

DANIEL ANDRÉS VILLEGAS HURTADO

APLICAÇÃO FOLIAR DE PUTRESCINA EM PLANTAS DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CULTIVADAS EM DOIS NÍVEIS DE ÁGUA NO SOLO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Willian Rodrigues Macedo

Coorientador: Geraldo Humberto Silva

**RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba

T

H967a
2021
Hurtado, Daniel Andrés Villegas, 1991-
Aplicação foliar de putrescina em plantas de manjeriço (*Ocimum
basilicum* L.) cultivadas em dois níveis de água no solo / Daniel Andrés
Villegas Hurtado. - Rio Paranaíba, MG, 2021.
49 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Willian Rodrigues Macedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Poliaminas. 3. Prolina. 4. CRA.
5. Fisiologia Vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto
Ciencias Agrarias. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).
II. Título.

581.1

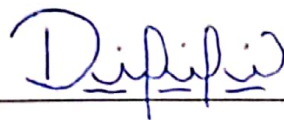
DANIEL ANDRÉS VILLEGAS HURTADO

APLICAÇÃO FOLIAR DE PUTRESCINA EM PLANTAS DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) CULTIVADAS EM DOIS NÍVEIS DE ÁGUA NO SOLO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 4 de março de 2021

Assentimento:



Daniel Andrés Villegas Hurtado
Autor



William Rodrigues Macedo
Orientador

**A Deus, minha família e as pessoas que
acreditam em minhas habilidades e promessas.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me ter dado a fortaleza em momentos de fraqueza e sempre me pôr no lugar exato com as pessoas indicadas.

Aos meus pais, Rodrigo e Carmenza pelo apoio incondicional durante cada uma das etapas da minha vida, pela educação e por me ensinar os valores de ser uma pessoa de bem.

A minha irmã, Alejandra porque sem seu apoio não seria a pessoa que sou hoje e por ser essa pessoa corajosa e trabalhadora que me ensina cada dia que nada é impossível quando temos nossos objetivos na vida.

Aos meus primos/as e tio/as, porque sempre houve essas palavras de apoio na distância para continuar neste processo.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Willian Rodrigues Macedo pela confiança desde o primeiro momento e sempre me ter guiado da melhor forma durante o tempo do mestrado. Também pela paciência e ajuda no planejamento e desenvolvimento do projeto. Seus ensinamentos me ajudaram no crescimento profissional e como pessoa.

Ao Professor Doutor Geraldo Humberto Silva pela coorientação, sua ajuda e os ensinamentos durante a etapa da pesquisa.

Aos técnicos Vinicius Guimaraes Nasser, Jader Alves Ferreira e Bruno Henrique Rocha pelo auxílio nas diversas atividades e orientação durante o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

A minha amiga do Rio Paranaíba, Michele e seus pais porque foram minha família e apoio no Brasil.

À Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa e oportunidade de fazer o mestrado no Brasil.

“Nada acontece por acaso. Não existe a sorte. Há um significado por detrás de cada pequeno ato. Talvez não possa ser visto com clareza imediatamente, mas sê-lo-á antes que passe muito tempo”.

(Richard Bach)

RESUMO

HURTADO, Daniel Andrés Villegas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Aplicação foliar de putrescina em plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) cultivadas em dois níveis de água no solo.** Orientador: Willian Rodrigues Macedo. Coorientador: Geraldo Humberto Silva.

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é uma espécie da família Lamiaceae com alto potencial na produção de metabolitos secundários. No entanto, é altamente suscetível a incidência de fatores abióticos e bióticos de comum ocorrência nos sistemas agrícolas. O estresse hídrico tem influência direta no crescimento e desenvolvimento vegetal. Com o fim de mitigar efeitos negativos da restrição hídrica e visando melhorar a produção de metabolitos secundários, as plantas tendem a acumular diferentes tipos de compostos, entre eles, as poliaminas. As poliaminas são compostos alifáticos que incluem espermidina, espermina e putrescina; compostos envolvidos na regulação de processos fisiológicos e na proteção das plantas submetidas a diferentes tipos de estresses ambientais. Por isso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) em características fisiológicas e produção de metabolitos secundários em plantas de manjeriço submetidas a dois níveis de água (80 e 60% da capacidade do vaso) num arranjo fatorial em delineamento de blocos casualizados (DBC) com três repetições. As variáveis analisadas foram: Altura, Massa fresca e seca, conteúdo relativo de água (CRA), teor dos pigmentos fotossintéticos, trocas gasosas, níveis de prolina, atividade de enzimas antioxidantes e óleos essenciais. Plantas submetidas ao déficit hídrico tiveram diminuição no crescimento e acumulação de matéria seca, redução no status hídrico e afetação nas variáveis fisiológicas, pigmentos fotossintéticos, sem efeito sobre a atividade de enzimas antioxidantes. Pulverizações com putrescina exógena, especialmente 50 e 100 mg L⁻¹ em plantas sob 80 e 60%, respectivamente; apresentaram efeito em variáveis morfológicas, fisiológicas e pigmentos fotossintéticos, assim como maiores teores de prolina. Os resultados obtidos sugere que pulverizações com putrescina induz as plantas de manjeriço na condição de déficit hídrico moderado, a acumulação de prolina nas folhas. Além disso, o perfil químico dos óleos essenciais foi dependente da disponibilidade hídrica no solo.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Poliaminas. Prolina. CRA. Fisiologia Vegetal.

ABSTRACT

HURTADO, Daniel Andrés Villegas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2021. **Putrescine foliar applications in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants under two water levels in the soil.** Adviser: Willian Rodrigues Macedo. Co-adviser: Geraldo Humberto Silva.

Basil (*Ocimum basilicum* L.) belongs to the Lamiaceae family, with high potential in secondary metabolites biosynthesis. However, it has highly susceptibility to abiotic and biotic stress, commonly found in agricultural systems, because this environment is harmful to plant growth and development. With the purpose of alleviate the negative effects of water restriction and improve the secondary metabolite production, plants tend to accumulate different kind of compounds such as the polyamines. Polyamines are aliphatic compounds that include spermidine, spermine and putrescine; they play pivotal role in plant's physiological regulation and protection under different environmental stresses. The aim of the research was evaluating the effect of putrescine doses (0, 50, 100 and 150 mg L⁻¹) in physiological parameters and secondary metabolites production in basil plants under two water levels (80 and 60% of the pot's capacity) in a factorial experiment based on randomized complete block design (RCBD) with three replications. The measured variables were: Height, fresh and dry matter, relative water content (RWC), photosynthetic pigments contents, gas exchanges, proline levels, antioxidant enzymes activity and essential oils. Plants under water deficit had decreased in growth and dry matter accumulation, water status, physiological variables and photosynthetic pigments. However, there was not influence in antioxidant enzymes activity. Exogenous putrescine sprays, particularly 50 and 100 mg L⁻¹ in 80 and 60% plants, respectively; had effects in morphological and physiological variables, photosynthetic pigments and proline levels. Our research suggests that exogenously putrescine sprays promote different kind of responses through the activation of tolerance mechanisms in basil plants under moderate water deficit, principally by the proline accumulation in the leaves. Moreover, the oil chemical profile was determinate by the water availability in the soil.

Keywords: Medicinal plants. Polyamines. RWC. Plant Physiology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1 Condições experimentais e delineamento experimental.....	11
2.2 Regime de irrigação.....	12
2.3 Análises biométricas, fisiológicas e químicas	12
2.3.1 Biometria vegetal: altura, matéria fresca, matéria seca.....	13
2.3.2 Conteúdo relativo de água (CRA), pigmentos, trocas gasosas e enzimáticas.....	13
2.3.3 Análises químicas: óleos essenciais.....	16
2.4 Análise estatística.....	16
3. RESULTADOS	16
3.1 Biometria.....	16
3.2 Análises fisiológicas.....	17
3.3 Análises químicas.....	29
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) é uma planta pertencente à família Lamiaceae amplamente distribuída no mundo, apresenta mais de 7.200 espécies de aproximadamente 240 gêneros (Harley et al., 2004), com ampla diversidade de espécies do gênero *Ocimum* distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais dos continentes asiático, africano e Americano, sendo África o principal centro de diversidade do gênero (Paton, 1991).

Trata-se de uma planta herbácea com hábito de crescimento anual e suas características fenotípicas variam de acordo à variedade. O manjeriço cultivado pode ser aproveitado em condições “*in natura*”, desidratado ou na extração dos seus óleos essenciais para suprir as indústrias alimentícia e médica. Pois possui diversos metabólitos secundários, com atividade biológica antioxidante, antifúngica e bactericida (Burt, 2004; Koroch et al., 2007). Os metabólitos secundários são estruturas carbonadas que não estão envolvidos diretamente no crescimento e desenvolvimentos de um organismo, quando comparados ao impacto dos metabólitos primários (Agostini-Costa et al., 2012), sendo que a ausência de metabólitos secundários não resultam em morte imediata da planta, mas apresentam funções relacionadas à sobrevivência desta, como mecanismo de defesa durante estresses bióticos e abióticos (Pagare et al., 2015). Estes podem ser classificados em distintos grupos: terpenoides, alcaloides, policetideos e fenilpropanoides (Thirumurugan et al., 2018). Em plantas de manjeriço, a síntese dos metabólitos secundários é dependente da variedade, altitude, idade fisiológica, estocagem, localização e condições ambientais (Hussain et al., 2008; Kruma et al., 2008; Nurzyńska-Wierdak, 2012; Scagel & Lee, 2012).

O estresse hídrico, por déficit de água, é um fator abiótico de comum ocorrência em sistemas agrícolas e é considerado um dos agravantes dentre os fatores ambientais que impactam negativamente na produção agrícola no mundo inteiro (Farooq et al., 2009a), além disso, a carência de água para as plantas cria um ambiente não favorável para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Ray et al., 2018). Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, abertura e fechamento estomático, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento vegetal, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, leva a alterações no metabolismo secundário (Taiz & Zeiger, 2006). Sendo que grandes quantidades de metabólitos

secundários são produzidos nas plantas para indução da tolerância ao estresse hídrico (Verma & Shukla, 2015).

O incremento dos níveis de metabólitos secundários está relacionado com uma maior qualidade e importância do ponto de vista comercial, já que em plantas da família Lamiaceae uma maior síntese de metabólitos secundários tem sido relacionados com condições de estresses ambientais e condicionado por efeitos no acúmulo de massa fresca e seca em *Thymus vulgaris* (Hassan et al., 2019), *Lavandula latifolia*, *Mentha piperita*, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia sclarea*, *Thymus capitatus* e *Thymus mastichina* (García-Caparrós et al., 2019), *Lavandula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* e *Thymus vulgaris* (Pirzad & Mohammadzadeh, 2018) e *Ocimum basilicum* L. (Pirbalouti et al., 2017).

Em vista de mitigar o efeito negativo do déficit hídrico no crescimento e desenvolvimento das plantas e a importância da síntese de metabólitos secundários, existem vários compostos contendo nitrogênio que são acumulados em plantas em resposta a diversos estresses ambientais como aminoácidos (prolina, arginina), amônio quaternário (glicina betaína) e poliaminas (Ahmad, 2012). Dentre esses grupos de metabólitos sinalizadores ao estresse ambiental destacam-se as poliaminas, pequenos compostos alifáticos presentes em plantas, animais e bactérias, que incluem espermidina, espermina; e seu precursor putrescina. Além de apresentarem-se como compostos com a função de regular os processos fisiológicos do desenvolvimento das plantas (Mustafavi et al., 2018).

As poliaminas estão presentes em sua forma livre ou podem configurar enlaces com ácidos fenólicos, especialmente com o ácido hidroxicinâmico e outros componentes de baixo peso molecular ou ácidos nucleicos e proteínas (Alcázar et al., 2010). Além de estarem envolvidos em vários processos metabólicos das plantas incluindo expressão gênica, síntese de proteínas e ADN, divisão e diferenciação celular, embriogêneses somática, organogêneses, quebra da dormência, desenvolvimento de flores e frutos, e senescência (Tavladoraki et al., 2012; Shi & Chan, 2014), também tem função de defesa contra estresses bióticos e abióticos mediante uma proteção integral e acúmulo destas substâncias em locais de maior vulnerabilidade (Fariduddin et al., 2013).

Diversos estudos têm demonstrado o efeito benéfico da aplicação exógena de poliaminas em características produtivas e estimulação na produção dos metabólitos secundários em plantas aromáticas, quando estas são submetidas a condições de restrição hídrica (Mustafavi et al., 2016;

Mohammadi et al., 2018; Abd Elbar et al., 2019), e os principais resultados sugerem que plantas pulverizadas com as poliaminas, conseguem incrementar o peso fresco e seco da parte aérea e raiz, incremento dos teores de clorofilas, acumulação de prolina e estimulação da atividade de enzimas antioxidantes para aliviar os efeitos oxidativos causados pelo estresse.

O manjeriço é uma espécie aromática altamente suscetível a estresses abióticos e bióticos, por este motivo, a pulverização com putrescina em plantas de manjeriço submetidas a déficit hídrico, surgem como uma alternativa produtiva no alívio dos efeitos negativos da restrição hídrica sob aspectos morfofisiológicos e no perfil químico dos óleos essenciais. Portanto, este trabalho objetiva avaliar o efeito da aplicação foliar de putrescina na produção agrônômica e conteúdo e qualidade dos óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) submetidas a diferentes níveis hídricos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições experimentais e delineamento experimental

A pesquisa foi desenvolvida em casa de vegetação no campo experimental da Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, no Laboratório de Fisiologia e Metabolismo da Produção Vegetal (LAFIMEPRO) e no Laboratório de Desenvolvimento de Agroquímicos Naturais (LDAN) durante o primeiro semestre de 2020. Foram utilizadas plantas de Manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) var. Limão.

