.; HABERAL, M. Sodium Chloride Priming Improves Salinity Response of Tomato At Seedling Stage. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.] v. 37, n. 3, p. 374–392, 2014.

JOHNSON, R.; PUTHUR, J. T. Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.] v. 162, p. 247–257, 2021.

KHAN, N.; BANO, A.; BABAR, M. A. The stimulatory effects of plant growth promoting rhizobacteria and plant growth regulators on wheat physiology grown in sandy soil. **Archives of Microbiology**, [s.l.] v. 201, n. 6, p. 769–785, 2019.

KIM, Y. *et al.* Root response to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.] v. 21, n. 4, p. 12–14, 2020.

KISTLER, L. *et al.* Multiproxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. **Science**, [s.l.] v. 362, n. 6420, p. 1309–1313, 2018.

KOCSY, G.; SZALAI, G.; GALIBA, G. Induction of glutathione synthesis and glutathione reductase activity by abiotic stresses in maize and wheat. **TheScientificWorldJournal**, [s.l.] v. 2, p. 1699–1705, 2002.

KOFFLER, B. E. *et al.* Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis*. **Plant Science**, [s.l.] v. 227, p. 133–144, 2014.

KRAUSE, G. H. CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AND PHOTOSYNTHESIS: The Basics. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology**, [s.l.] v. 42, p. 313–349, 1991.

KRUG, C. A.; VIÉGAS, G. P.; PAOLIÉRI, L. Híbridos comerciais de milho. **Bragantia**, [s.l.] v. 3, n. 11, p. 367–552, 1943.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s.l.]v. 32, p. 9–15, 1994.

LI, Z. *et al.* Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression. **Molecules**, [s.l.] v. 19, n. 11, p. 18003–18024, 2014.

LICHTENTHALER, H. K.; MIEHÉ, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Science**, [s.l.] v. 2, n. 8, p. 316–320, 1997.

LIJIE LI, A. *et al.* Exogenous spermidine improves drought tolerance in maize by enhancing

the antioxidant defence system and regulating endogenous polyamine metabolism. **Crop & Pasture Science**, [s.l.] p. 1–16, 2018.

LIU, M. *et al.* Effects of Drought Stress on Seed Germination and Seedling Growth of Different Maize Varieties. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.]v. 7, n. 5, p. 231–240, 2015.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Fisiologia da Produção de Milho. **Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, [s.l.] v. 76, p. 10, 2006.

MARON, J. L. *et al.* Effects of soil fungi, disturbance and propagule pressure on exotic plant recruitment and establishment at home and abroad. **Journal of Ecology**, [s.l.] v. 101, n. 4, p. 924–932, 2013.

MARTHANDAN, V.; GEETHA, R.; KUMUTHA, K. Seed Priming : A Feasible Strategy to Enhance Drought Tolerance in Crop Plants. **International Journal of Molecular Sciences Review**, [s.l.] v. 21, n. 8258, p. 1–23, 2020.

MATILLA. Polyamines and seed germination. **Seed Science Research**, [s.l.] v. 6, p. 81–93, 1996.

MICKKY, B. M. Seed Priming as a Strategy to Improve Wheat Productivity Under Abiotic Stress: Global Meta-analysis. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s.l.] v. 41, n. 4, p. 1397–1410, 2022.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.] v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIRANDA, L.; MIRANDA, L. E. C. Milho. In: VIÉGAS, A. F. G. (Ed.). . **Genética ecológica**. [s.l.] Fundação IAC, p. 363–409, 1993.

MISRA, P.S.; MERTZ, E.T.; GLOVER, D. . Studies on corn proteins. VI. Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize. **Cereal Chemistry**, [s.l.] v. 52, p. 161–166, 1975.

MIYAMOTO, S. *et al.* Estimation of Polyamine Distribution and Polyamine Stimulation of Protein Synthesis in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.] 1993.

NAHAR, K. *et al.* Polyamines Confer Salt Tolerance in Mung Bean ( *Vigna radiata* L .) by Reducing Sodium Uptake , Improving Nutrient Homeostasis , Antioxidant Defense , and Methylglyoxal Detoxification Systems. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.] v. 7, p. 1–14, 2016.

