

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS –  
AGRONOMIA

MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E  
A ALTA TEMPERATURA EM PLANTAS DE GIRASSOL  
TRATADAS COM COMPOSTOS MITIGADORES

Autor: Gabriel Martins Almeida  
Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Rio Verde - GO  
Novembro – 2023

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS –  
AGRONOMIA

MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFCIT HÍDRICO E A  
ALTA TEMPERATURA EM PLANTAS DE GIRASSOL  
TRATADAS COM COMPOSTOS MITIGADORES

Autor: Gabriel Martins Almeida  
Orientador: DSc. Alan Carlos Costa

Tese apresentada como parte das exigências para  
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS – AGRONOMIA, no Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Agrárias –  
Agronomia do Instituto Federal Goiano –  
Campus Rio Verde, Área de concentração em  
Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde - GO  
Novembro – 2023

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

AAL447 Almeida, Gabriel Martins  
m MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E À  
ALTA TEMPERATURA EM PLANTAS DE GIRASSOL TRATADAS COM  
COMPOSTOS MITIGADORES DE ESTRESSES / Gabriel Martins  
Almeida; orientador Alan Carlos Costa; co-orientador  
Adinan Alves Silva. -- Rio Verde, 2023.  
81 p.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias - Agronomia)  
-- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2023.

1. Estresse hídrico. 2. Estresse térmico. 3.  
Girassol. 4. Aliviadores de estresse. I. Costa, Alan  
Carlos, orient. II. Silva, Adinan Alves, co-orient.  
III. Título.

# TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

## IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- |  |   |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico              |
| <input type="checkbox"/> Dissertação (mestrado)      | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação)             | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

**GABRIEL MARTINS ALMEIDA**

Matrícula:

**2019202320140049**

Título do trabalho:

**MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E A ALTA TEMPERATURA EM PLANTAS DE GIRASSOL TRATADAS COM COMPOSTOS MITIGADORES**

## RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: **01 / 04 / 2024**

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

## DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** GABRIEL MARTINS ALMEIDA  
Data: 25/03/2024 16:18:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**RIO VERDE - GO**

Local

**25 / 03 / 2024**

Data

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ALAN CARLOS DA COSTA  
Data: 25/03/2024 16:26:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 6/2024 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

## MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E À ALTA TEMPERATURA EM PLANTAS DE GIRASSOL TRATADAS COM COMPOSTOS MITIGADORES DE ESTRESSES

Autor: Gabriel Martins Almeida

Orientador: Dr. Alan Carlos da Costa

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em, 30 de novembro de 2023.

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa (Presidente)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Minervina de Freitas Moura (Avaliadora interna)

Prof. Dr. Adinan Alves da Silva (Avaliador interno)

Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira (Avaliador interno)

Prof. Dr. Werner Camargos Antunes (Avaliador externo)

Documento assinado eletronicamente por:

- Marconi Batista Teixeira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 28/02/2024 18:10:10.
- WERNER CAMARGOS ANTUNES, WERNER CAMARGOS ANTUNES - Professor Avaliador de Banca - Uem (79151312000156), em 28/02/2024 14:56:30.
- Adinan Alves da Silva, 2022202344060002 - Discente, em 27/02/2024 15:51:43.
- Luciana Minervina de Freitas Moura, 2022202344060003 - Discente, em 27/02/2024 10:27:09.
- Alan Carlos da Costa, PRO-REITOR(A) - CD0002 - PROPPI-REI, em 27/02/2024 09:13:55.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 27/11/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 550575  
Código de Autenticação: 818b38c1a0



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Rio Verde

Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970

(64) 3624-1000

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pelo dom da vida, pela saúde e pela família.

À minha mãe Ana Paula Martins Dias, pela dedicação incondicional para comigo, o amor e educação que me fora transmitida. Ao meu pai Marco Antônio Almeida e Silva, pelo amor e carinho.

À minha família, em especial aos meus avós maternos João Batista Dias e Olívia Martins Dias e ao meu tio Leandro Martins Dias, pelo apoio, incentivo e sabedoria transmitidos. A meu avô Algemiro Medeiros e minha avó Maria José Almeida pelos bons exemplos.

À minha noiva Ana Claudia Martins, presente durante meu processo de doutoramento, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando com muito amor e carinho.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, pela possibilidade de obtenção do título de Técnico em Agropecuária, a oportunidade de cursar Agronomia e de ser participante do Programa de Iniciação Científica e, também, monitor do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, pela possibilidade de me tornar mestre em Ciências Agrárias – Agronomia, bem como estar como doutorando no mesmo programa.

Ao professor Alan Carlos Costa, pela orientação, dedicação, paciência e amizade durante todos esses anos, desde a graduação, um exemplo positivo de profissional e ser humano que sempre levarei comigo.

Ao Adinan Alves Silva e a Luciana Minervina de Freitas Mouras, pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal e demais laboratórios: Arthur Almeida, Priscila Ferreira Batista, Cássia Lino Rodrigues, Vanessa Camargo (*in memoriam*), Sueisla Rezende, Emily Carolina Duarte, Ketlen, Victor, Agatha, Igor e Samira.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

GABRIEL MARTINS ALMEIDA, filho de Ana Paula Martins Dias e Marco Antônio Almeida e Silva, nasceu no dia 30 de novembro de 1994, na cidade de Rio Verde -GO.

Em janeiro de 2010 ingressou no curso técnico em Agropecuária, finalizando em 2012, mesmo ano em que ingressou no curso de Bacharelado em Agronomia, ambos pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, graduando-se em julho de 2017.

Em agosto de 2017, iniciou no curso de mestrado no Programa de Pós- Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação do Professor Alan Carlos Costa, e defendeu em julho de 2019. Também foi analista de pesquisa agrícola na multinacional SGS do Brasil (2017 a 2018).

Em agosto de 2019, iniciou o curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, também sob a orientação do Professor Alan Carlos Costa.

Em março de 2021 co-fundou a empresa Plantnova LTDA, que é incubada no IF Goiano - Campus Rio Verde. Também é cofundador do e-commerce Cerrado Lab e seu braço de educação em inovação, Guará Academy, que foram criados em 2022.

Foi coordenador das regionais Centro-Norte e Oeste do Estado de Goiás pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (Senar Goiás) de 2021 a 2022.

Desde janeiro de 2023 é coordenador do portfólio de *Startups* no hub de inovação Campo Lab e do programa Conecta Campo + *Startups*, que é uma iniciativa do Sistema FAEG/Senar Goiás/Ifag/Sindicatos Rurais, bem como está como consultor de Inovação e *Startups* pelo Sebrae Goiás.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACIONES E UNIDADES	12
RESUMO GERAL	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS	25
3. CAPÍTULO 1	26
3.1 INTRODUCTION	
3.2 MATERIAL AND METHODS	28
3.2.1 Plant material and experimental conditions	28
3.2.2 Experimental design	29
3.2.3 Imposition of treatments and analysis	29
3.2.4 Water relations	30
3.2.5 Gas exchange	30
3.2.6 Chlorophyll a fluorescence	30
3.2.7 Pigment concentration	31
3.2.8 Determination of proline content	31
3.2.9 Determination of malondialdehyde (MDA)	32
3.2.10 Determination of peroxidase activity	32
3.2.11 Biometry	33
3.2.12 Statistical analysis	33
3.2 RESULTS AND DISCUSSION	33



3.4 CONCLUSIONS	41
3.5 REFERENCES	42
4. CAPÍTULO II	47
4.1 INTRODUÇÃO	48
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.2.1 Condições experimentais e imposição dos tratamentos	50
4.2.2 Avaliações de Relações Hídricas	51
4.2.3 Trocas Gasosas	51
4.2.4 Concentração de pigmentos cloroplastídicos	52
4.2.5 Determinação da concentração de prolina	52
4.2.6 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) e da permeabilidade de membranas	52
4.2.7 Determinação de atividades enzimáticas antioxidantes	53
4.2.8 Análises biométricas e germinação de grãos de pólen	54
4.2.9 Desenho experimental e análises estatísticas	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.4 CONCLUSÕES	66
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
5. CONCLUSÃO GERAL	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo I

- Página
- Figure 1:** Water potential [ $\psi_w$ , (a and b)], osmotic potential [ $\psi_s$ , (c)] and proline concentration [pro, (d)] of sunflower plants after 10 days of substrate humidity (sh) conditions of 100% (well-watered, ww) and 30% (water deficit, wd) of the field capacity (fc) combined with the spraying of the alleviators: potassium phosphite (kphi), zinc sulfate (zs), hydrogen sulfide (hs) donor nahs, and without product (wp). Means followed by different capital letters between alleviators (n = 10) or sh (n = 20) differ significantly from each other (tukey's test  $\alpha < 0.01$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  se. 36
- Figure 2:** Photosynthetic rate [a, (a)], stomatal conductance [ $g_s$ , (b)], transpiration rate [e, (c)], relationship between internal and external  $CO_2$  concentration [ $C_i/C_a$ , (d)], water use efficiency [wue, (e)] and carboxylation efficiency of rubisco [ $A/C_i$ , (f)] of sunflower plants after 10 days in substrate humidity (sh) conditions of 100% (well-watered, ww) and 30% (water deficit, wd) of the field capacity (fc) combined with the spraying of the alleviators: potassium phosphite (kphi), zinc sulfate (zs), hydrogen sulfide (hs) donor nahs, and without product (wp). Means followed by different capital letters between sh (n = 20) differ significantly from each other using the tukey's test ( $\alpha < 0.05$  and  $\alpha < 0.01$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  se. 38
- Figure 3:** Potential quantum yield [ $F_v/F_m$ , (a)] and effective [ $\Phi_{II}$ , (b)] of the psii, nonphotochemical dissipation [npq, (c)], electron transport rate [etr, (d)], excess energy related to psii [exc, (e)], and the ratio  $etr/a$  (f) of sunflower plants after 10 days under substrate humidity (sh) conditions of 100% (well-watered, ww) and 30% (water deficit, wd) of the field capacity (fc) combined with the spraying of alleviators: potassium phosphite (kphi), zinc sulfate (zs), hydrogen sulfide (hs) donor nahs, and without product (wp). Means followed by different capital letters between sh (n = 20) differed significantly from each other using the tukey's test ( $\alpha < 0.05$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  se. 40
- Figure 4:** Malonaldehyde content [mda, (a)] and peroxidase activity [pox, (b)] of sunflower plants after 10 days in substrate humidity (sh) conditions of 100% (well-watered, ww) and 30% (water deficit, wd) of the field capacity (fc) combined with the spraying of alleviators: potassium phosphite (kphi), zinc sulfate (zs), hydrogen sulfide (hs) donor nahs, and without product (wp). Means followed by different capital letters between sh and lower letters between alleviators differed significantly from each other using tukey's test ( $\alpha < 0.01$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  se. 42

### Capítulo II

- Figura 1** - Potencial hídrico ( $\psi_w$ , a), potencial osmótico ( $\psi_s$ , b) e conteúdo relativo de água (CRA, c) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores, temperatura e umidade do substrato. \*\* e \* indicam diferença entre as médias pelo teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 57
- Figura 2** - Temperatura foliar ( $^{\circ}\text{C}$ ) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*\*  $p \leq 0,01$ ). Barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 58
- Figura 3** - Altura de planta (AP, a), número de folha (NF, b) e diâmetro do colmo (DC, c) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indi indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ). As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 59
- Figura 4** - Conteúdo de clorofila a, b e total em função da aplicação dos aliviadores (a) e conteúdo de carotenóides (b) de plantas de girassol de acordo a interação entre os fatores aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Na figura (a), médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com teste de tukey a 5% de probabilidade. Na figura (b), médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre umidades do solo, ou minúsculas entre aliviadores em uma mesma temperatura, não diferem entre si de acordo com teste de tukey a 5% de probabilidade, já o \* indica diferença significativa entre as temperaturas pelo teste f ( $p \leq 0,05$ ). As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 60
- Figura 5** - Taxa fotossintéticas (A, a) a condutância estomática (gs, b), a taxa transpiratória (E, c) relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  (Ci/Ca, d) e eficiência do uso da água (EUA, e) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre umidades do solo, ou minúsculas entre temperaturas não diferem entre si de acordo com teste de tukey a 5% de probabilidade. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 62
- Figura 6** - Fluorescência inicial ( $F_0$ , a) eficiência máxima fotoquímica do FSII (Fv/Fm, b) fluxo de energia dissipada por centro de reação ativo (Dio/RC, c) e o fluxo de energia absorvida por centro de reação ativo (Abs/RC, d) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ) de acordo com o teste f. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 64
- Figura 7** - Rendimento quântico efetivo ( $Y_{II}$ , a) e taxa de transporte de elétrons (ETR, b) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Médias seguidas de letras maiúsculas diferem significativamente entre umidade de substrato e letra minúscula entre temperatura, e quando verificado os aliviadores, as letras maiúsculas indicam diferença significativa segundo teste de tukey  $\alpha < 0,05$ . As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 65
- Figura 8** - Taxa de extravasamento de eletrólitos (TLE, a) e o malonaldeído (MDA, b) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ) de acordo com o teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE. 66
- Figura 9** - Catalase (CAT, a), peroxidase (POX, b), ascorbato peroxidase (APX, c),

superóxido dismutase (SOD, d) proteínas (e) e prolina (f) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Médias seguidas de letras maiúsculas diferem significativamente entre si segundo teste de tukey  $\alpha < 0,01$  e diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ) de acordo com o teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

68

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo I

	Página
<b>Table 1</b> - Chlorophyll <i>a</i> (Chl <i>a</i> ), chlorophyll <i>b</i> (Chl <i>b</i> ) and carotenoids (Carot) content of sunflower plants after 10 days in substrate humidity (SH) conditions of 100% (well-watered, WW) and 30% (water deficit, WD) of the field capacity (FC) combined with the spraying of alleviators: potassium phosphite (kphi), zinc sulfate (ZS), hydrogen sulfide (HS) donor NAHS, and without product (WP).	41

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E UNIDADES

<i>A</i>	Taxa fotossintética	$\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
APX	Ascorbatoperoxidase	$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{prot}$
CAT	Catalase	$\mu\text{mol (H}_2\text{O}_2\text{) min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{prot}$
CC	Capacidade de campo	%
$C_i/C_a$	Relação entre concentração interna e externa de CO <sub>2</sub>	
<i>Cl<sub>a</sub></i>	Clorofila <i>a</i>	$\mu\text{g mg MF}^{-1}$
<i>Cl<sub>b</sub></i>	Clorofila <i>b</i>	$\mu\text{g mg MF}^{-1}$
<i>Cl<sub>t</sub></i>	Clorofila total	$\mu\text{g mg MF}^{-1}$
<i>E</i>	Taxa transpiratória	$\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
EROs	Espécies reativas de oxigênio	
<i>ETR</i>	Taxa de transporte de elétrons	$\mu\text{mol (elétrons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<i>EUA</i>	Eficiência instantânea do uso da água	$\mu\text{mol (CO}_2\text{) mmol (H}_2\text{O)}^{-1}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$
<i>F<sub>m</sub></i>	Fluorescência máxima	
<i>F<sub>m</sub>'</i>	Fluorescência máxima em amostra adaptada à luz	
<i>F<sub>0</sub></i>	Fluorescência inicial	

FSI	Fotossistema I	
FSII	Fotossistema II	
$F_V/F_M$	Rendimento quântico potencial do fotossistema II	
GGP	Germinação de grãos de pólen	%
$g_s$	Condutância estomática	mol (H <sub>2</sub> O) m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
MDA	Malonaldeído	nmol g <sup>-1</sup> MF
POX	Peroxidase	μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot
Pro	Prolina	μmol g <sup>-1</sup> MF
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa	μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato Carboxilase - Oxigenase	
RuBP	Ribulose-1,5-bifosfato	
SOD	Superóxido dismutase	U SOD min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot
$\Phi_{II}$	Rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII	
$\Psi_s$	Potencial osmótico foliar	(MPa)
$\Psi_w$	Potencial hídrico	(MPa)

## RESUMO GERAL

ALMEIDA, GABRIEL MARTINS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, outubro de 2023. **Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico e à alta temperatura em plantas de girassol tratadas com compostos mitigadores.** Orientador: DSc. Alan Carlos Costa. Coorientador: DSc. Adinan Alves Silva.

Os estresses hídrico e térmico são dois dos principais fatores abióticos que afetam a produtividade das culturas, entre elas a do girassol. Na agricultura, a utilização de compostos mitigadores (aliviadores de estresse) tem sido uma estratégia promissora para reduzir os efeitos negativos desses estresses nas plantas. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da pulverização de sulfato de zinco (S.Zn), fosfito de potássio e do sulfeto de hidrogênio (NaHS) em plantas de girassol sob estresse hídrico e térmico. No capítulo I, observou-se que a aplicação de SZn, KPhi e do NaHS induziu respostas de defesa ao estresse por déficit hídrico relacionada ao metabolismo antioxidante e à manutenção de água nos tecidos foliares. Esses compostos foram capazes de promover o incremento do potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) e reduzir os níveis de malondialdeído (MDA) nas folhas das plantas tratadas, pelo aumento de defesas antioxidantes. No capítulo 2, estudou-se a aplicação de SZn e Kphi em plantas anãs de girassol submetidas a estresse térmico e ao déficit hídrico. Neste estudo, verificou-se que a pulverização dos aliviadores auxilia as plantas a tolerar os efeitos negativos desses estresses, mesmo quando combinados. Plantas tratadas com S.Zn apresentaram maior atividade enzimática antioxidante, maior rendimento quântico efetivo do fotossistema II (FSII) e indução da produção de prolina,



em comparação com as plantas não tratadas. O KPhi também foi eficaz no aumento da atividade das enzimas ascorbato peroxidase e peroxidase, bem como no rendimento quântico efetivo do FSII e no teor de carotenoides na condição combinada de déficit hídrico com alta temperatura. Assim, tomados em conjunto, os resultados sustentam a hipótese de que a pulverização de S.Zn e KPhi pode ser eficiente para reduzir os efeitos deletérios do estresse por déficit hídrico e também térmico em plantas de girassol em ambiente controlado. Esses compostos atuam em diferentes mecanismos, incluindo a manutenção de água nos tecidos foliares e o incremento de defesas antioxidantes.

**Palavras-chave:** Estresse hídrico, estresse térmico, girassol, sulfato de zinco, fosfito de potássio; aliviadores de estresse

## ABSTRACT

ALMEIDA, GABRIEL MARTINS. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, November, 2023. **Mechanisms of tolerance to water deficit and high temperature in sunflower plants treated with stress-mitigating compounds.** Advisor: DSc. Alan Carlos Costa. Co-Advisor: DSc. Adinan Alves Silva.

Water and heat stress are two of the most important abiotic factors that affect crop productivity, including sunflower. In agriculture, the use of stress-mitigating compounds has been a promising strategy to reduce the negative effects of these stresses on plants. This study evaluated the effect of spraying zinc sulfate (SZn), potassium phosphate (KPhi), and hydrogen sulfide (NaHS) on sunflower plants under drought and heat stress. In Chapter 1, it was observed that the application of SZn, KPhi, and NaHS induced drought stress defense responses related to antioxidant metabolism and water maintenance in leaf tissues. These compounds were able to increase water potential ( $\Psi_w$ ) and reduce malondialdehyde (MDA) levels in treated plant leaves, through increased antioxidant defenses. In Chapter 2, the effect of spraying SZn and KPhi on dwarf sunflower plants subjected to heat and drought stresses was studied. It was found that the spraying of these compounds helped the plants to tolerate the negative effects of these stresses, even when combined. Plants treated with SZn showed higher antioxidant enzyme activity, effective quantum yield, and proline production compared to untreated plants. KPhi was also effective in increasing the activity of ascorbate peroxidase and peroxidase

enzymes, as well as effective quantum yield of FSII and carotenoid content under combined drought and high temperature conditions. In summary, the results support the hypothesis that spraying SZn and KPhi can be effective in reducing the detrimental effects of drought and heat stress in sunflower plants under controlled conditions. These compounds act through different mechanisms, including water maintenance in leaf tissues and increased antioxidant defenses.

**Keywords:** Drought stress, heat stress, sunflower, zinc sulfate, potassium phosphate, stress-mitigating compound

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma das principais culturas oleaginosas, cujo óleo contém muitas vitaminas e ácidos graxos essenciais insaturados, que podem prevenir doenças cardíacas (Anushree et al., 2017). Entretanto, o recente aquecimento e a seca já empurraram 28% das atuais terras agrícolas para fora do seu espaço climático ótimo (Rattis et al., 2021). É conhecido que um estresse hídrico severo causa efeitos prejudiciais nas plantas de girassol, como diminuição do potencial hídrico foliar e da pressão de turgescência celular, o que prejudica o crescimento e a produtividade, ou seja, reduz o rendimento dos grãos, o acúmulo de matéria seca, o tamanho do grão, o tamanho do capítulo, o diâmetro do caule e o peso total da semente (Umar e Siddiqui, 2018; Nisar et al., 2022).

