



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA

DANIELE SILVA SUKERT

EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ACETILCOLINA EM PLANTAS DE MILHO (*Zea
mays*) SOB ESTRESSES TÉRMICO E HÍDRICO

Presidente Prudente - SP
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA**

DANIELE SILVA SUKERT

**EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ACETILCOLINA EM PLANTAS DE MILHO (*Zea
mays*) SOB ESTRESSES TÉRMICO E HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Adriana Lima Moro

Presidente Prudente - SP
2024

633.151
S948e

Sukert, Daniele Silva.

Efeitos da aplicação de acetilcolina em plantas de milho [zea mays L.] sob estresses térmico e hídrico / Daniele Silva Sukert. –Presidente Prudente, 2024.
71f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

Orientador: Adriana Lima Moro.

1. Biorregulador. 2. Estresse hídrico. 3. Alta temperatura. 4. Atividade antioxidante. 5. Milho. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITOS DA APLICAÇÃO DE ACETILCOLINA EM PLANTAS DE MILHO [ZEA MAYS L.] SOB ESTRESSES TÉRMICO E HÍDRICO"

AUTOR(A): DANIELE SILVA SUKERT

ORIENTADOR(A): Dra. ADRIANA LIMA MORO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Dra. ADRIANA LIMA MORO

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Dr. ALEXANDRIUS DE MORAES BARBOSA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Dr. PEDRO HENRIQUE GORNI

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Tupã (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 23 de fevereiro de 2024.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Jesus, nosso exemplo máximo de amor e bondade e aos meus amados pais, Marisa e Ezequiel (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca e em circunstância alguma ter me abandonado e ter me concedido sabedoria e forças para realizar este mestrado.

À minha mãe, que é a minha grande amiga, ser humano mais bondoso e maravilhoso existente, amo te infinito.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Lima Moro por todo ensinamento e amizade, muito bom colocar nossas ideias em prática! Você é sensacional!

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal (CEVOP), grupo de estudos maravilhoso, onde me acolheram desde o segundo termo da graduação e onde me proporcionaram grandes oportunidades.

Gratidão às minhas amigas Héliida Sala, por todo o companheirismo e bondade, e pelo auxílio nas análises e em especial à Bruna Spolaor, que faz a correção dos meus textos desde a graduação e está sempre disposta a ajudar, com vocês meus dias são muito mais felizes, amo vocês.

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

Muito Obrigada!

“Amarás o Senhor, teu Deus, de todo o teu coração, de toda a tua alma e de todas as tuas forças.”

(Deuteronômio 6:5)

RESUMO

Efeitos da aplicação de acetilcolina em plantas de milho (*Zea mays*) sob estresses térmico e hídrico

O milho (*Zea mays*) é um cereal cultivado mundialmente e apresenta grande importância econômica. Em razão ao aumento substancial na temperatura global e consequente aumento na seca, a cultura tem diminuído seu potencial produtivo. Um biorregulador importante produzido em pequenas quantidades pela planta é a Acetilcolina (ACh), que age na germinação, reprodução, crescimento, desenvolvimento, metabolismo celular da cultura e é capaz de atuar na mitigação dos efeitos de estresses. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de acetilcolina em plantas de milho submetidas aos estresses térmico e hídrico. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, fatorial duplo, em duas condições normal (temperatura 31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação x 3 modos de aplicação (0 mmol L⁻¹ (C); tratamento de semente (TS) e foliar (F) ambos foram tratadas com 1 mmol L⁻¹ de ACh, foram realizadas análises de potencial hídrico foliar, medidas de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX), teores de O₂⁻, H₂O₂ e peroxidação lipídica (MDA), enzima acetilcolinesterase (AChE), fenóis e flavonoides totais, biometria e biomassa (altura, diâmetro, massas secas das folhas, colmo e espiga) e peso de 100 grãos. Os dados foram avaliados a partir de análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0.05) e a análise multivariada por componentes principais (PCA) com o programa estatístico PC-Ord. Houve um melhor ajuste fisiológico das plantas de milho em condição estressante com aplicação foliar de 1 mmol L⁻¹ de ACh. Além de um aumento na CAT em TS e F, acompanhada de uma diminuição do conteúdo de MDA, morfológicamente, foi observado uma diminuição da massa seca das folhas, no entanto, houve aumento no peso de 100 grãos. Concluindo que a aplicação de ACh influencia positivamente nos parâmetros fisiológicos, bioquímico e morfológico nas plantas, e atua na mitigação do efeito dos estresses térmico e hídrico.

Palavras-chave: biorregulador; alta temperatura; déficit hídrico; atividade antioxidante; trocas gasosas.

ABSTRACT

Effects of acetylcholine application on maize (*Zea mays*) plants under heat and drought stress

Maize (*Zea mays*) is a cereal grown worldwide and has great economic importance. Due to the substantial increase in global temperature and the consequent increase in drought, the crop has reduced its productive potential. An important bioregulator produced in small quantities by the plant is Acetylcholine (ACh), which acts on germination, reproduction, growth, development, cellular metabolism of the crop and is capable of mitigating the effects of stress. The objective of this work was to evaluate the effects of applying acetylcholine to maize plants subjected to thermal and water stress. The experiment was carried out in a completely randomized, double factorial design, in two conditions: normal (temperature 31.9 °C/19.9 °C max./min and irrigated) and stressful (38 °C/28 °C day/night and suspension of irrigation) x 3 application modes (0 mmol L⁻¹ (C); seed (TS) and foliar (F) treatments, both were treated with 1 mmol L⁻¹ of ACh, leaf water potential analyzes were carried out, gas exchange measurements, chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX), O₂⁻, H₂O₂ and lipid peroxidation (MDA) contents, acetylcholinesterase enzyme (AChE), total phenols and flavonoids, biometrics and biomass (height, diameter, dry masses of leaves, stem and ear) and weight of 100 grains. The data were evaluated using analysis of variance and the means compared using the Tukey test ($p < 0.05$) and multivariate analysis by principal components (PCA) with the statistical program PC-Ord. There was a better physiological adjustment of maize plants under stressful conditions with foliar application of 1 mmol L⁻¹ of ACh. In addition to an increase in CAT in TS and F, accompanied by a decrease in MDA content, morphologically, a decrease in the dry mass of the leaves was observed, however, there was an increase in the weight of 100 grains. Concluding that the application of ACh positively influences the physiological, biochemical and morphological parameters in plants, and acts to mitigate the effect of heat and water stress.

Keywords: bioregulator; high temperature; water déficit; antioxidant activity; gas exchange.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Biossíntese da acetilcolina. A reação enzimática ocorre a partir da Acetil-CoA com Colina, enzima Colina Acetiltransferase forma acetilcolina, e enzima acetilcolinesterase hidrolisa a molécula (ACh) em acetato e colina (adaptado de Danelluzi, 2012)..... 23
- Figura 2 - Assimilação líquida de CO₂ (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO₂ (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 35
- Figura 3 - Assimilação líquida de CO₂ (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO₂ (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 36
- Figura 4 - Assimilação líquida de CO₂ (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO₂ (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 37
- Figura 5 - Assimilação líquida de CO₂ (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO₂ (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite

e suspensão da irrigação), 24h (01/12/22) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 38

Figura 6 - Eficiência do uso da água (EUA) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 39

Figura 7 - Eficiência do uso da água (EUA) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 39

Figura 8 - Eficiência do uso da água (EUA) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 40

Figura 9 - Eficiência do uso da água (EUA) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 41

Figura 10 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada)

e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.....

41

Figura 11 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/22) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.....

42

Figura 12 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/22) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.....

42

Figura 13 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.....

43

Figura 14 - Taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros...

44

- Figura 15 - Taxa de transporte de elétrons (*ETR*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 44
- Figura 16 - Taxa de transporte de elétrons (*ETR*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 45
- Figura 17 - Taxa de transporte de elétrons (*ETR*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 46
- Figura 18 - Fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 46
- Figura 19 - Fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas

distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 47

Figura 20 - Fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 48

Figura 21 - Fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 48

Figura 22 - Superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 49

Figura 23 - Superóxido (O_2^-) (A), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (B) e peroxidação lipídica (MDA) (C) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros..... 50

- Figura 24 - Acetilcolinesterase (AChE) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 51
- Figura 25 - Fenóis totais (A) e flavonoides totais (B) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 51
- Figura 26 - Massa seca da folha (MSF) (A), massa seca do colmo (MSC) (B) e massa da espiga (ME) (C) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 53
- Figura 27 - peso de 100 grãos (g) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros..... 53
- Figura 28 - Gráfico de ordenação gerado pela análise de componentes principais com todos os parâmetros deste trabalho (Figuras 2 a 27). Símbolos fechados e abertos indicam os tratamentos sem e com condição estressante, respectivamente. Quadrados preto, triângulo laranja e círculo preto indicam os modos de aplicação de ACh. As porcentagens que explicam as variações dos dados em cada componente são mostradas nos eixos..... 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Potencial hídrico foliar (Ψ_f) das plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (CN) ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante (CE) ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação) (Tukey, $p < 0.05$)..... 27
- Tabela 2 – Comprimento total (CT) e diâmetro do colmo (DC) das plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (CN) ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante (CE) ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação). Quatro meses após emergência. (Tukey, $p < 0.05$)..... 52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Milho.....	19
2.2	Estresses térmico e hídrico no milho.....	19
2.3	Biorreguladores em plantas.....	21
2.4	Acetilcolina.....	22
3	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Aplicação de acetilcolina (ACh) no desempenho fisiológico em milho sob estresse térmico e hídrico.....	26
4.2	Parâmetros de avaliação.....	27
4.2.1	Medidas de trocas gasosas e Fluorescência da clorofila a.....	27
4.3	Análises bioquímicas.....	28
4.3.1	Superóxido dismutase (SOD).....	28
4.3.2	Catalase (CAT).....	29
4.3.3	Ascorbato peroxidase (APX).....	29
4.3.4	Superóxido (O ²⁻).....	29
4.3.5	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	30
4.3.6	Peroxidação lipídica (MDA).....	30
4.3.7	Acetilcolinesterase (AChE).....	31
4.3.8	Fenóis e flavonoides totais.....	31
4.4	Análises biométricas, biomassa e produção.....	32
4.5	Análise estatística.....	32
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Avaliações fisiológicas.....	34
5.2	Avaliações bioquímicas.....	49
5.3	Avaliações biométricas, biomassa e produção.....	52
5.4	Análise multivariada por componentes principais (PCA).....	53
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
8	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, seguido pelo arroz e trigo (Gao *et al.*, 2020). No Brasil, sua produção é expressivamente relevante, na safra de 2023/24 é estimado 110,96 milhões de toneladas de milho no país (CONAB, 2023/24). Desta forma, diferentes variedades existentes de milho, como milho doce e milho de silagem, são utilizados para o consumo humano, como também para a fabricação de ração animal e matéria prima para outros produtos, respectivamente (Mascarenhas, 2019; Gao *et al.*, 2020).

É uma cultura que apresenta o metabolismo fotossintético C4, e desta forma, possui maior eficiência no uso de água (Killi *et al.*, 2017), no entanto, pode ser diretamente afetado por estresses abióticos, como os estresses térmico e hídrico. No milho, os estresses são os principais responsáveis pela diminuição no crescimento radicular, interferência na produção de grãos, além de danos ao aparato fotossintético, como o PSII (Salika; Riffat, 2021).

Em associação, estes estresses podem afetar negativamente a atividade fotossintética, o crescimento das plantas e a produtividade (Killi *et al.*, 2017). Além de impulsionarem a síntese excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por causar estresse oxidativo, danificando lipídios, proteínas e destruindo componentes celulares (Sarker; Islam; Oba, 2018; Singh *et al.*, 2019).

Como forma de defesa, proteção e tolerância às EROs e aos estresses, as plantas aumentam a atividade de enzimas antioxidantes e biorreguladores (Sarker; Islam; Oba, 2018). Os bioreguladores, auxiliam no aumento da produtividade, crescimento, enraizamento, agem no metabolismo celular, na fotossíntese, na osmoregulação e proteção à estresses abióticos, como salino, hídrico, térmico e metais pesados (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2021).

Um bioregulador importante é a Acetilcolina (ACh), usualmente reconhecido como um neurotransmissor em seres humanos e animais (Braga; Pissolato; Souza, 2017). Nas plantas, atua nos processos fisiológicos, alongando células, promovendo o crescimento das raízes (Qin *et al.*, 2021), age na distribuição de hormônios e na germinação do pólen, além de atuar na proteção

a determinados estresses abióticos (Sagane *et al.*, 2005; Braga; Pissolato; Souza, 2017; Su *et al.*, 2020a; Qin *et al.*, 2021).

Estudos pilotos, conduzidos anteriormente com aplicação de 1 mmol L⁻¹ de ACh, demonstraram efeitos positivos na mitigação do estresse térmico em plântulas de milho.

Assim, com o aumento na temperatura global, acompanhado de seca intensa, a aplicação da acetilcolina atua no mecanismo de homeostase em plantas submetidas a estresse abióticos, mitigando os efeitos negativos dos estresses térmicos e hídrico nas plantas de milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Milho

A cultura do milho (*Zea mays*), é pertencente à família Poaceae e está taxonomicamente classificada como uma monocotiledônea, apresentando crescimento de raiz fasciculada (Barros; Calado, 2014). É um dos cereais que mais ocupam áreas de cultivo no mundo, e por ser uma planta com metabolismo fotossintético C4, apresenta um alto potencial de rendimento, além de um excelente metabolismo fotossintético (Barros; Calado, 2014; He *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021).

Evidenciando uma grande importância econômica, estimado para safra de 2023/24 uma produção de milho de 110,96 milhões de toneladas (CONAB, 2023/24). Sendo fortemente utilizado na alimentação dos seres humanos, servindo como fonte de carboidrato, e também na fabricação de ração animal, para frangos, suínos e bovinos (Contini *et al.*, 2019; Tandzi; Mutengwa, 2020).

Desta forma, alguns cultivares de milhos são submetidos a diferentes técnicas de melhoramento genético com o objetivo de promover mudanças na biomassa, diminuição da altura da planta, além do aumento no tamanho da espiga e redução na esterilidade, tornando a cultura mais tolerante à diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (Edmeades *et al.*, 2017).

Fatores externos podem ocasionar uma queda em sua produção, como os estresses abióticos, que diminuem o crescimento e desenvolvimento da cultura. A seca, a salinidade, as quantidades de nutrientes disponíveis no solo e as altas e baixas temperaturas, são exemplos que mais geram impactos negativos na produção (Suzuki *et al.*, 2014; Ayub *et al.*, 2021).

