



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

BRUNO FELIPE PICOLI DE OLIVEIRA

**DIFERENÇAS ESTRATÉGICAS ENTRE MECANISMOS FISIOLÓGICOS C3 E C4
FRENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS E APLICAÇÃO DE ACETILCOLINA**



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

BRUNO FELIPE PICOLI DE OLIVEIRA

**DIFERENÇAS ESTRATÉGICAS ENTRE MECANISMOS FISIOLÓGICOS C3 E C4
FRENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS E APLICAÇÃO DE ACETILCOLINA**

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. Dr^a. Ana Cláudia P. Santos

Presidente Prudente – SP
2024

Catálogo Internacional de Publicação (CPI)

571.2
O48d

Oliveira, Bruno Felipe Picoli

Diferenças estratégicas entre mecanismos fisiológicos C3 e C4 frente a estresses abióticos e aplicação de acetilcolina / Bruno Felipe Picoli de Oliveira. -- Presidente Prudente, 2024.
70 f.: il.

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

Bibliografia.

Orientadora: Ana Claudia Pacheco Santos

1. Biorregulador. 2. Trocas gasosas. 3. Estresse oxidativo celular.
4. Mitigação de estresse I. Título.

Bibliotecária: Sofia da Cunha Gonçalves – CRB 8\10943

BRUNO FELIPE PICOLI DE OLIVEIRA

**DIFERENÇAS ESTRATÉGICAS ENTRE MECANISMOS FISIOLÓGICOS C3 E C4
FRENTE A ESTRESSES ABIÓTICOS E APLICAÇÃO DE ACETILCOLINA**

Dissertação apresentada a 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.

Presidente Prudente, 11 de junho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Ana Claudia Pacheco Santos
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profª. Drª. Adriana Lima Moro
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Pedro Henrique Gorni
Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista (ESAPP)
Paraguaçu Paulista -SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigos e ao grupo de estudo CEVOP (Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista), que sempre me apoiaram em toda esta jornada acadêmica, meu muito obrigado a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares em especial a minha mãe Lidianne Gomes Picoli e in memoriam ao meu pai Marco Aurélio De Oliveira que me deram todos os ensinamentos, conselho e apoio até aqui em minha vida.

As minhas orientadoras Prof^ª. Drs.^a Ana Claudia Pacheco Santos e. Adriana Lima Moro, por todo os ensinamentos técnicos e paciência durante minha jornada acadêmica.

O Prof. Dr. Hilton Fabricio Vitolo, pelo conhecimento repassado.

A todos meus amigos e parentes que de alguma forma me incentivaram e depositaram sua confiança para que eu conseguisse passar por mais essa etapa da minha vida.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação profissional conferida a mim até o presente momento.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), pelo suporte técnico e colaboração durante a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela bolsa de estudos concedida.

“Toda a educação, no momento, não parece motivo de alegria. Depois, no entanto, produz naqueles que assim foram exercitados um fruto de paz e de justiça”.

(Hebreus 12:11)

RESUMO

Diferenças estratégicas entre mecanismos fisiológicos C3 e C4 frente a estresses abióticos e aplicação de acetilcolina

A soja e o milho estão entre as principais culturas produzidas atualmente, devido ao seu alto valor em proteínas e óleos, com alta valorização no mercado de commodities agrícolas. Porém, o aumento da ocorrência das secas aliado às altas temperaturas pode acarretar severas injúrias em vários processos fisiológicos destas culturas, afetando seu potencial produtivo. Uma forma de mitigar os efeitos do estresse abiótico é a aplicação em pequenas concentrações de biorreguladores, entre eles a acetilcolina (ACh). A ACh atua em diferentes processos fisiológicos da planta e exerce importante função nas respostas de defesa aos estresses abióticos. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi comparar os potenciais efeitos da aplicação exógena de ACh nas culturas de soja e milho cultivadas sob condições de déficit hídrico e alta temperatura associados. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e quando atingiram o estágio V3, parte delas foi levada para uma câmara de crescimento, onde, durante cinco dias foram expostas a 38/28oC (dia/noite) e irrigação com 30% da capacidade de campo. Finalizada a etapa de imposição de estresse e avaliações fisiológicas (potencial hídrico e trocas gasosas) e bioquímicas, elas foram reidratadas e voltadas para as condições controle de temperatura. Após 24 horas (6º dia), foram realizadas novamente medidas pontuais de trocas gasosas (ETR, A, E, gs, Ci, EiC e EUA) e análises bioquímicas (atividade das enzimas SOD, POD, APX e concentrações de O₂⁻, H₂O₂ e MDA), assim como parâmetros de crescimento. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 2 (ausência e presença de estresse e ausência e presença de ACh na concentração de 2mM), totalizando 4 tratamentos e 9 repetições. A ACh foi eficiente na ativação das enzimas antioxidantes nas duas culturas, porém a soja demonstrou aumento nos os parâmetros de A, gs, E, ETR e EC em resposta à aplicação da ACh, enquanto no milho não foi possível observar a mesma resposta positiva no período de estresse. Posteriormente, no 6º dia, todos os parâmetros fotossintéticos se apresentaram com valores recuperados na cultura da soja enquanto que na cultura do milho o biorregulador não resultou nesta resposta. Na avaliação morfológica, as plantas de milho apresentaram ganho na biomassa da

parte aérea e no número de folhas em resposta à aplicação de ACh, enquanto que na soja apresentaram uma realocação de fotoassimilados para a produção de biomassa na raiz. Conclui-se que nesse estudo a soja respondeu melhor quando considerados em conjunto os parâmetros bioquímicos, fotossintéticos e morfológicos frente ao estresse abiótico e aplicação de ACh, comparada ao milho.

Palavras-chave: Biorregulador; trocas gasosas; estresse oxidativo celular; mitigação de estresse.

ABSTRACT

Strategic differences between C3 and C4 physiological mechanisms subjected to stress factors and application of acetylcholine

Soybean and corn are among the main crops currently produced due to their high protein and oil value, with high value in the agricultural commodities market. However, the increased occurrence of droughts combined with high temperatures can cause severe damage to several physiological processes of these crops, affecting their productive potential. One way to mitigate the effects of abiotic stress is to apply small concentrations of bioregulators, including acetylcholine (ACh). ACh acts on different physiological processes of the plant and plays an important role in defense responses to abiotic stresses. In view of the above, the objective of this study was to compare the potential effects of exogenous application of ACh on soybean and corn crops grown under conditions of associated water deficit and high temperature. The plants were grown in a greenhouse and when they reached the V3 stage, some of them were taken to a growth chamber, where they were exposed for five days to 38/28°C (day/night) and irrigation with 30% of field capacity. After the stress imposition stage and physiological (water potential and gas exchange) and biochemical evaluations were completed, the plants were rehydrated and returned to temperature control conditions. After 24 hours (6th day), specific measurements of gas exchange (ETR, A, E, gs, Ci, EiC and EUA) and biochemical analyses (activity of the enzymes SOD, POD, APX and concentrations of O₂⁻, H₂O₂ and MDA) were performed again, as well as growth parameters. The experiments were conducted in a completely randomized experimental design, with a 2 x 2 factorial arrangement (absence and presence of stress and absence and presence of ACh at a concentration of 2 mM), totaling 4 treatments and 9 replicates. ACh was efficient in activating antioxidant enzymes in both crops, but soybean showed an increase in the parameters of A, gs, E, ETR and EC in response to ACh application, while in corn it was not possible to observe the same positive response during the stress period. Subsequently, on the 6th day, all photosynthetic parameters showed recovered values in the soybean crop, while in the corn crop the bioregulator did not result in this response. In the morphological evaluation, the corn plants showed an increase in shoot biomass and number of leaves in response to the application of ACh, while in the soybean plants there was a

reallocation of photoassimilates for the production of biomass in the root. It is concluded that in this study, soybean responded better when considering together the biochemical, photosynthetic and morphological parameters against abiotic stress and application of ACh, compared to corn.

Keywords: Bioregulator; gas exchange; oxidative stress; stress mitigation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).....	32
Tabela 2 —	Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência instantânea da carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse	34
Tabela 3 —	Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), uso da eficiência instantânea de carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	36
Tabela 4 —	Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), teor de malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O ₂ ⁻), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	40
Tabela 5 —	Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O ₂ ⁻), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	42
Tabela 6 —	Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) em plantas de soja submetidas à condição de	

	estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).....	44
Tabela 7 —	Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	46
Tabela 8 —	Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO ₂ (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	49
Tabela 9 —	Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), teor de malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O ₂ -), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh)....	53
Tabela 10 —	Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), teor de malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O ₂ -), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	55

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.....	25
Figura 2 —	Número de folhas (A), massa seca da parte aérea (B), massa seca da raiz (C) e altura (D), em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).....	33
Figura 3 —	Potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	34
Figura 4 —	Assimilação de CO ₂ (A) (A), na condutância estomática (gs) (B), concentração interna de CO ₂ (Ci) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	35
Figura 5 —	Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência do uso da água (EUA) (B) e eficiência intrínseca da carboxilação (EiC) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	36
Figura 6 —	Potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de milho em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição.....	37
Figura 7 —	Assimilação de CO ₂ (A) (A), condutância estomática (g) (B), concentração interna de CO ₂ (Ci) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição.....	38
Figura 8 —	Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência instantânea da carboxilização (EiC) (B) e eficiência do uso da água (EUA) (C) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à	

	condição normal (recuperação). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição.....	39
Figura 9 —	Atividade das enzimas peroxidase (POD) (A), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (B), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (C), concentração de superóxido (O_2^-) (D), ascorbato Peroxidase (APX) (E) e teor de malondialdeído (MDA) (F) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	41
Figura 10 —	Atividade das enzimas peroxidase (POD) (A), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (B), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (C), concentração de superóxido (O_2^-) (D), ascorbato Peroxidase (APX) (E) e teor de malondialdeído (MDA) (F) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	43
Figura 11 —	Altura (A), número de folhas (B), massa seca da raiz (C) e massa seca da parte aérea (D), em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).....	45
Figura 12 —	Potencial hídrico foliar (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	46
Figura 13 —	Assimilação de CO_2 (A) (A), na condutância estomática (gs) (B), concentração interna de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	47
Figura 14 —	Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência do uso da água (EUA) (B) e na eficiência intrínseca da carboxilação (E_iC) (C) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.....	48
Figura 15 —	Potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	50
Figura 16 —	Assimilação de CO_2 (A) (A), na condutância estomática (gs) (B), concentração interna de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de soja submetidas à condição de estresse	

	(déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	51
Figura 17 —	Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência do uso da água (EUA) (B) e eficiência intrínseca da carboxiação (EiC) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação)	52
Figura 18 —	Teor malondialdeído (MDA) (A), concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) (B), concentração de superóxido (O ₂ ⁻) (C), Atividade das enzimas peroxidase (POD) (D), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (E) e ascorbato peroxidase (APX) (F) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).....	54
Figura 19 —	Teor malondialdeído (MDA) (A), concentrações de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) (B), concentração de superóxido (O ₂ ⁻) (C), Atividade das enzimas peroxidase (POD) (D), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (E) e ascorbato peroxidase (APX) (F) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVO.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1	Culturas.....	20
3.2	Estresse abiótico.....	21
3.3	Biorreguladores em plantas.....	23
3.4	Acetilcolina.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Parâmetros de avaliação.....	28
4.1.1	Medidas de trocas gasosas.....	28
4.1.2	Potencial hídrico.....	28
4.1.3	Ánalse de bioquímica.....	29
4.1.3.1	Superóxido dismutase (SOD).....	29
4.1.3.2	Peroxidase (POD).....	29
4.1.3.3	Ascorbato peroxidas.....	30
4.1.3.4	Superóxido (O ₂ ⁻).....	30
4.1.3.5	Peroxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	30
4.1.3.6	Peroxidação lipídica (MDA).....	31
4.1.4	Ánalse biométrica.....	31
4.2	Ánalse estatística.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Milho.....	32
5.2	Soja.....	44
6	DISCUSSÃO.....	57
6.1	Biometria de plantas de soja e milho em resposta a combinação de estresse (alta temperatura e deficiência hídrica) e aplicação de acetilcolina.....	57
6.2	Troca gasosa de plantas de soja e milho em resposta a combinação de estresse (alta temperatura e deficiência hídrica) e aplicação de acetilcolina.....	58

6.3	Metabolismo bioquímico de plantas de soja e milho em resposta a combinação de estresse (alta temperatura e deficiência hídrica) e aplicação de acetilcolina.....	60
7	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A utilização de novas tecnologias na atividade agrícola faz com que o Brasil esteja entre os 5 maiores produtores de alimentos no mundo, sendo maior produtor e exportador de soja e milho (Silva *et al.*, 2024). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (2024), a produção de grãos nacional na safra de 2023/24 deverá atingir 298,4 milhões de toneladas, fazendo que o agronegócio corresponda à 27,4% do PIB brasileiro.

A alta demanda social por alimentos e combustíveis possibilitou o aumento da produção de soja e de milho, com uma alta adaptabilidade para o cultivo destes grãos em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Somado a isso, a alta taxa de proteínas, amido e óleo presente nessas culturas faz com que sejam utilizadas principalmente no setor alimentício e na produção de biocombustíveis (Camacho; Caraballo, 1994).

O milho (*Zea mays*), é uma espécie de metabolismo fotossintético C4, dessa forma, possui maior eficiência no uso da água. No Brasil, a cultura do milho apresenta alta produtividade e adaptação, apresentando vários cultivares resistentes aos estresses abióticos. Este grão possui alta qualidade nutricional, tornando-se uma das principais fontes de matéria prima para alimentação tanto animal quanto humana, e se constituindo no primeiro cereal mais produzido no mundo (Barros *et al.*, 2014).

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é a oleaginosa mais produzida no mundo, e apresenta metabolismo fotossintético C3. Embora no passado a cultura tenha sido introduzida no Brasil para ser usada apenas como forrageira, o avanço nas tecnologias fez com que sua produtividade aumentasse substancialmente fazendo com que o país se tornasse o principal produtor de soja no mundo (Tejo; Fernandes; Buratto, 2019; Coelho, 2024).

O aumento constante da temperatura, aliado a longos períodos de estiagem resulta em mudanças climáticas severas, acarretando em ambientes com maiores temperaturas e consequentemente mais secos afetando negativamente as plantas, ameaçando a produção agrícola. Esses estresses causam redução na condutância estomática e consequentemente diminuição das trocas gasosas. Além disso, os estresses abióticos têm influências negativas nos fotossistemas (PSI e PSII), no transporte de elétrons fotossintéticos e na biossíntese de clorofilas, prejudicando a atividade fotossintética da planta. Geralmente, a ocorrência de estresses abióticos é

caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-), oxigênio singlete e íons hidroxila (OH^-), os quais em excesso provocam o estresse oxidativo celular (Sharma, *et al.*, 2020). No caso das culturas de soja e milho, embora tenham sido lançados novos híbridos e cultivares desenvolvidos para uma maior tolerância aos estresses abióticos, ainda assim ocorrem diminuições na sua produtividade (Shen *et al.*, 2008).

Um bioregulador importante em plantas é a Acetilcolina (ACh), um neurotransmissor encontrado em seres humanos e animais (Braga; Pissolato; Souza, 2017). Nas plantas, a ACh atua em diferentes processos fisiológicos, entre eles o alongamento de células, promovendo o crescimento das raízes (Qin *et al.*, 2020), a distribuição de hormônios, germinação do pólen e a sensibilidade da raiz a mudanças de gravidade, (Sagane *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2020). A ACh também atua como uma molécula intermediária na ativação de genes, proteínas e fatores de transcrição relacionados com a sinalização de estresse abiótico em plantas (Sarangle; Bamel; Purty, 2024).