As transições das savanas lenhosas para terras agrícolas ou pastagens aumentaram a temperatura da superfície terrestre, em média, em 1,9 °C, e reduziram a evapotranspiração média anual em 27% (Rodrigues et al., 2022). O nível de estresse por déficit hídrico pode variar conforme sua duração, intensidade e estágio fenológico da cultura, sabendo-se que, em plantas de soja, as fases de floração e de enchimento de grãos são as mais sensíveis (Batista et al., 2020). Já para a cultura do girassol, o momento mais sensível à escassez de água ocorre durante aproximadamente entre 10 e 15 dias antes do início da fase de florescimento, estendendo-se até até 10 dias após o término da floração (Castro et al., 1996). O estresse por déficit hídrico caracteriza-se pela redução do conteúdo de água nas células, acarretando diversas alterações, como inicialmente a limitação da abertura estomática (Li et al., 2017), o que, conseqüentemente, promove a queda da assimilação de CO<sub>2</sub>, resultando na diminuição do crescimento e da produção. Adicionalmente, o déficit hídrico pode ocasionar perturbações no processo fotossintético

por conta da redução do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos e da expressão dos genes que codificam a enzima RuBisCo (*rbcL* e *rbcS*) (Zhou et al., 2014), que é responsável pela carboxilação do CO<sub>2</sub>. Esses danos são devidos em grande parte ao estresse oxidativo, que provoca a peroxidação de lipídios das membranas e a oxidação de macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, consequentemente, aumentando a concentração de malonaldeído (Li et al., 2017). A condição de restrição hídrica, associada ou não a outros estresses abióticos, provoca diminuição da fertilização, aumento do abortamento precoce de embriões e, consequentemente, um menor número de sementes ou grãos (Boyer & Westgate, 2004; Prasad et al., 2008). E nessas condições adversas, o desenvolvimento do gametófito masculino é uma das etapas mais afetadas (Mesihovic et al., 2016).

O estresse térmico prejudica a atividade fotossintética devido a uma ruptura na integridade lipídica da membrana tilacoide e a danos concomitantes ao fotossistema II (PSII), e o conteúdo reduzido de água causado pelo calor tem efeitos negativos na divisão e crescimento celular (Hasanuzzaman et al., 2013). Além disso, análises de parâmetros da fluorescência da clorofila *a* indicam que, em algumas espécies de plantas, o estresse térmico pode afetar a atividade do fotossistema I (PSI) (Chen et al. 2016). Isso acontece, pois, sob condições extremas de temperatura, ocorre uma regulação negativa da atividade transcricional dos genes *rbcL* e *rbcS*, reduzindo a atividade e as reservas da RuBisCo, fato que leva ao aumento no fluxo de elétrons para o O<sub>2</sub>, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Garcia-Caparros et al., 2021). Estudos conduzidos por Ohama et al. (2017) elucidaram as complexas redes regulatórias transcricionais envolvidas no estresse térmico, sendo as EROs os fatores iniciais envolvidos nas respostas ao estresse por calor.

As EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico e sabe-se que, em condições estáveis, suas taxas de produção nas plantas são baixas, porém sua produção aumenta consideravelmente sob condições adversas, resultando na ativação da maquinaria antioxidante para neutralizar os desequilíbrios (Garcia-Caparros et al., 2021). Essas EROs com alta taxa de oxidação causam danos aos tecidos vegetais, mutação no DNA, desordem nas organelas celulares e decadência de lipídios, proteínas e maquinaria fotossintética (Mohammadi et al., 2021). Além do sistema de defesa antioxidante, as plantas sob estresses tendem a acumular compostos de baixo peso molecular, como aminoácidos livres e carboidratos, os quais irão levar à redução do potencial osmótico celular, auxiliando na restauração e manutenção do gradiente de potencial hídrico entre a planta e a solução externa do solo (Ahanger et al., 2017).

Neste cenário, é de suma importância o avanço de estudos com substâncias e compostos mitigadoras dos estresses por déficit hídrico e alta temperatura, focando não somente em aspectos relacionados à fotossíntese e ao metabolismo vegetal, mas também na manutenção da viabilidade e do vigor dos grãos de pólen. E assim diminuir as perdas por abortamento de estruturas reprodutivas, o que tem sido um grande problema para atingir grandes produtividades em situações de estresses ambientais (Prasad et al., 2008; Pacini e Dolferus, 2019).

A fim de minimizar os efeitos negativos inerentes às mudanças climáticas, encontrar métodos alternativos é imprescindível para a manutenção da produtividade das culturas. Compostos baseados em nutrientes minerais, aminoácidos e sinalizadores celulares podem contribuir nesse sentido, sendo o sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ), o fosfito de potássio (KPhi) e o Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) moléculas promissoras.

Já é conhecido que entre os fertilizantes o  $ZnSO_4$  desempenha papel importante na regulação dos estômatos e no equilíbrio iônico para reduzir as tensões do estresse hídrico na planta de girassol (Zafar et al., 2014). Quando submetidas ao estresse salino, o crescimento das plantas de arroz foi potencializado pela aplicação de  $ZnSO_4$ , aumentando os atributos fisiológicos e a absorção de nutrientes (Ahmed et al., 2023). Torres et al. (2021) observaram que o tratamento com  $ZnSO_4$  foi mais eficaz no aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante, em comparação com a aplicação de outros compostos. Foi evidenciado que a pulverização de  $ZnSO_4$  nas plantas de girassol mitigou os efeitos do estresse hídrico, atuando especificamente em processos fisiológicos relacionados às respostas antioxidantes e à manutenção da água nos tecidos foliares (Almeida et al., 2020).

O KPhi está emergindo como um potencial bioestimulante, fungicida e inseticida, absorvido e translocado para todas as partes da planta por transportadores de Pi (Mehta et al., 2022) e atua melhorando o rendimento e a qualidade de espécies agrícolas importantes (Mehta et al., 2022; Nour e Horuz, 2023), podendo induzir um melhor desempenho das plantas, aumento da produção de flores, melhorando as respostas a estímulos ambientais e a agentes de estresse (Gómez-Merino e Trejo-Télez 2015). É conhecido que o KPhi inibe a produção de EROs, reduzindo a produção de  $H_2O_2$  e, conseqüentemente, danos às membranas celulares, além de ter efeito benéfico no processo fotossintético, especificamente no conteúdo de clorofilas e na expressão do gene *psbA* (Oyarburo et al., 2015; Novaes et al., 2019; Feldman et al., 2020). Além disso, foi observada atuação do fosfito (Phi) isolado diante de estresses térmicos, tendo o Phi

facilitado o acúmulo de osmólitos essenciais como açúcar solúvel, mantendo assim o ajuste osmótico em plantas de batata (Xi et al., 2020). Diante do déficit hídrico combinado com alta irradiância, o Phi aumentou a taxa fotossintética e a concentração de prolina, diminuiu a intensidade da peroxidação lipídica e a taxa de vazamento de eletrólitos, atuando na estabilidade das membranas celulares de plantas de soja (Batista et al., 2023).

O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) funciona como uma molécula sinalizadora que medeia os sistemas de defesa das plantas sob diversos estressores, incluindo déficit hídrico (Zhou et al., 2020; Batista et al., 2020), ainda melhora a capacidade fotossintética e a condutância estomática, mediante controle estomático através de uma rede de sinalização dependentes de ácido abscísico (ABA) (García-Mata e LaMattina, 2010). Além disso, esse composto pode aumentar a atividade da RuBisCo, modular a expressão dos genes *HvAACT1* e *HvAPX1* envolvidos na fotossíntese e respiração e alterar o estado redox celular (níveis de tióis), atuando diretamente na performance fotossintética das plantas de espinafre submetidas a uma toxicidade por alumínio (Chen et al., 2013). Já foi observado que a aplicação conjunta de ácido cítrico e de  $H_2S$  é responsável por aumentar a tolerância ao estresse por cromo em tomateiros (Kaya et al., 2023). Shalaby et al. (2023) verificaram que a aplicação foliar de  $H_2S$  mitigou os efeitos adversos do estresse salino nas plantas de brócolis, regulando a atividade das enzimas antioxidantes, aumentando os pigmentos fotossintéticos e o conteúdo de nutrientes, mantendo a estabilidade da membrana celular e reduzindo o acúmulo de  $H_2O_2$  e MDA, o que resultou em aumento do rendimento e do conteúdo nutricional do brócolis. Em uma revisão realizada por Hilal et al. (2023), foi visto que o  $H_2S$  induz o sistema antioxidante e é capaz de regular processos fisiológicos, modula a função de proteínas principalmente por meio de interruptores redox baseados em cisteína tiol e interage com os reguladores de crescimento vegetal para regular diversos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. Portanto, esse composto químico pode ser promissor para potencializar as respostas de defesas contra a restrição hídrica e a alta temperatura em cultivares com alto potencial produtivo.

Considerando que as plantas apresentam um complexo sistema de defesa atuando em nível molecular, fisiológico e bioquímico contra o déficit hídrico e a alta temperatura e que o fosfito de potássio, sulfato de zinco e sulfeto de hidrogênio participam, pelo menos em parte, de alguns desses processos, a aplicação foliar desses produtos pode ser uma medida alternativa para a manutenção da produtividade do girassol diante desses estresses. Esses resultados fornecerão subsídios para a adoção de práticas eficazes que

poderão diminuir os vastos prejuízos que a seca e a alta temperatura vêm causando na produtividade agrícola.

### **Referências bibliográficas**

- Ahanger, M. A., & Agarwal, R. M. (2017). Potassium up-regulates antioxidant metabolism and alleviates growth inhibition under water and osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L). *Protoplasma*, 254, 1471-1486.
- Ahmed, R., Zia-ur-Rehman, M., Sabir, M., Usman, M., Rizwan, M., Ahmad, Z., ... & Bamagoos, A. A. (2023). Differential response of nano zinc sulphate with other conventional sources of Zn in mitigating salinity stress in rice grown on saline-sodic soil. *Chemosphere*, 327, 138479.
- Anushree, S., André, M., Guillaume, D., & Frédéric, F. (2017). Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review. *Agronomy for sustainable development*, 37, 1-10.
- Batista, P. F., da Costa, A. C., da Silva, A. A., Almeida, G. M., Rodrigues, M. F. M., Santos, E. C. D., ... & Müller, C. (2023). Potassium Phosphite Induces Tolerance to Water Deficit Combined with High Irradiance in Soybean Plants. *Agronomy*, 13(2), 382.
- Batista, P. F., Müller, C., Merchant, A., Fuentes, D., Silva-Filho, R. D. O., da Silva, F. B., & Costa, A. C. (2020). Biochemical and physiological impacts of zinc sulphate, potassium phosphite and hydrogen sulphide in mitigating stress conditions in soybean. *Physiologia plantarum*, 168(2), 456-472.
- Boyer, J. S., & Westgate, M. E. (2004). Grain yields with limited water. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2385-2394.
- Castro, C. D., Castiglioni, V. B. R., Balla, A., Leite, R. D. C., Karam, D., Mello, C. H., & Farias, J. R. B. (1996). A cultura do girassol.
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., You, C. Y., Liu, T. W., Dong, X. J., Zheng, H. L. (2013). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil*, 362, 301-318.
- Chen, S., Yang, J., Zhang, M., Strasser, R. J., & Qiang, S. (2016). Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 126-140.
- Feldman, M. L., Guzzo, M. C., Machinandiarena, M. F., Rey-Burusco, M. F., Beligni, M.



- V., Di Rienzo, J., ... & Andreu, A. B. (2020). New insights into the molecular basis of induced resistance triggered by potassium phosphite in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 109, 101452.
- García-Caparros, P., De Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., & Lao, M. T. (2021). Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*, 87, 421-466.
- García-Mata, C., & Lamattina, L. (2010). Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New phytologist*, 188(4), 977-984.
- Gómez-Merino, F. C., & Trejo-Téllez, L. I. (2015). Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 82-90.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., & Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9643-9684.
- Hilal, B., Khan, T. A., & Fariduddin, Q. (2023). Recent advances and mechanistic interactions of hydrogen sulfide with plant growth regulators in relation to abiotic stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Rinklebe, J., & Ahmad, P. (2023). Citric acid and hydrogen sulfide cooperate to mitigate chromium stress in tomato plants by modulating the ascorbate-glutathione cycle, chromium sequestration, and subcellular allocation of chromium. *Environmental Pollution*, 335, 122292.
- Li, J., Cang, Z., Jiao, F., Bai, X., Zhang, D., & Zhai, R. (2017). Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 82-88.
- Liu, X., & Huang, B. (2008). Photosynthetic acclimation to high temperatures associated with heat tolerance in creeping bentgrass. *Journal of plant physiology*, 165(18), 1947-1953.
- Mehta, S., Kumar, A., Achary, V. M. M., Ganesan, P., Patel, A., Singh, A., ... & Reddy, M. K. (2022). Antifungal and defense elicitor activity of Potassium phosphite against fungal blast disease on ptxD-OE transgenic indica rice and its acceptor parent. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 182, 105026.
- Mesihovic, A., Iannacone, R., Firon, N., & Fragkostefanakis, S. (2016). Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant reproduction*, 29, 93-105.
- Mohammadi, M. A., Cheng, Y., Aslam, M., Jakada, B. H., Wai, M. H., Ye, K., ... & Qin,

- Y. (2021). ROS and oxidative response systems in plants under biotic and abiotic stresses: revisiting the crucial role of phosphite triggered plants defense response. *Frontiers in Microbiology*, 12, 631318.
- Mohammadi, M. A., Han, X., Zhang, Z., Xi, Y., Boorboori, M., & Wang-Pruski, G. (2020). Phosphite application alleviates *Pythophthora infestans* by modulation of photosynthetic and physio-biochemical metabolites in potato leaves. *Pathogens*, 9(3), 170.
- Nour, S. A. M. H., e Horuz, S. Determination of the efficacies of different phosphites in the management of tomato bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(1), 25-37. (2023).
- Novaes, M. I. C., Debona, D., Fagundes-Nacarath, I. R. F., Brás, V. V., & Rodrigues, F. A. (2019). Physiological and biochemical responses of soybean to white mold affected by manganese phosphite and fluazinam. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 1-16.
- Pacini, E., & Dolferus, R. (2019). Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10, 679.
- Prasad, P. V. V., Staggenborg, S. A., & Ristic, Z. (2008). Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: Understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*, 1, 301-355.
- Rattis, L., Brando, P. M., Macedo, M. N., Spera, S. A., Castanho, A. D., Marques, E. Q., ... & Coe, M. T. (2021). Climatic limit for agriculture in Brazil. *Nature Climate Change*, 11(12), 1098-1104.
- Rodrigues, A. A., Macedo, M. N., Silvério, D. V., Maracahipes, L., Coe, M. T., Brando, P. M., ... & Bustamante, M. M. (2022). Cerrado deforestation threatens regional climate and water availability for agriculture and ecosystems. *Global Change Biology*, 28(22), 6807-6822.
- Shalaby, O. A. E. S., Farag, R., & Ibrahim, M. F. (2023). Effect of hydrogen sulfide and hydrogen peroxide on growth, yield and nutrient content of broccoli plants grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*, 316, 112035.
- Trejo-Téllez, L. I., & Gómez-Merino, F. C. (2018). Phosphite as an inductor of adaptive responses to stress and stimulator of better plant performance. *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, 203-238.

- Umar, M., & Siddiqui, Z. S. (2018). Physiological performance of sunflower genotypes under combined salt and drought stress environment. *Acta Botanica Croatica*, 77(1), 36-44.
- Xi, Y., Han, X., Zhang, Z., Joshi, J., Borza, T., Aqa, M. M., ... & Wang-Pruski, G. (2020). Exogenous phosphite application alleviates the adverse effects of heat stress and improves thermotolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) seedlings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110048.
- Zafar, S., Nasri, M., Moghadam, H. R. T., & Zahedi, H. (2014). Effect of zinc and sulfur foliar applications on physiological characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water deficit stress. *International Journal of Biosciences*, 5(12), 87-96.
- Zhou, H., Chen, Y., Zhai, F., Zhang, J., Zhang, F., Yuan, X., & Xie, Y. (2020). Hydrogen sulfide promotes rice drought tolerance via reestablishing redox homeostasis and activation of ABA biosynthesis and signaling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 213-220.
- Zhou, L., Xu, H., Mischke, S., Meinhardt, L. W., Zhang, D., Zhu, X., ... & Fang, W. (2014). Exogenous abscisic acid significantly affects proteome in tea plant (*Camellia sinensis*) exposed to drought stress. *Horticulture Research*, 1.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar, de forma pioneira, o potencial do sulfato de zinco (S.Zn), fosfito de potássio (KPhi) e sulfeto de hidrogênio (NaHS) na redução dos efeitos deletérios causados pelo déficit hídrico e pela alta temperatura em plantas de girassol (*Helianthus annuus*).

### 2.2 Específicos

1. Avaliar o efeito do S.Zn, KPhi e NaHS na manutenção dos processos fisiológicos e bioquímicos relacionados à resposta antioxidante, fotossintética e de relações hídricas em plantas de girassol submetidas ao déficit hídrico;

2. Investigar a capacidade do SZn e do KPhi em atenuar os efeitos adversos do déficit hídrico e da alta temperatura, tanto isolados quanto combinados, em plantas de girassol. Dessa forma, avaliando parâmetros bioquímicos, fisiológicos, reprodutivos e de rendimento fotossintético.

### 3. CAPÍTULO I

#### **HYDROGEN SULFIDE, POTASSIUM PHOSPHITE AND ZINC SULFATE AS ALLEVIATORS OF DROUGHT STRESS IN SUNFLOWER PLANTS**

Artigo publicado em 17 de julho de 2020 junto a revista Science and Agrotechnology como critério de dispensa do exame de qualificação.

##### **Abstract**

Drought is the most harmful environmental factor crop productivity. Some chemicals are used in agriculture to mitigate the damage from this stress on plants. Therefore, we examined whether the spraying of zinc sulfate (ZS), potassium phosphite (KPhi) and the hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donor sodium hydrosulfide (NaHS) would mitigate the deleterious effects of water deficit on sunflower plants by analyzing physiological and biometric characteristics. The experiment was carried out in a greenhouse using a randomized block design with five replications. The treatments were arranged in a 4 x 2 factorial scheme: [Factor A (Alleviators)] - spraying of KPhi (0.5 L ha<sup>-1</sup>), ZS (3.2 kg ha<sup>-1</sup>), NaHS (1.2 g ha<sup>-1</sup>), and water; [Factor B (substrate humidity, SH)] - 100% (well irrigated) and 30% (water deficit, WD) of field capacity. Under WD conditions, alleviators led to the maintenance of higher values of water potential ( $\Psi_w$ ), a lower content of leaf malonaldehyde (MDA), and increased activity of the antioxidant enzyme peroxidase (POX), except for ZS. However, leaf osmotic potential, proline concentration, variables related to gas exchange and chlorophyll a fluorescence, and biometric characteristics differed only according to the SH factor. The results of  $\Psi_w$  and MDA for sunflower plants under WD are indicative of the mitigating capacity of ZS, KPhi, and

H<sub>2</sub>S. Thus, the spraying of these compounds on sunflower plants mitigates the effects of WD, acting specifically in physiological processes related to antioxidant responses and in the maintenance of water in leaf tissues.

**Index terms:** Photosynthesis; water deficit; malonaldehyde; leaf water potential; mitigating substance

### 3.1 Introduction

The sunflower (*Helianthus annuus* L.) has great importance in the world economy as one of the most cultivated oilseed crops (Castro; Leite, 2018). Sunflower seeds contain 38% to 50% oil, which is widely used in human food and the production of biodiesel (Miladinović et al., 2019). The average productivity of sunflower crops in the worldwide was 1803.9 Kg/ha in 2019 (FAO, 2019). Many environmental factors contributed to the non-achievement of greater productivity in the sunflower harvest in Brazil, which highlights the increase in the frequency of drought seasons (Soares et al., 2019). Large economic losses were reported for Brazilian agribusiness, primarily due to periods of severe drought in the field (Ribeiro et al., 2018). Increases in these abiotic stress events are among the consequences of anthropogenic global warming (Mora et al., 2017; Dai; Zhao; Chen, 2018), which threatened agricultural productivity worldwide.

Plants exposed to water deficit show changes in several physiological and biochemical processes, such as chlorophyll degradation (Zhou et al., 2014), cell osmotic adjustment (Batista et al., 2020), reduction in stomatal opening and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) assimilation (Tariq et al., 2018). The increase in the formation of reactive oxygen species (ROS) in plants exposed to water deficit is also noteworthy (Batista et al., 2018). ROS promote membrane lipid peroxidation and the oxidation of macromolecules, such as nucleic acids and proteins (Rivas et al., 2017; Tariq et al., 2018). Under oxidative stress, higher concentrations of malonaldehyde (MDA) are an indicative of cellular damage and increases in the activity of antioxidant enzymes act in the plant defense against the stress (Li et al., 2017).

Finding methods to minimize the negative effects of water restriction is essential for maintaining crop productivity. An alternative technique to mitigate the damage of abiotic stresses in plants is the application of different classes of chemical compounds using, via leaf spraying (Dinis et al., 2016; Van Oosten et al., 2017; Kahlaoui et al., 2018; Sabir; Sari, 2019). Among the numerous alleviators researched, zinc sulfate (ZS)

potassium phosphite (KPhi), and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) mitigated stress due to water deficit via maximizing the physiological processes involved in maintaining turgor and increasing antioxidant metabolism (Batista et al., 2020).

The ZS application increases enzyme antioxidant defenses and prevents oxidative stress in plants (Ma et al., 2017). ZS also contributes to higher levels of total chlorophyll, abscisic acid, and proline, and well as improves the efficiency of stomatal control (Monjezi; Vazin; Hassanzadehdelouei, 2013; Zafar et al., 2014). Potassium phosphite (KPhi) was initially proposed as a protective fungicide, but studies described its potential as a plant biostimulant, and it induced tolerance to abiotic stresses (Gómez-Merino; Trejo-Téllez, 2015). This effect was verified via the stimulation of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (POX) (Oyarburo et al., 2015; Machinandiarena et al., 2018).

In addition to foliar fertilizers, cell signaling molecules show several improving effects on plant metabolism, such as the performance of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in inducing antioxidant defenses and, improving the photosynthetic capacity and stomatal control of plants in water deficit conditions (García-Mata; Lamattina, 2010; Corpas, 2019). Therefore, the application of the H<sub>2</sub>S donor NaHS (sodium hydrosulfide) promoted increases in the relative water content and antioxidant defenses in soybean under drought (Batista et al., 2020). Smaller amounts of ROS and MDA were also verified (Zhang et al., 2010). These studies support NaHS as a potential reliever of abiotic stresses in cultivated plants (Singh; Tripathi; Fotopoulos, 2020).

