

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALEXANDRA DOS SANTOS AMBRÓSIO

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE TREALOSE EM FOLHAS DE MILHO SOB
DÉFICIT HÍDRICO: AVALIAÇÃO ANATÔMICA E FOTOSSINTÉTICA**

ALFENAS/MG

2019

ALEXANDRA DOS SANTOS AMBRÓSIO

**APLICAÇÃO DE DERIVADOS DE TREALOSE EM FOLHAS DE MILHO SOB
DÉFICIT HÍDRICO: AVALIAÇÃO ANATÔMICA E FOTOSSINTÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de
Alfenas. Área de concentração: Ciências da natureza.
Área de concentração: Tecnologia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

ALFENAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Ambrósio, Alexandra dos Santos

A496a Aplicação de derivados de trealose em folhas de milho sob déficit hídrico: avaliação anatômica e fotossintética. / Alexandra dos Santos Ambrósio – Alfenas, MG, 2020.
54 f.: il. –

Orientador: Thiago Corrêa de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Trocas gasosas. 2. Fluorescência - Clorofila A. 3. Zea mays L. 4. Quenching. 5. Anatomia foliar. 6. Densidade estomática. 7. Epiderme. I. Souza, Thiago Corrêa de. II. Título.

CDD- 581



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3701-9685 (Coordenação) / (35) 3701-9268 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



ALEXANDRA DOS SANTOS AMBRÓSIO

“Aplicação de derivados de trealose em folhas de milho sob déficit hídrico: avaliação anatômica e fotossintética”.

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 29 de julho de 2019.

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Thiago Souza

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva
Instituição: UNIFENAS

Assinatura: Adriano Silva

Dra. Kamila Rezende Dázio de Souza
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Kamila Souza

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente à minha mãe, Cláudia. Graças ao seu apoio, conquistei tudo o que almejava. Assim, espero te deixar orgulhosa e um conseguir retribuir tudo o que me foi dado.

Aos meus amigos (novos e antigos) que me ajudaram a crescer e a atingir meus objetivos. Yasmin, por ser minha melhor amiga, me suportar e me dar todo o apoio durante todo esse tempo. Laís, Antônio, Carlos e Marcela, pela amizade criada durante a graduação que pretendo levar para a vida. Pelos amigos distantes, alguns que nunca encontrei pessoalmente, mas que certamente fizeram parte desta jornada. Matheus Pepe, quase 10 anos de amizade, sempre me apoiando e criando memórias divertidas e inesquecíveis. Aos novos amigos, Kamila, Leticia e Valdir, por me proporcionarem muitos momentos de alegria, muitas risadas, me ensinarem e contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional. Espero ser especial para vocês da mesma forma que vocês são para mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza, por me acompanhar e me guiar durante estes anos. Agradeço por ter sido paciente, compreensivo e ter compartilhado todo esse conhecimento comigo.

Aos meus colegas Gisele e Pedro, por sempre me tratarem tão bem, pelas pequenas conversas engraçadas e divertidas que já conseguiam animar o meu dia. Joice, por ser minha amiga e parceira e ser essencial para a publicação deste trabalho, fruto do nosso esforço.

A todos os membros do BIOGEN e aos que me ajudaram de alguma forma neste trabalho: Prof. Dr. José Ricardo Mantovani, Prof. Dr. Plínio Rodrigues, Jéssika, André, Marcus, Danilo, Gabriel, Willian, Gabi Ezequiel, Zé e Raphael.

À Universidade Federal de Alfnas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa envolvido neste estudo (Processo 423584/2016-2, chamada Universal 01/2016). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais eventos que comprometem o cultivo de cereais, como o milho. Este apresenta grande importância para o consumo humano e animal, tornando-se um dos principais cultivos do mundo. A aplicação de substâncias, como a trealose, tornou-se uma das soluções para mitigar os estresses abióticos e assim expandir a agricultura para diferentes regiões. Porém, o conhecimento sobre a síntese de derivados de trealose e análise dos seus efeitos nas plantas ainda são desconhecidos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se a pulverização da mistura dos derivados de trealose azidídica e tosilada é capaz de mitigar o estresse gerado pelo déficit hídrico em milho através da análise da eficiência fotossintética e da anatomia de folhas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos e foi utilizado milho híbrido sensível ao déficit hídrico. Utilizou-se um pulverizador mecânico de pressão para aplicar a mistura de derivados (30mM) nas faces foliares adaxial e abaxial 12h antes da imposição do estresse e 5 dias depois. Quando as plantas alcançaram estágio V5/V6, foi imposto o estresse, o qual persistiu por 12 dias seguido de reidratação. A coleta de dados fisiológicos ocorreu no início do estresse, no final e no restabelecimento hídrico. Foram avaliados parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teor relativo de clorofila. Ao fim do experimento, as folhas foram coletadas e foram realizadas secções transversais e paradérmicas para analisar os seguintes parâmetros anatômicos: espessura da nervura central, distância entre os feixes da nervura central, diâmetro dos metaxilemas, área de fibras da nervura central, área do floema, espessura do limbo, espessura da epiderme, índice estomático, número de células paradérmicas, densidade estomática, diâmetro polar dos estômatos, funcionalidade estomática, e espessura das cutículas. A pulverização da mistura de derivados aumentou a taxa fotossintética, mitigou os danos gerados no fotossistema II, elevou a taxa de transporte de elétrons e o quenching fotoquímico. Ademais, gerou modificações anatômicas na folha visando aumentar a taxa fotossintética, como aumento da densidade estomática, diminuição da espessura do limbo foliar e da cutícula. Conclui-se que a mistura de derivados de trealose é capaz de mitigar os danos causados pelo estresse no híbrido de milho, exibindo a possibilidade de ser um estimulante para a tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Trocas gasosas. Fluorescência da clorofila *a*. Zea mays L. Quenching.

Anatomia foliar. Densidade estomática. Epiderme.

ABSTRACT

Water deficit is one of the main events that can negatively affect cereal yield, such as maize. This cereal variety has an enormous role for both human consumption and animal feed, turning it into a staple food all over the world. The use of chemical substances, such as trehalose, has been one of the main solutions to mitigate abiotic stress and expand agriculture into different areas. However, the knowledge on the synthesis of trehalose derivatives and the analysis of their effects on plants are still unknown. Thus, the present study aimed to verify if the spray of a trehalose derivatives' mixture is capable of lessening the effect of water deficit in maize through a photosynthetic efficiency and leaf anatomy analysis. The experiment was performed in a greenhouse. A water deficit-sensitive hybrid maize variety was planted in vases. A mechanical pressure spray was used to apply the derivatives' mixture (30mM) on the adaxial and abaxial leaf surfaces 12 hours before stress imposition and 5 days later. When plants reached V5/V6 stage, stress was imposed, which persisted for 12 days until rehydration. The physiologic data collection occurred at the stress start, end and hydric reestablishment. Evaluated parameters were gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence and relative chlorophyll content. At the end of the experiment, leaves were collected and transversal and paradermal sections were performed in order to analyze the central midrib thickness, distance between vascular bundles, metaxylem diameter, midrib area, phloem area, blade thickness, epidermis thickness, stomatic index, paradermic cell number, stomatic density, stomata polar diameter, stomatic functionality and cuticle thickness. Derivates' mixture spraying increases photosynthetic rate, mitigating damage in the photosystem II, increased electrons transport rate and photochemical quenching. Besides, generated anatomical modifications on leaves, which increases photosynthetic rates such as increased stomatic density and decreased leaf blade and cuticle thickness. It is possible to assume that the trehalose derivatives' mixture is capable of reducing damage caused by the stress in maize, thus being a possible water deficit tolerance stimulant.

Keywords: Gas exchange. Chlorophyll *a* fluorescence. *Zea mays* L. Quenching.
Leaf anatomy. Stomatic density. Epidermis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO NAS PLANTAS	8
2.2 O ESTRESSE HÍDRICO E O MILHO	9
2.3 TREALOSE E SEUS DERIVADOS	10
3 OBJETIVOS	13
3.1 OBJETIVO GERAL	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4 JUSTIFICATIVA	14
REFERÊNCIAS	15
ANEXO A	19
Artigo: Mistura de derivados de trealose mitigam efeitos causados pelo déficit hídrico em milho: uma análise da eficiência fotossintética	19
Resumo	19
Introdução	20
Material e métodos	22
Síntese das biomoléculas	22
Condições locais e material vegetal	22
Imposição do déficit hídrico, aplicação da trealose e derivados e design experimental	23
Medidas de trocas gasosas foliares e teor relativo de clorofila	24
Medidas de fluorescência da clorofila	24
Análise da anatomia foliar	25
Análise dos dados	26
Resultados	26
Trocas gasosas foliares e teor relativo da clorofila	26
Fluorescência da clorofila <i>a</i>	27
Anatomia foliar	28
Discussão	35
Conclusão	35
Author contributions	35
Referências	35

1 INTRODUÇÃO

A fome é uma realidade que atinge 770 milhões de pessoas ao redor do globo e o crescente aumento populacional somado aos efeitos das mudanças climáticas dificultam ainda mais o progresso para se encontrar a solução (CHEESEMAN, 2015). Para conseguir suprir a demanda alimentícia da população mundial, a agricultura deve ocupar uma área de 4,15 bilhões de hectares em todo o globo (BOT *et al.*, 2000). Entretanto, devido aos efeitos das mudanças climáticas, a área disponível à agricultura diminui gradualmente, ao contrário do crescimento populacional mundial (OSPINA; ROSER, 2016). Assim, torna-se necessário a identificação de tecnologias que busquem a tolerância à diversos estresses para que se possa ampliar a área agrícola mundial.

O déficit hídrico ou seca corresponde ao caso onde a precipitação apresenta valores menores do que a taxa evaporação da água e de transpiração das plantas (KERBAUY, 2012). É um fator limitante para a produção agrícola, já que pode afetar a germinação, o crescimento, o desenvolvimento e o rendimento das plantas. Consequentemente, a oferta de alimentos no mercado pode ser comprometida, prejudicando a economia do país e a qualidade de vida dos agricultores familiares e consumidores.

O estresse hídrico é o fator adverso que mais prejudica uma plantação, já que a água é essencial para todos os organismos. O milho, em geral, é tolerante ao déficit hídrico apenas em parte de seu crescimento e desenvolvimento, sendo que a seca afetando apenas um estágio de seu ciclo de vida, pode comprometer a sobrevivência e o rendimento de grãos (MAGALHÃES, 2002; RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003). Assim, torna-se necessário a identificação de novas tecnologias para promover a tolerância ao estresse hídrico para evitar o comprometimento da sociedade, economia e ambientes.

Uma alternativa para lidar com o déficit hídrico é a aplicação de biomoléculas que irão induzir a tolerância a estresses no vegetal, como é o caso da trealose. Esta é um dissacarídeo presente em vários organismos e pode ser considerada essencial para a tolerância a estresses abióticos (FERNANDEZ *et al.*, 2010; SOLTANIZADEH *et al.*, 2014). Já é conhecido o potencial da trealose de auxiliar na tolerância de plantas frente ao déficit hídrico, gerando modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas, porém modificações químicas (semissíntese) da trealose podem gerar derivados com maior capacidade de induzir a tolerância.

O milho é um dos principais cultivos do Brasil (IBGE, 2019) e apresenta grande importância econômica e social, sendo utilizado para a alimentação animal, consumo humano e industrial e é a atividade que garante a sobrevivência de pequenos produtores (DUARTE;

MATTOSO; GARCIA, 2010). Estudos para ampliar a produção de um dos cereais mais consumidos do país são necessários para que se possa atender às demandas e conseqüentemente seja possível melhorar a qualidade de vida da população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Anualmente, há a perda de centenas de milhões de dólares devido ao comprometimento das plantações devido à fatores abióticos (MAHAJAN; TUTEJA, 2005), como por exemplo, o déficit hídrico – seca. A seca é um dos principais eventos naturais que comprometem a produção de alimentos, sendo responsável por causar danos e até promover a perda de mais de 80% dos cultivos agrícolas (FAO, 2018). Geralmente, é associada a terrenos áridos, porém, muitos lugares úmidos também podem sofrer deste fenômeno, como é o caso da Amazônia brasileira, a qual é mais vulnerável ao déficit hídrico do que o sudeste do país, devido a atividades antrópicas (CARRÃO; NAUMANN; BARBOSA, 2016). O déficit hídrico pode ser classificado em três grupos: induzidos pelo clima, pela atividade humana e o que pode ser modificado pela ação humana, ou seja, a seca que pode ser intensificada ou aliviada pela ação antrópica (VAN LOON *et al.*, 2016). Para suprir a demanda alimentícia, é necessário desenvolver meios de se expandir a atividade agrícola para ambientes que antes não eram explorados, como lugares que sofrem com o déficit hídrico.

2.1 Efeito do déficit hídrico nas plantas

Ao detectar o déficit hídrico, a primeira resposta do vegetal é o fechamento de seus estômatos através da perda da turgescência dos mesmos, já que esta é uma resposta rápida e funcional (CHAVES, 1991). Apesar de acarretar em menor assimilação de carbono, o fechamento dos estômatos é eficiente em diminuir a perda de água e, conseqüentemente, evitar a cavitação e embolismo do xilema, processo responsável por bloquear o transporte de água através da formação de bolhas de ar nos vasos condutores (BRODRIBB; HOLBROOK, 2003; ZHANG *et al.*, 2016). Tais alterações reduzem a condutância estomática, promovendo aumento da temperatura do solo, do ar e interna do vegetal. Conseqüentemente, há maior demanda evaporativa, intensificando e acelerando os efeitos negativos do estresse hídrico (BERGAMASCHI; MARTZENAUER, 2014; BRITO, *et al.*, 2013).

Em relação a resposta ao déficit hídrico, as plantas podem ser isohídricas (trigo, feijão, pimenta) ou anisohídricas (milho, cana-de-açúcar e grão de bico). Os vegetais isohídricos fecham seus estômatos rapidamente comprometendo a assimilação de carbono, enquanto os anisohídricos mantêm seus estômatos abertos por mais tempo haja absorção de carbono, porém sofrem com o embolismo (MARTIN-STPAUL *et al.*, 2017). Além do fechamento estomático, ocorre a inibição da expansão foliar, ou seja, as folhas novas ficam menores (com menor área

foliar). Essa modificação é importante para diminuição da área transpiratória (AVRAMOVA *et al.*, 2015).

Com a diminuição da assimilação do carbono, não são fornecidos adenosina trifosfato (ATP) e NADPH suficientes para o funcionamento da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCo) devido a redução da taxa de transporte de elétrons, gerando a fotoinibição (MATHOBO *et al.*, 2017). Conseqüentemente, a proporção de centros de reação do fotossistema II abertos (quenching fotoquímico) e a eficiência da fotossíntese diminuem (SOUZA *et al.*, 2013). Sob déficit hídrico, a grande quantidade de energia sobre os pigmentos fotoprotetores deflagra na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando um estresse oxidativo, pois os carotenoides e xantofilas não conseguem dissipar o excesso de energia na forma de calor. As EROs podem atacar as membranas lipídicas (peroxidação lipídica), ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e clorofila (GILL; TUTEJA, 2010; NIKOLAEVA *et al.*, 2015). Também ocorre o aumento da produção de açúcares para que ocorra o balanceamento osmótico, estabilização de macromoléculas e estocagem de carbono e nitrogênio (MOHAMMADKHANI; HEIDARI, 2008).

Além das respostas fisiológicas, a anatomia do vegetal também sofre modificações para responder ao déficit hídrico. A larga produção de açúcares promove aumento da área do floema, já que a alta concentração de solutos eleva a pressão osmótica a fim de diminuir o volume de água no xilema, que seria destinado a transpiração (SEVANTO, 2018). A falta de água também pode promover a redução do xilema (área e número) e da área do parênquima celular (AKRAM *et al.*, 2016a). Em algumas espécies, há aumento do número de estômatos acompanhado da redução do tamanho dos mesmos, para que haja assimilação de carbono com o mínimo gasto de água (SOUZA *et al.*, 2010; XU; ZHOU, 2008). Ademais, ocorre aumento da espessura das epidermes, cutículas e da parede celular para evitar a saída de água (KAUR; ASTHIR, 2017; NAWAZISH; HAMEED, 2006).

2.2 O estresse hídrico e o milho

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), o milho é um dos principais cultivos do Brasil, junto com a cana-de-açúcar e soja. A produção mundial de milho dobrou nos últimos 50 anos (VALIPOUR *et al.*, 2015) e o Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo (USDA, 2019) com uma produção total de aproximadamente 94 milhões de toneladas (CONAB, 2019) em sua safra 2018/2019. Apresenta grande importância para o consumo humano e animal, visto que seus grãos são constituídos por um óleo altamente

calórico além de serem importantes fontes de aminoácidos e proteínas (LARKINS, 2017). Ademais, é matéria prima para outros alimentos, remédios, combustíveis, além de ser essencial para a sobrevivência de agricultores locais (ADIAHA *et al.*, 2016). Devido a seus diversos fins, o milho tornou-se um dos principais produtos cultivados e trocados ao redor do globo (VILLORIA; CHEN, 2018).