NANNAS, N. J.; KELLY DAWE, R. Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. **Genetics**, [s.l.] v. 199, n. 3, p. 655–669, 2015.

NAYYAR, H. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.] v. 50, n. 3, p. 253–264, 2003.

ONU. **População mundial deve ter mais 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos.** Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2019/06/1676601>> acesso jun 2022.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnologia do grão de milho. Circular Técnica. **Embrapa/Cnpms**, [s.l.] n. 75, p. 1–6, 2006.

PAPARELLA, S. *et al.* Seed priming: state of the art and new perspectives. **Plant Cell Reports**, [s.l.] v. 34, n. 8, p. 1281–1293, 2015.

PARENTONI, S. N. *et al.* Milho Híbrido Simples BRS 1030. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, [s.l.] v 108, p. 5, 2004.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z. *et al.* Estratégias de melhoramento para tolerância à seca em germoplasma de milho tropical. **Singular Meio Ambiente e Agrárias**, [s.l.] v. 1, n. 1, p. 19–24, 2019.

PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. Seed priming with spermine ameliorates salinity stress in the germinated seedlings of two rice cultivars differing in their level of salt tolerance. **Tropical Plant Research**, [s.l.] v. 3, n. 3, p. 616–633, 2016.

PRASANNA, B. M.; VASAL S. K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N. N. Quality Protein Maize. **Current Science**, [s.l.] v. 81, n. 10, p. 1308–1319, 2001.

PRESOTO, J. **Padrões de dispersão e conservação da diversidade genética do milho (*Zea mays ssp. mays*) nas terras baixas da América do Sul.** [s.l.] Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Padrões, 2020.

SAEED, F. *et al.* Functional and nutraceutical properties of maize bran cell wall non-starch polysaccharides. **International Journal of Food Properties**, [s.l.] v. 24, n. 1, p. 233–248, 2021.

SHIN, Y. K. *et al.* Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, phytochemical contents, and antioxidant activities in lettuce seedlings. **Horticulturae**, [s.l.] v. 7, n. 8, 2021.

SIDDIQUE, M. R. B.; HAMID, A.; ISLAM, M. S. Drought stress effects on photosynthetic rate and leaf gas exchange of wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, [s.l.] v. 40, 1999.

SIES, H.; MOSS, K. M. A Role of Mitochondrial Glutathione Peroxidase in Modulating Mitochondrial Oxidations in Liver. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.] v. 84, n. 2, p. 377–383, 1978.

SMITH, T. A. POLYAMINES. **Annual Review Plant Physiology**, [s.l.] p. 117–143, 1985.

SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.] v. 55, n. 1–2, p. 195–200, 2006.

STRAUSS, G.; HAUSER, H. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during

freezing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.] v. 83, n. 8, p. 2422–2426, 1986.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal Diversidade vegetal**. [s.l.: s.n.]. v. 6 ed. TAKAHASHI, T.; KAKEHI, J. Polyamines : ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. **Annals of Botany**, [s.l.] v. 105, p. 1–6, 2010.

TAN, Y. *et al.* Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of Radix Astragali at seeding stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.] v. 49, n. 1, p. 60–65, 2006.

TATAGIBA, S. D.; PEZZOPANE, J. E. M.; REIS, E. F. Fotossíntese em EUCALYPTUS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS. **Engenharia na agricultura**, [s.l.] v. 23, n. 4, p. 336–345, 2015.

VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. **Current Science**, [s.l.] v. 99, n. 4, p. 450–456, 2010.

VERNOUX, T. *et al.* The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. **Plant Cell**, [s.l.] v. 12, n. 1, p. 97–109, 2000.

VILLANUEVA, V. R.; HUANG, H. Effect of Polyamine Inhibition on Pea Seed Germination. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.] v. 141, n. 3, p. 336–340, 1993.

WATANABE, S. I. *et al.* Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.] v. 266, n. 31, p. 20803–20809, 1991.

WEBBER, H. *et al.* Diverging importance of drought stress for maize and winter wheat in Europe. **Nature Communications**, [s.l.] v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.

ZIA, R. *et al.* Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. **Microbiological Research**, [s.l.] v. 242, n. July 2020, p. 126626, 2021.