



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA**

**BACHARELADO EM AGRONOMIA**

**RAFAEL MATEUS ALVES**

**DANOS OXIDATIVOS ASSOCIADOS A ESTRESSES ABIÓTICOS DURANTE  
A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE  
MILHO**

**SERRA TALHADA  
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA**  
**BACHARELADO EM AGRONOMIA**

**DANOS OXIDATIVOS ASSOCIADOS A ESTRESSES ABIÓTICOS DURANTE  
A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE  
MILHO**

**RAFAEL MATEUS ALVES**

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia  
da Universidade Federal Rural de Pernambuco –  
Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como  
requisito básico para conclusão do curso.

**Orientadora:** Monalisa Alves Diniz da Silva

**SERRA TALHADA**  
**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A474d      Alves , Rafael Mateus  
              Danos oxidativos associados a estresses abióticos durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho  
              / Rafael Mateus Alves . - 2019.  
              49 f. : il.
- Orientadora: Monalisa Alves Diniz da Silva.  
              Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em  
              Agronomia, Serra Talhada, 2019.
1. Estresse salino. 2. Toxidez por Alumínio. 3. Potencial fisiológico . I. Silva, Monalisa Alves Diniz da, orient. II.  
              Título

**RAFAEL MATEUS ALVES**

**DANOS OXIDATIVOS ASSOCIADOS A ESTRESSES ABIÓTICOS DURANTE  
A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE  
MILHO**

Monografia apresentada ao Curso de  
Agronomia da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra  
Talhada, como requisito básico para conclusão  
do curso.

**APROVADA em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_**

---

**Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva**  
(UFRPE - UAST)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Honorato de Almeida**  
(UFRPE - UAST)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monalisa Alves Diniz da Silva**  
**Orientadora**

**SERRA TALHADA  
PERNAMBUCO – BRASIL**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais,

Josefa de Lima Alves e Enoc Alves Neto (*in memorian*), que estiveram sempre ao meu lado, minha mãe fisicamente, me transmitindo os verdadeiros valores da vida e o meu pai espiritualmente, me dando discernimento e me protegendo.

A minha tia e segunda mãe, Avaneide de Lima, por ter me dado todo o apoio durante a graduação, permitindo a realização desse sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, por TUDO, por me guiar em todo o caminho, me dando força e fé para superar os obstáculos.

Aos meus Familiares por todo apoio e incentivo durante a graduação.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), pela oportunidade da formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À minha professora orientadora Monalisa Alves Diniz da Silva, por toda compreensão e dedicação na orientação nesses últimos anos, pelos ensinamentos passados e momentos de conversas, que tiveram grande contribuição a minha formação pessoal e profissional. Obrigado pela confiança e orientação deste trabalho. Agradeço também aos amigos do Núcleo de Estudos Sementes do Semiárido (NESS), que me auxiliaram durante toda realização desse trabalho (Elania Freire, Anna Beatriz, Robson Alves, Liliane Silva, Débora Purcina) e de outros trabalhos, em especial a Joyce Naiara da Silva, que me ensinou e ajudou muito na elaboração, avaliação e escrita de trabalhos da área de sementes.

Ao Professor Adriano do Nascimento Simões pelo apoio e orientação no início do curso, esses momentos iniciais no desenvolvimento de trabalhos me despertaram grande interesse pela pesquisa. Agradeço também ao Núcleo de Estudos em Fisiologia e Pós-colheita (NEFP), que me presenteou com três grandes amigas, Maria Aparecida (Cidinha), Rúbia Maia e Samara Lopes, que sempre estiveram do meu lado, aconselhando e ajudando da melhor forma possível, espero levar essa amizade pra toda vida.

Aos demais professores do curso de Agronomia da Unidade Acadêmica de Serra Talhada que contribuíram para realização deste sonho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Honorato de Almeida pelas contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante a graduação (Bruna Santos, Eduardo Vítor, Edjane Lima, Elania Freire, Michelle Ferreira, Rosemeire Costa, Sidney Anderson e Suelyson Cordeiro), por toda cumplicidade e afeto. Agradeço em especial a Elania e Sidney, por serem meus fies amigos e companheiros de todas as horas, obrigado por todos os momentos vividos juntos, espero levar vocês comigo para sempre.

Aos técnicos do laboratório de química (Danilo e Felipe) e do laboratório de Biologia (Nádia, Priscila e Suzana) pela ajuda no trabalho e pelo bom convívio.

Aos funcionários que fazem a Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

Aos amigos que fiz na Universidade e fora dela, Gabriela Queiroz, Micaelle Mourato, Jussara Amorim, Ana Cláudia, Gabriel Novaes, Alexandre Maniçoba, Marcela Albuquerque, Pedro Hermínio, Abigail Jaynara, Mailza Gonçalves, Jéssica Siqueira, Gabriela Souza, dentre outros, que ajudaram de forma direta ou indireta na realização desse sonho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 Milho roxo .....	16
2.2 Estresses abióticos durante a germinação .....	17
2.2.1 Estresse por salinidade.....	17
2.2.2 Estresse por toxidez ao alumínio .....	17
2.3 Efeito dos Estresses Abióticos.....	18
3. OBJETIVOS .....	19
3.1 Objetivo geral .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 Obtenção das Sementes .....	20
4.2 Experimento 1: Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse salino em diferentes temperaturas .....	20
4.3 Experimento 2: Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse por toxidez ao alumínio em diferentes temperaturas.....	21
4.4 Avaliações.....	22
4.4.1 Teor de água .....	22
4.4.2 Teste Padrão de Germinação .....	22
4.4.3 Comprimento de plântulas .....	23
4.4.4 Massa Seca de plântulas .....	23
4.5 Indicadores de danos oxidativos .....	23



4.5.1 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos .....	23
4.5.2 Peroxidação de lipídeos (TBARS).....	24
5. Delineamento experimental .....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÕES .....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
9 ANEXOS .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentrações, quantidades, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico das soluções de cloreto de sódio, utilizadas na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas ao estresse salino, Serra Talhada – PE, UFRPE/UASt, 2019.....	21
<b>Tabela 2.</b> Conteúdo, Concentrações, quantidades, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico das soluções utilizadas na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas a toxidez por alumínio, Serra Talhada – PE, UFRPE/UASt, 2019.....	21

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentagem de germinação de sementes de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas. ....	26
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de germinação de sementes de milho roxo submetidas a diferentes temperaturas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ) .....	27
<b>Figura 3.</b> Comprimento da parte aérea (A) e do sistema radicular (B) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e temperaturas.....	28
<b>Figura 4.</b> Comprimento de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e temperaturas.....	28
<b>Figura 5.</b> Massa seca total – MST e da parte aérea – MSPA (A) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e massa seca do sistema radicular – MSSR (B) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e temperaturas.....	29
<b>Figura 6.</b> Massa seca total – MST, da parte aérea – MSPA e do sistema radicular – MSSR de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes temperaturas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ) .....	30
<b>Figura 7.</b> Conteúdo de clorofilas totais, a e b (A) e carotenoides totais (B) de folhas de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas.....	31
<b>Figura 8.</b> Peroxidação de lipídeos da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas.....	32
<b>Figura 9.</b> Comprimento de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio e temperaturas.....	33

- Figura 10.** Comprimento da parte aérea – CPA (A) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio e temperaturas; e comprimento do sistema radicular – CSR (B) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....34
- Figura 11.** Representação esquemática da ponta de uma raiz tolerante (A) e sensível (B) a toxidez por alumínio em função da liberação de ácidos orgânicos (Adaptado de SINGH et al., 2017) .....35
- Figura 12.** Massa seca total – MST, da parte aérea – MSPA e do sistema radicular – MSSR de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio (A) e temperaturas (B). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) .....35
- Figura 13.** Conteúdo de clorofilas totais, a e b (A) e carotenoides totais (B) de folhas de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....37
- Figura 14.** Peroxidação de lipídeos da parte aérea de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio (A) e temperaturas (B). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) .....38
- Figura 15.** Peroxidação de lipídeos do sistema radicular de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio e temperaturas.....38

ALVES, Rafael Mateus. Danos oxidativos associados a estresses abióticos durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho. 2019. 49p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.\*

## RESUMO

A contaminação dos solos por salinidade e metais pesados são fatores que limitam a produção agrícola, afetando a germinação das sementes e o desenvolvimento inicial das plântulas. O milho roxo destaca-se como uma importante fonte de pigmentos naturais, que podem ser utilizados para diversas finalidades industriais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de danos oxidativos associados a estresses abióticos durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo. O experimento foi conduzido na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada. Para cada experimento realizado o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (concentração x temperatura), com quatro repetições de 50 sementes (teste de germinação), quatro repetições de 20 sementes (teste de comprimento de plântula e massa seca) e três repetições de cinco plântulas normais, provenientes do teste de germinação (indicadores de danos oxidativos). Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação, comprimento e massa seca total, da parte aérea, do sistema radicular e indicadores de danos oxidativos (clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação de lipídeos) na fase de plântula. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR v. 5.6. e para a confecção dos gráficos, utilizou-se o programa Sigma Plot 10.0. O aumento das concentrações salinas afetou a germinação, parâmetros de crescimento (comprimento e massa seca) e indicadores de danos oxidativos (clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação de lipídeos) de plântulas de milho roxo. A associação das diferentes concentrações salinas com a temperatura de 30°C proporcionou parâmetros de crescimento superiores, mesmo em condições de estresse salino. A utilização de diferentes concentrações de alumínio não interferiu na porcentagem de germinação de sementes de milho roxo, já os parâmetros de crescimento (comprimento e acúmulo de massa seca) e os indicadores de danos oxidativos (clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação de lipídeos) de plântulas de milho roxo sofreram redução com o aumento das concentrações de alumínio. A associação das diferentes concentrações de alumínio com a temperatura de 25°C indicou que o crescimento da parte aérea foi menos afetado com o aumento das concentrações. A temperatura de 30°C acarretou em um maior acúmulo de massa seca total, da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de milho roxo. Diante do exposto, a germinação, o desenvolvimento inicial de plântulas e os indicadores de danos oxidativos submetidas a concentrações de cloreto de sódio e o desenvolvimento inicial de plântulas e os indicadores de danos oxidativos submetidas a concentrações de alumínio são eficientes para avaliar o desempenho fisiológico de plântulas de milho roxo.