The present study we tested the hypothesis that ZS, KPhi and H<sub>2</sub>S would improve the tolerance of sunflower to water deficit. This study is the first report on the application of these three compounds to sunflower plants under water deficit conditions. Thus, the objective was to verify whether the foliar spraying of ZS, KPhi and NaHS alleviated the deleterious effects of water deficit on sunflowers and, provided better water and osmotic adjustment, protection against cellular damage, maintenance of CO<sub>2</sub> assimilation and plant growth.

## **3.2 Material and methods**

### **3.2.1 Plant material and experimental conditions**

The experiment was performed in a pad-cooled greenhouse where the air temperature was programmed not to exceed 27 °C. The greenhouse is located at the Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, Goiás, Brazil. The sunflower hybrid used in this study was the Sany 66 (Atlântica Sementes®), with a cycle of approximately 110 days. Sunflower plants were grown in plastic pots containing 5 dm<sup>3</sup> of substrate (Bioplant®), one plant per pot. Each pot was fertilized with 4.6 g of the formulated fertilizer 10-10-10 (NPK) and 0.32 g of the formulated FTE BR12 (S = 3.2%; B = 1.8%; Cu = 0.18%; Mn = 2.0%; Mo = 0.1%; Zn = 9.0%).

### 3.2.2 Experimental design

The experimental design was arranged in randomized blocks, with five (5) replicates. It consisted of a 4 x 2 factorial design: [Factor A (alleviators and water)] 1) spraying of 0.5 L ha<sup>-1</sup> potassium phosphite (KPhi), 2) 3.2 kg ha<sup>-1</sup> zinc sulfate (ZS), 3) 1.2 g ha<sup>-1</sup> sodium hydrosulfide (NaHS), and 4) water (without product, WP) and [Factor B (Substrate humidity, SH)] 1) 100% well-watered control (WW), and 2) 30% (water deficit, WD) of field capacity (FC).

### 3.2.3 Imposition of treatments and analysis

Thirty-eight days after sowing and at the R1 stage, sunflower plants were sprayed one day before the imposition of the water regimes using a sprayer pressurized by CO<sub>2</sub>, four-tip bar type XR11002-VP, with a double fan and a spray volume equivalent to 200 L ha<sup>-1</sup> via pressure regulation of 2 bar. The meteorological data at the time of application were 24.8 °C temperature and 88.3% relative humidity, as measured using a Kestrel 4000 weather meter (Kestrel Instruments, Nielsen-Kellerman Company). For the imposition of water treatments, the FC of the cultivation substrate was determined using a gravimetric method (Costa et al., 2015). To control substrate moisture during the stress period, each pot was weighed twice daily (11 am and 5 pm), and the water lost through evapotranspiration was replaced, to maintain the plants as well-watered (WW) or under water deficit (WD) using 100 and 30% of FC, respectively. Ten days after the imposition of treatments (DAIT), analyses of water relations, gas exchanges, chlorophyll *a*



fluorescence, concentration of chloroplast pigments, content of proline and malonaldehyde, antioxidant enzyme activity and biometric measurements were performed.

### 3.2.4 Water relations

Predawn leaf water potential ( $\Psi_w$ ) was measured using a Scholander pressure chamber (model 3005-1412, Soilmoisture Equipment Corp.), between 04:00 and 06:00 in the morning. For the evaluation of leaf osmotic potential ( $\Psi_s$ ), the cellular exudate was extracted from the leaves and 10  $\mu$ L analyzed using a vapor pressure osmometer (model 5600, VAPRO, Wescor, Logan, Utah, USA) (Pask et al., 2012). Osmotic potential values were obtained using the Van't Hoff's equation:  $\Psi_s = -R \times T \times C_s$ , where R is the universal gas constant (0.08205 l atm mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), T is the temperature (T °K = T °C + 273), and C<sub>s</sub> the solute concentration (M), usually expressed in atmospheres and converted to MPa (0.987  $\approx$  1 atm = 0.1 MPa).

### 3.2.5 Gas exchange

Gas exchanges of the plants were measured using a portable infrared gas analyzer with coupled modulated fluorometer (IRGA, model LI6800xt, Li-Cor, Nebraska, United States), on the latest fully expanded plant leaf. Net photosynthetic rate [ $A$ ,  $\mu$ mol (CO<sub>2</sub>) m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>], transpiration rate [ $E$ , mmol (H<sub>2</sub>O) m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>], stomatal conductance [ $g_s$ , mol (H<sub>2</sub>O) m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>], and the ratio between internal and external CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i/C_a$ ) were measured under photosynthetically active radiation (PAR) of 1500  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> and a block temperature of 25 °C. The instant water use efficiency was obtained by the formula  $EUA = [A/E, \mu\text{mol (CO}_2\text{) mmol (H}_2\text{O)}^{-1} \text{ m}^2\text{s}^{-1}]$ .

### 3.2.6 Chlorophyll *a* fluorescence

The fluorescence variables of chlorophyll *a* were recorded on the same leaf of photosynthesis using a portable modulated fluorometer coupled to the IRGA (LI6800xt,

Li-Cor, Nebraska, United States). The evaluations were performed in the dark-adapted leaves, so that the reaction centers were fully open (primary oxidized receptors) with minimal heat loss. Leaves were initially dark-adapted to estimate the initial fluorescence ( $F_0$ ), maximum fluorescence ( $F_m$ ) and potential quantum yield of photosystem II (PSII)  $F_v/F_M = [(F_0 - F_m)/F_m]$  (Genty; Briantais; Baker, 1989). The slow phase variables were obtained after the application of an actinic illumination, followed by a pulse of saturated actinic light for the determination of steady-state fluorescence ( $F$ ) and maximum fluorescence in a sample adapted to light ( $F_m'$ ), respectively, allowing to calculate the effective quantum yield of photochemical energy conversion in PSII ( $\Phi_{II} = (F_m' - F)/F_m'$ ). The  $\Phi_{II}$  was also used to estimate the apparent electron transport rate,  $ETR = \Phi_{II} \cdot PAR \times A_{leaf} \times 0.5$  (Bilger; Schreiber; Bock, 1995), where PAR is the photon flow ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) on the leaves,  $A_{leaf}$  is the amount corresponding to the fraction of incident light that is absorbed by the leaves and 0.5 is the excitation energy fraction directed to the PSII (Laisk; Loreto, 1996). The non-photochemical quenching coefficient (NPQ) was calculated as  $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ ; and the relative energy excess at the PSII level as ( $EXC = (F_v/F_M) - (F_q'/F_m')/(F_v/F_M)$ ) (Bilger; Schreiber; Bock, 1995).

### 3.2.7 Pigment concentration

Pigment concentration was determined by extraction with dimethylsulfoxide (DMSO) saturated with calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) according to Castro et al. (2019). Three leaf discs ( $0.6 \text{ cm}^2$ ) were incubated in 5 mL of DMSO solution, and the pigments were extracted for 24 h in a water bath set to  $65^\circ\text{C}$ . The spectrophotometric readings were later obtained at 480.0, 649.1, and 665.1 nm using a UV-VIS spectrophotometer (model Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc.). The chlorophyll *a* ( $\text{Chl}a = 12.19A_{665} - 3.45A_{649}$ ), and chlorophyll *b* ( $\text{Chl}b = 21.99A_{649} - 5.32A_{665}$ ) and total carotenoids ( $\text{Carot} = (1000A_{480} - 2.14A_{649} - 70.16A_{665})/220$ ) concentrations were calculated according to Wellburn (1994) and expressed in micrograms per leaf area.

### 3.2.8 Determination of proline content

For free proline measurement, 200 mg of fresh leaf material was homogenized in

4 mL of 80% ethanol according Bates, Waldren and Teare (1973), with some modifications. After centrifugation (6300 g, 10 min), an aliquot of 250  $\mu$ L of filtrate extract was mixed with 2 mL acid ninhydrin (1.25 g ninhydrin, 30 mL glacial acetic acid, 20 mL 6 M orthophosphoric acid in 200 mL), 2 mL of glacial acetic acid and 2.65 mL of water. The samples were incubated at 90 °C in a water bath for 35 min and, after this period, placed on ice to stop the reaction. We added 4 mL of toluene to the solution, followed by stirring for complete separation of the chromophore-containing toluene to be analyzed. The absorbance of the supernatant was measured at 515 nm in a UV-VIS spectrophotometer (model Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific Inc.). The proline concentration was calculated by comparison with a proline standard curve (0 to 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and was expressed as  $\mu$ mol g FM<sup>-1</sup>.

### 3.2.9 Determination of malondialdehyde (MDA)

The content of MDA was evaluated to determine the lipid peroxidation using the method proposed by Heath and Packer (1968). Leaf samples (0.160 g) were homogenized in 2 mL 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), and the homogenate was centrifuged at 12 000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant (500  $\mu$ L) was mixed with 2 mL of TBA reagent (0.5% [w/v] of TBA in 20% TCA). The reaction mixture was heated at 90 °C for 20 min in a water bath and then quickly cooled in an ice bath and centrifuged at 3000 g for 4 min. The absorbance of the colored supernatant was monitored at 440, 532 and 600 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA). The concentration of MDA was calculated using the molar extinction coefficient of 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> according to the following equation: MDA (nmol mL<sup>-1</sup>) = [(A<sub>532</sub>-A<sub>600</sub>)/155000] 106. The concentration of MDA in leaves was expressed nmol TBA-MDA g<sup>-1</sup> FW (Heath; Packer, 1968).

### 3.2.10 Determination of peroxidase activity

Peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) activity was determined by addition of the crude enzyme extract to a reaction mixture containing 25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8), 20 mM pyrogallol and 20 mM hydrogen peroxide (Kar; Mishra, 1976). The reaction

was measured at 420 nm in a UV-VIS spectrophotometer for 1 min at 25 °C. An extinction coefficient of 2.47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance; Maehley, 1955) was used to calculate POX activity and was expressed as μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein. Protein concentration was determined according to Bradford (1976).

### 3.2.11 Biometry

The plants were measured to determine the biometric variables: plant height (H, cm), number of leaves, number of nodes, and stem diameter (mm). Leaves and stem were separated into paper bags and oven dried at 65 °C for 72h to obtain leaf dry matter (g) and stem dry matter (g).

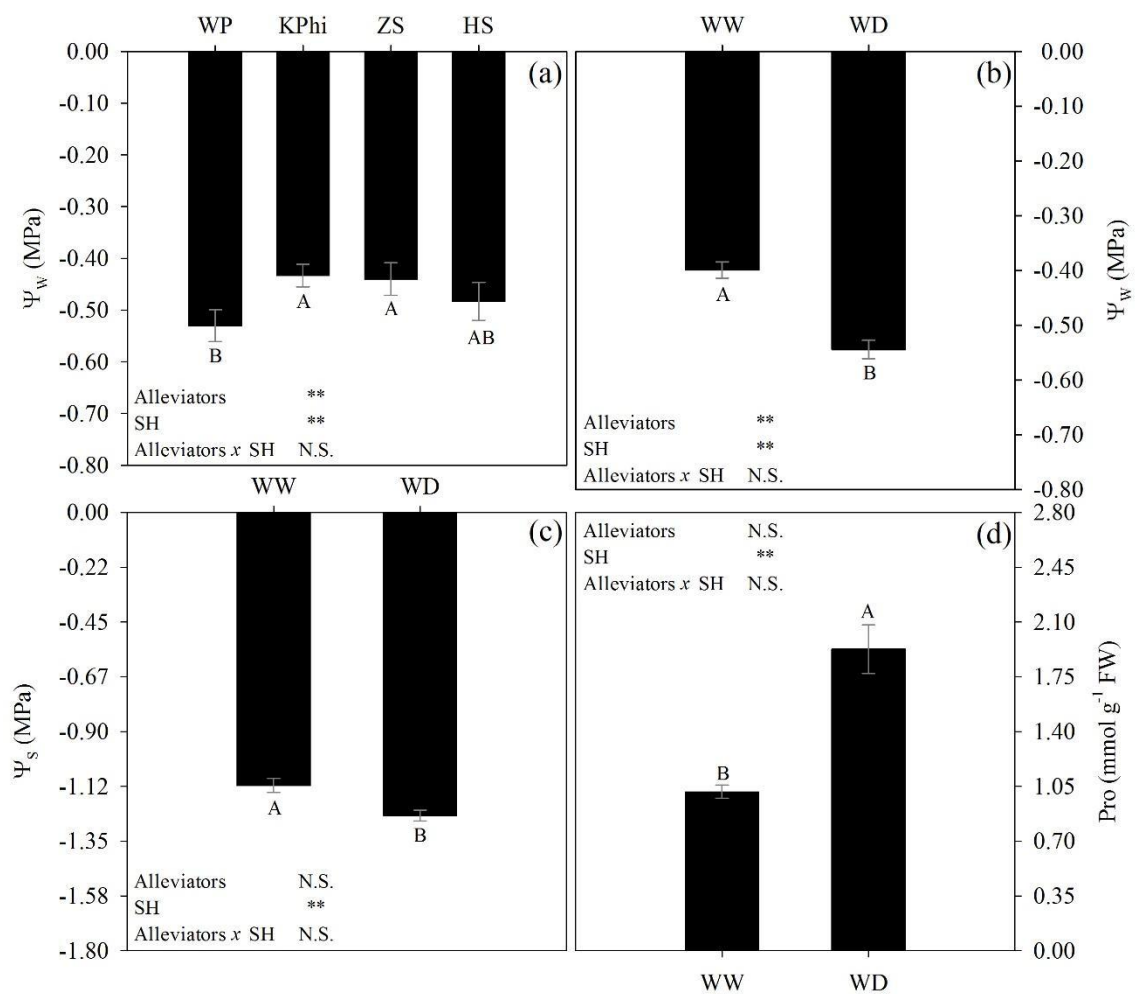
### 3.2.12 Statistical analysis

The data were evaluated for homogeneity and normality of errors (Bartlett and Shapiro-Wilk test) and, when significant, Box-Cox transformation was used (Box; Cox, 1964). After meeting the prerequisites, analysis of variance was performed to examine the effects of the isolated factors and their interaction (F test,  $\alpha < 0.05$ ). When there was a difference between treatments, multiple comparisons of means were used (Tukey's test,  $\alpha < 0.05$ ). The analyses were performed using Software ActionStat Pro® (ActionStat v. 3.3.2). Graphs were generated using SigmaPlot® software (Systat Software v.10.0).

## 3.2 Results and discussion

The leaf water potential ( $\Psi_w$ ) of sunflower plants differed separately due to the alleviating and substrate humidity (SH) factors (Figure 1a-b). Therefore,  $\Psi_w$  was higher in plants sprayed with potassium phosphite (KPhi), zinc sulfate (ZS) and the hydrogen sulfide donor (H<sub>2</sub>S) NaHS in both field capacities (FC) (Figure 1a). H<sub>2</sub>S showed results similar to plants without product (WP) application, which showed lower values of  $\Psi_w$  (Figure 1a). The higher values of  $\Psi_w$  of sunflower plants were observed due to the spraying of the H<sub>2</sub>S donor, and primarily KPhi and ZS, which indicate a higher water content in the leaf tissues of the plants (Figure 1a-b). Batista et al. (2020), observed similar

results in soybean plants under stress during 8 days of treatments, in which the application of these same alleviators promoted the maintenance of relative water content of plants under water deficit (WD) equal to well-watered (WW) plants. Although the  $\Psi_w$  was higher in the water deficit (WD) condition after spraying NaHS, KPhi, and ZS, the values were not statistically equal to those of the well-watered (WW) plants in the present study of sunflower plants (Figure 1b). There was also a mitigating effect regardless of substrate moisture level (Figure 1a).

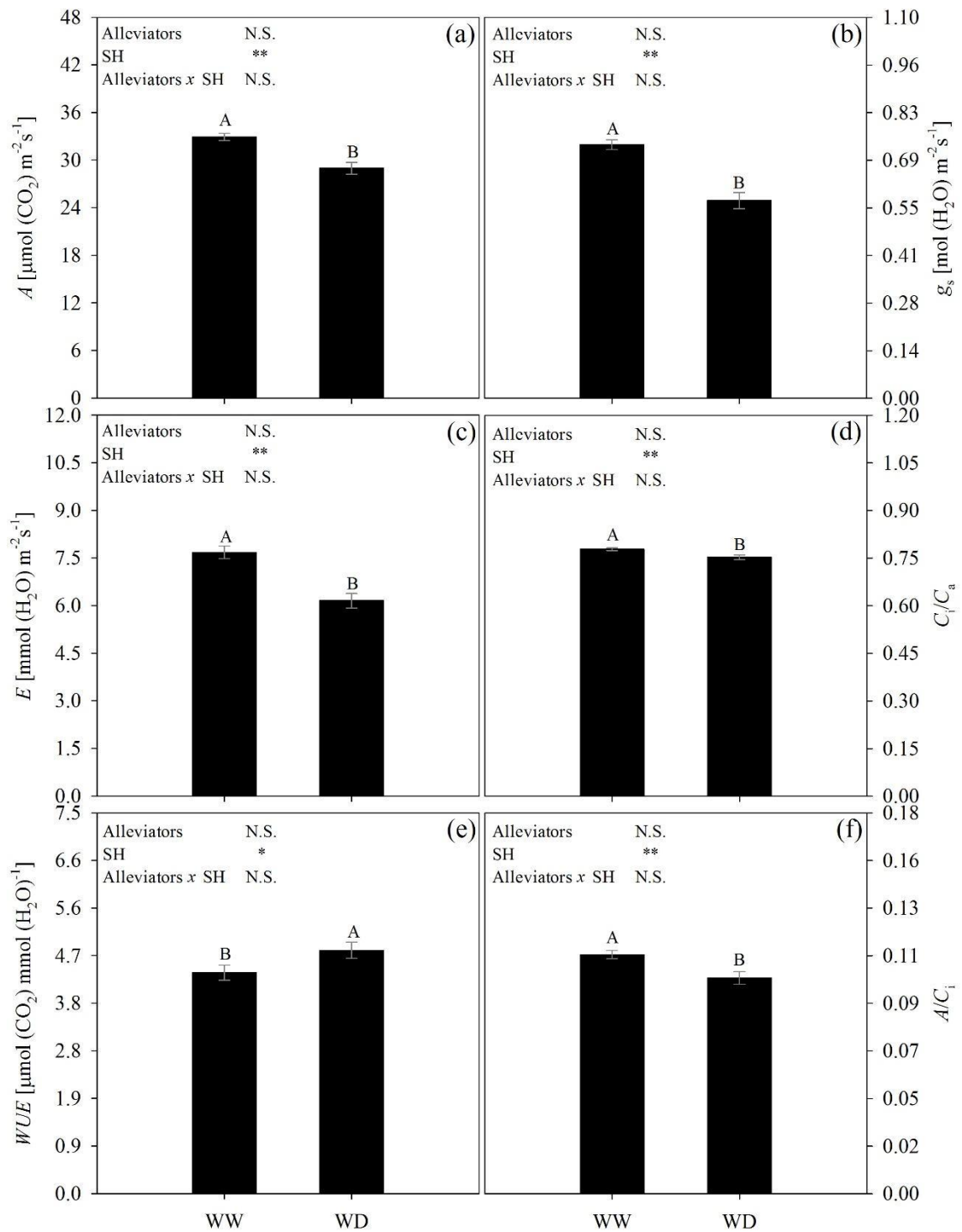


**Figure 1:** Water potential [ $\Psi_w$ , (a and b)], osmotic potential [ $\Psi_s$ , (c)] and proline concentration [Pro, (d)] of sunflower plants after 10 days of substrate humidity (SH) conditions of 100% (well-watered, WW) and 30% (water deficit, WD) of the field capacity (FC) combined with the spraying of the alleviators: potassium phosphite (KPhi), zinc sulfate (ZS), hydrogen sulfide (HS) donor NaHS, and without product (WP). Means followed by different capital letters between Alleviators (n = 10) or SH (n = 20) differ significantly from each other (Tukey's test  $\alpha < 0.01$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  SE.

The proline (Pro) leaf concentration was higher in the WD condition and differed only as a function of FC (Figure 1d). The general strategy of plants for maintaining water in WD conditions is an osmotic adjustment, due to the accumulation of osmolytes

(Chaumont; Tyerman, 2014; Nawaz et al., 2016; Silva et al., 2019). However, there was no differential osmotic adjustment due to the spraying of KPhi, NaHS, and ZS in the present study, which was observed in the results of osmotic potential ( $\Psi_s$ ) (Figure 1c), with only an effect of the imposed water regimes. The Pro accumulation is one of the strategies used in collaboration with the osmo-protection, and it act as an antioxidant (Azmat; Moin, 2019). Unlike wheat and soybean plants under WD conditions, which showed an increase in Pro due to treatment with ZS (Ma et al., 2017; Batista et al., 2020), KPhi and H<sub>2</sub>S (Batista et al., 2020).

The gas exchange parameters of sunflower plants differed only as a function of FC (Figure 2), and the photosynthetic rate ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration rate ( $E$ ), ratio between internal and external CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) and carboxylation efficiency ( $A/C_i$ ) were lower in the WD condition (Figure 2a-d e Figure 2f). However, the water use efficiency ( $WUE$ ) was higher in the WD condition (Figure 2e). The lowest  $A$  was primarily due to the restriction of stomatal opening, which was observed in soybean and *Jatropha curcas* plants under WD conditions (Silva et al., 2015; Castro et al., 2019). There was likely no damage to the biochemical stage of photosynthesis. One indication of damage to the Calvin-Benson cycle is the accumulation of CO<sub>2</sub> in the substomatal chamber (Silva et al., 2015; Rivas et al., 2017), which cannot be verified in the ratio between the internal and external concentration of CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) (Figure 2d). Despite the  $C_i/C_a$  ratio being 3.2% lower in the WD condition in the present study, a greater difference was expected compared to the WW condition. This result is due to the limitation of  $g_s$  affecting  $A$  and  $E$  more intensely than  $C_i/C_a$  (Figure 2a-d), which corroborates the lower  $A/C_i$  observed in sunflowers (Figure 2f), which was unlike cocoa plants under WD conditions (Zanetti et al., 2016). Notably, the values of  $A$  in WD conditions suggest that the imposed stress was not severe. These values were close to the values found by Vital et al. (2017) in sunflower plants, but in the control treatment.