O estudo da ação mitigadora de estresse via aplicação de biomoléculas, bem como as respostas metabólicas de plantas com diferentes mecanismos fotossintéticos à estas substâncias podem oferecer subsídios para a obtenção de nova tecnologias auxiliares na obtenção de alta produtividade das culturas diante das condições adversas ambientais.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi comparar os potenciais efeitos benéficos da aplicação de acetilcolina sobre parâmetros biométricos, fisiológicos e bioquímicos em plantas de soja e de milho sob condições de déficit hídrico e alta temperatura associados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Culturas

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é originária da China e é atualmente umas das principais culturas comercializadas do mundo, tendo como principais produtores e exportadores o EUA, Brasil e Argentina (Tejo *et al.*, 2019). No segundo semestre de 2024 o Brasil poderá ter uma produção de 166,9 milhões de t/ha, uma alta de 12,7% em relação ao ano anterior (CONAB, 2024).

O seu baixo teor de óleo e alto valor proteico fazem com que a soja seja uma das principais oleaginosas produzidas no mundo, com farelo derivado do grão sendo principal fonte de matéria prima na fabricação de ração de suínos, aves e bovinos (Dall'agnol; Lazarotto; Hirakuri, 2010). O grão de soja é usado nas agroindústrias alimentícias e seu óleo bruto se transforma em óleo refinado e lecitina para ser usado no desenvolvimento de biocombustível e nos mais variados produtos (Embrapa soja, 2001).

A soja apresenta metabolismo fotossintético C3, caracterizado pela enzima, a Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase (RUBISCO) que tem a função de captar o dióxido de carbono (CO₂) intracelular e fixa-lo na molécula ribulose 1,5 bifosfato (Rbp), gerando como produto uma molécula de 3 carbonos (ácido 3 fosfoglicérico – 3PGA). Com isso, passará em um ciclo semiaberto, o ciclo de Calvin- Benson, onde parte do produto final formará amido e parte formará sacarose. Neste ciclo ocorrem reações de redução que utilizam NADPH (fostato de dinucleótido de nicotina e adenina) e ATP (adenosina trifosfato) produzidos na etapa fotoquímica do processo fotossintético (Buckeridge, 2008; Benavides, 2003 Cui, 2021).

Embora a soja consiga se desenvolver numa escala de temperatura entre 20°C a 30°C, a temperatura ótima para seu pleno desenvolvimento é de 30 °C com um volume de água de 450mm a 800mm ao longo do ciclo. Dependendo da cultivar e da região, o fotoperíodo da soja pode alterar, mas em geral é considerada uma planta de dias curtos que apresenta fotoperíodo crítico de 13 a 14 horas (Neumiaer *et al.*, 2020).

O cultivo de milho (*Zea mays*) no Brasil, foi inicialmente explorado pelos índios como fonte de alimento, mas foi pelos colonizadores que recebeu notoriedade, devido a sua alta produtividade, adaptação e digestibilidade; além de ter uma alta qualidade

nutricional. Por estas razões, o milho tornou-se uma das principais fontes de matéria prima para alimentação tanto animal quanto humana (Barros; Calado, 2014).

Segundo a CONAB (2024), a primeira safra de 2024, é estimada em 119,1 milhões de t/ha do cereal tendo um aumento de 3,5% da produção em relação ao ano passado. O milho de segunda safra teve um aumento em área semeada de pouco mais de 16 mil hectares, com acréscimo de 7% em relação ao ano passado.

O milho apresenta metabolismo fotossintético do tipo C₄, com modificações anatômicas, morfológicas e bioquímicas que tornam essa espécie mais resistente a altas temperatura e déficit hídrico. Isto é possível pelo desenvolvimento de uma etapa complementar na fixação do CO₂ que ocorre na bainha vascular, que é uma camada adicional de células que envolve o feixe vascular. Nas células do mesófilo ocorre a captação do CO₂ com envolvimento da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), formando ácidos de 4 carbonos (malato ou aspartato), os quais serão descarboxilados nas células da bainha vascular. Com isso é gerada uma alta concentração de CO₂ dentro das células, possibilitando que a RUBISCO atue em alta concentração de substrato e evitando sua ligação com o oxigênio e, portanto, impedindo a ocorrência da fotorrespiração (Buckneridge, 2008; Benavides, 2003; Cui, 2021).

Para um desenvolvimento satisfatório, o milho necessita de uma temperatura entre 24°C a 30°C e com precipitação em torno de 250 mm até 500 mm anuais, embora que durante seu ciclo, esta planta consuma apenas em torno de 300 mm. O milho é considerado uma planta de dias curtos, embora algumas cultivares tenham pouca ou nenhuma sensibilidade às variações do fotoperíodo (Bergamachi *et al.*, 2014).

3.2 Estresse abiótico

O estresse pode ser definido como uma condição adversa para o crescimento e desenvolvimento das plantas causadas por fatores ambientais ou biológicos ou ambos (Ahmad; Raina; Khan, 2019), com o passar dos anos o acúmulo de ações antrópicas vem acarretando bruscas mudanças climáticas, com episódios cada vez mais extremos de seca e calor, os quais ameaçam a produção agrícola (Kumar, 2020). Segundo o Intergovernamental Panel on Climate Change (2021), a cada década

estima-se um aumento de 0,2°C na temperatura global resultando em um aumento de 1,8 a 4°C até o final do século, acarretando períodos de estiagem prolongados.

Quando plantas são submetidas a períodos de altas temperaturas, sofrem influência negativa no seu rendimento, havendo um desequilíbrio no seu metabolismo. Os danos primários ocorrem no aparato fotossintético e nas mitocôndrias, afetando consequentemente a fotossíntese e a respiração, devido à desestruturação físico-química das biomembranas, uma vez que esses processos dependem da atividade de transporte de elétrons e enzimas associada às membranas (Shen *et al.*, 2008). Porém a alta temperatura desencadeia outras reações prejudiciais a planta, como por exemplo, a degradação de proteínas reguladoras dos fitohormônios, como ácido giberélico (GA), que por sua vez afeta a resposta à auxina, etileno e ácido abscísico que estão inteiramente interligados na sinalização do crescimento da planta, no alongamento do hipocótilo, na queda de flores, hiponastia, pecíolo alongados e inibe o desenvolvimento de estruturas reprodutivas, como pólen (Alvey; Harberd, 2005; Yamada *et al.*, 2009; Sakata *et al.*, 2010; Sawicki *et al.*, 2015; Zhang, 2017).

Quando se encontram em ambiente sob condições de seca, as plantas têm respostas negativas de efeito cascata que começam em suas raízes, com perda de turgescência, redução de seu potencial hídrico e diminuição na condutância estomática. Consequentemente, a concentração de dióxido de carbono interna diminui, resultando em taxas de crescimento e produção de biomassa reduzidas. Paralelamente, haverá maior dissipação de energia luminosa e altos níveis de fotorrespiração gerando espécies reativas de oxigênio (EROS), que causam danos a macromoléculas, incluindo peroxidação lipídica e desestruturação de proteínas (Das; Roychoudhury, 2014; Pasala; Minhas; Wakchaure, 2017).

Para prevenir o dano oxidativo, as células produzem metabólitos antioxidantes (glutathione, ascorbato, tocoferol e compostos fenólicos) e aumentam a expressão e atividade de enzimas desintoxicantes [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX)]. Além disso, o estresse por seca resulta em estresse osmótico que é contrabalançado pela síntese e acúmulo de osmóticos compatíveis (açúcares, aminoácidos, glicina betaína, poliaminas, álcoois de açúcar) (Zhang, 2017). Com o aumento da produção de prolina e compostos de amônio quaternários que são osmólitos essenciais que ajudam a aliviar a inativação de enzimas ou perdas da integridade da membrana, além de manter o turgor celular prevenindo que os solutos

essenciais vazem das organelas e células resultando em danos as funções da membrana e desequilíbrio metabólicos (Valentovic *et al.*, 2006; Akula *et al.*, 2011).

Já a associação desses estresses (alta temperatura e déficit hídrico), causam mudanças morfológicas pois reduz o crescimento, diminui a fertilidade das sementes, consequentemente diminui o rendimento de grãos, baixo teor de clorofila e danifica os tecidos reprodutivos da planta; na parte fisiológica a condutância estomática e taxa fotossintética diminui, eleva a temperatura foliar, diminui atividade da RUBiSCO e eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) e aumento da produção de EROS (Suzuki *et al.*, 2014), isto faz com que, promovam respostas metabólicas e moleculares diferentes nas plantas, sendo danosos às mesmas, levando à diminuição na produção das culturas, tendo impacto negativo na alimentação mundial (Barnabás; Jäger; Fehér, 2008; Killi *et al.*, 2017).

3.3 Biorreguladores em plantas

Uma das soluções imediatas para atenuar os efeitos prejudiciais causados por estresses abióticos em plantas no campo, é o uso de biomoléculas ou biorreguladores, que são uma ferramenta tecnológica que maximiza o rendimento e qualidade da produtividade da cultura.

Biorreguladores são compostos orgânicos não nutrientes, de ocorrência natural, produzidos na planta, que, em baixas concentrações, promovem, inibem ou modificam processos fisiológicos do vegetal, tem papel fundamental nas atividades metabólicas da planta, alterando os principais processos físico-químicos e suas estruturas, possibilitando uma melhora no rendimento vegetal quando se encontram em ambientes hostis (Zulfiqar *et al.*, 2021). Quando usado de maneira adequada, tem a capacidade de controlar o vigor vegetativo, estimular a floração, reduzir a queda de frutos e atrasar o amadurecimento dos frutos (Pasala *et al.*, 2016).

O seu mecanismo consiste em alterar a permeabilidade e o potencial da membrana, estimulando processos regulatórios com a participação de mensageiros secundários ou enzimas metabólicas (Ramakrishna; Roshchina, 2018).

Ao atuarem na transmissão de sinais intracelular e intercelular por meio de impulsos elétricos, os biorreguladores possibilitam um melhor controle nos processos fisiológicos, como a fotossíntese, respiração e movimentos dos órgãos laterais (Akula; Mukherjee, 2020). Ainda, os biorreguladores são envolvidos nos mais variados

processos do tecido vegetal, incluindo a divisão, alongamento e diferenciação celular (Bamel; Gupta, S.; Gupta, R., 2007), além de participar da condutância estomática e sinalização e comunicação entre raiz e broto (Wang, H.; Wang, X.; Lou, 1999; Danelluzi, 2012).

Um exemplo de biorregulador (neurotransmissor em plantas) é a acetilcolina, a qual tem sido recentemente relatada pela sua atuação em respostas de crescimento e desenvolvimento das plantas (Akula; Mukherjee, 2020).

3.4 Acetilcolina

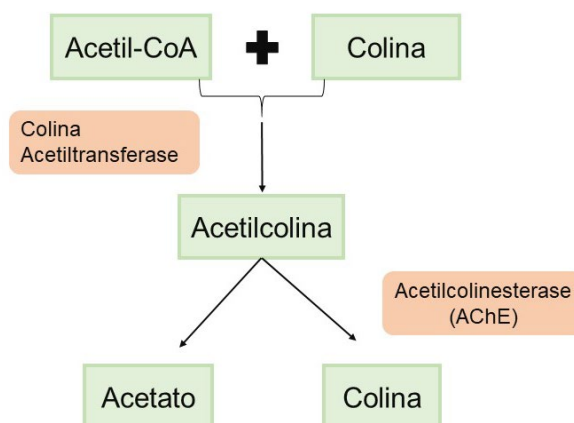
Descoberta no início do século XX por Ewins (1914), a acetilcolina foi classificada como um biorregulador não neural. Porém, estudos posteriores, evidenciaram que se tratava de um neurotransmissor que atua na transmissão de informação do sistema nervoso e muscular de animais (Hartmann; Gupta, 1989).

Conhecida como um neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico de vertebrados e insetos, foi detectada em formas de vida desprovidas de sistema nervoso, uni e multicelulares, tais como bactérias, algas, protozoários, esponjas, fungos e plantas (Danelluzi, 2012). Estudos evidenciaram que a ACh e sua atividade sintetizadora está presente em células não neuronais de mamíferos, como linfócitos, células epiteliais, gastrointestinais, respiratórios, urogenitais e do endoteliais vasculares (Wessler *et al.*, 1998; Wessler *et al.*, 2001; Kirkpatrick *et al.*, 2001; Kawashima; Fujii, 2000, 2003, 2004).

Diante do exposto, e dada à similaridade das funções a nível celular de diversos organismos, a designação “neurotransmissor”, poderia ser substituída por “biomediador”, fomentando um conceito em que essas substâncias participam de um quadro evolutivo de diferentes processos celulares não só de organismos que possui sistema nervoso, mas também de micro-organismos e plantas com sistemas não-sinápticos (Roshchina, 1991, 2001).

Composta por uma amina quaternária e tendo a presença de um éster acético e colina $[CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3]$ (Kurchii, 2009), a acetilcolina é gerada a partir dos compostos Acetil-CoA mais colina se ligando a enzima colina acetiltransferase passando por um processo de catalisação para gerar acetilcolina (ACh), quando hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), tem como produto, os metabólitos colina e acetado (Danelluzi, 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



Fonte: Adaptado de Danelluzi (2012)

Estudos recentes, sugerem o envolvimento de ACh em diversos processos morfológicos e fisiológicos das plantas (Qi; 2023). Em aplicação exógena, relatou-se uma participação no processo de rizogênese de tomate e rabanete (Sugiyama; Tezuka, 2011; Bamel; Gupta, S.; Gupta, R., 2007).

Diversos estudo vem demonstrando a interação que ocorre entre a ACh e fihormônios como as auxinas (Evans, 1972), giberelinas (Lawson *et al.*, 1978; Mukherjee, 1980; Verbeek; Vendrig, 1977) e etileno (Mukherjee, 1980). Além disso, a ACh aumenta a expressão do gene LeEXPA2 que codifica expansinas em hipocótilos de tomate, pepino e soja (Arru; Fornaciari, 2009), promove o alongamento dos coleótilos (Evans, 1972), além de induzir o crescimento radicular (Bamel; Gupta, S.; Gupta, R., 2007).

Na presença de estresse osmótico, a ACh assegurou um ganho de massa seca de raiz e parte aérea em plântulas de soja (Braga, 2017). Além da ação positiva em plântulas de soja, também foi constatado que sob estresse hídrico, a ação conjunta de ACh com Ácido gama-aminobutírico (GABA), proporcionou uma melhor eficiência de uso da água, possibilitando um menor declínio na fotossíntese e gerando maior acúmulo de biomassa (Braga-Reis *et al.*, 2021).

A atividade de acetilcolinesterase localizada em células-guardas dos estômatos em folhas de *Vicia faba* L. e *Nicotiana glauca* Graham, sugere um papel fisiológico da ACh no movimento estomático (Madhavan *et al.*, 1995). A ACh é encontrada também na matriz da parede celular de sementes e nos nós presentes em coleótilos de milho, gerando uma melhor resposta ao efeito de estresse térmico (Yamato *et al.*, 2011). Sua atuação no crescimento se dá em razão da sua interação com hormônios, como auxina, giberelinas e etileno (Danelluzi, 2012).