**Palavras-chave:** Estresse salino, toxidez por Alumínio, potencial fisiológico.

\*Comitê Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monalisa Alves Diniz da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

ALVES, Rafael Mateus. Oxidative damage associated with abiotic stress during germination and initial development of maize seedlings. 2019. 49p. Monograph (Graduation in Agronomy) - Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.\*

## ABSTRACT

Soil contamination by salinity and heavy metals are factors that limit agricultural production, affecting seed germination and initial seedling development. Purple corn stands out as an important source of natural pigments, which can be used for various industrial purposes. In view of the above, the objective of this study was to evaluate the effect of oxidative damage associated with abiotic stress during germination and the initial development of purple corn seedlings. The experiment was conducted at the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada Academic Unit. For each experiment, the design used was the entirely randomized 5x2 factor scheme (concentration x temperature), with four repetitions of 50 seeds (germination test), four repetitions of 20 seeds (seedling length and dry mass test) and three repetitions of five normal seedlings, from the germination test (indicators of oxidative damage). The parameters evaluated were germination percentage, length and total dry mass of the aerial part, root system and indicators of oxidative damage (total chlorophylls, a, b, total carotenoids and lipid peroxidation) in the seedling phase. All analyses were performed using the statistical software SISVAR v. 5.6 and the Sigma Plot 10.0 software was used to produce the graphs. The increase in saline concentrations affected germination, growth parameters (length and dry mass) and indicators of oxidative damage (total chlorophylls, a, b, total carotenoids and lipid peroxidation) of purple corn seedlings. The association of the different saline concentrations with the temperature of 30°C provided superior growth parameters, even in conditions of saline stress. The use of different aluminum concentrations did not interfere in the germination percentage of purple corn seeds, while the growth parameters (length and dry mass accumulation) and the indicators of oxidative damage (total chlorophylls, a, b, total carotenoids and lipid peroxidation) of purple corn seedlings were reduced with the increase in aluminum concentrations. The association of the different aluminum concentrations with a temperature of 25°C indicated that the growth of the aerial part was less affected with the increase in concentrations. A temperature of 30°C resulted in a greater accumulation of total dry mass, of the aerial part and of the root system of purple corn seedlings. In view of the above, germination, initial seedling development and indicators of oxidative damage subjected to sodium chloride concentrations and initial seedling development and indicators of oxidative damage subjected to aluminum concentrations are efficient to evaluate the physiological performance of purple corn seedlings.

**KEYWORDS:** Saline stress, aluminum toxicity, physiological potential.

\*Advisor Committee: Prof. Dr. Monalisa Alves Diniz da Silva - Federal University Rural of Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais de maior importância na economia mundial, que se caracteriza pelas diferentes formas de utilização, que vai desde a alimentação humana, animal até a sua utilização na indústria. Existem grãos de milho com diferentes colorações, entre as quais se destaca o milho roxo que é uma variedade que apresenta essa coloração em função da alta concentração de antocianinas (ZHANG et al., 2013).

As antocianinas são usadas como corantes alimentares principalmente na indústria de bebidas e alimentos. Atualmente existe uma preocupação dos consumidores e fabricantes na utilização de corantes alimentares artificiais, os mesmos buscam alimentos à base de corantes provenientes de fontes naturais (LAO; SIGURDSON; GIUSTI, 2017). Na América do Sul, extratos de milho roxo são amplamente utilizados em sobremesas caseiras e bebidas como *chicha morada*, uma bebida popular e sobremesa peruana, preparada a partir do milho roxo (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2013).

A produção de alimentos está diretamente ligada a diferentes fatores, entre eles as mudanças climáticas e estresses abióticos (RUGGIERO et al., 2017). Uma situação preocupante do melhoramento vegetal, visando obter cultivares mais produtivas e uniformes, é a diminuição da biodiversidade agrícola que tem levado a uma redução na tolerância aos estresses abióticos, devido à perda de características genômicas específicas durante a domesticação (DWIVEDI et al., 2016).

Existe a necessidade de estudar materiais genéticos mais rústicos, com maior variabilidade genética, para que os mesmos possam servir como fonte de germoplasma para as variedades modernas. O milho crioulo, cultivado por comunidades tradicionais, apresenta ampla variabilidade genética, sendo adaptado à região onde é cultivado há várias gerações. São capazes de suportar os estresses abióticos e bióticos, permitindo que o agricultor produza sua própria semente (ROMANO et al., 2007).

O crescimento das plantas é afetado por uma série de fatores abióticos que causam estresse, tais como, salinidade do solo, toxicidade por metais pesados, e temperaturas (MOHAMMADI, 2012). A produção do milho está diretamente associada às condições do meio no qual é produzido, fatores ambientais interferem diretamente nessa produção. A salinidade é um dos fatores que não só prejudica o desenvolvimento

das culturas como também a estrutura física do solo, comprometendo a composição química, afetando diretamente a disponibilidade de nutrientes (HOGARTH, 2015).

A acidez do solo é outro fator limitante para a produtividade das culturas em várias partes do mundo, sendo que no Brasil a maioria dos solos apresenta altos teores de alumínio (SORATTO et al., 2005). Esses problemas são verificados principalmente em terras agrícolas, devido aos efeitos da salinidade e da acidez no solo refletirem diretamente no desempenho das culturas, prejudicando a germinação e consequentemente o desenvolvimento do vegetal, causando declínio na produtividade agrícola (NOURI et al., 2017).

Segundo Andréo-Souza et al. (2010), a alta concentração de sais é um fator de estresse para as plantas, pois reduz o potencial osmótico proporcionando a ação dos íons sobre o protoplasma das células. Solos salinos são comuns em áreas de produção, pois o uso da água de baixa qualidade para irrigação e a aplicação de quantidades superiores de fertilizantes são as principais causas para o problema do aumento da salinidade do solo (GHEYI et al., 2016). Alguns dos principais efeitos das altas concentrações de sais no solo são: redução na porcentagem da germinação, baixa velocidade de germinação, redução do crescimento da raiz primária, decréscimo do crescimento das plântulas e aumento do tempo médio de germinação (PELEGRINI et al., 2013). Esses comportamentos são verificados em função da diminuição do potencial hídrico do solo, reduzindo o gradiente de potencial entre o solo e a superfície da semente, restringindo a captação de água pela semente, e consequentemente reduzindo as taxas de germinação (LOPES; MACEDO, 2008).

A alta acidez dos solos do Brasil tem sido considerada um grande problema, sendo facilmente encontrada em regiões produtoras de grãos, principalmente no sul do país. Além disso, quando está associada à presença de metais tóxicos, como é o caso do alumínio, é considerada uma das maiores restrições da produção agrícola (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001). A alta concentração de alumínio no solo segundo Ferreira; Moreira; Rassini (2006), é um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando principalmente na redução da germinação e da taxa de crescimento do sistema radicular, o que afeta o alongamento das raízes e a divisão celular, diminuindo assim o seu poder de absorção de água e nutrientes do solo.

Os estresses abióticos, como salinidade e toxidez por alumínio, afetam adversamente o crescimento das plantas, proporcionando uma ampla gama de respostas,



incluindo morfológicas, fisiológicas, alterações bioquímicas e moleculares (ZANDALINAS et al., 2017). Dessa forma, há a necessidade do estudo do processo germinativo e do desenvolvimento inicial de plântulas de culturas sob condições de estresses, visando tanto o uso das mesmas como fonte de germoplasma em programas de melhoramento genético, como o seu emprego no fornecimento de compostos bioativos, como é o caso do milho roxo, que possam ser empregados nos setores da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Milho roxo**

O milho roxo (*Zea mays* L.), pertencente à família Poaceae, é uma variedade nativa da região dos Andes, especificamente do Peru, destaca-se por apresentar em suas sementes uma das mais profundas cores roxas encontradas no reino vegetal, sendo amplamente cultivada e consumida em toda a região Andina da América do Sul, principalmente no Peru, Equador, Bolívia e Argentina (LAO; SIGURDSON; GIUSTI, 2017)

O endosperma da cariopse do milho roxo apresenta cianidina-3-glucosídeo, que é uma antocianina utilizada como corante natural, que tem demonstrado propriedades antioxidantes (HARAKOTR et al., 2014), anticancerígenas (FUKAMACHI et al., 2008), antimutagênicas, anti-proliferativas (PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006) e antidiabéticas (THIRAPHATTHANAVONG et al., 2014). Também há relatos associados com o potencial dessa antocianina para reduzir o risco de doenças cardiovasculares, obesidade e doenças crônicas (HE; GIUSTI, 2010).

O sabugo do milho roxo também contém grande quantidade de antocianinas, incluindo a cianidina-3-glucosídeo, pelagonidin-3-glucosídeo e peonidin-3-glucosídeo (YANG; ZHAI, 2010), também apresenta ácido protocatecúico, hidroxibenzoico, vanílico, cafeílico, p-camárico e ferúlico (HARAKOTR et al., 2014). Ainda produzido em baixa escala no Semiárido brasileiro, o milho roxo apresenta características que podem ser utilizadas para desencadear o aumento da produção dessa cultura por produtores locais com a finalidade de utilização nos diversos segmentos industriais, principalmente o alimentício.

## **2.2 Estresses abióticos durante a germinação**

### **2.2.1 Estresse por salinidade**

A semente é o insumo agrícola mais importante, pois a partir dela se determina o estande de plantas e consequentemente a produtividade. A germinação da semente é considerada como sendo o primeiro passo da vida de uma planta, sendo um dos processos fisiológicos mais sensíveis, afetada por interações hormonais e fatores ambientais, tanto bióticos quanto abióticos (MADEJÓN et al., 2015).

Os solos são naturalmente compostos por vários elementos, entre eles os sais e metais pesados. Os efeitos da salinidade sobre a germinação podem ser notados tanto pela interferência dos sais no metabolismo celular, como pela redução do potencial osmótico da semente, causando estresse hídrico. Segundo Moraes et al. (2007), a salinidade pode ainda causar injúrias, como por exemplo degradação das clorofilas e alterações no metabolismo de proteínas e nos teores de aminoácidos, devido ao estresse iônico decorrente da alteração na concentração de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no protoplasma.

Nas sementes, a salinidade afeta a porcentagem de germinação e os caracteres ligados ao vigor, afetando o estabelecimento de plântulas, reduzindo a velocidade de emergência, a uniformidade, a emergência total, o tamanho inicial e o estabelecimento do estande, influenciando no acúmulo de massa seca e afetando a produtividade (SCHEEREN et al., 2010). As sementes em contato com o substrato salino dão início ao processo de embebição e consequentemente a entrada de íons, especialmente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , suficientes para provocarem a toxicidade sobre o embrião e/ou células da membrana do endosperma (DUTRA et al., 2017).

### **2.2.2 Estresse por toxidez ao alumínio**

Em solos com influência antropogênica, as fontes de adição de metais pesados correspondem as emissões atmosféricas provenientes de indústrias metalúrgicas, fábricas de fertilizantes, combustão de carvão, combustíveis fósseis, mineração e incineradores, além da aplicação direta no solo de biossólidos, dejetos de animais, compostos de resíduos urbanos, fertilizantes e corretivos agrícolas, defensivos e outros produtos utilizados na agricultura (TIECHER, 2014). Estes materiais contribuem com quantidades variáveis para a entrada de metais pesados no ambiente.

O alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) apesar de ser um dos elementos mais abundantes, o terceiro elemento depois do oxigênio e sílica no meio ambiente, configurando 8,8 % na crosta

terrestre, está presente em reduzidas quantidades nos seres vivos (ROSALINO, 2011). Em solos ácidos e com elevados teores de  $Al^{3+}$ , a toxicidade de  $Al^{3+}$  é o fator mais limitante à produtividade agrícola (DEL GUERCIO; CAMARGO, 2011). A presença de alumínio no solo causa problemas em torno de 30-40% das terras cultiváveis do planeta, acarretando em solos ácidos, ele torna-se solúvel, sendo absorvido pelas raízes e inibindo o crescimento das plantas (SILVA, 2007).