As mudas foram obtidas a partir de plantas matrizes propagadas mediante estaquia de 10 cm de comprimento, com a base cortada em bisel (45°) e plantadas em bandejas de germinação com células de 6 cm largura x 6 cm comprimento x 9 cm profundidade, preenchidas com substrato, a base de solo (Tabela 1). As bandejas foram acondicionadas em casa de vegetação, com temperatura máxima e mínima de 35 e 18°C, respectivamente, aferidas durante o período experimental. Após 20 dias, foi realizado o transplante das 24 plantas mais homogêneas para vasos com capacidade de 8,5 dm³, preenchidos com solo (Tabela 1). E aos 18 dias após o transplante (DAT) foi realizada a poda de formação. Duas adubações foram realizadas: a primeira no momento do transplante com 5 gramas (g) por vaso de 10:10:10 (N-P-K), nos formulados ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente, Ca (9,9) e S (6,2). A segunda

adubação foi aos 18 DAT com 20 g por vaso do mesmo adubo. Os tratos culturais foram realizados de acordo aos preconizados para o cultivo comercial.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), em arranjo fatorial 4x2. O primeiro fator representa as quatro doses de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) e o segundo fator, dois níveis de água (80% e 60 % da capacidade de retenção do solo), com 3 repetições, para um total de 24 unidades experimentais. Os tratamentos seguem o padrão descrito a seguir: T1=Put0 + 80%, T2=Put0 + 60%, T3=Put50 + 80%, T4=Put50 + 60%, T5=Put100 + 80%, T6=Put100 + 60%, T7=Put150 + 80% e T8=Put150 + 60%. Foram realizadas três pulverizações com as doses de: 0, 50, 100 e 150 mg de putrescina L⁻¹ aos 36, 43 e 50 DAT com um volume de 30 mL da solução por tratamento.

Tabela 1. Análise química do solo utilizado na pesquisa, Rio Paranaíba, MG. 2019.

pH	Matéria orgânica	P	K	S	Ca	Mg	Al	Zn	B	Cu	Fe	Mn	CTC	Soma de bases	Sat. Bases
	dag.dm ⁻³	mg.dm ⁻³			cmolc.dm ⁻³			mg.dm ⁻³					cmolc.dm ⁻³	%	
5.5	2	4.2	26	9	2.1	0.7	0.3	0.5	0.2	0.9	34	3.8	7.77	2.87	36.9

2.2 Regime de irrigação

Para determinar o 100% da capacidade de retenção de água no vaso (CV), depois de 24 h de irrigado o solo, foi registrado o peso úmido. Logo foi secado a 105°C, durante 72 h, após foi registrado o peso seco. O volume de água correspondente a 100% da capacidade do vaso foi determinado pela equação descrita por Farahani et al. (2009):

$$\theta_w = \frac{\text{Massa solo úmido (g)} - \text{Massa solo seco (g)}}{\text{Massa solo seco (g)}}$$

O nível de 80% da capacidade do vaso, foi considerado como status hídrico adequado e 60% como o déficit hídrico moderado. Ao dia seguinte da última pulverização com a putrescina, as plantas foram submetidas a estes regimes de irrigação de acordo aos tratamentos descritos anteriormente e mantidos por 10 dias.

2.3 Análises biométricas, fisiológicas e químicas das plantas de manjeriço

Foram constituídas duas amostragens, correspondentes a 55 e 60 DAT. Nos dois dias, foram avaliados o conteúdo relativo de água (CRA), pigmentos fotossintéticos foliares, variáveis fisiológicas e prolina. Aos 55 DAT foi avaliada proteína solúvel e atividade das enzimas

antioxidantes. Aos 67 DAT, foi medida a altura das plantas, posteriormente foram coletadas e dispostas em sacolas de papel para extração e análise dos óleos essenciais.

2.3.1 Biometria vegetal: altura, matéria fresca, matéria seca.

Aos 67 DAT foram mensuradas as alturas de planta, medidas tomadas desde a base da haste principal até o ápice, com auxílio de uma régua milimetrada (cm). Além disso, foi conduzida a coleta das plantas, estas tiveram cortes na base e imediatamente pesadas para obtenção a massa fresca com balança de precisão, em seguida foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para secagem numa estufa de circulação forçada de ar a 40°C, durante 24 h, depois foram pesadas para obter a massa seca de cada planta por vaso e destiladas para obter e analisar os óleos essenciais.

2.3.2 Conteúdo relativo de água (CRA), pigmentos fotossintetizantes, trocas gasosas e atividade de enzimas antioxidantes.

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado aos 55 e 60 DAT, através da coleta de uma folha completamente expandida, por repetição, de cada tratamento. Este material foi pesado para obter a massa fresca (MF), depois, foi submergida em tubos falcon de 50 mL, com 10 mL de água destilada até atingir a turgência e registrou-se a massa túrgida (MT). Logo, a folha foi disposta numa sacola de papel e levada para secagem numa estufa de circulação forçada de ar durante 72 horas a 60 °C, depois registrou-se a massa seca (MS). Finalmente, O CRA foi determinado de acordo com a equação descrita por (Zegaoui et al., 2017):

$$CRA (\%) = \frac{(MF-MS)}{(MT-MS)} \times 100$$

Aos 55 e 60 DAT foram quantificados os pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), total (Cl *total*) e carotenoides. Uma folha madura completamente expandida no terço médio da planta, por repetição de cada tratamento, foi coletada e aferida a massa de segmentos foliares ($\pm 0,1g$), posteriormente este material foi acondicionada num tubo Falcon® de 50 mL, contendo 10 mL de acetona 80% (v/v), e armazenado em local escuro, durante 72 horas (Macedo et al., 2013). Os extratos foram submetidos a leitura no espectrofotômetro de UV nas absorvâncias de 470, 645 e 663 nm, para determinação de Cl *a*, *b*, *total* e carotenoides.

Os valores obtidos das absorvâncias foram aplicados nas equações de teores de clorofilas (Witham et al., 1971) e carotenoides (Lichtenthaler & Wellburn, 1983), para obtenção dos valores em $mg\ g^{-1}$.

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= [(12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}) * \frac{V}{1000 * W}] \\ \text{Clorofila } b &= [(22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}) * \frac{V}{1000 * W}] \\ \text{Clorofila total} &= [(20,2 * A_{645} + 8,02 * A_{663}) * \frac{V}{1000 * W}] \\ \text{Carotenóides} &= \frac{[(1000 * A_{470} - 3,27 * Cl\ a - 104 * Cl\ b)/229]}{1000 * W} \end{aligned}$$

Onde: W=peso da amostra, V=volume da solução extratora acetona (80% - V/V)

Aos 55 e 60 DAT, que corresponderam aos dias 5 e 10 dias de déficit hídrico acumulado, foram mensuradas as trocas gasosas das plantas, em terço médio da planta, especificamente nas mesmas folhas utilizadas para a extração dos pigmentos fotossintéticos. As mensurações ocorreram entre 9 e 10 h, com ajuda de um sistema de trocas gasosas portátil (LI-6400XT; LICOR Inc., Lincoln, NE, EUA), o qual está equipado com um fluorômetro modulado (LCF-40 LICOR Inc.) sob saturação de radiação fotossinteticamente ativa (Q) com fluxo de ar de 800 $\mu\text{mol s}^{-1}$; para mensuração das variáveis: assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), transpiração foliar (E) e pressão intercelular de CO_2 (C_i). Além disso, foram calculadas a eficiência do uso da água (EUA=A/E) e a eficiência instantânea da carboxilação (A/ C_i).

O teor de proteína total solúvel (PTS) foi determinado de acordo ao procedimento descrito por Bradford (Bradford, 1976). Folhas frescas foram dispostas num almofariz frio e maceradas utilizando nitrogênio líquido, logo as amostras foram pesadas (100 mg) e dispostas em tubos de micro centrifuga. Foi adicionado 1,5 mL de tampão Tris-HCl (50 mM e pH 7,5) e homogeneizado em vórtex, em seguida o material foi levado à centrifuga a 6149 g durante 15 min, à 4 °C. Foi retirado em torno de 500 μL do sobrenadante e transferido para outro microtubo. Para o momento da leitura, em tubos de ensaio foram adicionados 100 μL do extrato proteico e 2000 μL do reagente Bradford pronto para uso (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil). A solução ficou em temperatura ambiente durante 5 min e logo foi medida a absorbância de 595 nm. Os valores foram ajustados à curva padrão preparada com albumina de soro bovino (BSA).

Com relação a análise da atividade de enzimas antioxidantes, folhas frescas foram dispostas num almofariz frio e pulverizadas em nitrogênio líquido. Em seguida foram pesadas (200-250 mg) amostras e dispostas em tubos de micro centrifuga. Foi adicionado 750 μL de Fosfato de Potássio 200 mM com pH 7,8, 15 μL de EDTA 10 mM, 150 μL Ácido Ascórbico 200

mM e 585 μL Água Milli-Q. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 min. Após, coletou-se o sobrenadante que foi utilizado para as análises das enzimas:

Para Catalase (CAT), preparou-se 10 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), diluindo 260 μL de H_2O_2 em 10 mL de água Mili-Q. Para fazer a leitura, pipetou-se no tampão de incubação em banho-maria: 37,5 μL H_2O , 50 μL de H_2O_2 250 mM e 12,5 μL do extrato obtido anteriormente. Logo, foi vertido numa cubeta de quartzo e submetido à leitura em espectrofotômetro a 240 nm. Determinou-se a absorbância durante 60 segundos com leitura cada 10 segundos.

Para ascorbato peroxidase (APX), durante 5 min no banho-maria a 27 °C, colocou-se o extrato obtido (contendo 500 μL de tampão fosfato de potássio 200mM, 50 μL de ácido ascórbico 10 mM e 350 μL de H_2O). Para preparar o ácido ascórbico, foi pesado 0,176 g e diluído em 10 mL de água, depois, 1 mL da solução foi diluído em 9 mL de água Mili-Q. Para preparar H_2O_2 , 160 μL do peróxido preparado para a CAT foi diluído em 20 mL de água. Para fazer a leitura, pipetou-se no tampão de incubação em banho-maria: 37,5 μL H_2O , 50 μL de H_2O_2 2 mM e 12,5 μL da amostra. Logo, foi vertido numa cubeta de quartzo e submetido à leitura em espectrofotômetro a 290 nm. Determinou-se a absorbância durante 60 segundos com leitura cada 10 segundos.

Para superóxido dismutase (SOD), primeiro, preparou-se a Riboflavina, diluindo 20 μL da solução estoque em 10 mL de água e logo armazenou-se num recipiente forrado com papel alumínio. Para preparar o MIX, utilizou-se 2000 μL tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8, 800 μL de metionina 70 mM, 40 μL EDTA 10 μM , 300 μL NBT 1 mM e 620 μL água Mili-Q. Para fazer a leitura, pipetou-se nos tubos de ensaio 1880 μL do MIX (em duplicata por amostra), 100 μL da amostra e 20 μL de riboflavina. Agitou-se no vórtex e em seguida submeteu-se os tubos à iluminação intensa durante 25 minutos, logo as soluções foram transferidas para as cubetas e submeter à leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

Para a determinação de prolina, folhas frescas foram pulverizadas com nitrogênio líquido e pesadas (0,2 g), num tubo de ensaio foi adicionado o material e 2 mL do ácido sulfosalicílico a 3% (g/L), logo as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 min. Misturou-se 2 mL do sobrenadante com 2 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ninhidrina ácida. Foi fervido em banho maria a 100 °C durante 60 min. Foi adicionado 3 mL de tolueno e misturado vigorosamente até homogeneizar. Posteriormente procedeu-se a leitura das amostras em

espectrofotômetro a 520 nm, utilizando o tolueno como testemunha. Elaborou-se uma curva padrão para determinar a concentração de prolina (Bates et al., 1973).

2.3.3 Análises químicas: Óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, com auxílio de um aparelho Clevenger. Após da coleta das folhas de manjeriço, o material fresco foi pesado e triturado num liquidificador com 300 mL de água destilada. A extração foi feita durante 70 min, após a primeira gota de óleo. Os óleos obtidos foram pesados e armazenados em recipientes para logo fazer a análise dos seus componentes.

A análise química dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), em um equipamento modelo QP2010 (Shimadzu). A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas com os existentes na biblioteca NIST, interpretação visual dos espectros de massas e comparação dos índices de retenção. O percentual relativo de cada composto foi calculado através da razão entre área de cada pico com a área total de todos os constituintes da amostra.

2.4 Análise estatística

Os dados obtidos das variáveis biométricas e fisiológicas foram analisados com auxílio do software estatístico R. As médias foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e posteriormente a comparação das médias pelo teste SNK com nível de significância de 5%. Os gráficos foram plotados no software Microsoft Excel[®] 2010. As análises de dados dos óleos essenciais foram realizadas no software MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca), mediante análise estatística multivariada, incluindo análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PSL-DA). A escolha das variáveis utilizadas no PSL-DA foram determinadas do acordo a intensidade de aparição dos metabolitos e classificadas como as variáveis importantes na projeção (VIP).

3. RESULTADOS

3.1 Biometria das plantas de manjeriço

Medições de altura das plantas não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de 80% e 60% da água e entre as diferentes concentrações da putrescina (Figura 1). No entanto, observou-se que as plantas com nível adequado de água (80%) obtiveram ganhos médios no

comprimento da parte aérea com média de 3.8cm superior ao tratamento com déficit moderado (60%). Enquanto a concentração de 150 mg L⁻¹ apresentou os menores valores de comprimento para os dois níveis de disponibilidade hídrica.

