



**LORENA GABRIELA ALMEIDA**

**APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA NO PRÉ  
FLORESCIMENTO E SEUS EFEITOS NA INDUÇÃO A  
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM DIFERENTES  
HÍBRIDOS DE MILHO**

**LAVRAS - MG**

**2018**

**LORENA GABRIELA ALMEIDA**

**APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA NO PRÉ FLORESCIMENTO E SEUS  
EFEITOS NA INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM  
DIFERENTES HÍBRIDOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Dr. Amauri Alves de Alvarenga  
Orientador

Dr. Paulo César Magalhães  
Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Almeida, Lorena Gabriela.

Aplicação foliar de quitosana no pré florescimento e seus efeitos na indução da tolerância ao déficit hídrico em diferentes híbridos de milho / Lorena Gabriela Almeida . – 2018.

75 p. : il.

Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.

Coorientador: Paulo César Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Biopolímeros. 2. Estresse hídrico. 3. Metabolismo. 4. Milho safrinha. I. Alvarenga, Amauri Alves de. II. Magalhães, Paulo César. IV. Título.

**LORENA GABRIELA ALMEIDA**

**APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA NO PRÉ FLORESCIMENTO E SEUS  
EFEITOS NA INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM  
DIFERENTES HÍBRIDOS DE MILHO**

**FOLIAR APPLICATION OF CHITOSAN IN PRE-FLOWERING AND ITS EFFECTS  
IN INDUCING THE TOLERANCE TO WATER DEFICIT IN DIFFERENT MAIZE  
HYBRIDS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga  
Orientador

Prof. Dr. Paulo César Magalhães  
Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2018**

Aos meus pais, Bárbara e Itamar Almeida, por sempre acreditar nos meus sonhos.

**OFEREÇO**

Ao pesquisador Dr. Paulo César Magalhães e ao professor Amauri Alves de Alvarenga cientistas fundamentais no meu crescimento profissional e humano

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

As palavras nunca serão suficientes para expressar meu sentimento de gratidão. Muito maior que o título de doutora é a certeza de uma evolução como pessoa e profissional. Travei lutas com minhas próprias limitações, desafiei o impossível, tive uma dedicação sobre-humana, usei minhas próprias falhas para crescer e fiz do meu melhor o meu melhor. A força não provém das vitórias, são as lutas que travamos que nos tornam fortes. Quando enfrentamos dificuldades e não nos rendemos, isso sim é força. Em meio a tribulações, toda conquista alcançada não seria suficiente sem a ajuda, compreensão e apoio de pessoas queridas.

A Deus por me ofertar a capacidade de compreender que os Seus planos são maiores que os meus.

Aos meus pais Bárbara e Itamar Almeida, pelo amor incondicional, compreensão, força e suporte. Por serem a base da minha vida, sempre acreditar e confiar nos meus sonhos e acima de tudo, por me ensinarem o verdadeiro significado de resiliência. Para vocês eu conjugo o verbo amar.

Aos meus irmãos Gustavo e Guilherme Almeida, por todo companheirismo, amizade e por serem grandes exemplos.

Ao professor Amauri Alves de Alvarenga, por toda orientação e conhecimento transmitido desde a graduação. O senhor é um grande exemplo.

Ao pesquisador Dr. Paulo César Magalhães, meu eterno sentimento de gratidão. Agradeço pela oportunidade em realizar minha pesquisa na Embrapa Milho e Sorgo, a qual me proporcionou uma infraestrutura incrível. O senhor é exemplo da profissional que quero ser.

Ao professor João Paulo, obrigada por sempre me ouvir, aconselhar e acima de tudo, por ser um grande exemplo de pessoa e profissional.

Ao pesquisador Dr. Décio Karam, por toda disponibilidade e paciência em ensinar e colaborar na condução do experimento. O qual foi de suma importância para a realização dessa pesquisa.

Ao professor Luis Edson por despertar, desde a graduação, o encanto pela Fisiologia Vegetal, obrigada por todo conhecimento transmitido.

A pesquisadora Dra Vânia Aparecida Silva, por me ofertar a oportunidade em contribuir com sua equipe.

A pesquisadora Dra. Milene Figueiredo, por todo apoio e oportunidade.

A professora Dra. Ana Cardoso, por sempre contribuir em nosso grupo de pesquisa.

Ao meu amigo Hugo Bentzen o qual desde o mestrado sempre me ajudou em todos os momentos, um grande exemplo de pessoa e profissional. Conte sempre comigo.

A minha amiga Iris Paiva, obrigada por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos. “O dia que nasce é sempre o melhor dia de nossas vidas”.

Ao meu amigo Eder Marcos, muita gratidão por conhecê-lo. Agradeço por todos os conselhos, amizade incondicional e por todos os momentos de alegria, companheirismo e resiliência.

A família Laurente por me acolherem tão bem. Em especial ao Leonardo Laurente, serei eternamente grata a Deus por colocar pessoas tão especiais em meu caminho.

A minha estrela guia, vó Maria, eu sinto sua presença em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de cursar a pós-graduação, em especial a todos os professores, por todo conhecimento transmitido.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários técnico-administrativos da UFLA: Joel, Salete, Evaristo, D’Artagnan, Barrinha e Odorêncio.

A todos os funcionários da Embrapa Milho Sorgo, os quais me receberam tão bem e sempre se disponibilizaram em me ajudar. Obrigada por toda ajuda, pela simpatia sempre constante e por todo conhecimento transmitido.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo e da UFLA: Ana Clara, Athos Viana, Carlos César, Caroline Reis, Daniele Marques, Eder Marcos, Gilberto Cambraia, José Eduardo, Júlia e Roniel pela grande ajuda no laboratório e acima de tudo pelos bons momentos.

Ao professor da UNIFAL-MG, Thiago Souza, por representar uma grande inspiração.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma foram importantes para a realização deste trabalho.





“Existem vários tipos de sonhos...Aqueles sonhos para apenas sonhar e não realizar, sonhos para serem sonhados. Existem os sonhos os quais sonhamos e nos empenhamos em realizar, sonhos que nos esforçamos para conquistá-los. E ainda, existem aqueles sonhos que, no momento, não nos é dado saber se é um sonho apenas para sonhar ou sonho para realizar”.

Elizabeth Alvarenga Laurente

## RESUMO GERAL

Entre os fatores limitantes da produção vegetal, o déficit hídrico ocupa posição de destaque. Esse estresse ambiental interfere no desenvolvimento das culturas agrícolas, ocasionando perturbações fisiológicas que prejudicam o desenvolvimento e rendimento agrônomico das culturas. Nessa situação, faz-se necessário um maior conhecimento sobre formas alternativas que possibilitem as plantas de milho tolerar o déficit hídrico. A quitosana, considerada um bioestimulante, pode estimular respostas fisiológicas, atuando como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse. Diante disso a presente investigação buscou elucidar a viabilidade do uso deste biopolímero na indução da tolerância ao déficit hídrico em ensaios sob condições de casa de vegetação e campo. Os resultados obtidos em casa de vegetação, revelaram que a dose mais eficiente de quitosana foi de 140 mg/L, a qual foi utilizada em condições de campo. Foram realizadas avaliações bioquímicas, através da quantificação da atividade das enzimas antioxidantes, SOD, CAT, APX e PAL, bem como as características morfofisiológicas, tal como trocas gasosas, teor relativo de clorofila, fluorescência da clorofila e características relacionadas a produção. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências sobre o potencial uso da quitosana, a fim de aumentar a tolerância ao estresse hídrico.

**Palavras-chave:** Biopolímeros, Estresse hídrico, Metabolismo.

## GENERAL ABSTRACT

Among the limiting factors of plant production, the water deficit occupies a prominent position. This environmental stress interferes with the development of crops, causing physiological disturbances that impair the growth and agronomic yield of the vegetables. In this situation, it is necessary to know more about alternative ways that allow com plant to tolerance water deficit. Chitosan, considered a biostimulant, can stimulate physiological responses, acting as a antiperspirant in agricultural stress situations. Therefore, the present research sought to elucidate the feasibility of the use of this biopolymer in the induction of the tolerance to water deficit. The results obtained in greenhouse, regard to the most efficient chitosan dose (140 mg/L), were repeated under field conditions. For this, biochemical evaluations were performed by the quantification of antioxidant enzymes activity, SOD, CAT, APX and PAL, as well as ecophysiological characteristics, such as gas exchange, relative chlorophyll content, photosystem I and II and characteristics related to production. The results obtained in the present study provide evidences about the potential use of chitosan to increase the tolerance to water stress.