A presença do alumínio é considerada um dos mais importantes problemas de toxicidade por metais em solos ácidos com pH abaixo de 5,5, pois o mesmo possui efeito tóxico que age diretamente sobre o metabolismo vegetal, sendo um fator que limita o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de reduzir a capacidade de absorção de água e nutrientes por parte das raízes das plantas (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001). A absorção de metais pesados como o alumínio ( $Al^{3+}$ ) pela célula vegetal pode levar à acumulação de EROs (espécies reativas do oxigênio), inibição da fotossíntese, desorganização da estrutura de membranas e homeostase iônica, inibição de reações enzimáticas e ativação da morte celular programada (MCP) (TAIZ et al., 2017).

### **2.3 Efeito dos Estresses Abióticos**

As plantas respondem aos desafios ambientais alterando o seu metabolismo celular e acionando vários mecanismos de defesa. As principais fontes de EROs (espécies reativas do oxigênio) incluem as EROs produzidas na atividade metabólica e as EROs para efeito de sinalização, como parte da rede de transdução de sinal de resposta a estresses abióticos (MILLER et al., 2010). De maneira geral, as EROs produzidas podem afetar negativamente muitos processos na planta, por exemplo, inibição da expressão de genes e indução do estresse oxidativo (SCHLICKE et al., 2014).

Em condições normais, cerca de 1 a 2% do  $O_2$  consumido pela planta é convertido em EROs, entretanto, à medida que são geradas há a eliminação por um conjunto de enzimas do sistema antioxidante de resposta, sendo assim incapazes de causar algum tipo de dano as células (FOYER; NOCTOR, 2005). Entretanto, o aumento excessivo na concentração das EROs nas células pode levar a danos nas membranas a partir da peroxidação lipídica, da degradação de proteínas e também das moléculas de DNA e RNA, oxidação de carboidratos, degradação de pigmentos e um

comprometimento da atividade enzimática (MITTLER, 2002). Isso pode resultar em uma destruição oxidativa da célula, num processo denominado estresse oxidativo (CHOUDHURY et al., 2017).

O excesso de sais e de metais pesados promovem estresse oxidativo, causando alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas como, diminuição do teor relativo de água na folha, redução dos pigmentos fotossintéticos e aumento no teor de MDA (malondialdeído) (KAUSHAL; WANI, 2016). Além de comprometer as atividades fisiológicas normais da célula, podendo induzir uma produção excessiva de EROs. As principais EROs produzidas são: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FANG; XIONG, 2015).

Estudos recentes mostram que as EROs não são responsáveis somente por ações deletérias às plantas (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014), mas podem agir como moléculas de sinalização, que transmitem respostas ambientais, prevenindo as plantas de diversos estresses (SEWELAM; KAZAN; SCHENK, 2016). Assim, algumas EROs podem ser benéficas e coordenar o crescimento normal e a aclimação aos estresses, a depender de sua concentração e natureza reativa (CARMODY et al., 2016). Diferentes estudos apontam o papel central do  $H_2O_2$  nas vias de sinalização melhorando as respostas das plantas em condições de salinidade (BAGHERI; GHOLAMI; BANINASAB, 2019) e metais pesados (HASANUZZAMAN et al., 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de danos oxidativos associados a estresses abióticos durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do estresse salino associado a diferentes temperaturas sobre a germinação das sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo, por meio do processo germinativo, crescimento de plântulas e indicadores de danos oxidativos (peroxidação de lipídeos, clorofilas totais, *a*, *b* e carotenoides totais).

- Avaliar o efeito da toxidez por alumínio associado a diferentes temperaturas sobre a germinação das sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo, por meio do processo germinativo, crescimento de plântulas e indicadores de danos oxidativos (peroxidação de lipídeos, clorofilas totais, *a*, *b* e carotenoides totais).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia e do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Serra Talhada.

##### **4.1 Obtenção das Sementes**

As sementes de milho roxo foram obtidas por meio de doação de um produtor rural residente no sítio Sabino, Distrito de Tupanaci da cidade de Mirandiba – Pernambuco. As sementes foram provenientes da safra de 2018 e estavam armazenadas até o momento da instalação dos experimentos em garrafas PET em condição ambiente.

##### **4.2 Experimento 1: Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse salino em diferentes temperaturas**

No primeiro experimento as sementes foram submetidas aos testes de germinação e de crescimento de plântulas, sob condições de estresse salino, sendo conduzidos nas temperaturas de 25 e 30°C. O papel de germinação foi umedecido com soluções de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações de 0 – controle; 25; 50; 75 e 100 mM (Tabela 1).

**Tabela 1** - Concentrações, quantidades, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico das soluções de cloreto de sódio, utilizadas na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas ao estresse salino, Serra Talhada – PE, UFRPE/UAST, 2019.

Concentração de NaCl (mM)	Quantidade de NaCl (g L <sup>-1</sup> )	Condutividade Elétrica (dS m <sup>-1</sup> )	Potencial hidrogeniônico (pH)
0	0	0,00263	7,4
25	1,461	2,21	7,66
50	2,922	4,14	7,45
75	4,383	6,10	7,38
100	5,844	8,02	7,05

#### 4.3 Experimento 2: Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse por toxidez ao alumínio em diferentes temperaturas

No segundo experimento as sementes foram submetidas aos testes de germinação e de crescimento de plântulas, sob condições de estresse por toxidez ao alumínio, sendo conduzidos nas temperaturas de 25 e 30°C. O papel de germinação foi umedecido com soluções de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O) nas concentrações de 0 – controle; 25; 50; 75 e 100 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Conteúdo, Concentrações, quantidades, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico das soluções utilizadas na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas a toxidez por alumínio, Serra Talhada – PE, UFRPE/UAST, 2019.

Conteúdo de AlCl <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de AlCl <sub>3</sub> (mM)	Quantidade de AlCl <sub>3</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Condutividade Elétrica (dS m <sup>-1</sup> )	Potencial hidrogeniônico (pH)
0	0	0	0,00263	7,4
25	9,65	0,025	0,04146	4,72
50	19,3	0,050	0,7040	4,43
75	28,95	0,075	0,9524	4,17
100	38,6	0,1	0,1217	4,10

Para os dois experimentos procedeu-se com as seguintes avaliações:

#### 4.4 Avaliações

##### 4.4.1 Teor de água

Previamente, as sementes foram avaliadas quanto ao seu teor de água inicial, por meio do método da estufa a  $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009). Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, os resultados foram expressos em porcentagem.

##### 4.4.2 Teste Padrão de Germinação

Para o teste padrão de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. As folhas de papel de germinação foram previamente umedecidas com quantidade de água destilada (controle), solução de cloreto de sódio ou cloreto de alumínio equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Primeiramente, as sementes foram desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por quatro minutos seguido de três lavagens com água destilada (BRASIL, 2009). Após esse procedimento, foram distribuídas sobre duas folhas de papel de germinação, após a semeadura as sementes foram cobertas por uma terceira folha e, logo após, cada repetição foi confeccionada em forma de rolo e colocada no interior de saco plástico transparente para preservar a umidade (BRASIL, 2009).

Os tratamentos foram mantidos em câmara de germinação tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) (Marconi MA 1402/546) por um período de sete dias em temperaturas de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com o fotoperíodo 12 horas. Foram realizadas contagens do número de plântulas normais como critério de germinação no sétimo dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

A porcentagem de Germinação (PG) foi calculada pelo somatório de plântulas normais dos experimentos, dividido pelo número total de sementes por repetição.

$$PG = \left( \frac{n}{N} \right) \times 100$$

Onde:

PG = porcentagem de germinação;

n = Sementes germinadas;

N = Total de sementes.

#### **4.4.3 Comprimento de plântulas**

As folhas de papel de germinação foram previamente umedecidas com quantidade de solução de cloreto de sódio ou cloreto de alumínio equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Após a desinfecção das sementes, descrita acima, foram distribuídas 20 sementes por repetição sobre duas folhas de papel de germinação, após a semeadura as sementes foram cobertas por uma terceira folha de papel de germinação e, logo após, foram confeccionados rolos e colocados no interior de sacos plásticos pretos, para que não ocorresse influência da luz no crescimento, preservando também a umidade. Após isso, foram mantidos em B.O.D, conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

Os tratamentos foram mantidos na B.O.D por um período de sete dias em temperaturas de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com o fotoperíodo 12 horas. As mensurações das plântulas normais ocorreram no sétimo dia após a semeadura.

O comprimento da parte aérea (CPA) foi avaliado com o auxílio de uma régua milimetrada, a partir do coleto até a extremidade da maior folha. Já para o comprimento do sistema radicular (CSR) a mensuração foi a partir do coleto até a extremidade da raiz, sendo os resultados médios expressos em  $\text{cm plântula}^{-1}$ .

#### **4.4.4 Massa Seca de plântulas**

Após a avaliação do comprimento todas as plântulas normais foram seccionadas na região do coleto para separar a parte aérea e o sistema radicular, e foi determinada a massa seca por meio de uma estufa de circulação forçada de ar por um período de 24 horas à  $80^{\circ}\text{C}$ . Determinando posteriormente a massa seca da parte aérea (MSPA), do sistema radicular (MSSR) e total (MST) de plântulas normais de milho roxo.

### **4.5 Indicadores de danos oxidativos**

#### **4.5.1 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos**

Para a determinação do conteúdo de clorofilas foi pesado 0,1 grama de massa fresca de folhas, que foi colocado em tubos de ensaios identificados e a clorofila foi extraída adicionando 5 mL de acetona (80% v/v). Os tubos foram hermeticamente fechados, cobertos com lâmina de alumínio e mantidos sob refrigeração por 48h. Após esse período foram realizadas leituras em espectrofotômetro, no Laboratório do Programa de Produção Vegetal da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, nos



comprimentos de onda de 645; 652 e 663 nm para determinação de clorofilas (ARNON, 1949) e no comprimento de onda de 470 nm (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001) para determinação de carotenoides totais. As concentrações de clorofilas e carotenoides foram estimadas pelas seguintes equações.

Os conteúdos de clorofilas e carotenoides foram expressos em mg. g<sup>-1</sup> MF.

$$\text{Clorofila a} = \frac{(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645})}{(1000 \times W) \times V}$$

$$\text{Clorofila b} = \frac{(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663})}{(1000 \times W) \times V}$$

$$\text{Clorofilas totais} = \frac{((A_{652} \times 1000)/(34,5))}{(V/1000 \times W)}$$

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{(1000A_{470} - 1.82Ca - 85.02Cb)/198}{(1000 \times W) \times V}$$

Onde:

A = absorbância;

V = volume final do extrato (5 ml);

W = peso em gramas;

Ca = Clorofila a;

Cb = Clorofila b.

#### 4.5.2 Peroxidação de lipídeos (TBARS)

A peroxidação de lipídeos foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme Heath; Packer (1968). Foram realizadas análises da parte aérea e raiz de plântulas normais, sendo utilizado 0,1 grama do material vegetal por repetição, que foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido, seguido da adição de ácido tricloroacético (TCA) 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 min em temperatura de 4 °C. Em seguida 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 2,0 mL da solução TCA 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) e aquecida em banho maria a 95°C em tubos hermeticamente fechados durante 1 hora. Em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo, e foram realizadas leituras a 532 e 660 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> após a subtração da absorbância obtida a 660 nm daquela a 532 nm.