O milho pertence ao grupo das plantas C₄, as quais são capazes de transferir o CO₂ do mesófilo para as células da bainha vascular e, com o intermédio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), são armazenados na forma de ácidos C₄ (PEARCY; EHLERINGER, 1984). Quando necessário, tais ácidos C₄ (como o malato) são quebrados em CO₂ novamente e a alta concentração interna de CO₂ limita a ligação do oxigênio ao sítio da RuBisCo, reprimindo o processo de fotorrespiração (FODOR *et al.*, 2017). Com uma maior concentração interna de CO₂, há redução da frequência de abertura dos estômatos acompanhada da redução do volume de água perdido para a atmosfera (transpiração) e aumento da eficiência do uso da água, promovendo uma maior atividade fotossintética quando comparadas com plantas C₃ (ELLSWORTH; COUSINS, 2016; HETHERINGTON; WOODWARD, 2003).

As plantas desenvolveram algumas adaptações para sobreviverem ao déficit hídrico que são acionadas através de seu metabolismo logo que elas são submetidas ao estresse. O ajuste osmótico é uma resposta essencial para que as células não percam sua turgescência e assim torna-se possível evitar o mal funcionamento ou até mesmo a morte celular (BLUM, 2017). Além disso, os solutos orgânicos (aminoácidos, açúcares, entre outros) também apresentam importante papel na osmoproteção (HELALY *et al.*, 2017) e podem agir como antioxidantes junto com enzimas específicas (FURLAN *et al.*, 2016).

2.3 Trealose e seus derivados

A trealose é um dissacarídeo natural não redutor formado a partir da ligação α - α de duas moléculas de D-glicose: 1- α -D-glicanopiranosil- α -D-glicanopiranosídeo (Fig. 1) (MÜLLER; BOLLER; WIEMKEN, 1995) e está presente em uma variedade de microrganismos, insetos, plantas e fungos (LUYCKX; BAUDOIN, 2011). Pode ser considerada a chave do processo de tolerância a estresse abiótico incluindo o déficit hídrico (FERNANDEZ *et al.*, 2010; SOLTANIZADEH *et al.*, 2014). Desta forma, há várias pesquisas relacionadas a transgênicos, cujo objetivo é expressar genes que ativem enzimas participantes da biossíntese da trealose, acarretando no acúmulo desse dissacarídeo na planta para aumentar a sua tolerância a diferentes estresses (ASHRAF, 2010).

Nas plantas, é sintetizada a partir de moléculas de UDP-glicose e glicose-6-fosfato através de duas reações. Inicialmente, o resíduo D-glicose da molécula UDP-Glicose é transferido para glicose-6-fosfato, acoplando-as através da enzima trealose-6-fosfato sintase (TPS), formando assim a molécula trealose-6-fosfato. Na segunda reação, esta molécula é desfosforilada em trealose através da enzima trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (LUNN *et al.*, 2014; VALLIYODAN; NGUYEN, 2006).

Esse dissacarídeo possui diversos fins industriais. Na indústria alimentícia, quando os alimentos são rehidratados com trealose, há preservação de seu aroma, sabor e textura (COLAÇO; ROSER, 1994). Ademais, também é utilizada para armazenar biomateriais e vacinas, já que evita a degradação das enzimas. Já na área farmacêutica, a trealose pode elevar a eficiência do sistema imune, desempenhando função antitumoral, antiinflamatória, antiviral (MATSUMOTO *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

Nas plantas, supõe-se que a trealose apresenta função protetora contra diversos patógenos e estresses abióticos. Ela é sintetizada por plantas e é capaz de promover a vitrificação, onde há a formação de um fluido pouco viscoso que protege a membrana celular da desidratação (FEOFILOVA *et al.*, 2014). Também é capaz de formar ligações de hidrogênio e promove a estabilidade química das células (ROSER, 1991; ALMEIDA *et al.*, 2007). Em experimentos com rabanetes sob déficit hídrico, sua aplicação promoveu o aumento do comprimento das raízes e da biomassa, redução da permeabilidade da membrana e do acúmulo de certos nutrientes essenciais para o crescimento, como o potássio, cálcio e fósforo (AKRAM *et al.*, 2015). Resumidamente, a trealose é responsável pela osmorregulação, resistência a dessecação, fonte de armazenagem de energia (carbono), termotolerância e regulação do crescimento e desenvolvimento do vegetal (ILHAN; OZDEMIR; BOR, 2014).

Zhou *et al.* (2014) mostram que a aplicação exógena de trealose em milhos induziu uma resposta satisfatória em relação aos danos causados pelo estresse abiótico e biótico, aumentando a biomassa e posteriormente a produção de grãos. A trealose é um dissacarídeo muito apreciado pelas indústrias por ser um açúcar natural amplamente encontrado na natureza e que não apresenta toxicidade (BOSCH *et al.*, 2016; MNIF; GHRIBI, 2016). Existem muitas literaturas explorando a relação entre a trealose e a tolerância ao déficit hídrico, mas ainda se faz necessário uma maior contribuição científica sobre o assunto, principalmente envolvendo novos derivados. Assim como o próprio dissacarídeo, seus derivados também são utilizados para diversos fins, porém com foco na indústria farmacêutica. Nesta, estão relacionados ao tratamento de câncer e

outras enfermidades (IM *et al.*, 2013; LIU; JIANG, 2014) e são importantes devido a sua atividade antioxidante (HSIEH *et al.*, 2015).

Na agricultura, quando aplicados no vegetal em desenvolvimento, são capazes de aumentar a biomassa, o vigor e a qualidade do produto (STOLLER; SALZMAN; LIPTAY, 2014). Ademais, os derivados de trealose foram propostos quimicamente para atuação na inibição da enzima trealase, responsável por degradar a trealose, sendo de importante aplicação como inseticida e fungicidas (HADFIELD; HOUGH; RICHARDSON, 1979). Ainda não há estudos da aplicação em vegetais de derivados de trealose (pulverização foliar, por exemplo) com o objetivo de aumentar a tolerância a estresses.

3 OBJETIVOS

Por meio deste estudo, buscou-se analisar as respostas fisiológicas e anatômicas do híbrido de milho em estresse hídrico com a aplicação de derivados de trealose.

3.1 Objetivo geral

Verificar a influência da trealose e seus derivados sobre a fisiologia e anatomia de plantas de milho sob déficit hídrico.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a efetividade das biomoléculas na mitigação do estresse hídrico;
- b) Avaliar as modificações na fisiologia e anatomia do híbrido após a aplicação dos derivados de trealose sob déficit hídrico;
- c) Avaliar o efeito dos derivados de trealose aplicados em milho em estágio vegetativo.

4 JUSTIFICATIVA

Segundo o IBGE (2019), o milho é um dos principais cultivos do Brasil e apresenta grande importância econômica e social. É utilizado para a alimentação animal, consumo, como matéria prima para diversos produtos industriais e é a atividade que garante a sobrevivência de pequenos produtores (DUARTE; MATTOSO; GARCIA, 2010). Até o momento, o país produziu aproximadamente 98 milhões de toneladas em sua safra 2018/19, sendo apenas o estado de Minas Gerais responsável pela produção de 6 milhões de toneladas.

De acordo com a Conab (2019), uma das principais causas da perda da produtividade de milho é o déficit hídrico gerado naturalmente por períodos de estiagem. Como o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de milho (USDA, 2019), é necessário que haja a busca por novas tecnologias para lidar com os diferentes estresses que possam prejudicar a produção agrícola e assim não comprometer a economia do país.

O dissacarídeo trealose tem sido utilizado na indução à tolerância ao déficit hídrico, sendo capaz de gerar modificações anatômicas, morfológicas e fisiológicas para a planta conseguir sobreviver e manter sua produtividade alta frente ao déficit hídrico (AKRAM *et al.*, 2016a; AKRAM *et al.*, 2016b). Entretanto, ainda há uma lacuna nas pesquisas em relação à aplicação dos derivados de trealose em plantas e a sua utilização nos vegetais com o objetivo de mitigar os efeitos causados por diferentes estresses.

REFERÊNCIAS

- ADIAHA, M.S., AGBA, O.A., ATTOE, E.E., OJKPONG, T.O., KEKONG, M.A., OBIO, A., UNDIE, U.L. Effect of Maize (*Zea mays* L.) on Human Development and the Future of Man-maize Survival: A Review. **World Scientific News**, v. 59, p. 52–62. 2016.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 169–183. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.005>
- AKRAM, N.A., NOREEN, S., NOREEN, T., ASHRAF, M. Exogenous application of trehalose alters growth, physiology and nutrient composition in radish (*Raphanus sativus* L.) plants under water-deficit conditions. **Revista brasileira de Botânica**, v. 38, p. 431–439. 2015. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0149-7>
- AKRAM, N.A., SHAFIQ, S., ASHRAF, M., AISHA, R., SAJID, M.A. Drought-induced anatomical changes in radish (*Raphanus sativus* L.) leaves supplied with trehalose through different modes. **Arid Land Research Management**, v. 30, p. 412–420. 2016a. <https://doi.org/10.1080/15324982.2016.1145760>
- AKRAM, N.A., WASEEM, M., AMEEN, R., ASHRAF, M. Trehalose pretreatment induces drought tolerance in radish (*Raphanus sativus* L.) plant some key physio-biochemical traits. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38. 2016b. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2018-1>
- ALMEIDA, A.M., CARDOSO, L.A., SANTOS, D.M., TORNÉ, J.M., FEVEREIRO, P.S. Trehalose and its applications in plant biotechnology. **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 43, p. 167–177. 2007. <https://doi.org/10.1007/s11627-006-9024-3>
- AVRAMOVA, V., ABDELGAWAD, H., ZHANG, Z., FOTSCHKI, B., CASADEVALL, R., VERGAUWEN, L., KNAPEN, D., TALEISNIK, E., GUISEZ, Y., ASARD, H., BEEMSTER, G.T.S. Drought Induces Distinct Growth Response, Protection, and Recovery Mechanisms in the Maize. **Plant Physiology**, v. 169, p. 1382–1396. 2020. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00276>
- BERGAMASCHI, H., MATZENAUER, R. O milho e o clima. Emater/RS-Ascar, Porto Alegre.
- Brodribb, T.J., Holbrook, N.M., 2003. Stomatal Closure during Leaf Dehydration, Correlation with Other Leaf Physiological Traits 1. **Plant Physiology**, v. 132, p. 2166–2173. 2014.
- BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, p. 4–10. 2017. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- BOSCH, S., DE BEAUREPAIRE, L., ALLARD, M., MOSSER, M., HEICHETTE, C., CHRÉTIEN, D., JEGOU, D., BACH, J.M. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36162>
- CARRÃO, H., NAUMANN, G., BARBOSA, P. Mapping global patterns of drought risk: An empirical framework based on sub-national estimates of hazard, exposure and. **Global Environmental Change**, v. 39, p. 108–124. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2016.04.012>
- CHEESEMAN, J. Food Security in the Face of Salinity, Drought, Climate Change, and Population Growth, Halophytes for Food Security in Dry Lands. **Elsevier Inc.** 2015. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801854-5.00007-8>
- COLAÇO, C.A.L.S., ROSER, B. Trehalose - a multifunctional additive for food preservation. **Food Packaging and Preservation**, p. 123–140. 1994. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2173-0_7
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Monitor agrícola - Safra 2018/2019**, v. 6, p. 1–113. 2009. <https://doi.org/ISSN 2318-6852>
- Chaves, M. M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1–16.
- DUARTE, J.O., MATTOSO, M.J., GARCIA, J.C. **Milho**. Importância socioeconômica. Brasília: Embrapa. 2010.
- ELLSWORTH, P.Z., COUSINS, A.B. ScienceDirect Carbon isotopes and water use efficiency in C4 plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 31, p. 155–161. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.04.006>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, W. The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. **Building climate resilience for food security and nutrition**. Rome, FAO. 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, Building climate resilience for food security and nutrition. <https://doi.org/10.1093/cjres/rst006>

- FEOFILOVA, E.P., USOV, A.I., MYSYAKINA, I.S., KOCHKINA, G.A. Trehalose : Chemical Structure , Biological Functions , **Microbiology**, v. 83, p. 184–194. 2014. <https://doi.org/10.1134/S0026261714020064>
- FERNANDEZ, O., BÉTHENCOURT, L., QUERO, A., SANGWAN, R.S., CLÉMENT CHRISTOPHE, C. Trehalose and plant stress responses: Friend or foe? **Trends Plant Science**, v. 15, p. 409–417. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.004>
- FODOR, N., CHALLINOR, A., DROUTSAS, I., RAMIREZ-VILLEGAS, J., ZABEL, F. Integrating Plant Science and Crop Modeling : Assessment of the Impact of Climate Change on Soybean and Maize Production. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, p. 1833–1847. 2017. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx141>
- FURLAN, A., BIANUCCI, E., TORDABLE, M.C., KLEINERT, A., VALENTINE, A., CASTRO, S. Dynamic responses of photosynthesis and the antioxidant system during a drought and rehydration cycle in peanut plants. **Functional Plant Biology**, v. 43, p. 337. 2016. <https://doi.org/10.1071/FP15206>
- GILL, S.S., TUTEJA, N. Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 48, p. 909–930. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- HADFIELD, A.F., HOUGH, L., RICHARDSON, A.C. The syntheses of 4,6-dideoxy-4,6-difluoro- and 4-deoxy-4-fluoro- α , α -trehalose. **Carbohydrate Research**, v. 71, p. 95–102. 1979. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86064-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86064-4)
- HELALY, M.N., EL-HOSIENY, H.A.R., EL-SARKASSY, N.M. Growth , lipid peroxidation , organic solutes , and anti-oxidative enzyme content in drought-stressed date palm embryogenic callus suspension induced by polyethylene glycol. **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 53, p. 133–141. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9815-8>
- HETHERINGTON, A.M., WOODWARD, F.I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, v. 424, p. 901–908. 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
- HSIEH, S.W., LEE, M.R., TSAI, C.W., LAI, L.Y., YEH, T., HSIEH, C.W., YANG, T.J., CHANG, S.W. Enzymatic synthesis, purification and identification of bioactive trehalose ester derivatives for health applications. **Food Bioprocesses Processing**, v. 95, p. 163–172. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.05.003>
- IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA | IBGE**. 2019. URL <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados> (accessed 4.15.19).
- ILHAN, S., OZDEMIR, F., BOR, M., Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata*. Desf. **Plant Biology**, v. 17, p. 1–6. 2014. <https://doi.org/10.1111/plb.12227>
- IM, J., KIM, S., JEONG, Y.H., KIM, W., LEE, D., LEE, W.S., CHUNG, S.K. Preparation and evaluation of BBB-permeable trehalose. *Med. Chem. Comm.*, v. 6, p. 310–316. 2012. <https://doi.org/10.1039/c2md20112g>
- KAUR, G., ASTHIR, B. Molecular responses to drought stress in plants. **Biology Plantarum**, v. 61, p. 1–10. 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10535-016-0700-9>
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**, Guanabara. ed. Rio de Janeiro. 2012.
- LARKINS, B.A. **Maize Kernel Development**, 1st ed. CABI, Boston. 2017.
- LIU, Z., JIANG, Y. **U.S. Patent No. 8,889,651**. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2014.
- LUYCKX, J., BAUDOUIN, C. Trehalose : an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology. **Clinical Ophthalmology**, p. 577–581. 2011. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S18827>
- MAGALHÃES, P.C., DURÃES, F.O.M. Fisiologia da Produção de Milho. **Circular Técnica**, v.76, p. 10. 2006. <https://doi.org/ISSN 1679-1150>
- MAHAJAN, S., TUTEJA, N. Cold , salinity and drought stresses : An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139–158. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- MARTIN-STPAUL, N., DELZON, S., COCHARD, H. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. **Ecology Letters**, v. 20, p. 1437–1447. 2017. <https://doi.org/10.1111/ele.12851>