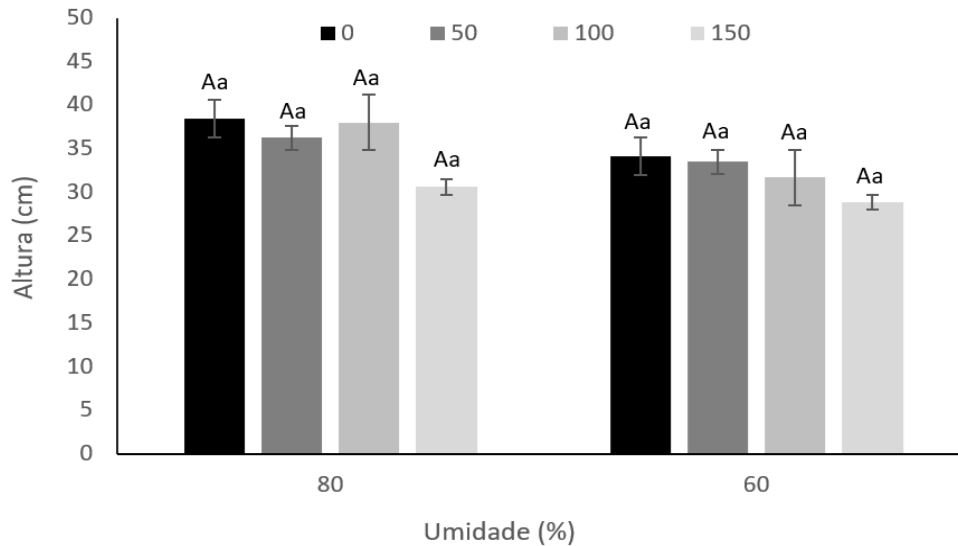


Figura 1. Altura (cm) de plantas de manjericão submetidas a concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

A massa seca das plantas foi maior e apresentou diferença significativa dentro das doses de putrescina no nível de 80% da CV em comparação as plantas do nível 60% da CV (Figura 2). Plantas com 80% da CV, tiveram sua máxima acumulação de matéria seca na dose 50 mg L⁻¹ de putrescina, com 7,3 g de matéria seca por planta, logo apresentaram uma queda de acordo com o incremento das doses. Por outro lado, plantas com 60% da CV, apresentaram um comportamento crescente até atingir sua máxima acumulação de matéria seca na dose 100 mg L⁻¹ de putrescina com 5,4 g de matéria seca por planta.

3.2 Análises fisiológicas das plantas de manjericão

Aos 5 e 10 dias após imposição do estresse (DAE), o CRA não apresentou diferenças significativas para os dois níveis de água e doses de putrescina (Figura 3). Porém, no 5 DAE, para o tratamento de 80% da CV, observou-se comportamento crescente dos valores de CRA, e as doses crescentes de putrescina até os 100 mg L⁻¹ com valores superiores a80%, mas com uma

diminuição para 73,5%, com a dose de 150 mg L⁻¹. Para 60% da CV o valor máximo observado do CRA foi de 79,3% para a dose de 50 mg L⁻¹. Já, para o 10 DAE, plantas com irrigação adequada (80%), apresentaram decréscimo do CRA nas doses de 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina e maiores valores para plantas tratadas com doses de 150 mg L⁻¹ até o valor de 87,6%. Em plantas com déficit hídrico moderado (60%), o CRA incrementou com maiores doses de putrescina, com 76,9 e 87,6% para o tratamento testemunha e 150 mg L⁻¹, respectivamente.

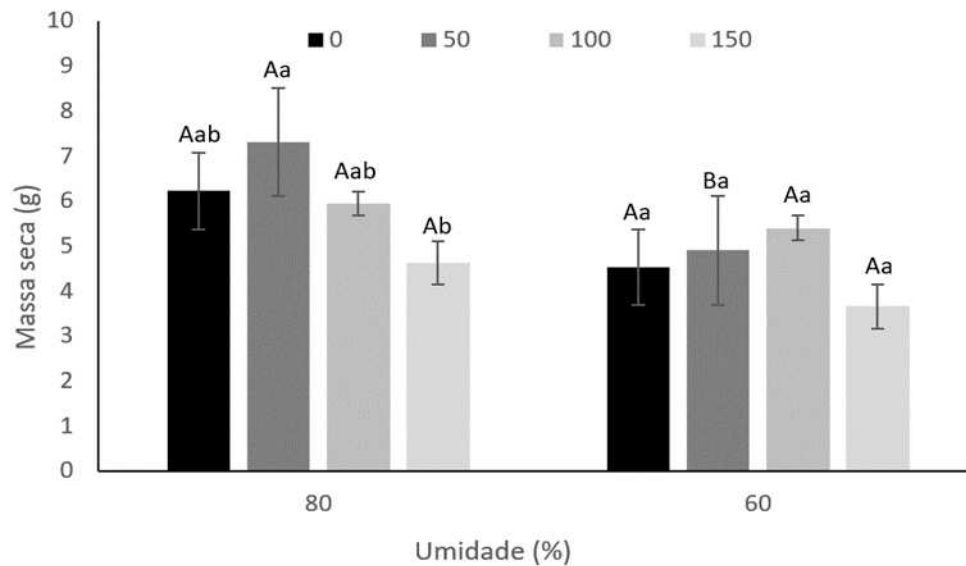


Figura 2. Massa seca (g) de plantas de manjericão submetidas a concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

Para assimilação de CO₂, houve diferenças significativas entre os tratamentos para os dois dias das amostragens. Aos 5 DAE, plantas com irrigação adequada e pulverizadas com 100 mg L⁻¹ e 150 mg L⁻¹ de putrescina tiveram menores valores de assimilação de CO₂, quando comparado com as doses inferiores de putrescina, sob o mesmo nível de disponibilidade hídrica, sendo que as plantas controle e àquelas pulverizadas com 50 mg L⁻¹, obtiveram-se os maiores valores de assimilação de CO₂ (Figura 4). As plantas sob déficit hídrico moderado, unicamente plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina diferiram em valores de assimilação de CO₂ com as

plantas sem estresse com valores de 21,69 e 14,71 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para 80 e 60%, respectivamente.

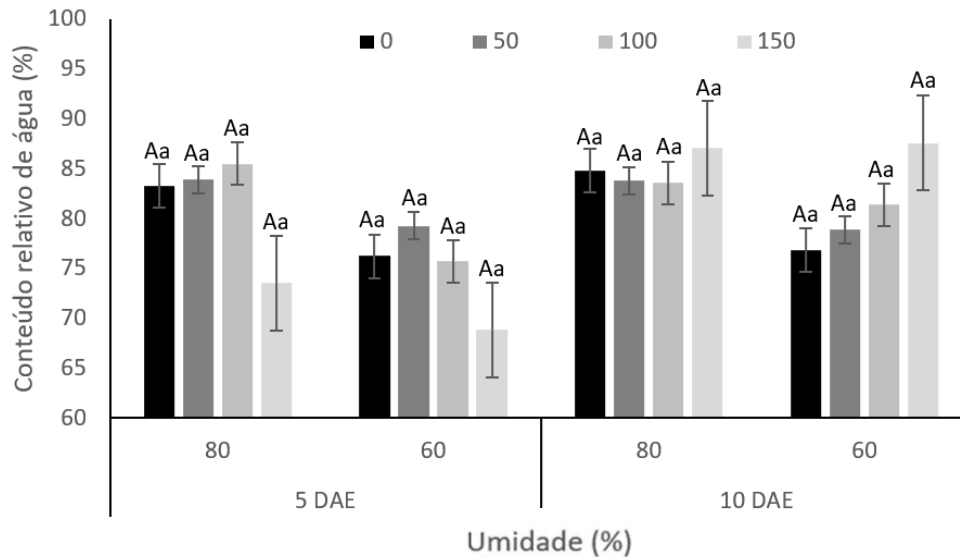


Figura 3. Conteúdo relativo de água (%) em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L^{-1}) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

E aos 10 DAE, somente as plantas sob déficit hídrico moderado apresentaram diferenças significativas nos seus valores de assimilação de CO_2 entre as doses de putrescina. Para o nível de 80% da CV não houve diferenças significativas entre as doses de putrescina. E para plantas sob déficit hídrico moderado, 50 e 100 mg L^{-1} de putrescina tiveram maiores valores de assimilação de CO_2 .

Para condutância estomática, em ambas as datas de análise (5 e 10 DAE), houve diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 80% da CV, enquanto ao nível 60% da CV apresentou, menores valores quando se comparou com as plantas com ótima irrigação (Figura 5).

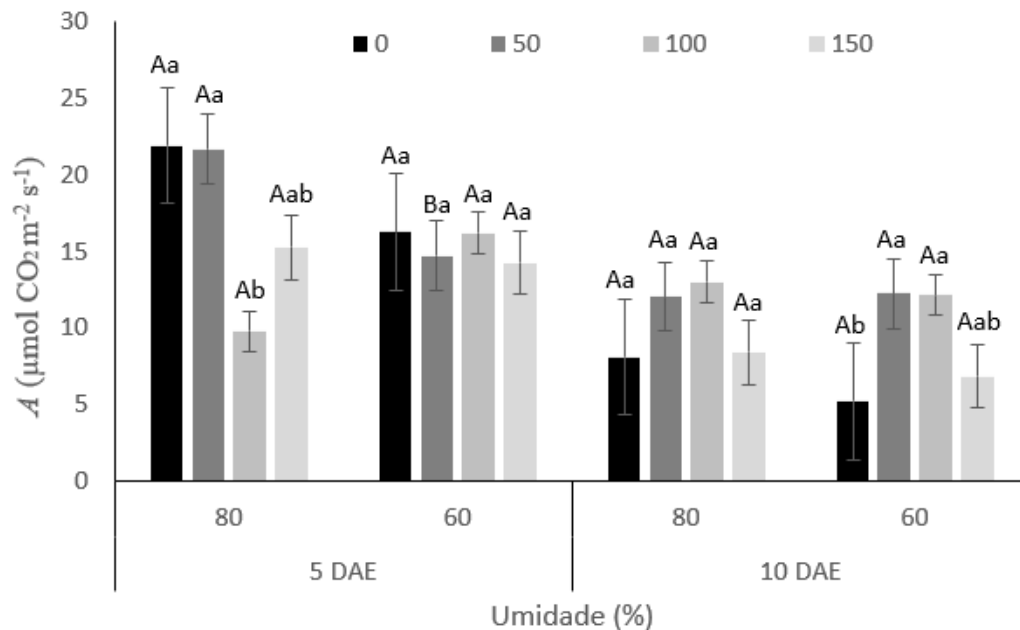


Figura 4. Assimilação de CO_2 (A) em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L^{-1}) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

Para o 5 DAE, os maiores valores de condutância estomática foram atingidos pelas plantas pulverizadas com 50 mg L^{-1} de putrescina, seguidas por as plantas controle, 150 e 100 mg L^{-1} de putrescina nessa ordem. Sob déficit hídrico moderado, não houve diferenças significativas dentre as doses de putrescina.

Para o 10 DAE, plantas pulverizadas com 50 mg L^{-1} de putrescina tiveram valores significativamente diferentes em comparação com os outros tratamentos no nível de 80% da CV. Sob déficit hídrico, não houve diferenças significativas dentre as doses de putrescina.

Para pressão intercelular de CO_2 , observou-se que para os 5 e 10 DAE não houve diferenças significativas entre as doses de putrescina nem dos níveis de água (Figura 6). Somente, houve diferenças entre os níveis de água no 10 DAE; no nível de 60% da CV as doses de 0 e 50 mg L^{-1} de putrescina apresentaram valores significativamente menores das mesmas doses nas plantas com 80% da CV.

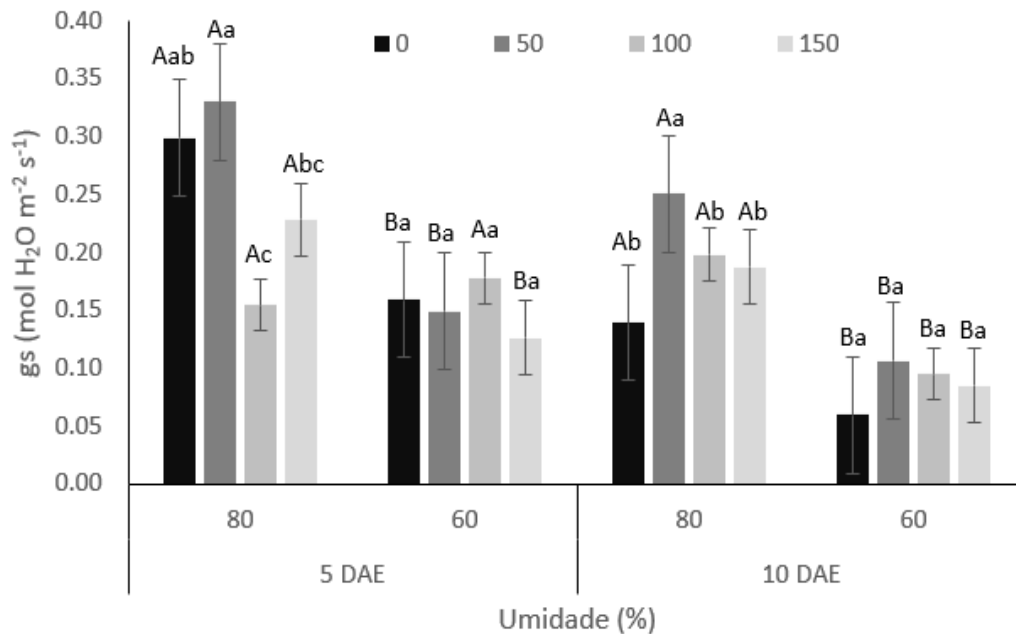


Figura 5. Condutância estomática (g_s) em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L^{-1}) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

Com 5 DAE, para os dois níveis de água, a pressão intercelular de CO_2 teve um incremento diretamente proporcional à dose de putrescina até 100 mg L^{-1} desta. Logo, os valores decresceram. Já, para o 10 DAE, o nível de 80% da CV apresentou os maiores valores de pressão intercelular de CO_2 , especialmente plantas pulverizadas com 50 mg L^{-1} de putrescina. Finalmente, plantas sob estresse hídrico, apresentaram incremento da pressão intercelular de CO_2 conforme aumentava a dose de putrescina até atingir o valor máximo na dose 100 mg L^{-1} , logo diminuiu.

Para transpiração foliar, observou-se que unicamente para o 10 DAE houve diferenças significativas entre os níveis de água e doses de putrescina (Figura 7).