Presente em todas as partes da planta a ACh confere uma maior resiliência aos estresses abióticos, pois sua interação com outros hormônios vegetais e metabólitos regula positivamente a expressão gênica, resultando em uma melhora no equilíbrio iônico e osmótico, no ajuste estomático, na eficiência do PSII, no aparato fotossintético e no crescimento da planta, além de diminuir a geração de EROS, peroxidação lipídica e clorose (Sarangle *et al.* 2024)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nas dependências do Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em Presidente Prudente – SP, Brasil. Os ensaios foram realizados com plantas de milho (*Zea mays* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com as cultivares DKB 335 pro3 e 64161RS respectivamente, em experimentos separados. As plantas foram cultivadas em vasos de 11 litros preenchidos com terra vegetal. Inicialmente as plantas foram conduzidas em casa de vegetação (sem controle de temperatura / telado). Quando as culturas atingiram o estágio V3, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento (Fitotron) com controle ambiental (Eletrolab, modelo EL 011), para a imposição de alta temperatura e déficit hídrico associados.

No fitotron, o milho e a soja foram mantidos sob temperaturas de 28,5°C durante o dia e 20°C durante a noite, sendo irrigados na capacidade de vaso. Parte das plantas foram transferidas para o fitotron, com um fotoperíodo de 12 horas sendo realizada a imposição de estresse hídrico através da irrigação de 30% da capacidade de vaso. A capacidade de vaso foi determinada por método gravimétrico, com pesagem dos vasos todos os dias no período da manhã. O estresse térmico foi imposto via aumento de temperatura para 38/28°C (dia/noite).

No dia anterior ao início do estresse, as plantas receberam a aplicação de Acetilcolina (ACh) na concentração de 2mM, via pulverização foliar, até o ponto de gotejamento. Já plantas controle foram pulverizadas com água destilada.

Foi adotado o esquema fatorial duplo 2 x 2 (com e sem estresse combinado de seca e calor e com e sem aplicação de ACh), totalizando 4 tratamentos. Para cada tratamento foram utilizadas 9 repetições (plantas), com delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC).

A partir do primeiro dia após o início do estresse, foi realizado um acompanhamento diário da condutância estomática (gs), com auxílio de analisador portátil (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA), até que as plantas sob estresse apresentassem a gs com metade do valor em relação às plantas controle. Neste momento, o potencial hídrico foliar (Ψ_f) foi mensurado com uma câmara de pressão Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, EUA) até a verificação de que o mesmo

atingisse o valor de -1,5 MPa. Aos 5 dias de imposição de estresse foram atingidos esses valores de g_s e de potencial hídrico. Neste momento foram realizadas as medidas pontuais de trocas gasosas e coletado material foliar com quatro repetições biológicas por tratamento para as análises bioquímicas.

Finalizada a etapa de imposição de estresse e avaliações fisiológicas (trocas gasosas), as plantas foram reidratadas e voltadas para as condições controle de temperatura. Após 24 horas (6º dia), foram realizadas novamente medidas pontuais de trocas gasosas, assim como as análises bioquímicas.

4.1 Parâmetros de avaliação

4.1.1 Medidas de trocas gasosas

As medições instantâneas das trocas gasosas foliares foram realizadas em seis réplicas biológicas por tratamento, usando um analisador de gases infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Todas as medidas foram realizadas em folhas saudáveis e totalmente expandidas, no horário entre 9:00 horas - 11:00 horas, sob irradiância saturante de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para cultura da soja e $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para cultura do milho, concentração de CO_2 no ar de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e temperatura de 28°C para ambas as culturas. Nestas condições, foram medidos os seguintes parâmetros: assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração de CO_2 intercelular (C_i), transpiração (E), eficiência do uso da água ($\text{EUA} = A/E$), eficiência instantânea de carboxilação ($\text{EiC} = A/C_i$) e taxa de transporte de elétrons (ETR).

4.1.2 Potencial hídrico foliar

Para as análises deste parâmetro, foram utilizados 4 vasos de cada tratamento no dia do pico do estresse (5º dia) e no dia de recuperação (6º dia), sendo coletado uma amostra, sendo escolhido o terceiro trifólio totalmente expandido de cada tratamento.

O potencial hídrico foliar (Ψ_h expresso em MPa) foi medido em câmara de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, USA). A lâmina da folha foi inserida na câmara e sujeita a pressão crescente de um cilindro de CO_2

comprimido até ser visível a seiva livre no pecíolo fora da câmara. As medidas foram realizadas à 12:00 horas.

4.1.3 Análises bioquímicas

Ao fim das medidas pontuais de trocas gasosas no quinto dia de estresse e no dia de recuperação (6º dia), foram coletados o terceiro trifólio totalmente expandido de 4 réplicas biológicas de cada tratamento. As amostras foram imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido em caixas de isopor, e logo em seguida foram armazenadas em ultra freezer a -80°C para a realização das análises bioquímicas posteriores

4.1.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD considera a capacidade da enzima em inibir a fotoredução do NBT (Acid de nitrotetrazólio cloreto). Sua atividade foi determinada pela adição de 50 µL de extrato bruto em uma solução contendo 13 mMol de metionina, 75 µMol de NBT, 100 nMol de EDTA e 2 µMol de riboflavina em 3,0 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 fotoredução 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 fotoredução 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 (µg/µL).

4.1.3.2 Peroxidase (POD)

A atividade da enzima Peroxidase (POD) foi determinada a partir da diluição (1:25) de 100 µL de extrato bruto e adicionados a 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de pyrogallol e 20 mM H₂O₂. Após

incubação por 1 min a reação foi paralisada com 0,5 mL de H₂SO₄ e a leitura da absorbância feita a 420 nm. Para o cálculo da atividade específica (μ Kat μ g⁻¹ de proteína) da enzima POD foi utilizado um coeficiente de extinção molar de 2,47 mM cm⁻¹ (Peixoto, 1999).

4.1.3.3 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da 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 μ L do tampão foi adicionado 80 μ L de ascorbato de sódio (0.8 mMol), 100 μ L de peróxido de hidrogênio (1 mMol) e 50 μ L 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 ϵ = 2,8 mMol⁻¹ cm⁻¹ (Koshiba, 1993).

4.1.3.4 Superóxido (O₂⁻)

O radical superóxido foi determinado de acordo com Li *et al.* (2010). Foi macerado 200 mg de amostra (tecido foliar), que foi homogeneizado com 1.800 μ L de tampão fosfato de potássio 65 mMol (pH 7.8) e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1.500 μ L 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 (NO₂) foi utilizada para calcular a taxa de geração de O₂⁻.

4.1.3.5 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para análise de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 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. Para o zero, o extrato vegetal foi substituído por

água, os tubos foram incubados em banho-maria à 30°C por 10 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm (Velikova; Yordanov; Edreva; 2000).

4.1.3.6 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 2ml de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). A mistura foi centrifugada à 12000 rpm por 20 minutos. Foi adicionado 500 µl de sobrenadante a 500 µl 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).

4.1.4 Avaliações biométricas

Ao final de cada experimento, com o término de estresse e após o tempo de recuperação das plantas foram avaliadas a altura (cm) e o número de folhas. Após a secagem das plantas em estufa a 65°C até a obtenção do peso constante (g), foram determinadas a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR).

4.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), com o auxílio do programa estatístico SISVAR v. 5.1 (FERREIRA, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Milho

Para as variáveis de altura (ALT), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) houve efeito isolado para o fator “estresse”. Porém, apenas para MSPA houve efeito significativo para a interação entre os fatores (estresse x ACh) (Tabela 1).

Tabela 1 — Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).

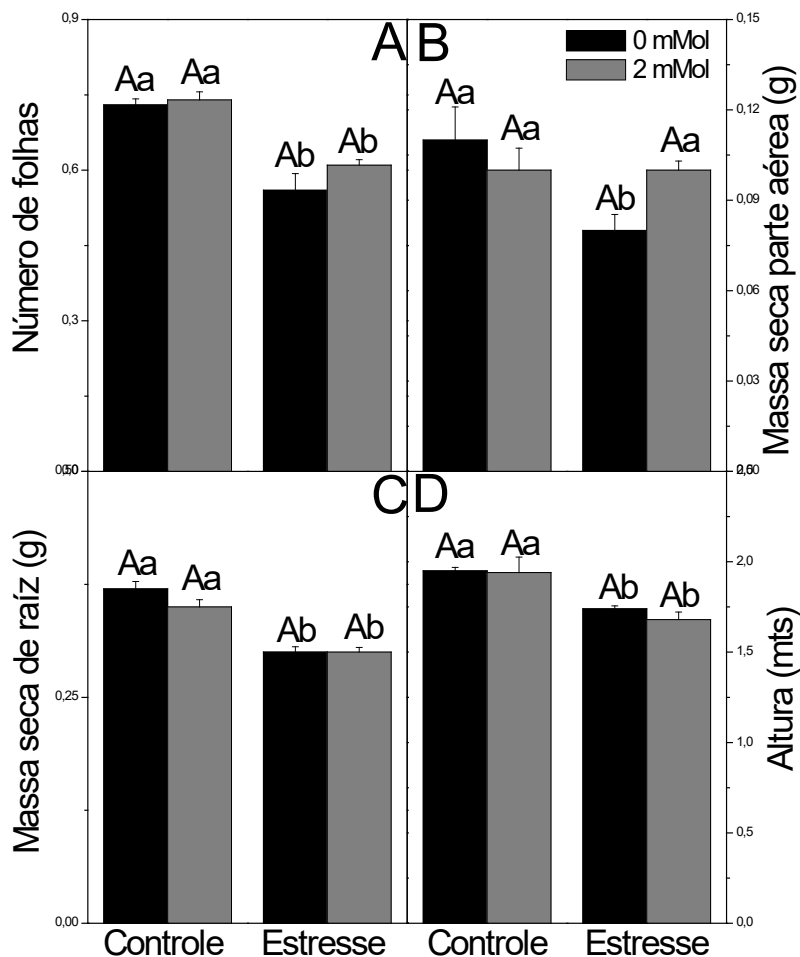
	Fonte de variação	ALT	NF	MSPA	MSR
Biometria	Estresse	**	**	**	**
	ACh	Ns	ns	Ns	Ns
	Interação	Ns	ns	*	Ns

Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

O efeito da condição estressante pode ser observado pelas reduções nas variáveis de ALT, NF, MSPA e MSR. Porém, as plantas sob condição estressante e tratadas com ACh obtiveram melhores resultados de MSPA em relação as plantas sem ACh sob a mesma condição. Para as demais variáveis, a aplicação de ACh não interferiu significativamente, tanto em condição controle quanto sob condição estressante (Figura 2).

Figura 2 — Número de folhas (A), massa seca da parte aérea (B), massa seca da raiz (C) e altura (D), em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses de ACh na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Aos 5 dias de imposição de estresse, as variáveis de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência intrínseca da carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) apresentaram efeito significativo apenas para o fator isolado “estresse” (Tabela 2).

Tabela 2 — Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência instantânea da carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψh) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

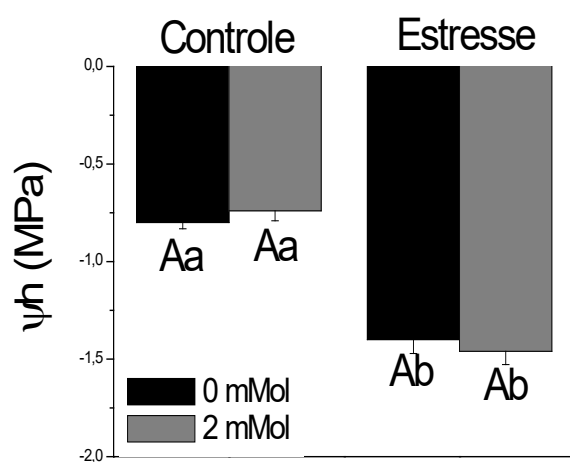
Fonte de variação	A	gs	Ci	E	EiC	EUA	ETR	Ψh
Estresse	**	**	*	*	*	**	**	**
ACh	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	Ns	Ns
Interação	ns	ns	*	Ns	ns	ns	Ns	Ns

Fonte: O autor.

Legenda: ns, não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Aos 5 dias de imposição de estresse, plantas apresentam menores valores de potencial hídrico (Ψh) quando comparado as plantas em condição controle, enquanto que a aplicação de ACh não interferiu significativamente nos resultados (Figura 3).

Figura 3 — Potencial hídrico Ψh em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

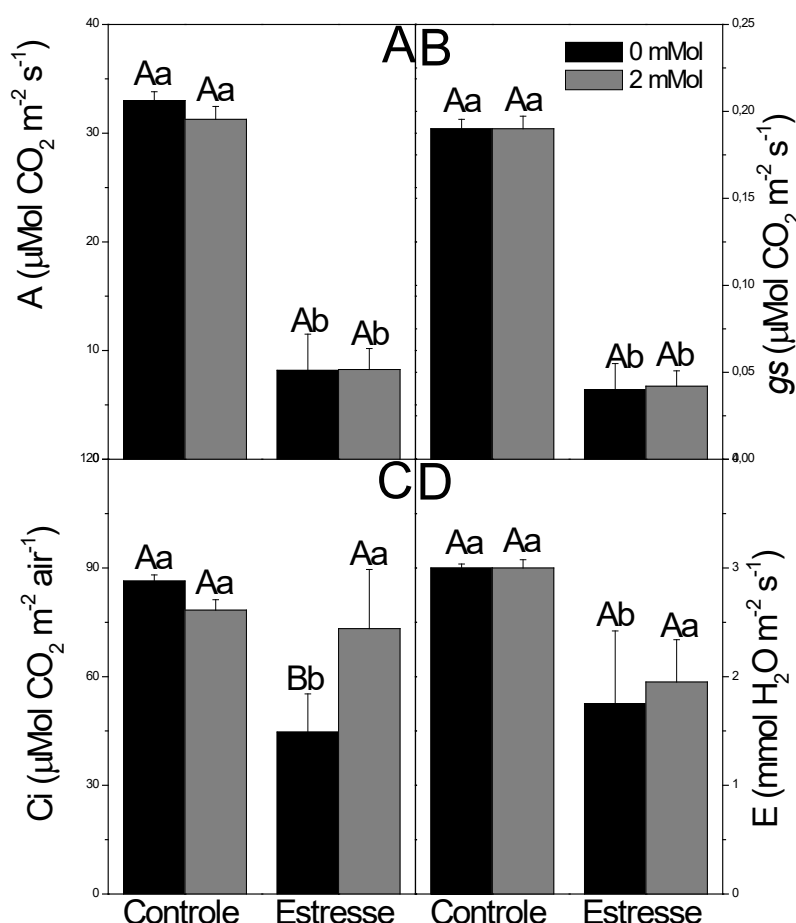


Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Em relação às trocas gasosas, as plantas expostas a condição de estresse apresentaram valores mais baixos em relação as plantas em condição controle nas variáveis de A , g_s e E . A aplicação de ACh não interferiu nos resultados. Já para a variável C_i , as plantas estressadas e que receberam a aplicação de ACh obtiveram os resultados mais altos em relação as plantas sem dose sob a mesma condição (Figura 4).