**Keywords:** Biopolymers. Hydric stress. Metabolism.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Cultura do milho</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Tolerância à seca e os efeitos do déficit hídrico</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Déficit hídrico e características ecofisiológicas</b> .....	16
<b>2.4</b>	<b>Relação déficit hídrico e osmoreguladores</b> .....	17
<b>2.5</b>	<b>Ácido Abscísico, estresse oxidativo e sistema de defesa</b> .....	17
<b>2.6</b>	<b>Quitosana</b> .....	19
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	22
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	26
	<b>ARTIGO 1 - CHITOSAN EXOGENOUS APPLICATION IN THE WATER DEFICIT TOLERANCE INDUCTION IN MAIZE PLANTS</b> .....	26
	<b>ARTIGO 2 - SISTEMA RADICULAR EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS SOB APLICAÇÃO DE QUITOSANA</b> .....	46
	<b>ARTIGO 3 - APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA APRESENTA POTENCIAL PARA INDUZIR TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os vários fatores limitantes da produção vegetal, o déficit hídrico ocupa posição de destaque. Esse estresse ambiental interfere no desenvolvimento das culturas agrícolas, caracterizando-se como o fator que mais influencia a produtividade da cultura do milho, por ocasionar perturbações fisiológicas e morfológicas que prejudicam o seu desenvolvimento e o rendimento agrônomo.

A magnitude dos efeitos do déficit hídrico nesta cultura sobre a produtividade está relacionada ao período, duração e intensidade de ocorrência desse fator e da capacidade genética da planta em responder as mudanças do meio. O período de florescimento é considerado como o estágio mais sensível e determinante do potencial produtivo.

Nessa situação, é necessário um maior conhecimento dos fatores biológicos e climáticos relacionados à tolerância ao déficit hídrico, de forma a garantir que no futuro, a agricultura brasileira possa contar com genótipos cada vez mais adaptados ao estresse hídrico. Além disto o uso de químicos antitranspirantes, que atuem como bioestimulante é uma estratégia que vem sendo utilizada ativamente pois, possibilitaria as plantas de milho tolerar o déficit hídrico tanto no pré como no pós-florescimento.

A quitosana, considerada um bioestimulante, pode estimular respostas fisiológicas para tolerância ao déficit hídrico. Os resultados das últimas décadas têm indicado que este biopolímero tem potencial para ser desenvolvido como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse, induzindo a tolerância à seca via aumento da eficiência do uso da água e maior defesa contra o estresse oxidativo. O fechamento estomático induzido por quitosana, sem afetar as taxas fotossintéticas, constitui um diferencial interessante de proteção da planta perante o estresse ambiental.

Diante do exposto e visando um aumento da tolerância de plantas de milho ao déficit hídrico, acredita-se que a aplicação de quitosana possa constituir uma alternativa aos antitranspirantes convencionais sem comprometer o rendimento agrônomo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes para a economia brasileira, sendo a segunda com maior produção de grãos no território nacional e com grande participação nas exportações. Hoje, o Brasil é o terceiro produtor mundial desta cultura, concentrando a maior parte da produção na segunda safra, denominada safrinha (USDA, 2016, CONAB, 2017). Essa cultura é produzida em climas que variam desde a zona temperada até a tropical, durante os períodos em que as temperaturas médias são superiores a 15°C sem ocorrência de geadas. Para obter a produção máxima, com período médio de amadurecimento, o milho necessita de 380 a 550 mm de água, dependendo do clima, normalmente apresenta um ciclo vegetativo variando entre 110 a 180 dias após a emergência (ALBUQUERQUE, 2010).

Em função das características edafoclimáticas, as principais épocas de semeadura também variam de acordo com a região geográfica. O milho safrinha que atualmente representa a maior parte da produção, recebeu esta denominação devido às condições menos favoráveis de cultivo, especialmente quanto à disponibilidade hídrica e época de cultivo após a colheita da safra de verão. Os fatores climáticos que exercem maior influência sobre a cultura são a radiação solar, precipitação pluvial e a temperatura, que interferem diretamente nas atividades fisiológicas da planta e conseqüentemente na produção de grãos e matéria seca (RUFINO et al., 2012).

O milho pertence ao grupo de plantas com metabolismo fotossintético do tipo C4, que se caracteriza pelo elevado potencial produtivo. O aumento na produção de grãos ocorre quando a máxima área foliar coincidir com a maior disponibilidade de radiação solar, desde que não ocorra o déficit hídrico. Essa condição permite a máxima taxa fotossintética, porém aumenta a necessidade hídrica da cultura, já que o elevado fluxo energético incidente também eleva a evapotranspiração (BERGAMASCHI et al., 2014).

Salienta-se que o milho, possui desenvolvimento influenciado pelas condições de umidade do solo. O déficit hídrico é, normalmente, o fator mais limitante à obtenção de produtividades elevadas e produtos de boa qualidade, ressaltando que o excesso também pode ser prejudicial. A reposição de água ao solo por irrigação, na quantidade e no momento oportuno, é decisiva para obter a maximização da produção (MATOS et al., 2012). Dois dias de estresse hídrico, no florescimento, são suficientes para diminuir o rendimento da cultura em

até 20%, enquanto que, quatro a oito dias resultam em uma queda de mais de 50% (MAGALHÃES et al., 2002).

Nesse contexto, o déficit hídrico, ocupa posição de destaque, pois além de afetar as relações hídricas nas plantas, alterando-lhes o metabolismo, é um fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis (COELHO et al., 2014). A aplicação de produtos no milho em busca de maior tolerância à seca vem aumentando nos últimos tempos, visando o aumento do crescimento e desenvolvimento, sob condições de restrição hídrica (ANJUM, 2011; SOUZA, 2014).

## **2.2 Tolerância à seca e os efeitos do déficit hídrico**

A seca ou desidratação resulta em déficit hídrico, o qual é definido como o desequilíbrio entre a disponibilidade de água no solo e a demanda evaporativa (GALL et al. 2015). Sendo caracterizado como um estresse abiótico, o déficit hídrico produz mudanças fisiológicas nas plantas, incluindo a perda de turgor, ajuste osmótico, redução do potencial hídrico na folha (TARDIEU et al. 2014).

As plantas submetidas à redução do suprimento de água podem estabelecer estratégias para minimizar as necessidades fisiológicas e conseguir sobreviver com perda mínima do seu conteúdo líquido (HEINEMANN et al., 2010). Sob essas condições a atividade dos estômatos é afetada, influenciando assim a absorção de CO<sub>2</sub>, e, portanto, impacta o processo fotossintético assim como o crescimento das plantas. Em resposta a essas condições de déficit hídrico, os sistemas de transporte de íons e água através das membranas, atuam a fim de controlar as alterações de pressão de turgescência em células guarda e estimular a diminuição da condutância estomática (WU et al., 2011).

A restrição na concentração interna de CO<sub>2</sub>, como uma consequência direta da diminuição da condutância estomática, promove aumento na susceptibilidade aos danos fotoquímicos, devido aos níveis altos de energia radiante que chegam ao fotossistema II (PSII) promovendo conjuntamente baixas taxas na assimilação de CO<sub>2</sub>. A menor taxa da resistência difusiva estomática aumenta a temperatura foliar, pois como a transpiração é reduzida, uma menor dissipação de calor para atmosfera será promovida (BENESOVA et al., 2012).



### 2.3 Déficit hídrico e características ecofisiológicas

A baixa disponibilidade hídrica limita a taxa fotossintética, principalmente devido a uma redução da condutância mesófila e de danos causados ao aparato fotoquímico, uma vez que menor condutância pode reduzir a quantidade de CO<sub>2</sub> que chega ao local de carboxilação onde a RUBISCO atua. A condutância mesófila é definida como a capacidade/facilidade que o CO<sub>2</sub> tem em passar por diversas barreiras que encontrará até chegar dentro do cloroplasto como os espaços intercelulares, a parede celular, o plasmalema e a própria camada que reveste o cloroplasto. Porém, quando a planta está em condições de baixa disponibilidade hídrica são apresentadas na sua anatomia foliar modificações que vem a dificultar essa passagem do CO<sub>2</sub> como o engrossamento da parede celular, células menores e mais densamente agrupadas (SILVA et al., 2010, LAWSON; BLATT, 2014).

Além dos fatores supracitados, a diminuição da fotossíntese sob estresse hídrico pode estar relacionada com redução de tamanho e proporção que ficam as folhas ou então a uma maior senescência das mesmas diminuindo a captação e diminuição da área fotossinteticamente ativa (XING; WU, 2012). Muitas plantas tendem a evitar ou escapar do estresse hídrico através da redução de sua área foliar, que é um importante fator limitante da produção, acarretando assim uma menor formação de fotoassimilados que promoveriam seu pleno desenvolvimento. O equilíbrio entre a produção de assimilados e a demanda durante o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos é severamente afetado pela redução da área foliar fotossinteticamente ativa (RUFINO et al., 2012).

As folhas quando submetidas à deficiência hídrica tendem a tornar-se mais espessas, ocorre um enrolamento, reduzindo a projeção da área foliar diminuindo a radiação incidente sobre as mesmas. Essas folhas tendem a formar substâncias de proteção na superfície como suberina, cutina e resinas reduzindo a perda de água pela epiderme. Esta condição hídrica tende a estimular o crescimento do sistema radicular para as zonas mais profundas, essa expansão radicular ocorre por causa do secamento da superfície do solo, o que leva as raízes a promoverem uma absorção de água nas camadas mais profundas do solo que ainda tem água disponível (CALVACHE et al., 1997).