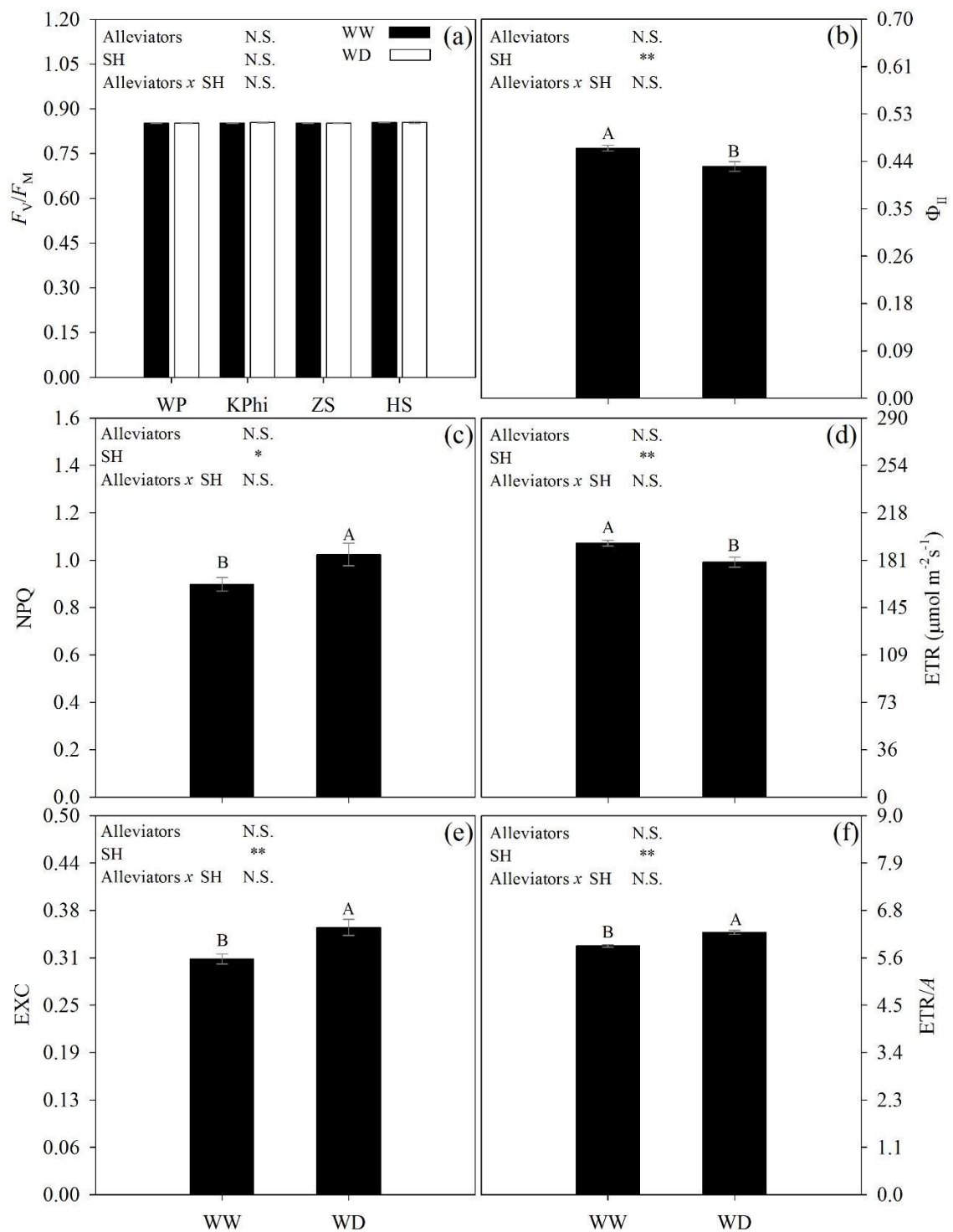
**Figure 2:** Photosynthetic rate [A, (a)], stomatal conductance [ $g_s$ , (b)], transpiration rate [E, (c)], relationship between internal and external CO<sub>2</sub> concentration [ $C_i/C_a$ , (d)], water use efficiency [WUE, (e)] and carboxylation efficiency of Rubisco [ $A/C_i$ , (f)] of sunflower plants after 10 days in substrate humidity (SH) conditions of 100% (well-watered, WW) and 30% (water deficit, WD) of the field capacity (FC) combined with the spraying of the alleviators: potassium phosphite (KPhi), zinc sulfate (ZS), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donor NaHS, and without product (WP). Means followed by different capital letters between SH (n = 20) differ significantly from each other using the Tukey's test ( $\alpha < 0.05$  and  $\alpha < 0.01$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  SE.

The regulation of stomatal opening is a strategy to prevent plant dehydration via

the loss of water in the atmosphere (Henry et al., 2019). There was a lower  $E$  of sunflower plants due to the limitation of  $g_s$  as a function of WD. Therefore, the objective of the entire strategy of stomatal regulation under WD conditions is to increase the  $WUE$  (Buezo et al., 2019). Furthermore, this increase in  $WUE$ , as expected, was verified in the sunflower plants in the present study (Figure 2e).

The potential quantum yield of photosystem II (PSII) ( $F_V/F_M$ ) did not differ between treatments (Figure 3a). However, the effective quantum yield of PSII ( $\Phi_{II}$ ) and the electron transport rate ( $ETR$ ) differed as a function of FC and were lower in the WD condition (Figure 3b e d ). The nonphotochemical dissipation (NPQ), the excess energy relative to the PSII (EXC) and the  $ETR/A$  ratio were higher in the WD condition (Figure 3c e 3e-f). Therefore, the effects of WD on photosynthesis also occurred via a decrease in the efficiency of the photochemical step, which was observed in the effective quantum yield of the PSII ( $\Phi_{II}$ ) and the electron transport rate ( $ETR$ ) (Figure 3b and 3d). The  $ETR/A$  ratio was also indicative of the lower photosynthetic efficiency in the WD condition (Figure 3f) because sunflower plants demanded more electrons for each  $CO_2$  molecule assimilated. This effect was also seen in plants of *Calotropis procera* under the same stress condition (Rivas et al., 2017). Therefore, the  $ETR/A$  results corroborate the  $A/C_i$  parameter, indicate a disturbance in the assimilation of  $CO_2$  that was not only due to the stomatic restriction. Notably, KPhi,  $H_2S$ , and ZS were reported to alleviate the harmful effects of stress on photosynthetic machinery (Oyarburo et al., 2015; Ma et al., 2017), and act as inducers of the antioxidant defense system (Machinandiarena et al., 2018; Corpas, 2019), but no stress-alleviating effects of these substances were observed in the photosynthetic process of sunflower plants.





**Figure 3:** Potential quantum yield [ $F_V/F_M$ , (a)] and effective [ $\Phi_{II}$ , (b)] of the PSII, nonphotochemical dissipation [NPQ, (c)], electron transport rate [ETR, (d)], excess energy related to PSII [EXC, (e)], and the ratio ETR/A (f) of sunflower plants after 10 days under substrate humidity (SH) conditions of 100% (well-watered, WW) and 30% (water deficit, WD) of the field capacity (FC) combined with the spraying of alleviators: potassium phosphite (KPhi), zinc sulfate (ZS), hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) donor NaHS, and without product (WP). Means followed by different capital letters between SH ( $n = 20$ ) differed significantly from each other using the Tukey's test ( $\alpha < 0.05$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  SE.

The increase in energy dissipation in NPQ is a strategy of tolerance to WD (Figure

3c). This response occurs due to the increased performance of the xanthophyll cycle, which is a strategy to prevent damage to the photosynthetic apparatus due to the excess of light energy (EXC) (Rivas et al., 2017; Głowacka et al., 2018). The regeneration of ADP and NADP<sup>+</sup> for the photochemical step is impaired with the lowest of the Calvin-Benson cycle, which generate a negative regulation of photosynthesis (Silva et al., 2015). Sunflower plant strategies were effective during WD stress to avoid the occurrence of photoinhibition. This success was verified in the stability of the F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub> ratio (Figure 3a) because the reduction of this variable is indicative of photoinhibition (Maxwell; Johnson, 2000), which was not observed in this study.

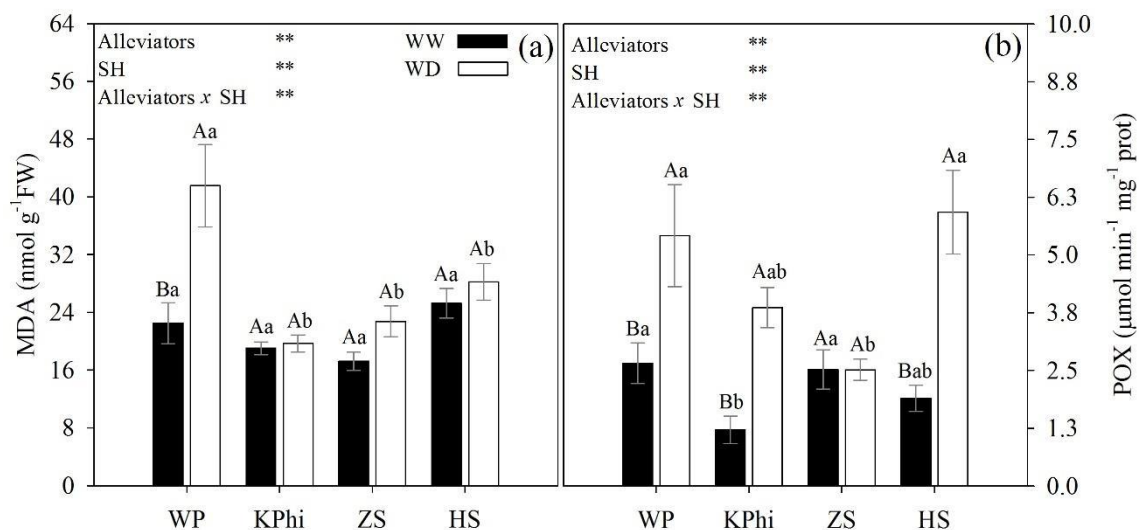
Among the chloroplast pigments, there was no difference between treatments for the content of chlorophyll *a* (Chl *a*) and carotenoids (Carot) (Table 1). The chlorophyll *b* (Chl *b*) content differed for factor FC, with lower values observed for plants under WD (Table 1). Corroborating with the F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub> results, there was no degradation of Chl *a* content, which are part of the reaction center of the photosystems. However, WD reduced the content of Chl *b* (Table 1), which plays an important role in the light harvesting complex (LHC) of photosystems (Nagao et al., 2020). This strategy decreases light absorption to avoiding photooxidative damage during stress conditions (Buezo et al., 2019).

**Table 1** - Chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*) and carotenoids (Carot) content of sunflower plants after 10 days in substrate humidity (SH) conditions of 100% (well-watered, WW) and 30% (water deficit, WD) of the field capacity (FC) combined with the spraying of alleviators: potassium phosphite (KPhi), zinc sulfate (ZS), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donor NaHS, and without product (WP).

	<b>Chl <i>a</i></b>	<b>Chl <i>b</i></b>	<b>Carot</b>
	[μg cm <sup>-2</sup> FW]		
	<b>WW – 100% of FC</b>		
<b>WP</b>	38.66 ± 2.77	14.47 ± 0.32	7.57 ± 0.52
<b>KPhi</b>	38.75 ± 1.68	14.85 ± 1.54	7.42 ± 0.34
<b>ZS</b>	40.42 ± 2.43	15.20 ± 0.90	7.92 ± 0.31
<b>HS</b>	45.07 ± 2.26	15.92 ± 1.21	8.79 ± 0.52
Mean	40.73 ± 1.22	15.11 ± 0.52A	7.93 ± 0.23
	<b>WD – 30% of FC</b>		
<b>WP</b>	40.04 ± 1.82	14.06 ± 0.48	7.59 ± 0.47
<b>KPhi</b>	42.33 ± 2.03	14.90 ± 1.13	8.08 ± 0.36
<b>ZS</b>	36.88 ± 4.18	13.42 ± 0.92	7.58 ± 0.81
<b>HS</b>	40.54 ± 2.64	13.75 ± 0.58	7.87 ± 0.46
Mean	39.95 ± 1.37	14.03 ± 0.40B	7.78 ± 0.26
C.V. (%)	13.38	9.59	13.78
Alleviators	N.S.	N.S.	N.S.
SH	N.S.	*	N.S.

Alleviators $\times$ SH	N.S.	N.S.	N.S.
Means followed by different capital letters between SH ( $n = 20$ ) differ significantly from each other using Tukey's test ( $\alpha < 0.05$ ). Vertical bars indicate means $\pm$ SE.			

There was an interaction between the Alleviating  $\times$  SH factors for the content of malondialdehyde (MDA) (Figure 4a) and activity of peroxidase (POX) (Figure 4b). The water deficit did not increase the MDA values in response to the application of the compounds, only without product. When compared between the substrate humidity per product, no difference was observed, except in plants sprayed with only water. The lower accumulation of MDA in sunflower plants due to the spraying of NaHS, KPhi, and ZS supports the potential role of these substances in mitigating the oxidative stress caused by WD (Figure 4a), which was observed in soybean plants in development stage V4 and R1 (Batista et al., 2020). The content of MDA was statistically equivalent between the plants under WD and WW with the application of NaHS, KPhi, and ZS. This result indicates an important role of these substances in the antioxidant metabolism of sunflower plants because plants that received only water spray in the WD condition accumulated 46% more MDA than the WW condition. The MDA content observed in this work under optimal conditions (WW condition with spraying only water) was compatible with that observed by Vital et al. (2017), also under control conditions, which indicates that the plants in the WP treatment were under oxidative stress in the WD condition.



**Figure 4:** Malonaldehyde content [MDA, (a)] and peroxidase activity [POX, (b)] of sunflower plants after 10 days in substrate humidity (SH) conditions of 100% (well-watered, WW) and 30% (water deficit, WD) of the field capacity (FC) combined with the spraying of alleviators: potassium phosphite (KPhi), zinc sulfate (ZS), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donor NaHS, and without product (WP). Means followed by different capital letters between SH and lower letters between Alleviators differed significantly from each other using

Tukey's test ( $\alpha < 0.01$ ). Vertical bars indicate means  $\pm$  SE.

POX activity was higher in plants under water deficit than in well-watered plants in the absence of alleviators and after the spraying of KPhi and NaHS. Plants treated with ZS did not differ between water availability conditions, which indicates that other antioxidant enzymes may have acted because the MDA content did not increase in the WD condition. One possible enzyme with increased activity is superoxide dismutase, which use zinc as a metal cofactor (Marreiro et al., 2017; Batista et al., 2020). The spraying of KPhi induced less POX activity in well-watered plants than WP and ZS. Under water deficit, greater POX activities occurred in the WP and NaHS treatments. The induction in POX activity may have contributed to plant protection against damage to cell membranes (Figure 4b). The role of H<sub>2</sub>S in increasing the antioxidant metabolism of plants under WD conditions was reported (Corpas, 2019). This increase was observed in wheat and soybean plants, in which the application of NaHS promoted a reduction in the content of MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due to the increased activity of antioxidant enzymes, including peroxidase (Ma et al., 2016; Zhang et al., 2010). The application of NaHS increased the biosynthesis of abscisic acid and promoted stomatal closure in wheat plants (Ma et al., 2016). KPhi also acted in the potentiation of the sunflower antioxidant system in the WD condition via increasing POX activity, which corroborates observations in potato plants (Oyarburo et al., 2015; Machinandarena et al., 2018).

WD stress decreased the growth of sunflower plants based on the reduction in biometric characteristics at the end of the stress period (Figure 5). Among the biometric variables, plant height, stem diameter, leaf dry matter, and stem dry matter differed as a function of FC, with lower values detected in the WD condition (Figure 5c-f). However, the number of leaves and the nodes of sunflower plants did not differ as function of the treatments (Figure 5a-b). There was no alleviation of the WD condition in reducing the biometric characteristics of plants with the spraying of NaHS, KPhi, and ZS. The decrease in growth primarily occurred due to the restriction of CO<sub>2</sub> assimilation and reduction in the accumulation of biomass, which was reported in other plants with high oil production potential (Moura et al., 2018).

### **3.4 Conclusions**

The spraying of potassium phosphite, zinc sulfate, and the hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide on sunflower plants mitigated the effects of drought stress by acting

specifically in physiological processes related to antioxidant responses and the maintenance of water in leaf tissues. However, there was no alleviation of water deficit for photosynthetic processes. These results indicate the potential of these substances to mitigate water deficit in sunflower crop and the importance of carrying out field experiments.

### 3.5 References

- AZMAT, R.; MOIN, S. The remediation of drought stress under VAM inoculation through proline chemical transformation action. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 193:155-161, 2019.
- BATES, L. S; WALDREN, R. P; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1):205-207, 1973.
- BATISTA, P. F. et al. Biochemical and physiological impacts of zinc sulphate, potassium phosphite and hydrogen sulphide in mitigating stress conditions in soybean. *Physiologia Plantarum*, 168(2):456-472, 2020.
- BATISTA, P. F. et al. Nitric oxide mitigates the effect of water deficit in *Crambe abyssinica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129:310-322, 2018.
- BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*, 102(4):425-432, 1995.
- BOX, G. E.; COX, D. R. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2):211-243, 1964.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248-254, 1976.
- BUEZO, J. et al. Drought tolerance response of high-yielding soybean varieties to mild drought: physiological and photochemical adjustments. *Physiologia Plantarum*, 166(1):88-104, 2019.
- CASTRO, C.; LEITE, R. D. C. Main aspects of sunflower production in Brazil Cesar. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 25(1):1-11, 2018.
- CASTRO, J. N. et al. Physiological tolerance to drought under high temperature in soybean cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 13(6):976-987, 2019.
- CHANCE, B; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in*

- Enzymology, 2:764-775, 1955.
- CHAUMONT, F.; TYERMAN, S. D. Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*, 164(4):1600-1618, 2014.
- CORPAS, F. J. Hydrogen sulfide: A new warrior against abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 24(11):983-988, 2019.
- COSTA, A. C. et al. The effect of irradiance and water restriction on photosynthesis in young jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*) plants. *Photosynthetica*, 53(1):118-127, 2015.
- DAI, A.; ZHAO, T.; CHEN, J. Climate change and drought: A precipitation and evaporation perspective. *Current Climate Change Reports*, 4(3):301-312, 2018.
- DINIS, L. T. et al. Kaolin-based, foliar reflective film protects photosystem II structure and function in grapevine leaves exposed to heat and high solar radiation. *Photosynthetica*, 54(1):47-55, 2016.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. FAOSTAT, Production Quantity: Sunflower. Available in: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Access in: March, 20, 2019.
- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytologist*, 188(4):977-984, 2010.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 990(1):87-92, 1989.
- GŁOWACKA, K. et al. Photosystem II Subunit S overexpression increases the efficiency of water use in a field-grown crop. *Nature Communications*, 9(1):1-9, 2018.
- GÓMEZ-MERINO, F. C.; TREJO-TÉLLEZ, L. I. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196:82-90, 2015.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1):189-198, 1968.
- HENRY, C. et al. A stomatal safety-efficiency trade-off constrains responses to leaf dehydration. *Nature communications*, 10(1):1-9, 2019.
- KAHLAOUI, B. et al. Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(1):17-23, 2018.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during

- rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57(2):315-319, 1976.
- LAISK, A.; LORETO, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence1: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase specificity factor, dark respiration in the light, excitation distribution between photosystems, alternative electron transport rate, and mesophyll diffusion resistance. *Plant Physiology*, 110(3):903-912, 1996.
- LI, J. et al. Influence of drought stress on photosynthetic characteristics and protective enzymes of potato at seedling stage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1):82-88, 2017.
- MA, D. et al. Alleviation of drought stress by hydrogen sulfide is partially related to the abscisic acid signaling pathway in wheat. *PLoS ONE*, 11(9):1-16, 2016.
- MA, D. et al. Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 8:1-12, 2017.
- MACHINANDIARENA, M. F. et al. The reinforcement of potato cell wall as part of the phosphite-induced tolerance to UV-B radiation. *Biologia Plantarum*, 62(2):388-394, 2018.
- MARREIRO, D. N. et al. Zinc and oxidative stress: Current mechanisms. *Antioxidants*, 6(2):24-32, 2017.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence: A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345):659-668, 2000.
- MILADINOVIĆ, D. et al. Sunflower and climate change: Possibilities of adaptation through breeding and genomic selection. In: Chittaranjan, K. *Genomic Designing of Climate-Smart Oilseed Crops*. Springer International Publishing, p. 173-238, 2019.
- MONJEZI, F.; VAZIN, F.; HASSANZADEHDELOUEI, M. Effects of iron and zinc spray on yield and yield components of wheat (*Triticum Aestivum* L.) in Drought Stress. *Cercetari agronomice in Moldova*, 46(1):23-32, 2013.
- MORA, C. et al. Global risk of deadly heat. *Nature Climate Change*, 7(7):501-506, 2017.
- MOURA, L. M. F. Drought tolerance in potential oilseed plants for biofuel production. *Australian Journal of Crop Science*, 12(2):289-298, 2018.
- NAGAO, R. et al. Structural basis for assembly and function of a diatom photosystem I-light-harvesting supercomplex. *Nature communications*, 11(1):1-12 2020.
- NAWAZ, M. et al. Proteomic analysis of soybean root including hypocotyl during recovery from drought stress. *Article in Journal of proteomics*, 144:39-50, 2016.
- OYARBURO, N. S. et al. Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato.