## **5. Delineamento experimental**

Para cada experimento o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2 (concentrações x temperaturas), com quatro repetições de 50 sementes (Testes de Germinação), quatro repetições de 20 sementes (Testes de comprimento de plântula e massa seca) e três repetições de 5 plântulas normais, provenientes do teste de germinação (indicadores de danos oxidativos). Posteriormente, foi realizada análise de variância pelo teste F ( $p < 0,05$ ), quando verificado o efeito significativo da interação na análise de variância, os tratamentos foram submetidos à análise de regressão. Na ausência de interação significativa, as médias das variáveis provenientes das temperaturas foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e as médias das concentrações foram avaliadas por análise de regressão. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SISVAR v. 5.6 (FERREIRA, 2011) e para a confecção dos gráficos, utilizou-se o programa Sigma Plot 10.0.

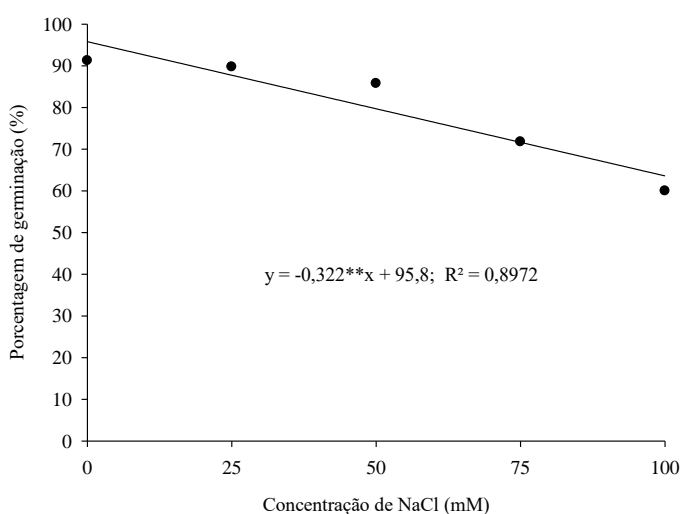
## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse salino em diferentes temperaturas**

De acordo com a análise de variância foi possível observar diferenças significativas para as concentrações salinas para todas as variáveis estudadas, já em relação ao efeito da temperatura, apenas a variável comprimento do sistema radicular – CSR não apresentou diferença significativa, enquanto que estudando a interação entre as concentrações salinas e temperaturas, as variáveis porcentagem de germinação – PG, massa seca da parte aérea – MSPA e massa seca total – MST não apresentaram diferença significativa (Anexo 1). O teor médio de água das sementes no momento da instalação dos experimentos foi de 11,76%. É de suma importância avaliar o teor de água de lotes de sementes que estavam armazenadas, uma vez que valores elevados durante o armazenamento aceleram o processo de deterioração, diminuindo o processo germinativo das sementes. Segundo Marcos Filho (2005) o teor médio de água para sementes ortodoxas durante o armazenamento deve ser em torno de 10-12%.

A germinação das sementes de milho roxo reduziu à medida que se aumentou as concentrações salinas, sendo que as menores porcentagem de germinação foram observadas nas concentrações de 75 e 100 mM (Figura 1). A germinação e a emergência de plântulas são os estágios mais críticos durante o ciclo de vida das plantas, que

determinam o uso eficiente dos nutrientes e recursos hídricos disponíveis para as plantas, a água de irrigação e a salinidade do solo estão entre os estresses ambientais mais graves e afetam a germinação e emergência em áreas áridas e semiáridas (ABIDO; ZSOMBIK, 2018). A salinidade reduz a germinação de sementes de milho, devido aos efeitos tóxicos e ao aumento dos danos oxidativos às células das plantas, provenientes de espécies reativas de oxigênio, e inibição osmótica da absorção de água em função de íons tóxicos (AZEVEDO NETO et al., 2004).

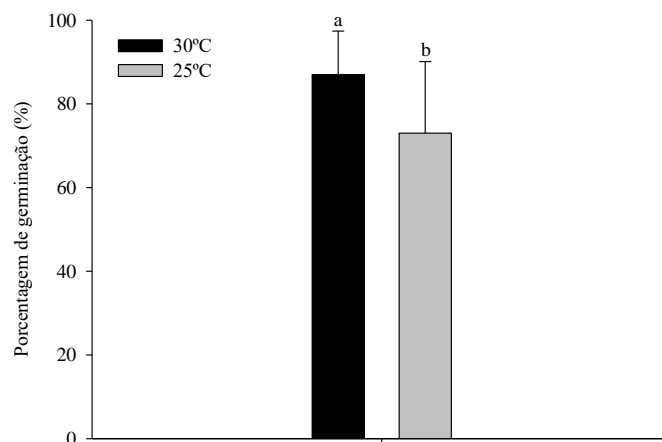


**Figura 1.** Porcentagem de germinação de sementes de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas.

A temperatura é outro dos principais fatores que interferem no processo germinativo das sementes, sendo que cada espécie possui uma faixa ideal para desencadear o processo germinativo. Verifica-se que as temperaturas de 25 e 30°C apresentaram diferença significativa quanto a germinação das sementes de milho roxo, sendo que a temperatura de 30°C acarretou em uma maior porcentagem de germinação (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Deng et al. (2015) estudando a germinação de sementes de milho branco, amarelo, vermelho e roxo nas temperaturas de 15; 30 e 40°C, sendo que os autores constataram que a melhor temperatura para germinação das sementes das diferentes colorações foi a de 30°C, ainda destacaram que o milho com coloração roxa teve a germinação superior aos das demais colorações estudadas, quando submetido a temperatura de 40°C.

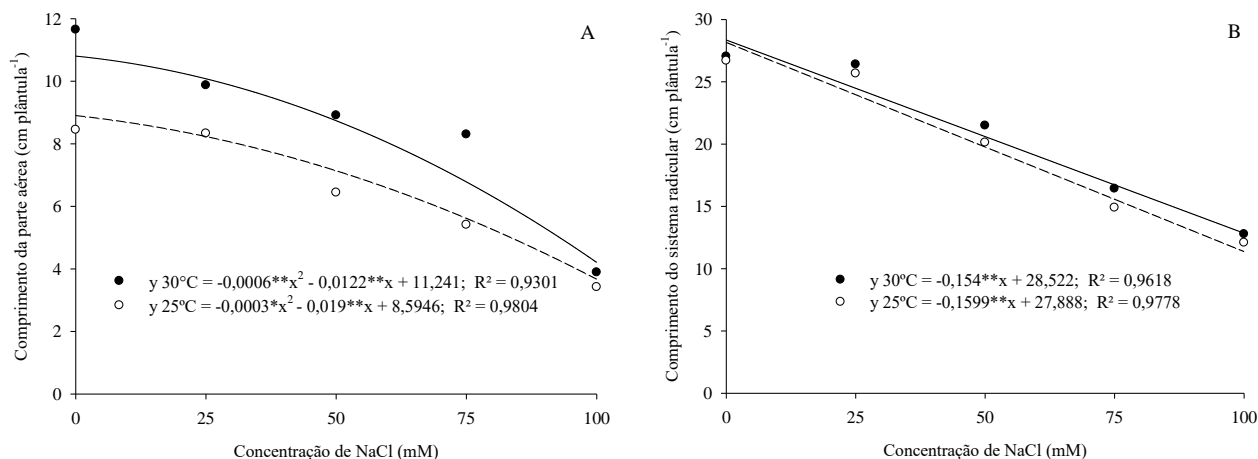
A diminuição da temperatura promove uma menor velocidade das atividades bioquímicas e fisiológicas envolvidas no metabolismo das células que atuam no

processo germinativo das sementes. Carvalho; Nakagawa (2012) ressaltam que em temperaturas mais elevadas a velocidade de absorção de água e das reações químicas é maior, o que justifica as sementes germinarem mais rapidamente quando submetidas a maiores níveis de temperatura até um limite aceitável.



**Figura 2.** Porcentagem de germinação de sementes de milho roxo submetidas a diferentes temperaturas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A interação entre as diferentes concentrações salinas e as temperaturas mostrou diferença significativa para as variáveis comprimento da parte aérea e do sistema radicular, sendo que a temperatura de 30°C nas diferentes concentrações salinas promoveu um maior comprimento da parte aérea e do sistema radicular (Figuras 3A; 3B e 4). Além disso, a parte aérea das plântulas de milho roxo foi menos afetada nas concentrações de 25; 50 e 75 mM de NaCl na temperatura de 30°C quando comparado com a temperatura de 25°C.



**Figura 3.** Comprimento da parte aérea (A) e do sistema radicular (B) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e temperaturas.

Segundo Silva; Grzybowski; Panobianco (2016) no estágio inicial de desenvolvimento, as plântulas de milho possuem uma estratégia de sobrevivência sob estresse salino, que é investir mais energia para o crescimento da parte aérea, uma vez que estas estruturas são responsáveis pela realização da fotossíntese. Bose; Snehasish (2018) avaliando quatro variedades de milho, concluíram que todas foram afetadas quanto ao crescimento e desenvolvimento inicial das plântulas, quando se utilizou um nível de salinidade de 8 dS m<sup>-1</sup>, que é aproximadamente 100 mM. Estes resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho.



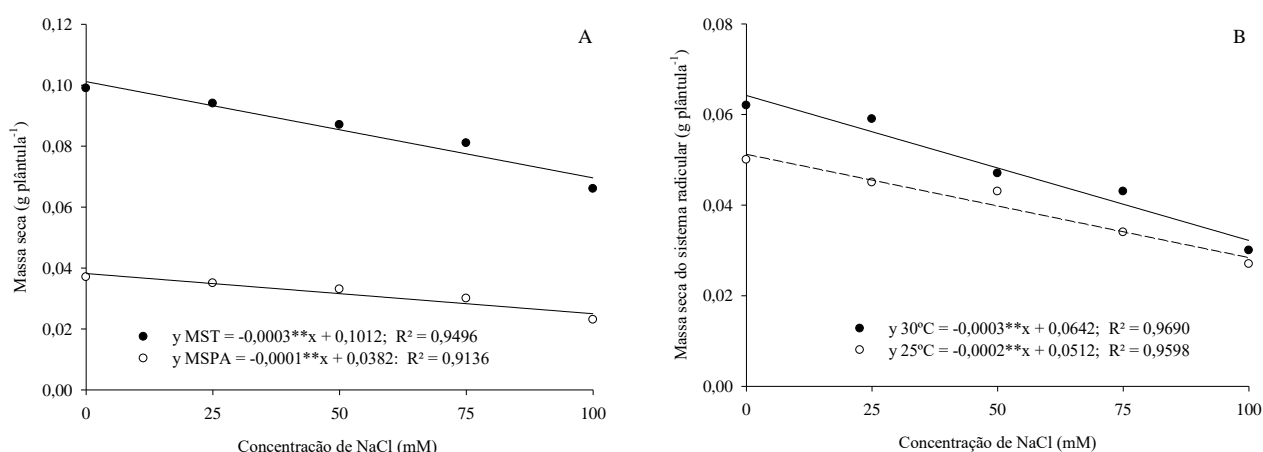
**Figura 4.** Comprimento de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e temperaturas.