O potencial hídrico da folha, cujos gradientes explicam os fluxos da água no sistema solo-planta-atmosfera, decresce na presença do déficit de água. Embora haja variação ao longo do dia, esse parâmetro descreve o estado hídrico da folha, e tem sido muito utilizado em estudos das relações hídricas dos vegetais, sobretudo quando as plantas são submetidas a algum tipo de estresse hídrico. O aumento da escassez hídrica no solo acaba por refletir na turgescência e

condutância acarretando uma menor alocação de seiva nas folhas, apresentando gradativamente uma diminuição do potencial hídrico foliar (CAIRO; NOVAIS, 2015). O potencial hídrico representa a energia livre associada às moléculas de água, sendo que maior  $\Psi_w$  maior energia livre para realizar trabalho, da mesma forma que menor  $\Psi_w$  menor energia livre para realizar trabalho.

#### **2.4 Relação déficit hídrico e osmoreguladores**

Quando as plantas estão sujeitas ao déficit hídrico tendem a responder com acúmulo de compostos não tóxicos de baixo peso molecular, conhecidos como solutos compatíveis. Esse aumento na concentração intracelular de solutos osmoticamente ativos, acarreta diminuição do potencial osmótico e conseqüentemente ajuda a manter o potencial hídrico em níveis normais ou mais elevados, devido ao fenômeno de ajustamento osmótico (QUEIROZ et al., 2011). O ajustamento osmótico produz um potencial osmótico mais negativo, ajudando assim a manter o movimento da água para as folhas e raízes, devido à manutenção da absorção de água, graças à diferença de concentração dos potenciais osmóticos e hídrico e conseqüentemente favorecendo a manutenção da turgescência dos mesmos órgãos, garantindo a integridade da membrana plasmática e crescimento nas regiões meristemáticas (GAMBETA, 2016). Este ajustamento osmótico é atribuído à síntese e absorção dos solutos orgânicos de baixo peso molecular tais como: açúcares, prolina, aminoácidos, alcoóis, entre outros compostos (GUIMARÃES et al., 2008).

Diversos estudos têm mostrado que o acúmulo de prolina pode influenciar na tolerância das plantas em diversos tipos de condições adversas. A prolina pode funcionar como uma chaperona molecular capaz de proteger a integridade de proteína contra a desnaturação durante estresse hídrico severo e aumentar as atividades de diferentes enzimas. Além disso, pode atuar como fonte de carbono e de nitrogênio usados pelas células para crescimento da planta após períodos de estresse (ZADEHBAGHRI; AZARPANAH; JAVANMARDI, 2014).

#### **2.5 Ácido Abscísico, estresse oxidativo e sistema de defesa**

O ácido abscísico (ABA) endógeno é produzido rapidamente durante as condições de déficit hídrico, provocando assim uma cascata de respostas fisiológicas, dentre elas o fechamento dos estômatos, regulado por uma rede de transdução. Em resposta ao estresse de seca, ABA estimula uma via de sinalização que desencadeia a produção de espécies reativas de

oxigênio (EROs), o que por sua vez induz um aumento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  (BRANDL et al., 2012). Durante a transferência de elétrons, alguns desses elétrons podem ser transferidos do fotossistema I (PSI) para o oxigênio, formando assim o radical superóxido ( $\text{O}_2 \bullet^-$ ). Esse processo pode acarretar a geração de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) e quando em excesso pode vir a causar estresse oxidativo (PANDA; KHAN, 2009). As principais EROs são formadas a partir de várias reações tendo por base o radical superóxido ( $\text{O}_2 \bullet^-$ ) que leva a formação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) e de outras espécies reativas tais como o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), radical alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ), radical peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e hidroperóxido orgânico ( $\text{ROOH}$ ) (BHATTACHARJEE, 2012).

O equilíbrio entre a produção e remoção das EROs pode ser alterado por vários fatores de estresse biótico ou abiótico, como a seca, salinidade, radiação UV, metais pesados, altas temperaturas, deficiência nutricional, poluição do ar, estresse mecânico, herbicidas e ataque de patógenos acarretando no aumento e conseqüentemente acúmulo dessas EROs sendo prejudicial as células das plantas (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Por serem altamente reativas e tóxicas, as EROs, podem reagir com uma vasta gama de biomoléculas, modificando ou bloqueando suas funções, causando danos aos componentes celulares tais como peroxidação lipídica de membranas, inativação de enzimas devido a desnaturação, oxidação de carboidratos, danos na conformação dos ácidos nucléicos e do complexo do fotossistema II (PSII) (GILL; TUTEJA, 2010).

Como resposta a essa produção excessiva de EROs, as plantas desenvolveram um mecanismo eficiente para a remoção ou mesmo para minimizar os efeitos tóxicos promovidos, chamado de sistema antioxidante. Os antioxidantes enzimáticos têm a função de mitigar os danos causados pelo excesso de EROs nos mais diversos compartimentos celulares através da manutenção do balanço entre produção e destruição dessas EROs com a finalidade de manter a homeostase da célula.

Nesta linha de defesa encontra-se a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), além da redutase da glutatona (GR), redutase monodehidroascorbato (MDHAR) entre outras (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). A SOD é a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos das EROs, catalisando a remoção do  $\text{O}_2 \bullet^-$  através de sua dismutação em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Evitando dessa forma a formação futura de  $\text{OH}^\bullet$  através da reação de Haber-Weiss e/ou de Fenton quando na presença de íons de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela reação catalisada pela dismutase do superóxido é dismutado em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e  $\text{O}_2$ , por meio da enzima CAT (DEDEMO et al., 2013). Assim como a catalase, a APX

promove a remoção do  $H_2O_2$ . No entanto, a APX atua diretamente na remoção do peróxido de hidrogênio dos cloroplastos e citosol, enquanto a CAT atua principalmente nos peroxissomos.

Por outro lado, as EROs podem agir como sinalizadoras em vários processos intrínsecos de crescimento e desenvolvimento, além de atuarem como mensageiros secundários envolvidos na ativação de genes de resposta ao estresse e rotas de defesa.

## 2.6 Quitosana

Diversos químicos têm sido utilizados como antitranspirantes em plantas sob déficit hídrico, sobretudo o ácido abscísico (ABA) (TWORKOSKI et al., 2011). Entretanto, ao reduzirem as trocas gasosas, tais antitranspirantes inibem não apenas a perda de vapor de água pelas folhas (transpiração), como também a fotossíntese, o que, em última instância, compromete o crescimento e o rendimento agrônomo dos cultivos. Devido a esses inconvenientes, composições químicas alternativas aos antitranspirantes convencionais à base de ABA, passíveis de controlar a transpiração sem comprometer o rendimento, fazem-se necessárias.

Sendo assim, a Quitosana (CHT) atua como um bioestimulante, ou seja, uma substância que não é considerada como pesticida ou corretivo de solos e que proporciona benefícios às plantas. Ela apresenta características policatiônica de oligômeros, o que permite que seja capaz de realizar ligações com uma variedade de componentes celulares, como constituintes da membrana plasmática e parede celular, bem como, ligações específicas a receptores influentes nos genes relacionados à defesa das plantas (JARDIN, 2015).

A CHT é um copolímero linear, composto por monômeros de D-glicosamina e resíduos de N-acetil - D-glicosamina, que são distribuídos aleatoriamente e ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4). Este polímero natural pode ser encontrado na parede celular de microorganismos, como *Mucor*; mas, é produzido, principalmente, a partir da desacetilação da quitina, um dos polímeros mais abundantes na natureza (DZUNG et al., 2011).

Esse copolímero de peso molecular elevado, assemelha-se a celulose, a única diferença está relacionada ao grupo amina ( $-NH_2$ ) na posição C-2 da quitosana em vez do grupo hidroxila ( $-OH$ ) encontrado na celulose. No entanto, ao contrário da fibra vegetal, a quitosana possui cargas iônicas positivas, o que lhe confere a capacidade de ligar-se quimicamente com lipídeos carregados negativamente, íons metálicos, proteínas e macromoléculas (KATIYAR et al. 2015)

O papel da quitosana como antitranspirante na agricultura ainda não foi completamente elucidado, mas é possível que ao serem depositados na parede celular tais químicos criem uma

barreira física que dificulta a perda de vapor de água, sem necessidade de aumento nos níveis de ABA para fechamento dos estômatos. Com isso, a eficiência de transpiração seria aumentada sem afetar negativamente a fotossíntese e o rendimento agrônomico dos cultivos, traduzindo-se em mecanismo de tolerância sob déficit hídrico. De fato, diversos trabalhos evidenciam efeitos benéficos da CHT no rendimento de cultivos sob condições de baixa disponibilidade de água (KATIYAR et al., 2015; EMAM et al., 2014). Tal químico, inclusive, é incluso como tecnologia emergente para uso na indústria devido às suas características, tais como: abundância, atoxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e, também, por sua configuração química (DZUNG et al., 2011).