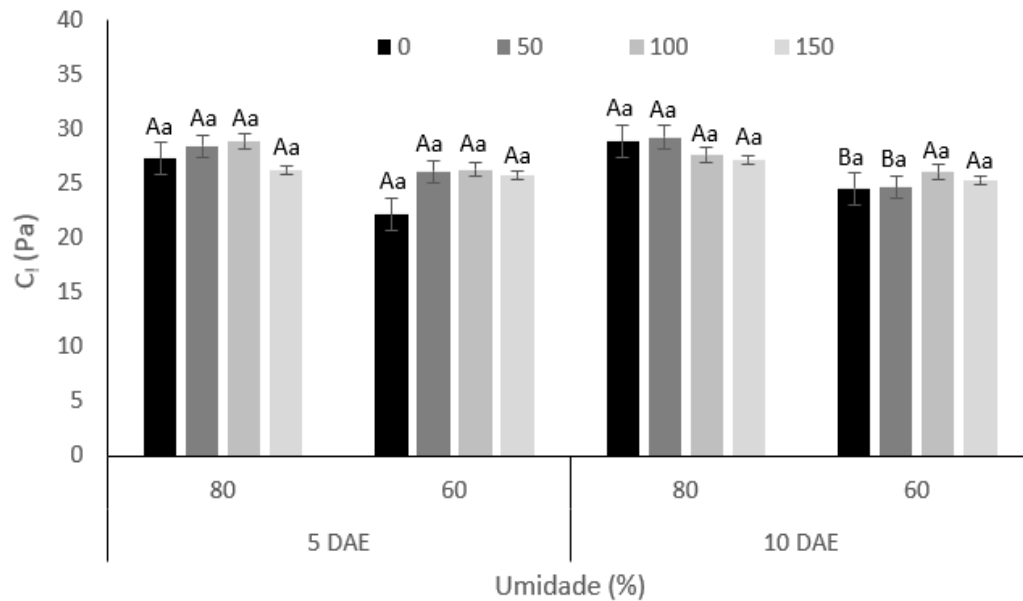


Figura 6. Pressão intercelular de CO₂ (C_i) em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

Para os 5 e 10 DAE, as plantas com irrigação adequada, apresentaram maiores valores de transpiração foliar comparadas com plantas sob déficit hídrico moderado (exceção das plantas pulverizadas com 100 mg L⁻¹ no nível 80% da CV). Plantas irrigadas com 80% da CV e pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina apresentaram maiores valores de transpiração foliar em comparação com os outros tratamentos no mesmo nível de disponibilidade de água. Por outro lado, plantas irrigadas com 60% da CV e pulverizadas com 100 mg L⁻¹ de putrescina tiveram maiores valores de transpiração foliar em comparação as outras doses de putrescina.

A eficiência do uso da água (EUA) teve diferenças significativas no 10 DAE entre os níveis de água e as doses de putrescina (Figura 8). Aos 5 DAE, valores maiores da EUA foram observados em plantas com o 60% da CV em comparação com aquelas plantas com o 80% da CV. Aos 10 DAE, valores maiores da EUA foram evidenciados em plantas com o 60% da CV quando se compararam com aquelas com 80% da CV, especialmente em plantas pulverizadas com 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina.

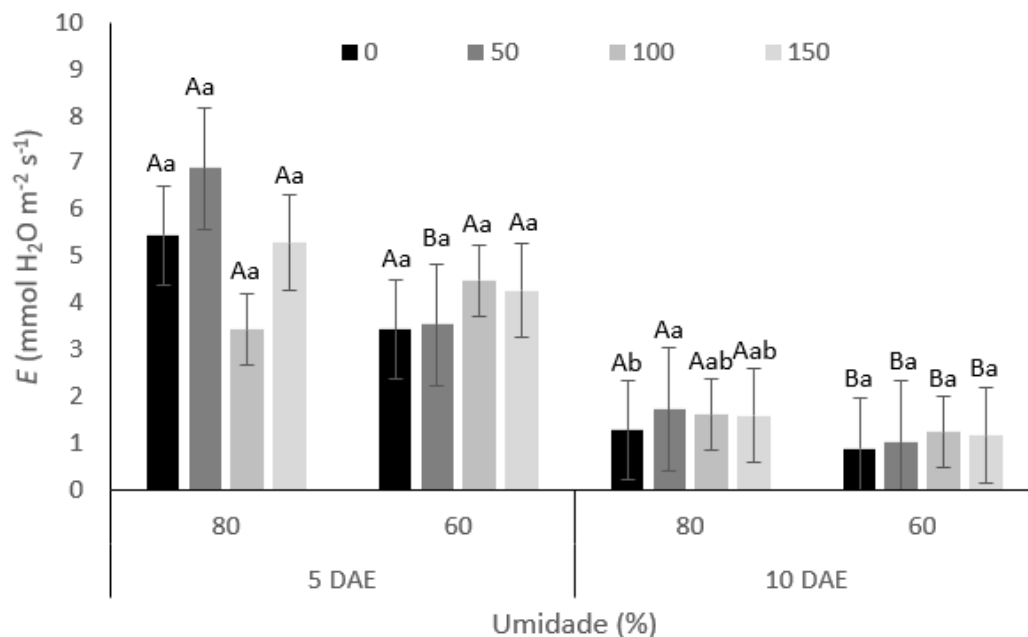


Figura 7. Transpiração foliar (E) em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

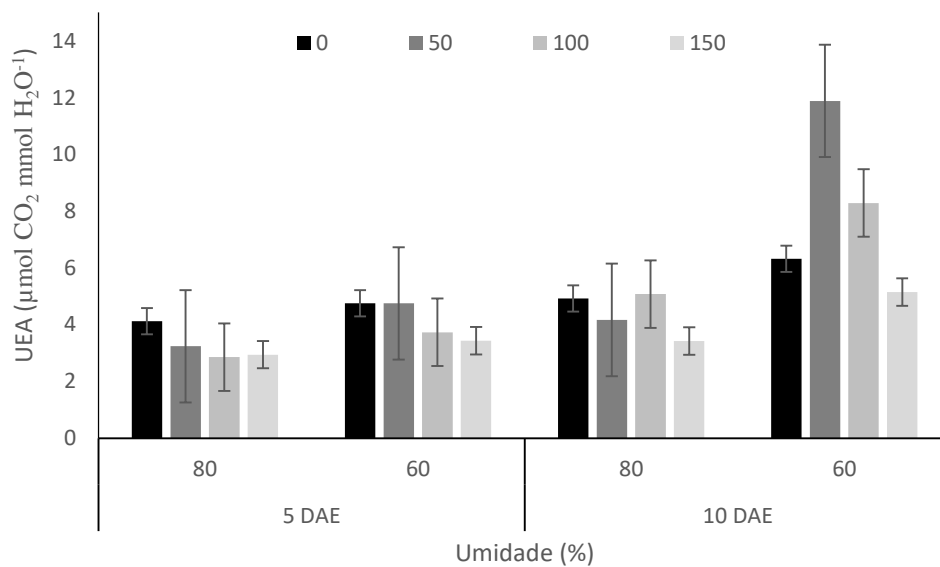


Figura 8. Uso eficiente da água (UEA) em plantas de manjeriço pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

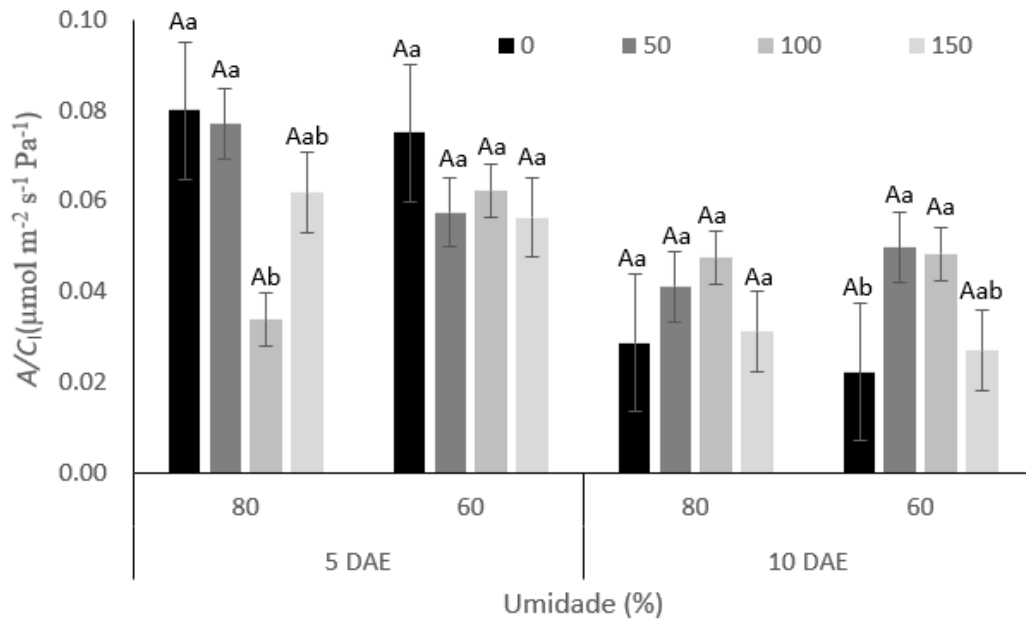


Figura 9. Eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) em plantas de manjeriço pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

A eficiência instantânea de carboxilação teve efeito significativo unicamente para doses de putrescina aos 5 DAE em plantas com irrigação adequada e aos 10 DAE em plantas sob déficit hídrico moderado (Figura 9). Com 5 DAE, as plantas pertencentes ao tratamento controle, e àquelas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina apresentaram os maiores valores da eficiência instantânea de carboxilação para o nível adequado de irrigação. Aos 10 DAE, os valores maiores da eficiência instantânea de carboxilação foram atingidos para as plantas pulverizadas com 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina nos dois níveis de disponibilidade de água testados.

Teor de pigmentos fotossintetizantes

O teor da *Cl a* teve diferenças significativas entre os níveis de água e doses de putrescina para os 5 e 10 DAE (Figura 10A). Também se observou uma tendência de diminuição dos teores do pigmento fotossintético no 10 DAE quando se comparou com o 5 DAE nos dois níveis testados.

Para o 5 DAE, plantas com irrigação adequada e pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina obtiveram teores significativamente maiores de *Cl a* em comparação com as outras doses da poliamina e o tratamento controle dentro o mesmo nível. No nível de 60% da CV, não houve diferenças significativas entre as doses, no entanto, plantas pulverizadas com 100 mg L⁻¹ de putrescina apresentaram valores maiores dentro do mesmo nível e inclusive maior aos teores das doses no nível com irrigação adequada, a exceção das plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina.

Para o 10 DAE, no nível de 80% da CV não se observou diferenças significativas de acordo a dose de putrescina; em contraste ao nível de 60% da CV, onde os maiores teores da *Cl a* foram atingidos por plantas pulverizadas com 150 mg L⁻¹ de putrescina, seguidas por 50, controle e 100 mg L⁻¹ nessa ordem.

O teor de *Cl b* teve diferenças significativas entre níveis de água e doses de putrescina no 5 DAE. No 10 DAE, unicamente obtivesse diferenças significativas dentro os níveis de água (Figura 10B). Além disso, os teores da *Cl b*, tenderam a aumentar conforme se acumulavam dias de estresse para o nível de 80% da CV, com exceção das plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina. Em contraste ao nível de 60% da CV, onde a tendência foi diminuir com o aumento dos dias de imposição da deficiência hídrica.

Para o 5 DAE, plantas com irrigação adequada e pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina tiveram significativamente maiores teores de *Cl b* em comparação com os outros tratamentos dentro do mesmo nível de disponibilidade hídrica. Já, para as plantas sob déficit hídrico moderado não apresentaram diferenças entre as doses de putrescina.

Para o 10 DAE, plantas sob déficit hídrico moderado, apresentaram teores de *Cl b* menores em comparação com o nível de irrigação adequada. Os teores maiores corresponderam às plantas com pulverização de 100 e 150 mg L⁻¹ de putrescina para os níveis de 80 e 60% da CV, respectivamente.

A *Cl total* teve diferenças significativas entre níveis de água e doses de putrescina no 5 DAE. No 10 DAE, unicamente obtivesse diferenças significativas dentre os níveis de água (Figura 10C). A *Cl total* teve uma tendência a aumentar nas plantas com o nível de 80% da CV conforme passaram os dias, com exceção das plantas tratadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina. Por outro lado, a *Cl total* tendeu a diminuir com o aumento do número de dias da deficiência hídrica nas plantas com 60% da CV.

Aos 5 DAE, plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina e com irrigação adequada tiveram teores de *Cl total* significativamente maiores quando se compararam com as plantas que foram tratadas com outras doses da poliamina. Para as plantas submetidas a déficit hídrico moderado, não houve diferenças significativas entre as doses, embora as plantas tratadas com 100 mg L⁻¹ de putrescina tiveram 11% maior *Cl total* em comparação com o tratamento controle.

Aos 10 DAE, embora não houve diferenças significativas dentre as doses de putrescina, maiores valores de *Cl total* foram atingidos por plantas do nível 80% de CV em comparação com aquelas do nível 60% de CV.

O teor de carotenoides teve interação dos fatores nos dois dias da amostragem. O efeito das doses de putrescina foram observadas ao 5 e 10 DAE nas plantas de 80% e 60% da CV, respectivamente (Figura 10D). Os teores de carotenoides tenderam a aumentar nas plantas com o nível de 80% da CV conforme passaram os dias, com exceção das plantas tratadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina. Por outro lado, os teores de carotenoides tenderam a diminuir com o passo dos dias da deficiência hídrica nas plantas com 60% da CV.

Aos 5 DAE, plantas sob irrigação adequada e pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina tiveram teores significativamente maiores em comparação com as outras doses de putrescina dentre o mesmo nível. Em plantas sob déficit hídrico moderado, não houve diferenças significativas, no entanto, plantas pulverizadas com 100 mg L⁻¹ de putrescina tiveram um leve incremento de 10% no teor de carotenoides em comparação com as plantas sem pulverização no mesmo nível de água.