Figura 4 — Assimilação de CO_2 (A) (A), na condutância estomática (g_s) (B), concentração interna de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

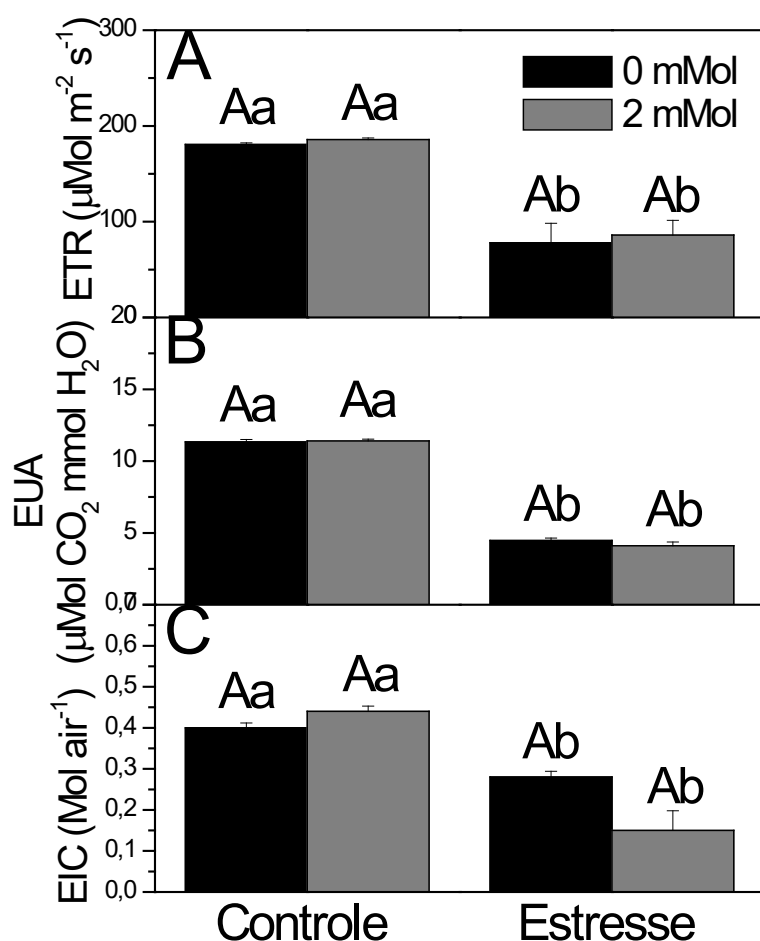


Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

As plantas estressadas apresentaram valores mais baixos de ETR, EUA e EiC em relação as plantas controle, sendo que a aplicação de ACh não interferiu nestes resultados (Figura 5).

Figura 5 — Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência do uso da água (EUA) (B) e eficiência intrínseca da carboxilação (EiC) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Nas avaliações de trocas gasosas realizadas no após o retorno das plantas para a condição controle de hidratação e temperatura, houve efeito isolado apenas para o fator “estresse”, para todos os parâmetros analisados (Tabela 3).

Tabela 3 — Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), uso da eficiência instantânea de carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

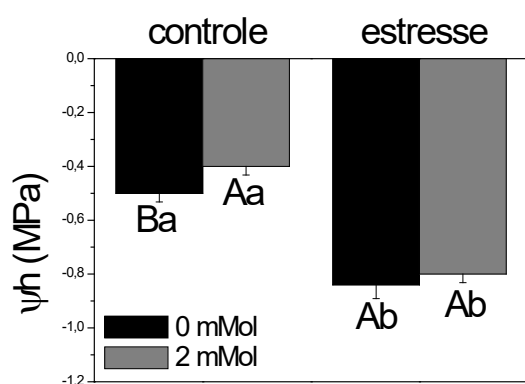
Dias	Fontes de variação	A	<i>gs</i>	Ci	E	EiC	EUA	ETR	Ψ_h
6º	Estresse	**	**	**	**	**	**	**	**
	ACh	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	*
	Interação	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Em relação ao potencial hídrico avaliado no dia de recuperação, houve interferência da aplicação de ACh apenas nas plantas em condição controle, onde as plantas tratadas apresentaram valor de -0,4MPa e, portanto, melhor hidratação do que as plantas sem ACh (Figura 6).

Figura 6 — Potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de milho em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

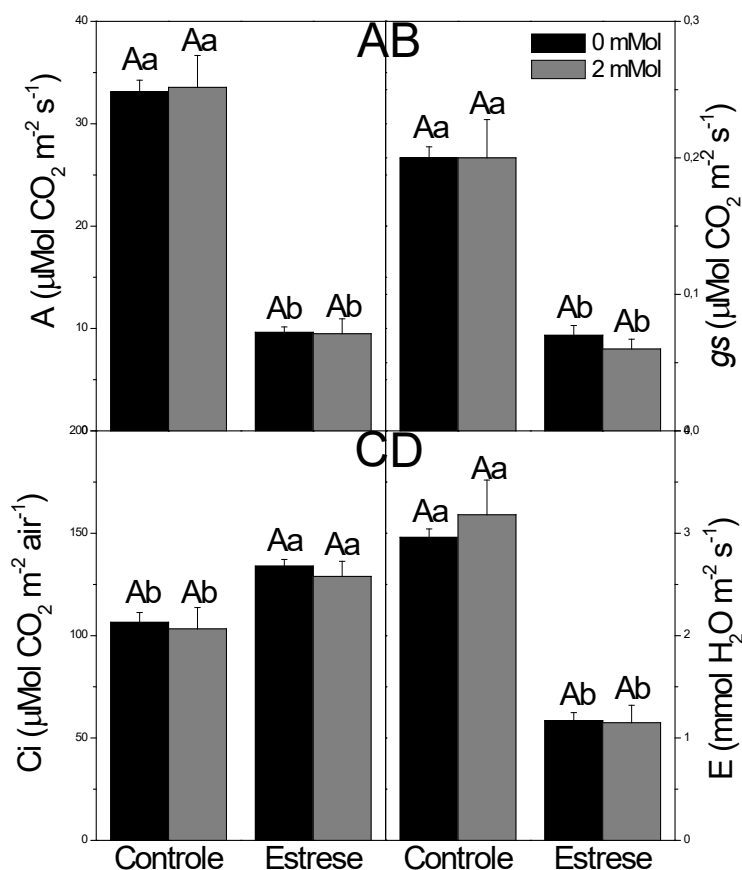


Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Nas medidas efetuadas após a recuperação do estresse, verifica-se que as plantas que estiveram em condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) apresentaram menores valores de g_s , A e E em comparação às plantas controle. Entretanto plantas em condição controle apresentaram menores valores de C_i quando comparadas as plantas em recuperação do estresse. Para todas as variáveis não houve efeito significativo da aplicação de ACh, tanto nas plantas controle como nas plantas sob estresse (Figura 7).

Figura 7 — Assimilação de CO_2 (A) (A), condutância estomática (g) (B), concentração interna de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição controle.



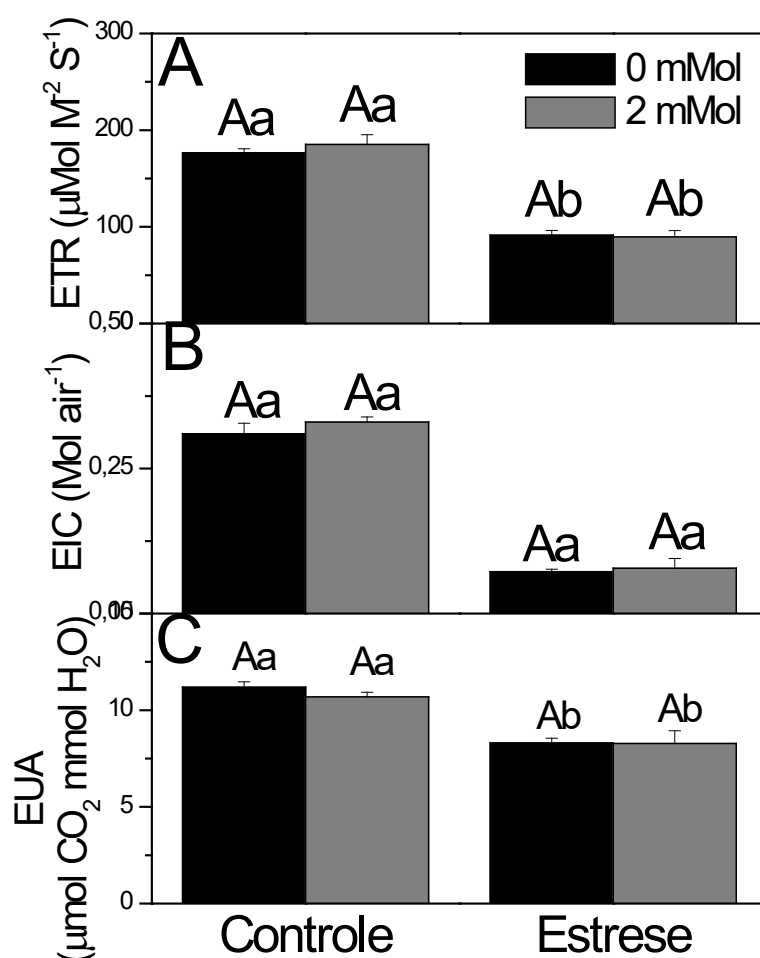
Fonte: O autor.

Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Nas medidas de recuperação do estresse, os dados de ETR, EUA e E_iC mostraram que plantas em condição controle foram melhores que plantas

recuperadas após o estresse, porém, a aplicação de ACh não teve efeito significativo nestes parâmetros (Figura 8).

Figura 8 —Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência instantânea da carboxilação (EiC) (B) e eficiência do uso da água (EUA) (C) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Em relação às variáveis bioquímicas, verifica-se que a atividade das enzimas POD, SOD e APX, assim como as concentrações O₂-1 e MDA apresentaram efeito significativo isolado para fator estresse, enquanto que, para fator “ACh”, só as

variáveis de APX, MDA, O_2^{1-} , e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) obtiveram efeito significativo. Houve efeito significativo para fator de interação (estresse x ACh) apenas para as enzimas SOD e APX (Tabela 4).

Tabela 4 — Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), teor de malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O_2^-), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

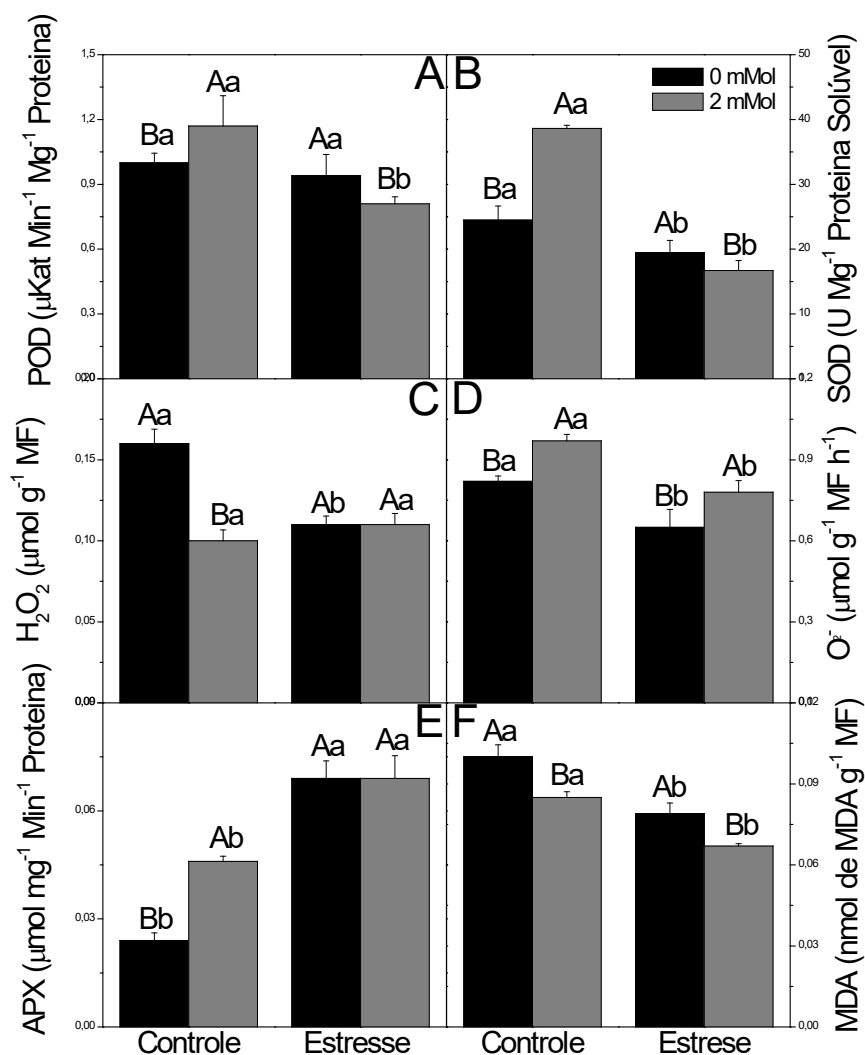
Bioquímica	Fonte de variação	APX	H_2O_2	MDA	O_2^-	POD	SOD
	Estresse	**	Ns	**	**	*	**
	ACh	**	**	**	**	ns	ns
	Interação	*	Ns	ns	Ns	ns	**

Fonte: O autor.

Legenda: ns, não significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

No 5º dia de imposição de estresse, as plantas sob condições controle e com aplicação de ACh apresentaram melhores resultados nas variáveis de POD, SOD, APX e O_2^{1-} , enquanto que as plantas sem ACh obtiveram melhores resultados em MDA e H_2O_2 . Já nas plantas estressadas e tratadas com ACh houve redução na atividade das enzimas SOD e POD e aumento na concentração do radical O_2^{1-} . Entretanto, mesmo com o aumento deste radical livre, as plantas tratadas com ACh apresentaram menor concentração de MDA em relação às plantas sem aplicação da ACh (Figura 9).

Figura 9 — Atividade das enzimas peroxidase (POD) (A), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (B), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (C), concentração de superóxido (O_2^-) (D), ascorbato Peroxidase (APX) (E) e teor de malondialdeído (MDA) (F) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Na recuperação do estresse, verifica-se que as variáveis de POD e H_2O_2 obtiveram efeito significativo para todos os fatores estudados, tanto de forma isolada como em interação. Já as demais variáveis apresentaram efeitos isolados dos fatores estudados (Tabela 5).