Issak et al. (2013) cultivaram dois genótipos de *Arabidopsis* (o mutante *aba2-2*, com baixos níveis endógenos de ABA, e o seu respectivo tipo selvagem), a fim de examinar se o ABA endógeno está envolvido na redução da condutância estomática induzido por CHT no mutante *aba2-2*, e o efeito do inibidor da biossíntese de ABA no tipo selvagem. Tais autores verificaram que o ABA não é requerido para o fechamento estomático induzido por CHT, corroborando a sugestão que CHT e ABA possuem vias de sinalização divergentes para induzir o controle da transpiração. Em contraste, Iriti et al. (2009) verificaram que a aplicação de quitosana fez aumentar os níveis de ABA, em plantas de *Phaseolus vulgaris*, o que levou a um fechamento parcial dos estômatos para controle da transpiração. Tais autores verificaram ainda a formação de um filme antitranspirante na superfície de folhas tratadas com quitosana, o que permitiu controle da transpiração mais eficiente do que o fechamento estomático.

A Aplicação exógena de quitosana pode melhorar o teor de água na folha. Resultados experimentais mostraram que a aplicação de quitosana aumentou significativamente a concentração de clorofila sob condições de déficit hídrico, a qual ilustra que tal químico pode melhorar o desempenho da fotossíntese e a acumulação de matéria orgânica em plântulas de trigo (MA et al. 2014). Sob tal condição um sistema de raiz bem desenvolvido absorve mais água para manter a umidade estável, a presença de quitosana pode reduzir a inibição do crescimento de raízes e caules, o que mostra que a aplicação deste pode efetivamente promover o desenvolvimento do sistema radicular e fortalecer a capacidade de absorção de água, de modo a aumentar a resistência à seca em plantas de trigo (ZENG e LUO 2012).

O fornecimento de quitosana reduziu o declínio na taxa fotossintética em mudas de *Brassica napus* e trigo sob condições de déficit hídrico (MA et al. 2014; LI et al. 2008). Avaliações de microscopia eletrônica e histoquímica demonstraram que a aplicação foliar de quitosana reduziu a transpiração em plantas de pimenta através do fechamento parcial dos

estômatos, resultando assim em uma redução de 26-43% no uso da água, mantendo ao mesmo tempo o rendimento e a produção de biomassa.

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Diante do exposto e visando uma melhoria da tolerância da cultura de milho em condições de déficit hídrico, a aplicação de novas tecnologias resulta em avanços rápidos na agricultura e torna-se possível atingir um aumento na produção agrícola. Esses resultados sugerem que a quitosana apresenta um eficaz potencial anti transpirante para conservar o uso da água na agricultura. Devido as suas propriedades biológicas a quitosana pode ser considerada como um composto bioestimulante promissor para uso na agricultura.

## REFERÊNCIAS

- ANJUM, S. A. et al. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange **Journal Agronomy and Crop Science**, v. 197, n. 3, p. 177-185, 2011.
- BENEŠOVÁ, M. et al. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? **PLoS One**, San Francisco, v.7, n. 6, e38017, Jun. 2012.
- BERGAMASCHI, Homero; MATZENAUER, Ronaldo. O milho e o clima. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, p. 84, 2014.
- BHATTACHARJEE, S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. **Journal of Botany**, v. 2012, Article ID 985298, p. 1-22, 2012.
- CAIRO, P.A.R.; NOVAES, A.B.; FERNANDES, E.T. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2014.
- CALVACHE, A. M. et al. Efeito da deficiência hídrica e da adubação nitrogenada na produtividade e na eficiência do uso de água em uma cultura do feijão. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 232-240, Set. 1997.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo levantamento, Julho/2016**. Disponível em: <www.conab.gov.br> Acesso em: 20 jul. 2016.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v 2, article 53, p.1-13. Dec. 2014.
- DEDEMO, G. C. et al. Osmoprotection in sugarcane under water deficit conditions. **Plant Stress**, v.7, n. 1, p. 1-7, Jan. 2013.
- DZUNG, N. A.; KHAN, T. P.; DZUNG, T. T. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. **Carbohydrate Polymers** v. 84, p.751–755, 2011.
- EMAM, M. M.; et al. Effect of selenium and silicon on yield quality of rice plant grown under drought stress. **Australian Journal of Crop Science** v.8, p.596-605, 2014.
- GAMBETTA, G.A. Water stress and grape physiology in the context of global climate change. **Journal of Wine Economics**. V.11, n.1, p.168-180, May, 2016.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.



GUIMARÃES, E. R. et al. Free proline accumulation in sugarcane under water restriction and spittlebug infestation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 628-633, Dec. 2008.

HEINEMANN, A.B. Caracterização dos padrões de estresse hídrico para a cultura do arroz (ciclo curto e médio) no estado de Goiás e suas consequências para o melhoramento genético. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.1, p.29-36, 2010.

IRITI, M. et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany** v.66, p.493-500, 2009.

JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation, JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. 2.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940, 300p. Jul. 1964.

KATIYAR, D., HEMANTARANJAN, A., SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, V. 20, p.1-9, February, 2015.

LAWSON, T.; BLATT, M. R. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. **Plant Physiology**, Rockville, v. 164, n. 4, p. 1556-1570, Apr. 2014.

LI, D. et al. Effects of drought on soluble protein content and protective enzyme system in cotton leaves. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 4, n. 1, p. 56-62, Mar. 2010.

MA, L. J. et al. Germination and physiological response of wheat (*Triticum aestivum*) to pre-soaking with oligochitosan. **International Journal of Agricultural Biology**, v.16, p. 766-770, 2014.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. Fisiologia da produção. **A cultura do milho**. Embrapa Milh e Sorgo, Sete Lagoas, v.3, p. 64-87, 2008.

MATOS, F.M. de, et al. Produtividade de milho cultivado sob diferentes regimes hídricos. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, **Anais: ABMS**, Águas de Lindóia, p.3244-3250, 2012.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Malden, v.195, n. 6, p.442-454, Dec. 2009.

QUEIROZ, R. J. B. et al. Biochemical and physiological responses of sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 4, p, 2011.

RUFINO, C.A. et al. Desempenho de genótipos de milho submetidos ao déficit hídrico no estágio vegetativo. **Magistra**, Cruz das Almas, v.24, n.3, p.217-255, julho, 2012.

SILVA, E. N. et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, Chubut, v. 74, n. 10, p. 1130-1137, Oct. 2010.

SOUZA, T. C.;MAGALHÃES, P. C.;CASTRO, E. M.; Carneiro, N. P.; Padilha, F. A. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. **Plant Growth Regulation** **73**: 205-217, 2014.

TWORKOSKI, T.; WISNIEWSKI, M.; ARTLIP, T. Application of BABA and s-ABA for drought resistance in apple. **Journal of Applied Horticulture** **13**: 85-90, 2011

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Foreign Agricultural Service. **World markets and trade: grain**. 2011. Disponível em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do>>> Acesso em : 16 de agosto de 2016.

WU, Y.; HUANG, M.; WARRINGTON, D.N. Growth and transpiration of maize and winter wheat in response to water deficits in pots and plots. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v.71, p.64-71, 2011.

XING, K. et al. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**. V. 35, p. 569–588, April, 2015.

ZADEHBAGHRI, M.; AZARPANAH, A.; JAVANMARDI, S. Proline metabolite transport an efficient approach in corn yield improvement as response to drought conditions. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 14, n. 5, p. 476-485, May 2014.

ZENG, K.F., et al. Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by hitosan. **Science Horticultural** v.126, p. 223-228, 2012.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1 - CHITOSAN EXOGENOUS APPLICATION FOR WATER DEFICIT  
TOLERANCE INDUCTION IN MAIZE PLANTS**

**Artigo redigido conforme norma da Revista *Acta Scientiarum Agronomy***

## **APLICAÇÃO EXÓGENA DE QUITOSANA E INDUÇÃO PARA TOLERÂNCIA AO DEFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO**

### **CHITOSAN EXOGENOUS APPLICATION FOR THE WATER DEFICIT TOLERANCE INDUCTION IN MAIZE PLANTS**

#### **RESUMO**

A presente investigação busca elucidar a viabilidade do uso da Quitosana na indução a tolerância ao déficit hídrico em híbridos de milho, contrastantes para tolerância a restrição hídrica. Para tanto, as plantas de milho foram submetidas ao déficit hídrico e aplicação foliar de diferentes doses de quitosana (60, 100, 140 e 180 mg/L) no pré florescimento, sendo realizadas avaliações ao longo do período de quinze dias de estresse. A fim de compreender o comportamento na indução da tolerância a restrição hídrica, foram realizadas avaliações de potencial hídrico, teor relativo de água e clorofila, trocas gasosas, investigações bioquímicas, através da quantificação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX e PAL e conteúdo de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio. Dentre os tratamentos, as plantas de milho submetidas a aplicação foliar de quitosana na dose de 140 mg/L resultaram num comportamento específico, apresentando respostas similares as plantas sob condição favorável de irrigação. Tais respostas positivas estão relacionadas as elevadas atividades das enzimas antioxidantes, trocas gasosas e baixos teores de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências sobre o potencial uso da quitosana, a fim de aumentar a tolerância ao estresse hídrico.