- Plant Physiology and Biochemistry, 88:1-8, 2015.
- PASK, A. J. D. et al. Physiological breeding II: A field guide to wheat phenotyping. Cimmyt, 2012. 134p.
- RIBEIRO, I. O. et al. Biomass burning and carbon monoxide patterns in Brazil during the extreme drought years of 2005, 2010, and 2015. Environmental Pollution, 243:1008-1014, 2018.
- RIVAS, R. et al. Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C3 from arid regions. Plant Physiology and Biochemistry, 118:589-599, 2017.
- SABIR, A.; SARI, G. Zinc pulverization alleviates the adverse effect of water deficit on plant growth, yield and nutrient acquisition in grapevines (*Vitis vinifera* L.). Scientia Horticulturae, 244:61-67, 2019.
- SILVA, E. N. et al. Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. Environmental and Experimental Botany, 110:36-45, 2015.
- SILVA, D. C. et al. Silicon foliar application attenuates the effects of water suppression on cowpea cultivars. Ciência e Agrotecnologia, 43:e023019, 2019.
- SINGH, V. P.; TRIPATHI, D. K.; FOTOPOULOS, V. Hydrogen sulfide and nitric oxide signal integration and plant development under stressed/non-stressed conditions. Physiologia plantarum, 168(2):239-240, 2020.
- SOARES, M. M. et al. Effects of Competition and Water Deficiency on Sunflower and Weed Growth. Revista Caatinga, 32(2):318-328, 2019.
- TARIQ, A. et al. Phosphorous fertilization alleviates drought effects on *alnus cremastogyne* by regulating its antioxidant and osmotic potential. Scientific Reports, 8(1):1-11, 2018.
- VAN OOSTEN, M. J. et al. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 4(5):1-12, 2017.
- VITAL, R. G. Physiological changes and in the carbohydrate content of sunflower plants submitted to sub-doses of glyphosate and trinexapac-ethyl. Bragantia, 76(1):33-44, 2017.
- WELLBURN, R. W. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.



- Journal of Plant Physiology, 144(3):307-313, 1994.
- ZANETTI, L. V. et al. Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(3):215-223, 2016.
- ZAFAR, S. et al. Effect of zinc and sulfur foliar applications on physiological characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water deficit stress. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 5(12):87-96, 2014.
- ZHANG, H. et al. Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5):849-857, 2010.
- ZHOU, L. et al. Exogenous abscisic acid significantly affects proteome in tea plant (*Camellia sinensis*) exposed to drought stress. *Horticulture Research*, 1:1-9, 2014.

## 4. CAPÍTULO II

### **FOSFITO DE POTÁSSIO E SULFATO DE ZINCO: ALIADOS DE PLANTAS DE GIRASSOL NA RESILIÊNCIA AOS ESTRESSES POR SECA E CALOR**

(Normas de acordo com a revista Science and Agrotechnology)

#### **Resumo**

As ondas de calor representam um significativo desafio para a agricultura devido ao estresse hídrico e térmico nas plantas. Logo, objetivou-se avaliar o potencial do sulfato de zinco (SZn) e do fosfito de potássio (KPhi) na mitigação dos efeitos adversos do déficit hídrico (DH) e da alta temperatura (AT) em plantas de girassol. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento, seguindo delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições e 3 fatores (temperatura do ar x umidade do substrato x aplicação de substâncias aliviadoras de estresses), resultando em 12 tratamentos. As plantas foram submetidas a dois regimes hídricos (90 e 45% da capacidade de campo, CC), aplicação de água, SZn (0,5kg/ha) e KPhi (0,4L/ha), além de duas temperaturas diurnas (25°C e 40°C das 10h às 14h e 25°C nos demais horários). As plantas foram submetidas a esses tratamentos no estágio fenológico de início do florescimento (R1) e mantidas por 7 dias. A aplicação de SZn e KPhi proporcionou maior tolerância das plantas de girassol aos efeitos adversos do DH e AT. Plantas tratadas com SZn apresentaram atividades mais elevadas de enzimas antioxidantes, maior rendimento fotoquímico e indução da produção de prolina, em comparação com as plantas não tratadas. O KPhi também aumentou a atividade das enzimas ascorbato peroxidase e peroxidase, bem como o rendimento quântico efetivo do fotossistema II e o teor de carotenoides, especialmente em plantas

submetidas à condição combinada de DH+AT. Esses resultados nos permitem sugerir que SZn e KPhi podem ser usados para reduzir os efeitos negativos destes dois estresses em plantas de girassol.

**Palavras-chave:** girassol; estresse hídrico; estresse térmico; sulfato de zinco; fosfito de potássio

#### 4.1 Introdução

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma cultura importante no fornecimento de óleo para a alimentação humana e animal. No entanto, devido às mudanças nos cenários climáticos, efeitos negativos vêm sendo observados no crescimento e na produtividade do girassol (Nisar et al., 2022). As projeções climáticas futuras sugerem que uma grande parte das terras agrícolas na região Amazônica-Cerrado saia do espaço climático mais favorável para a agricultura de sequeiro (Rattis et al., 2021). As temperaturas médias aumentaram 0,5 °C por década em algumas regiões tropicais e os extremos de temperatura estão se tornando mais pronunciados (1,5 °C mais quente em comparação com o El Niño de 2015 em relação ao El Niño de 1997) (Jiménez-Muñoz et al., 2016).

As alterações climáticas e o aquecimento global têm aumentado a frequência de eventos extremos de estresse térmico e hídrico que afetam gravemente a produção vegetal. O estresse por calor causa alterações no metabolismo e na estrutura das plantas, afetando processos fisiológicos essenciais, como respiração, fotossíntese e relações hídricas (Sehgal et al., 2016). Danos ao cloroplasto induzidos por estresse térmico inativam proteínas sensíveis ao calor, incluindo a RuBisCo ativase, causam desequilíbrio redox e reduzem a eficiência fotossintética (Zahra et al., 2023). Além disso, o estresse térmico interfere significativamente no maquinário de defesa antioxidante da planta e aumenta a geração de EROs, afetando o potencial de produção vegetal (Sarwar et al., 2019; Johnson et al., 2022).

A temperatura ambiente além do limite da cultura, particularmente na época da floração e dos estágios de enchimento dos grãos, afeta severamente o rendimento agrícola e a qualidade da produção (Farooq et al., 2017; Liu et al., 2019). Já o estresse por déficit hídrico pode levar a diversas alterações na planta, como redução nos teores de clorofilas (Zhou et al., 2015), fechamento estomático e, conseqüentemente, redução na assimilação

de CO<sub>2</sub> e incremento da fotorrespiração (Tariq et al., 2018; Castro et al., 2019). De fato, o déficit hídrico pode ser considerado o estresse que mais compromete os processos fisiológicos das plantas (Rajabi et al., 2017).

A seca e o estresse térmico estão entre os dois fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento, o desenvolvimento e a produção das culturas (Prasad et al., 2008). As plantas são afetadas em diversos processos, especialmente aqueles relacionados à fotossíntese, que estão diretamente ligados à produção de grãos (Mathur et al., 2014). Além disso, sabe-se que a ocorrência de seca e/ou estresse térmico durante a fase reprodutiva influencia diretamente o número de sementes (Prasad et al., 2008). É conhecido que uma variedade de fatores adversos, incluindo o estresse térmico, pode atuar como agente mutagênico físico para produzir gametas não reduzidos em plantas, com a formação de pólen não produtivo (Wang et al., 2024), o que afeta diretamente a produtividade das culturas. De fato, a produtividade de várias espécies tem sido limitada pela esterilidade do pólen em função de estresses abióticos (Powell et al., 2012). Outros efeitos na reprodução, como o abortamento de tecidos florais, podem ocorrer pela diminuição do potencial hídrico e do fluxo de carboidratos ou nitrogênio, bem como por sinalização hormonal (Prasad et al., 2008; Pacini e Dolferus, 2019).

Aumentar a resiliência da produção agrícola diante das alterações climáticas requer alternativas promissoras (Batista et al., 2023). Um dos principais objetivos da agricultura moderna é minimizar o impacto ambiental, garantindo rendimento elevado e estável das culturas, bem como sua qualidade (Lobato et al., 2023). Vários produtos químicos podem induzir respostas de defesa contra estresses nas plantas (Mohammadi et al., 2020), entre eles, compostos nutricionais como o sulfato de zinco (SZn - ZnSO<sub>4</sub>) e o fosfíto de potássio (KPhi), que vêm apresentando resultados relevantes (Batista et al., 2020).

O SZn é utilizado como composto nutricional para combater a deficiência de zinco no solo (Hembade et al., 2022) e também como principal adubo foliar à base de zinco, que aumenta a atividade da enzima superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD), prevenindo, assim, danos celulares (Kirkby e Römheld, 2007). Sabe-se que a aplicação foliar de SZn reduz os efeitos nocivos do estresse e aumenta a resistência ao déficit hídrico em plantas de girassol (Zafar et al., 2014). Isso foi verificado também por Almeida et al. (2020), em que o SZn resultou na manutenção de maiores valores de potencial hídrico e menor teor de malonaldeído foliar, ou seja, sua atuação melhorou as defesas antioxidantes das plantas de girassol. Além disso, acrescenta-se que, na condição de restrição hídrica, plantas de

milho pulverizadas com SZn apresentaram incremento de 8,5% no número de grãos (Vazin, 2012). No entanto, destaca-se que há poucas informações acerca do uso dessa substância como aliviador do estresse por alta temperatura.

O fosfito de potássio (KPhi) está emergindo como uma molécula que pode ser usada como bioestimulante para melhorar o desempenho das plantas em ambientes limitantes (Trejo-Téllez et al., 2018). Em estudo com plantas de batata, Oyarburo et al. (2015) demonstraram que o KPhi induz proteção contra estresse oxidativo e preserva componentes do fotossistema II diante do estresse UV-B. Também é conhecido que a pulverização de KPhi atenua os efeitos do estresse por déficit hídrico, especificamente por atuar na indução de respostas antioxidantes e na manutenção da água nos tecidos foliares em plantas de girassol (Almeida et al., 2020) e soja (Batista et al., 2020). Observa-se ainda que o KPhi mantém a eficiência fotossintética e reduz o estresse oxidativo e os danos ao DNA em plantas de batata sob estresse térmico (Xi et al., 2020). Testada em situação de estresses combinados, a pulverização foliar de KPhi promoveu mitigação dos estresse hídrico combinado com a alta irradiância em plantas de soja (Batista et al., 2023). Entretanto, ainda não são conhecidos os efeitos do KPhi e do SZn na mitigação de danos decorrentes da combinação do estresse hídrico com alta temperatura sobre plantas de girassol, sendo este trabalho o primeiro relato.

A utilização do SZn e de KPhi como método alternativo para redução dos efeitos deletérios causados por estresses combinados na cultura do girassol é uma proposta promissora. Ao mesmo tempo, conhecer as respostas fisiológicas, bioquímicas e de reprodução de plantas de girassol submetidas ao déficit hídrico e a uma alta temperatura, juntamente com a aplicação destes compostos, será de grande importância para determinar quais alterações promovem que resultam na evitação ao estresse, ou na mitigação dos seus danos. Assim, objetivou-se avaliar o potencial do SZn e do KPhi como mitigadores dos efeitos deletérios da seca e da alta temperatura em plantas de girassol, bem como identificar os principais mecanismos envolvidos nessa resposta.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Condições experimentais e imposição dos tratamentos**

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento sob delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições e 3 fatores (temperatura x umidade do substrato x

aliviadores), totalizando 12 tratamentos. Foi utilizada a cultivar de girassol anão de jardim (Isla®), que tem ciclo médio de 60 dias. As plantas de girassol foram submetidas às combinações dos seguintes tratamentos: dois regimes hídricos [90% (bem-irrigado - BI) e 45% (déficit hídrico - DH) da capacidade de campo, CC]; aplicação de somente água, 0,5kg/ha de sulfato de zinco (SZn) e de 0,4L/ha fosfito de potássio (KPhi); e duas temperaturas [25°C (Controle - CT) e 40°C das 10h às 14h e 25°C nos demais horários (alta temperatura - AT)]. No estágio fenológico, início do florescimento (R1), foram iniciados os tratamentos, que foram mantidos por 7 dias. As condições de crescimento na câmara foram de 65% de umidade relativa do ar, temperatura de 25/20°C (dia/noite) e irradiância de 750  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 12h durante o desenvolvimento das plantas até o momento da aplicação dos tratamentos (estádio R1 - 37 dias após a emergência).

Foi cultivada uma planta em cada vaso com 1,8 kg de substrato (Bioplant®). Cada vaso foi fertirrigado duas vezes (V2 e V5) com 0,44g de ureia, 0,46g de MAP, 0,51 g de KCl, 0,11 g de sulfato de Mg, 0,03 g de sulfato de Zn, 0,008 g de ácido bórico, 0,008 g de sulfato de Mn, 0,005 g de sulfato de Cu.

#### 4.2.2 Avaliações de Relações Hídricas

O potencial hídrico de antemanhã ( $\Psi_w$ ) foi medido por uma câmara de pressão do tipo Scholander, entre 04h e 06h da manhã. Para a avaliação do potencial osmótico foliar ( $\Psi_s$ ) foi feita extração do suco celular das folhas, e as leituras foram feitas utilizando osmômetro (VAPRO 5600, Elitech, França) (Pask et al., 2012). Os valores de  $\Psi_s$  foram obtidos utilizando a fórmula de Van't Hoff's  $\Psi_s = -R.T.C_s$ , em que R é a constante universal dos gases (0,08205 L atm.mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>), T é a temperatura e  $C_s$  a concentração da solução. Ambas as análises de  $\Psi_w$  e  $\Psi_s$  foram realizadas aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos DAIT. Também foi avaliado, no mesmo período, o conteúdo relativo de água (CRA), segundo metodologia descrita por Barrs e Weatherley (1962), pela pesagem da massa fresca (MF), túrgida (MT) e seca (MS) de discos foliares, usando a fórmula  $CRA = (MF-MS) / (MT-MS) \times 100\%$ .

#### 4.2.3 Trocas Gasosas

Aos 7 DAIT as trocas gasosas das plantas foram avaliadas para registro das taxas fotossintética [ $A$ ,  $\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ] e transpiratória [ $E$ ,  $\text{mmol (H}_2\text{O) m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ], da condutância estomática [ $g_s$ ,  $\text{mol (H}_2\text{O) m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ] e da relação entre a concentração interna e

externa de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>). A eficiência instantânea do uso da água foi obtida pela fórmula  $EUA = [A/E, \mu\text{mol (CO}_2\text{)}.mmol \text{ (H}_2\text{O)}^{-1} \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}]$ . Estas avaliações foram realizadas utilizando um analisador de gases no infravermelho portátil com fluorômetro modulado acoplado (IRGA, modelo LI6800xt, Li-Cor, Nebraska, Estados Unidos), com RFA de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura do bloco de 25°C, utilizando a mais recente folha completamente expandida da planta.

#### 4.2.4 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi registrada usando um fluorômetro portátil (FluorPen FP100, Photon Systems Instruments; Drasov, Czech Republic), analisando as folhas previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do aparato fotossintético. Em seguida, foi aplicado um pulso de luz azul com intensidade de 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , sendo registrada a fluorescência mínima (F<sub>0</sub>) em 50  $\mu\text{s}$ , quando todos os centros de reação do fotossistema II (FSII) estão abertos, marcando o passo O, seguido pelo passo J (a 2 ms), pelo passo I (a 30 ms) e pela fluorescência máxima (F<sub>m</sub>), quando todos os centros de reação do FSII estão fechados, conhecido como passo P. Esses valores foram utilizados para calcular índices bioenergéticos do FSII, conforme descrito por Strasser et al. (2000). Foram obtidos os valores relativos à fluorescência inicial (F<sub>0</sub>), ao rendimento quântico específico (F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub>), ao fluxo específico de absorção luminosa por centro de reação (ABS/RC) e ao fluxo de energia dissipada por centro de reação (DÍo/RC). Todas as avaliações foram feitas entre 08 e 12 horas, sempre em uma folha expandida.

#### 4.2.5 Concentração de pigmentos cloroplastídicos

A concentração de pigmentos cloroplastídicos foi determinada a partir de uma alíquota de 1 mL do extrato etanólico. Em seguida, os extratos foram agitados e submetidos à leitura de absorvância nos comprimentos de onda 648.8, 450, 470 e 505 nm por meio de um espectrofotômetro UV- VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA). Para o cálculo dos teores de clorofilas e carotenoides, foram utilizadas equações propostas por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  clorofila/g de massa fresca e em  $\mu\text{g}$  carotenoides/g de massa fresca.

#### 4.2.6 Determinação da concentração de prolina

A concentração de prolina foi determinada em material foliar fresco de acordo

com Bates et al. (1973), com algumas modificações detalhadas por Shabnam et al. (2016). O extrato obtido foi medido a 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA). A concentração de prolina foi calculada usando uma curva padrão de prolina (0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g MF}^{-1}$ .

#### 4.2.7 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) e da permeabilidade de membranas

O nível de peroxidação lipídica foi medido estimando a concentração de MDA, seguindo o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Heath e Packer (1968). O MDA foi extraído de amostras de folhas com ácido tricloroacético (TCA), e as soluções do extrato foram lidas a 440, 532 e 600 nm utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Evolution 60S, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA). A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Hodges et al., 199) e expressa em  $\text{nmol MDA g}^{-1} \text{ MF}$ . A avaliação do extravasamento de eletrólitos foi feita tendo como base a taxa de liberação de eletrólitos, utilizando condutivímetro portátil CD-850, segundo adaptação da metodologia descrita por Vasquez-Tello et al. (1990) e Pimentel et al. (2002). Dez discos foliares foram submersos em 30 mL de água deionizada, em frascos âmbar, por um período de 24 horas, em temperatura ambiente, para obtenção da condutividade livre (CL,  $\mu\text{S/cm}$ ). Posteriormente, os frascos foram mantidos em estufa a  $100^\circ\text{C}$  por 1 h para obtenção da condutividade total (CT,  $\mu\text{S/cm}$ ). A taxa de liberação de eletrólitos foi determinada pela fórmula  $\text{TLE (\%)} = \text{CL/CT} \times 100$ .

#### 4.2.8 Determinação de atividades enzimáticas antioxidantes

Para determinar as atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX), 0,2 g de tecido foliar foram moídos em um pó fino em um almofariz e pistilo com nitrogênio líquido. O pó fino foi homogeneizado em banho de gelo em 2 mL de uma solução contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 2 mM (PMSF) e polivinilpirrolidona (PVP) 4%.

O pH do tampão fosfato de potássio foi ajustado para 7,8 para análise das enzimas. O homogeneizado foi centrifugado a  $12.000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto. As atividades das enzimas SOD, CAT, APX e POX foram expressas com base na proteína total, cuja concentração foi determinada



segundo o método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão (Bradford, 1976).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada medindo sua capacidade de reduzir fotoquimicamente o azul de *p*-nitrotetrazol (NTB) (Del Longo et al., 1993; Giannopolitis e Reis, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50%, que foi expressa como unidade SOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

A atividade da catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi determinada seguindo o método de Havir e McHale (1987). O coeficiente de extinção de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al., 1995) foi usado para calcular a atividade CAT, que foi expressa em μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). Um coeficiente de extinção de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade de APX, que foi expressa como μmol ascorbato min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada usando pirogalol como doador de elétrons para redução de peróxido de hidrogênio (Kar e Mishra, 1976). Um coeficiente de extinção de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehly, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX e os resultados foram expressos em μmol purpurogalina min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### 4.2.9 Análises biométricas e germinação de grãos de pólen

Aos 7 DAIT as plantas foram mensuradas para a determinação das variáveis biométricas altura da planta (AP, cm), número de folhas (NF) e diâmetro de caule (DC, mm). A germinação dos grãos de pólen *in vitro* foi avaliada após os 7 DAIT no estágio de desenvolvimento R1. O meio de cultivo para a germinação de grãos de pólen da soja foi preparado com solução contendo 15% sacarose, 0,03% Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,01% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e 0,5% de ágar (Koti et al., 2004). Grãos de pólen maduros recém-coletados foram germinados em temperatura ambiente e registradas as imagens após 30 minutos. Após a germinação, as lâminas foram avaliadas em microscópio biológico binocular Leica. Os grãos de pólen foram considerados germinados quando o tamanho do tubo polínico havia ultrapassado o diâmetro do próprio grão de pólen. Foram contados 100 grãos de pólen por planta.