2.2 Estresses térmico e hídrico

Para que as plantas sejam caracterizadas como estressadas, é necessário que o ambiente em que estão inseridas apresentem condições adversas e não ideais ao seu desenvolvimento (Zhang; Zhao; Zhu, 2020).

O aumento na temperatura global tem se destacado grandemente, visto que se estima uma elevação de 2,6 para 4°C antes do final deste século, levando

a um consequente aumento na duração das secas (Pachauri, 2014; Rogelj *et al.*, 2016).

Em razão do aumento no aquecimento global, a alteração no equilíbrio interno das plantas pode ser causada pela presença do estresse térmico, que pode atuar tanto na fisiologia quanto na bioquímica interna das plantas (Santos *et al.*, 2022). A exposição prolongada e intensa a temperaturas elevadas, pode aumentar o desenvolvimento das raízes à procura de água no solo e diminuir o número de estômatos e a condutância estomática, como forma de evitar a perda de água através da transpiração (Chaki; Begara-Morales; Barroso, 2020). Ainda, as altas temperaturas são responsáveis pelos danos celulares, levando ao processo de estresse oxidativo ocasionado por radicais livres (Chaki; Begara-Morales; Barroso, 2020).

Já o estresse hídrico ocorre em razão da diminuição de água presente no solo, e consequentemente uma diminuição na absorção de água pelas plantas, ocorrendo principalmente quando a taxa da transpiração na superfície das folhas é maior que a água absorvida pelas raízes. Desta forma, a falta de água no solo e consequentemente nas plantas, é caracterizado como seca (Yang *et al.*, 2021). O déficit hídrico gera diversas alterações nas plantas, como diminuição no crescimento e desenvolvimento, influencia negativamente nas trocas gasosas e na condutância estomática (Seleiman *et al.*, 2021).

Desta forma, a associação dos estresses térmico e hídrico promovem respostas metabólicas e moleculares diferentes nas plantas, sendo danosos às mesmas, levando à diminuição na produção da cultura, tendo impacto negativo na alimentação mundial (Barnabás; Jäger; Fehér, 2008; Killi *et al.*, 2017).

Em *Leymus chinensis*, o aumento da temperatura e a seca do solo reduziram a atividade do fotossistema II, diminuindo o anabolismo do nitrogênio, aumentando o catabolismo de proteínas e aumentando a peroxidação lipídica (Xu; Zhou, 2006; Barnabás; Jager; Fehér, 2008). Quando associados, os estresses térmicos e hídricos dificultam a abertura e fechamento de estômatos, portanto, a temperatura foliar aumenta drasticamente (Barnabás; Jager; Fehér, 2008).

O milho, ao ser exposto severamente a esses estresses em associação, tem perda de seu rendimento maior que 70%, e durante a polinização esse percentual pode atingir 100% (Meseka *et al.*, 2018). Outro fator que causa danos

ao milho é a temperatura noturna alta, diminuindo o rendimento de grãos e a produção, além de provocar senescência precoce das folhas, visto que durante a noite o milho continua a respiração, mas interrompe a fotossíntese, consumindo os produtos metabólicos sintetizados durante o dia (Maldaner *et al.*, 2014).

Desta forma, os estresses térmicos e hídricos, além de causar danos na produtividade do milho, interferem negativamente no seu crescimento, com a diminuição na massa fresca e seca dos caules e raízes (Ayub *et al.*, 2021). Afetam negativamente seus processos fisiológicos e bioquímicos, com a diminuição na fotossíntese, aumento na temperatura foliar, diminuição nas taxas de transpiração, e aumento na concentração de prolina (Ayub *et al.*, 2021).

Com os estresses, as plantas sintetizam em altas concentrações espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), responsáveis por afetar negativamente a síntese de proteínas, DNA, lipídeos e interferirem nas funções celulares (Das; Roychoudhury, 2014; Pasala; Minhas; Wakchaure, 2017).

Em razão disso, para se defender e proteger contra os estresses e as EROs e como forma de manter o equilíbrio celular interno, as plantas sintetizam compostos e substâncias como os osmoprotetores, estando os açúcares, açúcares-álcool (manitol) e proteínas (prolina) responsáveis por promover o equilíbrio osmótico, ainda, sintetizam proteínas de choque térmico (Qu *et al.*, 2013), e enzimas antioxidantes, que atuam principalmente na diminuição dos impactos negativos das EROs (Das; Roychoudhury, 2014; Balfagón *et al.*, 2021). Como respostas, as plantas também sintetizam biorreguladores (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2016).

2.3 Biorreguladores em plantas

Os biorreguladores, produzidos de forma natural pela planta ou inseridos sinteticamente, atuam no metabolismo da planta, influenciando em estruturas e processos celulares, assim como na qualidade da produção, e quando aplicados exogenamente na agricultura, proporcionam o aumento na produtividade (Ratnakumar *et al.*, 2016; Srivastava *et al.*, 2016; Zulfiqar; Ashraf, 2021).

Alguns exemplos de biorreguladores são a melatonina, histamina, GABA e dopamina, classificados como indolaminas, aminoácido e catecolamina, respectivamente (Von Haartmann; Kahlson; Steinhardt, 1966; Ramos-Ruiz; Martinez; Knauf-Beiter, 2019; Liu *et al.*, 2020; Oliveira-Spolaor *et al.*, 2022).

Além disso, existem diversos modos de aplicação de biomoléculas, com diferentes benefícios às plantas, o tratamento de semente é uma técnica com custo baixo e tem baixo impacto no ambiente, visto que diminui a área de aplicação quando comparada com pulverização (Cunha *et al.*, 2015).

Já a aplicação foliar apresenta como vantagem a utilização de toda a solução a ser aplicada, sem que ocorra perda do conteúdo por volatilização (Faroni *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos utilizam ambas as técnicas para elucidar o benefício da utilização de biomoléculas, como tratamento em sementes e aplicação foliar de melatonina em plantas submetidas à estresse hídrico (Oliveira-Spolaor *et al.*, 2022).

Desta forma, a aplicação destes bioreguladores, influencia no processo de germinação, na respiração, abertura e fechamento de estômatos e crescimento celular (Pasala; Minhas; Wakchaure, 2017). Agem no sistema de defesa da planta, com a função de tornar as plantas mais tolerantes e adaptadas aos diferentes tipos de estresses (Pasala; Minhas; Wakchaure, 2017; Zulfiqar; Ashraf, 2021).

Além de promoverem o aumento na atividade fotossintética, no crescimento e no vigor das plantas, estimulam a floração e a obtenção de nutrientes (Ratnakumar *et al.*, 2016). Um biorregulador com atuação importante e encontrado em algumas plantas é a Acetilcolina (ACh) (Hartmann; Gupta, 1989).

2.4 Acetilcolina

A Acetilcolina (ACh) $[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$, é uma amina quarternária, com a presença de um éster acético e colina (Tretyn; Kendrick, 1991; Kurchii, 2009; Daneluzzi, 2012), é um neurotransmissor em animais, atuando na transmissão de informações do sistema nervoso e muscular

(Hartmann; Gupta, 1989) e foi reconhecido como um biorregulador não neural no início do século XX por Ewins (1914).

A mesma é sintetizada a partir do processo de catalisação realizado pela enzima colina acetiltransferase, transformando a colina e a acetil-coA em acetilcolina (ACh), e posteriormente, a ACh é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), surgindo os metabólitos colina e acetato (Daneluzzi, 2012).

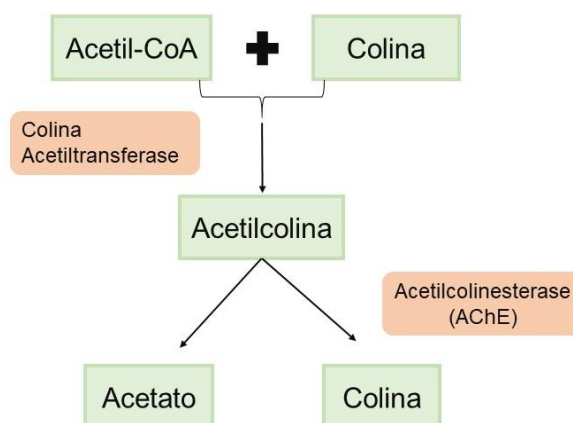


Figura 1 - Biossíntese da acetilcolina. A reação enzimática ocorre a partir da Acetil-CoA com Colina, enzima Colina Acetiltransferase forma acetilcolina, e enzima acetilcolinesterase hidrolisa a molécula (ACh) em acetato e colina (adaptado de Daneluzzi, 2012).

Este biorregulador foi identificado em 65 espécies de plantas, incluindo o milho (Hartmann; Gupta, 1989). A ACh age em diversos processos morfológicos e fisiológicos. A partir de sua aplicação, foi observado aumento de raízes laterais em plântulas de rabanete e tomate (Bamel; Gupta; Gupta, 2007; Sugiyama; Tezuka, 2011), diminuição dos efeitos do estresse osmótico em sementes de soja (Braga; Pissolato; Souza, 2017), em *Nicotiana benthamiana*, sob estresse salino, a ACh promoveu aumento na capacidade fotossintética e nas atividades das enzimas antioxidantes (Qin *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2021).

Estudos sugerem que a ACh está envolvida em processos como diferenciação, homeostase osmótica e fotossintética, atuando no transporte de água e eletrólitos, favorecendo o processo de crescimento (Kawashima *et al.*, 2007). Sua atuação no crescimento é realizada em razão da sua interação com hormônios, como auxina, giberelinas e etileno (Daneluzzi, 2012). A ACh consegue elevar o processo de permeabilidade iônica de membranas, promover

mudanças no potencial de membrana das células vegetais, atuar na abertura de estômatos e como sinalizadora entre raiz e parte aérea (Jaffe, 1970; Wang; Wang; Lou, 1999; Wang *et al.*, 2003).

Ainda, a enzima acetilcolinesterase (AChE) tem importância em meio ao estresse, sendo observado o aumento de sua atividade em plântulas de milho sob altas temperaturas (Yamamoto; Sakamoto; Momonoki, 2011) promovendo uma tolerância/proteção das plantas ao estresse térmico (Ođjakova; Hadjiivanova, 1997; Horiuchi *et al.*, 2003).

3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

O objetivo do projeto foi analisar os potenciais efeitos fisiológicos e bioquímicos da aplicação de Acetilcolina em plantas de milho sob estresses térmico e hídrico.

Objetivos específicos:

- Avaliar qual modo de aplicação é mais eficiente: tratamento de semente (TS) ou foliar (F);
- Analisar se a aplicação de acetilcolina influenciou nos parâmetros fotossintéticos em plantas estressadas;
- Avaliar se compostos antioxidantes produzidos pelas plantas com aplicação foram eficazes na redução de radicais livres.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP) na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em Presidente Prudente – SP, Brasil. Os experimentos foram realizados com plantas de milho (*Zea mays*) – cultivar Dkb335 pro3.

4.1 Aplicação de acetilcolina (ACh) no desempenho fisiológico em milho sob estresse térmico e hídrico

O experimento foi dividido em plantas sob condição normal (temperatura 31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (alta temperatura (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão hídrica). Em ambos com plantas sem aplicação (controle - C) e com aplicação de Acetilcolina em semente (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹.

A acetilcolina (sigma-aldrich) apresenta peso molar de 181,66 g/mol, sua solução foi realizada através da dissolução de 0,0275 gramas de ACh em 150 mL de água destilada, formando a solução desejada de 1 mmol L⁻¹.

Com esquema fatorial 2 x 3 (2 ambientes x 3 aplicações). Para cada tratamento foram utilizadas 6 repetições (plantas), com delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para o tratamento de sementes (TS), as sementes foram dispostas em três folhas de papel germitest (duas folhas de base e uma de cobertura), a ACh (1 mmol L⁻¹) foi aplicada o equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, diretamente nas folhas germitest, e posteriormente foram mantidas por 24h em uma câmara de germinação Mangelsdorf (ELETROLAB, São Paulo, BR).

Foram utilizados vasos com 15 kg de terra vegetal e a semeadura ocorreu dia 04/11/22 e emergiram no dia 08/11/22, desta forma, 17 dias após a emergência, quando atingiram o estágio fenológico V3/V4, foi realizada a aplicação, pois todas as folhas e espigas que serão formadas se estabelecem neste período (Magalhães; Durães, 2006). Desta forma, dia 25/11/22 as plantas sem o TS receberam aplicação por pulverização nas folhas de 1 mmol L⁻¹ de ACh e as plantas controle (C - 0 mmol L⁻¹) receberam água destilada. Cada planta foi pulverizada, com auxílio de um pulverizador manual, com 11 mL de

ACh. No mesmo dia, as plantas foram submetidas à alta temperatura e suspensão de irrigação em fitotron, para um maior controle.

O potencial hídrico foliar (Ψ_f) foi mensurado às 12:00 horas da manhã, na 3ª folha, com uma câmara de pressão Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, EUA), no quinto dia (30/11/22) após submissão aos estresses para verificar se o potencial hídrico foliar do tratamento de estresse atingiu próximo a -1,5 MPa (Tabela 1). Paralelamente, foi coletado a 4ª folha das plantas, nas 6 repetições biológicas por tratamento para análises bioquímicas.

Tabela 1 – Potencial hídrico foliar (Ψ_f) das plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (CN) (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (CE) (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação) (Tukey, p<0.05).

Potencial hídrico foliar (Ψ_f)		
Tratamentos	CN	CE
C	-0,6187 Aa	-1,35 ABb
TS		-1,475 Ba
F		-1,15 Aa
CV% (média)	-6,06	-7,32

Em seguida, as plantas foram reidratadas e retornaram a temperatura controle, e análise de recuperação após 24 horas foram realizadas medidas fisiológicas pontuais de trocas gasosas. Posteriormente, foram para casa de vegetação até o final do ciclo.

4.2 Parâmetros de Avaliação

4.2.1 Medidas de trocas gasosas e Fluorescência da clorofila a

Medidas instantâneas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a, foram obtidas utilizando um analisador de gases por infra-vermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA).

As medidas foram realizadas pela manhã (9 horas) na terceira folha sadia e completamente expandidas, no terceiro, quarto e quinto dias após submissão dos estresses (dias 28, 29 e 30 de novembro de 2022) e 24 horas após

reidratação (dia 01 de dezembro de 2022) sob irradiância de $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com uma concentração de CO_2 na câmara de amostragem de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ de ar. Foram analisados os seguintes parâmetros de trocas gasosas: assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), e transpiração (E). A partir dessas medidas foi calculada a eficiência do uso da água (EUA), eficiência de carboxilação da rubisco (A/C_i) e a taxa de transporte de elétrons (ETR).