- MATHOBO, R., MARAIS, D., STEYN, J.M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultural Water Management**, v. 180, p. 118–125. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.11.005>
- MATSUMOTO, Y., KUWABARA, K., ICHIHARA, H., KUWANO, M. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Therapeutic effects of trehalose liposomes against lymphoblastic leukemia leading to apoptosis in vitro and in vivo. *Bioorg. Med. Chemistry Letters*, v. 26, p. 301–305. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.025>
- MNIF, I., GHRIBI, D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 4310–4320. 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>
- MOHAMMADKHANI, N., HEIDARI, R. Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. **World Applies Sciences Journal**, v. 3, p. 448–453. 2008.
- MÜLLER, J., BOLLER, T., WIEMKEN, A. Review article Trehalose and trehalase in plants : recent developments. **Plant Science**, v. 112, p. 1–9. 1995. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04218-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04218-J)
- NAWAZISH, S., HAMEED, M. Leaf anatomical adaptations of *Cenchrus ciliaris* L., from the Salt Range, Pakistan against drought stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, p. 1723–1730. 2006.
- NIKOLAEVA, M.K., MAEVSKAYA, S.N., VORONIN, P.Y. Activities of Antioxidant and Osmoprotective Systems and Photosynthetic Gas Exchange in Maize Seedlings under Drought Conditions. *Russ. Journal of Plant Physiology*, v. 62, p. 314–321. 2015. <https://doi.org/10.1134/S1021443715030139>
- PEARCY, R.W., EHLERINGER, J. Comparative ecophysiology of C₃ and C₄ plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 7, p. 1–13. 1984. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01194.x>
- ROSER, B. Trehalose, a new approach to premium dried foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 2, p. 166–169. 1991. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0924-2244\(91\)90671-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0924-2244(91)90671-5)
- ROSER, M., RITCHIE, H., ORTIZ-OSPINA, E. **World of Corn 2019**. 2019. URL <https://ourworldindata.org/world-population-growth> (accessed 4.15.19)
- SEVANTO, S. Drought impacts on phloem transport. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 43, p. 76–81. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.002>
- SOLTANIZADEH, N., MIRMOGHATAIE, L., NEJATI, F., NAJAFABADI, L.I., HESHMATI, M.K. Solid-State Protein – Carbohydrate Interactions and Their Application in the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 860–870. 2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12089>
- SOUZA, T.C., MAGALHÃES, P.C., PEREIRA, F.J. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, p. 16–24. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000100003>
- SOUZA, T. C., CASTRO, E.M., CÉSAR MAGALHÃES, P., OLIVEIRA LINO, L., TRINDADE ALVES, E., ALBUQUERQUE, P.E.P. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 3201–3211. 2013a. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1355-1>
- SOUZA, T. C., MAGALHÃES, P.C., DE CASTRO, E.M., DE ALBUQUERQUE, P.E.P., MARABESI, M.A. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 515–527. 2013b. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1093-9>
- STOLLER, J. H., SALZMAN, R., LIPTAY, A. **U.S. Patent Application** No. 13/614,741. 2013.
- USDA. **World of Corn 2019**. 2019. URL <http://www.worldofcorn.com/#world-corn-production> (accessed 4.15.19)
- VALIPOUR, M., ZIATABAR AHMADI, M., RAEINI-SARJAZ, M., GHOLAMI SEFIDKOUHI, M.A., SHAHNAZARI, A., FAZLOLA, R., DARZI-NAFTCHALI, A. Agricultural water management in the world during past half century. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, p. 657–678. 2015. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.944903>
- VAN LOON, A.F., STAHL, K., DI BALDASSARRE, G., CLARK, J., RANGE CROFT, S., WANDERS, N., GLEESON, T., VAN DIJK, A.I.J.M., TALLAKSEN, L.M., HANNAFORD, J.,

- UIJLENHOET, R., TEULING, A.J., HANNAH, D.M., SHEFFIELD, J., SVOBODA, M., VERBEIREN, B., WAGENER, T., VAN LANEN, H.A.J. Drought in a human-modified world: Reframing drought definitions, understanding, and analysis approaches. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 20, p. 3631–3650. 2016. <https://doi.org/10.5194/hess-20-3631-2016>
- VILLORIA, N.B., CHEN, B. Yield risks in global maize markets: Historical evidence and projections in key regions of the world. **Weather and Climate Extremes**, v. 19, p. 42–48. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2018.01.003>
- WU, Q., JIANG, D., HUANG, C., DYK, L.F. VAN, LI, L., CHU, H.W. Trehalose-Mediated Autophagy Impairs the Anti-Viral Function of Human Primary Airway Epithelial Cells. **PLoS One**, v. 10, p. 1–13. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124524>
- XU, Z., ZHOU, G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3317–3325. 2008. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern185>
- ZHANG, Y., ROCKWELL, F.E., GRAHAM, A.C., ALEXANDER, T., HOLBROOK, N.M. Reversible Leaf Xylem Collapse : A Potential “ Circuit Breaker ” against Cavitation I. **Plant Physiology**, v. 172, p. 2261–2274. 2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01191>
- ZHOU, M.L., ZHANG, Q., SUN, Z.M., CHEN, L.H., LIU, B.X., ZHANG, K.X., ZHU, X.M., SHAO, J.R., TANG, Y.X., WU, Y.M. Trehalose Metabolism-Related Genes in Maize. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 256–271. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9368-y>

ANEXO A

Mistura de derivados de trealose mitigam efeitos causados pelo déficit hídrico em milho: uma análise da eficiência fotossintética

Alexandra dos Santos Ambrósio¹, Thiago Correa de Souza¹

¹ Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil

Corresponding author: Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Institute of Natural Sciences- ICN,700, Gabriel Monteiro Street. Phone: +553 532 991 419, FAX: +553 532 991 419, P. O. Box 37130-000, Alfenas-MG, Brazil. Email: thiago.souza@unifal-mg.edu.br.
ORCID: 0000-0002-4991-7704 **Tel.:** 55 (35) 98405-4956, **E-mail:** thiago.souza@unifal-mg.edu.br.

Resumo

O déficit hídrico é um dos principais eventos que comprometem o cultivo de milho e a aplicação de substâncias, como a trealose, tornou-se uma das soluções para mitigar estresses abióticos e expandir a agricultura. Porém, síntese de derivados de trealose e análise dos seus efeitos nas plantas ainda são desconhecidos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se a pulverização da mistura dos derivados de trealose azidídica e tosilada é capaz de mitigar o estresse gerado pelo déficit hídrico em milho através da análise da eficiência fotossintética. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos e foi utilizado um milho híbrido sensível ao déficit hídrico. Utilizou-se um pulverizador manual para aplicar a mistura de derivados (30mM) nas faces foliares adaxial e abaxial 12h antes da imposição do estresse e 5 dias depois. Quando as plantas alcançaram estágio V5/V6, foi imposto o estresse, o qual persistiu por 12 dias seguido de reidratação. A coleta de dados fisiológicos ocorreu no início e fim do estresse e na reidratação. Foram avaliados parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teor relativo de clorofila. Ao fim do experimento, as folhas foram coletadas para serem analisados os seguintes parâmetros anatômicos: espessura da nervura central, distância entre os feixes, diâmetro dos metaxilemas, área de fibras, área do floema, espessura do limbo, espessuras das epidermes e das cutículas. A pulverização da mistura de derivados aumentou a taxa fotossintética, mitigou os danos gerados no fotossistema II, elevou a taxa de transporte de elétrons e o quenching fotoquímico. Ademais, gerou modificações anatômicas na folha visando aumentar a taxa fotossintética. Conclui-se que a mistura de derivados de trealose é capaz de mitigar os danos causados pelo estresse no híbrido de milho, exibindo a possibilidade de ser um estimulante para a tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: trocas gasosas; fluorescência da clorofila *a*; *Zea mays* L.; quenching; anatomia foliar; densidade estomática

1. Introdução

O déficit hídrico é um dos principais eventos naturais que comprometem a produção de cereais, sendo responsável por causar danos e até promover a perda de mais de 80% dos cultivos agrícolas (FAO, 2018). O milho apresenta grande importância para o consumo humano e animal, visto que seus grãos são constituídos por um óleo altamente calórico (Larkins, 2017). Ademais, é matéria prima para outros alimentos, remédios, combustíveis, além de ser essencial para a sobrevivência de agricultores locais (Adiaha et al., 2016). A produção mundial de milho dobrou nos últimos 50 anos (Valipour et al., 2015) e o Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, ocupando uma posição abaixo de China e Estados Unidos no ranque mundial (USDA, 2019).

Em estágio vegetativo, constata-se que a falta de água no solo (déficit hídrico) pode acarretar em milho a redução do diâmetro do colmo, quantidade de açúcares armazenados, altura, área foliar e produtividade (Rufino et al., 2018; Magalhães and Durães, 2006; Ritchie et al., 2003). Vale ressaltar que juntamente com os estádios de florescimento (VT) e de enchimento de grãos (R3), o estágio vegetativo V5/V6 é um dos mais importantes de se estudar o efeito do déficit hídrico em milho, pois nesta etapa ocorre a diferenciação floral (Magalhães and Durães, 2006; Souza et al., 2016; Yan et al., 2016). Em estágio V5/V6, Perdomo et al. (2017) observaram que o déficit hídrico acarreta na limitação da fotossíntese, através do comprometimento da fase bioquímica com a redução da concentração de Ribulose-1,5-bisfosfato (Rubisco). No mesmo estágio, também foi observado redução do potencial hídrico, taxa de transpiração, condutância estomática e massa seca (Riboldi et al., 2016).

Sob déficit hídrico, as plantas tem a sua atividade fotossintética reduzida e apresentam maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) devido ao excesso de energia absorvido e baixo consumo desta no Ciclo de Calvin (Zandalinas et al., 2018). A primeira resposta a tal estresse é o fechamento estomático, o qual diminui a perda de água para a atmosfera através do processo de transpiração, mas também reduz a taxa fotossintética no vegetal (Lawson et al., 2018; Lawson and Vialet-Chabrand, 2019). A diminuição de água absorvida acarreta na fotoinibição, onde há uma redução do quenching fotoquímico e aumento do quenching não fotoquímico, ou seja, a planta está destinando menos energia para o processo

fotossintético e está dissipando mais energia na forma de calor ou para a formação de EROs (Hazrati et al., 2016; Liu et al., 2012; Mathobo et al., 2017).

Parâmetros ligados a eficiência fotossintética como trocas gasosas foliares (fotossíntese, condutância estomática, entre outros), fluorescência da clorofila *a* (avaliação dos quenchings, entre outros) e anatomia foliar (densidade de estômatos, espessura do limbo, da epiderme e da cutícula) são ferramentas morfofisiológicas primordiais e eficientes para a discriminação de genótipos sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico (Efeoğlu et al., 2009; Jabeen et al., 2008; Reis et al., 2018; Souza et al., 2013a).

Frente a diferentes estresses, é necessário que haja desenvolvimento tecnológico a fim de se criar novos métodos para lidar ou contornar essas barreiras à agricultura. Neste sentido, tem-se os bioestimulantes, o qual referem-se a substâncias (exceto nutrientes ou pesticidas) ou microrganismos que promovem aumento no crescimento, por meio da melhora da absorção de nutrientes, tolerância ao estresse abiótico e qualidade dos produtos (Calvo et al., 2014; Jardin, 2015). A aplicação de bioestimulantes com intuito de indução à tolerância tem como objetivo melhorar a fisiologia da planta, aumentando o status hídrico foliar, a atividade enzimática antioxidante e a atividade fotossintética (Kałużewicz et al., 2017; Souza et al., 2013b). Em milho observa-se a aplicação de diversos bioestimulantes, os quais podem ser produzidos naturalmente ou sintetizados em laboratório, tais como silício, quitosana, ácido abscísico, ácido ascórbico, trealose, entre outros (Ali and Ashraf, 2011; Reis et al., 2018; Van Oosten et al., 2017; Yamauchi, 2018).

Já é comprovado que a aplicação exógena de trealose em milhos é capaz de induzir uma resposta satisfatória em relação aos danos causados pelo estresse hídrico, aumentando parâmetros fisiológicos, biomassa e posteriormente a produção de grãos (Ali and Ashraf, 2011; Zhou et al., 2014). A trealose (α -D-glicopiranosil-1,1- α -D-glicopiranosideo) é um dissacarídeo não reduzido muito apreciado pelas indústrias por ser um açúcar natural amplamente encontrado na natureza (cogumelos, camarões, insetos, bactérias e plantas) e que não apresenta toxicidade (Bosch et al., 2016; Mnif and Ghribi, 2016). Apesar de existir trabalhos explorando a relação entre o açúcar natural trealose e a tolerância ao déficit hídrico como relatado anteriormente, assim como trabalhos explorando semissíntese de derivados de trealose em áreas da saúde (Hsieh et al., 2015; Oliveri et al., 2016) ainda se faz necessário uma maior contribuição científica sobre o assunto, principalmente envolvendo pulverização de novos derivados na agricultura. Praticamente ainda não se estudou o efeito de aplicações de derivados semissintéticos de trealose em plantas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar

os efeitos da pulverização da mistura dos derivados de trealose tosilada e azido na eficiência fotossintética em milho sob déficit hídrico avaliando-se as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e anatomia foliar.

2. Material e métodos

2.1 Síntese das biomoléculas

Os derivados de trealose utilizados foram: trealose tosilada, 6-O-[(4-metilfenil)sulfonil]- α -D-glicopiranosídeo de 6-O-[(4-metilfenil)sulfonil]- α -D-glucopiranosila – PM = 650,13g/mol] (**2**) e trealose azídica, 6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de 6-azido-6-desoxi-D-glucopyranosila – PM = 392,13) (**3**) (Fig. 1). Inicialmente, a trealose (Vetec-Sigma®) (**1**) foi submetida à reação com cloreto de p-toluenossulfonila (cloreto de tosilato) em piridina anidra, seguida da adição de anidrido acético para formar o derivado intermediário **4** (Menger and Mbadugha, 2001). O derivado intermediário azido **5** foi produzido por reação de **4** com azida de sódio em piridina (Menger and Mbadugha, 2001). A última reação foi a desproteção das hidroxilas pela hidrólise básica dos ésteres acetilados com hidróxido de potássio em metanol para formar os derivados desprotegidos **2** e **3** (de Souza et al., 2015) (Fig.1). Detalhes das reações dos derivados intermediários e dos derivados de trealose utilizados neste experimento e de suas caracterizações químicas podem ser observados no Material Suplementar.

2.2 Condições locais e material vegetal

O experimento foi conduzido na Unidade Educacional Santa Clara da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), situada na cidade de Alfenas, no estado Minas Gerais (altitude de 818 m, latitude Sul 21°25', longitude Oeste 45°58') em casa de vegetação, cuja as temperaturas mínima e máxima foram de 25 e 30 °C respectivamente e a umidade relativa média de 74,44%. A radiação global foi medida dentro da casa de vegetação através de um radiômetro (Instrutherm/MES-100) obtendo-se um valor médio de 900 W m² ao meio dia.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos com capacidade de 10 dm³ e foi utilizado a camada superficial (0 a 0,2m) de solo classificado, de acordo com a Embrapa (2018) como Latossolo Vermelho distrófico. Não foi necessário realizar a calagem do solo. A adubação foi feita de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio 11g de superfosfato simples por vaso (18% P₂O₅). Cada vaso recebeu 4 sementes de milho híbrido BRS 1030, sensível ao déficit hídrico (Souza et al.,

2013a), oriundo do Programa de Melhoramento da Embrapa. Após a emergência, foi efetuado raleio para manter duas plantas por vaso. A seguir, foi realizada adubação, por meio de solução, e foram aplicados 1 mg dm^{-3} de boro e 2 mg dm^{-3} de zinco, empregando-se as fontes p.a. H_3BO_3 (11% B) e ZnSO_4 (20% Zn). Durante a condução do experimento foram realizadas adubações com N e K, por meio de solução, semanalmente após o raleio. Em cada adubação foram aplicados 50 mg dm^{-3} de N e 117 mg dm^{-3} de K, e as fontes utilizadas foram a ureia (45% N) e o KCl (50% K_2O).

2.3 Imposição do déficit hídrico, aplicação da trealose e derivados e design experimental

O teor de água no solo foi monitorado através de pesagens dos vasos nos períodos da manhã e da tarde (8 e 18 h) com um auxílio de uma balança digital 25kg (Modelo 200SS, Black Bull, São Paulo, SP). A reposição hídrica foi realizada com base nas leituras obtidas com a diferença de pesos dos vasos e a água foi reposta até a capacidade de campo (CC) durante o período que antecedeu a imposição dos tratamentos. Esses cálculos foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica.

Foram impostos dois tratamentos: irrigado (IRRI) e déficit hídrico (WD) no estádio de 4 folhas totalmente expandidas (V4). O primeiro consistiu na irrigação diária até o solo alcançar 70% da capacidade de campo (CC) e o segundo a irrigação foi realizada aplicando-se 55 % da água total disponível.

Já que o potencial hídrico de base reflete o teor hídrico da planta e do solo (equilíbrio) (Bergonci et al., 2000), para caracterizar os tratamentos irrigados e estressados (déficit hídrico), foi utilizado o potencial hídrico de base (pre-dawn, Ψ_{pd}) determinado antes do amanhecer (5h a.m) através de uma câmara de pressão do tipo Scholander (Soil Moisture Equipment Corp., Modelo SEC-3015G2, Santa Barbara CA, USA) em quatro folhas totalmente expandidas. O tratamento irrigado consistiu em valores médios de $-0,31 \text{ Mpa}$ e o tratamento déficit hídrico consistiu em valores de $-1,7 \text{ Mpa}$. Ao todo foram 10 dias de déficit hídrico e a imposição do estresse iniciou-se de fato em plantas no estádio V5/V6, fase de maior susceptibilidade ao estresse hídrico (Magalhães and Durães, 2006).

Doze horas antes da imposição do déficit hídrico as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: trealose na concentração de 30 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA) mistura dos derivados de trealose (azida + tosila) na concentração de 15 mM cada totalizando 30mM. As concentrações foram baseadas pelo que foi recomendado por Ali e Ashraf (2011). Uma segunda aplicação foi realizada no quinto dia de déficit hídrico. Os dissacarídeos foram

dissolvidos em água e etilenoglicol (20%) e pulverizados na parte aérea com um pulverizador mecânico de pressão (Guarani, PCP1P, capacidade de 2 litros) na proporção de 12,5 mL planta⁻¹ em cada aplicação e de acordo com o vídeo (Material Muplementar S1).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), compreendendo 4 condições: déficit hídrico (WD), déficit hídrico com pulverização de trealose (WD+TRE), déficit hídrico com pulverização da mistura dos derivados de trealose (WD+TD) e irrigado (IRRI), cada um com 5 repetições. As análises foram realizadas 24h após a pulverização (1dwd), no final do período de estresse hídrico (12 dias de déficit hídrico, 12dwd), 12h após o reestabelecimento hídrico (rehy) até o solo atingir 70% da capacidade de campo. Contudo não se procedeu a comparação estatística entre os dias, apenas entre os tratamentos. Durante esse período foram analisadas as seguintes variáveis: trocas gasosas foliares, teor relativo de clorofila e fluorescência da clorofila *a*. Ao fim do experimento, coletaram-se folhas para análise anatômica.