A massa seca total e da parte aérea de plântulas de milho roxo foi afetada linearmente com o aumento das concentrações salinas (Figura 5A), resultados

semelhantes foram encontrados por Abdelgawad et al. (2016) que verificaram uma redução na biomassa das raízes e folhas de milho com o aumento da salinidade. Os mesmos autores relatam que o acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nos tecidos foliares pode ter resultado em fechamento estomático e danos à maquinaria fotossintética que, por sua vez, resultam em menor assimilação de  $\text{CO}_2$  e menor crescimento e acúmulo de biomassa.

Nas condições de estresse, a redução da massa seca pode ser causada pela pressão do turgor celular induzida pela redução da área foliar e também pela diminuição da taxa fotossintética devido às restrições bioquímicas causadas pelo déficit hídrico, como a diminuição dos pigmentos fotossintéticos, principalmente as clorofilas (LAWLOR; CORNIC, 2002).

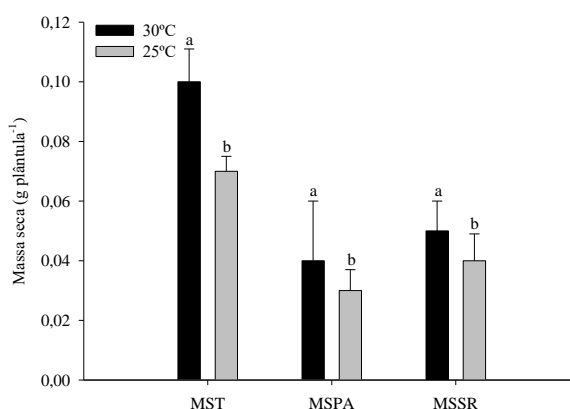
A interação entre as diferentes concentrações salinas e as diferentes temperaturas provocou uma redução da massa seca do sistema radicular de plântulas de milho roxo com o aumento das concentrações salinas de cloreto de sódio (Figura 5B), sendo que a temperatura de 30°C proporcionou uma maior massa seca do sistema radicular em comparação com a temperatura de 25°C. De acordo com Ferreira; Borghetti (2004) a temperatura ideal para a divisão celular é de aproximadamente 30°C para a maioria das espécies; portanto, está próximo da temperatura ideal para o crescimento de raízes primárias.



**Figura 5.** Massa seca total – MST e da parte aérea – MSPA (A) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e massa seca do sistema radicular – MSSR (B) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas e temperaturas.

A temperatura de 30°C acarretou em um maior acúmulo de massa seca total, da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de milho roxo. Comparando a massa seca

da parte aérea e do sistema radicular, é possível observar que as plântulas de milho roxo destinaram um maior acúmulo de reservas para as raízes (Figura 6). Sabe-se que a diminuição da temperatura promove uma menor velocidade das atividades bioquímicas e fisiológicas envolvidas no metabolismo das células, retardando assim o desenvolvimento de órgãos como raiz, folha e caule. Carvalho et al. (2017) estudando diferentes variedades de milho, constataram que a temperatura de 30°C foi a que apresentou os melhores resultados quanto à formação morfológica das plantas.



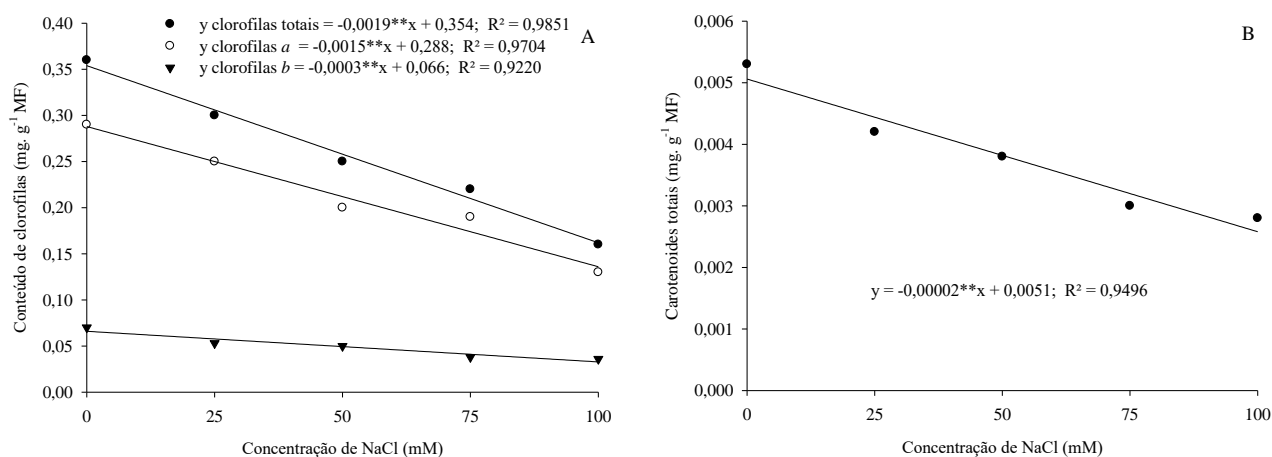
**Figura 6.** Massa seca total – MST, da parte aérea – MSPA e do sistema radicular – MSSR de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes temperaturas. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 6.1.1 Indicadores de danos oxidativos no desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse salino em diferentes temperaturas

A análise de variância (Anexo 2) mostra que ocorreu diferença significativa para as concentrações salinas quando se avaliou as clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação lipídica (TBARS) de plântulas de milho roxo. Por sua vez, o fator temperatura e a interação das diferentes concentrações salinas e temperaturas não proporcionaram diferenças significativas. As clorofilas são os principais pigmentos responsáveis pela coleta da radiação solar, que durante o processo fotossintético é convertida em energia química na forma de ATP e NADPH (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os carotenoides são essenciais para a fotossíntese atuando como pigmentos secundários, fator pró-vitamina e protetor solar que elimina radicais livres como EROs em tecidos danificados (PANDEY; DIXIT; SHYAM, 2009). Os efeitos deletérios da salinidade causados pelo estresse osmótico, pelo desequilíbrio nutricional e pelo

estresse oxidativo promovem diminuições no teor de clorofila, que no seu conjunto, conduzem a uma diminuição da eficiência fotossintética da planta (ÇIÇEK et al., 2018).



**Figura 7.** Conteúdo de clorofilas totais, *a* e *b* (A) e carotenóides totais (B) de folhas de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas.

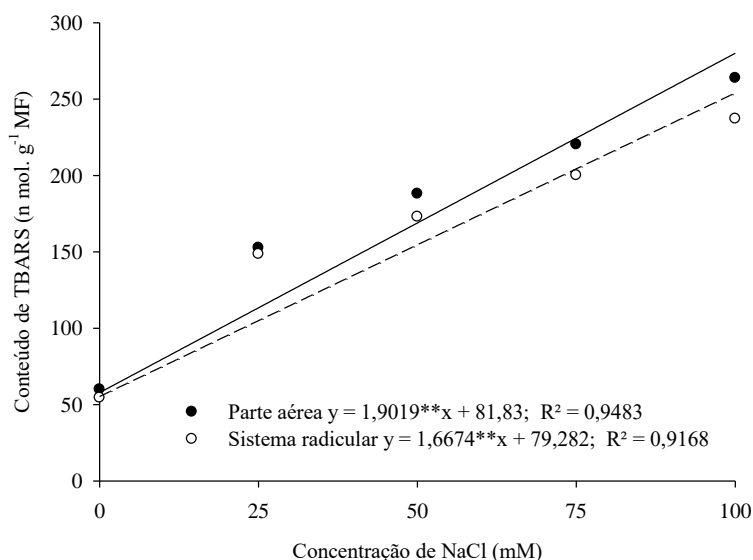
O conteúdo de clorofilas totais, *a*, *b* e carotenóides totais foi afetado linearmente à medida que se aumentou as concentrações salinas de cloreto de sódio (Figuras 7A e 7B). Resultados semelhantes foram observados por Torğut; Akbulut (2018), que verificaram uma redução nos teores de clorofilas totais, *a*, *b* e carotenóides totais em plantas de milho em função do estresse salino. O estresse salino tem efeitos tóxicos nas plantas e ocasiona alterações metabólicas, como perda da atividade dos cloroplastos, diminuição da taxa fotossintética e aumento da taxa de fotorrespiração, o que leva a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PARIDA; DAS, 2005).

A parte aérea e o sistema radicular de plântulas de milho roxo tiveram um aumento linear quanto a peroxidação de lipídeos (TBARS) com o aumento das concentrações salinas (Figura 8), porém, a parte aérea a partir da concentração de 50 mM expressou maior conteúdo na peroxidação de lipídeos, possivelmente como decorrência do rompimento do sistema de membranas da parte aérea.

De acordo com Abdel Latef; Tran (2016), plantas de milho em condições de estresse, geram muito EROs, que subsequentemente induzem a peroxidação de lipídeos da membrana, acarretando no aumento do conteúdo de malondialdeído (MDA) nas plantas; sendo que o MDA é um dos principais produtos da peroxidação de lipídeos (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Também Torğut; Akbulut (2018) verificaram que o estresse por sal causou um aumento no conteúdo de MDA nas plantas



de milho. O estresse por salinidade aumenta a peroxidação lipídica, pois aumenta o número de radicais livres nas plantas (EL-TAYEB, 2005).



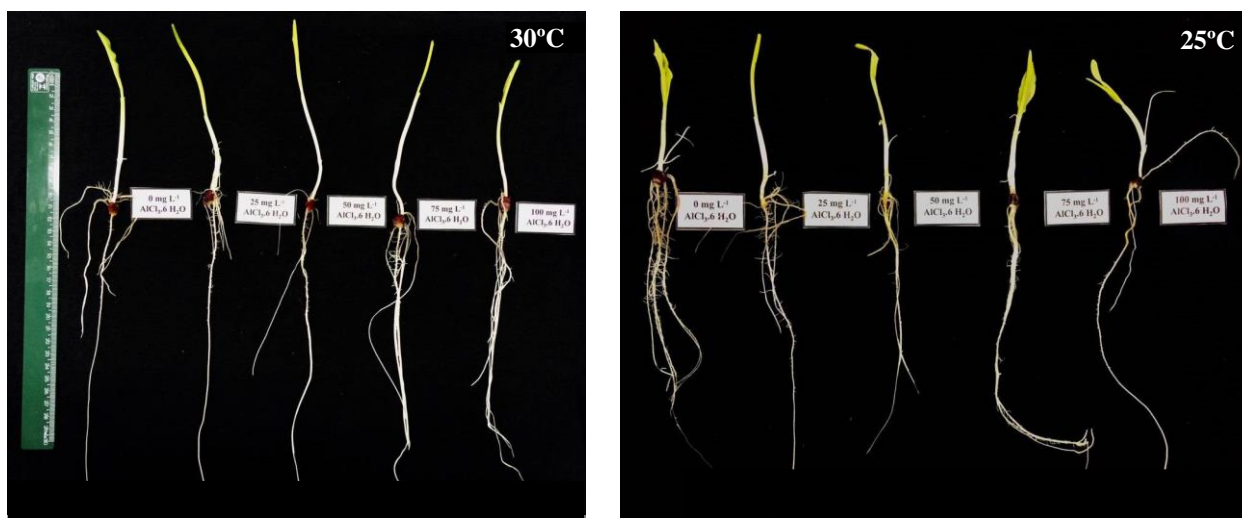
**Figura 8.** Peroxidação de lipídeos da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações salinas.