As medidas da fluorescência da clorofila a foi realizada a partir dos parâmetros determinados para análise do Fotossistema II segundo Kotakis (2013) com modificações: eficiência quântica potencial (F_v'/F_m') (Bilguer; Schreiber; Bock, 1995).

4.3 Análises bioquímicas

Análises de parâmetros bioquímicos ocorreram por meio de uma série de enzimas que possuem um mecanismo de inativação de EROs, antioxidante enzimático (SOD, CAT e APX) em folhas das plantas de milho. Além de determinação de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica (MDA), e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).

4.3.1. Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

A atividade da Superóxido dismutase (SOD) considera a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). Sua atividade foi determinada pela adição de $50 \mu\text{L}$ de extrato bruto em uma solução contendo 13 mMol de metionina, $75 \mu\text{mol}$ de NBT, 100 nmol de EDTA e $2 \mu\text{mol}$ de riboflavina em $3,0 \text{ mL}$ de tampão fosfato de potássio 50 mmol , pH 7.8.

A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em uma câmara composta por lâmpadas fluorescentes (15W), a 25°C . Após 5 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz (Giannopolitis; Ries, 1977). O composto azul formado pela fotorredução do NBT, determinado pelo incremento na absorção a 560 nm . Os tubos considerados brancos para a análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos em papel alumínio. Uma unidade de SOD foi definida como a

quantidade de enzima necessária para inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

4.3.2 Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada por medição em aparelho espectrofotômetro a 240 nm pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto *et al.* (1999). Para o teste, foi adicionado 50 μL de extrato bruto a 950 μL de tampão fosfato de potássio, 50 mMol, pH 7.0, suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12.5 mmol. A variação de absorção (ΔE) foi calculada em um intervalo de 80s, sendo a atividade da enzima calculada utilizando um coeficiente de extinção molar $\epsilon = 39,4 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade específica ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$) da catalase levou em consideração a concentração de proteína solúvel no teste.

4.3.3 Ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11)

A análise de ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pela leitura em espectrofotômetro a 290 nm. Foi utilizado um tampão fosfato de potássio, 50 mMol, pH 7.0. Para o teste, em 1,700 μL do tampão foi adicionado 80 μL de ascorbato de sódio (0.8 mmol), 100 μL de peróxido de hidrogênio (1 mmol) e 50 μL de extrato vegetal. Para o zero foi utilizado todos os reagentes e o extrato foi substituído por água. A variação de absorção (ΔE) foi calculada em um intervalo de 60s, utilizando um coeficiente de extinção molar $\epsilon = 2,8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Koshiba, 1993).

4.3.4 Superóxido ânion (O_2^-)

O superóxido ânion foi determinado de acordo com Li *et al.* (2010). Foi macerado 200 mg de amostra (tecido foliar), que foi homogeneizado com 1.800 μL de tampão fosfato de potássio 65 mmol (pH 7.8) e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1.500 μL de tampão fosfato de

potássio 65 mmol (pH 7.8) e 50 μ L de hidroxilamina 10 mMol, juntamente à 50 μ L do extrato vegetal, a solução foi incubada em banho maria a 25 °C por 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado à mistura 100 μ L de sulfanilamida (17 mmol) e 100 μ L de a-naftilamina (7 mmol), novamente a solução foi incubada em banho maria à 25 °C por 20 minutos. Após o período de espera, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 530 nm. Uma curva padrão com radical nitrito (NO_2) foi utilizada para calcular a taxa de geração de O_2^- .

4.3.5 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para análise de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado 700 μ L de tampão fosfato de potássio, 10 mmol, pH 7.0, foi adicionado 1 mL de Iodeto de potássio (1 mmol) e 300 μ L de extrato vegetal (deve fechar em 2 mL). Para o zero, o extrato vegetal foi substituído por água, os tubos deveram ser incubados em banho-maria à 30°C por 10 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm (Velikova; Yordanov; Edreva, 2000).

4.3.6 Peroxidação lipídica (MDA)

A peroxidação de lipídeos foi realizada por quantificação da concentração de malondialdeído (MDA) reagente com ácido tiobarbitúrico (TBA). Então 200mg de material vegetal e 2 mL de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). A mistura foi centrifugada à 12000 rpm por 20 minutos. Foi adicionado 500 μ L de sobrenadante a 500 μ L de TBA à 0,5% em TCA à 10%. Essa solução foi incubada em banho-maria à 90 °C por 20 minutos, e a reação foi interrompida através da refrigeração em gelo por 10 minutos. A absorbância do TBA gerado foi realizada por espectrofotometria à 535 nm, e efetuou a correção das medidas para turbidez inespecífica subtraindo a absorbância à 600 nm. A concentração de TBA foi calculada usando o coeficiente de absorbância $1,55 \times 10^{-5} \text{ nmol}^{-1}$ (Elstner; Heupel, 1976; Li *et al.*, 2010).

4.3.7 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada a partir do reagente colorimétrico SH, ácido 5,5'-ditiobis-2-Nitrobenzoico (DTNB) (Ellman *et al.*, 1961). Foram utilizadas partes da folha de milho, extraídas em tampão fosfato de potássio pH 7,0 com 10 mmol (contendo EDTA a 10 mmol, e 4% de sulfato de amônio). Foram mantidas 1h no escuro, e o sobrenadante foi coletado após centrifugação por 15 min. No precipitado coletado foi adicionado 3x o volume final de tampão de extração (esse processo foi repetido 2 vezes). O extrato foi então deixado durante a noite. O precipitado foi coletado por centrifugação e suspenso em 3 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,4 a 100 mmol e centrifugou-se novamente. Para reação foram utilizados 100 μ L da amostra e 150 μ L de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (100mM), mantidos a 30 °C em banho maria por 10 min., posteriormente foram adicionados 250 μ L de ASCh Chloride (12,5 mmol em 100 mmol de tampão fosfato de sódio, pH 7,0). Foram incubados por 120 min. a 30 °C. Após incubação, 300 μ L da solução foi transferida para outro tubo e adicionou-se 1,425 μ L de tampão fosfato de sódio, pH 7,0 e 75 μ L de DTNB (10 mmol em 100 mmol de tampão fosfato de sódio, pH 7,0). A absorbância utilizada para leitura em espectrofotômetro foi de 412nm com coeficiente de extinção molar de 13,600 e foi utilizado tubo sem a presença das amostras como controle (Sagane *et al.*, 2005).

4.3.8 Fenóis e Flavonoides totais

Para ambas as análises a extração foi realizada com a pesagem de 0,5 gramas de massa fresca, maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para um tubo com rosca. Foi adicionado 5 mL de etanol 80% e posteriormente, deixado em banho-maria a 30 °C por 3 horas. Após este período, as amostras foram filtradas em papel filtro e armazenadas em congelador.

Os fenóis totais nas folhas foram analisados segundo o método Folin-Ciocalteu (Noriega *et al.*, 2012), utilizando ácido gálico nas concentrações de 25 a 500 μ g mL⁻¹ para construir a curva padrão. As reações para determinação de fenóis totais foram realizadas com a utilização de 25 μ L de amostra, 1250 μ L de água destilada e 125 μ L de Folin-Ciocalteu, após a adição dos compostos

anteriores, foi necessário aguardar 3 minutos, e após este tempo foram adicionados 350 μL de NaCO_3 e 750 μL de água destilada, as amostras então ficaram armazenadas no escuro por 1 hora. Posteriormente, a leitura dos tubos foi realizada em espectrofotômetro a 765 nm em cubeta de quartzo, o branco (para zerar o espectrofotômetro) foi realizado da mesma forma da amostra, exceto que ao invés da amostra, adicionou-se 25 μL de água destilada. A sua concentração foi expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em duplicata.

A determinação dos flavonoides totais nas folhas foi realizada de acordo com Yao *et al.* (2004). Para a elaboração da curva analítica, foi utilizada rotina diluída em álcool etílico absoluto nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações de flavonoides foram realizadas a partir da adição de 100 μL de amostra, 400 μL de etanol 70% e 50 μL de NaNO_2 , aguardou 6 minutos e adicionou-se 50 μL de AlCl_3 , 300 μL de NaOH e 100 μL de água destilada, ficaram em repouso no escuro por 15 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 510 nm em cubeta de quartzo. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado as mesmas soluções, exceto a amostra (substituída por água destilada). A sua concentração foi expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de equivalentes de rutina. As análises foram realizadas em duplicata.

4.4 Avaliação biométrica, biomassa e de produção

No dia 17/03/23, 4 meses após a emergência, foram realizados altura (auxílio de fitas métricas) e diâmetro das plantas (utilizando um paquímetro). Para biomassa: massa seca das folhas (MSF), massa seca do caule (MSC) e massa da espiga (ME). Ainda, foram realizadas estimativas de produção, onde as espigas foram removidas da casca e debulhadas, posteriormente foi realizada a medição do peso de 100 grãos (Ahmad *et al.*, 2021).

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR v. 5.1 (Ferreira, 2011). Foi realizada uma

análise multivariada por componentes principais (PCA) com o programa estatístico PC-Ord.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliações fisiológicas

No primeiro dia de medidas fisiológicas, terceiro dia após submissão dos estresses (28/11/2022) em condição normal as plantas aumentaram a assimilação líquida de CO₂ (A) com aplicação foliar de 1 mmol L⁻¹ (F), comparada à concentração controle de 0 mmol L⁻¹ (C) (Figura 2 - A). Para as plantas em condição estressante houve uma diminuição da A nas plantas com tratamento F de 16,22%, comparadas a C (Figura 2 - A).

Com relação à condutância estomática (g_s), as plantas em condição normal, com tratamento de semente (TS) e F aumentaram a condutância comparada às C (Figura 2 - B). E sob condição estressante, observa-se que as plantas com aplicação F diminuiu 28,04% a condutância em comparação à C (Figura 2 - B).

Na concentração intercelular de CO₂ (C_i), sob condição normal, as plantas com tratamento F aumentaram a concentração de CO₂ em 55,04%, em relação ao tratamento C (Figura 2 - C). Na condição estressante, as plantas com aplicação F diminuíram o C_i comparado à C (Figura 2 - C).

No parâmetro de transpiração (E), sob condição estressante, as plantas com tratamento F, apresentaram diminuição de 20,32% comparado à C (Figura 2 - D).

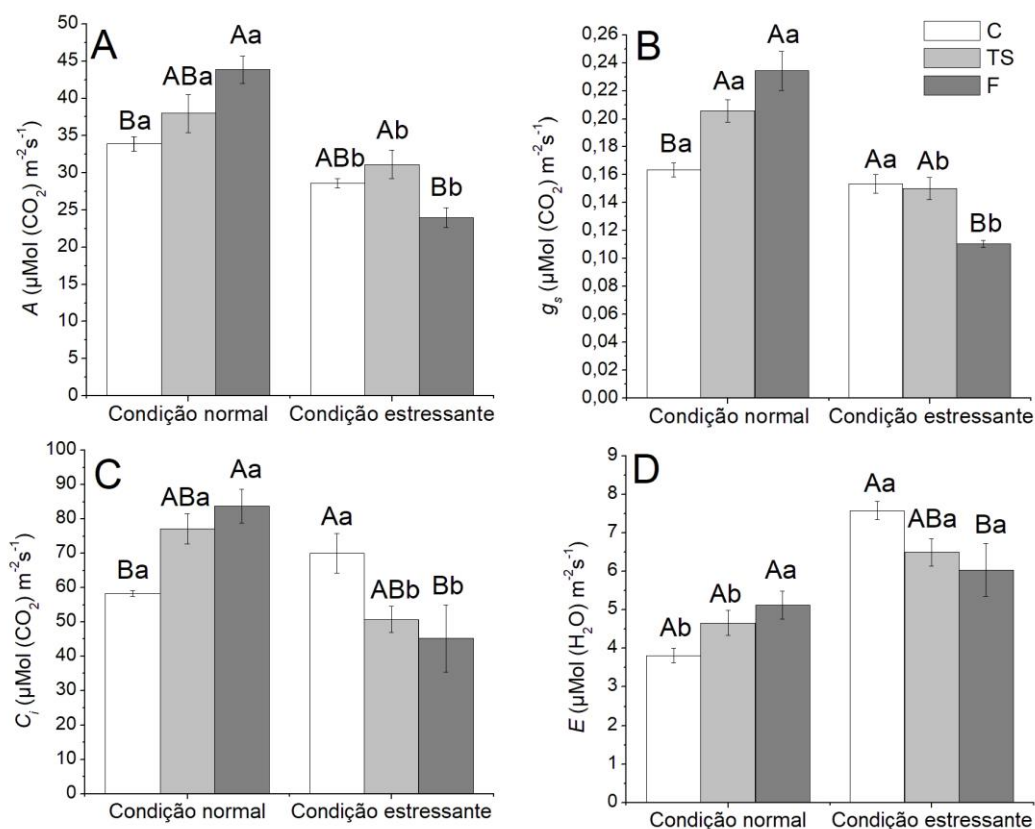


Figura 2 - Assimilação líquida de CO_2 (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No quarto dia após submissão aos estresses (29/11/2022) em condição estressante, é possível observar uma diminuição da A e do g_s nas plantas com tratamento F, tanto com relação à condição quanto com a aplicação de ACh comparado à C (Figura 3 - A e B).

Em C_i , sob condição estressante, as plantas com TS e F, diferiram da C com relação à alta temperatura e suspensão de irrigação (Figura 3 - C). Para E, as plantas na condição estressante com tratamento F, houve diminuição da transpiração, com relação à aplicação (Figura 3 - D).