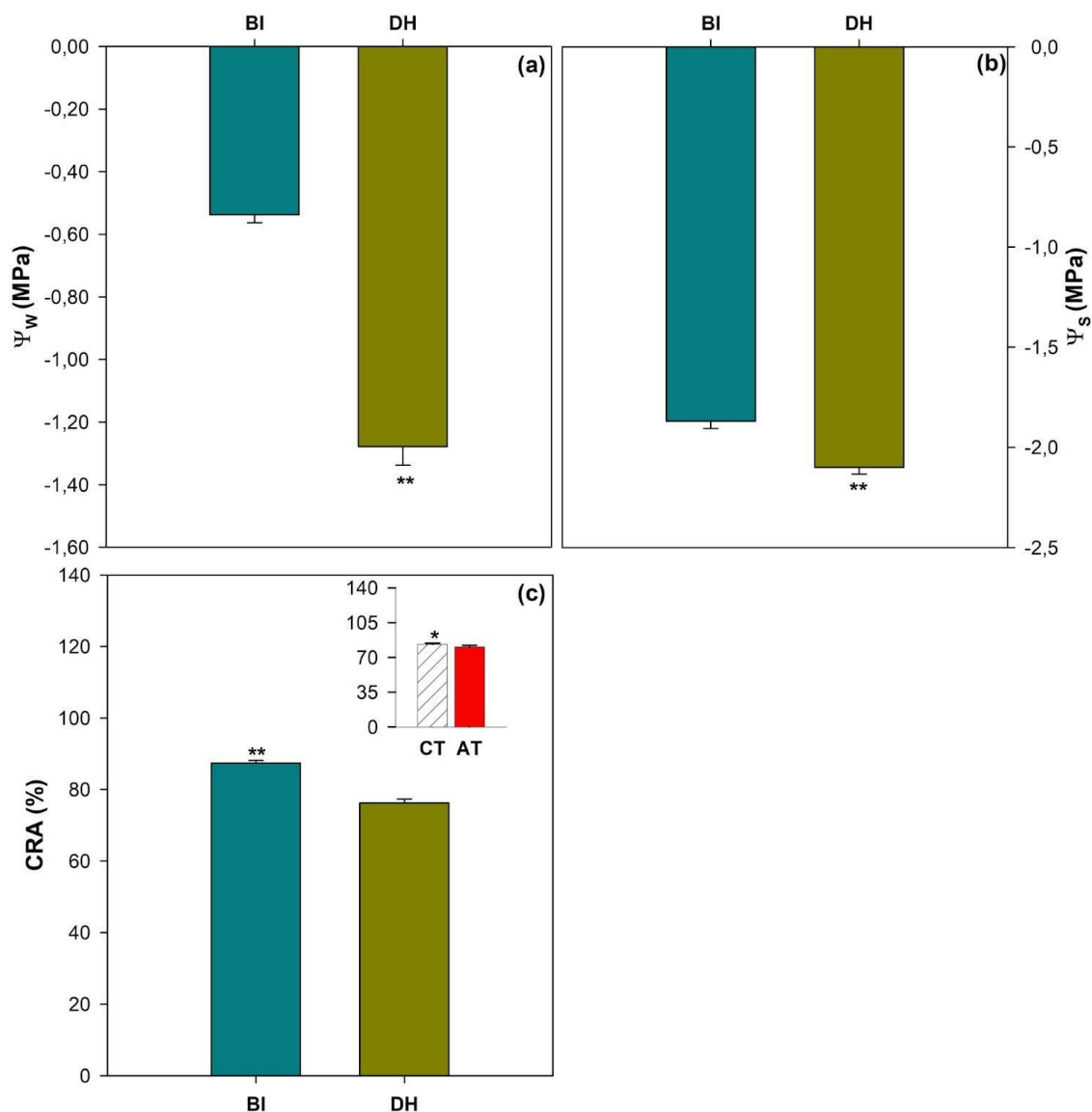
#### 4.2.10 Desenho experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com doze tratamentos e 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos às avaliações de homogeneidade (teste de Bartlett) e normalidade do erro (teste de Shapiro-Wilk), seguido de análise de variância, e as médias agrupadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises foram feitas por meio do Software Action Pro.

### 4.3 Resultados e Discussão

O potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) e o potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) foliar das plantas de girassol não diferiram no fatorial triplo somente para o fator isolado de umidade do substrato (Figuras 1a e b). O déficit hídrico (DH) levou à redução do potencial hídrico das folhas em comparação com as plantas bem irrigadas (BI). A queda no  $\Psi_s$  foi discreta, tendo sido principal causa da redução do  $\Psi_w$  a diminuição da água nos tecidos foliares. Além disso, não foi evidente um efeito ativo dos aliviadores para essas variáveis. O DH ocorre quando a taxa de transpiração da superfície foliar é maior que a taxa de absorção de água pelas raízes, estando este desequilíbrio entre a absorção e a perda de água relacionado a um menor potencial hídrico no solo do que nas raízes (Santos et al., 2022).

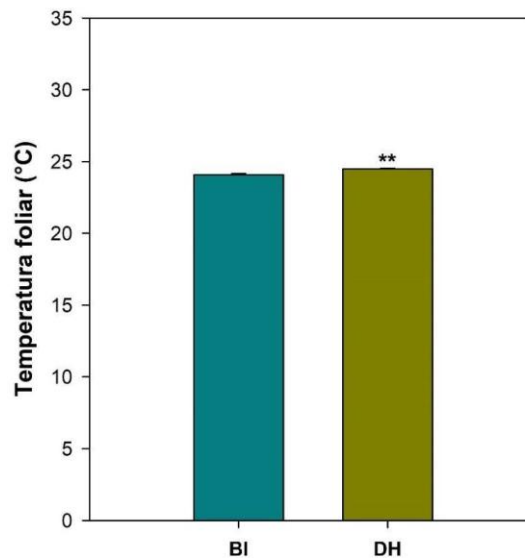
O conteúdo relativo de água (CRA) das folhas de girassol diferiu para o fator umidade do substrato e temperatura, separadamente, sendo que as plantas bem irrigadas mantiveram maiores valores de CRA em relação às plantas submetidas à seca. O mesmo ocorreu diante do estresse por alta temperatura (AT), o qual reduziu o CRA, em comparação com plantas controle (Figura 01c). A exposição das plantas à AT pode levar a uma maior taxa de transpiração, inclusive cuticular, levando a uma perda de água pelas folhas para a atmosfera (Wahid et al., 2007).



**Figura 1** - Potencial hídrico ( $\Psi_w$ , a), potencial osmótico ( $\Psi_s$ , b) e conteúdo relativo de água (CRA, c) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores, temperatura e umidade do substrato (\*\*  $p \leq 0,01$ ) e (\* $p \leq 0,05$ ) indicam diferença entre as médias pelo teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

A temperatura foliar foi obtida utilizando o analisador de gases do infravermelho (IRGA), tendo sido, dessa forma, mensurado o efeito acumulado dos estresses e aliviadores durante os 7 dias de tratamento. A umidade do substrato foi o único fator que influenciou a temperatura foliar, com plantas submetidas a déficit hídrico apresentando maiores valores do que as plantas BI (Figura 02). A temperatura foliar é um importante fator que influencia os processos fisiológicos das folhas (Lin et al., 2017). Em plantas de *Pimpinella anisum* L., a temperatura foliar aumentou 5°C em resposta ao estresse por déficit hídrico severo (Mehravi et al., 2023). A temperatura foliar em plantas sob DH pode aumentar em função de alguns fatores, como o fechamento de estômatos e a redução

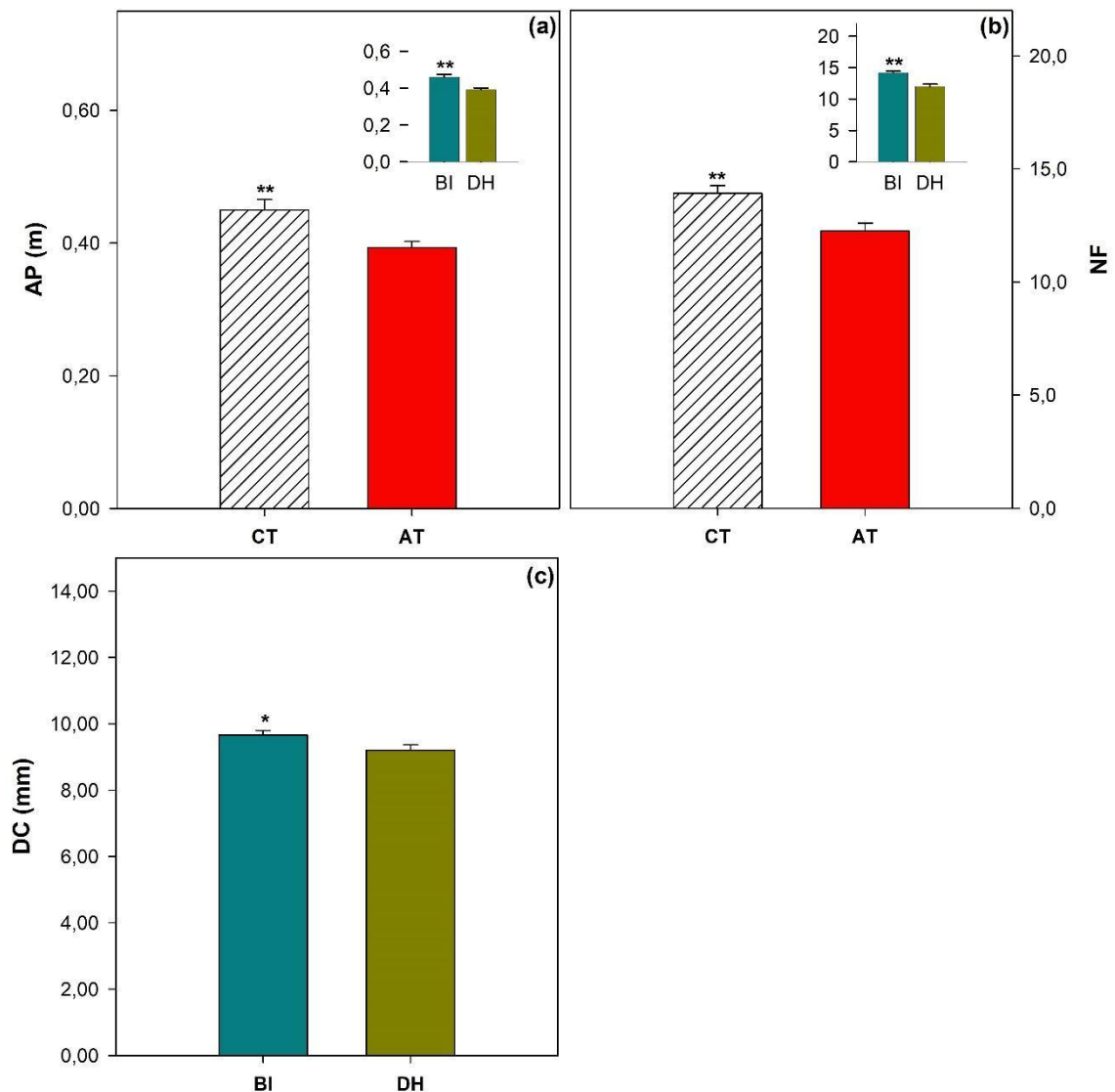
da transpiração, que são processos que contribuem para dissipar o calor da superfície das folhas, logo, a redução leva ao aumento da temperatura foliar (Osakabe et al., 2014).



**Figura 2** - Temperatura foliar (°C) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*\*  $p \leq 0,01$ ). Barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

As variáveis altura de planta (AP), número de folha (NF) e diâmetro do caule (DC) diferiram para o fator isolado umidade do substrato, visto que plantas bem irrigadas exibiram maiores valores em comparação com plantas submetidas ao DH. Já o fator isolado de temperatura diferiu para AP e NF, tendo as plantas controle obtido maiores valores em comparação com a alta temperatura (Figuras 03 a, b e c). Sabe-se que a resposta das plantas ao estresse causado por alta temperatura (AT) pode limitar o desenvolvimento vegetal, afetando processos como crescimento, germinação, reprodução e rendimento das culturas (Szymańska et al., 2017). Já sob déficit hídrico, a resposta mais crítica é o declínio na condutância dos estômatos devido a seu efeito negativo na fotossíntese, reduzindo o crescimento da parte aérea e das raízes (Mashilo et al., 2017). Sob déficit hídrico, a resposta mais crítica é o declínio da condutância dos estômatos devido a seu efeito negativo na fotossíntese, reduzindo o crescimento da parte aérea e das raízes (Mashilo et al., 2017). O estresse hídrico pode reduzir o turgor celular da planta, e sabe-se que durante o crescimento foliar, a expansão celular desempenha papel decisivo na área foliar final (Renaudin et al., 2017), pois a pressão de turgescência celular é a principal força motriz da expansão celular (Haas et al., 2020). Em plantas de milho, foi observada diminuição significativa no acúmulo de biomassa do caule, raiz, folhas e parte

aérea em condições de estresse hídrico (Ahmad et al. 2022). Sabe-se que o rendimento das culturas é particularmente vulnerável a altas temperaturas, e a reprodução das plantas está entre os componentes fisiológicos mais sensíveis a temperaturas acima de 30°C (Sage et al., 2015). Contudo, para a variável germinação de grão de pólen, não foi observada diferença estatística, mas o percentual médio de germinação foi de 16,77% (dados não mostrados).

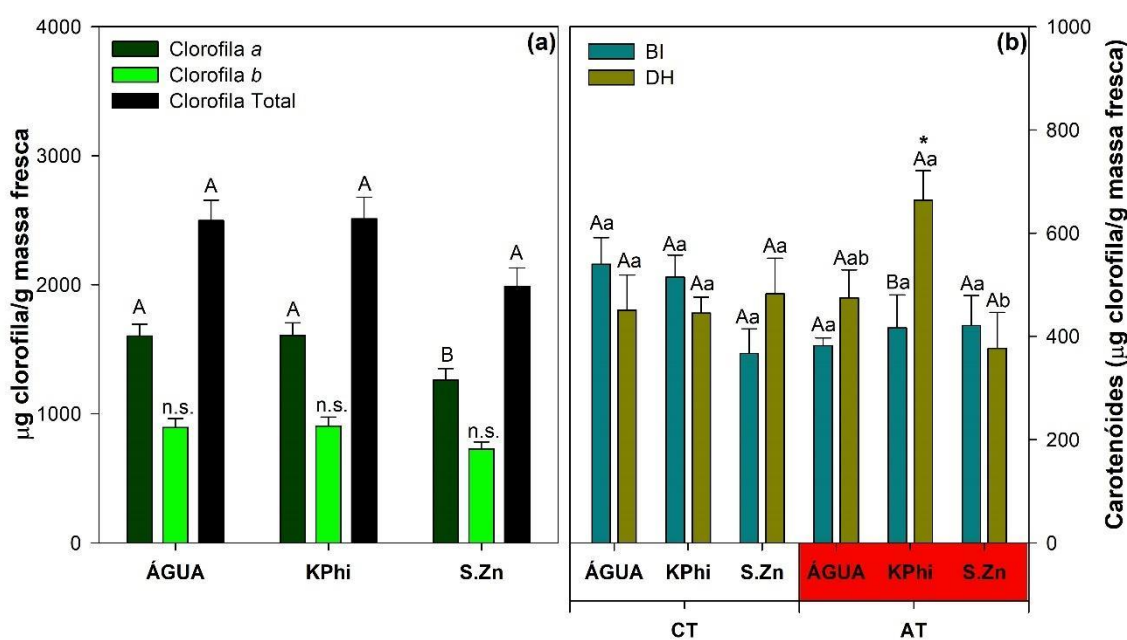


**Figura 3** - Altura de planta (AP, a), número de folha (NF, b) e diâmetro do colmo (DC, c) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ). As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

Plantas submetidas a déficit hídrico e a estresse térmico podem apresentar diminuição no teor de clorofilas ao produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode levar à peroxidação lipídica e, conseqüentemente, ao desarranjo de cloroplastos

(Shivakrishna et al., 2018). Considera-se que os compartimentos celulares mais afetados sob condições desfavoráveis são os cloroplastos e que as condições de estresse resultam em diminuição do desempenho da cadeia de transporte de elétrons e na desregulação da expressão gênica desta organela (Szymańska et al., 2017; Kan et al., 2023), afetando, assim, a fotossíntese. Neste estudo, o conteúdo de clorofilas diferiu somente entre os aliviadores para clorofila *a* (Figura 04 a), uma vez que as plantas submetidas à pulverização do fosfito de potássio (KPhi) e água apresentaram teores mais elevados de clorofila *a* em comparação com as plantas pulverizadas com sulfato de zinco (S.Zn) (Figura 04 a). Esse aumento do conteúdo de clorofila *a* pode ser decorrente do efeito do potássio na formação da molécula de clorofila, que está relacionado com a regulação do metabolismo do nitrogênio (Zahoor et al., 2017). Para a variável clorofila *b*, não foi verificada diferença estatística (Figura 04 a). Em contrapartida, para as clorofilas totais foi verificada diferença entre os aliviadores pelo teste F (ANOVA), no entanto, o teste de Tukey não diferenciou os aliviadores (Figura 04 a).

A interação entre umidade do substrato x temperatura x aliviadores foi significativa ( $p = 0,0385$ ) para a variável conteúdo de carotenoides. Quando submetidos ao estresse térmico, foram observados maiores valores em plantas com pulverização de KPhi em relação a plantas com pulverização de S.Zn sob déficit hídrico. Quando comparadas às plantas submetidas ao estresse hídrico, somente no tratamento KPhi+AT foram obtidos maiores valores em relação aos demais tratamentos. Além disso, o teor de carotenoides foi maior em plantas do tratamento KPhi+AT+DH, em comparação às plantas submetidas a KPhi+AT+BI (Figura 04b).



**Figura 4** - Conteúdo de clorofila a, b e total em função da aplicação dos aliviadores (a) e conteúdo de carotenoides (b) de plantas de girassol de acordo a interação entre os fatores aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Na Figura (a), médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na Figura (b), médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre umidades do solo, ou minúsculas entre aliviadores em uma mesma temperatura, não diferem entre si pelo Tukey a 5% de probabilidade, já o \* indica diferença significativa entre as temperaturas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ). As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

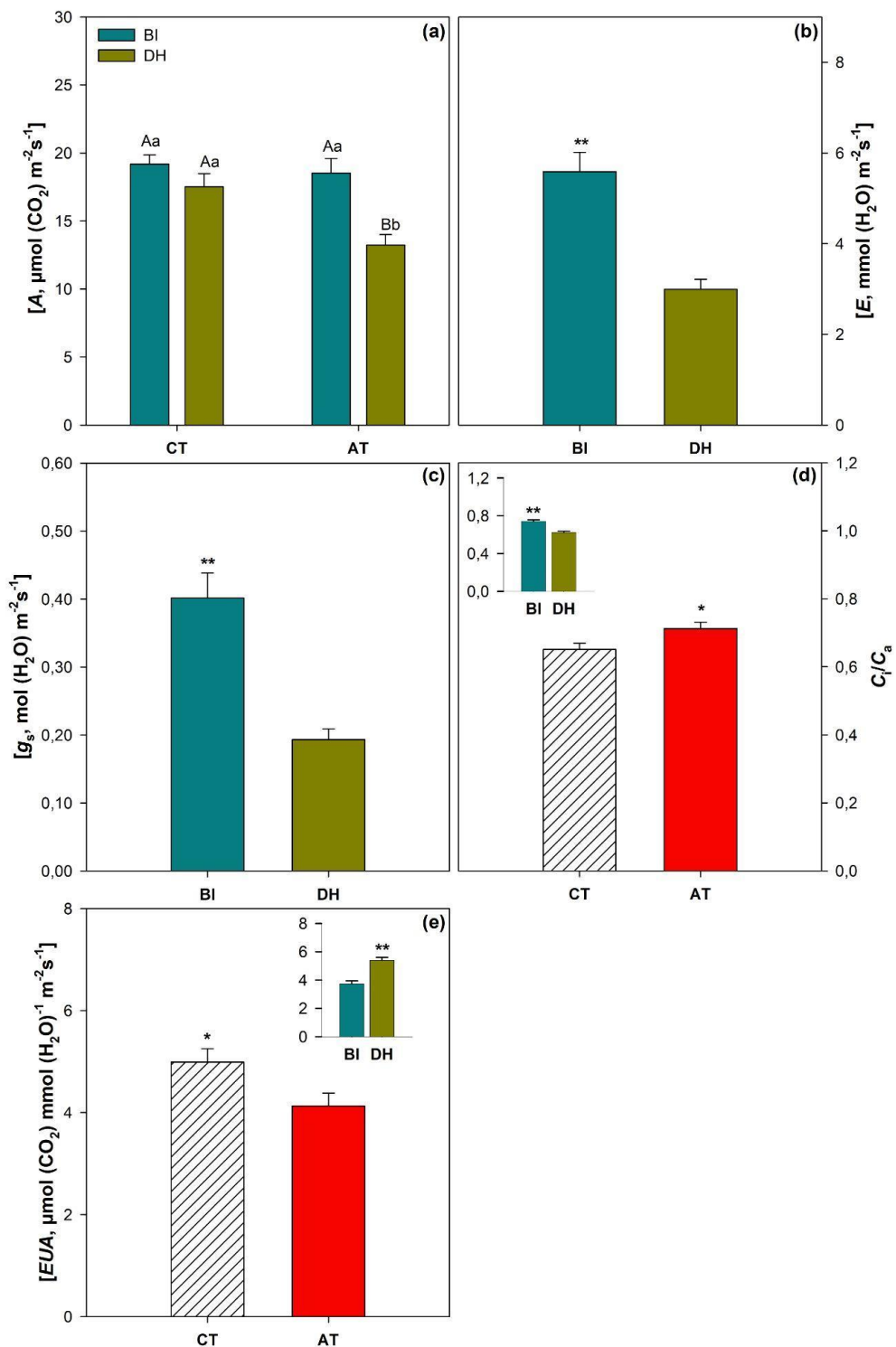
A fotossíntese é um dos processos fisiológicos das plantas mais sensíveis a AT, portanto, se o estresse for extremo, sua inibição ocorre em minutos (Szymańska et al., 2017). Além disso, é a atividade funcional e a estabilidade estrutural do FSII, que inclui o complexo evolutivo de oxigênio, constituindo aspectos do aparelho fotossintético bastante suscetíveis ao estresse hídrico (Kalaji et al., 2016). Quanto à variável taxa fotossintética (A) de plantas de girassol, a interação entre umidade do substrato x temperatura foi significativa ( $p = 0,0419$ ), tendo sido observado decréscimo de 28,62% para o fator alta temperatura + déficit hídrico em comparação com alta temperatura + bem irrigado. Além disso, quando comparada a umidade do substrato de plantas bem irrigadas, não houve diferença entre controle e alta temperatura. Entretanto, em plantas de girassol submetidas a déficit hídrico sob alta temperatura, a A foi 24,54% menor que plantas sob condição de temperatura ótima (Figura 05 a). Resultados similares foram encontrados para a variável A, que também foi menor em plantas de girassol submetidas a condições de déficit hídrico em comparação com plantas irrigadas (Almeida et al., 2020).