2.4 Medidas de trocas gasosas foliares e teor relativo de clorofila

As medidas de trocas gasosas foram feitas através de um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, Model LI-6400 XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). Todas as medidas foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 10:00 na última folha totalmente expandida. As variáveis avaliadas foram taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (*g_s*), transpiração (*E*) e eficiência do uso da água (*WUE*). As medidas foram feitas em uma área foliar de 6 cm², a densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de 1500 μmol m⁻² s⁻¹ com fonte de luz LED azul-vermelho (6400-02B LED) e temperatura foliar controlada (30°C). O teor relativo de clorofila (SPAD) foi determinado por um clorofilômetro (modelo Minolta SPAD-502, Konica Minolta, Chiyoda, Tóquio, Japão) por meio da média de seis leituras por planta da parte média da última folha totalmente expandida.

2.5 Medidas de fluorescência da clorofila

Na medição dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, foi utilizado um fluorômetro modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Após uma adaptação de 30 min no escuro, foi medida a fluorescência mínima (*F_o*) com uma luz suficientemente baixa evitando reações fotoquímicas e a fluorescência máxima (*F_m*), aplicando-se por 0,8 segundos um pulso de luz saturante de 7000 μm de fótons m⁻² s⁻¹. Nas amostras adaptadas no escuro, a máxima eficiência do fotossistema (FS II) foi estimada pela razão *F_v*/*F_m*. Em seguida as folhas foram

iluminadas com luz actínica com intensidade de $1500 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Então a fluorescência constante (F_s) foi obtida e em seguida outro pulso de luz saturante foi aplicado por 1s para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas folhas (F_m'). A luz actínica foi removida e as folhas foram irradiadas com luz vermelho-distante, para obtenção de F_o adaptado a luz (F_o'). O quenching fotoquímico foi calculado como $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$, e o quenching não fotoquímico foi calculado como $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$. Outros parâmetros também foram avaliados como: taxa de transporte de elétrons (ETR) = $[(F_m' - F_s) / F_m'] \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84$; produção quântica fotoquímica efetiva (Y_{II}) = $F_m' - F_s / F_m' = \Delta F / F_m'$, rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia não fotoquímica do FSII, $Y_{NO} = F_s / F_m$, rendimento quântico de dissipação regulada de energia não fotoquímica do FSII, $Y_{NPQ} = F_s / F_m' - F_s / F_m$ (Snel and van Kooten, 1990).

2.6 Análise da anatomia foliar

Para a anatomia, as folhas foram retiradas, lavadas com água corrente e fixadas em uma solução de etanol 70 % (Johansen, 1940), até o momento da realização dos cortes anatômicos. Foram realizadas secções transversais à mão livre com o auxílio de uma lâmina de aço e um suporte (pecíolo de embaúba). As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio 5% por 8 minutos, ácido acético por 5 minutos, reidratados por 15 minutos, corados com Safrablau (Azul de Astra e Safranina na proporção 7,5:2,5) e montados em lâminas com glicerina 50%. As secções foram fotografadas em microscópio óptico de luz Axio Scope A1 acoplado a uma câmara digital. As fotomicrográfas foram utilizadas para as medições dos seguintes parâmetros para as folhas: espessura da nervura central (LCT), distância entre os feixes da nervura central (DSS), diâmetro dos metaxilemas (XD), área de fibras da nervura central (FA), área do floema (F), espessura do limbo (LBT), espessura da epiderme (ET) e espessura da cutícula (CT). As medições de epiderme e cutícula foram realizadas em nas faces adaxiais e abaxiais.

Para a análise dos cortes paradérmicos, espalhou-se uma fina camada de cola (Super Bonder®, Loctite, São Paulo – SP) sobre a folha. Após a secagem, retirou-se a película formada, a qual continha a impressão da superfície foliar e foram montadas lâminas para serem fotografadas assim como os cortes transversais. Este procedimento foi realizado tanto na face adaxial quanto na face abaxial da folha. Os parâmetros analisados em ambas faces foram: Índice estomático (número de estômatos/número de células epidérmicas, SI), número de células paradérmicas (PC), densidade estomática (número de estômatos/ mm^2 , SD), diâmetro polar dos estômatos (PD) e funcionalidade estomática (diâmetro polar/diâmetro equatorial, SF).

2.7 Análise dos dados

Foram calculadas as médias e o \pm erro padrão (SE) para cada parâmetro. Para análise estatística dos resultados foi realizada uma comparação somente entre os tratamentos em cada dia após a aplicação (1dwd = um dia após a aplicação, 12dwd – 12 dias após a aplicação e rehydration) e foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Scott Knott, a 0,05 % de significância ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

3. Resultados

3.1 Trocas gasosas foliares e teor relativo da clorofila

Ao observar a taxa fotossintética (A), pode-se constatar que no primeiro dia de estresse (1dwd), o tratamento IRRI seguido do WD+TD apresentaram maiores médias. (Fig. 2A). Com doze dias de estresse (12dwd) o tratamento irrigado apresentou maior taxa fotossintética A seguido do restante dos tratamentos que não se diferenciaram. No período após a reidratação (Rehy), a maior média de A foi no IRRI seguido de WD+TRE e WD+TD.

Para a condutância estomática (g_s), com 1 dia de estresse, o tratamento WD+TD apresentou valores mais altos em relação aos tratamentos estressados (WD e WD+TRE, Fig. 2B). Com 12 dias, o tratamento WD+TRE apresentou os menores valores de g_s . Mas quando as plantas foram reidratadas, houve aumento na condutância estomática em relação ao tratamento WD, principalmente nos tratamentos WD+TD seguido de WD+TRE. Nenhum dos tratamentos alcançaram as médias das plantas irrigadas na reidratação.

Os valores de transpiração (E) com 1 dia de estresse apresentaram o mesmo comportamento que os valores de fotossíntese e condutância estomática (Fig. 2C). Com 12 dias de estresse as menores taxas de transpiração foram encontradas nos tratamentos WD+TD e WD+TRE. Já na reidratação, observou-se um padrão crescente, tendo como menor média o WD, seguido de WD+TRE, WD+TD e IRRI.

Os dados do primeiro dia de estresse (1dwd) e da reidratação (Rehy) apresentaram o mesmo comportamento na análise da eficiência do uso da água (WUE), sendo o tratamento WD+TD com menor média. (Fig. 2D). Com 12 dias de estresse, os valores dos tratamentos permaneceram estatisticamente iguais, exceto o irrigado, o qual se apresentou menor.

Em relação ao teor relativo de clorofila em 1dwd, o tratamento WD apresentou os menores valores e o restante dos tratamentos foram semelhantes ao irrigado (Fig. 2E). Com 12

dias, o tratamento IRRI apresentou maior teor relativo de clorofila do que os demais tratamentos, que não se diferiram estatisticamente.

3.2 Fluorescência da clorofila a

Ao avaliar a taxa de transporte de elétrons (ETR) em um dia de estresse, observou-se que as plantas dos tratamentos WD+TD e WD+TRE tiveram maiores taxas que aquelas do tratamento WD. Em 12 dias de estresse observou-se que o tratamento WD+TD ainda apresentou maior ETR do que os outros tratamentos, com exceção do IRRI. Na reidratação, os valores dos tratamentos com trealose e com derivados não apresentaram diferença em relação ao tratamento irrigado (Fig. 3A) e foram superiores do que o tratamento WD.

Com 1 dia de estresse, os maiores valores de máxima eficiência quântica do FSII (F_v/F_m) foram nos tratamentos IRRI e WD+TRE. Contudo aos 12 dias de estresse, após o tratamento IRRI, a maior F_v/F_m foi encontrada em WD+TD. Na reidratação, todos os tratamentos apresentaram valores estatisticamente iguais (Fig. 3B).

O quenching fotoquímico (q_P) no primeiro dia de estresse, mostrou-se superior no tratamento irrigado, seguido do tratamento WD+TRE. Com 12 dias de estresse e na reidratação, as plantas sob WD+TRE e WD+TD apresentaram q_P semelhantes ao IRRI (Fig. 3C).

A produção quântica fotoquímica efetiva do FSII (Y_{II}) apresentou o mesmo comportamento no período de 1 e 12 dias de estresse (1dwd e 12dwd), onde o tratamento WD+TD foi superior aos demais tratamentos estressados, porém inferior ao irrigado. Na reidratação, os tratamentos com trealose e mistura de derivados de trealose foram superiores ao déficit hídrico (WD) e irrigado (IRRI) (Fig. 3D).

Após 1 dia de estresse, o quenching não fotoquímico (NPQ) apresentou maior valor no tratamento WD e o menor valor no tratamento IRRI (Fig. 4A). Em relação ao tratamento déficit hídrico tanto a trealose quanto os derivados diminuíram NPQ. Aos 12 dias de estresse, essa diminuição ocorreu apenas com o tratamento WD+TRE. No período de reidratação não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 4A).

O tratamento IRRI apresentou a maior média em relação aos demais tratamentos para o rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia não fotoquímica do FSII ($Y(NO)$) após 1 dia de estresse. Contudo com o aumento de dias de estresse (12dwd), apenas o tratamento WD+TD se diferenciou apresentando médias menores que os demais. Posteriormente na reidratação, somente o tratamento WD se diferenciou, apresentando um aumento de $Y(NO)$.

Ao analisar o rendimento quântico de dissipação regulada de energia não fotoquímica do FSII ($Y(NPQ)$), é possível verificar que o tratamento IRRI apresentou as menores médias em relação aos demais com 1 dia de estresse hídrico. Com 12 dias de estresse, observou-se que o tratamento WD apresentou a menor média, porém na reidratação, este tratamento apresenta um aumento. WD+TRE e WD+TD aos 12dwd resultaram em médias de $Y(NPQ)$ semelhantes ao IRRI.

3.3 Anatomia foliar

Ao avaliar os parâmetros das secções transversais, verificou-se que as médias da espessura da nervura central, distância entre os feixes da nervura central, diâmetro dos metaxilemas e área de fibras da nervura central são estaticamente iguais entre os tratamentos (dados não mostrados). WD e IRRI obtiveram médias maiores de área de floema da nervura central (FA) em relação a WD+TD e WD+TRE (Fig. 5A). Para a espessura do limbo foliar (LBT), a maior média foi observada em WD+TRE, seguido de WD, enquanto em WD+TD e IRRI apresentaram menores médias sem diferença estatística entre si. As médias da espessura da epiderme (ET) adaxial dos tratamentos são estatisticamente iguais, enquanto que na ET abaxial do WD+TD foram observadas médias superiores aos demais tratamentos. WD+TRE e IRRI obtiveram as maiores médias de espessura da cutícula (CT) adaxial e, na parte abaxial, o único tratamento que se diferenciou dos demais apresentando médias menores foi WD+TD.

A análise das secções paradérmicas indicaram que não houve diferença significativa nos valores de número de células epidérmicas e índice estomático. As médias de densidade estomática (SD) adaxial (Fig. 6A) foram iguais, enquanto na abaxial, as médias de WD+TD se sobrepuseram em relação aos demais tratamentos. Ao analisar o diâmetro polar (PD) da face adaxial, também observou-se maiores médias no tratamento IRRI (Fig. 6B). WD+TRE apresentou maior funcionalidade estomática (SF) adaxial seguido de IRRI, ao passo que os demais tratamentos apresentaram médias iguais (Fig. 6C). Não houve diferença estatística entre as médias de SF abaxiais.

4. Discussão

As raízes, ao detectarem a redução de água no ambiente, são responsáveis pela sinalização inicial para ativar mecanismos de tolerância ao estresse hídrico (Arend et al., 2015). A redução do turgor das células como produto da redução do potencial hídrico nestes órgãos deflagra na produção de ácido abscísico e consequente fechamento estomático (Takahashi and

Shinozaki, 2019). Este comportamento dos estômatos é considerado a primeira linha de defesa ao déficit hídrico, porém é acompanhado da redução da assimilação de carbono, comprometendo o processo fotossintético (A) em alguns casos (Chaves, 1991; Tounekti et al., 2018). Sabe-se que a aplicação foliar de trealose promove aumento de A (Ali and Ashraf, 2011), como foi verificado neste trabalho no período de reidratação (rehy), provavelmente devido ao aumento da assimilação de CO_2 , como ocorre em plantas que expressam o gene para a produção de trealose fosfato sintase (TPS) (Morgutti et al., 2019; Paul et al., 2001). Já a pulverização da mistura de derivados de trealose (TD) mostrou-se mais eficiente em mitigar a redução de A promovida pela falta de água no solo no início do estresse (1dwd), aparentando desencadear uma resposta mais rápida ao estresse do que a própria trealose.

O fechamento estomático acarreta na redução da condutância estomática (g_s), a qual pode ser considerada o indicador mais sensível aos diferentes níveis de disponibilidade de água no solo (Miyashita et al., 2005; Yan et al., 2016). Porém a redução de g_s também diminui a perda de água pela folha, diretamente relacionada ao resfriamento da mesma (Urban et al., 2017), e limita a entrada de CO_2 no mesófilo, comprometendo a produção de amido devido a redução das atividades das enzimas ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), enzima málica dependente de NADP (NADP-ME), frutose-1.6-bisfosfatase (FBPase) e piruvato ortofosfato diquinase (PPDK) (Mohammadi et al., 2018; Perdomo et al., 2017). No período de reidratação (após o estresse), a aplicação foliar de trealose induziu o aumento de g_s , como ocorreu previamente com cultivares de milho (Ali and Ashraf, 2011), e o oposto foi observado em rabanetes (Akram et al., 2015). Sob déficit hídrico existem duas limitações fotossintéticas no milho: limitação estomática (relacionada a condutância estomática) e não estomática, como por exemplo o aumento da temperatura ou a redução da concentração de CO_2 interno que compromete o funcionamento das enzimas do aparato fotossintético (Chatterjee and Basu, 2011; Parry et al., 2007; Perdomo et al., 2017). Observou-se que a mistura de derivados de trealose induziu um aumento significativo na fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), na transpiração (E) e também na densidade estomática (SD) com médias superiores ao tratamento com apenas trealose. O maior número de estômato por área e a elevação de g_s provavelmente levou ao aumento de A no tratamento com a mistura de derivados, já que uma maior condutância estomática promove maior assimilação de carbono para o processo fotossintético (Farquhar and Sharkey, 1982; Hubbard et al., 2001) mostrando que a mistura de derivados de trealose alivia a limitação estomática das plantas de milho sob déficit hídrico.

Como g_s é reduzida em plantas sob déficit hídrico, a taxa de transpiração (E) segue o mesmo comportamento, já que o fechamento estomático é uma resposta para diminuir a perda de água para o ambiente e assim evitar a dessecação (Gu et al., 2012; Lawson et al., 2006). Ali e Ashraf (2011) observaram que a aplicação de trealose em milho aumentou g_s e, conseqüentemente, intensificou E para que o processo fotossintético não fosse tão prejudicado pelo estresse hídrico imposto. Diversos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico em genótipos de milho já foram encontrados, como a tendência a abrir os estômatos mais rapidamente para resfriar as suas folhas além de realizarem ou retomarem a sua fotossíntese mais rapidamente (Reis et al., 2018; Souza et al., 2013a; Souza et al., 2013b) devido a um melhor status hídrico nas folhas.

Essa resposta após a pulverização da trealose e principalmente pela mistura de derivados de trealose poderia ser explicada pelo maior acúmulo desse açúcar no citoplasma já que diversos autores demonstram aumento de trealose sob déficit hídrico devido à indução de expressão de TPS genes que codificam enzimas responsáveis pela biossíntese da trealose (Eleutherio et al., 2015; Fernandez et al., 2010; Iordachescu and Imai, 2008; Mu et al., 2016). Esse acúmulo poderia levar a uma modificação osmótica e melhor status hídrico foliar, pois são consideradas como solutos compatíveis de diversas plantas. Esses solutos compatíveis são moléculas não-tóxicas capazes de acumular em altas concentrações no citoplasma e participam na manutenção do turgor e/ou na proteção de estruturas macromoleculares contra os efeitos de seca (Anjum et al., 2017b; Fang and Xiong, 2015).

Outra explicação poderia ser que a trealose (e com mais intensidade os derivados de trealose) poderiam estar induzindo o sistema antioxidante das plantas (Kosar et al., 2018b; Mostofa et al., 2015; Zhao et al., 2019) já que as EROs acarretam grandes danos no processo fotossintético de genótipos de milho sensíveis sob déficit hídrico (Anjum et al., 2017a, 2017b; Rohman et al., 2016). Zhao et al. (2019), confirmam que a trealose acarreta na redução de EROs acumulados e aumenta a concentração de enzimas antioxidantes. De fato já foi relatado na literatura que a trealose pode induzir diversos genes associados ao etileno e ao metil-jasmonato que estão ligados na defesa contra o estresse abiótico (Bae et al., 2005). Assim a aplicação da mistura de derivados mostrou-se mais eficiente que a trealose na mitigação do estresse hídrico.