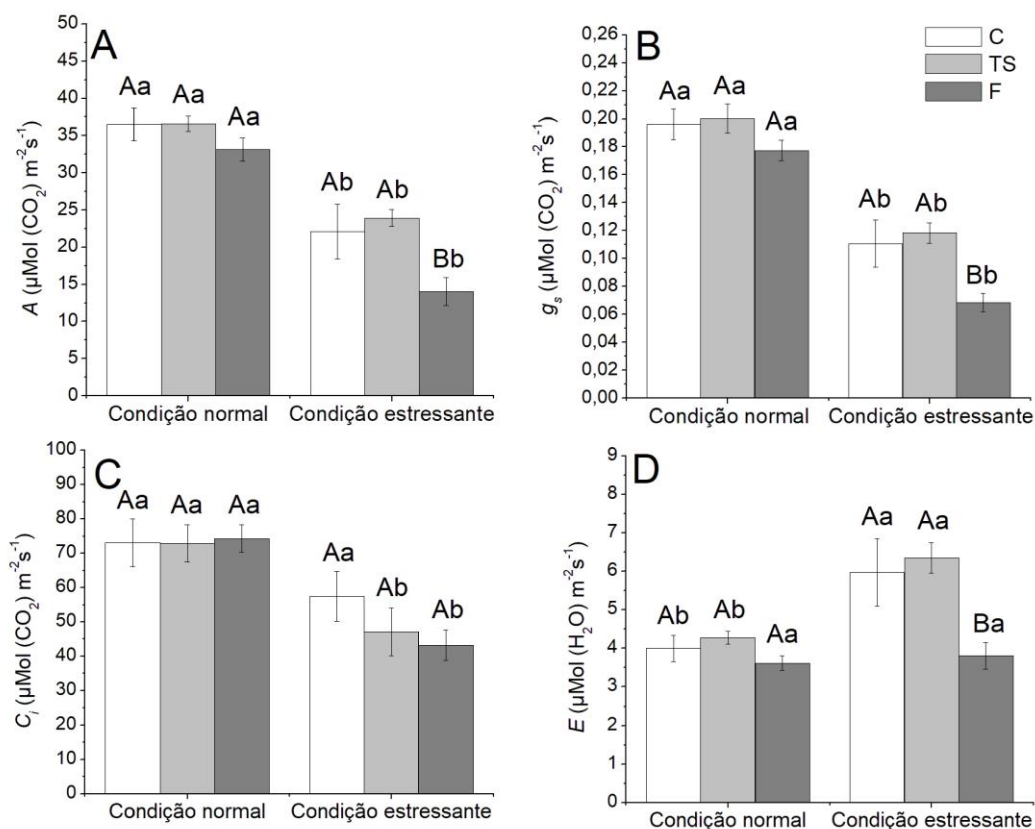


Figura 3 - Assimilação líquida de CO_2 (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No quinto dia das plantas submetidas a alta temperatura e suspensão da irrigação (30/11/22) é possível observar diferença estatística na A , g_s e C_i entre as condições, mas não entre os modos de aplicação, onde a condição normal apresentou aumento comparada à condição estressante (Figura 4 - A, B e C).

Em E , também não houve diferença entre os modos de aplicação, mas o aumento ocorreu na condição estressante e não na condição normal (Figura 4 - D).

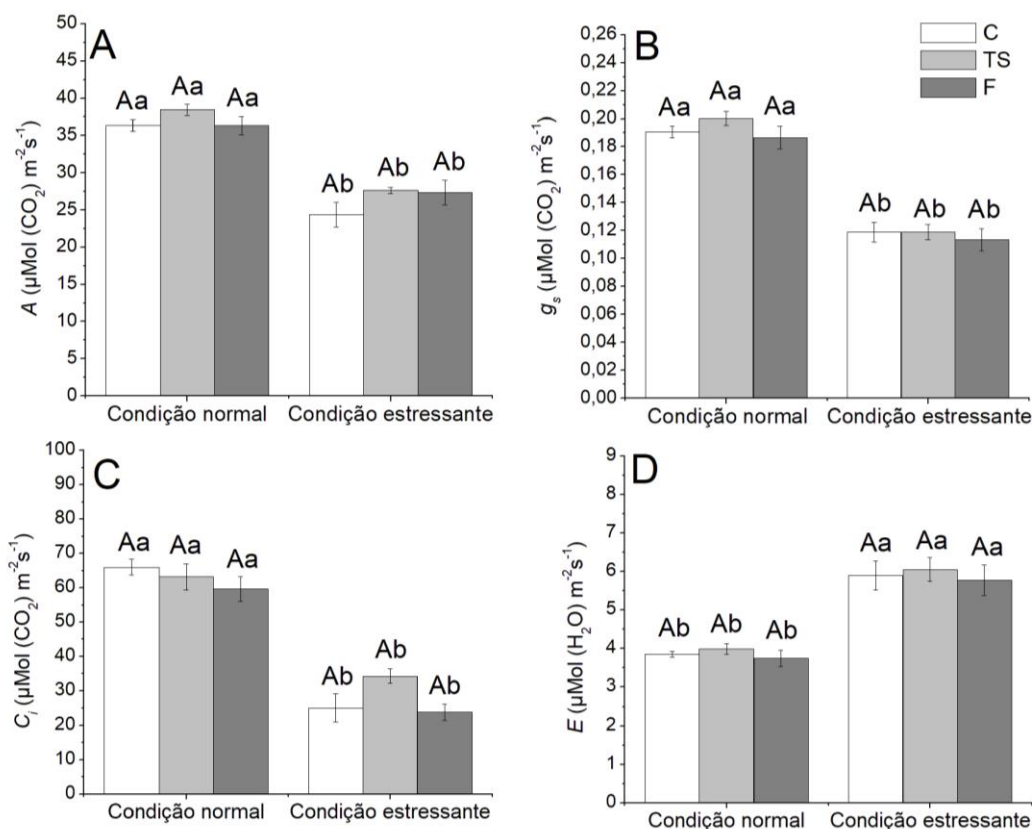


Figura 4 - Assimilação líquida de CO₂ (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO₂ (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Após 24 horas da retomada das condições normais (01/12/2022), as plantas em condição estressante retomaram a temperatura controle e foram irrigadas. Foram realizadas análises de reidratação, a A nas plantas em condição estressante, com tratamento F apresentou diminuição comparada comparada à C e TS (Figura 5 - A).

No parâmetro de g_s e C_i , as plantas na condição normal em TS e F apresentaram diminuição comparadas ao tratamento C (Figura 5 - B e C).

Na condição estressante, as plantas nos tratamentos C e F, não se diferiram estatisticamente no g_s , no entanto, as plantas com TS apresentou aumento comparadas à C (Figura 5 - B). Em C_i , também em condição estressante, não houve diferença entre os tratamentos, independente dos modos de aplicação e condição (Figura 5 - C).

Com relação à E , em condição normal, as plantas com TS, diminuiu comparadas ao tratamento C (Figura 5 - D). Em condição estressante as plantas nos tratamentos C e F se equipararam estatisticamente a TS (Figura 5 - D).

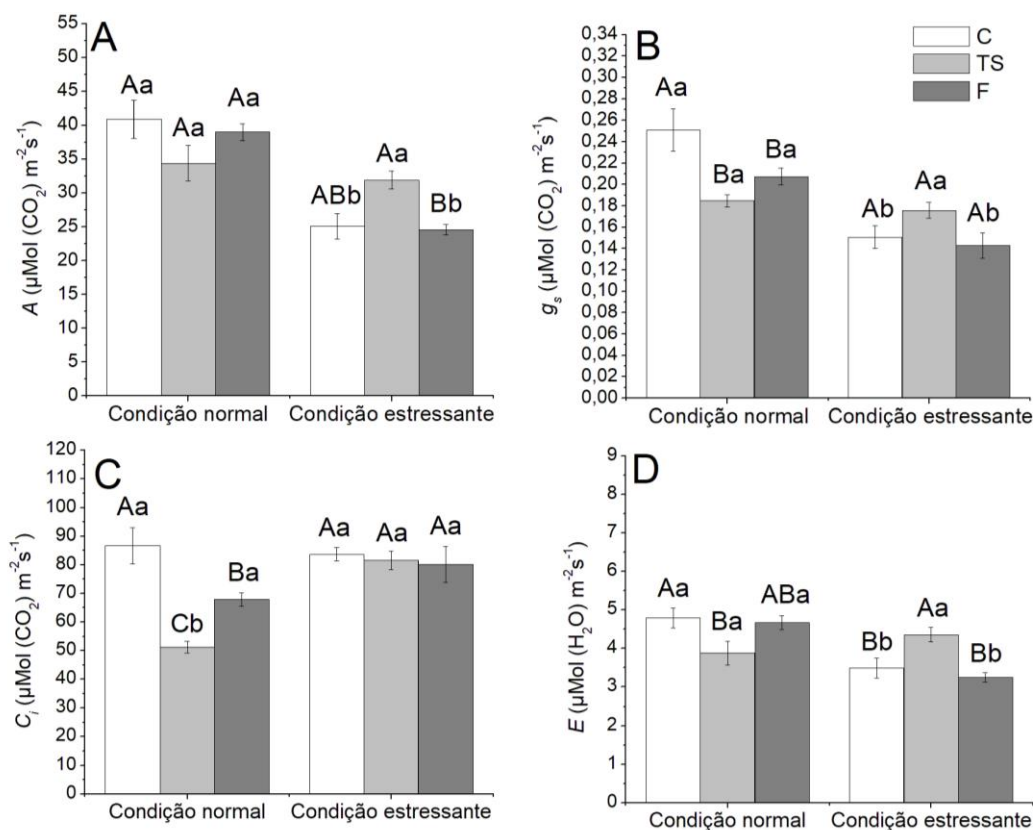


Figura 5 - Assimilação líquida de CO_2 (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração intercelular de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1} e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/22) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No terceiro dia do início dos estresses, a análise de eficiência do uso da água (EUA), as plantas não apresentaram diferença com relação ao modo de aplicação, apenas entre as condições, na qual, a condição estressante ocasionou diminuição em EUA , quando comparadas com plantas em condição normal (Figura 6).

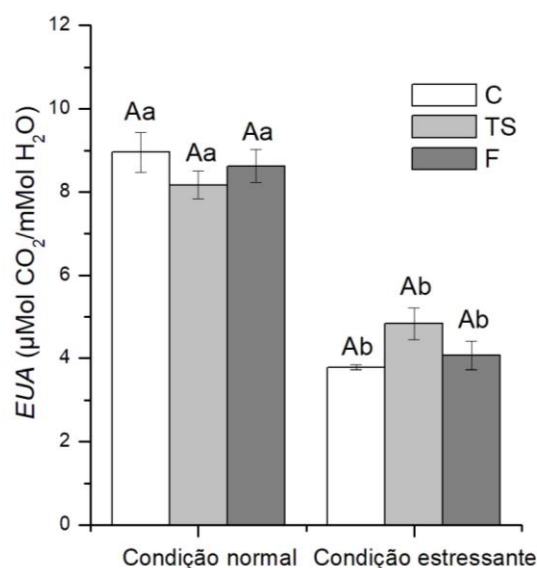


Figura 6 - Eficiência do uso da água (*EUA*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No quarto dia, a *EUA*, as plantas não apresentaram diferença significativa com relação ao modo de aplicação, apenas entre as condições (Figura 7).

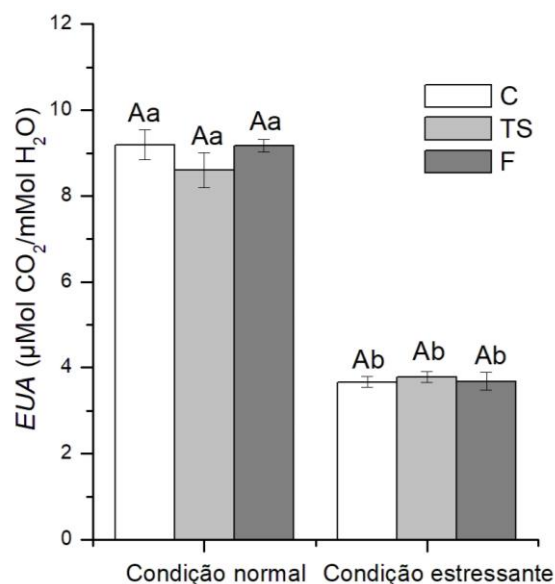


Figura 7 - Eficiência do uso da água (*EUA*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

O mesmo da Figura 7 foi observado nas plantas no quinto dia de estresse, as plantas em condição normal, independente dos modos de aplicação de ACh utilizadas apresentaram melhor *EUA* comparada às plantas na condição estressante (Figura 8).

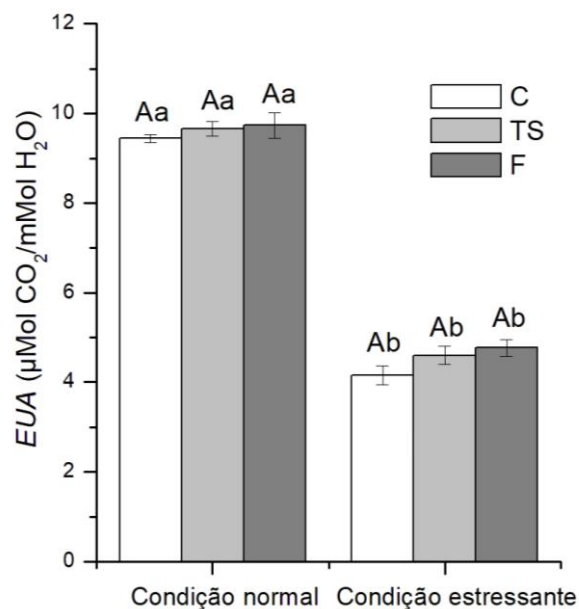


Figura 8 - Eficiência do uso da água (*EUA*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na análise de recuperação, em condição estressante, com o tratamento F aumentou a *EUA*, com relação à condição imposta, comparada às demais doses na mesma condição (Figura 9).

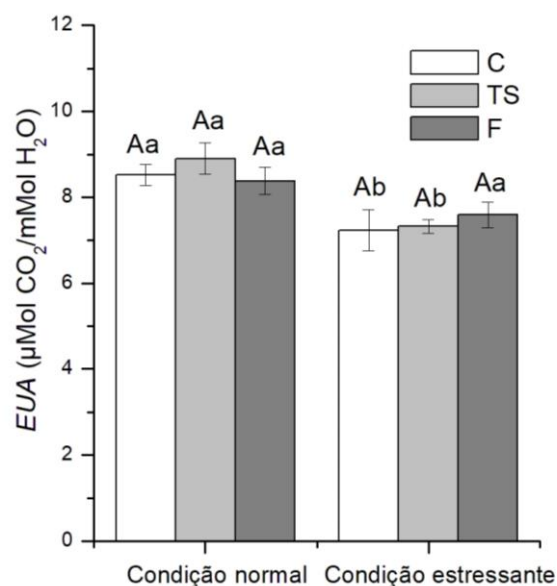


Figura 9 - Eficiência do uso da água (EUA) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No terceiro dia de estresse, não houve diferença estatística significativa na eficiência da carboxilação da rubisco (A/C_i) (Figura 10).