## 6.2 Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo sob estresse por toxidez ao alumínio em diferentes temperaturas

É possível observar na análise de variância (Anexo 3) que não houve diferença significativa para as concentrações de alumínio quando se avaliou a porcentagem de germinação, para as demais variáveis houve diferença significativa. Com relação ao efeito da temperatura, apenas as variáveis de massa seca total, da parte aérea e do sistema radicular apresentaram diferença significativa, enquanto para a interação entre as concentrações de alumínio e as temperaturas, apenas a variável comprimento da parte aérea apresentou diferença significativa.

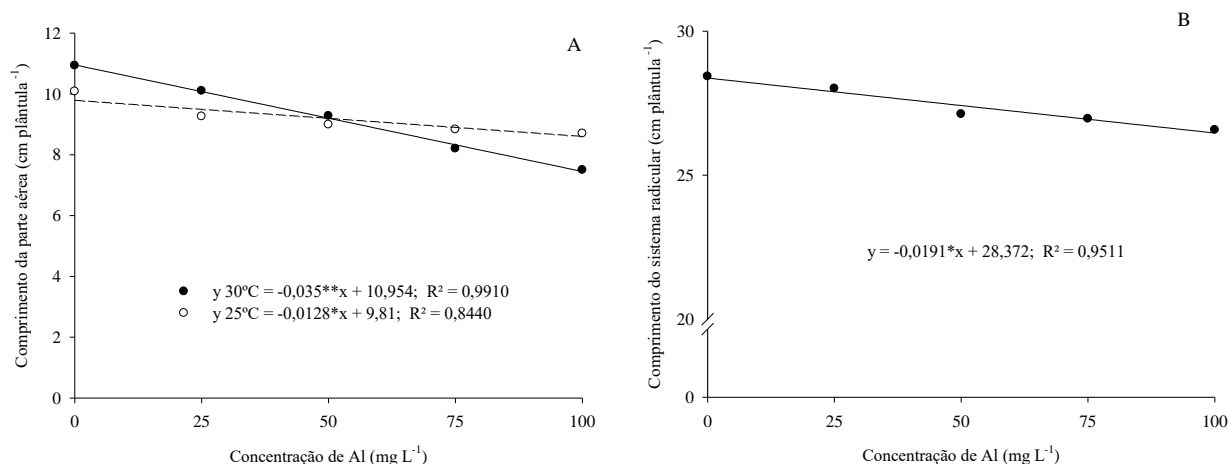
A resposta encontrada para a germinação de sementes de milho roxo no presente estudo foi semelhante a encontrada por Milane et al. (2014), que estudando a germinação de duas variedades de milho, uma convencional e uma geneticamente modificada, não observaram diferença significativa na porcentagem de germinação nas diferentes concentrações de alumínio. De maneira geral, ocorreu uma diminuição no comprimento da parte aérea de plântulas de milho roxo em decorrência da interação entre as concentrações das soluções de alumínio e as temperaturas. Sendo assim, observa-se que a redução do comprimento da parte aérea foi de forma mais drástica na

temperatura de 30°C quando se comparado com a temperatura de 25°C (Figura 9 e 10A).



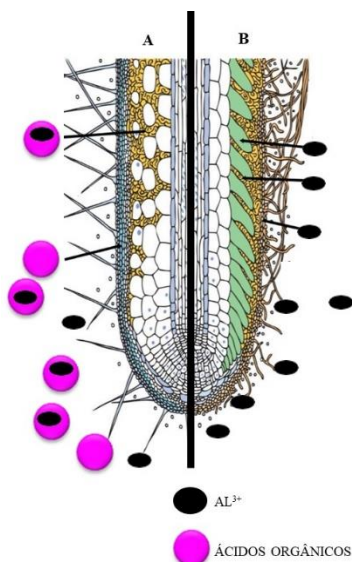
**Figura 9.** Comprimento de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio e temperaturas.

A diminuição da temperatura promove uma menor velocidade das atividades bioquímicas e fisiológicas envolvidas no metabolismo das células que atuam no crescimento e desenvolvimento, bem como da capacidade de se multiplicarem e formarem os tecidos; retardando assim o desenvolvimento de órgãos como folhas (CARVALHO et al., 2017); entretanto no presente trabalho com o emprego de uma situação estressante, provocada pelo aumento da concentração de cloreto de alumínio, a temperatura mais baixa minimizou os efeitos deletérios sobre o comprimento da parte aérea, à partir da concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> (Figura 10A).



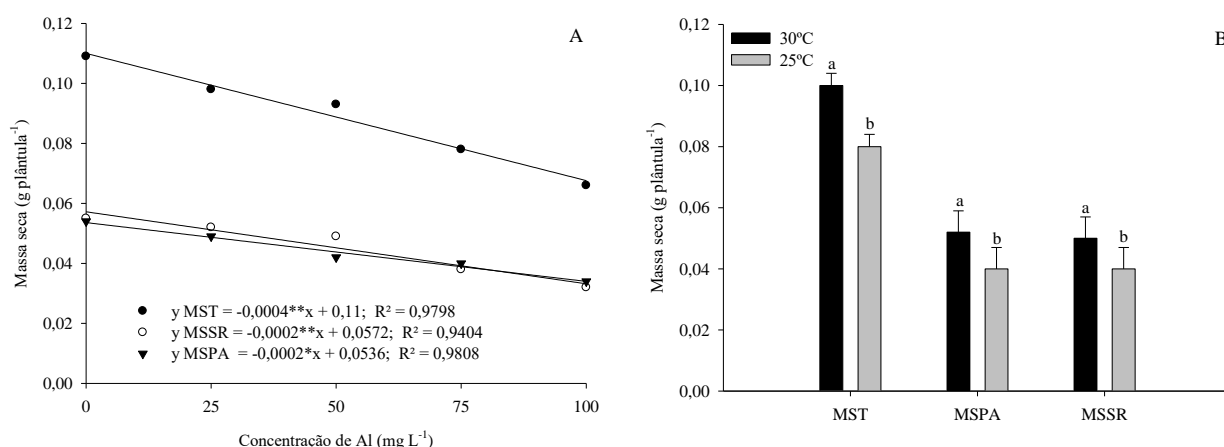
**Figura 10.** Comprimento da parte aérea – CPA (A) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio e temperaturas; e comprimento do sistema radicular – CSR (B) de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

O comprimento do sistema radicular de plântulas de milho roxo foi afetado linearmente com o aumento das concentrações de alumínio (Figura 10B). O principal sintoma de toxicidade do Al nas plantas cultivadas é a inibição do crescimento da raiz (SINGH et al., 2017), sendo que o Al inibe a expansão e alongação das células das raízes (KOCHIAN, 1995). As raízes possuem mecanismos de tolerância ao alumínio, Piñeros; Kochian (2001), relatam que as raízes de milho liberam o ácido orgânico citrato, que é o mais comum entre as espécies na presença do Al, sendo também o mais efetivo entre os ácidos orgânicos por ser um ânion tricarboxilado, conseguindo formar quelatos com o  $\text{Al}^{3+}$  muito mais estáveis, se comparados com os quelatos formados pelo malato (ânion dicarboxilado) (HARTWIG et al., 2007). Desta forma, fica evidente a importância do citrato, como ácido orgânico envolvido na tolerância ao Al tóxico (Figura 11).



**Figura 11.** Representação esquemática da ponta de uma raiz tolerante (A) e sensível (B) à toxidez por alumínio em função da liberação de ácidos orgânicos (Adaptado de SINGH et al., 2017).

De acordo com Nasr (2013) o aumento dos níveis de Al no solo levou a um declínio na produção de massa seca da parte aérea e das raízes de milho, sendo que resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho (Figura 12A). Em solos ácidos o Al é solubilizado na solução do solo, assumindo a forma de cátion trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ), ficando disponível para a planta e gerando toxidez (KOPITKE et al., 2015). A toxicidade por Al causa rompimento da homeostase de espécies reativas de oxigênio/ $\text{Ca}^{2+}$  e a sinalização mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , considerados eventos chave na indução de danos no DNA ou morte celular em plantas (ACHARY et al., 2013).

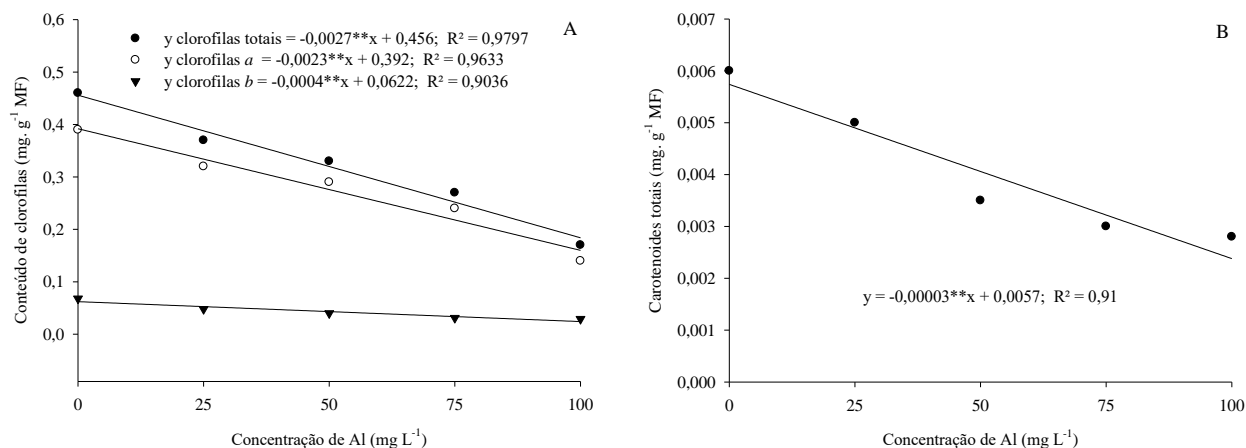


**Figura 12.** Massa seca total – MST, da parte aérea – MSPA e do sistema radicular – MSSR de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio (A) e temperaturas (B). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A massa seca total, da parte aérea e do sistema radicular de plântulas de milho roxo apresentam maior acúmulo de massa seca quando expostas a temperatura de 30°C (Figura 12B). Os autores Bewley; Black (1994) acrescentam que baixas temperaturas podem diminuir a capacidade da semente em absorver água, reduzindo a velocidade do processo germinativo; apesar de 25°C não ser considerada uma temperatura baixa para o processo de germinação de sementes de milho, sendo indicada para a realização do teste padrão de germinação (Brasil, 2009), o emprego da temperatura de 30°C ao favorecer uma maior velocidade do processo de germinação, pode ter contribuído para um maior acúmulo de massa seca de plântulas de milho roxo (Figura 12B). Sbrussi; Zucareli (2015) estudando diferentes lotes de milho constataram que a temperatura de 34°C foi a que proporcionou um maior acúmulo de massa seca, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular de plântulas de milho.