Da mesma forma, assim como na taxa fotossintética, o déficit hídrico reduziu em 51,75% a condutância estomática (gs), em 46,51% a taxa transpiratória (E) e em 16,21%

a relação entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (Ci/Ca) das plantas de girassol (Figuras 05 b, c e d). Somente o fator isolado umidade do substrato diferiu significativamente. Esta redução na  $g_s$  é uma resposta comum ao estresse por déficit hídrico, com o fechamento dos estômatos servindo para conservar a água pela diminuição na transpiração (Inman-Bamber e Smith, 2005). Além disso, foi observada diferença para a variável Ci/Ca, que, em plantas sob alta temperatura, foi 9,23% maior que o controle, o que pode indicar que o ciclo de Calvin-Benson não estava funcionando a plena capacidade (Figura 05d). Esse aumento do Ci pode ter sido causado por fatores como fotoinibição, redução da disponibilidade de ATP e NADPH, desnaturação de enzimas e o aumento da fotorespiração (Osakabe et al., 2014). As reações fotoquímicas e o metabolismo do carbono são os mais propensos a danos, e a AT afeta marcadamente o *status* da água nas folhas e a concentração intracelular de CO<sub>2</sub>, decorrente de um efeito do fechamento dos estômatos (Wang et al., 2009; Greer e Weedon, 2012). Sabe-se que a capacidade máxima de carboxilação da RuBisCO aumenta exponencialmente antes de atingir o pico e depois diminui em temperaturas mais altas (Medlyn et al., 2002), sendo a desativação da RuBisCO devida à sensibilidade ao calor da RuBisCO ativase, a proteína acessória da RuBisCO, que remove inibidores de fosfato de açúcar fortemente ligados ao sítio ativo da enzima (Scafaro et al., 2023). Além disso, o AT acelera a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inibindo a síntese proteica e o reparo do FSII, como no caso da inibição do reparo do PSII induzida pela limitação de CO<sub>2</sub> (Murata et al., 2007).

Em relação à variável de eficiência do uso da água (*EUA*), as plantas controle obtiveram maiores valores (17,43% maior) do que as plantas submetidas a uma alta temperatura. Em comparação com o fator isolado umidade do substrato, os maiores valores foram evidentes em plantas com déficit hídrico – cerca de 44,89% –, quando comparadas às plantas bem irrigadas (Figura 05 e). Isto ocorre porque o fechamento dos estômatos sob estresse hídrico resulta em uma diminuição simultânea na absorção de CO<sub>2</sub> e na perda de água. Como resultado, a eficiência do uso da água aumenta devido à menor condutância estomática combinada com a fotossíntese sustentada (Arab et al., 2023).



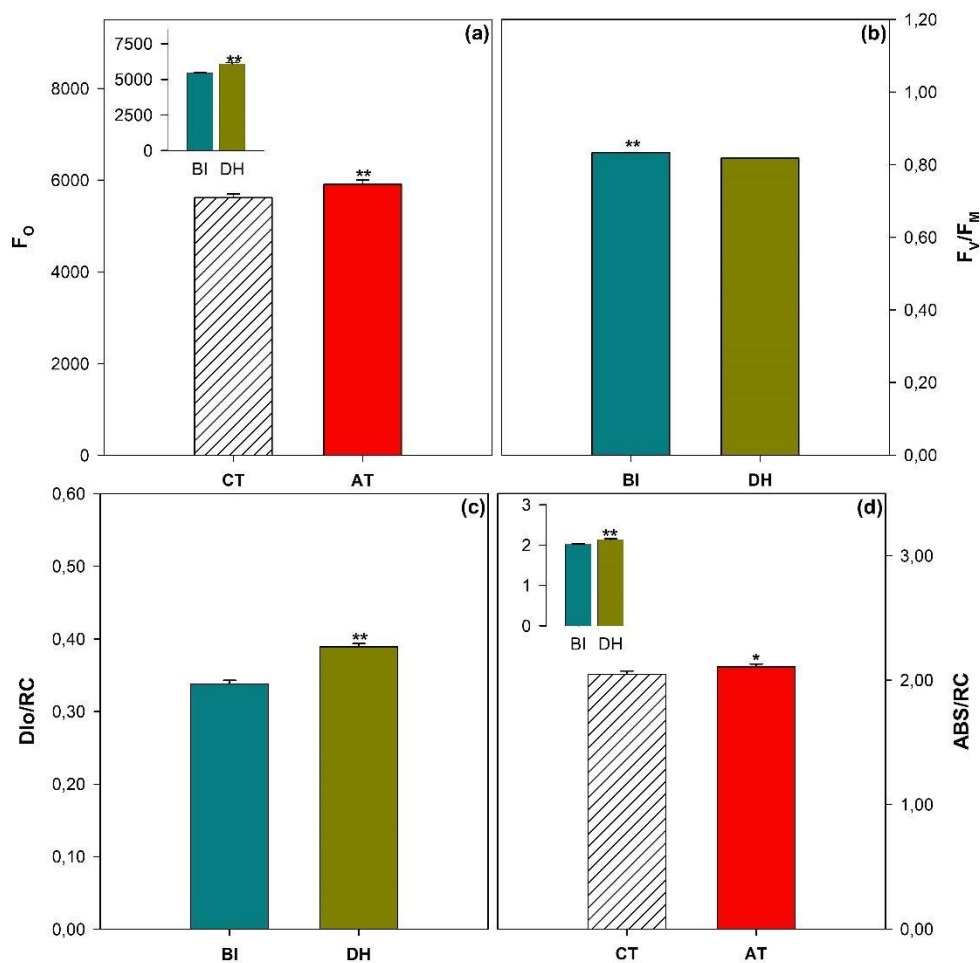


**Figura 5** - Taxa fotossintéticas ( $A$ , a) condutância estomática ( $g_s$ , b), taxa transpiratória ( $E$ , c), relação entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ , d) e eficiência do uso da água (EUA, e) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $\leq 0,01$ ). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre umidades do solo, ou minúsculas entre temperaturas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

A fluorescência da clorofila  $a$  tornou-se uma ferramenta valiosa para pesquisar a

capacidade fotossintética das plantas sob condição de estresse abiótico (Ahmad et al., 2022). Neste sentido, a eficiência máxima fotoquímica do FSII ( $F_v/F_m$ ) diferiu somente para o fator isolado da umidade do substrato, tendo as plantas bem irrigadas obtido valores maiores que as plantas submetidas a déficit hídrico. Entretanto, mesmo com diferença estatística, os valores foram acima de 0,8 (Figura 06b), não indicando danos ao FSII. Em plantas de *Petunia hybrida*, a  $F_v/F_m$  apresentou mudança significativa em resposta a estresse hídrico severo, atingindo o menor valor de 0,78; já quando submetidas a estresse hídrico moderado, o valor foi de 0,8, ou seja, a redução pronunciada do potencial hídrico causou diminuição da eficiência máxima fotoquímica do FSII (Toscano et al., 2023). Esse efeito também foi observado em estudo conduzido por Mehravi et al. (2023) com plantas de *Pimpinella anisum* L., em que foi constatado que a razão  $F_v/F_m$  diminuiu de 0,83 sob condições bem irrigadas para 0,70 sob tratamento com déficit hídrico severo. Comportamento idêntico foi evidenciado em plantas de milho submetidas a estresse por déficit hídrico (Ahmad et al., 2022), indicando comprometimento do aparato fotossintético dessas espécies. Essa redução nas plantas pode resultar na diminuição da eficiência do aparelho fotossintético e, conseqüentemente, numa diminuição na fotossíntese líquida ou na eficiência quântica de  $O_2$  (Li et al., 2022). Manter uma relação  $F_v/F_m$  mais elevada sob déficit hídrico pode melhorar a eficiência do uso da radiação, facilitando as reações de assimilação de carbono (Herritt et al., 2020).

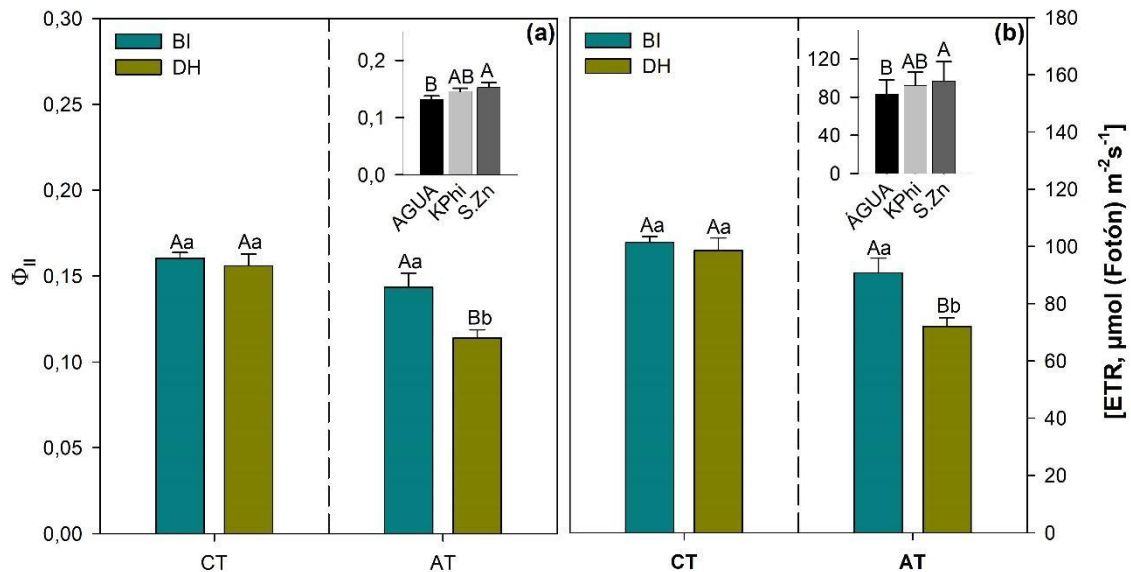
A fluorescência inicial ( $F_0$ ) e o fluxo de energia absorvida por centro de reação ativo (ABS/RC) diferiram para os fatores de temperatura e umidade do substrato isoladamente; em ambos, o estresse resultou em maiores valores do que nas plantas controle e bem irrigadas (Figura 06 a e d). Já o fluxo de energia dissipada por centro de reação ativo (DIO/RC) diferiu somente para o fator isolado da umidade do substrato, sendo maior no déficit hídrico em relação às plantas bem irrigadas (Figura 06 c). Maiores valores  $F_0$  indicam que o estado estrutural dos centros de reação FSII pode estar comprometido (Krause e Jahns, 2004). Em plantas de *Crambe abyssinica*, expostas apenas ao déficit hídrico, também foram observados maiores valores de  $F_0$  em comparação com plantas bem irrigadas (Batista et al., 2018).



**Figura 6** - Fluorescência inicial ( $F_0$ , a) eficiência máxima fotoquímica do FSII ( $F_v/F_m$ , b), fluxo de energia dissipada por centro de reação ativo ( $Dl_0/RC$ , c) e fluxo de energia absorvida por centro de reação ativo ( $ABS/RC$ , d) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores x temperatura x umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ) pelo teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

Sob estresse, o transporte de elétrons pode diminuir e ocorrer aumento do estresse fotooxidativo, o que leva a uma produção de EROs. Neste estudo, o rendimento quântico efetivo ( $\Phi_{II}$ ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) diferiram para a interação entre os fatores temperatura x umidade do substrato, sendo que em ambas as variáveis, a combinação de alta temperatura + déficit hídrico apresentou menores valores em relação aos demais tratamentos (Figuras 07 a e b). Em estudo conduzido por Almeida et al. (2020), avaliando plantas de girassol submetidas à seca, foi observado decréscimo na fotossíntese, decorrente da diminuição na eficiência da etapa fotoquímica, refletida em menores valores de  $\Phi_{II}$  e ETR. Além disso, no fator isolado de pulverização de aliviadores, também foi observado aumento dessas características, sendo que o S.Zn foi maior em comparação com a pulverização de somente água (Figuras 07 a e b). O Zn é um cofator da anidrase carbônica que aumenta o conteúdo de  $CO_2$  no cloroplasto, portanto,

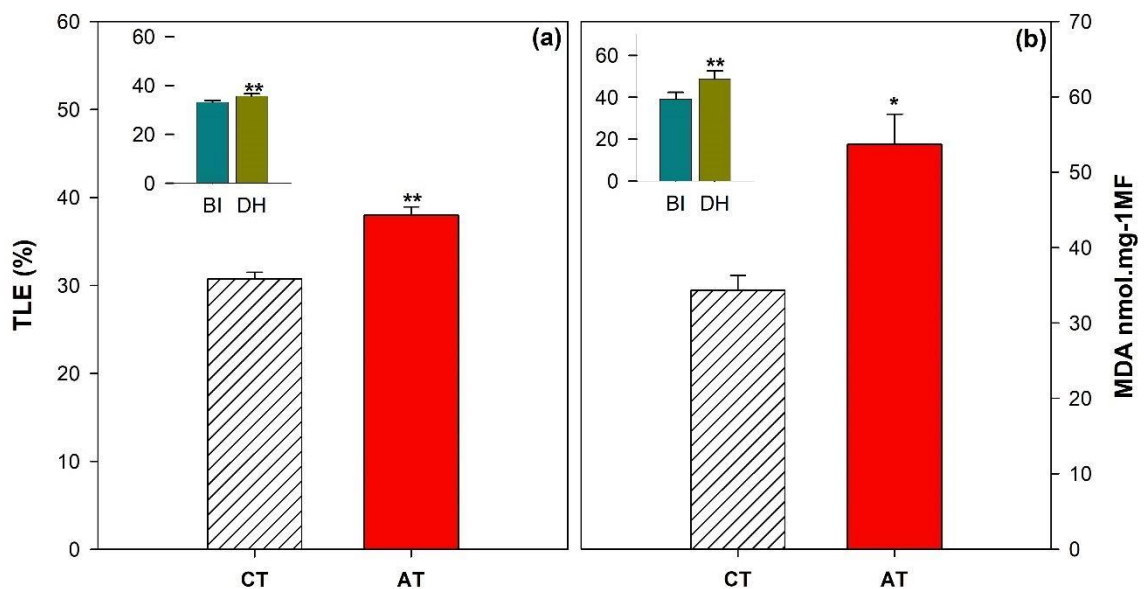
também aumentando a capacidade de carboxilação da enzima RuBisCO, o que se reflete na fotossíntese (Salama et al., 2006). Em plantas de soja submetidas a déficit hídrico, comportamento semelhante foi observado para  $\Phi_{II}$  e ETR, que diminuiu apenas quando exposto ao déficit hídrico, apresentando valores semelhantes aos do controle em plantas tratados com S.Zn+DH (Batista et al., 2020).



**Figura 7** - Rendimento quântico efetivo ( $\Phi_{II}$ , a) e taxa de transporte de elétrons (ETR, b) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Médias seguidas de letras maiúsculas diferem significativamente entre umidade de substrato e letra minúscula entre temperatura, quando verificados os aliviadores, as letras maiúsculas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey  $\alpha < 0,05$ . As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

A disfunção da membrana celular como resultado do estresse é bem expressa no aumento da permeabilidade da membrana e no extravasamento de íons para fora da célula, podendo ser medida pelo efluxo eletrolítico (Sedaghat et al., 2017). As respostas referentes à alta temperatura, à seca e ao estresse, combinadas em diferentes estágios de crescimento, diminuem as atividades das enzimas antioxidantes e o teor de proteínas solúveis nas folhas, levando a aumentos no teor de MDA e a danos nas membranas celulares, o que acelera a senescência da planta (Hu et al., 2023). Diante disso, a taxa de extravasamento de eletrólitos (TLE) e o malonaldeído (MDA) são importantes indicadores de danos nas membranas lipídicas nas plantas. No fator isolado umidade do substrato, as plantas submetidas a déficit hídrico apresentaram conteúdos de MDA e TLE, respectivamente, 7,71% e 24,81% maiores, em comparação com as plantas bem irrigadas (Figuras 8 a e b). Comportamento semelhante foi evidenciado para o fator temperatura,

em que as plantas submetidas a uma alta temperatura obtiveram aumento de 23,56% para MDA e 56,55% para TLE, indicando danos celulares (Figuras 8 a e b). Wang et al. (2022) observaram aumento da permeabilidade da membrana em plantas de soja sob estresse por déficit hídrico, indicando redução da estabilidade da membrana. Além disso, os teores de MDA aumentaram em folhas crambe submetidas a déficit hídrico, em razão do aumento das EROs, afetando, desse modo, a permeabilidade das membranas (Batista et al., 2018). Teores mais elevados de MDA em híbridos de milho submetidos à combinação dos estresses térmico e de seca podem estar associados a graves danos fotossintéticos, direcionando mais elétrons para a geração de EROs (Hussain et al., 2019).



**Figura 8-** Taxa de extravasamento de eletrólitos (TLE, a) e o malonaldeído (MDA, b) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo entre aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ) pelo teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

O acúmulo de EROs induzido pelo estresse é neutralizado por sistemas antioxidantes enzimáticos e metabólitos não enzimáticos de baixo peso molecular. Além disso, a prolina pode ser adicionada a uma lista de antioxidantes não enzimáticos que neutralizam os efeitos danosos das EROs (Gill e Tuteja, 2010). No presente estudo, a prolina diferiu para o fator isolado aplicação de aliviadores, obtendo maiores valores para o S.Zn (52,43%), quando comparado à aplicação de apenas água, e 28,67% menor com a aplicação de KPhi. Já para o fator isolado umidade do substrato, maior valor foi observado para o déficit hídrico em relação às plantas de girassol bem irrigadas (Figura 09 f), cerca de 56,08% de incremento. Em estudo conduzido em plantas de soja submetidas a déficit

hídrico e à aplicação de S.Zn, foi verificado aumento de prolina no estágio R1 (Batista et al., 2020). De acordo com Azmat e Moin (2019), a prolina funciona como osmólito e tem três funções principais no estresse: função de molécula sinalizadora, de molécula de defesa antioxidante e função de quelante de metais. A superprodução de prolina nas plantas estabiliza as membranas, conseqüentemente evita o vazamento de eletrólitos e mantém as concentrações de EROs dentro de faixas normais, evitando, assim, a explosão oxidativa celular, atuando como antioxidante ativo (Alagoz et al., 2023).

Neste estudo, foram observadas diferenças estatísticas para as enzimas do sistema antioxidante em plantas de girassol. A catalase (CAT) diferiu isoladamente para os fatores temperatura e aliviadores, tendo as plantas submetidas ao tratamento AT apresentado valores 34,48 % superiores aos das plantas controle. Além disso, a pulverização do S.Zn induziu aumento da atividade da CAT em 35,53% em relação às plantas com pulverização somente de água (Figura 09 a). A CAT nas plantas é um decompositor de  $H_2O_2$  em água e oxigênio para prevenir o estresse oxidativo, e o principal local de produção de CAT em plantas superiores é durante a fotorrespiração nos peroxissomos (Mhamdi et al., 2012; Yang et al., 2023). A fotorrespiração ajuda a proteger as plantas contra os danos causados por estresses ambientais, como a alta temperatura, pois consome  $CO_2$  e, principalmente, energia, que poderia ser direcionada para a produção de radicais livres. Esse incremento na fotorrespiração pode ter sido uma estratégia utilizada pelas plantas de girassol. No entanto, a fotorrespiração produz  $H_2O_2$ , que é também um importante sinalizador celular ao estresse, sendo esse aumento do  $H_2O_2$  geralmente acompanhado de maior atividade da CAT, que protege as células contra os danos causados pelo  $H_2O_2$  (Yang et al., 2023). Assim, acredita-se que o estresse por calor tenha aumentado a taxa de fotorrespiração e, conseqüentemente, a atividade da CAT.