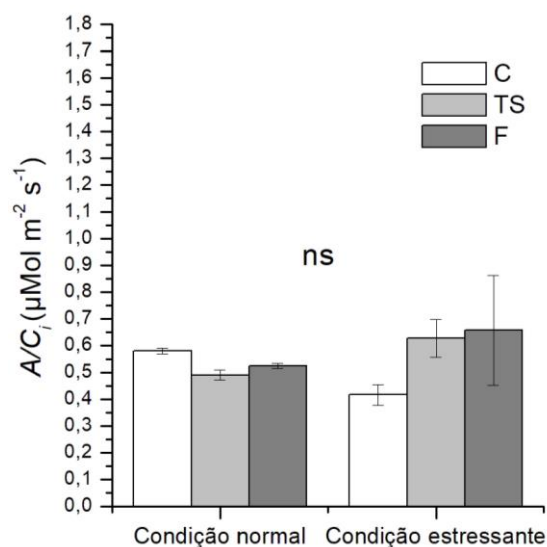


Figura 10 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

O mesmo foi observado no quarto dia após submissão aos estresses, onde A/C_i não apresentou diferença estatística entre as condições e entre os modos de aplicação (Figura 11).

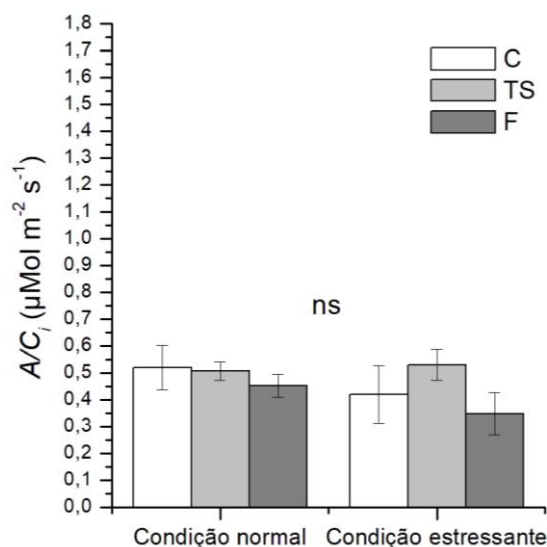


Figura 11 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/22) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Já no quinto dia de estresse, sob condição estressante, as plantas com TS, apresentou diminuição na A/C_i comparadas ao tratamento F (Figura 12).

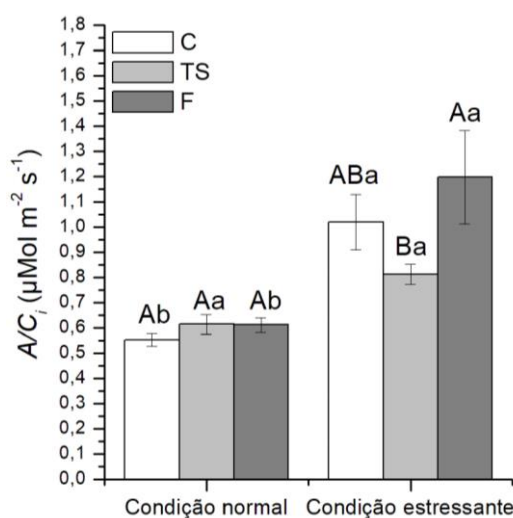


Figura 12 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/22) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na análise de recuperação, 24 horas após retomada das condições normais (01/12/2022), no parâmetro de A/C_i as plantas na condição normal, com aplicação de ACh, apresentaram aumento em TS, comparadas a C (Figura 13). Na condição estressante, as plantas em todos os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (Figura 13).

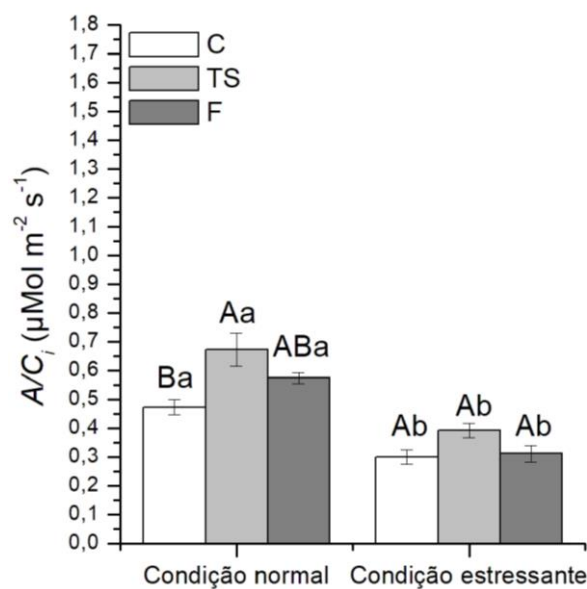


Figura 13 - Eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ diae suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Sob condição estressante, terceiro dia de estresse, as plantas no tratamento F diminuiu 18,45% a taxa de transporte de elétrons (ETR) comparada a C (Figura 14).

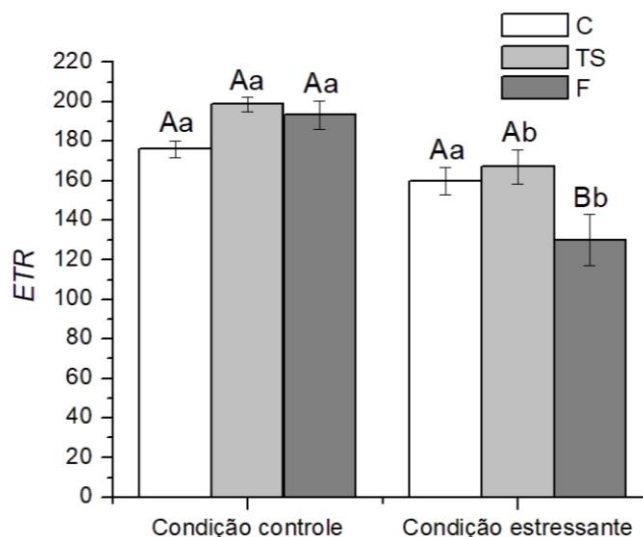


Figura 14 - Taxa de transporte de elétrons (*ETR*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Após quatro dias de estresse, na *ETR*, as plantas no tratamento F, em condição estressante, diferiu estatisticamente com relação ao modo de aplicação comparada ao tratamento TS. Apresentando diferenças entre a mesma aplicação (F) na condição normal (Figura 15).

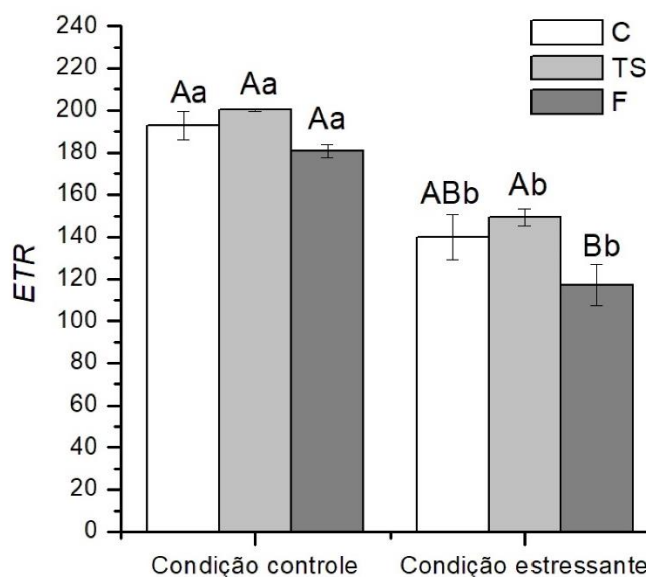


Figura 15 - Taxa de transporte de elétrons (*ETR*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No *ETR*, dia 30/11/22, com cinco dias após submissão aos estresses, as plantas sob condição normal, indiferente dos modos de aplicação de ACh utilizadas, apresentaram um aumento comparada às plantas na condição estressante (Figura 16).

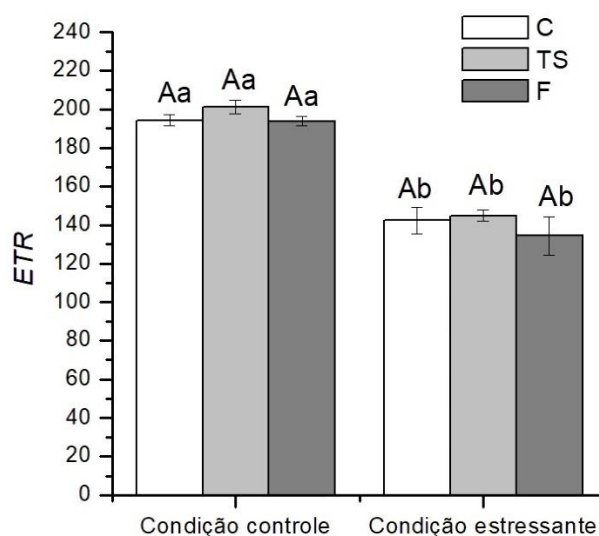


Figura 16 - Taxa de transporte de elétrons (*ETR*) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na análise de recuperação, as plantas na condição estressante, apresentaram *ETR* menor estatisticamente no tratamento F comparadas à TS, e diminuiu 32,4% comparada ao mesmo tratamento na condição normal (Figura 17).

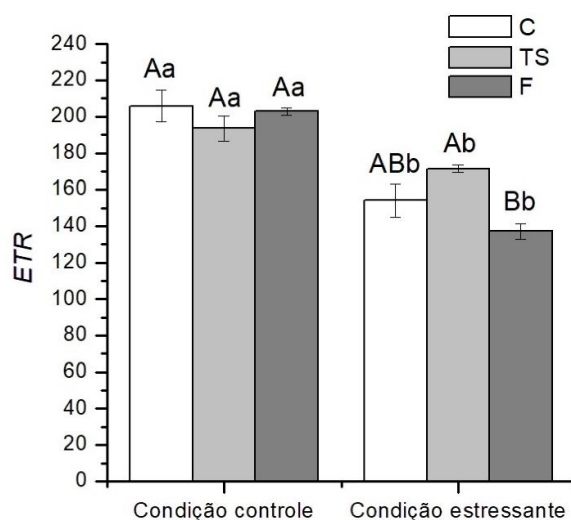


Figura 17 - Taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m'), primeiro dia de análise (28/11/22) e três dias após submissão aos estresses, o tratamento F apresentou uma diminuição em comparação às plantas C com relação à condição (Figura 18).

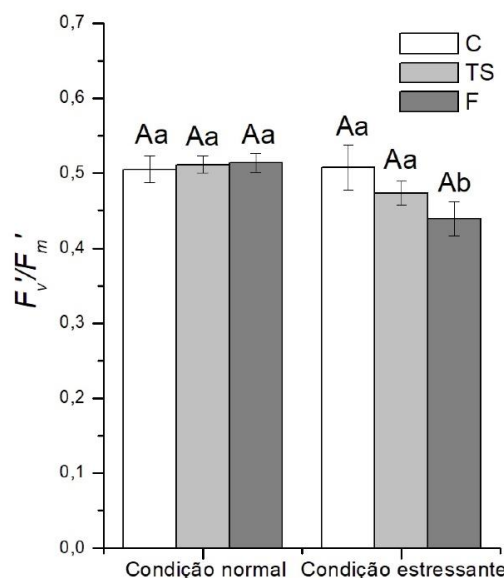


Figura 18 - Fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), três dias (28/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

No quarto dia de estresse, no parâmetro de F_v'/F_m' as plantas com tratamento F em condição estressante apresentou diminuição com relação ao modo de aplicação comparada a C (Figura 19).

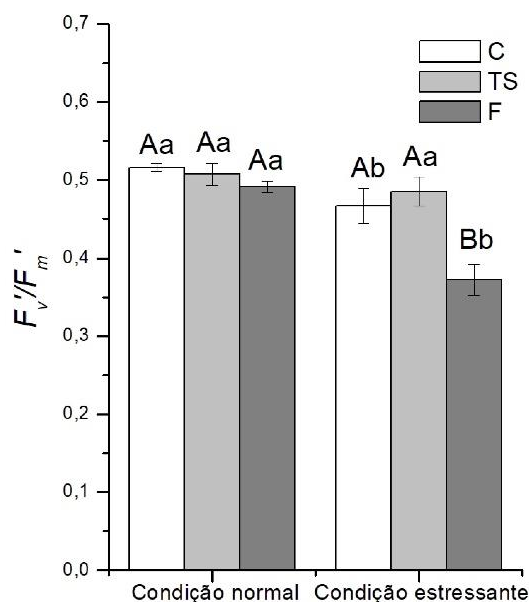


Figura 19 - Fluorescência da clorofila a (F_v'/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), quatro dias (29/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na F_v'/F_m' , cinco dias após estressadas, independente dos modos de aplicação de ACh utilizadas, as plantas em condição estressante apresentaram aumento estatístico em TS e F comparado às plantas C. Ainda, as plantas nos mesmos tratamentos e na mesma condição estressante equipararam estatisticamente com as plantas em condição normal, independente da forma de aplicação de ACh (Figura 20).

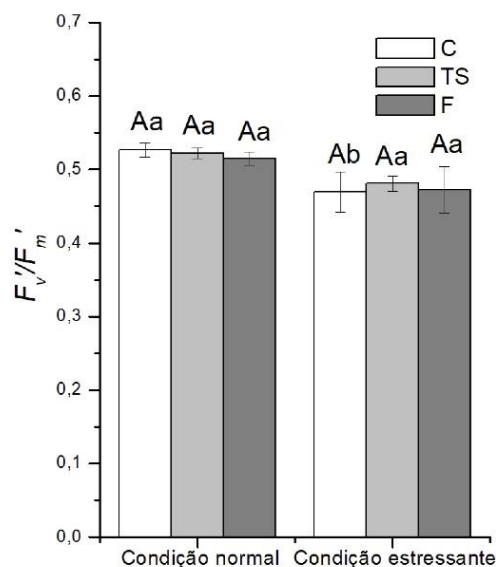


Figura 20 - Fluorescência da clorofila a (F_v/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após a submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na análise de recuperação, na F_v/F_m' não houve diferenças estatísticas, independente das condições e dos modos de aplicação de ACh utilizadas (Figura 21).