**Palavras-chave:** Estresse hídrico, enzimas antioxidantes, seca, trocas gasosas

#### **ABSTRACT**

The present research seeks to elucidate the feasibility of the Chitosan (CHT) use in water deficit tolerance induction in different maize hybrids, contrasting for tolerance to water restriction. The maize plants were submitted to water deficit and foliar application of different chitosan doses (60, 100, 140 and 180 mg/L) at pre flowering growth stage, being evaluated during the stress period of fifteen days. In order to understand the behaviour in the tolerance induction to water restriction, biophysical evaluations were performed, such as water potential, relative water content and chlorophyll, gas exchange, biochemical investigations, by activity quantification of, SOD, CAT, APX and PAL antioxidant enzymes and lipid peroxidation content and

hydrogen peroxide. Among the treatments, maize plants submitted to chitosan foliar application at the dose of 140 mg/L presented a specific behaviour, showing similar responses to plants under favourable irrigation conditions. Such positive responses are related to the high activities of antioxidant enzymes, gas exchanges and low levels of lipid peroxidation and hydrogen peroxide. The results obtained provide evidence on the CHT potential use in order to increase tolerance to water stress.

**Key words:** Antioxidant enzymes, water stress, drought, gas exchange.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is characterized by being a crop grown in climates ranging from temperate to tropical zone, during periods when average temperatures are above 15°C without frost occurrence. To obtain the maximum production, maize needs 380 to 550 mm of water, depending on the weather.

In environmental conditions that cause water deficit, such as drought, the occasioned impacts depend on the stress duration, intensity and progression rate, as well as genotype, plants development stage and interaction with other stresses ( CHAVES et al., 2016; FENG et al., 2016). The pre flowering period is considered as the most sensitive and determinant stage of productive potential. Two days of water stress, at flowering period, are sufficient to decrease crop yield by up to 20%, four to eight days result in a fall of more than 50% (MAGALHÃES et al., 2002).

In view of the air temperature increase and lower precipitation, together with the increasing limitations of the available water resources in the agricultural areas, it is necessary to adopt alternative strategies aiming at a better knowledge of the biological and climatic factors related to the water deficit tolerance. The antitranspirant chemicals use, acting as a biostimulant, is a strategy that has been actively used since it would enable maize plants to tolerate water deficit both in pre flowering and post flowering (KATIYAR et al., 2014).

Chitosan (CHT), considered a biostimulant, can stimulate physiological responses to water deficit tolerance (KATIYAR et al., 2014). The results of the last decades have indicated that this biopolymer has the potential to be developed as an antitranspirant in agricultural stress situations, inducing drought tolerance through increased defense against oxidative stress, without compromising the agronomic yield.

However, chitosan potential goes beyond that. It can reduce the environmental impacts of agricultural activity. Its nontoxic character is proven by its wide application in agriculture due

to its biocompatibility, biodegradability and bioactivity (KATIYAR et al., 2014). Agriculture has a strong impact on the environment. In this sense, the use of clean technologies, that can reduce the use of toxic chemicals, is necessary, especially in cash crops like maize (SCHARFY et al., 2017). This necessity makes chitosan a sustainable and clean alternative. Chitosan also induces mechanisms against various biotic stresses such as fungi, bacteria and insects, and promotes the formation of barriers that increase plant productivity (KATIYAR et al., 2014), reducing the need for agrochemicals.

The present study had the objective to evaluate the performance of two hybrids contrasting to drought, submitted to different Chitosan doses in order to induce tolerance to water deficit.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material and growing conditions**

Maize hybrids contrasting to drought tolerance, DKB 390 and BRS 1010, tolerant and sensitive, respectively, were grown under greenhouse conditions at Embrapa- Brazilian Agricultural Research Corporation, division of maize and sorghum in Sete Lagoas, Minas Gerais Estate- Brazil (19°28'S, 44°15'08' W, 732m latitude). Both were grown in plastic pots containing 20 dm<sup>3</sup> of typical dystrophic Red Yellow Latosol, medium to moderate texture, removed from the plateau area.

### **Soil moisture determination**

Tensiometers were installed at a depth of 20 cm. The water replenishment through irrigation was performed based on the measurements obtained with the sensor and the water replenished up to field capacity. In parallel, the cultural and phytosanitary treatments needed were carried out for the crop.

### **Treatments imposition**

Upon reaching the pre flowering, maize plants were submitted to the soil water deficit effects. This condition was imposed by the daily supply 50% of the available water until the water potential in the soil reached approximately - 138kPa (SOUZA et al., 2014). The treatments were characterized by the different CHT doses used at concentrations of 60, 100,

140 and 180 mg/L, besides water acidified, irrigated and water deficit. CHT is characterized by having free aminic groups, which have solubility in acid solutions and insolubility in pH higher than 6.5 (Katiyar et al., 2015), thus justifying the treatment with acidified water. The treatments were applied in both hybrids. For the application of CHT doses, a solution was prepared according to DZUNG et al., 2011 by dissolving the CHT in 100 mL of 0.5% acetic acid for 12 h. This solution was then diluted to the corresponding concentrations.

The solutions were supplied via foliar, through a costal sprayer, whose spray pressure was obtained through a CO<sub>2</sub> cylinder and controlled by a low pressure manometer and a flow rate of 102L/ha, pressure of 3 BAR. All measurements to prevent the contact of the sprayed CHT solutions to neighboring plants were taken. The treatments imposition was performed on the first day after exposure to water stress, which lasted 15 days. All evaluations were performed on the first day, the seventh day and at the end of 15 days of water stress (1, 7, 15 DAA). The water supply was then restored and maintained at levels close to field capacity. The experiment was carried out until harvesting time.

### **Parameters of water relation, Photochemical Efficiency and Chlorophyll Index**

The leaf water potential ( $\Psi_w$ ) was evaluated using a pressure chamber (model 1000. PMS Instrument Company - Albany OR, USA). The measurements were performed at 12 hours according to the methodology described by Scholander et al., 1964. For the relative water content (RWC) determination was followed the methodology described by Silveira et al., 2009. The chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ) maximum quantum efficiency was determined using the fluorimeter (Plant Efficiency Analyser, Hans a tech Instruments King's Lynn, UK). The chlorophyll index was evaluated using a SPAD - 502 chlorophyll measurement (Minolta Corp, Tramsey, USA). All readings were performed in the morning, on the first leaf below the flag leaf.

### **Gas exchange measurements**

The gas exchange measurements were performed using a portable photosynthesis system (IRGA, Model LI-6400, Li-Color, Lincoln, Nebraska, USA) with integrated fluorescence chamber (LI-6400-40 leaf chamber fluoremeter, Li-Cor). All measurements were performed in the morning between 8 and 11 am on a fully expanded leaf (ear maize leaf). The evaluated

parameters were leaf photosynthetic rate (Pn), stomatal conductance (gs), respiration (E), CO<sub>2</sub> (Ci) intercellular concentration. The measurements were performed in a leaf area of 2 cm<sup>2</sup>, with controlled CO<sub>2</sub> flow by using cylinders (Liqueur) of 12 grams in a concentration of 380 μmol mol<sup>-1</sup>. The photon flow density (PPFD) was 1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and leaf temperature was controlled (26 °C).

### **Extraction and enzymatic activity**

The enzymes extraction was done by the maceration of 200 mg of leaf in liquid nitrogen, adding 1.5 mL of the extraction buffer consisting of: 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.8 mM PMSF, 1% PVPP and 1 mM ascorbic acid (ASC). The extract was centrifuged at 14000 rpm for 30 minutes at 4° C and the supernatant was collected and stored at -80° C in the analysis period. The collected supernatants were used in all enzymes analyzes (BIEMELT ET AL., 1998).

The analyzed enzymes activity quantification, followed established protocols. Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated by the ability to inhibit nitrotriazolium blue (NBT) photoreduction proposed by Giannopolitis et al., 1977. Catalase (CAT) was determined by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption at 240 nm for 3 minutes (HAVIR AND MCHALE, 1987). Ascorbate peroxidase (APX) was determined by monitoring the ascorbate oxidation at 290 nm for 3 minutes (NAKANO AND ASADA, 1981). Phenylalanine ammonia lyase (PAL) was determined by the cinnamic acid formation at 290 (ZUCKER, 1965).

### **Extraction and quantification of hydrogen peroxide content (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and malondialdehyde (MDA)**

Samples containing 200 mg of leaf tissue were macerated in liquid nitrogen, supplemented with 20% PVPP, homogenized in 5 mL of trichloroacetic acid (TCA) 0.1% and centrifuged, to 10,000g for 10 minutes to 4°C. The supernatant was used to hydrogen peroxide and MDA content (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) determination. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was measured in a spectrophotometer according to VELIKOVA et al., 2000. Malondialdehyde content (MDA) which is a lipid peroxidation final product was used to determine the membrane damage level. The method used was according to BUEGE AND AUST, 1978.