#### **6.2.1 Indicadores de danos oxidativos no desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas a estresse por toxidez ao alumínio em diferentes temperaturas.**

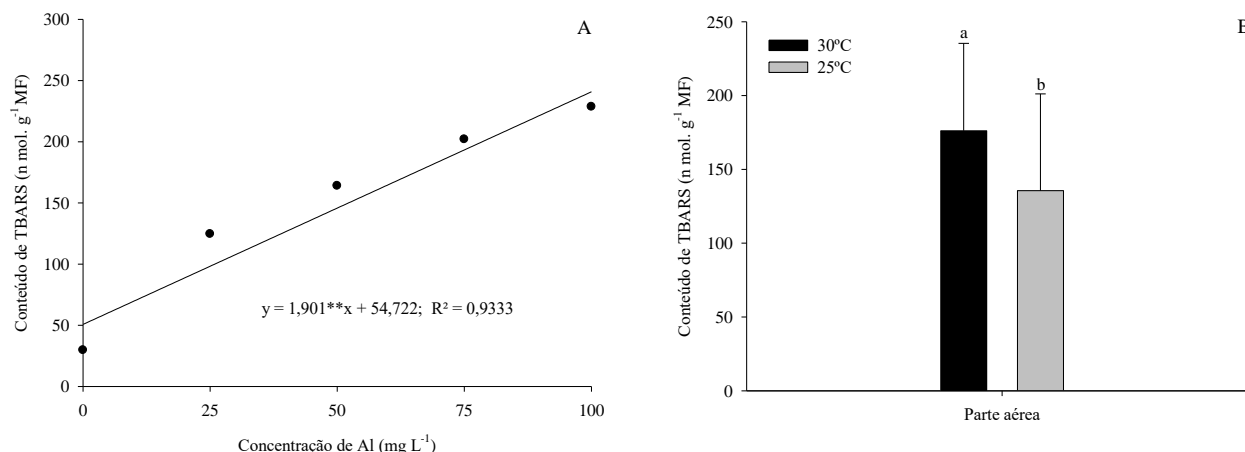
A análise de variância (Anexo 4) mostra diferença significativa para as concentrações de alumínio quando se avaliou as clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação lipídica (TBARS) de plântulas de milho roxo. Com relação a temperatura e o efeito da interação das diferentes concentrações de alumínio e temperatura houve diferença significativa para a peroxidação lipídica (TBARS). O conteúdo de clorofilas totais, *a*, *b* e carotenoides totais foram afetados linearmente com o aumento das concentrações de alumínio (Figuras 13A e 13B). Resultados semelhantes foram encontrados por Zhao et al. (2017) que verificaram um declínio induzido pelo alumínio na fotossíntese foliar em plantas de milho. Segundo Pereira et al. (2006), o  $\text{Al}^{3+}$  também causa danos oxidativos por inibição da desidratase do ácido aminolevulínico, que desempenha um papel importante na síntese da clorofila.



**Figura 13.** Conteúdo de clorofilas totais, *a* e *b* (A) e carotenoides totais (B) de folhas de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

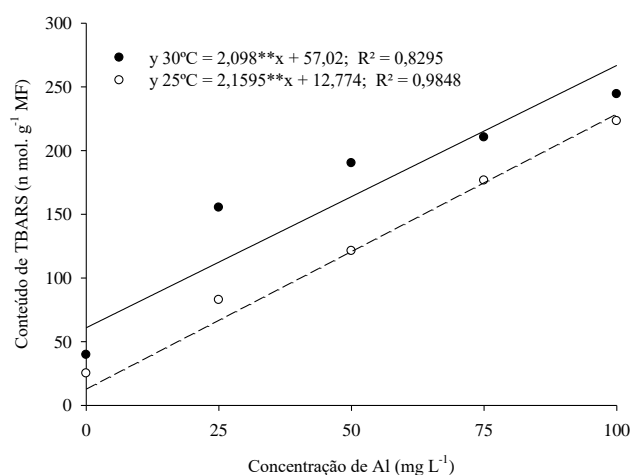
Portanto, maiores concentrações de alumínio resultam em menores teores de clorofilas, o que leva à limitação de potencial metabólico da planta. Esta redução no desempenho fotossintético indica que o Al pode destruir complexos de proteínas, cloroplastos e o aparelho fotossintético (JIANG et al., 2008). Esses autores mostraram que uma menor capacidade de transporte de elétrons no aparato fotossintético, acompanhada pela falta de equivalentes redutores foram os principais fatores que contribuíram para a menor assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas expostas ao Al. A parte aérea de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio apresentaram um aumento na peroxidação de lipídeos (Figura 14A). Resultados similares foram encontrados por Giannakoula et al. (2010), que ao estudarem duas variedades de milho, um sensível e outra tolerante ao alumínio, verificaram que com o aumento das concentrações de alumínio, houve um aumento do conteúdo de MDA.

O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio na produção de EROs e na eliminação de antioxidantes no tecido da planta em função de alguma situação de estresse. Como resultado da produção de EROs, ocorrem reações fitotóxicas nas plantas, como peroxidação lipídica, degradação de proteínas e mutação no DNA (TANOU; MOLASSIOTIS; DIAMANTIDIS, 2009). Essas reações interferem diretamente no desenvolvimento e crescimento das plantas. A temperatura de 30°C acarretou em uma maior peroxidação de lipídeos (TBARS) da parte de aérea de plântulas de milho roxo quando comparada com a temperatura de 25°C (Figura 14B).



**Figura 14.** Peroxidação de lipídeos da parte aérea de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio (A) e temperaturas (B). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com Han et al. (2013) o estresse térmico desencadeia o estresse oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), culminando na peroxidação lipídica, danos na estrutura de proteínas e lesão do DNA. A interação das diferentes concentrações de alumínio e temperaturas ocasionou uma maior peroxidação de lipídeos no sistema radicular de plântulas de milho roxo, contudo a temperatura de 30°C resultou em uma maior peroxidação de lipídeos em relação a temperatura de 25°C (Figura 15). A peroxidação induzida por EROs das membranas lipídicas é um reflexo de danos induzidos por estresse a nível celular (JAIN et al., 2001).



**Figura 15.** Peroxidação de lipídeos do sistema radicular de plântulas de milho roxo submetidas a diferentes concentrações de alumínio e temperaturas.

## 7. CONCLUSÕES

O aumento das concentrações salinas de cloreto de sódio (zero; 25; 50; 75 e 100 mM) reduz a germinação, o comprimento e a massa seca da parte aérea e do sistema radicular e os indicadores de danos oxidativos (clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação de lipídeos) de plântulas de milho roxo.

Sob condições de estresse salino a temperatura de 30°C proporciona um maior comprimento da parte aérea, do sistema radicular e acúmulo de massa seca do sistema radicular de plântulas de milho roxo.

As concentrações de soluções de cloreto de alumínio (zero; 25; 50; 75 e 100 mg L<sup>-1</sup>) não interfere na porcentagem de germinação de sementes de milho roxo, já os parâmetros de crescimento, massa seca e indicadores de danos oxidativos de plântulas de milho roxo sofre redução com o aumento das concentrações de alumínio.

A associação das diferentes concentrações de alumínio com a temperatura de 25°C mostra que o crescimento da parte aérea é menos afetado com o aumento das concentrações.

A temperatura de 30°C favorece a germinação e o acúmulo de massa seca de plântulas de milho roxo.

Clorofilas totais, *a*, *b*, carotenoides totais e peroxidação de lipídeos são indicadores bioquímicos sensíveis para a detecção da qualidade fisiológica de sementes de milho roxo, diante de situação de estresse salino e por toxidez por alumínio.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL LATEF, A. A.; TRAN, L. S. P. Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2016.
- ABDELGAWAD, H. et al. High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n.3, p. 1–11, 2016.
- ABIDO, W. A. E.; ZSOMBIK, L. Effect of salinity on germination characters and seedlings parameters of Egyptian fl ax cultivars growing in Nyiregyhaza. **Acta Ecologica Sinica**, p. 1–7, 2018.
- ANDRÉO-SOUZA, Y. et al. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 83–92, 2010.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol-oxydase in *Beta vulgaris*, **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014.
- AZEVEDO NETO, D. DE A. et al. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Braz. J. Plant Physiol**, v. 16, n. 1, p. 31–38, 2004.
- BAGHERI, M.; GHOLAMI, M.; BANINASAB, B. Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in relation to antioxidant systems in pistachio seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. 243, n.4, 2018, p. 207–213, 2019.
- BOSE; SNEHASISH. Effects of salinity on seedling growth of four maize (*Zea mays* L.) Cultivars Under Hydroponics. **Journal of Agricultural Studies**, v. 6, n. 1, p. 56, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.

CARMODY, M. et al. ROS signalling in a destabilised world: A molecular understanding of climate change. **Journal of Plant Physiology**, v. 203, p. 69–83, 2016.

CARVALHO, J. N. DA S. et al. Simulation of the effect of environmental temperature variation in the germination of corn varieties Junia. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 02, n. 3, p. 266–273, 2017.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017.

ÇIÇEK, N. et al. Salt stress effects on the photosynthetic electron transport chain in two chickpea lines differing in their salt stress tolerance. **Photosynthesis Research**, v. 136, n. 3, p. 291–301, 2018.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 1–13, 2014.

DEL GUERCIO, A. M. F.; CAMARGO, C. E. DE O. Herança da tolerância à toxicidade de alumínio em trigo duro. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p. 775–780, 2011.

DENG, B. et al. The effects of temperature on the germination behavior of white, yellow, red and purple maize plant seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 2, p. 1–11, 2015.

DUTRA, T. R. et al. Efeito da salinidade na germinação e crescimento inicial de plântulas de três espécies arbóreas florestais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 91, p. 323, 2017.

DWIVEDI, S. L. et al. Landrace Germplasm for Improving Yield and Abiotic Stress Adaptation. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 1, p. 31–42, 2016.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência rural**. v. 31, n. 3, p. 531–541, 2001.

EL-TAYEB, M. A. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 3, p. 215–224, 2005.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673–689, 2015.

FAO, 2013. Traditional High – Andean cuisine, 1 ed. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i1466e/i1466e.pdf>. Acesso em 20 de out. 2019.

FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, E. G. B. DE S. et al. Processo germinativo e vigor de sementes de Cedrela odorata L. sob estresse salino. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 99–105, 2013.

FERREIRA, R. DE P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. **Toxidez de alumínio em culturas anuais**. 1 ed. São Carlos: Embrapa Pecuária, 35 p. 2006.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866–1875, 2005.

FUKAMACHI, K. et al. Purple corn color suppresses Ras protein level and mammary carcinogenesis in the rat. **Japanese Cancer Association**, v. 99, n. 9, p. 1841–1846, 2008.

GHEYI, H. et al. Livro - **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. 2 ed. Fortaleza: INCTSal, 2016. 504p.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 487–494, 2010.

HAN, Y. et al. Effect of heat stress on the MDA, proline and soluble sugar content in leaf lettuce seedlings. **Agricultural Sciences**, v. 04, n. 05, p. 112–115, 2013.

HARAKOTR, B. et al. Anthocyanins and antioxidant activity in coloured waxy corn at different maturation stages. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 109–118, 2014.

HARTWIG, I. et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas associated mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 219–228, 2007.

HASANUZZAMAN, M. et al. Hydrogen peroxide pretreatment mitigates cCadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L.: An intrinsic study on antioxidant defense and glyoxalase systems. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2017.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, p. 163–187, 2010.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch Biochem Biophys**, v. 125, p. 189–198, 1968.