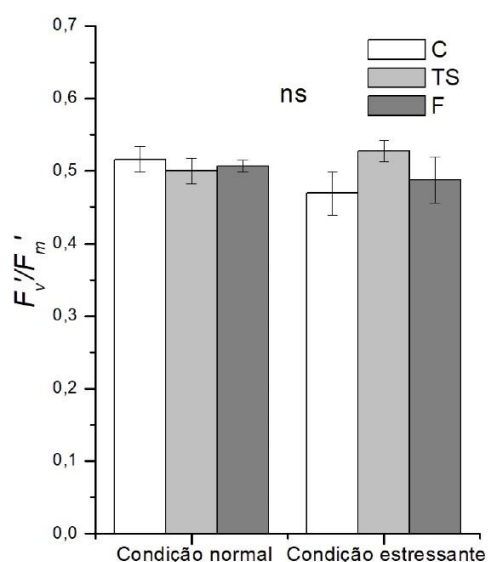


Figura 21 - Fluorescência da clorofila a (F_v/F_m') em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), 24h (01/12/2022) após retomada das condições normais. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

5.2 Avaliações bioquímicas

A SOD diminuiu sua atividade, em condição normal nas plantas de milho com tratamento F em 45,9% e 39,43%, respectivamente, comparadas à C e TS (Figura 22 - A). Sob condição estressante, as plantas com tratamento F apresentou diminuição de SOD em 15,17%, comparadas à C (Figura 22 - A).

A CAT apresentou um aumento da atividade enzimática nas plantas com TS e F em condição normal, em condição estressante, as plantas com TS aumentaram a atividade enzimática comparada a C (Figura 22 - B).

A enzima APX em condição normal nas plantas de milho no TS aumentou 155,28% sua atividade enzimática comparada a C, no entanto, as plantas no tratamento F diminuiu 46,3% comparada ao tratamento C (Figura 22 - C). Já em condição estressante, as plantas com TS e F diminuíram a atividade enzimática da APX em 66,8% e 47,64% respectivamente, comparadas às plantas C (Figura 22 - C).

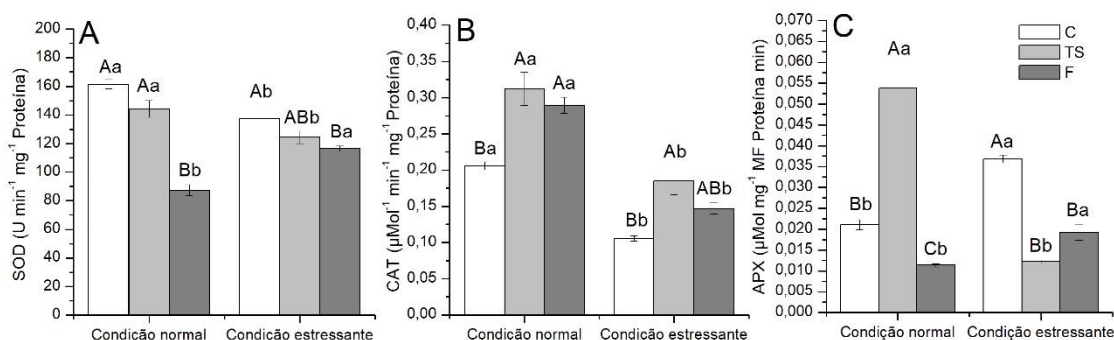


Figura 22 - Superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, p<0.05). Barras indicam erros.

No O₂⁻, as plantas na condição normal no tratamento F apresentam uma diminuição comparadas a C e TS (Figura 23 - A). Em condição estressante as plantas no tratamento F aumentaram 28,91% o O₂⁻ comparada às plantas C (Figura 23 - A).

No H₂O₂ em condição normal, não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Figura 23 - B). Sob condição estressante, as plantas no tratamento

F aumentou a produção de peróxido de hidrogênio comparadas à C (Figura 23 - B).

No parâmetro de MDA, sob condição normal, as plantas com TS diminuíram 24,40% com relação a C (Figura 23 - C). Em condição estressante as plantas com TS e F diminuíram o teor de MDA em 23,88% e 30,94%, respectivamente, comparadas à C (Figura 23 - C).

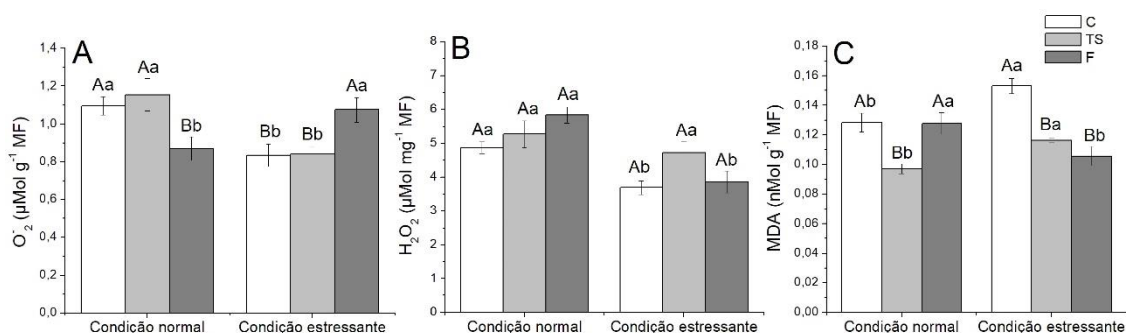


Figura 23 - Superóxido (O_2^-) (A), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (B) e peroxidação lipídica (MDA) (C) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/2 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Na atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE), as plantas sob condição normal com TS e F diminuíram comparadas a C (Figura 24). Em condição estressante as plantas com TS e F também diminuíram a atividade da enzima AChE comparada à C (Figura 24).

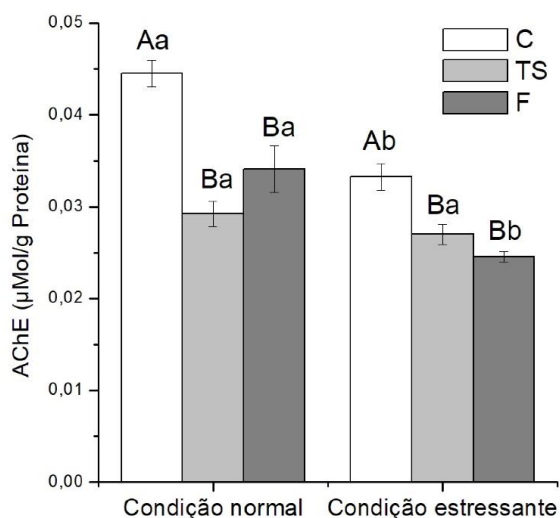


Figura 24 - Acetilcolinesterase (AChE) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^{\circ}\text{C}/19,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^{\circ}\text{C}/28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

Em fenóis e flavonoides totais, foram observados os mesmos resultados, desta forma, sob condição normal, as plantas com aplicação F diminuíram comparado a C com relação ao modo de aplicação (Figura 25 – A e B). No entanto, as plantas em condição estressante não apresentaram diferenças estatísticas, independente dos modos de aplicação de ACh utilizadas (Figura 25 - A e B).

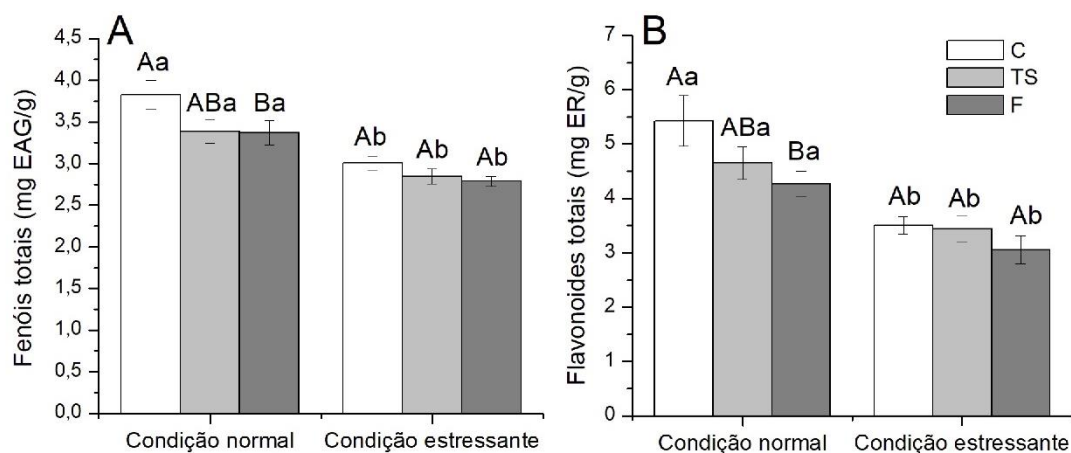


Figura 25 - Fenóis totais (A) e flavonóides totais (B) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^{\circ}\text{C}/19,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^{\circ}\text{C}/28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação), cinco dias (30/11/2022) após submissão aos estresses. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0.05$). Barras indicam erros.

5.3 Avaliações biométricas, biomassa e produção

Análises realizadas 4 meses após a emergência das plantas de milho, os parâmetros de CT e DC não apresentaram diferenças estatísticas, independente das condições e dos modos de aplicação de ACh utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Comprimento total (CT) e diâmetro do colmo (DC) das plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L⁻¹) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal (CN) (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e condição estressante (CE) (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão da irrigação). Quatro meses após emergência. (Tukey, p<0.05).

Tratamentos	Comprimento total (m)		Diâmetro do colmo (mm)	
	CN	CE	CN	CE
C	1,803 Aa	1,853 Aa	19,45 Aa	19,53 Aa
TS	1,645 Aa	1,723 Aa	19,64 Aa	20,53 Aa
F	1,780 Aa	1,845 Aa	20,58 Aa	20,12 Aa
CV% (média)	6,45	5,33	11,3	14,48

Houve um aumento da MSF na condição normal nas plantas com TS e F de ACh comparadas às plantas C (Figura 26 - A). Em condição estressante ocorreu uma diminuição de 28,53%, na MSF das plantas sob o tratamento TS comparada à C (Figura 26 - A).

Em MSC apenas em condição estressante, as plantas no tratamento F diferiu dos outros tratamentos com relação à condição, e não com relação à aplicação de ACh (Figura 26 - B).

Com relação à ME, na condição normal as plantas que receberam aplicação em TS diminuíram a massa da espiga comparadas à F (Figura 26 - C). Em condição estressante, as plantas de milho com aplicação F aumentou a ME em 23,03%, comparadas à C (Figura 26 - C).

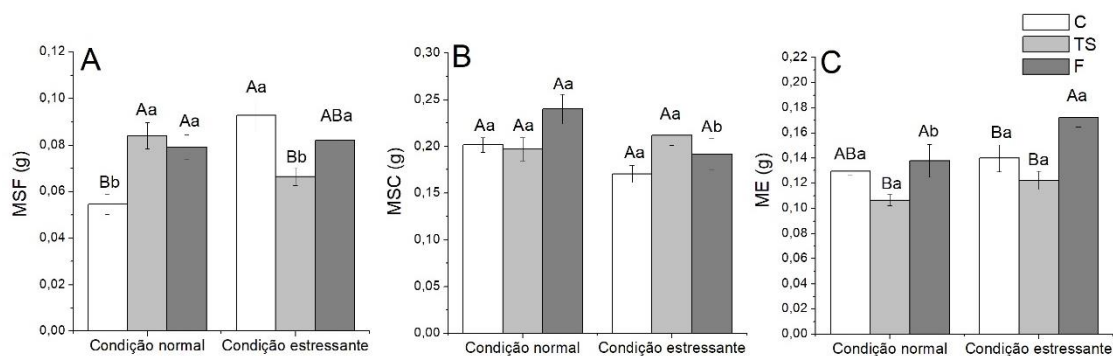


Figura 26 - Massa seca da folha (MSF) (A), massa seca do colmo (MSC) (B) e massa da espiga (ME) (C) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0,05$). Barras indicam erros.

No peso de 100 grãos (g) as plantas na condição estressante com aplicação TS e F apresentaram aumento de 11,9% e 12,77%, respectivamente, comparadas às plantas C (Figura 27).

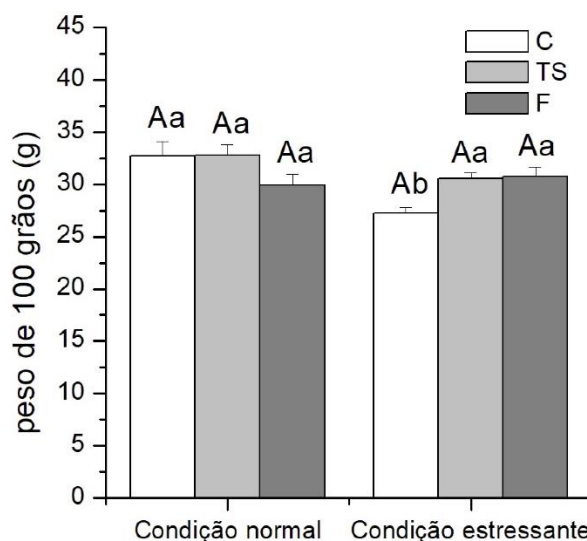


Figura 27 - peso de 100 grãos (g) em plantas de milho tratadas com diferentes aplicações de ACh (tratamento de sementes (TS) e foliar (F) com 1 mmol L^{-1}) e controle com água destilada (C) submetidas à condição normal ($31,9 \text{ }^\circ\text{C}/19,9 \text{ }^\circ\text{C}$ máx./min. e irrigada) e condição estressante ($38 \text{ }^\circ\text{C}/28 \text{ }^\circ\text{C}$ dia/noite e suspensão da irrigação). Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os modos de aplicação de ACh e letras minúsculas entre estresses térmico e hídrico associados (Tukey, $p < 0,05$). Barras indicam erros.

5.4 Análise multivariada por componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) apresentou diferença nos agrupamentos com relação às condições (normal e estressante) (Figura – 28). A

PCA com todos os parâmetros deste trabalho representou 56,46% da variação total dos dados. A componente principal um (PCA1) explicou 47,72% e a componente principal dois (PCA2) explicou 8,74% (Figura – 28). As variáveis que mais contribuíram para distinção dos grupos na PCA1 foram no dia 28/11/2022, assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração, eficiência no uso da água e taxa de transporte de elétrons. No dia 29/11/2022 foram assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, concentração interna de CO₂, eficiência no uso da água, fluorescência da clorofila a e taxa de transporte de elétrons. Para o dia 30/11/2022 foram assimilação líquida CO₂, condutância estomática, concentração interna do CO₂, transpiração, eficiência do uso da água, fluorescência da clorofila a, eficiência de carboxilação da rubisco e taxa de transporte de elétrons. E no dia 01/12/2022 foram assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração, eficiência no uso da água, eficiência da carboxilação da rubisco e taxa de transporte de elétrons. Também nos parâmetros bioquímicos como catalase, peróxido de hidrogênio, acetilcolinesterase, fenol e flavonoide totais e em biomassa, em massa da espiga. Enquanto que para a PCA2 foram transpiração no dia 29/11/2022, e fluorescência da clorofila a nos dias 29/11/2022 e 01/12/2022. A ordenação espacial das repetições permitiu a visualização de dois grupos formados por plantas sob condição normal (31,9 °C/19,9 °C máx./min. e irrigada) e plantas sob condição estressante (38 °C/28 °C dia/noite e suspensão na irrigação), por símbolos fechado e abertos, respectivamente. O grupo de plantas em condição normal está à esquerda do eixo central, nos quadrantes superior e inferior, enquanto que as plantas em condição estressante estão à direita do eixo principal, nos quadrantes superior e inferior (Figura – 28).