### **Agronomic parameters evaluation**

At harvest, plant height, ear size and diameter were measured using a millimeter ruler and a slide caliper, respectively. We also evaluated rows number per ear, grains number per row



and final grain weight. Then, the plants were submitted to drying in forced air circulation dry oven at 70 °C for 72 h, based on the total dry biomass value, the harvest index was estimated through the ratio (grains dry mass/total plants dry mass)\*100 (MAGALHÃES AND DURÃES, 2008).

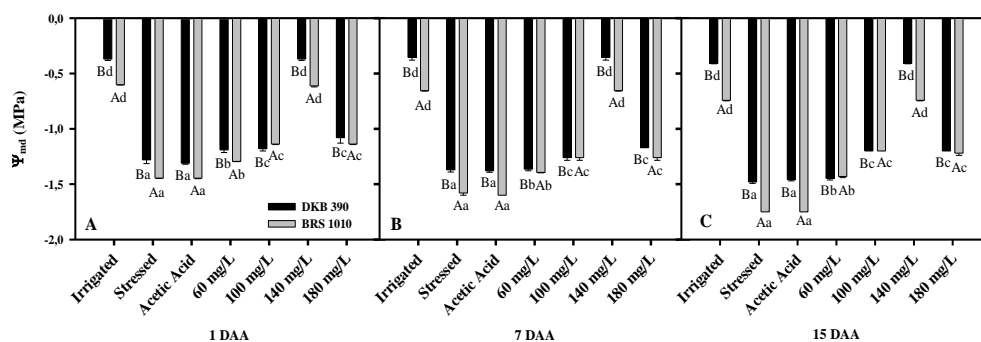
### Data analysis

For all analyzed parameters, the averages were calculated. For the statistical analysis of the results, the Analysis of variance (ANOVA) and the Scott-Knott averages comparison test at 0.05% significance ( $P \leq 0,05$ ) were used, in the Sisvar version 4.3 program (Federal University of Lavras, Lavras, Brazil).

## RESULTS AND DISCUSSION

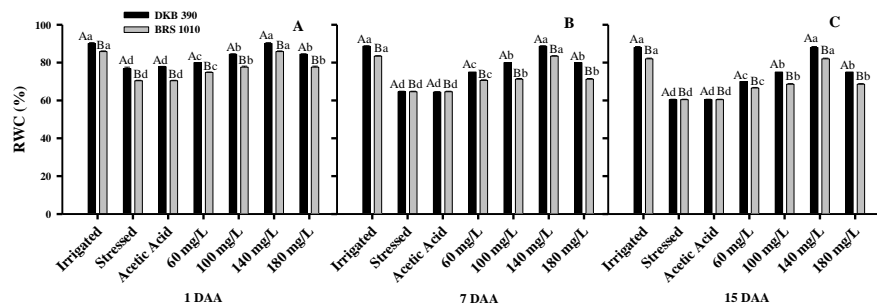
To understand the plant resilience and plasticity basis to environmental pressures, it is necessary to understand the cellular and developmental mechanisms that determine the functional consequences on plant metabolism. The maize plants submitted to CHT 140 mg/L dose and the ones which were irrigated showed a similar result, surpassing the other treatments, in all analyzed parameters and independent of the hybrid. The observed differences between hybrids are related to their genetic characteristics, which allow them to be characterized as tolerant or sensitive to the water restriction condition.

For leaf water potential, irrigated treatments and the CHT application of 140 mg/L did not show differences in the evaluations performed for the two hybrids. However, for all other treatments there was an effective reduction of this parameter (Fig. 1). The DKB 390 (tolerant) hybrid presented, in general, a water potential smaller reduction than the hybrid BRS 1010 (sensitive).



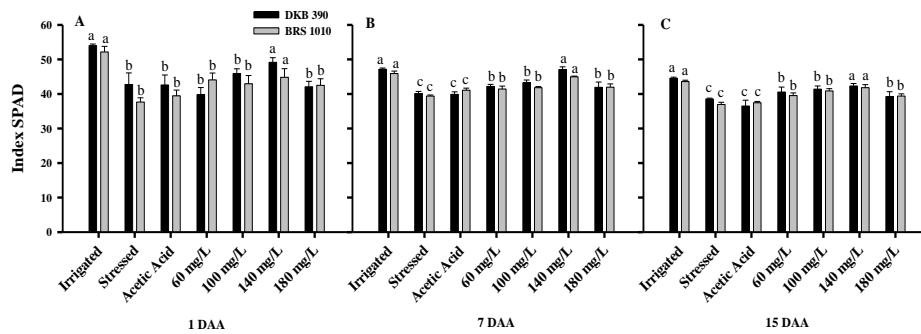
**Figure 1:** Leaf water potential at noon  $\psi_{md}$ , during the stress imposition on two drought contrasting hybrids (DKB 390 and BRS 1010) submitted to the different treatments. The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $p \leq 0.05$ ).

The relative water content (RWC) behavior, for irrigated treatments and CHT 140 mg/L, in both DKB 390 and BRS 1010, did not present differences in the evaluations performed during the stress period (Fig. 2). However, for all other treatments there was an effective reduction when compared to the 15 days under water restriction. On the first day of stress imposition, the greatest reduction of the relative water content was in the sensitive hybrid (BRS 1010). Throughout the stress days, the stressed BRS 1010 presented a significant reduction followed by the DKB 390.



**Figure 2.** Relative water content (RWC %), during stress imposition on two drought contrasting hybrids (DKB 390 and BRS 1010) submitted to the several treatments. The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ ).

CHT Leaf application, especially at 140 mg/L, resulted in a significant influence on the chlorophyll index in both hybrids, when compared to treatments under conditions of water deficit and acidified water spray (Figure 3). In a comparison over time, it was observed a decline of this index, in the treatments, except in the irrigated plants and with application of CHT 140 mg/L. No differences were found between hybrids.



**Figure 3.** Chlorophyll Index during the stress imposition on two drought contrasting hybrids (DKB 390 and BRS 1010) submitted with and without CHT different doses application. The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ ).

The CHT chemical and physical structures are related to their strong bonding ( $\beta$ -1,4), and because it is a relatively water-insoluble polymer. Solubility can be achieved when a pH adjustment occurs by diluting acetic acid. These characteristics are critical in assessing this polymer biological properties, transfer of insoluble CHT would decrease cellular responses (HADWIGER, 2013). In the present study, it was observed that the CHT dilution in 0.5% acetic acid did not result in negative effects on the maize plants metabolic characteristics, regardless of the hybrids analyzed.

Studies that involve water stress should present a daily monitoring of soil moisture. In the present investigation, it was observed that during the 15 days of water restriction, soil moisture was equal to or less than 50% of the total available water capacity in the soil, resulting, in the stress presence, which can be described as moderate in the early days and severe in the last days.

The results obtained for chlorophyll content are related to the fact that under water restriction conditions the decrease of this parameter is a phenomenon commonly observed (PIRBALOUTI et al., 2017). This behavior can be attributed to the synthesis reduction of the major pigments protein complexes, which protect the photosynthetic apparatus, oxidative damage to lipids and chloroplast proteins. The decrease in this pigment content is a negative consequence of the water deficit, however, it has been considered as an adaptive characteristic in plants grown under water restriction (HADWIGER, 2013). The CHT resembles cellulose, the only difference is related to the amine group ( $-NH_2$ ) at the C2 position instead of the

hydroxyl group (-OH) found in the cellulose. However, unlike vegetable fiber, CHT has positive ionic charges, which gives ability to chemically bind with negatively charged macromolecules (KATIYAR et al., 2015). This chemical characteristic suggests that an interaction between Chlorophyll and CHT can occur through its protonated amino group, thus corroborating the chlorophyll index maintenance observed in the present investigation (RIZZI et al., 2016).

A significant decrease in the Fv/Fm ratio (maximum photochemical efficiency) was observed in both hybrids, but remarkably in BRS 1010, in all treatments, except in plants under irrigated conditions and CHT 140 mg/L (Table 1).

Table 1. Maximum photochemical efficiency of PSII (Fv/Fm) maize hybrids with contrasting characteristics for drought tolerance cultivated under different treatments.