HOGARTH, P. **The Biology of Mangroves and Seagrasses**. 3 ed. 2015. 304p.

JAIN, M. et al. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 463–468, 2001.

JIANG, H. et al. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. **Tree Physiology**, v. 28, p. 1863–1871, 2008.

KAUSHAL, M.; WANI, S. P. Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 231, p. 68–78, 2016.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 46, n. 6, p. 237–260, 1995.

KOPITTKKE, P. M. et al. Identification of the primary lesion of toxic aluminum (Al) in plant roots. **Plant Physiology Preview**, v. 10, p. 1–30, 2015.

LAO, F.; SIGURDSON, G. T.; GIUSTI, M. MÓNICA. Health benefits of purple corn (*Zea mays* L.). **Phenolic Compounds. Institute of Food Technologists**, v. 16, n. 2, 2018, p. 1–13, 2017.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated Photosynthesis under. **Plant, Cell and Environment**, v. 44, n. 25, 1998, p. 275–294, 2002.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. 1–8, 2001.

LOPES, J. C.; MACEDO, C. M. P. Germinação de sementes de couve chinesa sob influência do teor de água, substrato e estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 079-085, 2008.

MADEJÓN, P. et al. Effects of soil contamination by trace elements on white poplar progeny: seed germination and seedling vigour. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 11, p. 1–11, 2015.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 495.

MILANE, L. V. et al. Acidez e alumínio na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, n. 10, 2017, p. 188–198, 2014.

MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant Cell Environ**, v. 33, p. 453–467, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MOHAMMADI, P. P. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1906–1923, 2012.

MORAIS, D. L. DE et al. Acumulação de íons e metabolismo de N em cajueiro anão em meio salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 2, p. 125–133, 2007.

NASR, N. Germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) seeds in toxicity of aluminum and nickel. **Merit Research Journal of Environmental Science and Toxicology**, v. 1, n. 5, p. 110–113, 2013.

NOURI, H. et al. Application of green remediation on soil salinity treatment: A review on halophytoremediation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 94–107, 2017.

PANDEY, V.; DIXIT, V.; SHYAM, R. Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. **Protoplasma**, v. 236, p. 85–95, 2009.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 60, p. 324–349, 2005.

PELEGRI, L. L. et al. Efeito do estresse hídrico simulado com NaCl, manitol e PEG (6000) na germinação de sementes de *Erythrina falcata* Benth. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 2, p. 511–519, 2013.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4557–4567, 2006.

PIÑEROS, M. A.; KOCHIAN, L. V. A Patch-Clamp Study on the Physiology of Aluminum Toxicity and Aluminum Tolerance in Maize. Identification and Characterization of Al<sup>3+</sup>- Induced Anion Channels. **Plant Physiology**, v. 125, p. 292–305, 2001.

ROMANO, M.R.; VERBURG, N.; ANDRADE, J.M.; ROCHA, C.H. Desempenho de cinco variedades de milho crioulo em diferentes sistemas de produção. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p. 808-811, 2007.

ROSALINO, M. R. R. **Potenciais Efeitos da Presença de Alumínio na Água de Consumo Humano**. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente, Perfil Sanitária) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2011.

RUGGIERO, A. et al. Improving plant water use efficiency through molecular genetics. **Horticulturae Review**, v. 3, p. 1–22, 2017.

SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELI, C. Germinação sob altas temperaturas para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1736–1741, 2015.

SCHEEREN, B. R. et al. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 35–41, 2010.

SCHLICHE, H. et al. Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. **Molecular Plant**, v. 7, p. 1211–1227, 2014.

SEWELAM, N.; KAZAN, K.; SCHENK, P. M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 2, p. 1–21, 2016.

SILVA, R. C. DA; GRZYBOWSKI, C. R. DE S.; PANOBIANCO, M. Vigor de sementes de milho: influência no desenvolvimento de plântulas em condições de estresse salino. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 491–499, 2016.

SILVA, T. K. **Ação do óxido nítrico sobre o estresse de alumínio na germinação de arroz (*Oryza sativa* L.): Alterações fisiológicas e bioquímicas**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - botânica) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, 2007.

SINGH, S. et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 1–63, 2017.

SORATTO, R. P. et al. Resposta de quatro cultivares de feijão ao manganês em Solução Nutritiva. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 2, p. 235–240, 2005.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. p. 888, 2017.

TANOUE, G.; MOLASSIOTIS, A.; DIAMANTIDIS, G. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2–3, p. 270–281, 2009.

THIRAPHATTHANAVONG, P. et al. Preventive effect of *Zea mays* L. (Purple Waxy Corn) on experimental diabetic cataract. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

TIECHER, T. L. **Alterações fisiológicas em milho cultivado em solo com alto teor de cobre e submetido à aplicação de zinco**. 2014, p. 44, Dissertação (Mestrado em ciência do solo) – Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, RS, Brasil, 2014.

TORĞUT, G.; AKBULUT, G. B. Effect of the novel biodegradable copolymer and soil salinity on the growth of corn plant. **Adv Polym Technol**, v. 37, n. 7, p. 3588–3595, 2018.

YANG, Z.; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 169–176, 2010.

ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 1, n. 15, p. 2–15, 2017.

ZHANG, A. et al. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection. **Molecules**, v. 18, p. 14241–14257, 2013.

ZHAO, X. et al. Ecotoxicology and environmental safety hydrogen-rich water induces aluminum tolerance in maize seedlings by enhancing antioxidant capacities and nutrient homeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. 6, p. 369–379, 2017.



## 9 ANEXOS

**Anexo 1.** Resumo da análise de variância das médias de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas a estresse salino em diferentes temperaturas.

Fonte de variação	Quadrado médio						
	GL	PG (%)	CPA (cm plântula <sup>-1</sup> )	CSR	MSPA	MSSR (g plântula <sup>-1</sup> )	MST
<b>Concentração</b>	4	1444,6**	47,1**	343,0*	0,0004**	0,0007**	0,001**
<b>Temperatura</b>	1	2073,6**	19,8**	4,8 <sup>NS</sup>	0,0002**	0,0008**	0,01**
<b>Concentração x Temperatura</b>	4	121,1 <sup>NS</sup>	8,0**	6,72**	0,00002 <sup>NS</sup>	0,0001*	0,0002 <sup>NS</sup>
<b>Erro</b>	30	48,1	0,6	1,9	0,00009	0,00005	0,0001
<b>Total</b>	39	-	-	-	-	-	-
<b>CV (%)</b>	-	8,7	10,36	6,89	23,12	15,66	15,27

NS, \*\*, \* respectivamente, não significativo e significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. Legenda: PG – Porcentagem de germinação (%); CPA – Comprimento da parte aérea (cm plântula<sup>-1</sup>); CSR – Comprimento do sistema radicular (cm plântula<sup>-1</sup>); MSPA – Massa seca da parte aérea (g plântula<sup>-1</sup>); MSSR – Massa seca do sistema radicular (g plântula<sup>-1</sup>) e MST – Massa seca total (g plântula<sup>-1</sup>) de plântulas de milho roxo.

**Anexo 2.** Resumo da análise de variância das médias de indicadores de danos oxidativos de plântulas de milho roxo submetidas a estresse salino em diferentes temperaturas.

Fonte de variação	Quadrado médio						
	GL	Clorofilas totais	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides totais	Conteúdo de TBARS	
						PA	SR
<b>Concentração</b>	4	0,03**	0,02**	0,008**	0,0002*	60061,8**	42504,8**
<b>Temperatura</b>	1	0,005 <sup>NS</sup>	0,003 <sup>NS</sup>	0,0003 <sup>NS</sup>	0,00004 <sup>NS</sup>	0,35 <sup>NS</sup>	796,7 <sup>NS</sup>
<b>Concentração x Temperatura</b>	4	0,003 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	0,0001 <sup>NS</sup>	0,00006 <sup>NS</sup>	2841,5 <sup>NS</sup>	476,0 <sup>NS</sup>
<b>Erro</b>	20	0,03	0,007	0,01	0,00004	3195,6	2466,29
<b>Total</b>	29	-	-	-	-	-	-
<b>CV (%)</b>	-	29,55	29,74	28,87	29,73	25,17	32,76

NS, \*\*, \* respectivamente, não significativo e significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. Legenda: PA – parte aérea; SR – Sistema radicular.

**Anexo 3.** Resumo da análise de variância das médias de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho roxo submetidas a estresse por toxidez ao alumínio em diferentes temperaturas.

Fonte de variação	Quadrado médio						
	GL	PG (%)	CPA (cm plântula <sup>-1</sup> )	CSR	MSPA	MSSR (g plântula <sup>-1</sup> )	MST
<b>Concentração</b>	4	16,7 <sup>NS</sup>	5,3*	4,8*	0,0005*	0,0008*	0,002*
<b>Temperatura</b>	1	16,9 <sup>NS</sup>	0,06 <sup>NS</sup>	0,2 <sup>NS</sup>	0,001*	0,001*	0,01*
<b>Concentração x Temperatura</b>	4	11,6 <sup>NS</sup>	2,25*	1,7 <sup>NS</sup>	0,0001 <sup>NS</sup>	0,0002 <sup>NS</sup>	0,0002 <sup>NS</sup>
<b>Erro</b>	30	48,1	0,6	1,9	0,00009	0,00004	0,0002
<b>Total</b>	39	-	-	-	-	-	-
<b>CV (%)</b>	-	4,64	7,97	3,3	21,68	15,23	15,56

<sup>NS</sup>, \*\*, \* respectivamente, não significativo e significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. Legenda: PG – Porcentagem de germinação (%); CPA – Comprimento da parte aérea (cm plântula<sup>-1</sup>); CSR – Comprimento do sistema radicular (cm plântula<sup>-1</sup>); MSPA – Massa seca da parte aérea (g plântula<sup>-1</sup>); MSSR – Massa seca do sistema radicular (g plântula<sup>-1</sup>) e MST – Massa seca total (g plântula<sup>-1</sup>) de plântulas de milho roxo.

**Anexo 4.** Resumo da análise de variância das médias de indicadores de danos oxidativos de plântulas de milho roxo submetidas a estresse por toxidez ao alumínio em diferentes temperaturas.

Fonte de variação	Quadrado médio						
	GL	Clorofilas totais	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides totais	Conteúdo de TBARS	
						PA	SR
<b>Concentração</b>	4	0,06*	0,05*	0,001*	0,00009*	47252,1**	43277,5**
<b>Temperatura</b>	1	0,01 <sup>NS</sup>	0,01 <sup>NS</sup>	0,0003 <sup>NS</sup>	0,00002 <sup>NS</sup>	12352,5*	12670,3**
<b>Concentração x Temperatura</b>	4	0,004 <sup>NS</sup>	0,003 <sup>NS</sup>	0,0009 <sup>NS</sup>	0,00002 <sup>NS</sup>	4068,1 <sup>NS</sup>	5133,20**
<b>Erro</b>	20	0,005	0,005	0,0002	0,00002	2077,3	1011,7
<b>Total</b>	29	-	-	-	-	-	-
<b>CV (%)</b>	-	22,45	25,78	27,11	28,72	29,24	22,48

<sup>NS</sup>, \*\*, \* respectivamente, não significativo e significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. Legenda: PA – parte aérea; SR – Sistema radicular.