As medidas de eficiência do uso da água (WUE) e teor relativo de clorofila (SPAD) podem ser utilizadas para classificar a tolerância de algumas espécies ao estresse hídrico, como é o caso do amendoim e do milho (Arunyanark et al., 2008; Silva et al., 2007; Songsri et al.,

2009). WUE é utilizada para verificar a capacidade de “economizar” água das plantas, já que é um parâmetro relacionado ao consumo de água (transpiração ou condutância estomática) e fotossíntese (Chen et al., 2009). Quando a planta sofre com déficit hídrico, ocorrem alterações nos valores de A , g_s , T promovendo um aumento em WUE através da mudança do comportamento dos estômatos para aumentar a assimilação de CO_2 , diminuir a perda de água e minimizar os danos nos tecidos (Li et al., 2017; Liu et al., 2016; Nemali et al., 2015). A pulverização da mistura de derivados de trealose reduziu as médias de WUE em $1dwd$ e $rehy$, como foi observado em girassóis com a aplicação foliar de trealose por Kosar et al. (2018a). Isto sugere que a mistura de derivados é eficiente em minimizar os efeitos gerados pela falta de água permitindo maior status hídrico, o que reflete em melhores condições para o uso da água, pois mesmo sob seca mantém uma abertura estomática, descartando a necessidade de se ter valores altos de WUE para garantir a sobrevivência da planta. Desta forma, os derivados de trealose agem permitindo maior Uso de água (Water Use, WU) e não maior Eficiência do Uso da Água (Water Use Efficiency, WUE). Essa maior possibilidade de gastar água pelas plantas de milho que receberam os derivados de trealose pode ser justificado por uma possível melhor osmoproteção e osmorregulação por esses açúcares derivados da trealose (Ali and Ashraf, 2011; Anjum et al., 2017a; Fang and Xiong, 2015).

O déficit hídrico pode acarretar tanto no aumento, redução ou não gerar nenhuma alteração no teor de clorofila (SPAD) (Dordas et al., 2018; Puangbut et al., 2017; Song et al., 2018). Sabe-se que a aplicação de trealose aumenta o teor de clorofila sob tal estresse, devido a sua capacidade de manter a estabilidade da clorofila e equilibrar o potencial osmótico do cloroplasto (Akram et al., 2015; Kosar et al., 2018b; Tarek et al., 2017). Provavelmente, a trealose também é responsável pela neutralização de EROs, minimizando o dano nas células responsáveis pela fotossíntese, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Mostofa et al., 2015).

Sabe-se que plantas sob déficit hídrico que possuem as médias de g_s reduzidas, apresentam também baixos valores de ETR (Flexas et al., 2002; Naidoo and Naidoo, 2018). Durante o déficit hídrico, as taxas de transporte de elétrons (ETR) nas folhas de milho tratados com a mistura de derivados de trealose corroboraram com g_s e A , mostrando que, o transporte de elétrons e o comportamento dos estômatos funcionam em conjunto para suprir a demanda de CO_2 e água no metabolismo das plantas (Gleason et al., 2017) e os derivados potencializam o processo fotossintético. Entende-se que em condições sem estresse, plantas que produzem mais trealose apresentam maior ETR (Garg et al., 2002), mas não foram encontrados estudos

relacionando este parâmetro com a aplicação de trealose ou derivados em plantas sob déficit hídrico. Plantas de milho tolerantes ao déficit hídrico possuem maiores ETR sob estresse (Souza et al., 2013b) e os derivados de trealose parecem mais uma vez mitigarem o estresse permitindo este aumento e induzindo certa tolerância.

A redução da eficiência da fotossíntese (F_v/F_m) causada por déficit hídrico, ocorre devido aos danos gerados no centro de reação do fotossistema II. Assim, F_v/F_m pode ser utilizado para verificar os danos no aparato fotossintético causados por estresses (Baker and Rosenqvist, 2004; Souza et al., 2013b). A pulverização da mistura de derivados de trealose mostrou-se eficiente em mitigar a fotoinibição devido ao déficit hídrico. A trealose também está relacionada a uma melhor proteção da Proteína D1 aliviando a fotoinibição em trigo sob estresse por calor (Luo et al., 2018).

Sob déficit hídrico ocorre a redução do quenching fotoquímico (q_P), indicando que ocorre uma diminuição na abertura nos centros de reação do fotossistema II das plantas (incluindo o milho) (Reis et al., 2018; Guo et al., 2016). Tanto no início do estresse quanto no fim, a pulverização dos dissacarídeos acarretou em um aparato fotossintético mais eficiente do que o tratamento sem a pulverização. Plantas transgênicas de tabaco que apresentavam alta produção de trealose, tiveram seus valores de F_v/F_m e q_P maiores do que plantas não transgênicas sob déficit hídrico (Pilon-Smits et al., 1998).

A fração de energia fotoquimicamente convertida pelo fotossistema II pode ser medida através da produção quântica fotoquímica efetiva do FSII (Y_{II}) e o déficit hídrico também promove a redução no Y_{II} diminuindo a capacidade fotossintética (Sousa et al., 2017; Lima et al., 2018; Wang et al., 2018). Apesar do déficit acarretar nesta diminuição nas plantas de milho, os derivados de trealose amenizaram este efeito. Em trabalho com transgênicos de tabaco, constatou-se que plantas que produziam mais trealose tiveram menor redução de Y_{II} em relação as demais sob déficit hídrico (Penna, 2003). Esse aumento da assimilação de CO_2 , do F_v/F_m e ETR das plantas tratadas com trealose e os derivados de trealose pode ser explicado por uma superexpressão do gene *OTsA* envolvido na produção de trealose-6-fosfato (precursor de trealose) (Luo et al., 2018; Pellny et al., 2004; Zhou et al., 2014). Pode-se observar que a mistura dos derivados tosila e azido parecem/poderiam estar influenciando mais este gene do que a própria trealose.

O complexo antena possui um mecanismo para que o excesso de energia absorvido não comprometa o funcionamento do aparato fotossintético. O quenching não fotoquímico (NPQ) representa a energia não utilizada no processo fotossintético, a qual é dissipada na forma não

radioativa (calor) para evitar a formação de EROs (Misra et al., 2012; Serôdio and Lavaud, 2011; Szafrńska et al., 2016). Este mecanismo pode ser considerado uma medida fotoprotetora, porém, em excesso, essa dissipação de energia pode ser prejudicial para as plantas devido ao menor investimento em uma dissipação fotoquímica (qP) (Berteotti et al., 2016). Um dos efeitos amenizadores do déficit hídrico pela aplicação de trealose que observamos neste trabalho, também foram verificados por Pilon-Smits et al. (1997) estudando tabaco e Gao et al. (2013) com *Vicia faba* em que a aplicação de trealose reduziu NPQ e aumentou qP sob déficit hídrico

A energia não correspondente a Y(II) pode ser classificada como rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia não fotoquímica do FSII (Y(NO)) ou como rendimento quântico de dissipação regulada de energia não fotoquímica do FSII (Y(NPQ)). A capacidade dos derivados de trealose ao longo do estresse em dissipar o excesso dos elétrons e proteger os fotossistemas fica bem evidenciada na análise da partição do NPQ, já que em 12 dias de estresse essas moléculas resultaram, diferentemente do tratamento apenas sem aplicação, em manutenção de Y(NPQ) e diminuição de Y(NO). Este representa a energia não fotoquímica dissipada passivamente na forma não regulada devido ao fechamento dos centros de reação do fotossistema II (por exemplo energia que é canalizada para as EROs), enquanto Y(NPQ) representa a energia dissipada na forma de calor do mecanismo regulado do NPQ (ciclo das xantofilas, liberação de calor) (Cousins et al., 2002; Klughammer and Schreiber, 2008). Essa indução dos derivados de trealose acarreta na liberação de energia para reações enzimáticas e calor, o que evita a formação de Espécies Reativas de oxigênio (EROs) (Reis et al., 2018), mostrando uma mitigação da pressão gerada pela intensidade de energia sobre os centros de reação (Khan et al., 2017).

O déficit hídrico pode acarretar no aumento da área do floema da nervura central das folhas (F), porém em algumas cultivares de milho a falta de água não influenciou no tamanho dos feixes vasculares foliares (Guha et al., 2018; Hoque et al., 2018) corroborando com o que foi encontrado em nosso trabalho. O aumento da área do floema indica uma maior quantidade de vasos que podem transportar açúcares para regiões em desenvolvimento (como novas folhas e raízes) ou para promover a osmorregulação (Das et al., 2015), porém os açúcares aplicados neste projeto diminuíram a área de floema.

A espessura do limbo (LBT) é um parâmetro com relação direta a espessura do mesofilo e das epidermes. Trabalhos com déficit hídrico mostraram resultados variados em relação a espessura do mesofilo, onde ocorreu redução, aumento ou não houve diferença (Chartzoulakis et al., 2002; Hameed et al., 2002; Scoffoni et al., 2014; Souza et al., 2010). Souza e

colaboradores (2013a) observaram aumento na espessura do mesofilo em milho sob déficit hídrico, porém não houve diferença entre o genótipo sensível e tolerante a seca. Em relação a epiderme (ET), a mistura de derivados de trealose proporcionou um aumento da espessura da face abaxial, tornando-se mais eficiente em evitar a perda de água pela superfície foliar (Nawazish and Hameed, 2006) do que a própria trealose. Neste trabalho, é possível observar que a LBT de WD+TRE foi maior do que em IRRI, porém a espessura das epidermes e das cutículas (CT) foram iguais entre os dois tratamentos. É interessante notar que a mistura dos derivados de trealose conduziu a folhas de milho mais finas (LBT), com menor espessura de cutícula (CT), características anatômicas estas semelhantes a folhas de plantas que estão em condições mais favoráveis de umidade. Assim, novamente observa-se que a mistura de derivados pode estar aliviando as plantas sob estresse hídrico deixando uma condição hídrica tal que as plantas não investem em adaptações anatômicas para ambientes secos.

Uma densidade estomática (SD) maior, ou seja, maior número de estômatos por área, pode favorecer as trocas gasosas foliares (Souza et al., 2010). A SD das folhas aumenta quando a planta está sob déficit hídrico moderado, porém decai sob estresse severo (Xu and Zhou, 2008). A falta de água faz com que a planta controle o desenvolvimento dos estômatos na formação de uma nova folha, reduzindo SD para diminuir a perda de água (Bi et al., 2017; Greco et al., 2012). Porém observa-se que a mistura de derivados aumentou a SD otimizando maior trocas gasosas (Fig. 7) e corroborou com os valores de fotossíntese, condutância estomática e demais parâmetros encontrados neste tratamento.

O diâmetro polar dos estômatos (PD) e a funcionalidade estomática (SF) estão ligados ao tamanho dos estômatos e conseqüentemente a área de abertura e a economia de água podendo melhorar o status hídrico das plantas (Zhao et al., 2015). A pulverização da mistura de derivados de trealose diminuiu a SF o que indicaria em um não uso eficiente de água, levando a uma modificação morfofisiológica que, embora acarrete em maior perda de água (E), há maior otimização na assimilação de CO₂. Diferentemente da mistura de derivados, a pulverização apenas da trealose acarretou em maior investimento em espessura do limbo, cutícula, maior funcionalidade estomática (adaxial) o que corroborou com o seu maior uso eficiente da água (WUE) neste tratamento.

Sob déficit hídrico, é mais eficiente a planta desenvolver folhas com mais estômatos, porém menores, para minimizar a perda de água sem comprometer a atividade fotossintética (Özyıldız and Akinci, 2009; Souza et al., 2013a). Isto pode ser visualizado pelo tratamento WD+TD, onde a ação dos derivados acarretou em médias menores de PD em relação a IRRI.

5. Conclusão

A aplicação da mistura de derivados de trealose (azido e tosilada) são eficazes em mitigar os danos causados pelo déficit hídrico em relação a eficiência fotossintética especificamente nos parâmetros fotossintéticos, de fluorescência da clorofila *a* e anatômicos. Conclui-se que a mistura de derivados age de forma diferente da trealose frente ao déficit hídrico. Enquanto a trealose desencadeia modificações que buscam economizar água, a mistura de derivados deflagra em respostas em prol de manter uma alta atividade fotossintética mesmo que haja maior perda de água. Desta forma, a mistura dos derivados trealose azidídica e tosilada é capaz de mitigar os efeitos do déficit hídrico em milho e podem contribuir para pesquisas futuras de bioestimulantes a fim de se expandir a atividade agrícola.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa envolvido neste estudo (Processo 423584/2016-2, chamada Universal 01/2016). O presente trabalho também foi realizado com apoio de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E agradecimentos pela bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq (modalidade PQ, categoria 2 cedida a Souza, TC (Processo: 304421/2018-9).

Author contributions

Thiago Correa de Souza: responsável pela orientação do trabalho e auxiliou na análise dos dados e escrita do artigo.

Referências

- Adiaha, M.S., Agba, O.A., Attoe, E.E., Ojikpong, T.O., Kekong, M.A., Obio, A., Undie, U.L., 2016. Effect of Maize (*Zea mays* L .) on Human Development and the Future of Man-maize Survival : A Review. *World Sci. News* 59, 52–62.
- Akram, N.A., Noreen, S., Noreen, T., Ashraf, M., 2015. Exogenous application of trehalose alters growth, physiology and nutrient composition in radish (*Raphanus sativus* L.) plants under water-deficit conditions. *Rev. Bras. Bot.* 38, 431–439. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0149-7>
- Ali, Q., Ashraf, M., 2011. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: Growth, Photosynthesis, Water Relations and Oxidative Defence Mechanism. *J. Agron. Crop Sci.* 197, 258–271. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00463.x>

- Anjum, S.A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M.F., Ali, I., Wang, L.C., 2017a. Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids. *Front. Plant Sci.* 08, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00069>
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Khan, I., Tanveer, M., Shahid, M., Shakoor, A., Wang, L., 2017b. Phyto-Toxicity of Chromium in Maize: Oxidative Damage, Osmolyte Accumulation, Anti-Oxidative Defense and Chromium Uptake. *Pedosphere* 27, 262–273. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60315-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60315-1)
- Arend, M., Brunner, I., Dawes, M.A., Sperisen, C., Herzog, C., 2015. How tree roots respond to drought. *Front. Plant Sci.* 6, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>
- Arunyanark, A., Jogloy, S., Akkasaeng, C., Vorasoot, N., Kesmlala, T., Nageswara Rao, R.C., Wright, G.C., Patanothai, A., 2008. Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. *J. Agron. Crop Sci.* 194, 113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00299.x>
- Bae, H., Herman, E., Bailey, B., Bae, H.J., Sicher, R., 2005. Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiol. Plant.* 125, 114–126. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00537.x>
- Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55, 1607–1621. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh196>
- Bergonci, J.I., Bergamaschi, H., Berlato, M.A., Santos, A.O., 2000. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 35, 1531–1540.
- Berteotti, S., Ballottari, M., Bassi, R., 2016. Increased biomass productivity in green algae by tuning non-photochemical quenching. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep21339>
- Bi, H., Kovalchuk, N., Langridge, P., Tricker, P.J., Lopato, S., Borisjuk, N., 2017. The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biol.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1033-3>
- Bosch, S., De Beaupaire, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chrétien, D., Jegou, D., Bach, J.M., 2016. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36162>
- Calvo, P. e derivados/2015 T. ester derivatives for health applications. pd., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Chartzoulakis, K., Patakas, A., Kofidis, G., 2002. Water stress affects leaf anatomy , gas exchange , water relations and growth of two avocado cultivars. *Sci. Hortic.* 95, 39–50. [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(02\)00016-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(02)00016-x)
- Chatterjee, A., Basu, A., 2011. Rubisco: limitations and re-engineering for a better enzyme. *Int. Res. J. Plant Sci.* 2, 22–24.
- Chaves, M. M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1–16.
- Chen, Z. bo, Tang, J. wen, Zhang, F., 2009. Advances and Developing Tendency of Water Use Efficiency in Plant Biology. *Agric. Sci. China* 8, 855–863. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60288-6](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60288-6)
- Cousins, A.B., Adam, N.R., Wall, G.W., Kimball, B.A., Pinter Jr, P.J., Ottman, M.J., Leavitt, S.W., Webber, A.N., 2002. Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophyll cycle in. *Plant, Cell Environ.* 25, 1551–1559.
- Das, R., Bhagawati, K., Boro, A., Medhi, T., Medhi, B., Bhanisana, R.K., 2015. Relative Performance of Plant Cultivars under Respective Water Deficit Adaptation Strategies : A Case Study. *Curr. World Environ.* 10, 683–690. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.12944/CWE.10.2.36>
- De Souza, T.B., Raimundo, P.O.B., Andrade, S.F., Hipólito, T.M.M., Silva, N.C., Dias, A.L.T., Ikegaki, M., Rocha, R.P., Coelho, L.F.L., Veloso, M.P., Carvalho, D.T., Dias, D.F., 2015. Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides. *Carbohydr. Res.* 410, 1–8. doi:10.1016/j.carres.2015.04.002.
- Dordas, C.A., Papathanasiou, F., Lithourgidis, A., Petrevska, J., Pankou, C., Gekas, F., Ninou, E., Mylonas, I., Sistanis, I., Kargiotidou, A., Tokatlidis, I.S., 2018. Evaluation of physiological characteristics as selection criteria for drought tolerance in maize inbred lines and their hybrids.