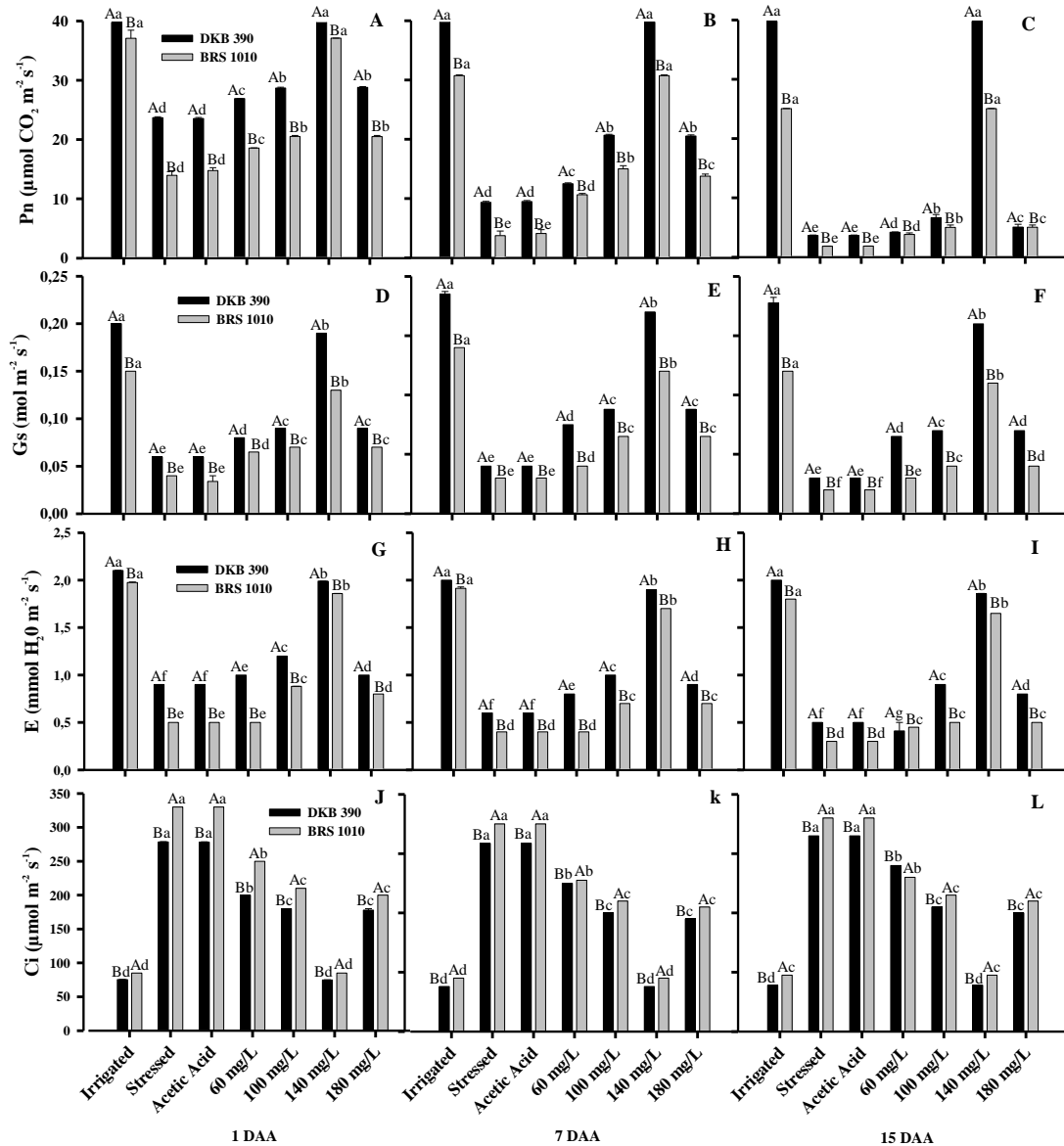
DKB 390*								
	Irrigated	Stressed	Acetic Acid	60 mg/L	100 mg/L	140 mg/L	180 mg/L	CV%
<b>IDAA</b>	0.80 a	0.69 b	0.69 d	0.69 c	0.73 b	0.79 a	0.70 b	15.1
<b>7DAA</b>	0.81 a	0.63 c	0.65 c	0.69 b	0.72 b	0.79 a	0.68 b	16.2
<b>I5DAA</b>	0.80 a	0.58 d	0.58 d	0.60 c	0.70 b	0.75 a	0.66 b	14.3
BRS 1010*								
	Irrigated	Stressed	Acetic Acid	60 mg/L	100 mg/L	140 mg/L	180 mg/L	CV%
<b>1DAA</b>	0.79 a	0.68 b	0.69 b	0.70 b	0.72b	0.78 a	0.69 b	15.0
<b>7DAA</b>	0.78 a	0.62 c	0.64 C	0.71 b	0.73 b	0.77 b	0.69 b	14.5
<b>I5DAA</b>	0.74 a	0.55 c	0.59 c	0.67 b	0.68 b	0.72 a	0.68 b	14.1

Tolerant hybrid DKB 390, sensitive BRS 1010

The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ ).

A specific behavior was observed for gas exchange parameters, except for  $C_i$  ( $CO_2$  intracellular concentration), on the first day, where water deficit significantly affected the stressed treatments, but there was a specific behavior of the plants submitted to CHT 140 mg/L, presenting a similarity with the plants under irrigation conditions. The analyzed parameters reductions were more pronounced in the hybrid BRS 1010 (Fig. 4). With 15 days of stress, both hybrids presented a reduction of these parameters, but DKB 390, obtained superior results when compared to BRS 1010. By analyzing the  $CO_2$  intracellular concentration, it can be observed

that the sensitive hybrid presented a superior behavior, when compared to the tolerant, in addition, the lowest contents analyzed occurred in maize plants submitted to treatments of CHT 140 mg/L and in favorable irrigation conditions.

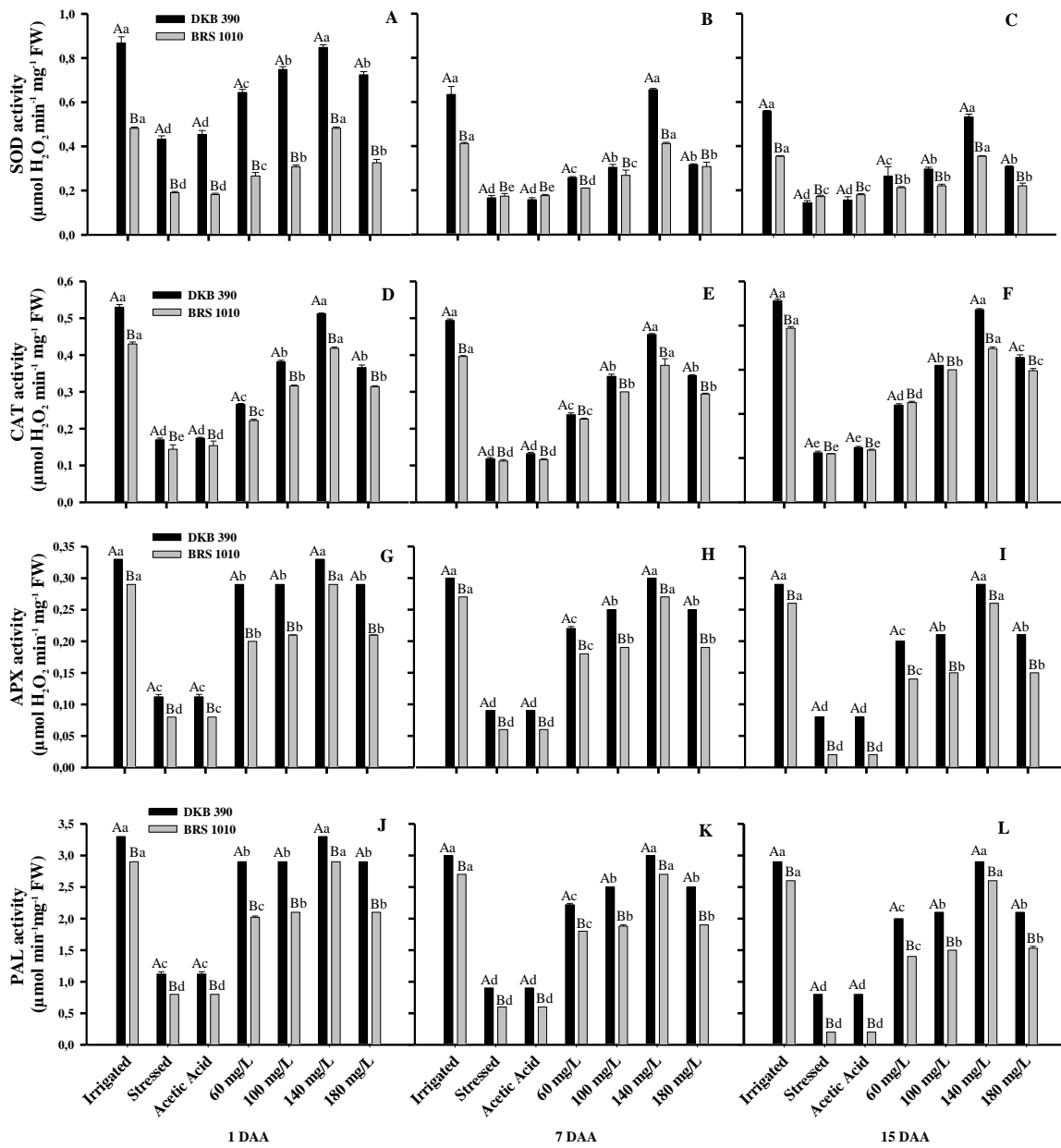


**Figure 4.** Gas exchange parameters during stress imposition on two drought contrasting hybrids (DKB 390 and BRS 1010) submitted to the various treatments, Pn (photosynthetic rate, Figs. A and B), gs (stomatal conductance, Figs. D, E and F), E (perspiration rate, Figs. G, H and I) and Ci (internal carbon, Figs. J, K and L). The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ ).