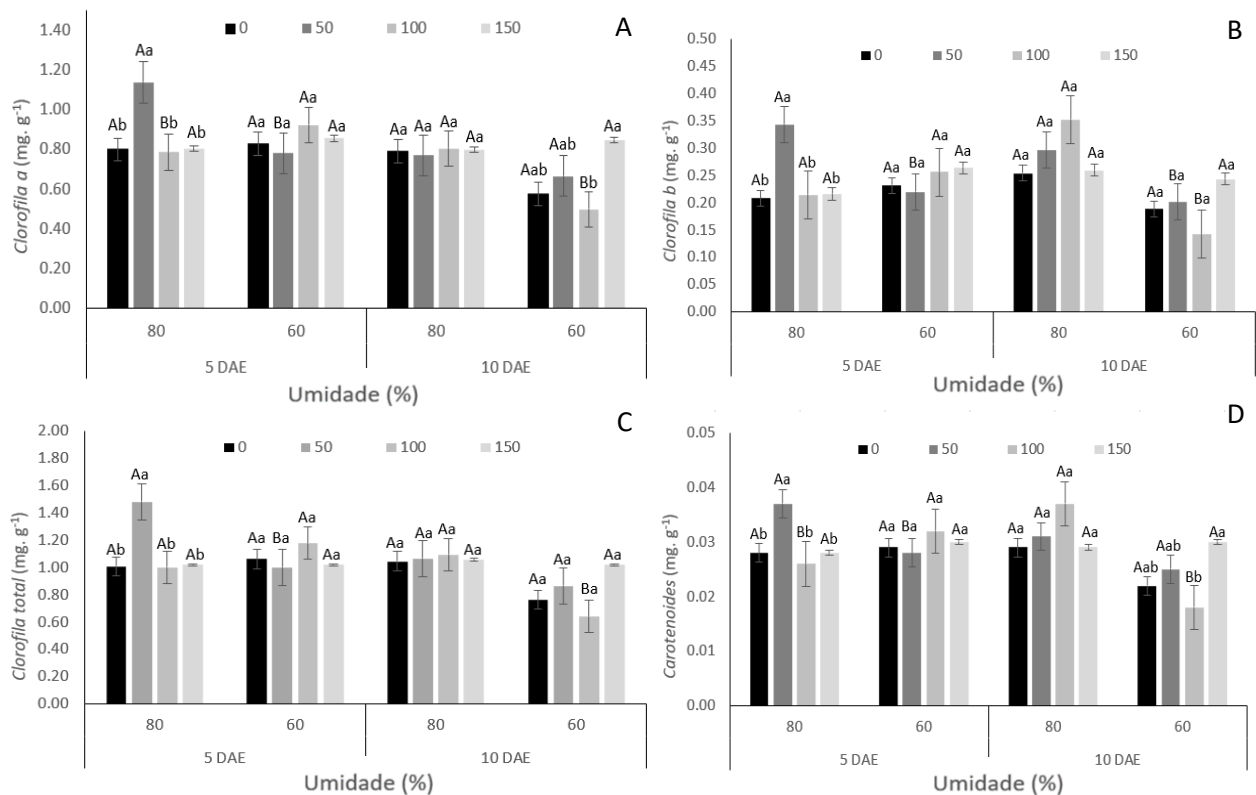


Figura 10. Teor pigmentos fotossintéticos A) Cl *a*, B) Cl *b*, C) Cl *total* e D) Carotenoides em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre os níveis de água e minúsculas entre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

Aos 10 DAE, plantas no nível de 60% da CV e pulverizadas com 150 mg L⁻¹ de putrescina tiveram diferenças significativas no teor de carotenoides em comparação às outras plantas.

Para a análise de proteínas totais solúveis, observou-se que o conteúdo total foi relativamente maior nas plantas sob condições de irrigação adequada em comparação com as plantas sob déficit hídrico moderado (Figura 11A). Dentro o nível de 80% da CV houve diferenças significativas nas plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina. Não houve diferenças significativas no nível de 60% da CV.

Para a atividade da SOD, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Observou-se que para o nível de 80% da CV, a maior atividade foi registrada para as plantas sem aplicação de putrescina (Figura 11B). No nível de 60% da CV, não houve diferenças significativas na resposta da atividade da SOD. Para a atividade da APX, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 11C). Porém, houve tendência de ter maior atividade nas plantas pulverizadas com 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina no nível de 80 e 60%, respectivamente.

Para a atividade da CAT, plantas sob déficit hídrico tiveram maior atividade em comparação com as plantas com irrigação adequada, embora, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 11D). Observou-se que para o nível de 80% da CV, a maior atividade foi registrada para as plantas sem aplicação de putrescina. No nível de 60% da CV, a maior atividade correspondeu a plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina.

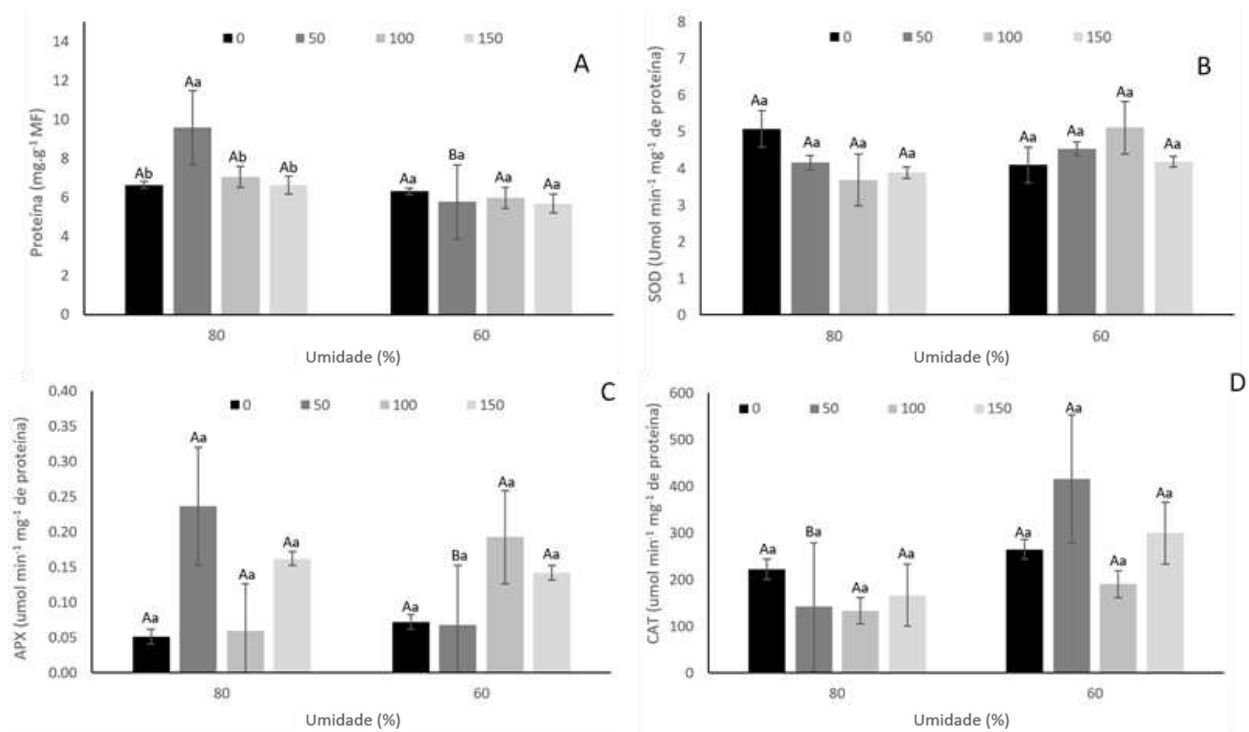


Figura 11. A) Proteína total solúvel (PTS) e atividade de enzimas antioxidantes: B) Superóxido dismutase (SOD), C) Ascorbato peroxidase (APX) e D) Catalase (CAT) em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

Com relação ao teor de prolina foi relativamente baixo no 5 DAE quando se compara com aos 10 DAE; e unicamente teve diferenças significativas entre doses de putrescina no 10 DAE em plantas sob déficit hídrico moderado (Figura 12).

Observou-se que nos 10 DAE, plantas do nível de 60% da CV acumularam maiores valores de prolina que as plantas de 80% da CV, especialmente as plantas pulverizadas com 100 mg L⁻¹ de putrescina tiveram teores significativamente maiores de prolina em comparação com as outras doses, dentre o mesmo nível de disponibilidade hídrica.

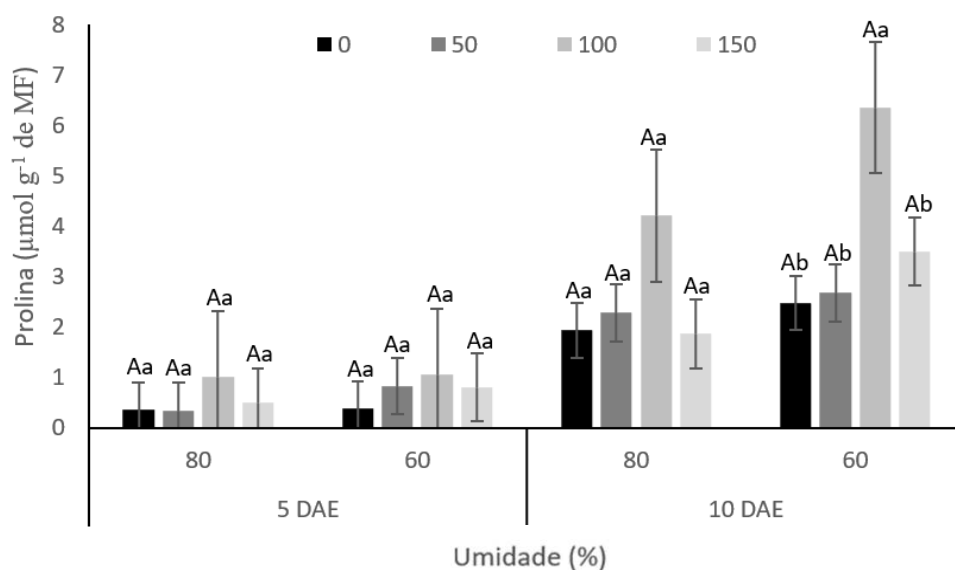


Figura 12. Prolina em plantas de manjericão pulverizadas com concentrações de putrescina (0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹) sob condições de adequada irrigação (80%) e déficit hídrico moderado (60%) aos 5 e 10 dias após o estresse (DAE). Valores seguidos pelas mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente dentre os níveis de água e minúsculas dentre as doses de putrescina pelo teste SNK ($\alpha = 5\%$).

3.3 Análises químicas das plantas de manjericão

Não houve diferenças significativas dos metabolitos secundários entre as doses de putrescina. Embora, foram constatadas diferenças dos componentes e intensidade destes, entre os níveis de água no solo (Figuras 13, 14 e 15).

Independente das concentrações de putrescina pulverizadas observou-se que houve dois diferentes grupos (irrigação adequada e déficit hídrico moderado) que representaram distinta variância entre eles. Já, para as plantas sem aplicação de putrescina, os principais componentes (PC1 e PC2) representaram 43.1% e 29.5% da variância, respectivamente (Figura 13A). Para plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ foi de 28,2% e 26.2% da variância (Figura 14A). E na dose de 100 mg L⁻¹, corresponderam a 34.8% e 26% da variância (Figura 15A).