Maydica 63.

- Efeoğlu, B., Ekmekçi, Y., Çiçek, N., 2009. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African J. Bot.* 75, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.06.005>
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J.F., Trevisol, E., Magalhães, R., 2015. Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr. Genet.* 61, 263–274. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0450-1>
- Fang, Y., Xiong, L., 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 673–689. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, W., 2018. The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. Building climate resilience for food security and nutrition. Rome, FAO. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, Building climate resilience for food security and nutrition. <https://doi.org/10.1093/cjres/rst006>
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.001533>
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R.S., Clément Christophe, C., 2010. Trehalose and plant stress responses: Friend or foe? *Trends Plant Sci.* 15, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.004>
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H., 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.* 29, 461–471.
- Gao, J., Wang, N., Xu, S.S., Li, Y., Wang, Y., Wang, G.X., 2013. Exogenous application of trehalose induced H₂O₂ production and stomatal closure in *Vicia faba*. *Biol. Plant.* 57, 380–384. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0285-x>
- Garg, A.K., Kim, J.-K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L. V., Wu, R.J., 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15898–15903. <https://doi.org/10.1073/pnas.252637799>
- Gleason, S.M., Wiggans, D.R., Bliss, C.A., Comas, L.H., Cooper, M., DeJonge, K.C., Young, J.S., Zhang, H., 2017. Coordinated decline in photosynthesis and hydraulic conductance during drought stress in *Zea mays*. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 227, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.017>
- Greco, E.T., Thomas, R., Maria, M., 2012. Drought induces alterations in the stomatal development program in *Populus*. *J. Exp. Bot.* 63, 4959–4971. <https://doi.org/10.1093/jxb/err313>
- Gu, J., Yin, X., Stomph, T.-J., Wang, H., Struik, P.C., 2012. Physiological basis of genetic variation in leaf photosynthesis among rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines under drought and well-watered conditions. *J. Exp. Bot.* 63, 5137–5153. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers170>
- Guha, A., Chhajed, S.S., Choudhary, S., Sunny, R., Jansen, S., Barua, D., 2018. Hydraulic anatomy affects genotypic variation in plant water use and shows differential organ specific plasticity to drought in *Sorghum bicolor*. *Environ. Exp. Bot.* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.025>
- Guo, Y.Y., Yu, H.Y., Kong, D.S., Yan, F., Zhang, Y.J., 2016. Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum* Murr. seedlings. *Photosynthetica* 54, 524–531. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0206-x>
- Hameed, M., Ashraf, M., Sciences, A., 2002. Variation in Leaf Anatomy in Wheat Germplasm from Varying Drought-Hit Habitats. *Int. J. Agri. Biol.* 4.
- Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S.A.M., Mokhtassi-Bidgoli, A., Nicola, S., 2016. Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiol. Biochem.* 106, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.046>
- Hoque, M.I.U., Uddin, M.N., Fakir, M.S.A., 2018. Drought and salinity affect leaf and root anatomical structures in three maize genotypes. *J. Bangladesh Agric. Univ.* 16, 47–55. <https://doi.org/10.3329/jbau.v16i1.36480>
- Hsieh, S.W., Lee, M.R., Tsai, C.W., Lai, L.Y., Yeh, T., Hsieh, C.W., Yang, T.J., Chang, S.W., 2015. Enzymatic synthesis, purification and identification of bioactive trehalose ester derivatives for health applications. *Food Bioprod. Process.* 95, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.05.003>

- Hubbard, R.M., Ryan, M.G., Stiller, V., Sperry, J.S., 2001. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine - Hubbard - 2001 - Plant, Cell & Environment - Wiley Online Library. *Plant Cell Environ.* 24, 113–121. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00660.x>
- Iordachescu, M., Imai, R., 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1223–1229. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00736.x>
- Jabeen, F., Shahbaz, M., Ashraf, M., 2008. Discriminating some prospective cultivars of maize (*Zea Mays L.*) for drought tolerance using gas exchange characteristics and proline contents as physiological markers. *Pakistan J. Bot.* 40, 2329–2343.
- Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique.*, McGraw-Hill Book Company, Inc: London.
- Kałużewicz, A., Krzesiński, W., Spizewski, T., Zaworska, A., 2017. Effect of Biostimulants on Several Physiological Characteristics and Chlorophyll Content in Broccoli under Drought Stress and Re-watering. *Not Bot Horti Agrobo* 45, 197–202. <https://doi.org/10.15835/nbha45110529>
- Khan, F., Upreti, P., Singh, R., Shukla, P.K., Shirke, P.A., 2017. Physiological performance of two contrasting rice varieties under water stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23, 85–97. <https://doi.org/10.1007/s12298-016-0399-2>
- Klughammer, C., Schreiber, U., 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *Photosynth. Res.* 27–35.
- Kosar, F., Akram, N.A., Ashraf, M., 2018a. Trehalose-induced improvement in growth, photosynthetic characteristics and levels of some key osmoprotectants in sunflower (*Helianthus annuus L.*) under drought stress. *Pak. J. Bot.* 50, 955–961..
- Kosar, F., Akram, N.A., Sadiq, M., Al-Qurainy, F., Ashraf, M., 2018b. Trehalose: A Key Organic Osmolyte Effectively Involved in Plant Abiotic Stress Tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 0, 0. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9876-x>
- Larkins, B.A., 2017. *Maize Kernel Development*, 1st ed. CABI, Boston.
- Lawson, T., Caemmerer, S. Von, Baroli, I., 2006. *Progress in Botany, Nature.* <https://doi.org/10.1038/1941023a0>
- Lawson, T., Terashima, I., Fujita, T., Wang, Y., 2018. Coordination Between Photosynthesis and Stomatal Behavior, in: *The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis.* Springer, pp. 141–161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93594-2_6
- Lawson, T., Vialet-Chabrand, S., 2019. Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytol.* 221, 93–98. <https://doi.org/10.1111/nph.15330>
- Li, Yuping, Li, H., Li, Yuanyuan, Zhang, S., 2017. Improving water-use efficiency by decreasing stomatal conductance and transpiration rate to maintain higher ear photosynthetic rate in drought-resistant wheat. *Crop J.* 5, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.01.001>
- Lima, C.S., Ferreira-Silva, S.L., Carvalho, F.E.L., Lima Neto, M.C., Aragão, R.M., Silva, E.N., Sousa, R.M.J., Silveira, J.A.G., 2018. Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. *Environ. Exp. Bot.* 149, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.001>
- Liu, E.K., Mei, X.R., Yan, C.R., Gong, D.Z., Zhang, Y.Q., 2016. Effects of water stress on photosynthetic characteristics, dry matter translocation and WUE in two winter wheat genotypes. *Agric. Water Manag.* 167, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.12.026>
- Liu, M., Zhang, Z.P., Song, Z.W., Kou, T.J., Zhang, W.J., YU, J.L., 2012. Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to drought stress in two maize cultivars. *African J. Agric. Researh* 7, 4751–4760. <https://doi.org/10.5897/ajar12.082>
- Luo, Y., Wang, W., Fan, Y.Z., Gao, Y.M., Wang, D., 2018. Exogenously-Supplied Trehalose Provides Better Protection for D1 Protein in Winter Wheat under Heat Stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 65, 115–122. <https://doi.org/10.1134/s1021443718010168>
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., 2006. *Fisiologia da Produção de Milho.* *Circ. Técnica*, 76 d, 10. <https://doi.org/ISSN 1679-1150>
- Mathobo, R., Marais, D., Steyn, J.M., 2017. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous

- exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agric. Water Manag.* 180, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.11.005>
- Menger, F.M., Mbadugha, B.N. 2001. Gemini surfactants with a disaccharide spacer. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 875–885. doi:10.1021/ja0033178.
- Misra, A.N., Misra, M., Singh, R., 2012. *Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Biophysics (Oxf).
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., Kimura, K., 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 53, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.03.015>
- Mnif, I., Ghribi, D., 2016. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>
- Mohammadi, R., Crop, S., Science, P., Mohammadi, R., 2018. Breeding for increased drought tolerance in wheat : a review. *Crop Pasture Sci.* 69, 223–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/CP17387>
- Morgutti, S., Negrini, N., Pucciariello, C., Sacchi, G.A., 2019. Role and Regulation of Plant Hormones as a Signal Molecule in Response to Abiotic Stresses, *Plant Signaling Molecules*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00018-6>
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A., Fujita, M., 2015. Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma* 252, 461–475. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0691-3>
- Mu, M., Lu, X.K., Wang, J.J., Wang, D.L., Yin, Z.J., Wang, S., Fan, W.L., Ye, W.W., 2016. Genome-wide Identification and analysis of the stress-resistance function of the TPS (Trehalose-6-Phosphate Synthase) gene family in cotton. *BMC Genet.* 17, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0360-y>
- Naidoo, G., Naidoo, K.K., 2018. Drought stress effects on gas exchange and water relations of the invasive weed *Chromolaena odorata*. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 248, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.08.008>
- Nawazish, S., Hameed, M., 2006. Leaf anatomical adaptations of *Cenchrus ciliaris* L., from the Salt Range, Pakistan against drought stress. *Pak. J. Bot.* 38, 1723–1730.
- Nemali, K.S., Bonin, C., Dohleman, F.G., Stephens, M., Reeves, W.R., Nelson, D.E., Castiglioni, P., Whitsel, J.E., Sammons, B., Silady, R.A., Anstrom, D., Sharp, R.E., Patharkar, O.R., Clay, D., Coffin, M., Nemeth, M.A., Leibman, M.E., Luethy, M., Lawson, M., 2015. Physiological responses related to increased grain yield under drought in the first biotechnology-derived drought-tolerant maize. *Plant, Cell Environ.* 38, 1866–1880. <https://doi.org/10.1111/pce.12446>
- Oliveri, V., Bellia, F., Grasso, G.I., Pietropaolo, A., Vecchio, G., 2016. Trehalose-8-hydroxyquinoline conjugates as antioxidant modulators of A β aggregation. *RSC Adv.* 6, 47229–47236. <https://doi.org/10.1039/c6ra04204j>
- Özyıldız, İ.İ., Akinci, Ş., 2009. Effects of some Stress Factors (Aluminum, Cadmium and Drought) on Stomata of Roman Nettle (*Urtica pilulifera* L.). *Not. Bot. Hort. Agrobot.* 37, 108–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.15835/nbha3713191>
- Parry, M.A.J., Madgwick, P.J., Carvalho, J.F.C., Andralojc, P.J., 2007. Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *J. Agric. Sci.* 145, 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859606006666>
- Paul, M., Pellny, T., Goddijn, O., 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci.* 6, 197–200. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01920-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01920-3)
- Pellny, T.K., Ghannoum, O., Conroy, J.P., Schluempmann, H., Smeekens, S., Andralojc, J., Krause, K.P., Goddijn, O., Paul, M.J., 2004. Genetic modification of photosynthesis with. *Plant Biotechnol. J.* 71–82. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00053.x>
- Penna, S., 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8, 355–357. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00159-6)
- Perdomo, J.A., Capó-Bauçà, S., Carmo-Silva, E., Galmés, J., 2017. Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. *Front. Plant Sci.* 8, 1–15.

- <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00490>
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S., Van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T.C., Krutwagen, R.W.H.H., Goddijn, O.J.M., 1998. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.* 152, 525–532. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80273-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80273-3)
- Puangbut, D., Jogloy, S., Vorasoot, N., 2017. Association of photosynthetic traits with water use efficiency and SPAD chlorophyll meter reading of Jerusalem artichoke under drought conditions. *Agric. Water Manag.* 188, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.04.001>
- Reis, C.O., Magalhães, P.C., Avila, R.G., Almeida, L.G., Rabelo, V.M., Carvalho, D.T., Cabral, D.F., Karam, D., de Souza, T.C., 2018. Action of N-Succinyl and N,O-Dicarboxymethyl Chitosan Derivatives on Chlorophyll Photosynthesis and Fluorescence in Drought-Sensitive Maize. *J. Plant Growth Regul.* 0, 0. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9877-9>
- Riboldi, L.B., Oliveira, R.F., Angelocci, L.R., 2016. Leaf turgor pressure in maize plants under water stress. *Aust. J. Crop Sci.* 10, 878–886. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.06.p7602>
- Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Benson, G.O., 2003. Como a planta de milho se desenvolve. *Science* (80-). 1–20.
- Rohman, M.M., Begum, S., Talukder, M.Z.A., Akhi, A.H., Amiruzzaman, M., Ahsan, A.F.M.S., Hossain, Z., 2016. Drought sensitive maize inbred shows more oxidative damage and higher ROS scavenging.pdf. *Plant Omics* 9, 220. <https://doi.org/10.21475/poj.16.09.04.pne31>
- Rufino, C. A, Fernandes-Vieira, J., Martín-Gil, J., Abreu Júnior, J., Tavares, L., Fernandes-Correa, M., Martín-Ramos, P., 2018. Water Stress Influence on The Vegetative Period Yield Components of Different Maize Genotypes. *Agronomy* 8, 151. <https://doi.org/10.3390/agronomy8080151>
- Scoffoni, C., Vuong, C., Diep, S., Sack, L., Biology, E., Angeles, L., 2014. Leaf Shrinkage with Dehydration : Coordination with Hydraulic Vulnerability and Drought. *Plant Physiol.* 164, 1772–1788. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221424>
- Serôdio, J., Lavaud, J., 2011. A model for describing the light response of the nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 108, 61–76. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9654-0>
- Silva, M.D.A., Jifon, J.L., Da Silva, J.A.G., Sharma, V., 2007. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19, 193–201. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000300003>
- Snel, J.F.H., van Kooten, O., 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, 147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00033156>
- Song, H., Li, Y., Zhou, L., Xu, Z., Zhou, G., 2018. Maize leaf functional responses to drought episode and rewatering. *Agric. For. Meteorol.* 249, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.11.023>
- Songsri, P., Jogloy, S., Holbrook, C.C., Kesmala, T., Vorasoot, N., Akkasaeng, C., Patanothai, A., 2009. Association of root, specific leaf area and SPAD chlorophyll meter reading to water use efficiency of peanut under different available soil water. *Agric. Water Manag.* 96, 790–798. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.10.009>
- Sousa, C.A.F., de Paiva, D.S., Casari, R.A. das C.N., de Oliveira, N.G., Molinari, H.B.C., Kobayashi, A.K., Magalhães, P.C., Gomide, R.L., Souza, M.T., 2017. A procedure for maize genotypes discrimination to drought by chlorophyll fluorescence imaging rapid light curves. *Plant Methods* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0209-z>
- Souza, T.C., Magalhães, P.C., Pereira, F.J., 2010. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. *Pesq. agropec. bras.* 45, 16–24. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000100003>
- Souza, T. C., Castro, E.M., César Magalhães, P., Oliveira Lino, L., Trindade Alves, E., Albuquerque, P.E.P., 2013a. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 35, 3201–3211. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1355-1>
- Souza, T C, Magalhães, P.C., de Castro, E.M., de Albuquerque, P.E.P., Marabesi, M.A., 2013b. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. *Acta Physiol.*

- Plant. 35, 515–527. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1093-9>
- Souza, T.C., Magalhães, P.C., de Castro, E.M., Duarte, V.P., Lavinsky, A.O., 2016. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 330–339. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000400005>
- Szafrańska, K., Reiter, R.J., Posmyk, M.M., 2016. Melatonin Application to *Pisum sativum* L. Seeds Positively Influences the Function of the Photosynthetic Apparatus in Growing Seedlings during Paraquat-Induced Oxidative Stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01663>
- Takahashi, F., Shinozaki, K., 2019. Long-distance signaling in plant stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 47, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.10.006>
- Tarek, A.E.E., Sadak, M.S., Dawood, M.G., 2017. Improving drought tolerance of quinoa plant by foliar treatment of trehalose. *Agric. Eng. Int. CIGR J.* 245–254.
- Tounekti, T., Mahdhi, M., Al-Turki, T.A., Khemira, H., 2018. Water relations and photo-protection mechanisms during drought stress in four coffee (*Coffea arabica*) cultivars from southwestern Saudi Arabia. *South African J. Bot.* 117, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.022>
- Urban, J., Ingwers, M., McGuire, M.A., Teskey, R.O., 2017. Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signal. Behav.* 12. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356534>
- USDA, 2019. World of Corn 2019. URL <http://www.worldofcorn.com/#world-corn-production> (accessed 4.15.19).
- Valipour, M., Ziatabar Ahmadi, M., Raeini-Sarjaz, M., Gholami Sefidkouhi, M.A., Shahnazari, A., Fazlola, R., Darzi-Naftchali, A., 2015. Agricultural water management in the world during past half century. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 657–678. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.944903>
- Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., Maggio, A., 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Wang, W., Wang, C., Pan, D., Zhang, Y., Luo, B., Ji, J., 2018. Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence images of soybean (*Glycine max*) seedlings. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 11, 196–201. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20181102.3390>
- Xu, Z., Zhou, G., 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59, 3317–3325. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern185>
- Yamauchi, Y., 2018. Integrated Chemical Control of Abiotic Stress Tolerance Using Biostimulants. *Plant, Abiotic Stress Responses to Clim. Chang.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74214>
- Yan, W., Zhong, Y., Shangguan, Z., 2016. Evaluation of physiological traits of summer maize under drought stress. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 66, 133–140. <https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1083610>
- Zandalinas, S.I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.* 162, 2–12. <https://doi.org/10.1111/ppl.12540>
- Zhao, D.Q., Li, T.T., Hao, Z.J., Cheng, M.L., Tao, J., 2019. Exogenous trehalose confers high temperature stress tolerance to herbaceous peony by enhancing antioxidant systems, activating photosynthesis, and protecting cell structure. *Cell Stress Chaperones* 24, 247–257. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-00961-1>
- Zhao, W., Sun, Y., Kjellgren, R., 2015. Response of stomatal density and bound gas exchange in leaves of maize to soil water deficit. *Acta Physiol Plant* 37. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1704-8>
- Zhou, M.L., Zhang, Q., Sun, Z.M., Chen, L.H., Liu, B.X., Zhang, K.X., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X., Wu, Y.M., 2014. Trehalose Metabolism-Related Genes in Maize. *J. Plant Growth Regul.* 33, 256–271. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9368-y>