Tabela 5 — Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O_2^-), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

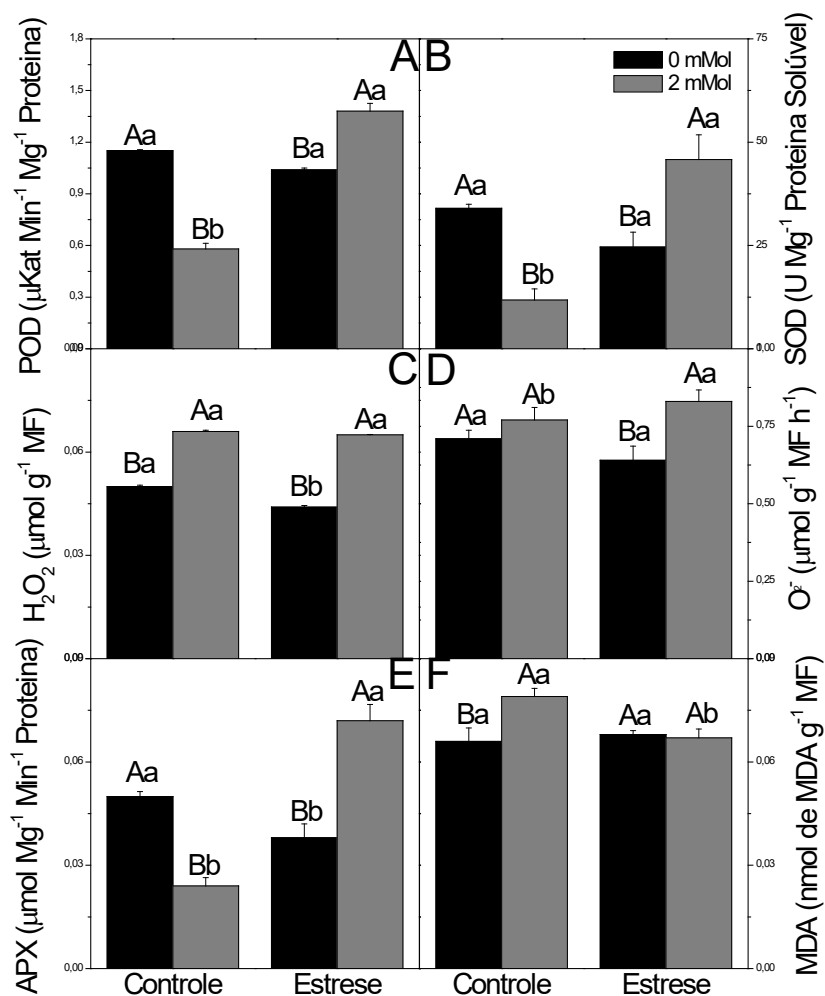
Bioquímica	Fonte de variação	APX	H_2O_2	MDA	O_2^-	POD	SOD
	Estresse	**	**	ns	Ns	**	**
	ACh	ns	**	ns	**	**	ns
	Interação	**	**	*	Ns	**	**

Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

As plantas em condição controle que receberam a aplicação de ACh, apresentaram aumentos nas variáveis de H_2O_2 e MDA. Porém, a atividade das enzimas POD, SOD e APX foi menor em plantas tratadas com ACh. Contudo, sob condição estressante, a aplicação de ACh resultou em aumento da atividade da POD, SOD, APX e das concentrações de H_2O_2 , O_2^- , enquanto que só no MDA os valores foram iguais entre as plantas tratadas ou não tratadas com ACh (Figura 10).

Figura 10 — Atividade das enzimas peroxidase (POD) (A), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (B), concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (C), concentração de superóxido (O_2^-) (D), ascorbato peroxidase (APX) (E) e teor de malondialdeído (MDA) (F) em plantas de milho submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

5.2 Soja

A adição de resíduos e rizobactérias ao solo resultou em diferentes respostas dos atributos biológicos, demonstrando a influência dessas práticas no funcionamento do ambiente edáfico. A introdução da rizobactéria *Bacillus subtilis* promoveu aumentos expressivos na atividade das enzimas desidrogenase e arilsulfatase, enquanto o uso de carvão ativou enzimas como glicosidase e fosfatase, principalmente em solos arenosos.

Notavelmente, a inoculação isolada de *B. subtilis* foi responsável pelo melhor desempenho no rendimento do milho em dois locais distintos, evidenciando seu potencial como bioestimulante. No entanto, as combinações de *B. subtilis* com biochar ou carvão não apresentaram diferenças significativas em comparação aos demais tratamentos, sugerindo que os efeitos positivos podem depender de condições específicas.

Dessa forma, a utilização de *B. subtilis* surge como uma estratégia promissora para aprimorar a qualidade biológica do solo e aumentar a produtividade agrícola em curto prazo. Contudo, é recomendável a realização de estudos adicionais para compreender melhor os mecanismos envolvidos, sobretudo no que diz respeito ao papel do carvão em diferentes tipos de solo e às interações entre os tratamentos e os atributos do solo.

As variáveis de altura (ALT), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) apresentaram efeito significativo para o fator isolado “estresse”, enquanto que MSPA e MSR apresentaram efeito significativo isolado para o fator “aplicação de ACh” (Tabela 6).

Tabela 6 — Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).

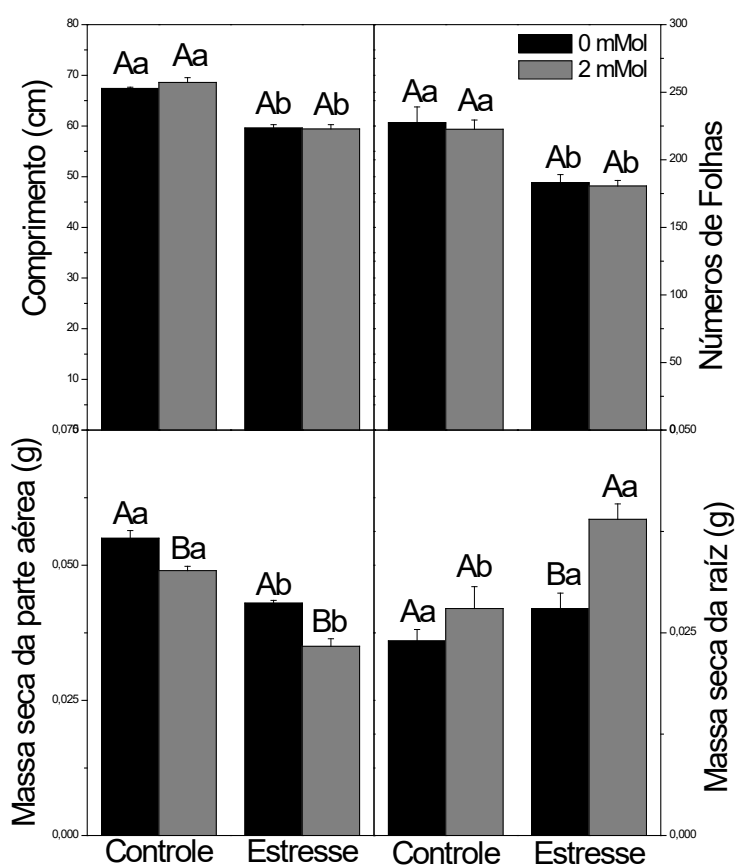
	Fonte de variação	ALT	NF	MSPA	MSR
Biometria	Estresse	**	**	**	*
	ACh	Ns	ns	**	*
	Interação	Ns	ns	Ns	ns

Fonte: O autor.

Legenda: ns, não significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

No final do período de estresse, as plantas apresentaram reduções na altura e número de folhas, quando comparadas às plantas controle, não havendo efeito da aplicação de ACh. Houve diminuição da massa seca da parte aérea (MSPA) em resposta à aplicação de ACh, tanto em plantas controle como em plantas sob estresse. Já a massa seca da raiz (MSR) foi maior nas plantas sob estresse e tratadas com ACh (Figura 11).

Figura 11 — Altura (A), número de folhas (B), massa seca da raiz (C) e massa seca da parte aérea (D), em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Para todas as variáveis de trocas gasosas houve efeito significativo para fator isolado “estresse”, enquanto que para o fator “ACh” houve efeito significativo para a transpiração e potencial hídrico. Houve interação significativa dos fatores estudados apenas para os parâmetros de assimilação de CO_2 (A) e transpiração (E) (Tabela 7).

Tabela 7 — Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (*gs*), concentração interna de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (EiC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

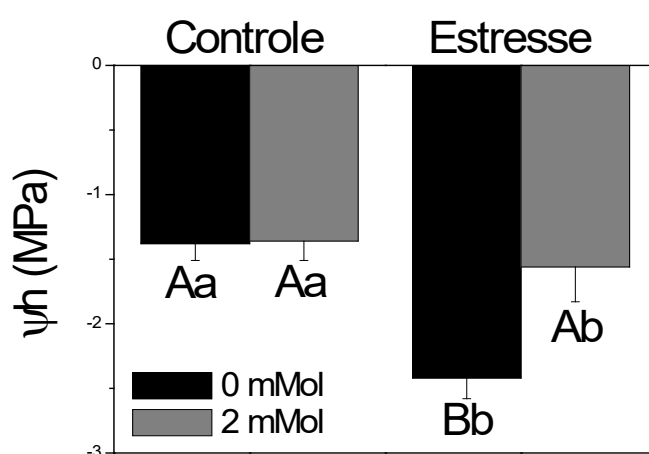
Fonte de variação	A	<i>gs</i>	Ci	E	EiC	EUA	ETR	Ψ_h
Regime	**	**	**	**	**	*	*	**
Doses	ns	ns	ns	*	ns	ns	Ns	*
Interação	**	ns	ns	**	ns	ns	Ns	ns

Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Em relação ao potencial hídrico, as plantas em condição controle não obtiveram interferência da aplicação de ACh, enquanto que as plantas sob condição estressante e com aplicação de ACh apresentaram resultado melhor de hidratação em relação as plantas não tratadas (Figura 12).

Figura 12 — Potencial hídrico foliar (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

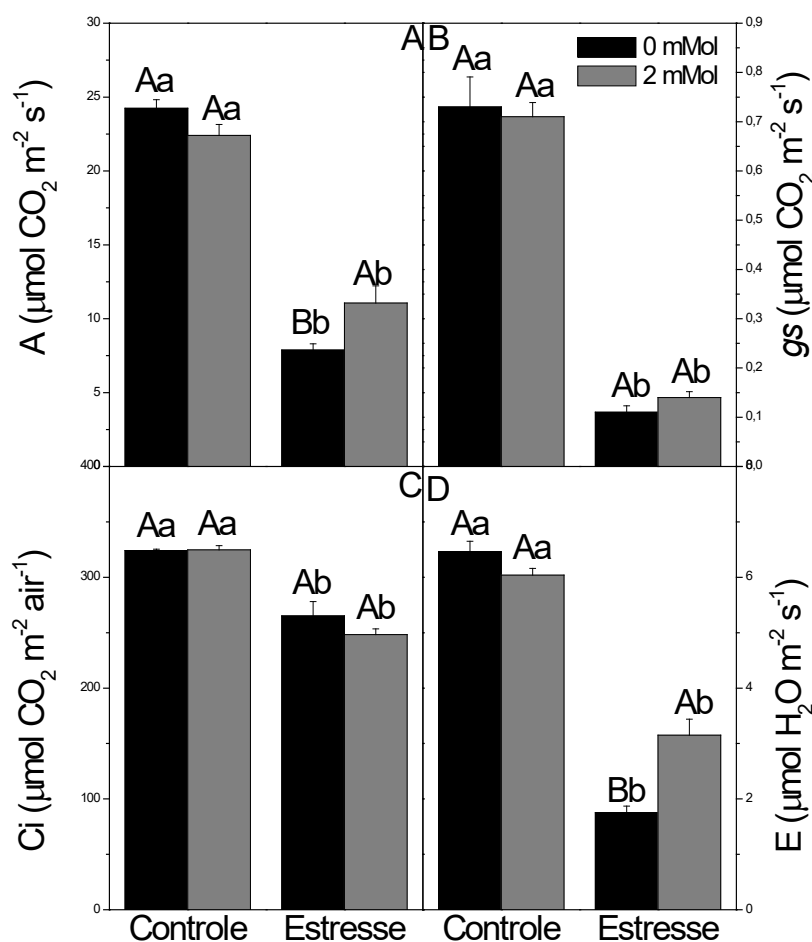


Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

No 5º dia de leitura na semana de imposição ao estresse, as plantas em condição controle não tiveram interferência da dose em todos os parâmetros, em relação as plantas estressadas, mostrou que plantas que receberam a dose de ACh foram superiores quando relacionadas a plantas que não receberam a dose nos parâmetros de A e E. Entretanto as plantas condição controle se sobressai a plantas em condição de estresse com ou sem aplicação da dose de ACh em todos os parâmetros estudados (Figura 13).

Figura 13 — Assimilação de CO₂ (A) (A), na condutância estomática (*gs*) (B), concentração interna de CO₂ (Ci) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.

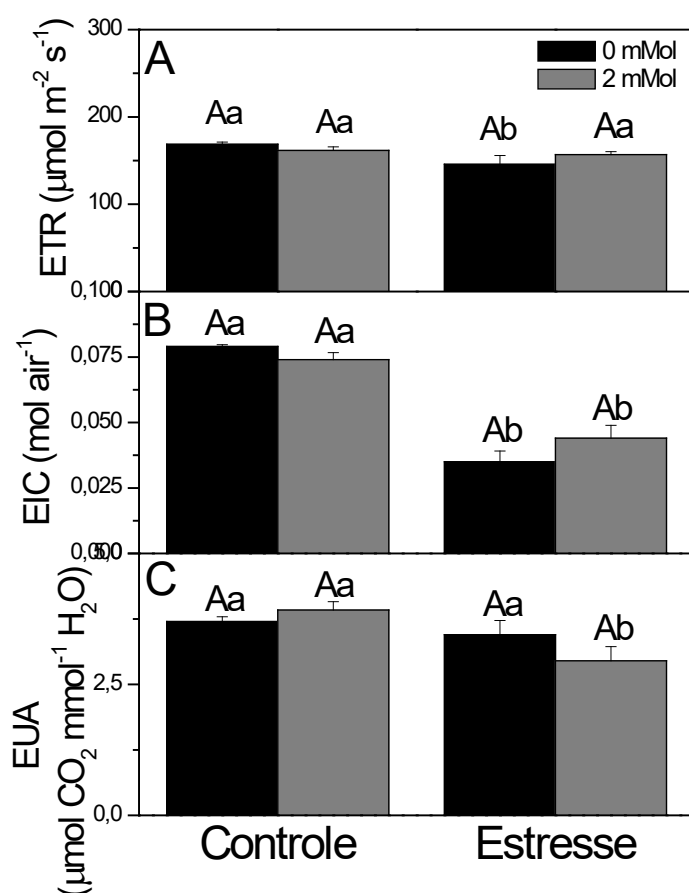


Fonte: O autor.

Legenda: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

No 5º dia de leitura na semana de imposição de estresse, a dose não interfere significativamente tanto em plantas controle quanto em plantas sob estresse para todos os parâmetros. Já, plantas em condição de estresse apresentaram resultados inferiores quando relacionado a plantas em condição controle tanto para as que não receberam a dose quanto para que receberam a dose no parâmetro de EC, contudo, enquanto que no parâmetro de ETR as plantas que não receberam dose em condição controle é melhor que plantas em condição de estresse, por outro lado são as plantas que receberam a dose de ACh em condição controle se sobressai as plantas em condição de estresse no parâmetro de EUA (Figura 14).

Figura 14 — Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência do uso da água (EUA) (B) e na eficiência intrínseca da carboxilação (EiC) (C) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), aos 5 dias de imposição do estresse.



Fonte: O autor.

Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Nas medidas da recuperação, o fator isolado “estresse” indicou efeito significativo para os parâmetros de A , g_s , E , E_iC , ETR e ψ_h ; já para o fator isolado ACh o parâmetro que obteve diferença significativa foi apenas o EUA . Houve interação significativa entre os fatores estudados para A , E_iC , EUA e ETR (Tabela 8).