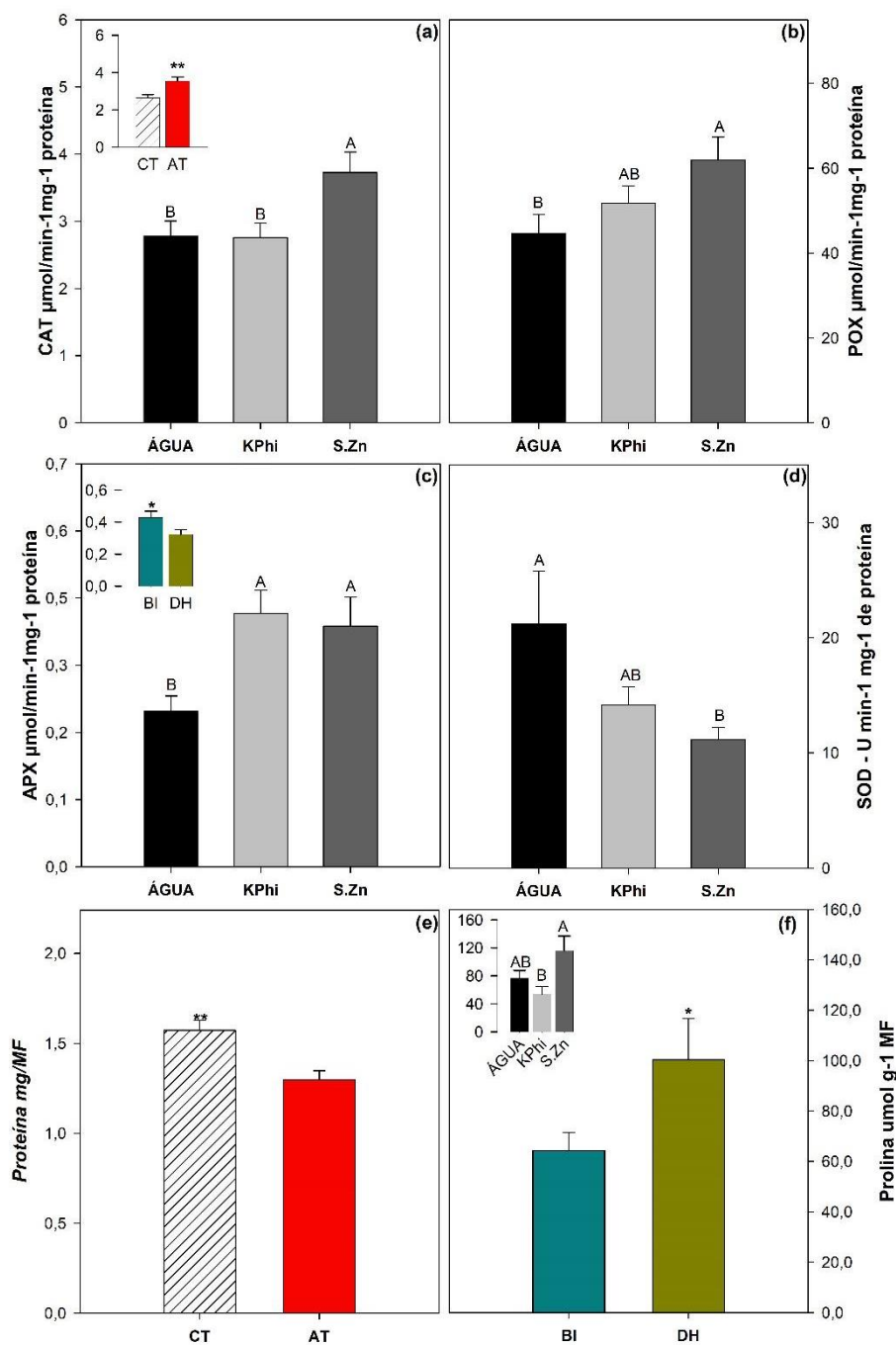
A avaliação da enzima peroxidase (POX) revelou variações significativas para o fator isolado aliviadores, observando um padrão de resposta similar ao da CAT, no qual a atividade com a aplicação de S.Zn aumentou 38,72% em comparação com as plantas submetidas somente a pulverizações com água (Figura 09 b). A POX desempenha papel crucial em processos como lignificação celular e regulação do crescimento vegetal, além de estar envolvida na detoxificação de  $H_2O_2$  (Lee et al., 2022). Esse padrão de resultado também foi observado para a enzima ascorbato peroxidase (APX), cuja atividade aumentou 54,81% com S.Zn e 62,96% com KPhi, em comparação com as plantas tratadas somente com água (Figura 09 c). A APX é essencial para detoxificação de  $H_2O_2$ , utilizando o ascorbato como redutor (Pandey et al., 2017). Sabe-se que o potássio

desempenha papel primordial na ativação da APX e na regulação do pH celular, influenciando, assim, sua atividade enzimática (Johnson et al., 2022). A APX também diferiu para o fator isolado umidade do substrato, porém os maiores valores foram registrados para as plantas bem irrigadas em comparação com as plantas submetidas a déficit hídrico.

A enzima superóxido dismutase (SOD), por sua vez, é uma metalo-enzima que constitui a primeira linha de defesa contra EROs, catalisando a dismutação do radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$  para formar  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Choudhury et al., 2013). No caso da SOD, houve diferença para o fator isolado Aliviadores, com os menores valores registrados para S.Zn, que é um cofator metálico dessa enzima (Figura 09 d).

As concentrações de proteínas diferiram somente para o fator Temperatura, sendo observada redução em plantas expostas a temperaturas elevadas em comparação com o controle, indicando redução do teor de proteínas em razão do estresse térmico (Figura 09 e). Este declínio pode ser atribuído à desnaturação das proteínas e à consequente redução na atividade enzimática, o que comumente acontece em condições de temperaturas elevadas (Wahid et al., 2007).

Estudos conduzidos por Zafar et al. (2014) com plantas de girassol demonstraram que a aplicação foliar de zinco aumentou a atividade antioxidante enzimática em condições de estresse hídrico, evidenciando o papel crucial do zinco como componente estrutural e catalítico de diversas proteínas e enzimas (Ma et al., 2017).



**Figura 9** - Catalase (CAT, a), peroxidase (POX, b), ascorbato peroxidase (APX, c), superóxido dismutase (SOD, d) proteínas (e) e prolina (f) de plantas de girassol de acordo com a análise do fatorial triplo ente aliviadores, temperatura e umidade do substrato. Médias seguidas de letras maiúsculas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey  $\alpha < 0,01$  e diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos (\*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,01$ ) de acordo com o teste F. As barras verticais indicam médias  $\pm$  SE.

#### 4.4 Conclusões

A pulverização de fosfito de potássio e, principalmente, de sulfato de zinco em plantas de girassol induz respostas de tolerância ao estresse por déficit hídrico e térmico,



bem como a combinação desses fatores, justamente por atuar em processos relacionados às respostas enzimáticas do metabolismo antioxidante e em estratégias para manutenção de água nos tecidos foliares, como a indução do aumento de prolina, apontando a possibilidade de ajustamento osmótico. Isso nos leva a concluir que os efeitos dos estresses poderiam ter sido maiores sem a aplicação dos aliviadores, com ênfase no sulfato de zinco. No entanto, não houve alívio dos estresses no processo fotossintético, em especial no estresse combinado, ressaltando que, no déficit hídrico isolado, as plantas conseguem manter a taxa de fotossíntese quando se contrasta com as condições ideais. Logo, observa-se nos resultados o maior potencial da aplicação do sulfato de zinco em mitigar o déficit hídrico, térmico e a combinação entre eles em plantas de girassol, assim como da pertinência de realizar experimentos a campo para validação destes resultados.

#### **4.5 Referências Bibliográficas**

- Ahmad, S., Wang, G. Y., Muhammad, I., Chi, Y. X., Zeeshan, M., Nasar, J., & Zhou, X. B. (2022). Interactive effects of melatonin and nitrogen improve drought tolerance of maize seedlings by regulating growth and physiochemical attributes. *Antioxidants*, 11(2), 359.
- Alagoz, S. M., Lajayer, B. A., & Ghorbanpour, M. (2023). Proline and soluble carbohydrates biosynthesis and their roles in plants under abiotic stresses. In *Plant Stress Mitigators* (pp. 169-185). Academic Press.
- Anderson, M.D.; Prasad, T.K.; Stewart, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 1995, 109, 1247–1257.
- Arab, M. M., Askari, H., Aliniaiefard, S., Mokhtassi-Bidgoli, A., Estaji, A., Sadat-Hosseini, M., ... & Vahdati, K. (2023). Natural variation in photosynthesis and water use efficiency of locally adapted Persian walnut populations under drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201, 107859.
- Arora, D., & Bhatla, S. C. (2017). Melatonin and nitric oxide regulate sunflower seedling growth under salt stress accompanying differential expression of Cu/Zn SOD and Mn SOD. *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 315-328.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 1973, 39, 205–207.
- Batista, P. F., da Costa, A. C., da Silva, A. A., Almeida, G. M., Rodrigues, M. F. M.,

- Santos, E. C. D., ... & Müller, C. (2023). Potassium phosphite induces tolerance to water deficit combined with high irradiance in soybean plants. *Agronomy*, 13(2), 382.
- Batista, P. F., Müller, C., Merchant, A., Fuentes, D., Silva-Filho, R. D. O., da Silva, F. B., & Costa, A. C. (2020). Biochemical and physiological impacts of zinc sulphate, potassium phosphite and hydrogen sulphide in mitigating stress conditions in soybean. *Physiologia plantarum*, 168(2), 456-472.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248-254.
- Castro, J. N., Muller, C., Almeida, G. M., & Costa, A. C. (2019). Physiological tolerance to drought under high temperature in soybean cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 13(6), 976-987.
- Chance, B.; Maehly, A.C. Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymol.* 1955, 2, 764–775.
- Chen, C., & Dickman, M. B. (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3459-3464.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., & Panda, S. K. (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 8(4), e23681.
- Del Longo, O.T.; Gonzalez, C.A.; Pastori, G.M.; Trippi, V.S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol.* 1993, 34, 1023–1028.
- Farooq, M., Nadeem, F., Gogoi, N., Ullah, A., Alghamdi, S. S., Nayyar, H., & Siddique, K. H. (2017). Heat stress in grain legumes during reproductive and grain-filling phases. *Crop and Pasture Science*, 68(11), 985-1005.
- Garcia-Caparrós, P., De Filippis, L., Gul, A., Hasanuzzaman, M., Ozturk, M., Altay, V., & Lao, M. T. (2021). Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*, 87, 421-466.
- Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977, 59, 309–314.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.

- Greer, D. H., & Weedon, M. M. (2012). Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. *Plant, Cell & Environment*, 35(6), 1050-1064.
- Haas, K. T., Wightman, R., Meyerowitz, E. M., & Peaucelle, A. (2020). Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. *Science*, 367(6481), 1003-1007.
- Havir, E.A.; McHale, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 1987, 84, 450–455.
- Heath, R.L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I- Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968, 10, 189–198
- Hembade, V. L., Yashveer, S., Taunk, J., Sangwan, S., Tokas, J., Singh, V., ... & Kumar, M. (2022). Chitosan-Salicylic acid and Zinc sulphate nano-formulations defend against yellow rust in wheat by activating pathogenesis-related genes and enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 192, 129-140.
- Herritt, M. T., Pauli, D., Mockler, T. C., & Thompson, A. L. (2020). Chlorophyll fluorescence imaging captures photochemical efficiency of grain sorghum (*Sorghum bicolor*) in a field setting. *Plant methods*, 16, 1-13.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207, 604-611.
- Hu, J., Zhao, X., Gu, L., Liu, P., Zhao, B., Zhang, J., & Ren, B. (2023). The effects of high temperature, drought, and their combined stresses on the photosynthesis and senescence of summer maize. *Agricultural Water Management*, 289, 108525.
- Inman-Bamber, N. G., & Smith, D. M. (2005). Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field crops research*, 92(2-3), 185-202.
- Jiménez-Muñoz, J. C., Mattar, C., Barichivich, J., Santamaría-Artigas, A., Takahashi, K., Malhi, Y., ... & Schrier, G. V. D. (2016). Record-breaking warming and extreme drought in the Amazon rainforest during the course of El Niño 2015–2016. *Scientific reports*, 6(1), 33130.
- Johnson, R., Vishwakarma, K., Hossen, M. S., Kumar, V., Shackira, A. M., Puthur, J. T., ... & Hasanuzzaman, M. (2022). Potassium in plants: Growth regulation, signaling, and environmental stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 172, 56-69.

- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., ... & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta physiologiae plantarum*, 38, 1-11.
- Kan, Y., Mu, X. R., Gao, J., Lin, H. X., & Lin, Y. (2023). The molecular basis of heat stress responses in plants. *Molecular Plant*.
- Kar, M.; Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 1976, 57, 315–319.
- Khan, H. U. R., Link, W., Hocking, T. J., & Stoddard, F. L. (2007). Evaluation of physiological traits for improving drought tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant and Soil*, 292, 205-217.
- Kirkby, E. A., & Römheld, V. (2007). Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Informações agronômicas*, 118(2), 1-24.
- Krause, G. H., & Jahns, P. (2004). Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (pp. 463-495). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Lee, B. R., La, V. H., Park, S. H., Mamun, M. A., Bae, D. W., & Kim, T. H. (2022). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive hormonal status involves oxidative burst signaling and proline metabolism in *Rapeseed leaves*. *Antioxidants*, 11(3), 566.
- Li, Y. T., Li, Y., Song, J. M., Guo, Q. H., Yang, C., Zhao, W. J., ... & Zhang, Z. S. (2022). Has breeding altered the light environment, photosynthetic apparatus, and photosynthetic capacity of wheat leaves?. *Journal of Experimental Botany*, 73(10), 3205-3220.
- Lin, H., Chen, Y., Zhang, H., Fu, P., & Fan, Z. (2017). Stronger cooling effects of transpiration and leaf physical traits of plants from a hot dry habitat than from a hot wet habitat. *Functional Ecology*, 31(12), 2202-2211.
- Liu, Y., Li, J., Zhu, Y., Jones, A., Rose, R. J., & Song, Y. (2019). Heat stress in legume seed setting: effects, causes, and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 10, 938.
- Lobato, M. C., Feldman, M. L., Machinandiarena, M. F., & Olivieri, F. P. (2023). First insights into the role of polyamines in biotic stress resistance induced by potassium phosphite in potato. *Potato Research*, 1-16.
- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Ding, H., Qin, H., Hou, J., ... & Guo, T. (2017). Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress.

- Frontiers in plant science, 8, 860.
- Mashilo, J., Odindo, A. O., Shimelis, H. A., Musenge, P., Tesfay, S. Z., & Magwaza, L. S. (2017). Drought tolerance of selected bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] landraces assessed by leaf gas exchange and photosynthetic efficiency. *Plant physiology and biochemistry*, 120, 75-87.
- Mathur, S., Agrawal, D., & Jajoo, A. (2014). Photosynthesis: response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 116-126.
- Medlyn, B. E., Dreyer, E., Ellsworth, D., Forstreuter, M., Harley, P. C., Kirschbaum, M. U. F., ... & Loustau, D. (2002). Temperature response of parameters of a biochemically based model of photosynthesis. II. A review of experimental data. *Plant, Cell & Environment*, 25(9), 1167-1179.
- Mehravi, S., Hanifei, M., Gholizadeh, A., & Khodadadi, M. (2023). Water deficit stress changes in physiological, biochemical and antioxidant characteristics of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 107806.
- Mhamdi, A., Noctor, G., & Baker, A. (2012). Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 181-194.
- Mohammadi, M. A., Han, X., Zhang, Z., Xi, Y., Boorboori, M., & Wang-Pruski, G. (2020). Phosphite application alleviates *Phytophthora infestans* by modulation of photosynthetic and physio-biochemical metabolites in potato leaves. *Pathogens*, 9(3), 170.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6), 414-421.
- Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981, 22, 867–880.
- Nisar, M., Aqeel, M., Sattar, A., Sher, A., Ijaz, M., Ul-Allah, S., ... & Ali, M. (2022). Application of silicon coupled with sulfate improve the drought tolerance in sunflower via modulating the morpho-physiological and antioxidants defense mechanisms.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science*, 22(1), 53-65.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to

- high temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 81.
- Oyarburo, N. S., Machinandiarena, M. F., Feldman, M. L., Daleo, G. R., Andreu, A. B., & Olivieri, F. P. (2015). Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 88, 1-8.
- Pacini, E., & Dolferus, R. (2019). Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10, 679.
- Powell, N., Ji, X., Ravash, R., Edlington, J., & Dolferus, R. (2012). Yield stability for cereals in a changing climate. *Functional Plant Biology*, 39(7), 539-552.
- Prasad, P. V. V., Staggenborg, S. A., & Ristic, Z. (2008). Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: Understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*, 1, 301-355.
- Rajabi, A., Ehsanzadeh, P., & Razmjoo, J. (2019). Partial relief of drought-stressed fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in response to foliar-applied zinc. *Pedosphere*, 29(6), 752-763.
- Rattis, L., Brando, P. M., Macedo, M. N., Spera, S. A., Castanho, A. D., Marques, E. Q., ... & Coe, M. T. (2021). Climatic limit for agriculture in Brazil. *Nature Climate Change*, 11(12), 1098-1104.
- Renaudin, J. P., Deluche, C., Cheniclet, C., Chevalier, C., & Frangne, N. (2017). Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp. *Journal of Experimental Botany*, 68(7), 1613-1623.
- Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., & Sage, R. F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research*, 182, 30-42.
- Salama, Z. A., El-Fouly, M. M., Lazova, G., & Popova, L. P. (2006). Carboxylating enzymes and carbonic anhydrase functions were suppressed by zinc deficiency in maize and chickpea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28, 445-451.
- Santos, T. B., Ribas, A. F., de Souza, S. G. H., Budzinski, I. G. F., & Domingues, D. S. (2022). Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review. *Stresses*, 2(1), 113-135.
- Sarwar, M., Saleem, M. F., Ullah, N., Ali, S., Rizwan, M., Shahid, M. R., ... & Ahmad, P. (2019). Role of mineral nutrition in alleviation of heat stress in cotton plants grown in glasshouse and field conditions. *Scientific reports*, 9(1), 13022.
- Scafaro, A. P., Posch, B. C., Evans, J. R., Farquhar, G. D., & Atkin, O. K. (2023). Rubisco

- deactivation and chloroplast electron transport rates co-limit photosynthesis above optimal leaf temperature in terrestrial plants. *Nature Communications*, 14(1), 2820.
- Sedaghat, M., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Emam, Y., & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2017). Physiological and antioxidant responses of winter wheat cultivars to strigolactone and salicylic acid in drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 59-69.
- Sehgal, A., Sita, K., & Nayyar, H. (2016). Heat stress in plants: sensing and defense mechanisms. *The Journal of Plant Science Research*, 32(2), 195.
- Shabnam, N., Tripathi, I., Sharmila, P., & Pardha-Saradhi, P. A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. *Protoplasma*, 2016, 253, 1577-1582.
- Shivakrishna, P., Reddy, K. A., & Rao, D. M. (2018). Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi journal of biological sciences*, 25(2), 285-289.
- Szymańska, R., Ślesak, I., Orzechowska, A., & Kruk, J. (2017). Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 165-177.
- Tariq, A., Pan, K., Olatunji, O. A., Graciano, C., Li, Z., Sun, F., ... & Zhang, A. (2018). Phosphorous fertilization alleviates drought effects on *Alnus cremastogyne* by regulating its antioxidant and osmotic potential. *Scientific reports*, 8(1), 5644.
- Toscano, S., Gómez-Bellot, M. J., Romano, D., & Sánchez-Blanco, M. J. (2023). Physiological and biochemical changes in response to *Moringa oleifera* biostimulant in petunia plants under water deficit. *Scientia Horticulturae*, 319, 112187.
- Trejo-Téllez, L. I., & Gómez-Merino, F. C. (2018). Phosphite as an inductor of adaptive responses to stress and stimulator of better plant performance. *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, 203-238.
- Vazin, F. (2012). Effect of zinc sulfate on quantitative and qualitative characteristics of corn (*Zea mays*) in drought stress. *Cercetări Agronomice în Moldova* 45 (3): 16-24
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
- Wang C., Ge W., Yin H., Zhang Y., Li J. (2024). MicroRNAs and their targets involved in unreduced pollen formation induced by heat stress in *Camellia nitidissima*. *Scientia Horticulturae*, 323(1) 112462.
- Wang, J. Z., Cui, L. J., & Wang, Y. Li JI (2009) Growth, lipid peroxidation and photosynthesis in two tall fescue cultivars differing in heat tolerance. *Biologia*

- Plantarum, 53, 247-242.
- Wang, X., Wu, Z., Zhou, Q., Wang, X., Song, S., & Dong, S. (2022). Physiological response of soybean plants to water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 12, 809692.
- Xi, Y., Han, X., Zhang, Z., Joshi, J., Borza, T., Aqa, M. M., ... & Wang-Pruski, G. (2020). Exogenous phosphite application alleviates the adverse effects of heat stress and improves thermotolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) seedlings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 190, 110048.
- Yang, F., Liu, Y., Zhang, X., Liu, X., Wang, G., Jing, X., ... & You, C. X. (2023). Oxidative post-translational modification of catalase confers salt stress acclimatization by regulating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis in *Malus hupehensis*. *Journal of Plant Physiology*, 154037.
- Zafar, S., Nasri, M., Moghadam, H. R. T., & Zahedi, H. (2014). Effect of zinc and sulfur foliar applications on physiological characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water deficit stress. *International Journal of Biosciences*, 5(12), 87-96.
- Zafar, S., Nasri, M., Moghadam, H. R. T., & Zahedi, H. (2014). Effect of zinc and sulfur foliar applications on physiological characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under water deficit stress. *International Journal of Biosciences*, 5(12), 87-96.
- Zahoor, R., Zhao, W., Abid, M., Dong, H., & Zhou, Z. (2017). Potassium application regulates nitrogen metabolism and osmotic adjustment in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) functional leaf under drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 215, 30-38.
- Zahra, N., Hafeez, M. B., Ghaffar, A., Kausar, A., Al Zeidi, M., Siddique, K. H., & Farooq, M. (2023). Plant photosynthesis under heat stress: Effects and management. *Environmental and Experimental Botany*, 206, 105178.
- Zhou, L., Xu, H., Mischke, S., Meinhardt, L. W., Zhang, D., Zhu, X., ... & Fang, W. (2014). Exogenous abscisic acid significantly affects proteome in tea plant (*Camellia sinensis*) exposed to drought stress. *Horticulture Research*, 1.



## 5. Conclusão geral

A pulverização de compostos como o fosfito de potássio, o sulfato de zinco e o doador de sulfeto de hidrogênio e o hidrossulfeto de sódio desempenha papel significativo na mitigação dos efeitos adversos causados pelo estresse hídrico e térmico em plantas de girassol. Esses aliviadores atuam diretamente nos processos fisiológicos relacionados às respostas antioxidantes e à manutenção de água nos tecidos foliares, com destaque para o aumento da prolina como uma estratégia de ajustamento osmótico, que foi incrementada em função da aplicação dos aliviadores. É importante destacar que, embora esses aliviadores tenham sido eficazes na redução dos efeitos dos estresses, eles não foram capazes de proporcionar significativo alívio nos processos fotossintéticos, especialmente em condições de estresse combinado. No entanto, ficou evidente que, sob condições de déficit hídrico isolado, as plantas conseguiram manter uma taxa de fotossíntese relativamente estável em comparação com condições ideais. Os resultados enfatizam o potencial da aplicação de sulfato de zinco para mitigar o impacto do déficit hídrico e térmico, bem como de sua combinação, em plantas de girassol. Além disso, denota a importância de conduzir experimentos em campo para validar os resultados obtidos em condições controladas de laboratório. Essas descobertas contribuem significativamente para o entendimento dos mecanismos de resposta das plantas de girassol a estresses ambientais e indicam a possibilidade de desenvolver estratégias eficazes para aumentar a tolerância dessas plantas, quando cultivadas sob condições ambientais adversas.