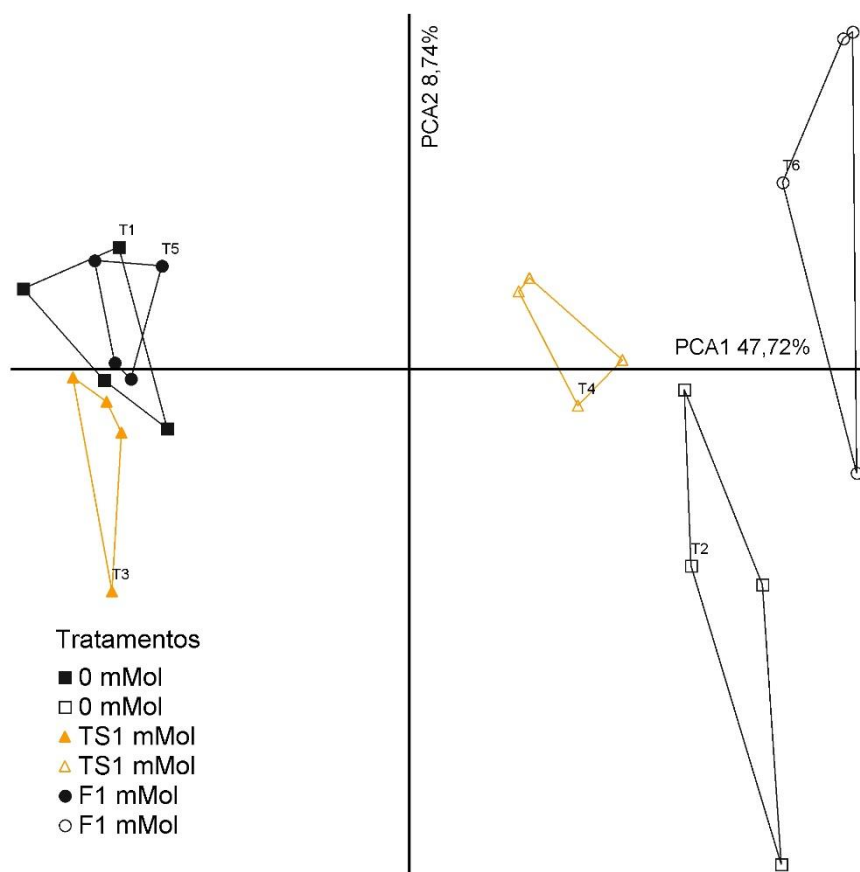


Figura 28 – Gráfico de ordenação gerado pela análise de componentes principais com todos os parâmetros deste trabalho (Figuras 2 a 27). Símbolos fechados e abertos indicam os tratamentos sem e com condição estressante, respectivamente. Quadrados preto, triângulo laranja e círculo preto indicam os modos de aplicação de ACh. As porcentagens que explicam as variações dos dados em cada componente são mostradas nos eixos.

6 DISCUSSÃO

A cultura do milho é sensível a alterações ambientais, como alta temperatura e déficit hídrico (Bhusal *et al.*, 2021; Erenstein *et al.*, 2022). A interação dos estresses térmico e hídrico podem levar à redução da atividade fotossintética, do metabolismo oxidativo e ocasionar danos às membranas, desta forma, interfere negativamente em processos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos das plantas (Hussain *et al.*, 2019).

O mecanismo da fotossíntese é essencial para o metabolismo primário das plantas, especialmente em situações de estresse (Wise *et al.*, 2004). No estudo atual foi demonstrado que plantas com aplicação de ACh após submissão à alta temperatura e suspensão da irrigação diminuíram a atividade fotossintética, levando ao fechamento estomático, à diminuição do conteúdo interno de CO₂ e diminuição na transpiração no tratamento F, nos dois primeiros dias de análise (28/11/22 e 29/11/22) (Figura 2 e 3).

Desta forma, nossos resultados demonstraram a eficiência das plantas em manter o ajuste fisiológico, como forma de evitar a perda de água em meio à condição estressante. O processo de abertura e fechamento estomático ocorre em razão da alteração do volume das células guardas, influenciado pela presença de íons, como K⁺ (Wang; Wang; Lou,1999). Desta forma, a ACh está envolvida no processo de abertura e fechamento dos estômatos, na alteração da permeabilidade da membrana aos íons.

Estudos sem aplicação de ACh, em briófitas encontraram atividade enzimática da acetilcolinesterase entre a parede celular e a membrana plasmática, acreditando no envolvimento da ACh no movimento dos estômatos (Wang; Wang; Lou,1999). Em plantas como tabaco e fava, a atividade da acetilcolinesterase, também foi relevante, desta forma, as células guardas é ponto alvo da acetilcolina (Wang; Wang; Lou,1999; Wang *et al.*, 2003), ocorrendo a diminuição da perda de água através da redução da transpiração (Wang *et al.*, 2003; Jia; Zhang, 2008).

Experimentos realizados em plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) com estresse salino e aplicação foliar e radicular de ACh em diferentes concentrações, apresentou resultados semelhantes, afirmando haver uma

correlação entre A e g_s , pois ambas apresentaram diminuição, levando ao fechamento estomático, e desta forma, impedindo a entrada de CO_2 nas folhas, reduzindo também os valores do C_i (Qin *et al.*, 2019).

Ainda sobre o ajuste fisiológico, houve diminuição de F_v'/F_m' , que é a eficiência fotoquímica adaptada à luz, para as plantas com aplicação F sob condição estressante tanto no primeiro quanto no segundo dia de análises fisiológicas (28 e 29/11/22) (Figura 18 e 19), demonstrando que houve dano nas clorofilas, caracterizando uma perturbação no aparato fotossintético, levando a diminuição da eficiência fotoquímica do PSII (Azevedo Neto *et al.*, 2011).

No entanto, no terceiro dia de análise (30/11/22), as plantas com TS e F aumentaram a F_v'/F_m' , e como observado na recuperação (01/12/22), não houve diferença significativa entre os tratamentos, desta forma, evidenciando uma fotoinibição transitória, não comprometendo a integridade das clorofilas (Figura 20 e 21).

Também nos dois primeiros dias (28 e 29/11/22), e na análise de recuperação (01/12/22), foi observado diminuição do ETR , com aplicação F em condição estressante (Figura 14, 15 e 17). A exposição das plantas à diferentes tipos de estresses abióticos podem reduzir a atividade do fotossistema II (PSII) levando à degradação de proteínas como a D1, que faz parte do centro de reação do PSII, é facilmente degradada com o excesso de luz, ocorrendo um processo de fotoinibição (Araújo; Deminicis, 2009), outro fator é a interferência na produção de ATP e NADPH para etapa final da bioquímica da fotossíntese (Pieters; Tezara; Herrera, 2003; Faseela *et al.*, 2020; Perera-Castro; Flexas, 2023).

Em milho, submetido à estresse hídrico, foi observado uma diminuição acentuada na taxa de transporte de elétrons (ETR) (Guo *et al.*, 2020). Ainda, a exposição prolongada ao estresse hídrico pode levar a ruptura de organelas celulares, dos pigmentos fotossintetizantes, membranas de tilacóides e cloroplastos (Manaa *et al.*, 2021).

No terceiro dia de análise, com as plantas condicionadas à alta temperatura e déficit hídrico (30/11/22), conseguimos observar que a concentração da ACh parou de influenciar nos parâmetros da A , g_s , C_i e E , ocorrendo uma estabilização entre os tratamentos (Figura 4). Apesar disso, é possível inferir que a ACh beneficiou as plantas, através dos resultados

referentes ao potencial hídrico foliar (ψ_f), que é caracterizado pela diminuição da quantidade de água presente no solo, também decrescendo o conteúdo de água da folha, perdendo o turgor das células guardas e levando ao fechamento estomático (Nonami, 1998).

Os estresses hídricos com base no potencial hídrico foliar são definidos em três intervalos de classificação: $\psi < -1,5\text{MPa}$, déficit hídrico severo, entre $-1,5$ e $-0,8\text{MPa}$ déficit hídrico moderado e $> -0,8\text{MPa}$, sem déficit hídrico (Guimarães; Stone; Brunini, 2006). As plantas com o tratamento F sob condição estressante se equipararam às plantas controle (C) sob condição normal, com valores entre $-0,6\text{Mpa}$ e $-1,15\text{Mpa}$. Desta forma, essas plantas apresentaram menor déficit hídrico, com relação aos outros tratamentos (Tabela 1).

Além disso, as plantas quando estressadas, diminuem a atividade fotossintética e conseqüentemente a eficiência da carboxilação da rubisco (A/C_i) (Daneluzzi, 2012). Oposto aos nossos resultados, que apresentaram maior A/C_i em plantas estressadas com aplicação F de ACh também no dia 30/11/22 (Figura 12). Quando a carboxilação é otimizada, temos uma preservação da integridade da Rubisco, sendo benéfica para o aparato bioquímico da fotossíntese. Em plantas estressadas, com aplicação de ACh, isso não resultou em incremento de A , porém, mesmo mantendo a integridade da rubisco o resultado de A em plantas C4 também é moderado pela enzima Pcpase (Bergamaschi; Matzenauer, 2014).

Nossos resultados fisiológicos referentes às análises de recuperação (01/12/22), com plantas em condição estressante que retornaram a temperatura adequada, após 24h. Medidas pontuais constataram que no TS, houve aumento de A , g_s , C_i e E , no entanto, para as plantas com aplicação C e F, diminuíram a A juntamente com E , e aumentaram g_s e C_i (Figura 5), constatando que elas ainda estavam em estado de recuperação e adaptação, visto que, o tempo de recuperação pode variar entre espécies, intensidade e duração de estresses (Liberato *et al.*, 2006).

Evidenciado em estudos realizados com diferentes genótipos de sorgo, submetidos à estresse hídrico, onde após quatro níveis de estresse: ameno (4 dias), médio (8 dias) e severo (12 dias) demonstraram que a condutância estomática diminuiu drasticamente comparado às plantas irrigadas, e que esse

padrão se manteve 7 dias após a suspensão do estresse, no período de recuperação (Magalhães *et al.*, 2016).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando em concentrações adequadas é essencial para regulação de crescimento e desenvolvimento, no entanto, quando as plantas estão em condições de estresse, as EROs são danosas, causando estresse oxidativo, gerando degradação de compostos como carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas celulares e peroxidação lipídica através da formação de malondialdeído (MDA) (Raza *et al.*, 2022).

Como forma de defesa, ocorre a síntese e atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX) e não enzimáticas (fenóis e flavonoides). A relação das EROs, com as enzimas, e os biorreguladores é que definem a sobrevivência das plantas nestas condições adversas (Raza *et al.*, 2022). A utilização de biorreguladores estimula alguns processos celulares como a atividade enzimática (Raza *et al.*, 2022).

A enzima SOD é a primeira na linha de defesa contra EROs, onde é capaz de converter O_2^- em H_2O_2 , posteriormente, a H_2O_2 é convertida em O_2 e H_2O através das enzimas CAT e APX, diminuindo os danos da EROs (Su *et al.*, 2020b).

Nossos resultados demonstraram que aplicação de ACh diminuiu a concentração de MDA em condição estressante para TS e F e aumentou a atividade enzimática da CAT (Figura 22 – B e 23 - C). Dois trabalhos apresentaram resultados semelhantes, com aplicação de ACh em *Nicotiana benthamiana*, um sob estresse hídrico e outro com estresse por cádmio, observando a redução do acúmulo de EROs e aumento da atividade enzimática, da SOD, CAT e APX, desta forma, indicando que a ACh auxilia na expressão de genes relacionados às atividades das enzimas antioxidantes em folhas (Su *et al.*, 2020b; Qi *et al.*, 2023).

A diminuição da atividade enzimática da AChE em TS e F em ambas as condições, e também a diminuição da atividade das enzimas SOD e APX, assim como aumento no conteúdo de H_2O_2 e O_2^- (Figura 24, 22 – A e C e 23 – A e B) está relacionado com a resposta temporal, visto que, respostas bioquímicas variam ao longo do tempo. Um exemplo foi a submissão de *Agropyron desertorum* ao estresse hídrico, onde observaram que a atividade da CAT e SOD

aumentaram substancialmente entre o 5^o e 15^o dias de estresse, no entanto, no 20^o dia elas diminuíram suas atividades, equiparando aos controles. Na APX houve aumento rápido entre o 10^o e 20^o dias e no 20^o dia começou a diminuir sua atividade, desta forma, o aumento e diminuição da atividade enzimática tem variação de dias, com relação a severidade do estresse, tempo de duração e espécies (Liu; Huang, 2000; Tatari *et al.*, 2012)

Com relação aos parâmetros morfológicos, os nossos resultados apresentaram aumento de massa da folha em condição normal em TS e F (Figura 26 - A).

De acordo com a literatura, estresses são capazes de ocasionar redução nos parâmetros de biomassa, como observado em plantas de milho (*Zea mays*) cultivadas sob alta temperatura, com diminuição considerável na biomassa da parte aérea e do enchimento de grãos na espiga, diminuindo a produção, atrelada ao aumento de metabolismo respiratório e consequente mecanismo de manutenção celular (Silveira *et al.*, 2010; Edreira; Otegui, 2012). Positivamente, as plantas com aplicação de bioreguladores apresentam seu crescimento estimulado, aumentando biomassa, a produção e mitigam os efeitos danosos dos estresses (Ahmad *et al.*, 2022).

Outro resultado observado referente aos parâmetros de biomassa e produção, foi a diminuição da MSF e aumento da ME juntamente com o aumento no peso de 100 grãos nas plantas com aplicação F de ACh, (Figura 26 – A e C e 27). Visto que, a ACh, é uma biomolécula envolvida na translocação de carboidratos, como amido, o que promove crescimento e desenvolvimento de todos os órgãos vegetais (Sugiyama; Tezuka, 2011). Podendo promover ajustes fisiológicos e incrementando a biomassa, mesmo em condição de estresses associados (térmico e hídrico).