Tabela 8 — Resumo da análise de variância para dados de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (E_iC), taxa de transporte de elétrons (ETR) e potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

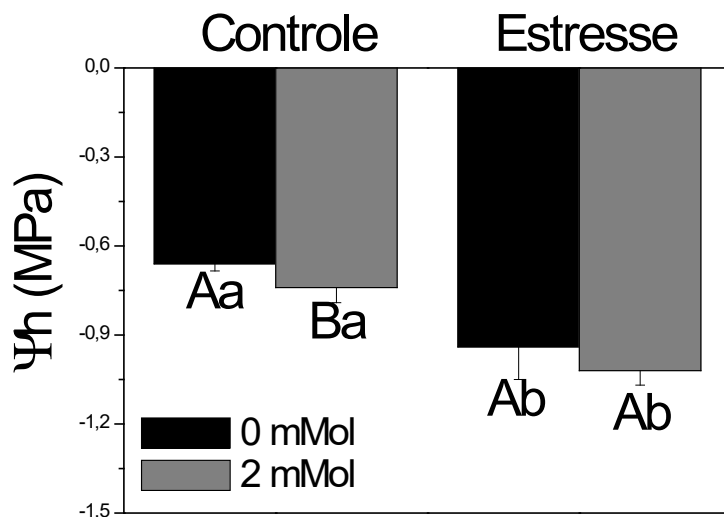
Fonte de variação	A	g_s	C_i	E	E_iC	EUA	ETR	Ψ_h
Estresse	**	**	ns	**	**	ns	**	**
ACh	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
Interação	**	ns	ns	ns	**	**	**	ns

Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Em relação ao potencial hídrico, observa-se que as plantas sob estresse apresentaram valores mais negativos em comparação com as plantas controle. As plantas em condição controle e sem aplicação de ACh apresentaram uma melhora do potencial hídrico em relação as plantas tratadas sob a mesma condição. Porém, em condição estressante, a aplicação de ACh não resultou em diferença significativa (Figura 15).

Figura 15 — Potencial hídrico (Ψ_h) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

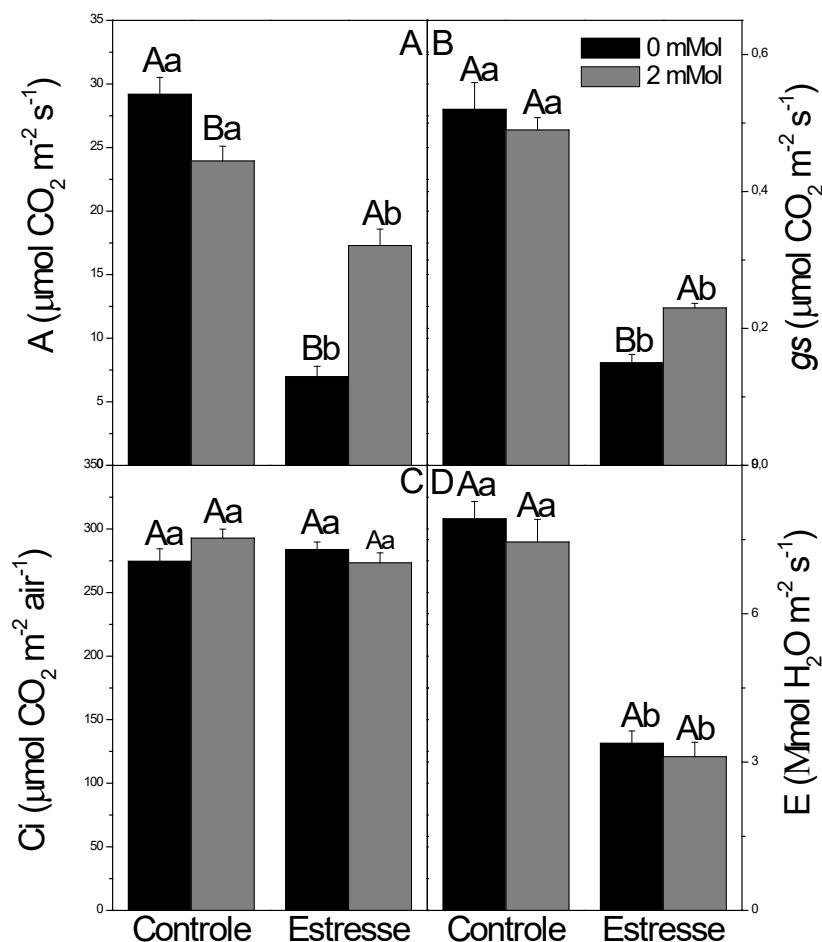


Fonte: O autor.

Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

As plantas em condição controle e sem aplicação de ACh apresentaram maior valor de A do que plantas com ACh, enquanto que para os demais parâmetros a aplicação de ACh não interferiu significativamente nos resultados. Já na condição estressante, as plantas com ACh apresentaram uma melhora em relação às plantas não tratadas nos parâmetros de A e g_s , enquanto que nos outros parâmetros a aplicação de ACh não interferiu significativamente nos resultados. A ação deletéria da condição estressante faz com que as plantas em condição controle se sobressaiam em relação às plantas e condição de estresse com ou sem dose respectivamente nos parâmetros de A, g_s e E, por outro lado a dose não interfere significativamente no resultado no parâmetro de C_i (Figura 16).

Figura 16 — Assimilação de CO_2 (A) (A), na condutância estomática (g_s) (B), concentração interna de CO_2 (C_i) (C) e transpiração (E) (D) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

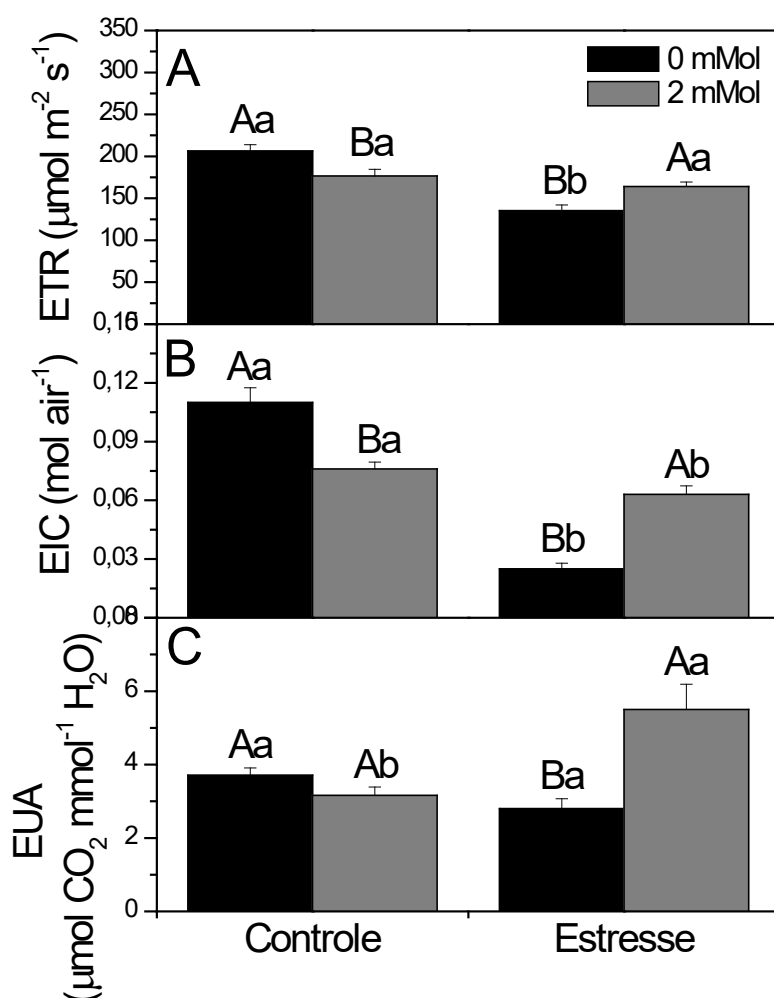


Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Nas medidas da recuperação, as plantas que não receberam a aplicação de ACh em condição controle obtiveram melhores resultados de ETR e E_iC quando comparadas plantas tratadas. Na condição de estresse, as plantas que receberam a aplicação de ACh apresentaram melhores resultados de ETR, E_iC e EUA quando comparadas as plantas não tratadas. Na ausência de aplicação de ACh não houve diferença entre plantas controle e sob estresse em relação à EUA (Figura 17).

Figura 17 — Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A), eficiência do uso da água (EUA) (B) e eficiência intrínseca da carboxilação (EiC) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

No 5º dia de leitura da semana de imposição de estresse, houve interação significativa entre os fatores estudados para os parâmetros de POD, SOD O_2^- e APX, enquanto que para os demais parâmetros houve efeito isolado (Tabela 9).

Tabela 9 — Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), teor de malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O_2^-), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).

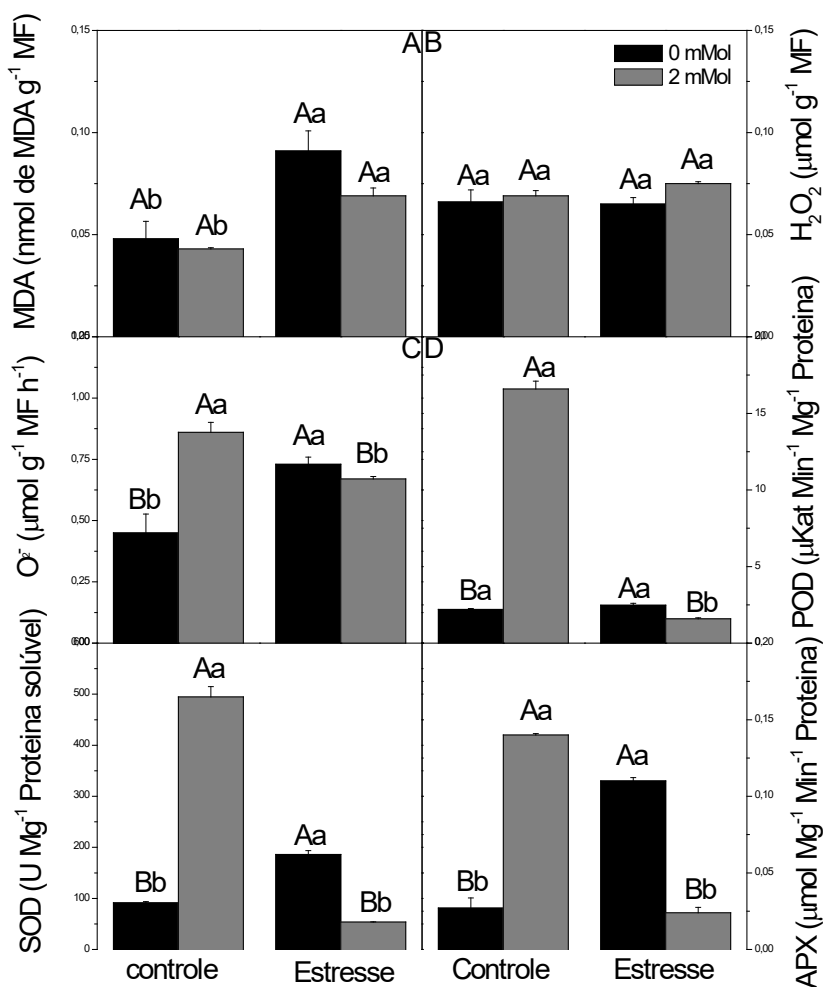
Fonte de variação	APX	H_2O_2	MDA	O_2^-	POD	SOD
Estresse	**	ns	Ns	**	**	**
ACh	*	ns	Ns	ns	**	**
Interação	**	ns	Ns	*	**	**

Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Comparando-se as plantas controle e estressadas independente da aplicação de ACh, verifica-se que sob condição de alta temperatura e deficiência hídrica as plantas de soja apresentaram maiores concentrações foliares de MDA e O_2^- e maior atividade das enzimas SOD, POD e APX. (Figura 18). Já na comparação entre plantas controle e estressadas que receberam a aplicação de ACh verifica-se que houve maior valor de MDA nas plantas sob estresse e novamente redução da atividade das enzimas POD, SOD e APX. Reportando-se ao fator “ACh “dentro de cada condição (controle X estresse), verifica-se que nas plantas sob condição controle a aplicação de ACh resultou em maior atividade das enzimas antioxidantes e maior concentração de O_2^- , porém com menor valor de MDA. Sob condição de estresse, a aplicação de ACh ocasionou redução da atividade das enzimas e das concentrações de MDA e O_2 , porém houve aumento do radical H_2O_2 (Figura 18).

Figura 18 — Teor malondialdeído (MDA) (A), concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B), concentração de superóxido (O₂⁻) (C), atividade das enzimas peroxidase (POD) (D), atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD) (E) e ascorbato peroxidase (APX) (F) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

Na recuperação do estresse, POD, SOD, APX, MDA e H₂O₂ indicaram diferença significativa para ambos os fatores de forma isolada, enquanto que O₂⁻ indicou para fator isolado “ACh” e para interação (regime x dose). Houve efeito de interação significativa entre os fatores somente para a SOD (Tabela 10).

Tabela 10 — Resumo da análise de variância para dados de ascorbato peroxidase (APX), concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), teor de malondialdeído (MDA), concentração de superóxido (O_2^-), atividade das enzimas peroxidase (POD) e atividade das enzimas de superóxido dismutase (SOD), em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).

Fonte de variação	APX	H_2O_2	MDA	O_2^-	POD	SOD
Estresse	**	**	**	ns	**	**
ACh	**	**	*	**	**	**
Interação	ns	ns	Ns	*	Ns	*

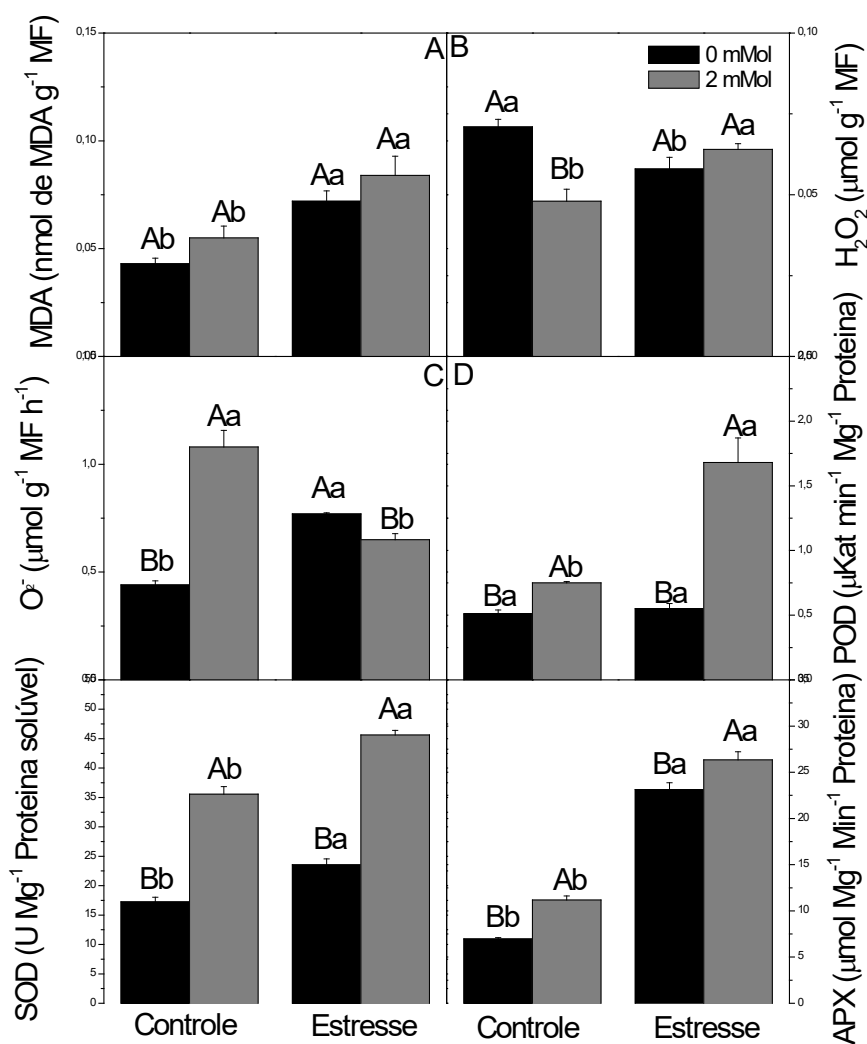
Fonte: O autor.