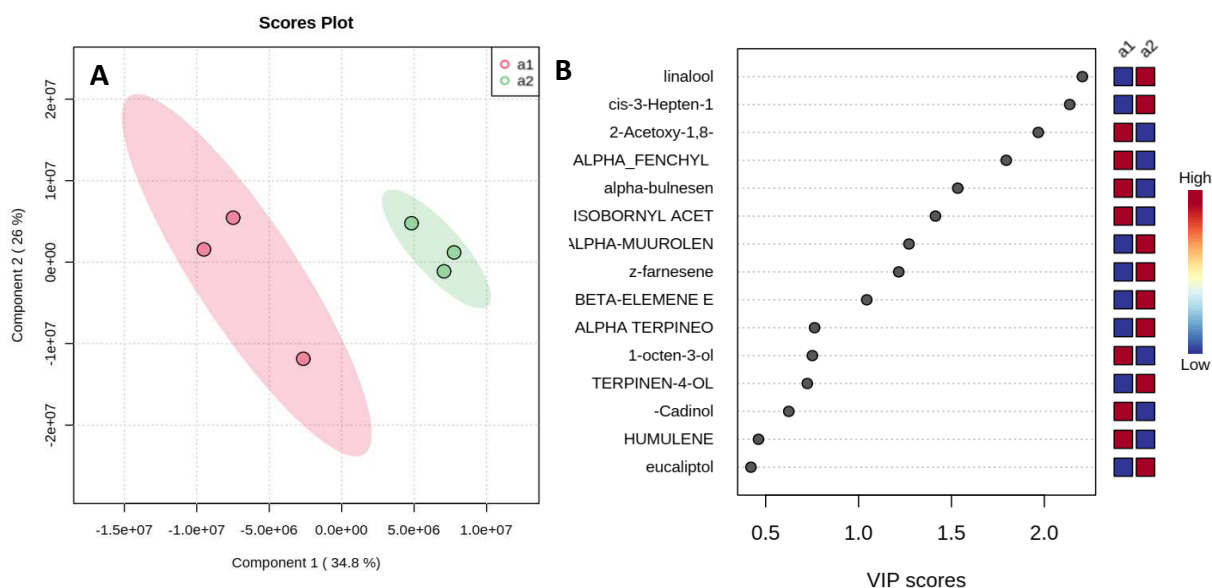


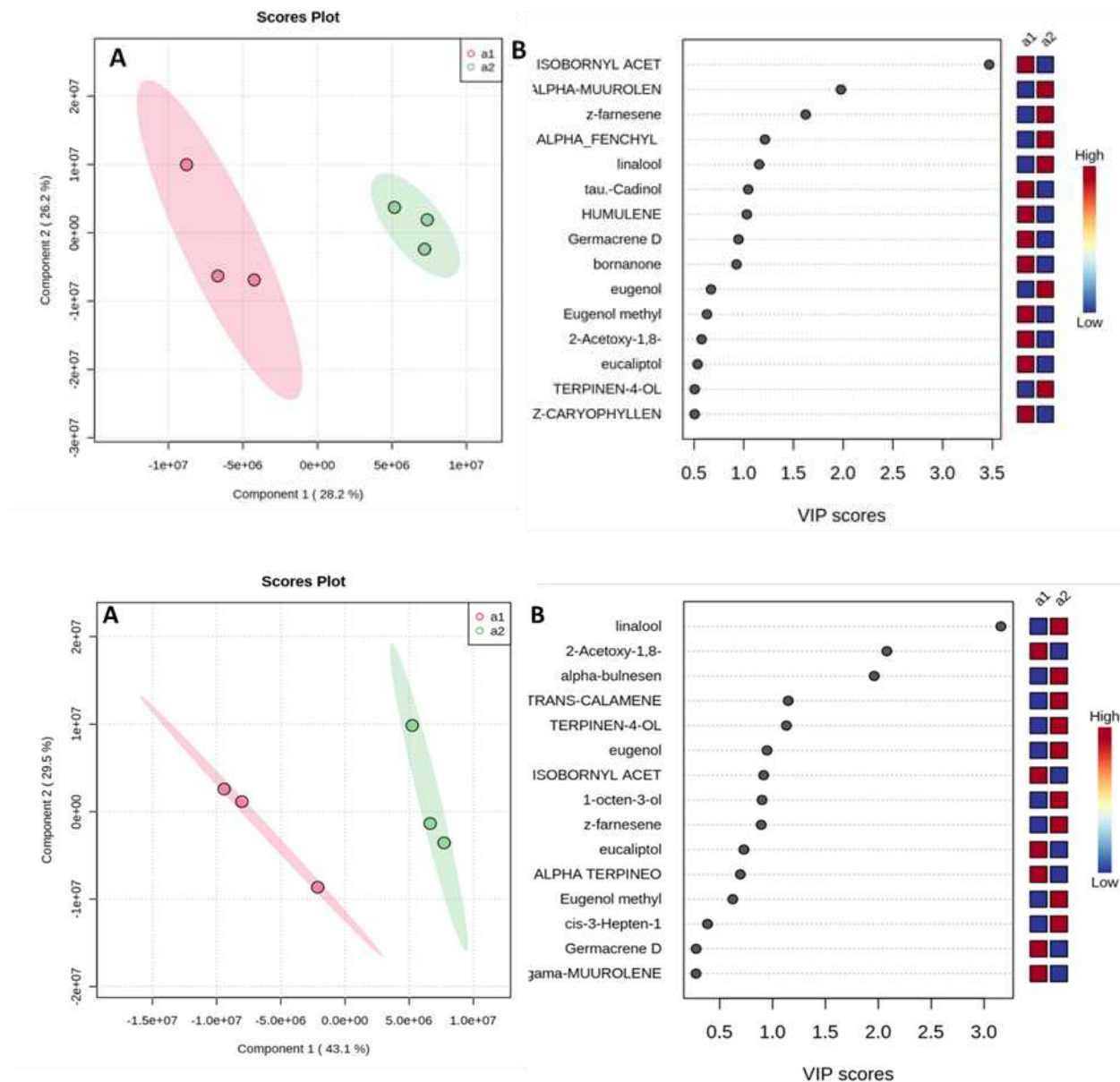
Figura 13. Plotagem dos escores da análise de componentes principais (A) e VIP escores pela análise de PSL-DA (B). As caixas coloridas à direita indicam a intensidade de presença do metabólito correspondente em cada grupo em estudo, para plantas de manjeriço sem aplicação de putrescina e submetidas a irrigação adequada (a1) e déficit hídrico moderado (a2).

Enquanto a qualificação dos óleos essenciais, observou-se diferenças na intensidade de aparição e tipo de molécula encontrada para as doses de putrescina e níveis de água quantificados em VIP escores.

Em plantas sem aplicação de putrescina os metabolitos mais se diferenciaram foram linalool, e α -bulnesene em plantas submetidas a déficit hídrico moderado e 2-acetoxy-1,8-cineole em plantas com irrigação adequada (Figura 13B). Plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina, os componentes que se diferenciaram foram: Isobornyl acetato em plantas sem déficit hídrico, α -muurolen e z-farnesene em plantas com déficit hídrico moderado (Figura 14B).

Finalmente, plantas pulverizadas com 100 mg L^{-1} de putrescina, apresentaram linalool e cis-3-hepten-1-ol em plantas sem déficit hídrico, e 2-Acetoxy-1,8-cineole em plantas com déficit hídrico moderado (Figura 15B).

Figura 14. Plotagem dos escores da análise de componentes principais (A) e VIP escores pela análise de PSL-DA (B). As caixas coloridas à direita indicam a intensidade de presença do metabólito correspondente em cada grupo em estudo, para plantas de manjeriço com aplicação e



50 mg L^{-1} de putrescina e submetidas a irrigação adequada (a1) e déficit hídrico moderado (a2).

Figura 15. Plotagem dos escores da análise de componentes principais (A) e VIP escores pela análise de PSL-DA (B). As caixas coloridas à direita indicam a intensidade de presença do

metabólito correspondente em cada grupo em estudo, para plantas de manjeriço com aplicação de 100 mg L⁻¹ de putrescina e submetidas a irrigação adequada (a1) e déficit hídrico moderado (a2).

4. DISCUSSÃO

A restrição hídrica tem ação sobre processos fisiológicos e estruturais nos vegetais, sendo o turgor celular um dos mais prejudicados, com significativa redução no volume celular e danos nas membranas, levando a uma concentração de solutos em seu interior (Taiz & Zeiger, 2006). Em nosso estudo, observou-se uma diminuição de 33% no acúmulo de massa seca nas plantas submetidas ao déficit hídrico moderado (Figura 2), comprovando que a menor disponibilidade hídrica, acarreta significativos prejuízos, como expansão celular (Taiz & Zeiger, 2006), fechamento e abertura de estômatos (Pirasteh-Anosheh et al., 2016), rendimento fotossintético e, conseqüentemente, restrição na produção de estruturas de carbono (Wang et al., 2018).

Já, pulverizações foliares de putrescina em plantas submetidas ao déficit hídrico, têm sido reportada como um mecanismo atenuador dos efeitos negativos da seca em plantas, mediante a regulação de diversas rotas metabólicas (Chen et al., 2019), considerando que as poliaminas são substâncias reguladoras do desenvolvimento vegetal, que incrementam a divisão celular e podem-se ligar e estabilizar as membranas, protegendo-as da ação da sua peroxidação (Khan et al., 2012; Abbasi et al., 2017), essas moléculas atuam na estimulação da tolerância a condições adversas do ambiente (Gill & Tuteja, 2010). Os resultados apresentados nesta pesquisa mostraram que as plantas pulverizadas com doses de 50 mg L⁻¹ de putrescina em plantas com 80% da capacidade do vaso (CV), apresentaram um maior acúmulo de matéria seca na parte aérea em condições de irrigação adequada. Este comportamento esteve mais relacionado com a pulverização de doses baixas de putrescina, que levou ao incremento da assimilação de CO₂ aos 5 DAE. Já doses crescentes de putrescina trazem prejuízos no processo fotossintético. Logo, aos 10 DAE, pulverizações com 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina em plantas sob déficit hídrico moderado levaram a incrementos no acúmulo de massa seca, fenômeno relacionado com os maiores índices de fotossínteses nas plantas sob estes tratamentos, se comparados aos demais tratamentos (Figura 4); por tanto pode-se inferir que o incremento de doses de putrescina teve efeito negativo em plantas sem restrição hídrica, e que somente obteve-se benefício destes biorreguladores quando

aplicados em plantas com déficit hídrico moderado, e em período do estresse mais prolongado. Resultados similares da utilização de putrescina e seu efeito foram reportados em manjerição (Talaat & Balbaa, 2010) e tomilho sob déficit hídrico (Mohammadi et al., 2018).

A restrição hídrica limitou o acúmulo de massa seca nas plantas, porém a altura não foi afetada consideravelmente ao final do experimento, o que permite ponderar que o redirecionamento dos fotoassimilados dentro da planta, como consequência do estresse hídrico, estaria envolvido na manutenção dos meristemas e sua magnitude pode sim, estar influenciada pela disponibilidade hídrica (Damalas, 2019; Farouk & Omar, 2020).

Manter o status hídrico nas células é um dos desafios das plantas quando se enfrentam a condições de baixa disponibilidade de água no ambiente radicular, os resultados observados indicam que a putrescina teve influência no ajuste do nível de água nas folhas. As plantas submetidas ao déficit hídrico moderado (60% CV) conseguiram atingir valores de CRA maiores que 75%, porém, nos dois dias de amostragem observou-se que as plantas com restrição moderada de água independente da dose de putrescina, registraram valores médios do CRA acima do 70%, diferenças matemáticas não observadas durante a análise de CRA entre níveis de água e putrescina (Figura 3). Mas refletem um aprimorado consumo hídrico pelas plantas sob déficit hídrico, tendo em vista a baixa transpiração (Figura 7) e melhor ajuste no uso eficiente de água (Figura 8).

A manutenção do status hídrico das plantas com restrição hídrica moderada, similar às plantas com irrigação adequada depois de 10 dias acumulados de estresse, pode ser explicado devido à hidrofiliabilidade, propriedade das poliaminas que cumpre a função de manter o turgor e conteúdo de água nas células mediante o acúmulo de osmólitos compatíveis nas folhas (Kuznetsov & Shevyakova, 2007). Fato que correspondeu a elevados teores de prolina encontrados nas folhas, principalmente em aquelas plantas com 60% da CV e pulverizadas com 100 mg L^{-1} de putrescina (Figura 12) aos 10 DAE.

Tanto as poliaminas como a prolina têm o glutamato como precursor em comum, então mudanças nas concentrações de algum destes compostos pode alterar a rota biossintética do outro, e este processo pode-se dar de maneira competitiva (Montesinos-Pereira et al., 2014; Pál et al., 2018), o que possivelmente apresentou efeito proeminente nas plantas sobre a restrição hídrica mais prolongada, levando o glutamato disponível para a síntese de prolina. O maior acúmulo de prolina nas folhas é um indicativo de sinalização contra estresse abiótico (Abdul

Jaleel et al, 2007) o que levou as plantas a tolerar melhor as condições ambientais externas desfavoráveis, mediante um ajuste osmótico em virtude da proteção das membranas pela ação de peroxidação das espécies reativas de oxigênio (ERO's) (Cramer et al., 2011).

A prolina, possivelmente foi um dos compostos envolvidos no ajuste osmótico nas células sob condições de restrição hídrica, o que permitiria atingir valores similares de CRA em comparação com as plantas crescidas sem restrição hídrica, tendo os valores de CRA próximos ou superiores a 80%, e seu comportamento esteve relacionado com a dose de 100 mg L⁻¹ de putrescina em plantas sob déficit hídrico moderado aos 10 DAE (Figura 12). Já que o acúmulo de massa seca foi afetado pelo estresse hídrico, plantas tratadas com putrescina poderiam mitigar efeitos negativos, especialmente quando a restrição hídrica é prolongada, mediante acúmulo de solutos em suas folhas. Hassan et al. (2018) reportaram que aplicação de poliaminas aperfeiçoaram alguns parâmetros como: crescimento, o CRA, teores de clorofila e condutância estomática em plantas de Rosa de damasco (*Rosa damascena*) submetidas a déficit hídrico.

O entendimento da relação entre a duração e intensidade da restrição hídrica e sua interação com os demais fatores, pode ajudar a desvendar as diversas respostas das plantas ao déficit hídrico (Farooq et al., 2009a). Então, a duração e a intensidade da restrição hídrica tiveram pouco efeito na regulação do status hídrico das folhas, no entanto, houve resposta representativa da disponibilidade de água e concentração de putrescina no ganho de matéria seca das plantas ao final do experimento.

Com relação aos pigmentos, as clorofilas apresentam um papel fundamental na determinação da intensidade do processo da fotossíntese e produção de matéria seca (Rhie et al., 2014), os resultados desta pesquisa apontam que condições de déficit hídrico acumuladas tendem a degradar clorofilas e carotenoides. Em contraste, plantas com suplementação adequado de água tiveram um padrão crescente em seus teores, com exceção do tratamento 2 (plantas pulverizadas com 50 mg L⁻¹), e em geral, teores de Cl *total* foram maiores nas folhas das plantas com irrigação adequada em comparação com aquelas submetidas a déficit hídrico moderado, comportamento relacionado com um possível maior acúmulo de ERO's e sua ação de peroxidação e degradação dos pigmentos fotossintéticos em plantas sob condições de déficit hídrico (Ashraf & Harris, 2013), seguindo padrões de resultados previamente reportados para plantas de camomila (Salehi et al., 2016) e manjerição (Damalas, 2019).

Também, observa-se que os teores de Cl *a*, *b* e *total* não apresentaram diferenças em seu conteúdo foliar, quando avaliado os níveis de água aos 5 DAE. Logo, aos 10 DAE, estes teores foram relativamente maiores em plantas com 80% da CV, similar ao resultado reportado para plantas de *Oudeneya africana* (Talbi et al., 2020). Estabelecendo assim um padrão fisiológico temporal da ação deletéria da restrição hídrica moderada sobre a degradação dos pigmentos, podendo ainda ser considerado este uma possível estratégia de adaptação das plantas num ambiente restritivo, com priorização da manutenção da integridade das suas estruturas vitais e o evitamento de maiores danos internos, mediante uma menor interceptação da radiação solar como mecanismo de defesa, o que conseqüentemente refletirá em reduções na taxa fotossintética e, portanto, comprometimento no acúmulo de massa seca.