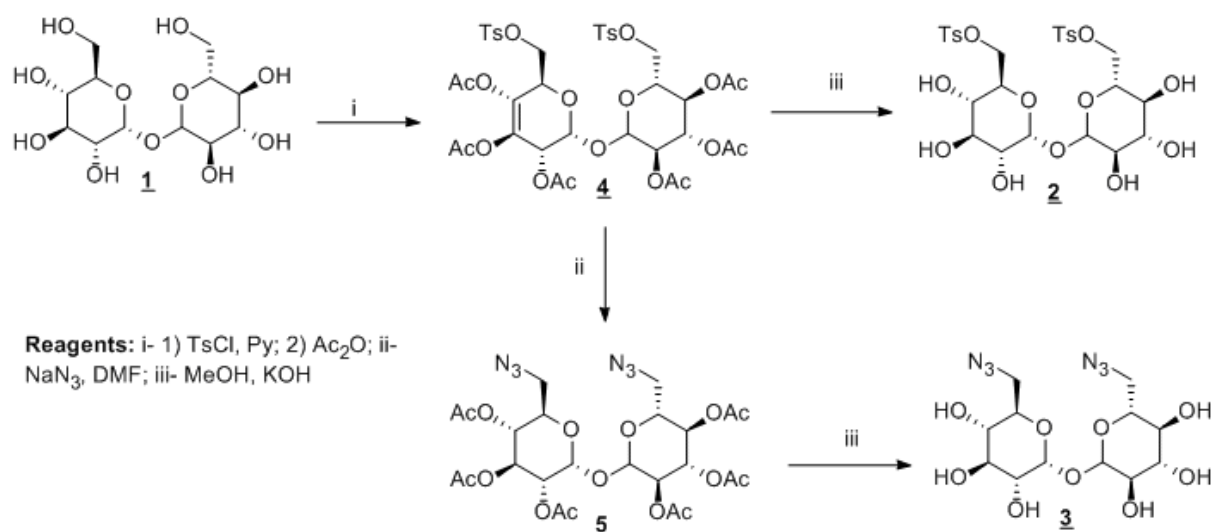


Fig 1. Reação de semissíntese dos derivados de trealose. A figura mostra as estruturas química da trealose (**1**); da trealose tosilada, 6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosídeo de 6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glucopiranosila (**2**); trealose azídica, 6-azido-6-desoxi- α -D-glicopiranosídeo de 6-azido-6-desoxi-D-glucopyranosila (**3**); e os derivados intermediários 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosídeo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glucopiranosila (**4**); e 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopyranosídeo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosila (**5**).

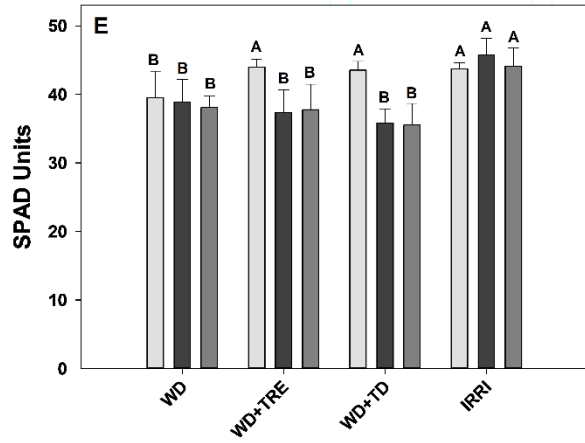
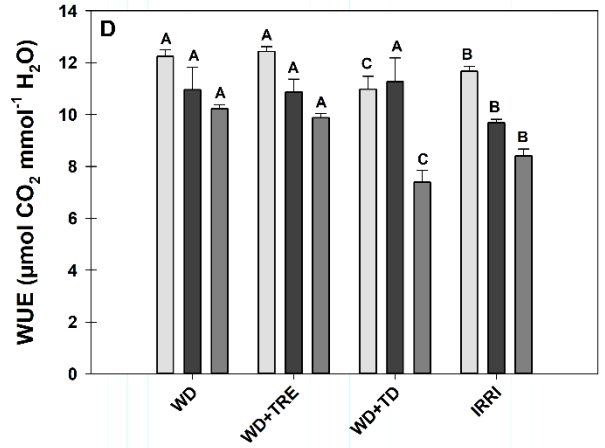
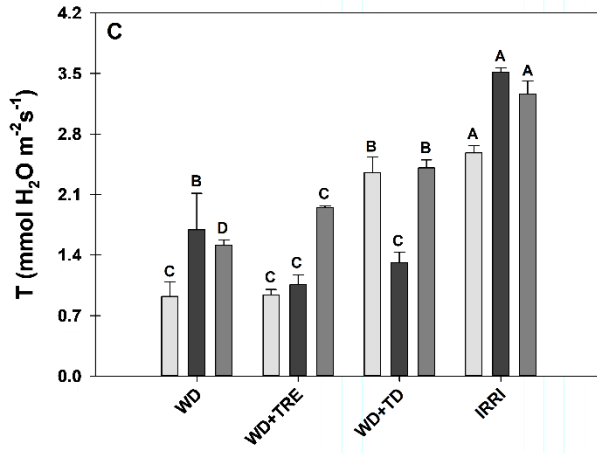
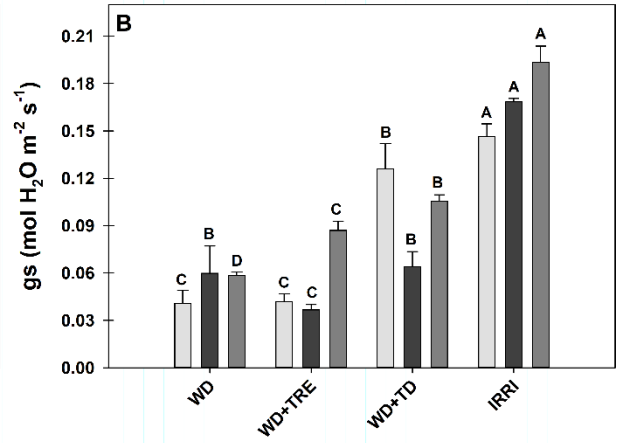
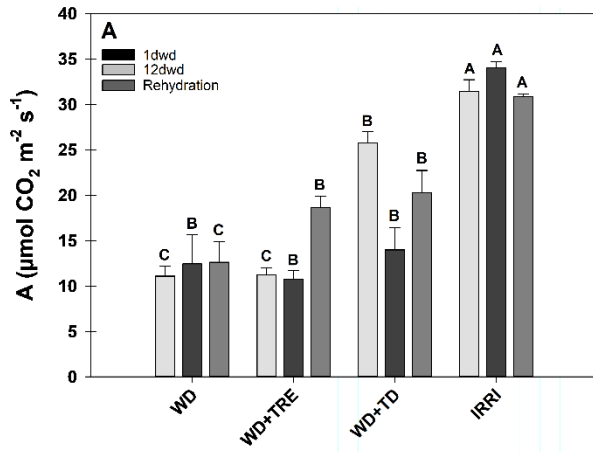


Fig 2. Análise das trocas gasosas durante a imposição do déficit hídrico e reidratação em milho com a aplicação da trealose e a mistura dos seus derivados. **(A)** Taxa fotossintética (A), **(B)** condutância estomática (gs), **(C)** transpiração (T), **(D)** eficiência do uso da água (WUE), **(E)** teor relativo de clorofila. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos dentro de cada dia de estresse (1dwd; 12dwd; Rehydration) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Déficit hídrico (Water deficit - WD), déficit hídrico com pulverização de trealose (Water Deficit with trehalose application - WD+TRE), déficit hídrico com pulverização da mistura dos derivados tosila e azido de trealose (Water deficit with trehalose derivateds application - WD+TD) e irrigado (irrigated - IRRI). Barras correspondem ao \pm erro padrão (SE) ($n = 5$).

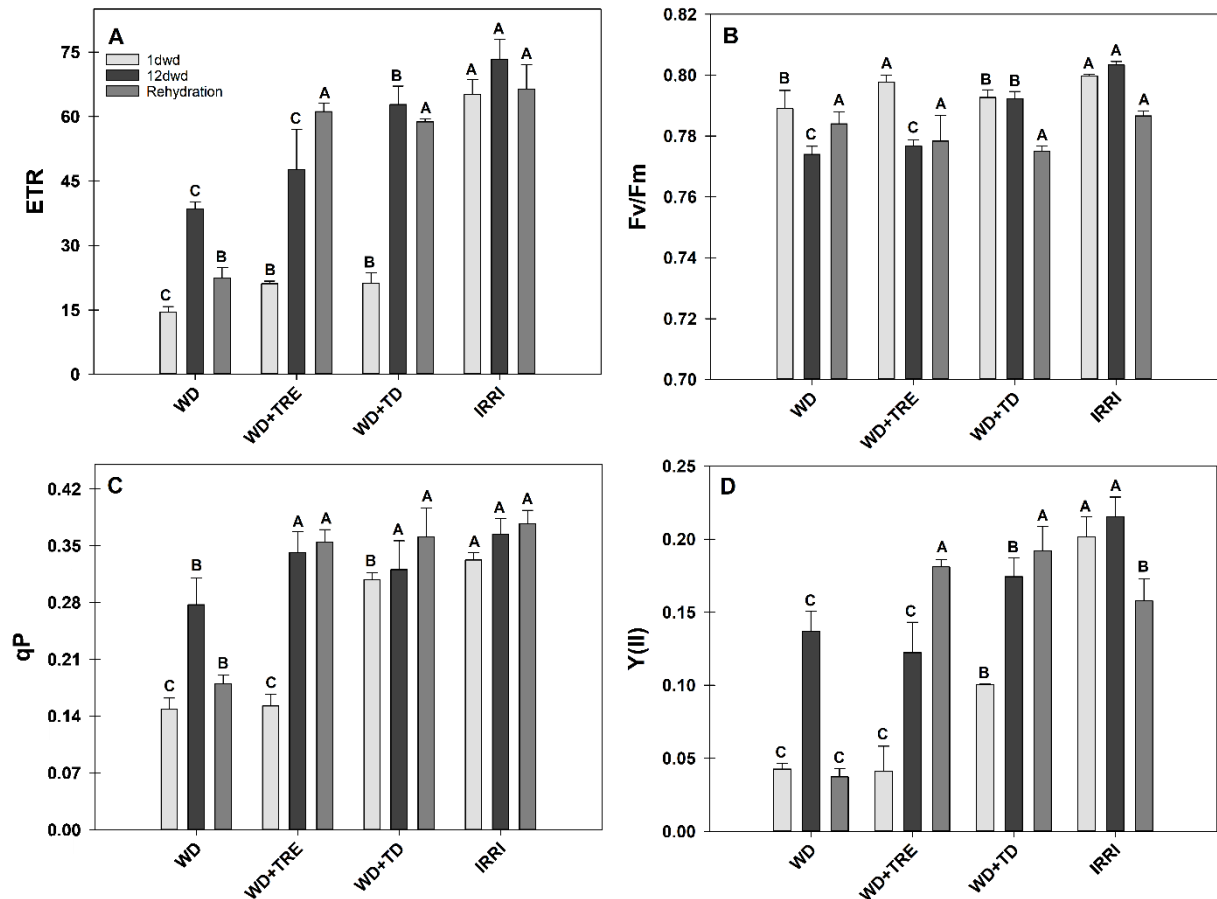


Fig 3. Análise da fluorescência da clorofila *a* durante a imposição do déficit hídrico e reidratação em milho com a aplicação da trealose e mistura dos seus derivados. **(A)** Taxa de transporte de elétrons (ETR), **(B)** Máxima eficiência quântica do FSII (Fv/Fm), **(C)** Quenching fotoquímico (qP), **(D)** Produção quântica fotoquímica efetiva do FSII (YII).

Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos dentro de cada dia de estresse (1dwd; 12dwd; Rehydration) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Deficit hídrico (Water deficit - WD), déficit hídrico com pulverização de trealose (Water Deficit with trehalose application – WD+TRE), déficit hídrico com pulverização da mistura dos derivados tosila e azido de trealose (Water deficit with trehalose derivateds application – WD+TD) e irrigado (irrigated – IRRRI). Barras correspondem ao \pm erro padrão (SE) ($n = 5$).

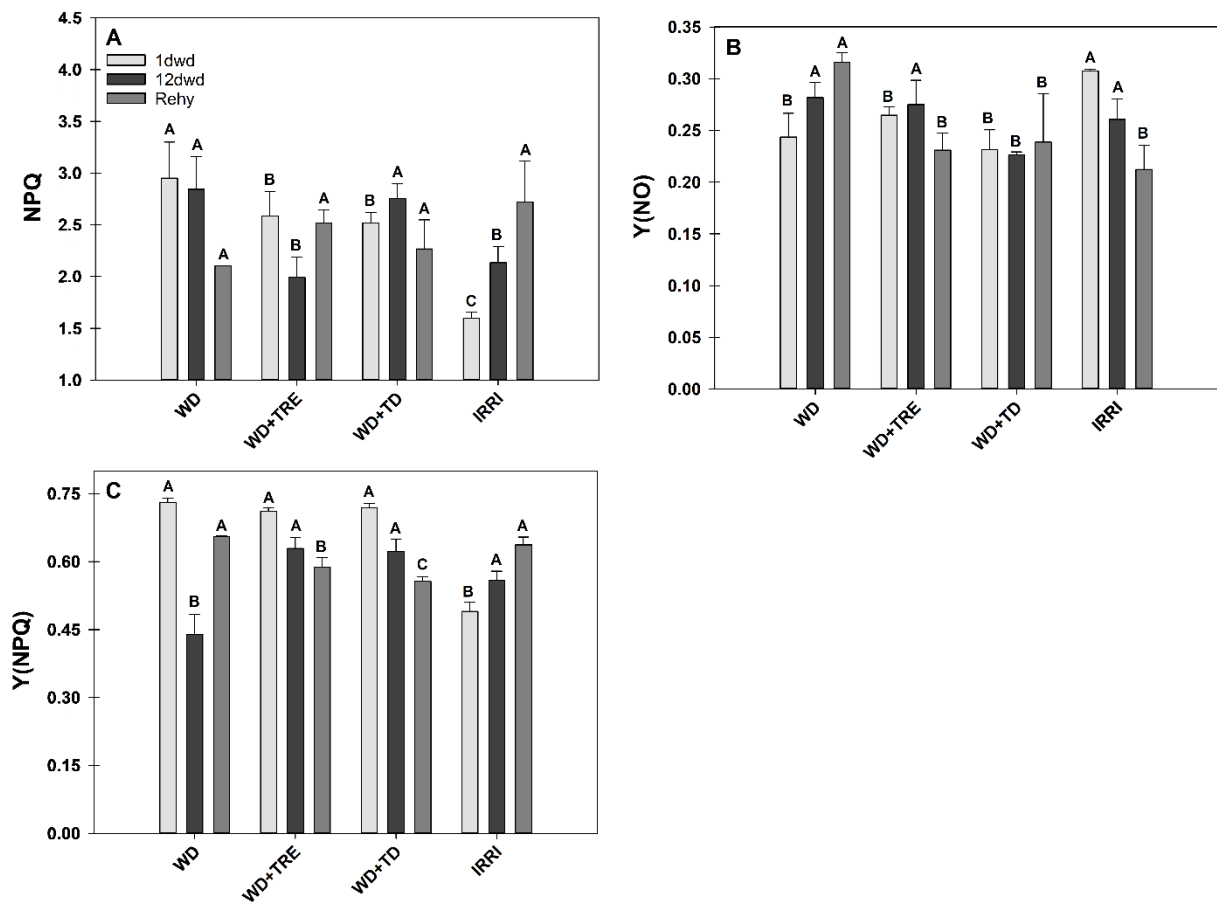


Fig 4. Análise da fluorescência da clorofila *a* durante a imposição do déficit hídrico e reidratação em milho com a aplicação da trealose e mistura de seus derivados. (A) Quenching não fotoquímico (NPQ), (B) Rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia não fotoquímica do FSII (Y(NO)), (C) Rendimento quântico de dissipação regulada de energia não fotoquímica do FSII (Y(NPQ)). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos dentro de cada dia de estresse (1dwd; 12dwd; Rehydration) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Deficit hídrico (Water deficit - WD), déficit hídrico com pulverização de trealose (Water Deficit with trehalose application – WD+TRE), déficit hídrico com pulverização da mistura dos

derivados tosila e azido de trealose (Water deficit with trehalose derivateds application – WD+TD) e irrigado (irrigated – IRR). Barras correspondem ao \pm erro padrão (SE) (n = 5).