Legenda: ^{ns}, não significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Na medida de recuperação do estresse, a aplicação de ACh não tem interferência significativa no MDA, tanto em plantas em condição controle como em plantas sob estresse. A aplicação de ACh resultou em aumento da atividade das enzimas POD, SOD e APX, tanto em plantas controle como em plantas estressadas.

Já em relação aos radicais livres, para as plantas controle, o tratamento com ACh resultou em maior O_2^- e menor H_2O_2 , enquanto que em plantas sob estresse o tratamento com ACh resultou em menor O_2^- e não modificou a concentração de H_2O_2 (Figura 19).

Figura 19 — Teor de malondealdeído (MDA) (A), concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (B), concentração de superóxido (O_2^-) (C), atividade da enzima peroxidase (POD) (D), atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (E) e atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) (F) em plantas de soja submetidas à condição de estresse (déficit hídrico + alta temperatura) e aplicação de Acetilcolina (ACh), em medida realizada após o retorno à condição normal (recuperação).



Fonte: O autor.

Nota: Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as doses na mesma condição. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as condições dentro da mesma dose de ACh.

6 DISCUSSÃO

6.1 Biometria de plantas de soja e milho em resposta a combinação de estresse (alta temperatura e deficiência hídrica) e aplicação de acetilcolina

A alta temperatura e o déficit hídrico apresentam efeitos deletérios sobre as culturas de soja e milho, sendo que a combinação desses estresses abióticos ocorre em áreas agrícolas no mundo inteiro, afetando negativamente o crescimento, desenvolvimento, rendimento e sustentabilidade das culturas. O déficit hídrico afeta negativamente a expansão das folhas, o alongamento do caule, o crescimento radicular e a absorção de água e nutrientes; provocando diminuição do potencial hídrico, fechamento estomático, atraso na floração e diminuição do número de sementes. Já a alta temperatura afeta a morfologia, fisiologia e desnaturação de enzimas geral da planta e diminuição da produtividade das culturas (Khan *et al.*, 2021).

Para minimizar os efeitos deletérios causados pelos estresses abióticos, a planta apresenta diversos mecanismos de defesa, dentre eles os enzimáticos e não enzimáticos. Além dos antioxidantes enzimáticos, as plantas possuem também os antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo, a prolina, a glutatona, o ácido ascórbico, o tocoferol, os compostos fenólicos e as poliaminas (Akula *et al.*, 2011).

Além dos hormônios vegetais, as plantas produzem biorreguladores que atuam na transmissão de sinais intracelulares e extracelulares por meio de impulsos elétricos, possibilitando um melhor controle nos processos fisiológicos, como a fotossíntese, respiração e movimentos dos órgãos laterais (Akula; Mukherjee, 2020).

Ainda, os biorreguladores são envolvidos nos mais variados processos do tecido vegetal, incluindo a divisão, alongamento e diferenciação celular (Bamel; Gupta, S.; Gupta, R. 2007), além de participar da condutância estomática e sinalização e comunicação entre raiz e parte aérea (Wang, H.; Wang, X.; Lou, 1999; Danelluzi, 2012). Um exemplo de biorregulador é a acetilcolina (ACh), a qual tem sido recentemente relatada pela sua atuação em respostas de crescimento e desenvolvimento das plantas (Akula; Mukherjee, 2020) e na indução de tolerância contra estresses abióticos (Sarangle *et al.*, 2024).

Neste estudo, os resultados indicaram que na cultura do milho sob estresse a ACh foi capaz de aumentar a massa seca da parte aérea e o número de folhas (Figuras 2). Esse ligeiro aumento da MSPA pode estar relacionado com a interação

que a ACh tem com as proteínas expansinas localizadas na parede celular que tem como função promover o afrouxamento da parede celular para que a mesma possa expandir (Mcqueen-Mason; Rochange, 1999). Bamel, Gupta, S. e Gupta, R. (2007) também estabelece que o biorregulador ACh apresenta interação com a auxina ou com outros hormônios.

Em relação às plantas de soja, a ACh reduziu a massa seca da parte aérea e aumentou a massa seca da raiz (Figura 11), indicando que houve uma translocação preferencial de fotoassimilados para o sistema radicular em detrimento da parte aérea. Resultado semelhante foi encontrado por Sugiyama e Tezuka (2011), onde o autor afirma que a ACh interfere em alguns sistemas metabólicos como a via glicolítica no citoplasma e o sistema de transporte de elétrons nas mitocôndrias que regula a translocação de metabólitos dos caules para as raízes.

6.2 Troca gasosa de plantas de soja e milho em resposta a combinação de estresse (alta temperatura e deficiência hídrica) e aplicação de acetilcolina

Devido à sua natureza sésil, as plantas sofrem diversos efeitos prejudiciais ao seu desenvolvimento em resposta aos estresses abióticos causados por alterações climáticas (Lindner *et al.*, 2010; Chaudhry *et al.*, 2022).

Estudos relatam que o processo fotossintético é o principal alvo de danos pelos efeitos nocivos causados pelos estresses abióticos, principalmente altas temperaturas e déficit hídrico. Estes dois estresses juntos são responsáveis pela menor assimilação de CO₂ e formação massiva de EROs, afetando o mecanismo molecular relacionado ao crescimento, influenciando negativamente o transporte de elétrons e levando à redução do crescimento e da produtividade das plantas (Anjum *et al.*, 2017; Bitá; Gerats, 2013).

O déficit hídrico interfere nas funções regulatórias das plantas através de uma cascata de efeitos, afetando o turgor e potencial hídrico (Nawaz *et al.*, 2015). O efeito negativo do déficit hídrico inicia-se nas raízes, as quais apresentam transporte de nutrientes interrompido, sendo o primeiro órgão a sentir a falta da água. Com isso aumenta-se a concentração de ácido abscísico (ABA), que por sua vez serve como sinalizador para as folhas para que ocorra o fechamento estomático. O fechamento parcial dos estômatos diminui a perda da água através da transpiração, porém, também afeta a concentração interna de CO₂, diminuindo a assimilação de CO₂, com

consequente aumento da produção de EROs, induzindo ao desequilíbrio redox e ao estresse oxidativo celular. O excesso de EROS que não é compensado pelo sistema antioxidante acarreta na peroxidação lipídica e ruptura das membranas, em especial as membranas dos tilacóides onde estão localizados os fotossistemas I e II (FSI e FSII). Como consequência, ocorre um vazamento dos elétrons durante as vias do transporte de elétrons (ETR) e a degradação das clorofilas responsáveis pela captação de fótons para a produção de ATP/NAPH. Além disso, as altas temperaturas podem acarretar problemas no estágio reprodutivo devido a infertilidade do pólen, podem causar desnaturação das proteínas prejudicando a atividade enzimática, perturbação da estabilidade proteica, desintegração das membranas e interrupção do metabolismo dos fotossistemas quanto à absorção de luz e acúmulo de energia no centro de reação; além de danos à proteína D1 do FSII, ocasionando a produção excessiva de EROS e resultando em estresse oxidativo na planta (He *et al.*, 2017, Chaudhry; Sidhu, 2022; Sharma *et al.*, 2020).

Frente a essa adversidade do ambiente, a ACh é um importante biorregulador que vem mostrando resultados satisfatórios em linhas de pesquisas com estresse abiótico, pois esta molécula interfere no processo fotossintético das plantas. Por ser um neurotransmissor, tem como funcionalidade controlar o fluxo de íons e de hormônios que regulam a abertura de canais iônicos das membranas plasmáticas de células das raízes e folhas, controlando a homeostase iônica da planta (Kostir; Klenha; Jirácek, 1965; Wang, H.; Wang, X.; Zhang; Lou, 2000). Su *et al.* (2020) e Jia e Zhang (2008) enfatizaram em seus trabalhos, que o biorregulador consegue regular a condutância estomática, de forma a sinalizar o aumento da concentração de ácido abscísico (ABA) nas folhas, que por sua vez provoca uma alteração no potencial osmótico das células-guardas, alterando a concentração de Ca^{2+} dentro das mesmas e ligando-se às proteínas quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM). Desta forma, ocorre maior controle da abertura e fechamento estomático. A ACh promove ainda a síntese de precursores relacionados à clorofila, melhorando a funcionalidade do PSII (Su *et al.*, 2020; Yamamoto *et al.*, 2011).

Diante do exposto, neste estudo, a aplicação de ACh foi capaz de mitigar os efeitos do estresse combinado de seca e alta temperatura na cultura da soja, induzindo aumentos nos valores de A, gs, E, ETR e EC (Figuras 12 e 13). Estes resultados corroboram os resultados obtidos em estudos anteriores com utilização de ACh (Qin *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2020; Braga-Reis *et al.*, 2021; Daneluzzi, 2012). No

entanto, nas plantas de milho, a ACh não apresentou o mesmo efeito positivo (Figuras 6 e 7), onde as reduções de todos os parâmetros de trocas gasosas não foram atenuadas em relação às plantas controle não tratadas com ACh.

Posteriormente, na reidratação e volta das plantas para as condições controle de temperatura, todos os parâmetros fotossintéticos se apresentaram com valores recuperados na cultura da soja (Figura 13); enquanto que na cultura do milho o biorregulador não resultou nesta resposta (Figura 7).

6.3 Metabolismo bioquímico de plantas de soja e milho em resposta a combinação de estresse (alta temperatura e deficiência hídrica) e aplicação de acetilcolina

Os efeitos deletérios dos estresses abióticos nas diferentes culturas agrícolas geram uma perturbação no equilíbrio metabólico das células, resultando em uma maior produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) (Miller *et al.*, 2008), as quais são extremamente reativas na presença de proteínas, material nucleico (DNA) e principalmente lipídios que se encontram nas membranas celulares (Curvêlo, 2012).

A presença de superóxido (O_2^-) é resultante da ligação da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) com a molécula de oxigênio, quando a concentração intracelular de CO_2 na planta está menor. Quando se encontram em pequenas quantidades, os radicais superóxidos concedem benefícios enérgicos para as plantas, além de atuarem como moléculas sinalizadores para ativação de respostas bioquímicas ao estresse. Porém, em grandes concentrações geram danos em todos os componentes celulares (Hasanuzzaman *et al.*, 2012).

Como respostas ao estresse oxidativo, as plantas modificam seu metabolismo para produzir metabólitos no sentido de normalizar a concentração redox celular e a homeostase (Spolaor *et al.*, 2022), os quais atuam em conjunto para controlar a via de oxidação, danos oxidativos às células vegetais e eliminação de EROS. De acordo com Mittler *et al.* (2004), tal resposta de defesa pode se dar através de antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não enzimáticos.

A ação dos antioxidantes enzimáticos se inicia pela atividade da enzima SOD, localizada no citosol e cloroplastos, cuja função é de catalisar o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Mobin; Khan 2007; Singh *et al.*, 2008); o qual por sua vez será catalizado em H_2O e O_2 pelas enzimas CAT e APX (Sanchez-Casas;

Klesseg, 1994; Asada, 1994). Já as peroxidases (POD) usam o peróxido de hidrogênio como catalizador da oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos (Erechim, 2006). Aliado a isso, o teor de malondialdeído (MDA), serve como sinalizador da deterioração da membrana celular pelas EROS (peroxidação lipídica), por ser um produto gerado a partir da reação dos radicais OH⁻ com ácidos graxos poli-insaturados que retiram um hidrogênio da membrana desencadeando a destruição da célula (Silva *et al.*, 2021).

A ACh atua como um protetor em resposta aos estresses abióticos e melhora a adaptabilidade da planta aos mesmos, sendo um importante mitigador dos efeitos nocivos das EROS nas células vegetais. A ACh atua na regulação de genes que codificam as proteínas presentes no sistema osmótico e redox. Em mudas de tabaco sob estresse salino, a aplicação exógena de ACh na raiz regulou positivamente os genes codificadores das enzimas POD, SOD, APX e GST; conferindo uma maior resistência para as plantas frente ao estresse (Quin *et al.*, (2021). Shen *et al.* (2024), relataram que o pré-tratamento de sementes de milho com ACh sob estresse salino estimulou a eliminação de EROS pela ativação dos antioxidantes e regulação hormonal, melhorando a germinação. Su *et al.* (2020) afirmaram que a ACh, juntamente com a auxina, regula os genes das enzimas antioxidantes, sendo que a maior parte da atividade antioxidante ocorre nas folhas em relação as raízes.

No entanto, no presente estudo, tanto nas plantas de soja como de milho, a aplicação exógena de ACh não exerceu efeito sobre a atividade antioxidante durante a imposição do estresse hídrico e térmico associados, com diminuição da atividade das enzimas POD, SOD e APX e consequentemente aumento nas concentrações de O₂⁻ e H₂O₂ e maior concentração de MDA, indicando maior grau de peroxidação lipídica das membranas celulares (Figuras 8 e 17). Entretanto, quando ocorreu a recuperação do estresse, as plantas de soja tratadas com ACh apresentaram efeito positivo na atividade antioxidante, elevando a atividade da POD, SOD e APX e diminuindo a concentração de O₂⁻ e H₂O₂ (Figuras 9 e 18). Desta forma, sugere-se que esta biomolécula apresentou uma espécie de “atraso” em sua ação sobre as plantas, ou seja, no momento do pico de estresse a ACh não conseguiu gerar os efeitos esperados de mitigação. Porém, quando as plantas de soja se encontraram em ambiente favorável após a recuperação, a ACh conseguiu reverter a situação e auxiliou na recuperação via aumento da atividade antioxidante.

7 CONCLUSÕES

Levando-se em consideração o ambiente estabelecido pelo estudo e as culturas utilizadas, pode-se afirmar que as plantas de soja apresentaram melhor resposta à aplicação de ACh, demonstrando que seu aparato fotossintético foi menos danificado e com melhor resposta na ativação de defesa antioxidante, além de sua realocação de biomassa para as raízes. Por outro lado, nas plantas de milho, de maneira geral, não houve melhora dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos em resposta à aplicação de ACh, tanto durante o período de estresse como na recuperação das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, B.; RAINA, A.; KHAN, S. Retracted chapter: impact of biotic and abiotic stresses on plants, and their responses. *In*: WANI, S. H. (ed.). **Disease resistance in crop plants**. Cham: Springer, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-20728-1_1.
- AKULA, R.; MUKHERJEE, S. New insights on neurotransmitters signaling mechanisms in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 15, n. 6, p. 1737450, 2020. DOI: 10.1080/15592324.2020.1737450
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011. DOI: 10.4161/psb.6.11.17613.
- ALVEY, L.; HARBERD, N. P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs?. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 2, p. 153-160, 2005. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2004.00412.x.
- ANJUM, S. A.; ASHRAF, U.; TANVEER, M.; KHAN, I.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; ZOHAIB, A.; ABBAS, F.; SALEEM, M. F.; ALI, I.; WANG, L. C. Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 69, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00069.
- ARRU, L.; FORNACIARI, S. Role of acetylcholine in plant cell elongation. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT NEUROBIOLOGY, 5., 2009, Florence. **Anais...** [S.l.]: [s.n.], 2009. p. 64.
- 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, n. 24-25, p. 2393-2396, 2007. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.01.039.
- 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, 2014. 52 p. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10174/10804>. Acesso em: 6 ago. 2025.
- BERGAMASCHI, Homero; MATZENAUER, Ronaldo. O milho e o clima. **Porto Alegre: Emater/RS-Ascar**, v. 84, p. 85, 2014.
- BENAVIDES, A. **Fotosíntesis**: diferencias en las vías metabólicas C3, C4 y CAM. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, 2003. Disponível em: <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Fotosintesis%20C3%2CC4%20y%20CAM.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2025.