Já as doses de 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina tiveram efeito positivo na manutenção de maiores teores de Cl *a*, *b*, *total* e carotenoides em plantas com 80 e 60% de CV, respetivamente. Diversos estudos têm reportado o efeito das poliaminas no aumento dos pigmentos fotossintéticos. Amri et al. (2011), atribuíram esse fenômeno ao possível efeito da proteção das membranas dos tilacóides especialmente nos sítios do complexo proteína-clorofila; o qual é explicado mediante uma possível ligação direta com os fosfolipídios da bicamada da membrana plasmática, conferindo proteção ao aparato fotossintético (Abd Elbar et al., 2019), resposta similar também descrita para as culturas do pepino (Yuan et al., 2018) e do tomilho (Mohammadi et al., 2018).

A síntese de putrescina, clorofila e prolina tem como precursor em comum o glutamato (Mohammadi et al., 2016), assim acredita-se que uma possível degradação da clorofila causaria alterações metabólicas significativas na regulação de mecanismos protetivos, como o potencial incremento nos teores de prolina, como observado em plantas com déficit hídrico moderado especialmente aos 10 DAE.

Porém as plantas com 60% da CV, em geral, tenderam a ter menores teores de clorofilas e acúmulo de massa seca, quando estas plantas foram pulverizadas com uma dose de 100 mg L⁻¹ de putrescina, o efeito da restrição hídrica sob os pigmentos fotossintéticos poderia ser mitigado a curto prazo, como foi observado aos 5 DAE, mediante essa proteção e manutenção da estabilidade das membranas dos tilacóides. Já, num período mais prolongado de restrição hídrica, o mecanismo de proteção pode ser oriundo de outras vias metabólicas. Entretanto, ponderamos que em plantas com 80% da CV, o glutamato poderia ser direcionado para sintetize de maiores

teores de clorofilas, enquanto a putrescina seria direcionada para processos de divisão celular, que irão se traduzir em maior acúmulo de massa seca. Como proposto por Croce & Amerongen (2014), que alegam que o teor foliar de clorofila está diretamente relacionado com a potencial eficiência de captação de fótons durante a fotossíntese nas plantas, que culminarão na produção de fotoassimilados.

Por outro lado, os teores de carotenoides apresentaram reduções significativas sob o uso de 100 mg L⁻¹ de putrescina, em condições de 80% de CV e 60% de CV, potencialmente pela atuação destes pigmentos em processos fotossintéticos e preventivos a danos oxidativos em membranas celulares (Takahashi & Badger, 2011).

Sob condições de cultivo inóspita, as plantas apresentam como primeiras respostas de proteção ao déficit hídrico o fechamento estomático, processo que está modulado por incremento das concentrações de ácido abscísico. Comportamento similar ao observado nesta pesquisa, onde as plantas submetidas a estresse hídrico moderado tiveram menor condutância estomática (Figura 5), tanto aos 5 como aos 10 DAE, quando se comparou as plantas com irrigação adequada.

O fechamento e abertura dos estômatos é regulado por diversos mecanismos de sinalização tanto o status hídrico no solo como na folha (Taiz & Zeiger, 2006), com sinalização majoritária do ácido abscísico (ABA), o qual induz ao fechamento estomático e conduz a uma menor condutância estomática (Waterlando et al., 2010). Embora a nossa pesquisa tenha observado que os valores do CRA nas folhas se encontrassem, em média, acima de 70%, inclusive nas plantas com déficit hídrico moderado aos 10 DAE, o status hídrico na folha conseguiu ser regulado mediante o ajuste osmótico liderado possivelmente pela síntese e acúmulo osmólitos nas folhas.

Pela ocorrência do fechamento estomático, para restrição da transpiração foliar e incremento no uso eficiente de água (UEA) (Ebeed et al., 2017; ZHANG et al., 2018), existe uma forte redução no fluxo assimilatório de CO₂ no interior do mesofilo foliar e conseqüentemente, existe a liberação de altas quantidades de elétrons que vão conduzir à formação de ERO's (Farooq et al., 2009a), resultando em prejuízo da atividade de diferentes enzimas envolvidas no processo da fotossíntese (Chaves et al., 2009). Deste modo, considerando que a transpiração foliar foi reduzida devido ao fechamento de estômatos em plantas submetidas ao déficit hídrico moderado, com maior efeito aos 10 DAE, pode-se assumir que este comportamento está relacionado com a duração e a intensidade do estresse imposto, e somente as doses de putrescina foram representativas em plantas com irrigação adequada aos 10 DAE.

Outros parâmetros fotossintéticos afetados pelo fechamento dos estômatos são a pressão intercelular (C_i) (Tominaga et al., 2018) e a assimilação de CO_2 (A) (Farooq et al., 2009a). A inexistente diferença significativa entre os valores da pressão intercelular de CO_2 aos 5 e 10 DAE nos dois níveis de água, podem ser interpretadas como dois cenários distintos, por um lado plantas submetidas ao déficit hídrico moderado tendem a acumular CO_2 no mesofilo das folhas nas primeiras horas do dia, quando ainda os estômatos estavam abertos, logo quando a radiação atingiu as folhas e em restrição hídrica, houve fechamentos dos estômatos e o CO_2 ficou aprisionado nesses espaços intercelulares. Por outro lado, plantas com irrigação adequada, tiveram uma condutância estomática mais proeminente, o que indicou que os estômatos estavam abertos permitindo esse fluxo interno de CO_2 proveniente da atmosfera.

Aos 5 DAE, houve menor assimilação de CO_2 em plantas com 60% da CV em comparação com aquelas do nível de 80% da CV e pulverizadas com 50 mg L^{-1} de putrescina. Já, aos 10 DAE, também houve maior assimilação de CO_2 em plantas sem déficit hídrico, embora a diferença com as plantas submetidas a déficit hídrico moderado tenha sido menor; e as doses de 50 e 100 mg L^{-1} de putrescina, apresentaram maior assimilação de CO_2 e eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) que as outras doses da poliamina. O que possivelmente está relacionado ao papel das poliaminas como removedores de ERO's e protetoras do aparato fotossintético ou estimulação dos sistemas de defesa das plantas submetidas a estresse hídrico (Hussain et al., 2011; Juzoń et al., 2017).

Somente as plantas do tratamento controle e àquelas pulverizadas com 50 mg L^{-1} de putrescina, apresentaram diferenças na concentração intercelular de CO_2 aos 10 DAE; o que pode sugerir que doses maiores de putrescina podem ter influência positiva na regulação interna de CO_2 inclusive em condições de déficit hídrico moderado. Além disso, observou-se que a maior assimilação de CO_2 das plantas com 80% da CV e pulverizadas com 50 mg L^{-1} de putrescina, especialmente aos 5 DAE, obtiveram maior acúmulo de massa seca como consequência do status hídrico adequado e maiores teores de clorofilas, que resultariam em maior produção de fotoassimilados direcionados para os órgãos dreno. Em contraste, plantas com 60% da CV, apresentaram mecanismos de regulação osmótica, mediante o acúmulo de prolina nas folhas, não tiveram sucesso no evitamento da degradação das clorofilas, durante o fechamento dos estômatos, e na redução da assimilação de CO_2 , o que possivelmente condicionou o acúmulo de massa seca.

Em manjeriço observou-se que a EUA foi diferente aos 10 DAE nas plantas pulverizadas com 50 e 100 mg L⁻¹ de putrescina, o que permite inferir que a duração do estresse hídrico tem um papel fundamental em regular o efeito da putrescina e seu ajuste com a fim de utilizar eficientemente o CO₂ assimilado e reduzir as perdas de água por transpiração ao longo do período do déficit hídrico. Além, de ter tido relação com o comportamento do CRA, especialmente aos 10 DAE, onde o ajuste osmótico conferiu as plantas, com 60% da CV, valores maiores de 75% de CRA, e conforme a transpiração foliar foi reduzida, devido ao fechamento dos estômatos, a assimilação de CO₂ atingiu valores similares aos das plantas com 80% da CV, no entanto, houve menor acumulação de massa seca, com menor afetação em plantas pulverizadas com 100 mg L⁻¹ de putrescina neste nível de disponibilidade hídrica.

Os resultados obtidos evidenciam que para a atividade das enzimas antioxidantes não houve diferenças relevantes entre os dois níveis avaliados, e nem efeito das doses de putrescina. Unicamente em plantas com 60% da CV e pulverizadas com 50 mg L⁻¹ de putrescina diferiram com plantas controle do nível 80% da CV. Pesquisas em plantas medicinais tem demonstrado que o déficit hídrico tende a aumentar a atividade das enzimas antioxidantes como resposta a elevadas concentrações de ERO's e isso vai depender da intensidade do estresse (Mohammadi et al., 2018; Omid et al., 2018; Taha et al., 2020). A resposta das plantas expostas a déficit hídrico pode variar entre espécies e que diferentes estratégias adotadas pelas plantas para a defesa podem ser determinadas pela duração e intensidade do período de restrição hídrica (Carvalho, 2008). E que períodos prolongados de déficit hídrico podem resultar em danos oxidativos irreversíveis (Osmolovskaya et al., 2018).

Verifica-se que atividade das enzimas antioxidantes, especificamente para manjeriço, não foram representativas, assim o metabolismo enzimático antioxidante não foi o principal mecanismo vegetal para mitigar o efeito do estresse hídrico. Talbi et al. (2020) diz que as células têm desenvolvido complexos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação com o fim de mitigar os efeitos negativos das ERO's sob as membranas destas. Outra possível razão pode estar relacionada com a intensidade do estresse hídrico imposto, o qual pode não ter estimulado suficientemente o sistema antioxidante destas enzimas para reagir aos danos causados pela limitação de água. Já os mecanismos não enzimáticos, como: fechamento estomático e acumulação de solutos, podem estar envolvidos na proteção das estruturas internas da planta submetidas a condições de déficit hídrico moderado.

Com relação a análise das propriedades qualitativas dos óleos essenciais constata-se que as doses de putrescina não apresentaram diferenças significativas em alterar o conteúdo destes. Porém a disponibilidade hídrica no solo teve maior influência na produção de compostos secundários de maior relevância ao setor industrial, de modo que sob condições de déficit hídrico, as plantas de manjeriço foram submetidas a diferentes mudanças em níveis morfológicos e fisiológicos, com influência no acúmulo de metabolitos secundários. Isto explica-se pelo fato de que as plantas de manjeriço sob condições de déficit hídrico, a turgência das folhas diminui e há uma maior densidade de glândulas contendo óleos essenciais, resultando numa elevada acumulação na quantidade dos compostos secundários (Simon et al., 1992). Além disso, metabolitos secundários são produzidos como principal ação de proteção em contra agentes tóxicos, como as ERO's, e em resposta a condições adversas; estes variam em quantidade e qualidade (Kulak, 2020).

Portanto, nossos resultados sugerem que independente das doses de putrescina, a disponibilidade hídrica no solo detém de fundamental importância na produção e acúmulo de metabolitos secundários; e que a intensidade da sua aparição pode estar ligada ao grau de estresse com consequência de uma série de respostas metabólicas das plantas relacionadas a proteção e conservação de funções básicas das plantas de manjeriço.

5. CONCLUSÃO

Pulverização exógena com putrescina apresentou diversas respostas em variáveis morfo-fisiológicas em plantas de manjeriço submetidas a irrigação adequada ou ao déficit hídrico moderado. Sendo que a putrescina conferiu proteção aos pigmentos fotossintéticos, permitiu melhor ajuste no status hídrico nas folhas e estimulou maior acumulação de massa seca em plantas de manjeriço submetidas a déficit hídrico moderado.

Em contraste, a disponibilidade hídrica no solo foi o fator responsável na determinação do perfil químico dos óleos essenciais. E o mecanismo de defesa de plantas de manjeriço submetidas a déficit hídrico moderado por longo período, esteve diretamente vinculado pelo maior acúmulo de prolina nas folhas.

Ambientes desfavoráveis no cultivo de *Ocimum* ssp., como restrição moderada de água no solo, levam as plantas a elevarem seu potencial de síntese dos óleos essenciais foliares,

com interesse comercial. Em contrapartida a adoção de pulverização exógena de doses de putrescina permitem sinalizar positivamente no combate do estresse oxidativo, via mecanismos de proteção celular com alívio dos processos fisiológicos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, N.; ALI, I.; HAFIZ, I.A. Application of polyamines in horticulture: A review.

International Journal of Biosciences (IJB), v.10, p.319–342, 2017. DOI:

10.12692/ijb/10.5.319-342.

ABD ELBAR, O.H.; FARAG, R.E.; SHEHATA, S.A. Effect of putrescine application on some growth, biochemical and anatomical characteristics of *Thymus vulgaris* L. under drought stress.

Annals of Agricultural Sciences, v.64, p.129–137, 2019. DOI: 10.1016/j.aoas.2019.10.001.

ABDUL JALEEL, C.; GOPI, R.; SANKAR, B.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SRIDHARAN, R.; PANNEERSELVAM, R. Studies on germination, seedling vigour, lipid

peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. **South African Journal of Botany**, v.73, p.190–195, 2007. DOI: 10.1016/j.sajb.2006.11.001.

AGOSTINI-COSTA, S.T. DA; F., R.; R., H.; SILVEIRA, D.; A., M. Secondary Metabolites.

Chromatography and Its Applications, 2012. DOI: 10.5772/35705.

AHMAD, P. Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.11, 2012.

DOI: 10.5897/ajb11.3203.

ALCÁZAR, R.; ALTABELLA, T.; MARCO, F.; BORTOLOTTI, C.; REYMOND, M.; KONCZ, C.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A.F. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**, v.231, p.1237–1249, 2010. DOI: 10.1007/s00425-010-1130-0.

AMRI, E.; MIRZAEI, M.; MORADI, M.; ZARE, K. The effects of spermidine and putrescine

polyamines on growth of pomegranate (*Punica granatum* L. cv 'Rabbab') in salinity circumstance. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v.3, p.43–49, 2011.

AN, Z.; JING, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.815–825, 2008. DOI: 10.1093/jxb/erm370.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v.51, p.163–190, 2013. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205–207, 1973. DOI: 10.1007/BF00018060.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2, p.48–54, 1997. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)82562-9.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223–253, 2004. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

CARVALHO, M.H. DE. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. **Plant Signaling and Behavior**, v.3, p.156–165, 2008. DOI: 10.4161/psb.3.3.5536.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, p.551–560, 2009. DOI: 10.1093/aob/mcn125.