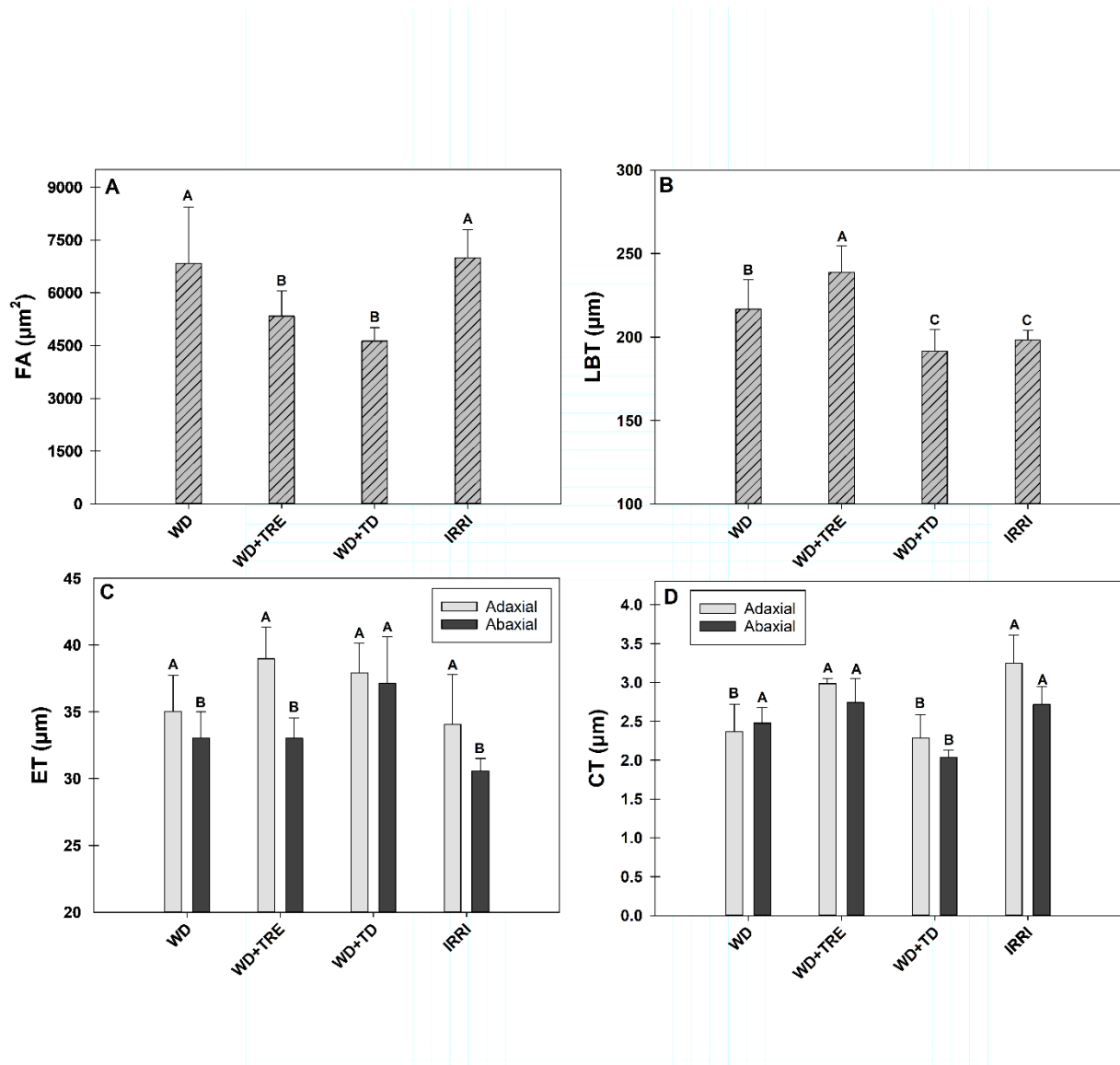


Fig 5. Análise das secções transversais em folhas de milho com a aplicação da trealose e mistura dos seus derivados ao fim da imposição dos tratamentos. (A) Área do floema da nervura central (F), (B) Espessura do limbo (LBT), (C) Espessura das epidermes adaxiais e abaxiais (ET), (D) Espessura das cutículas adaxiais e abaxiais. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Deficit hídrico (Water deficit - WD), déficit hídrico com pulverização de trealose (Water Deficit with trehalose application – WD+TRE), déficit hídrico com pulverização da mistura dos derivados tosila e azido de trealose (Water deficit with trehalose derivateds application – WD+TD) e irrigado (irrigated – IRR). Barras correspondem ao \pm erro padrão (SE) (n = 5).

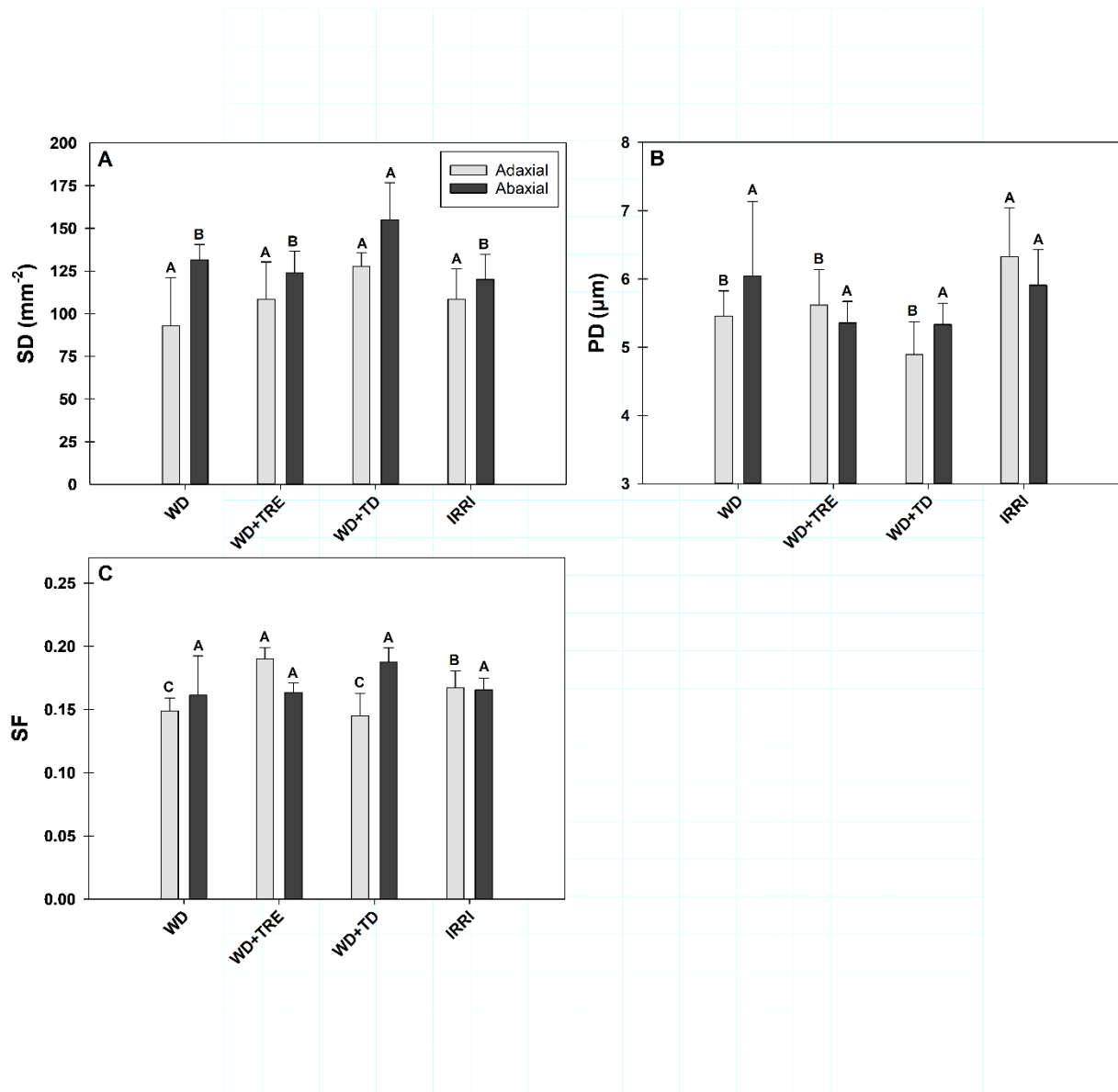


Fig 6. Análise das secções paradérmicas em folhas de milho com a aplicação da trealose e mistura dos seus derivados ao fim da imposição dos tratamentos. **(A)** Densidade estomática (SD), **(B)** Diâmetro polar do estômato (PD), **(C)** Funcionalidade estomática (SF). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Deficit hídrico (Water deficit - WD), déficit hídrico com pulverização de trealose (Water Deficit with trehalose application – WD+TRE), déficit hídrico com pulverização da mistura dos derivados tosila e azido de trealose (Water deficit with trehalose derivateds application – WD+TD) e irrigado (irrigated – IRRRI). Barras correspondem ao \pm erro padrão (SE) ($n = 5$).

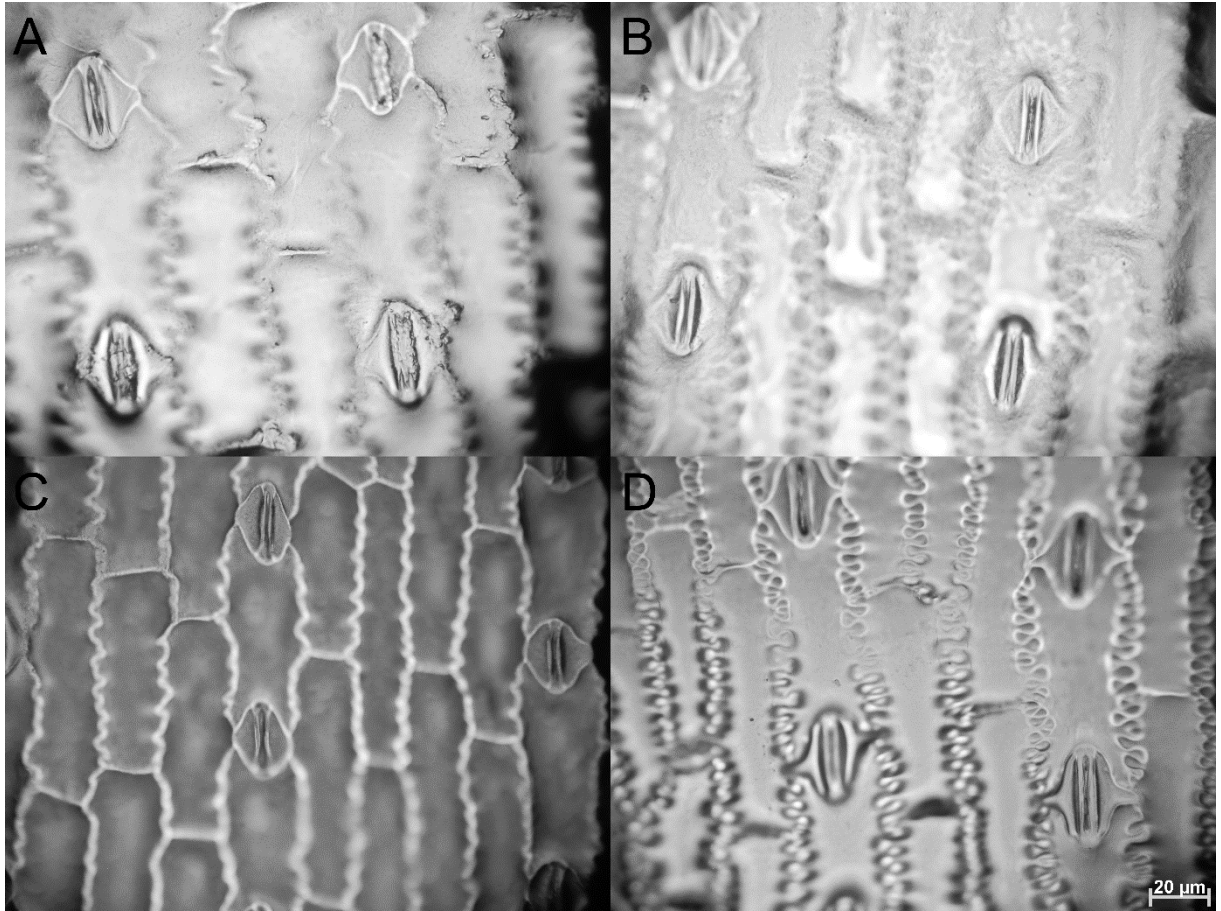


Fig 7. Fotomicrografia das secções paradérmicos do híbrido de milho BRS 1030, onde é possível visualizar os estômatos e células paradérmicas. (A) WD, (B) WD+TRE, (C) WD+TD, (D) IRRI. Barra corresponde a 20 µm.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Procedimento de Síntese das biomoléculas detalhado:

*Síntese do 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosídeo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glucopiranosila **4** :*

Em balão de fundo redondo de 100 mL, foi adicionada a 1g (2,92 mmol) de trealose e 10 mL de piridina anidra. Em seguida, adicionou-se 2,29g (12 mmol) de cloreto de *p*-toluenossulfonila. O sistema reacional foi deixado sob agitação magnética em temperatura ambiente por três horas até que foi verificado, por cromatografia em camada delgada (eluente: acetato de etila/metanol 7:3 v/v adicionando 3 gotas de ácido acético, revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico 5% v/v, seguido de aquecimento), que a trealose tinha sido consumida por completo. Em seguida, foram adicionados 2,2 mL (20,4 mmol) de anidrido acético e o sistema foi deixado sob agitação magnética *overnight*. Após esse tempo, por CCD (eluente: acetato de etila/ hexano 8:2 v/v adicionando 3 gotas de ácido acético, revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico 5% v/v, seguido de aquecimento), verificou-se que a reação tinha sido completa. Assim, em seguida, verteu-se a mistura reacional em 150 mL de água gelada mantendo-se agitação manual. O precipitado branco foi filtrado à pressão reduzida, lavado com água gelada. O sólido foi recristalizado em metanol. O derivado **4** foi obtido com 94% de rendimento.

*Caracterização química do 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosídeo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glucopiranosila **4** :*

IV (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR): 2961 (C-H, C *sp*3), 1752 (C=O), 1366 (S=O), 1215 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ): 7,73 (d, 4H, $J = 8,1$ Hz, H-Ar), 7,31 (d, 4H, $J=8,1$ Hz, H-Ar), 5,43-5,37 (m, 2H, H-açúcar), 4,97-4,87 (m, 6H, H-açúcar), 4,11-4,0 (m, 4H, C-6), 2,44 (6H, s, CH_3 tosila), 2,03 (m, 18H, CH_3 acetila).

*Síntese de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopyranosídeo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosila **5** :*

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 0,5 g (0,55 mmols) de **4** solubilizado em 9 mL de *N,N*-dimetilformamida. Em seguida, adicionou-se 1,1 g (16,6 mmol) de azida de sódio. O sistema foi deixado sob agitação magnética e em 90°C por 24h até que foi verificado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3 v/v; revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico 5% v/v, ou solução etanólica de ninhidrina 2% v/v, seguido de aquecimento) que não havia mais material de partida. A mistura reacional foi vertida em 50 mL água gelada mantendo a agitação. O precipitado formado foi filtrado à pressão reduzida e lavado com água. Foi obtido um sólido branco com 91 % de rendimento.

Caracterização química de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glicopiranosídeo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glicopiranosila 5 :

IV (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR): 2960 (CH C-*sp*3), 2104 (N=N=N), 1753 (C=O), 1218 (C-O).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ): 5,50-5,44 (m, 4H, H-açúcar), 5,10-4,96 (m, 4H, açúcar), 4,10-4,06 (m, 2H, açúcar), 2,06 (m, 18H, CH_3 acetila), 3,35-3,15 (m, 4H, C-6 e C-6').

Síntese de 6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosídeo de 6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosila 2 e 6-azido-6-desoxi- α -D-glicopiranosídeo de 6-azido-6-desoxi-D-glicopiranosila 3 :

1g (2,92 mmol) de 4 ou 0,5 g (7,76 mmol) de 5 foi solubilizado em 10 mL de metanol sob agitação, adicionando, em seguida, uma pastilha de KOH. O sistema foi deixado sob agitação magnética em banho de gelo (0°C) por 1h até que foi verificado por CCD (eluente: Acetato de etila/ hexano 8:2 v/v; revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico 5% v/v, ou solução etanólica de ninhidrina 2% v/v, seguido de aquecimento) que não havia mais os regentes acetilados. Então, adicionou-se resina IRA 120 à solução até verificar a neutralização da solução. A solução foi filtrada e o solvente evaporado sob aquecimento e à pressão reduzida. Formou-se um sólido branco; com rendimento de 95% para 2 e 97% para 3 .

Caracterização Química de 6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosídeo de 6-O-[(4-metilfenil)sulfonyl]- α -D-glicopiranosila 2 e 6-azido-6-desoxi- α -D-glicopiranosídeo de 6-azido-6-desoxi-D-glicopiranosila 3 :

Para 2:

IV (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR):.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ):

Para 3:

IV (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR):

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ):.