BITA, C. E.; GERATS, T. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 273, 2013.

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. DOI: 10.3389/fpls.2013.00273.

BRAGA-REIS, I.; NERIS, D. M.; RIBAS, A. F.; ESTEVES VIEIRA, L. G.; SOUZA, G. M. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine (ACh) alleviate water deficit effects in soybean: from gene expression up to growth performance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 182, p. 104303, 2021. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104303.

BUCKERIDGE, M. S. **Comparação entre os sistemas fotossintéticos C3 e C4**. Disponível em: <https://profsaulblog.wordpress.com/wp-content/uploads/2016/10/sistemas-c3-c4.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2025.

CAMACHO, R. G.; CARABALLO, D. F. Evaluation of morphological characteristics in Venezuelan maize (*Zea mays* L.) genotypes under drought stress. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 453-458, 1994. DOI: 10.1590/S0103-90161994000300012.

CHAUDHRY, S.; SIDHU, G. P. S. Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review. *Plant Cell Reports*, v. 41, p. 1–31, 2022. DOI: 10.1007/s00299-021-02759-5.

COÊLHO, J. D. Soja. **Caderno Setorial ETENE**, v. 9, n. 361, 2024. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/revista/cse/article/view/3105>. Acesso em: 6 ago. 2025.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 12, safra 2024/25, n. 8 oitavo levantamento, maio 2025.

CUI, H. Challenges and approaches to crop improvement through C3-to-C4 engineering. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, e715391, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.715391.

CURVÊLO, C. R. S. **Análises fisiológicas e bioquímicas da resistência do algodão à mancha de ramulária mediada pelo silício**. 2012. Tese (Doutorado em Fitotecnia – Produção Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. **Desenvolvimento, mercado, rentabilidade da soja brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 19 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 74). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/854125>. Acesso em: 6 ago. 2025.

DANELUZZI, G. S. Uma abordagem neurofisiológica da acetilcolina em plantas de milho hidratadas e sob condições de estresse hídrico. 2012. Dissertação (Mestrado

em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. DOI: 10.11606/D.11.2012.tde-31052012-090722.

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. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00053.

ELSTNER, E. F.; HEUPEL, A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Analytical biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 616-620, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90488-7.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja** – Paraná – 2001/2002. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 281 p. (Embrapa Soja. Documentos, 166). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/462945>. Acesso em: 6 ago. 2025.

EVANS, M.L. Promotion of cell elongation in avena coleoptiles by acetylcholine. **Plant Physiology**, v. 50, n. 3, p. 414-416, 1972. DOI: 10.1104/pp.50.3.414.

EWINS, A. J. Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot. **Biochemical Journal**, v. 8, n. 1, p. 44–49, 1914. DOI: DOI: 10.1042/bj0080044.

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. DOI: 10.1104/pp.59.2.315.

HARTMANN, E.; GUPTA, R. Acetylcholine as a signaling system in plants. *In*: BOSS, W. F.; MORRE, D. J. (ed.). **Second messengers in plant growth and development**. New York: Alan R. Liss, 1989. p. 257–288.

HE, B.; GUO, T.; HUANG, H.; XI, W.; CHEN, X. Physiological responses of *Scaevola aemula* seedlings under high temperature stress. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 203–209, 2017. DOI:

JIA, W.; ZHANG, J. Stomatal movements and long-distance signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, p. 772–777, 2008. DOI: 10.4161/psb.3.10.6294.

IPCC. Summary for policymakers. *In*: MASSON-DELMOTTE, V. *et al.* (ed.). **Climate change 2021: the physical science basis**. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2021. p. 3–32. DOI: 10.1017/9781009157896.001.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 2063–2085, 1 set. 2004. DOI: 10.2741/1390.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 1, p. 29-48, 2000. DOI: 10.1016/s0163-7258(99)00071-6

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life sciences**, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.09.037.

KHAN, N.; ALI, S.; SHAHID, M. A.; MUSTAFA, A.; SAYYED, R. Z.; CURÁ, J. A. Insights into the interactions among roots, rhizosphere, and rhizobacteria for improving plant growth and tolerance to abiotic stresses: a review. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1551, 2021. DOI: 10.3390/cells10061551.

KILLI, D.; BUSSOTTI, F.; RASCHI, A.; HAWORTH, M. 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. DOI: 10.1111/ppl.12490.

KIRKPATRICK, C. J.; BITTINGER, F.; UNGER, R. E.; KRIEGSMANN, J.; KILBINGER, H.; WESSLER, I. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 24–28, 2001. DOI: 10.1254/jjp.85.24.

KOSTÍR, J.; KLENHA, J.; JIRÁČEK, V. The effect of choline and acetylcholine on the seed germination of some economically important plants. I. **Sborník Československé akademie zemědělských věd. Řada C.**, v. 11, p. 1239-1280, 1965.

KUMAR, S. Abiotic stresses and their effects on plant growth, yield and nutritional quality of agricultural produce. **International Journal of Food Science and Agriculture**, v. 4, n. 4, 2020. DOI: 10.26855/ijfsa.2020.12.002.

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.

LAWSON, V. R.; BRADY, R. M.; CAMPBELL, A.; KNOX, B. G.; KNOX, G. D.; WALLS, R. L. Interaction of Acetylcholine Chloride with IAA, GA3 and Red Light in the Growth of Excised Apical Coleoptile Segments. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 105, n. 3, p. 187–191, 1978. DOI: 10.2307/2484113.

LI, C.; BAI, T.; MA, F.; HAN, M. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 2, p. 274-279, 2010. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.12.029.

LINDNER, M.; MAROSCHEK, M.; NETHERER, S.; KREMER, A.; BARBATI, A.; GARCIA-GONZALO, J.; SEIDL, R.; DELZON, S.; CORONA, P.; KOLSTRÖM, M.; LEXER, M. J.; MARCHETTI, M. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 4, p. 698–709, 2010. DOI: 10.1016/j.foreco.2009.09.023.

MADHAVAN, S.; SARATH, G.; LEE, B. H.; PEGDEN, R. S. Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity. **Plant Science**, v. 109, n. 2, p. 119–127, 1995. DOI: 10.1016/0168-9452(95)04164-P.

MCQUEEN-MASON, S. J.; ROCHANGE, F. Expansins in plant growth and development: an update on an emerging topic. **Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 1999. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00704.x.

MUKHERJEE, I. The effect of acetylcholine on hypocotyl elongation in soybean. **Plant and cell physiology**, v. 21, n. 8, p. 1657-1660, 1980. DOI: 10.1093/pcp/21.8.1657.

NAWAZ, F.; AHMAD, R.; ASHRAF, M. Y.; WARAICH, E. A.; KHAN, S. Z. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 191–200, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.003.

NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; MERTZ-HENNING, L. M.; FOLONI, J. S. S.; MORAES, L. A. C.; GONCALVES, S. L. Ecofisiologia da soja. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. de C. (ed.). **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. p. 33–54. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17).

PASALA, R. K.; KHAN, M. I. R.; MINHAS, P. S.; FAROOQ, M. A.; SULTANA, R.; PER, T. S.; DEOKATE, P. P.; KHAN, N. A.; RANE, J. Can plant bio-regulators minimize crop productivity losses caused by drought, heat and salinity stress? An integrated review. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, p. 113–125, 2016. DOI: 10.5073/JABFQ.2016.089.014.

PASALA, R. K.; MINHAS, P. S.; WAKCHAURE, G. C. Plant bioregulators: a stress mitigation strategy for resilient agriculture. In: MINHAS, P. S.; RANE, J.; PASALA, R. K. (org.). **Abiotic stress management for resilient agriculture**. Singapore: Springer, 2017. Cap. 10. DOI: 10.1007/978-981-10-5744-1_10.

PEIXOTO, P. H. P. 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.

QI, M.; ZHENG, X.; NIU, G.; YE, A.; RATHER, S. A.; AHMED, N.; MUSTAFAD, N. S.; WANG, P.; SIDDIQUI, M. H.; KIMAR, R.; ZHANG, L. 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, p. 4616–4628, 2023. DOI: 10.1007/s00344-022-10642-0.

QIN, C.; SU, Y. Y.; LI, B. S.; CHENG, Y. Q.; WEI, C. C.; YUAN, S.; AHMED, N.; ASHRAF, M.; ZHANG, L. X. Acetylcholine mechanism of action to enhance tolerance to salt stress in *Nicotiana benthamiana*. **Photosynthetica**, v. 57, n. 2, p. 590–598, 2019. DOI: 10.32615/ps.2019.084..

QIN, C.; AHANGER, M. A.; LIN, B.; HUANG, Z.; ZHOU, J.; AHMED, N.; AI, S.; MUSTAFA, N. S. A.; ASHRAF, M.; ZHANG, L. Comparative transcriptome analysis reveals the regulatory effects of acetylcholine on salt tolerance of *Nicotiana benthamiana*. **Phytochemistry**, v. 181, p. 112582, 2021. DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112582.

RAMAKRISHNA, A.; ROSHCHINA, V. V. (ed.). **Neurotransmitters in plants: perspectives and applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2018. 448 p. DOI: 10.1201/b22467.

ROSHCHINA, V. V. **Acetylcholine and biogenic amines**, bioeffectors in plants. Pushchino: Biological Center of USSR Academy of Science, 1991. 192 p.

ROSHCHINA, V. V. **Neurotransmitters in plant life**. Enfield: Science Publishers, Inc., 2001. 292 p.

SAGANE, Y.; NAKAGAWA, T.; YAMAMOTO, K.; MICHIKAWA, S.; OGURI, S.; MOMONOKI, Y. S. Molecular characterization of maize acetylcholinesterase: a novel enzyme family in the plant kingdom. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1359–1371, 2005. DOI: 10.1104/pp.105.062927.

SAKATA, T.; et al., Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8569–8574, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1000869107.

SARANGLE, Y.; BAMEL, K.; PURTY, R. S. Role of acetylcholine and acetylcholinesterase in improving abiotic stress resistance/tolerance. **Communicative & Integrative Biology**, v. 17, n. 1, e2353200, 2024. DOI: 10.1080/19420889.2024.2353200.

SAWICKI, M.; AÏT BARKA, E.; CLÉMENT, C.; VAILLANT-GAVEAU, N.; JACQUARD, C. Cross-talk between environmental stresses and plant metabolism during reproductive organ abscission. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 1707–1719, 2015. DOI: 10.1093/jxb/eru533.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; RAMAKRISHNAN, M.; SIDHU, G. P. S.; BALI, A. S.; HANDA, N.; KAPOOR, D.; YADAV, P.; KHANNA, K.; BAKSHI, P.; REHMAN, A.; KOHLI, S. K.; KHAN, E. A.; PARIHAR, R. D.; YUAN, H.; THUKRAL, A. K.; BHARDWAJ, R.; ZHENG, B. Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 509–531, 2020. DOI: 10.1007/s00344-019-10018-x.

SHEN, H.; TANG, Y.; MURAOKA, H.; WASHITANI, I. Characteristics of leaf photosynthesis and simulated individual carbon budget in *Primula nutans* under contrasting light and temperature conditions. **Journal of Plant Research**, v. 121, n. 2, p. 191–200, 2008. DOI: 10.1007/s10265-008-0146-z.

SHEN, J.; QIN, C.; QIN, Y. DU, M.; BEGUM, N.; LIAN, H. Acetylcholine alleviates salt stress in *Zea mays* L. by promoting seed germination and regulating phytohormone

level and antioxidant capacity. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 341–352, 2024. DOI: 10.1007/s00344-023-11089-7.

SILVA, D. F.; GARCIA, P. H. M.; SANTOS, G. C. L.; FARIAS, I. M. S. C.; PÁDUA, G. V. G.; PEREIRA, P. H. B.; SILVA, F. E.; BATISTA, R. F.; NETO, S. G.; CABRAL, A. M. D. Morphological characteristics, genetic improvement and planting density of sorghum and corn crops: a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e12310313172, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i3.13172.

SILVA, L. O.; AGUIAR, N. G.; PEREIRA, A. R.; EVANGELISTA, C. L.; LIRA, G. T.; CABRAL NETO, O. Déficit de armazenagem de grãos no Brasil. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 2, n. 1, 2024. DOI: 10.61164/rmnm.v2i1.2119.

SU, Y. Y.; CHENG, Y. Q.; QIN, C.; AHMED, N.; MU, Y. H.; MUSTAFA, N. S.; ASHRAF, M.; ZHANG, L. X. 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, 2020. DOI: 10.32615/ps.2020.051.

SUGIYAMA, K.; TEZUKA, T. Acetylcholine promotes the emergence and elongation of lateral roots of *Raphanus sativus*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 10, p. 1545–1553, out. 2011. DOI: 10.4161/psb.6.10.16876.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32–43, jul. 2014. DOI: 10.1111/nph.12797.

TEJO, D. P.; FERNANDES, C. H. S.; BURATTO, J. S. Soja: fenologia, morfologia e fatores que interferem na produtividade. **Revista científica eletrônica de Agronomia da FAEF**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2019.

VALENTOVIC, P.; LUXOVÁ, M.; KOLAROVIC, L.; GAŠPARÍKOVÁ, O. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. **Plant, Soil and Environment**, v. 52, n. 4, p. 186–191, 2006. DOI: 10.17221/3364-PSE.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59–66, 2000. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00197-1.

VERBEEK, M.; VENDRIG, J. C. Are acetylcholine-like cotyledon-factors involved in the growth of the cucumber hypocotyl? **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 83, n. 4, p. 335–340, ago. 1977. DOI: 10.1016/S0044-328X(77)80157-8.

WANG, H. B.; WANG, X. C.; LOU, C. H. Relationship between acetylcholine and stomatal movement in *Vicia faba*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 41, n. 2, 1999.

WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, S.; LOU, C. Muscarinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating stomatal movement. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 3, p. 250–252, 2000. DOI: 10.1007/BF02884684.

WESSLER, I.; KILBINGER, H.; BITTINGER, F.; KIRKPATRICK, C. J. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, n. 1, p. 2–10, 2001. DOI: 10.1254/jjp.85.2.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J.; RACKÉ, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 59–79, jan. 1998. DOI: 10.1016/s0163-7258(97)00085-5.

YAMADA, M.; GREENHAM, K.; PRIGGE, M. J.; JENSEN, P. J.; ESTELLE, M. The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. **Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 168–179, set. 2009. DOI: 10.1104/pp.109.138859.

YAMAMOTO, K.; SAKAMOTO, H.; MOMONOKI, Y. S. Maize acetylcholinesterase is a positive regulator of heat tolerance in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 16, p. 1987–1992, 2011. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.06.001.

ZHANG, H.; SONNEWALD, U. Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 839–855, jun. 2017. DOI: 10.1111/tpj.13557.

ZULFIQAR, F.; ASHRAF, M. Bioregulators: unlocking their potential role in regulation of the plant oxidative defense system. **Plant Molecular Biology**, v. 105, n. 1-2, p. 11–41, jan. 2021. DOI: 10.1007/s11103-020-01077-w.