CHEN, D.; SHAO, Q.; YIN, L.; YOUNIS, A.; ZHENG, B. Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.1–13, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2018.01945.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v.11, p.163, 2011. DOI: 10.1186/1471-2229-11-163.

CROCE, R.; AMERONGEN, H. VAN. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. **Nature Chemical Biology**, v.10, p.492–501, 2014. DOI: 10.1038/nchembio.1555.

DAMALAS, C.A. Improving drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum*) with salicylic acid. **Scientia Horticulturae**, v.246, p.360–365, 2019. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.11.005.

EBEED, H.T.; HASSAN, N.M.; ALJARANI, A.M. Exogenous applications of Polyamines modulate drought responses in wheat through osmolytes accumulation, increasing free polyamine levels and regulation of polyamine biosynthetic genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.118, p.438–448, 2017. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.07.014.

FAHAD, S.; BAJWA, A.A.; NAZIR, U.; ANJUM, S.A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A.; SADIA, S.; NASIM, W.; ADKINS, S.; SAUD, S.; IHSAN, M.Z.; ALHARBY, H.; WU, C.; WANG, D.; HUANG, J. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1–16, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01147.

FARAHANI, H.A.; VALADABADI, S.A.; DANESHIAN, J.; KHALVATI, M.A. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, p.329–333, 2009.

FARIDUDDIN, Q.; VARSHNEY, P.; YUSUF, M.; AHMAD, A. Polyamines: potent modulators of plant responses to stress. **Journal of Plant Interactions**, v.8, p.1–16, 2013. DOI:

10.1080/17429145.2012.716455.

FAROOQ, M.; A. WAHID; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Review article Plant drought stress : effects , mechanisms and management. **Agron. Sustain. Dev**, v.29, p.185–212, 2009a.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; LEE, D.J. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.31, p.937–945, 2009b. DOI: 10.1007/s11738-009-0307-2.

FAROOUK, S.; OMAR, M.M. Sweet Basil Growth, Physiological and Ultrastructural Modification, and Oxidative Defense System Under Water Deficit and Silicon Forms Treatment. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.39, p.1307–1331, 2020. DOI: 10.1007/s00344-020-10071-x.

GARCÍA-CAPARRÓS, P.; ROMERO, M.J.; LLANDERAL, A.; CERMEÑO, P.; LAO, M.T.; SEGURA, M.L. Effects of drought stress on biomass, essential oil content, nutritional parameters, and costs of production in six Lamiaceae species. **Water (Switzerland)**, v.11, p.1–12, 2019. DOI: 10.3390/w11030573.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v.5, p.26–33, 2010. DOI: 10.4161/psb.5.1.10291.

HARLEY, R.M.; S. ATKINS, A.L.; BUDANTSEV, P.D.; CANTINO, B.J.; CONN, R.; GRAYER, M.M.; HARLEY, R. DE KOK, T. KRESTOVSKAJA, R.; MORALES, A.J.; PATON, O.R.; UPSON, T. Labiatae. In: **Flowering Plants • Dicotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants vol 7**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. p.167–274. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-18617-2_11.

HASSAN, F.A.S.; ALI, E.F.; ALAMER, K.H. Exogenous application of polyamines alleviates water stress-induced oxidative stress of *Rosa damascena* Miller var. *trigintipetala* Dieck. **South African Journal of Botany**, v.116, p.96–102, 2018. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.02.399.

HASSAN, H.M.; MINA, S.A.; BISHR, M.M.; KHALIK, S.M.A. Influence of foliar spray of ethephon and water stress on the essential oil composition and impact on the cytotoxic activity of *Thymus vulgaris* aerial parts. **Natural Product Research**, v.33, p.2714–2717, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1460843.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; HUSSAIN SHERAZI, S.T.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, p.986–995, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.12.010.

HUSSAIN, S.S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K.H.M. Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnology Advances**, v.29, p.300–311, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.003.

JUZOŃ, K.; CZYCYŁO-MYSZA, I.; MARCIŃSKA, I.; DZIURKA, M.; WALIGÓRSKI, P.; SKRZYPEK, E. Polyamines in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) tolerance to soil drought. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p.1–10, 2017. DOI: 10.1007/s11738-017-2500-z.

KHAN, H.; ZIAF, K.; AMJAD, M.; IQBAL, Q. Exogenous Application of Polyamines Improves Germination and Early Seedling Growth of Hot Pepper. **Chilean journal of agricultural research**, v.72, p.429–433, 2012. DOI: 10.4067/s0718-58392012000300018.

KOROCH, A.R.; RODOLFO JULIANI, H.; ZYGADLO, J.A. Bioactivity of essential oils and their components. **Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability**, p.87–115, 2007. DOI: 10.1007/978-3-540-49339-6_5.

KRUMA, Z.; ANDJELKOVIC, M.; VERHE, R.; KREICBERGS, V. Phenolic Compounds in Basil, Oregano and Thyme. **Foodbalt 2008**, p.99–103, 2008.

KULAK, M. Recurrent drought stress effects on essential oil profile of Lamiaceae plants: An approach regarding stress memory. **Industrial Crops and Products**, v.154, 2020. DOI:

10.1016/j.indcrop.2020.112695.

KUZNETSOV, V.; SHEVYAKOVA, N. Polyamines and stress tolerance of plants. **Plant Stress**, v.1, p.50–71, 2007.

LICHTENTHALER, H.K.; WELLBURN, A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, p.591–592, 1983. DOI: 10.1042/bst0110591.

MACEDO, W.R.; ARAÚJO, D.K.; CASTRO, P.R. DE C. E. Unravelling the physiologic and metabolic action of thiamethoxam on rice plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.107, p.244–249, 2013. DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.08.001.

MOHAMMADI, H.; GHORBANPOUR, M.; BRESTIC, M. Exogenous putrescine changes redox regulations and essential oil constituents in field-grown *Thymus vulgaris* L. under well-watered and drought stress conditions. **Industrial Crops and Products**, v.122, p.119–132, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.05.064.

MOHAMMADI, M.; GHASSEMI-GOLEZANI, K.; ZEHTAB-SALMASI, S.; NASROLLAHZADE, S. Assessment of Some Physiological Traits in Spring Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Cultivars under Water Stress. **International Journal of Life Sciences**, v.10, p.58–64, 2016. DOI: 10.3126/ijls.v10i1.14512.

MONTESINOS-PEREIRA, D.; BARRAMEDA-MEDINA, Y.; ROMERO, L.; RUIZ, J.M.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. Genotype differences in the metabolism of proline and polyamines under moderate drought in tomato plants. **Plant Biology**, v.16, p.1050–1057, 2014. DOI: 10.1111/plb.12178.

MUSTAFAVI, S.H.; NAGHDI BADI, H.; SEKARA, A.; MEHRAFARIN, A.; JANDA, T.; GHORBANPOUR, M.; RAFIEE, H. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.40, p.0, 2018. DOI: 10.1007/s11738-018-2671-2.

MUSTAFAVI, S.H.; SHEKARI, F.; MALEKI, H.H. Influence of exogenous polyamines on antioxidant defence and essential oil production in valerian (*Valeriana officinalis* L.) plants under drought stress. **Acta Agriculturae Slovenica**, v.107, p.81–91, 2016. DOI: 10.14720/aas.2016.107.1.09.

NURZYŃSKA-WIERDAK, R. Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) flowering affected by foliar nitrogen application. **Acta Agrobotanica**, v.64, p.57–63, 2012. DOI: 10.5586/aa.2011.007.

OMIDI, H.; SHAMS, H.; SEIF SAHANDI, M.; RAJABIAN, T. Balangu (*Lallemantia* sp.) growth and physiology under field drought conditions affecting plant medicinal content. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.130, p.641–646, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.08.014.

OSMOLOVSKAYA, N.; SHUMILINA, J.; KIM, A.; DIDIO, A.; GRISHINA, T.; BILOVA, T.; KELTSIEVA, O.A.; ZHUKOV, V.; TIKHONOVICH, I.; TARAKHOVSKAYA, E.; FROLOV, A.; WESSJOHANN, L.A. Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, 2018. DOI: 10.3390/ijms19124089.

PAGARE, S.; BHATIA, M.; TRIPATHI, N.; PAGARE, S.; BANSAL, Y.K. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.9, p.293–304, 2015.

PÁL, M.; TAJTI, J.; SZALAI, G.; PEEVA, V.; VÉGH, B.; JANDA, T. Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. **Scientific Reports**, v.8, p.1–12, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-31297-6.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew bulletin**, v.47, p.403–435, 1991.

PIRBALOUTI, A.G.; MALEKPOOR, F.; SALIMI, A.; GOLPARVAR, A.; HAMEDI, B. Effects of foliar of the application chitosan and reduced irrigation on essential oil yield, total phenol

content and antioxidant activity of extracts from green and purple basil. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v.16, p.177–186, 2017. DOI: 10.24326/asphc.2017.6.16.

PIRZAD, A.; MOHAMMADZADEH, S. Water use efficiency of three mycorrhizal Lamiaceae species (*Lavandula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*). **Agricultural**

Water Management, v.204, p.1–10, 2018. DOI: 10.1016/j.agwat.2018.03.020.

RAY, R.L.; FARES, A.; RISCH, E. Effects of Drought on Crop Production and Cropping Areas in Texas. **Agricultural & Environmental Letters**, v.3, p.170037, 2018. DOI: 10.2134/acl2017.11.0037.

RHIE, Y.H.; LEE, S.Y.; JUNG, H.H.; KIM, K.S. Light intensity influences photosynthesis and crop characteristics of *Jeffersonia dubia*. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, v.32, p.584–589, 2014. DOI: 10.7235/hort.2014.14028.

SALEHI, A.; TASDIGHI, H.; GHOLAMHOSEINI, M. Evaluation of proline, chlorophyll, soluble sugar content and uptake of nutrients in the German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) under drought stress and organic fertilizer treatments. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, p.886–891, 2016. DOI: 10.1016/j.apjtb.2016.08.009.

SCAGEL, C.F.; LEE, J. Phenolic composition of basil plants is differentially altered by plant nutrient status and inoculation with mycorrhizal fungi. **HortScience**, v.47, p.660–671, 2012. DOI: 10.21273/hortsci.47.5.660.

SHI, H.; CHAN, Z. Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.56, p.114–121, 2014. DOI: 10.1111/jipb.12128.

SIMON, J.E.; REISS-BUBENHEIM, D.; JOLY, R.J.; CHARLES, D.J. Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, p.71–75, 1992. DOI: 10.1080/10412905.1992.9698013.

TAHA, R.S.; ALHARBY, H.F.; BAMAGOOS, A.A.; MEDANI, R.A.; RADY, M.M. Elevating tolerance of drought stress in *Ocimum basilicum* using pollen grains extract; a natural biostimulant by regulation of plant performance and antioxidant defense system. **South African Journal of Botany**, v.128, p.42–53, 2020. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.09.014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal - Taiz & Zeiger - 3ª edição.pdf**, 2006.

TAKAHASHI, S.; BADGER, M.R. Photoprotection in plants: A new light on photosystem II damage. **Trends in Plant Science**, v.16, p.53–60, 2011. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.10.001.

TALAAT, I.M.; BALBAA, L.K. Physiological response of sweet basil plants (*Ocimum basilicum* L.) to putrescine and trans-cinnamic acid. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v.8, p.438–445, 2010.

TALBI, S.; ROJAS, J.A.; SAHRAWY, M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; CÁRDENAS, K.E.; DEBOUBA, M.; SANDALIO, L.M. Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the saharan plant *Oudeneya africana*. **Environmental and Experimental Botany**, v.176, p.104099, 2020. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104099.

TAVLADORAKI, P.; CONA, A.; FEDERICO, R.; TEMPERA, G.; VICECONTE, N.; SACCOCCIO, S.; BATTAGLIA, V.; TONINELLO, A.; AGOSTINELLI, E. Polyamine catabolism: Target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. **Amino Acids**, v.42, p.411–426, 2012. DOI: 10.1007/s00726-011-1012-1.

THIRUMURUGAN, D.; CHOLARAJAN, A.; RAJA, S.S.S.; VIJAYAKUMAR, R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. **Secondary Metabolites - Sources and Applications**, p.2–22, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79766.

TOMINAGA, J.; SHIMADA, H.; KAWAMITSU, Y. Direct measurement of intercellular CO₂ concentration in a gas-exchange system resolves overestimation using the standard method.

Journal of Experimental Botany, v.69, p.1981–1991, 2018. DOI: 10.1093/jxb/ery044.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, p.105–113, 2015. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.09.002.

WANG, Z.; LI, G.; SUN, H.; MA, L.; GUO, Y.; ZHAO, Z.; GAO, H.; MEI, L. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. **Biology Open**, v.7, p.1–9, 2018. DOI: 10.1242/bio.035279.

WATERLAND, N.L.; FINER, J.J.; JONES, M.L. Abscisic acid applications decrease stomatal conductance and delay wilting in drought-stressed chrysanthemums. **HortTechnology**, v.20, p.896–901, 2010. DOI: 10.21273/horttech.20.5.896.

WITHAM, F.; BLAYDES, D.; DEVLIN, R.. Experiments in Plant Physiology. **D. Van Nostrand**, 1971.

YUAN, R.N.; SHU, S.; GUO, S.R.; SUN, J.; WU, J.Q. The positive roles of exogenous putrescine on chlorophyll metabolism and xanthophyll cycle in salt-stressed cucumber seedlings. **Photosynthetica**, v.56, p.557–566, 2018. DOI: 10.1007/s11099-017-0712-5.

ZEGAOU, Z.; PLANCHAIS, S.; CABASSA, C.; DJEBBAR, R.; BELBACHIR, O.A.; CAROL, P. Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. **Journal of Plant Physiology**, v.218, p.26–34, 2017. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.07.009.

ZHANG, S. HAN; XU, X. FENG; SUN, Y. MIN; ZHANG, J. LIAN; LI, C. ZHOU. Influence of drought hardening on the resistance physiology of potato seedlings under drought stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v.17, p.336–347, 2018. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61758-1.