7 CONSIDERAÇÃO FINAL

A aplicação foliar de ACh apresentou maior eficiência fotossintética em razão de ter se adaptado melhor às condições impostas, no entanto, as plantas com tratamento de semente se equipararam à controle. Parâmetros bioquímicos apresentaram aumento na atividade enzimática da catalase e diminuição no conteúdo de MDA, já em biomassa, houve redução na MSF, mas ocorreu aumento no peso de 100 grãos, em TS e F sob condição estressante.

8 CONCLUSÃO

A aplicação de acetilcolina foliar mitigou os efeitos dos estresses térmico e hídrico, ajustando parâmetros fisiológicos no decorrer do tempo e quando plantas foram retomadas a condições normais, impactando no aumento de biomassa. No entanto, novos estudos são necessários para elucidar o seu papel.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N. *et al.* Integrated application of plant bioregulator and micronutrients improves crop physiology, productivity and grain biofortification of delayed sown wheat. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 35, p. 52534-52543, 2022.

AHMAD, S. *et al.* Melatonin improves the seed filling rate and endogenous hormonal mechanism in grains of summer maize. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 2, p. 1059-1072, 2021.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

AYUB, M. *et al.* Growth and physio-biochemical responses of maize (*Zea mays* L.) to drought and heat stresses. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 155, n. 3, p. 535-542, 2021.

AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salt-stress tolerance screening in the sunflower. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 893, 2011.

BALFAGÓN, D. *et al.* Citrus rootstocks modify scion antioxidant system under drought and heat stress combination. **Plant Cell Reports**, p. 1-10, 2021.

BAMEL, K.; GUPTA, S. C.; GUPTA, R. Acetylcholine causes rooting in leaf explants of in vitro raised tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) seedlings. **Life Sciences**, v. 80, p. 2393-2396, 2007.

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

BARROS, J.F.C.; CALADO, J.G. **A cultura do milho**. Évora: Universidade de Évora. 52 p., 2014.

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

BHUSAL, Bishnu *et al.* A review on abiotic stress resistance in maize (*Zea mays* L.): effects, resistance mechanisms and management. **Journal Biology and Today's World**, v. 10, p. 1-3, 2021.

BILGUER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v. 102, p. 425-432, 1995.

BRAGA, I.; PISSOLATO, M. D.; SOUZA, G. M. Mitigating effects of acetylcholine supply on soybean seed germination under osmotic stress. **Brazilian Journal of Botany**, v. 40, n. 3, p. 617-624, 2017.

CHAKI, M.; BEGARA-MORALES, J. C.; BARROSO, J. B. Oxidative stress in plants. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 481, 2020.

CONAB. **Safra 2023/24**: produção de grãos pode chegar a 294,1 milhões de t impulsionada pela boa rentabilidade de milho, soja e algodão, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5478-safra-de-graos-2023-2024-esta-estimada-em-294-1-milhoes-de-toneladas>. Acesso em 18 de abril de 2024.

CONTINI, E. *et al.* Milho: caracterização e desafios tecnológicos. **Embrapa Milho e Sorgo-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2019.

CUNHA, R. P. *et al.* Diferentes tratamentos de sementes sobre o desenvolvimento de plantas de soja. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1761-1767, 2015.

DANELUZZI, G. S. **Uma abordagem neurofisiológica da acetilcolina em plantas de milho hidratadas e sob condições de estresse hídrico**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2012.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 53, 2014.

EDMEADES, G. O. *et al.* Tropical maize (*Zea mays* L.). In: **Genetic improvement of tropical crops**. Cham: Springer 2017. p. 57-109.

EDREIRA, J. I. R.; OTEGUI, M. E. Heat stress in temperate and tropical maize hybrids: Differences in crop growth, biomass partitioning and reserves use. **Field Crops Research**, v. 130, p. 87-98, 2012.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.2, p. 88-95, 1961.

ELSTNER, E.F.; HEUPEL, A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay of superoxide dismutase. **Analytical Biochemistry**, v. 70, p. 616- 620, 1976.

ERENSTEIN, O. *et al.* Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security**, v. 14, n. 5, p. 1295-1319, 2022.

EWINS, A. J. Acetylcholine, a new active principle of ergot. **Biochemical Journal**, v. 8, n. 1, p. 44, 1914.

FARONI, C. E. *et al.* Marcação de fitomassa de cana-de-açúcar com aplicação de solução de uréia marcada com¹⁵N. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 851-857, 2007.

FASEELA, P. *et al.* Chlorophyll a fluorescence parameters as indicators of a particular abiotic stress in rice. **Photosynthetica**, v. 58, 2020.

- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- GAO, C. *et al.* The integration of bio and organic fertilizers improve plant growth, grain yield, quality and metabolism of hybrid maize (*Zea mays* L.). **Agronomy**, v. 10, n. 3, p. 319, 2020.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant Physiology**, n.59, p.315-318, 1977.
- GUIMARÃES, C. M.; STONE, L. F.; BRUNINI, O. Adaptação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 1, p. 70-75, 2006.
- GUO, Y. Y. *et al.* Exogenous melatonin improves drought tolerance in maize seedlings by regulating photosynthesis and the ascorbate–glutathione cycle. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 67, p. 809-821, 2020.
- HARTMANN, E.; GUPTA, R. 11. Acetylcholine as a Signaling System in Plants. **Second messengers in plant growth and development**, v. 6, p. 257, 1989.
- HASANUZZAMAN, M. *et al.* Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9643-9684, 2013.
- HE, J. *et al.* Genome-wide transcript and small RNA profiling reveals transcriptomic responses to heat stress. **Plant Physiology**, v. 181, n. 2, p. 609-629, 2019.
- HORIUCHI, Y. *et al.* Evolutional study on acetylcholine expression. **Life Sciences**, v. 72, p. 1745-1756, 2003.
- HUSSAIN, H. A. *et al.* Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3890, 2019.
- JAFFE, M. J. Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohumor, acetylcholine. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.46, n.6, p. 768-777, 1970.
- JIA, W.; ZHANG, Jianhua. Stomatal movements and long-distance signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 10, p. 772-777, 2008.
- KAWASHIMA, K. *et al.* Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. **Life sciences**, v. 80, n. 24-25, p. 2206-2209, 2007.

KILLI, D. *et al.* Adaptation to high temperature mitigates the impact of water deficit during combined heat and drought stress in C3 sunflower and C4 maize varieties with contrasting drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 159, n. 2, p. 130-147, 2017.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 713-721, 1993.

KURCHII, B. A. Acetylcholine and ethylene: do they share similar receptors and biological action. **Ukrainica Bioorganica Acta**. v.7, n.1, p. 36-44, 2009.

LI, C. *et al.* Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. **Scientia Horticulturae**, v.124, p. 274-279, 2010.

LIBERATO, M. A. R. *et al.* Leaf water potential, gas exchange and chlorophyll a fluorescence in acariquara seedlings (*Minuartia guianensis* Aubl.) under water stress and recovery. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 315-323, 2006.

LIU, Q. *et al.* Functions of dopamine in plants: a review. **Plant signaling & behavior**, v. 15, n. 12, p. 1827782, 2020.

LIU, X., HUANG, B. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. **Crop Science**, v. 40, p. 503-510, 2000.

MAGALHÃES, P. C. *et al.* Efeitos de Diferentes níveis de estresse hídrico na caracterização ecofisiológica de genótipos de sorgo. *In*: **CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO**. 2016. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE).

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. OM. **Fisiologia da produção de milho**. 2006.

MALDANER, L. J. *et al.* Exigência agroclimática da cultura do milho (*Zea mays*). **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, n. 1, p. 13-23, 2014.

MANAA, A. *et al.* Photosynthetic performance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) after exposure to a gradual drought stress followed by a recovery period. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1862, n. 5, p. 148383, 2021.

MASCARENHAS, K. **Conheça as principais variedades de milho usados na alimentação humana e animal**. Portal UFLA, 2019. Disponível em: <https://ufla.br/noticias/pesquisa/12714-conheca-as-principais-variedades-de-milho-usados-na-alimentacao-humana-e-animal>. Acesso em: 11 out. 2021.

MESEKA, S. *et al.* Performance assessment of drought tolerant maize hybrids under combined drought and heat stress. **Agronomy**, v. 8, n. 12, p. 274, 2018.

NONAMI, H. Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 373-382, 1998.

NORIEGA, P. *et al.* Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1119-1129, 2012.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. Animal neurotransmitter substances in plants. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 94-102, 1997.

OLIVEIRA-SPOLAOR, B. *et al.* Exogenous melatonin induces tolerance to drought stress damage in seedlings and soybean plants. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 82, n. 4, p. 515-526, 2022.

PACHAURI, R. K. *et al.* **Climate change 2014: synthesis report**. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ipcc, 2014.

PASALA, R. K.; MINHAS, P. S.; WAKCHAURE, G. C. Plant bioregulators: a stress mitigation strategy for resilient agriculture. *In: Abiotic stress management for resilient agriculture*. Singapore: Springer, 2017. p. 235-259.

PEIXOTO, P. H. P. *et al.* Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PERERA-CASTRO, A. V.; FLEXAS, J. The ratio of electron transport to assimilation (ETR/AN): underutilized but essential for assessing both equipment's proper performance and plant status. **Planta**, v. 257, n. 2, p. 29, 2023.

PIETERS, A. J.; TEZARA, W.; HERRERA, A. Operation of the xanthophyll cycle and degradation of D1 protein in the inducible CAM plant, *Talinum triangulare*, under water deficit. **Annals of Botany**, v. 92, n. 3, p. 393-399, 2003.

QI, M. *et al.* Supplementation of acetylcholine mediates physiological and biochemical changes in tobacco lead to alleviation of damaging effects of drought stress on growth and photosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 8, p. 4616-4628, 2023.

QIN, C. *et al.* Acetylcholine mechanism of action to enhance tolerance to salt stress in *Nicotiana benthamiana*. **Photosynthetica**, v. 57, n. 2, 2019.

QIN, C. *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals the regulatory effects of acetylcholine on salt tolerance of *Nicotiana benthamiana*. **Phytochemistry**, v. 181, p. 112582, 2021.

QU, P.H. *et al.* *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3628-3635, 2013.

RAMOS-RUIZ, R.; MARTINEZ, F.; KNAUF-BEITER, G. The effects of GABA in plants. **Cogent Food & Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 1670553, 2019.

RATNAKUMAR, P. *et al.* Can plant bio-regulators minimize the crop productivity losses caused by drought, heat stress and salinity? An integrated review. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, 2016.

RAZA, A. *et al.* Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

ROGELJ, J. *et al.* Paris Agreement climate proposals need a boost to keep warming well below 2 C. **Nature**, v. 534, n. 7609, p. 631-639, 2016.

SAGANE, Y. *et al.* Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1359-1371, 2005.

SALIKA, R.; RIFFAT, J. Abiotic stress responses in maize: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 43, n. 9, p. 130, 2021.

SANTOS, T. B. *et al.* Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review. **Stresses**, v. 2, n. 1, p. 113-135, 2022.

SARKER, U.; ISLAM, Md T.; OBA, S. Salinity stress accelerates nutrients, dietary fiber, minerals, phytochemicals and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor* leaves. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0206388, 2018.

SELEIMAN, M. F. *et al.* Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 259, 2021.

SILVA, D. F. *et al.* Características morfológicas, melhoramento genético e densidade de plantio das culturas do sorgo e do milho: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e12310313172-e12310313172, 2021.

SILVEIRA, J. AG *et al.* Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. 2010. v. 1, p. 161-18.

SINGH, A. *et al.* Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. **Plant Gene**, v. 18, p. 100173, 2019.

SRIVASTAVA, A. K. *et al.* Plant bioregulators for sustainable agriculture: integrating redox signaling as a possible unifying mechanism. **Advances in Agronomy**, p. 237-278, 2016.

SU, Y. *et al.* Acetylcholine ameliorates the adverse effects of cadmium stress through mediating growth, photosynthetic activity and subcellular distribution of

cadmium in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p. 110671, 2020a.

SU, Y. Y. *et al.* Exogenous acetylcholine alleviates cadmium-induced phytotoxicity by modulating photosynthetic metabolism and antioxidant potential in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). **Photosynthetica**, v. 58, n. 4, p. 984-994, 2020b.

SUGIYAMA, K.; TEZUKA, T. Acetylcholine promotes the emergence and elongation of lateral roots of *Raphanus sativus*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 10, p. 1545-1533, 2011.

SUZUKI, N. *et al.* Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

TANDZI, L. N.; MUTENGWA, C. S. Estimation of maize (*Zea mays* L.) yield per harvest area: Appropriate methods. **Agronomy**, v. 10, n. 1, p. 29, 2020.

TATARI, M. *et al.* Analysis of antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation and proline content of *Agropyron desertorum* under drought stress. **Biology and Environment**, v. 3, n. 1, p. 9-24, 2012.

TRETYN, A.; KENDRICK, R. E. Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action. **The Botanical Review**, v. 57, n. 1, p. 33-73, 1991.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59-66, 2000.

VON HAARTMANN, U.; KAHLSON, G.; STEINHARDT, C. Histamine formation in germinating seeds. **Life Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1966.

WANG, H.; WANG, X.; LOU, C. Relationship between acetylcholine and stomatal movement in *Vicia faba*. **Acta Botanica Sinica**, v. 41, n. 2, p. 171-175, 1999.

WANG, H.; ZHANG, S.; WANG, X.; LOU, C. Involvement of Ca²⁺/CaM in the signal transduction of acetylcholine-regulating stomatal movement. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 4, p. 351-354, 2003.

WISE, R. R. *et al.* Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 6, p. 717-724, 2004.

XU, Z. Z.; ZHOU, G. S. Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. **Planta**, v. 224, n. 5, p. 1080-1090, 2006.

YAMAMOTO, K.; SAKAMOTO, H.; MOMONOKI, Y. S. Maize acetylcholinesterase is a positive regulator of heat tolerance in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1987-1992, 2011.

YANG, X. *et al.* Response mechanism of plants to drought stress. **Horticulturae**, v. 7, n. 3, p. 50, 2021.

YAO, *et al.* Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHU, J.K. **Developmental Cell**, v. 55, n. 5, p. 529-543, 2020.

ZULFIQAR, F.; ASHRAF, M. Bioregulators: unlocking their potential role in regulation of the plant oxidative defense system. **Plant Molecular Biology**, v. 105, n. 1, p. 11-41, 2021.