The foliar application of CHT 140 mg/L and the irrigated treatments resulted in maintenance in the Fv/Fm ratio, thus indicating that photosynthetic electron transport was not

affected, as probably no photoinhibition occurred in the photosystem II (PSII) complexes. CHT can stimulate the xanthophyll cycle, reflecting corresponding changes in the zeaxanthin/violaxanthin ratio (IRITI et al., 2009). CHT probably regulates 9 cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED), a key enzyme of ABA biosynthesis through the carotenoid pathway. In fact, in the present investigation it was observed that CHT 140 mg/L provided a decrease in stomatal conductance, thus acting as an antitranspirant, without negatively affecting the photosynthetic rate and the Carbon intracellular concentration. This result suggests a decrease in the CO<sub>2</sub> assimilation and transport efficiency, but photosynthetic activity prevails.

The increase in water stress days resulted in lower enzyme activity in both hybrids analyzed (Fig. 5). Irrigated treatments and CHT 140 mg/L showed similar behavior regarding the activity of SOD, CAT, APX and PAL enzymes, expressing a high performance when compared to the other treatments. As other results showed, it was observed that the tolerant hybrid (DKB 390) presented a higher enzymes activity than the sensitive hybrid (BRS 1010).



**Figure 5.** Antioxidant SOD enzymes activity (Fig. A and B), CAT (Fig. D, E and F), APX (Fig. G, H and I) and PAL (Fig. J, K and L) during the stress imposition on two contrasting hybrids (DKB 390 and BRS 1010) submitted to the different treatments. The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ )

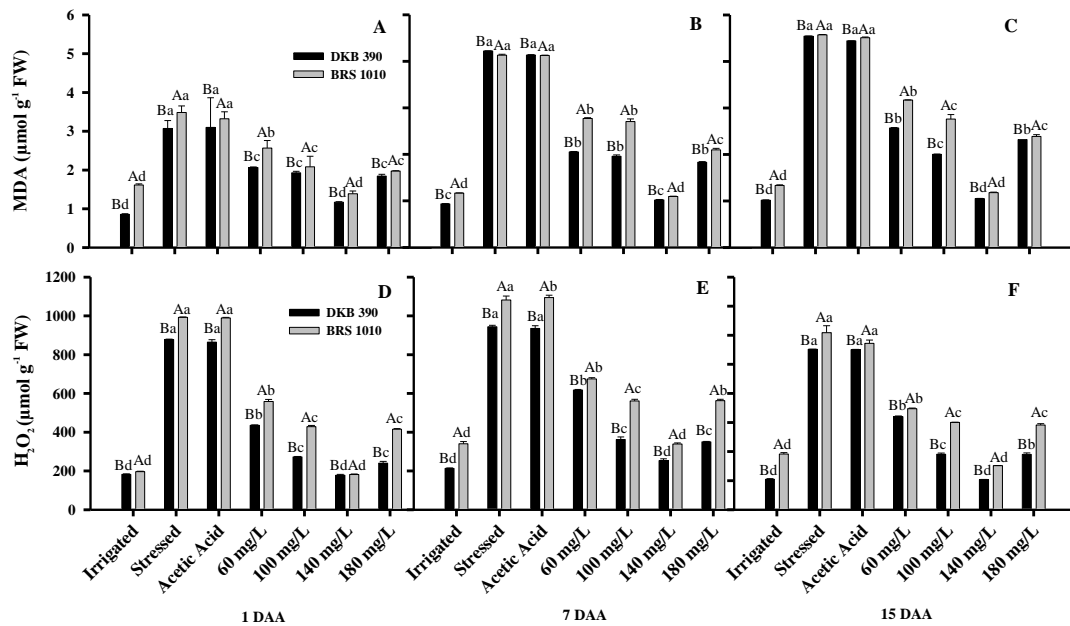
In agreement with the obtained results related to the enzymes analyzed activity, in general, the treatments stressed and 0.5% acetic acid application, independent of the hybrids, had an increase in the malondialdehyde (MDA) content and hydrogen peroxide, which specific



behavior was observed along the water restriction days (Figure 6). It is observed that the irrigated treatments and CHT 140 mg/L resulted in the lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation content. As far as hybrids are concerned, it was observed that the maize plants sensitive to the water deficit (BRS 1010) had higher concentrations of the analyzed contents when compared to the tolerant plants (DKB 390).

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may play a role as a secondary messenger for responses to abiotic stress, leading to an tolerance increase to these unfavorable conditions, especially low water availability, by maintaining cellular homeostasis through the antioxidant enzymes SOD, CAT and APX activity. The CHT defense response includes the secondary metabolism enzymes improved activity, such as PAL. It is proposed that CHT receptors are present on the plasma membrane, however, through a signalling cascade, the chloroplast is the primary CHT action organelle (HADWIGER, 2013). Charge-charge interactions between positively charged CHT amine groups and negatively charged phospholipids promote a signal that will lead to the octadecanoid pathway activation, this metabolic pathway is directly related to the < H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation, as well as the PAL enzyme activation (PICHYANGKURA et al., 2013).

Probably, the MDA high content found in plants subjected to water stress, except for the treatment of 140 mg/L, resulted in negative damage to the phospholipids, resulting in a low interaction between plant cells and CHT, promoting a decrease in the antioxidant enzyme activity.



**Figure 6.** Malondialdehyde content (MDA) (Fig. A, B and C) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. D, E, F) during the stress imposition on two drought contrasting hybrids (DKB 390 and BRS 1010) submitted to several treatments. The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ ).

The stress effect caused by lack of water was evidenced between stressed conditions, CHT doses and irrigated for the production attributes. The results found for DKB 390 confirmed a higher tolerance compared to BRS 1010, where it can be observed that maize plants, of the sensitive hybrid, did not result in an expressive grain production. It was verified through the analyzed parameters that maize plants grown in CHT 140 mg/L and irrigated, showed similar responses (Tabela 2).

Table 2. Production characteristics in contrasting maize hybrids for drought tolerance grown under different treatments

DKB 390								
	Irrigated	Stressed	Acetic Acid	60 mg/L	100 mg/L	140 mg/L	180 mg/L	CV%
PH	2.47 Aa	2.02 Ad	2.03Ad	2.31 Ab	2.31 Ab	2.46 Aa	2.26 Ac	13.8
ED	49.10 Aa	35 Ad	35 Ad	46 Ab	46 Ab	49 Aa	46.1 Ab	14.7
NCR	26 Aa	10.0 Ac	10.8Ae	24.2Ab	24.8Ab	26,8Aa	24.8 Ab	14.6
NRE	15.80 Aa	8.4 Ad	8.4 Ad	13.4Ac	13.2 Ac	15.8 Aa	12.4 Ac	15.2
TDB	174.84Aa	91 Ad	91,04Ad	144,9Ab	145.1Ab	173.9Aa	139.1 Ac	12.3
DGB	61.89 Aa	28.2 Ac	28.4 Ac	51.3 Ab	50.9 Ab	61.12Aa	51.2Ab	14.6
H1	0.35%Aa	0.30%Ac	0.30%Ac	0.32%Ab	0.31%Ab	0.35%Aa	0.33%Ab	14.1

BRS 1010								
	Irrigated	Stressed	Acetic Acid	60 mg/L	100 mg/L	140 mg/L	180 mg/L	CV%
PH	2.18 Ba	1.88 Bd	1.89Bd	2.02 Bc	2.14Bb	2.19Ba	2.15Bb	13.9
ED	43.31 Ba	*	*	*	*	43.1Ba	*	12.4
NGR	17.2 Ba	*	*	*	*	16.9Ba	*	15.9
NRE	13.2 Ba	*	*	*	8	13.1Ba	*	13.6
TDB	129 Ba	37.5 Bd	37.3Bd	58.4Bc	61.1Bb	128.1 Ba	60.9Bb	15.8
DGB	25.3 Ba	*	*	*	*	25 Ba	*	13.5
H1	0.31%Ba	*	*	*	*	0.31%Ba	*	15.5

Tolerant hybrid DKB 390, sensitive hybrid BRS 1010 PH: plant height (m); ED: spike diameter (mm); NGR: number of grains per row; NRE: number of rows per ear; TDB: total dry biomass (g); DGB: total grain biomass (g); HI: harvest index (g.g-1). \* There was no production.

The averages followed by the same letter do not statistically differ from each other. Uppercase letters denote comparisons between genotypes, and lowercase letters denote comparisons between treatments within the same genotype by the Scott-Knott test with 5% significance ( $P \leq 0.05$ ).

The CHT stimulating effect on plant growth can be attributed to an increase , water absorption and essential nutrients by adjusting the cellular osmotic pressure and reducing the free radicals accumulation by increasing the antioxidant enzymes activity (PIRBALOUTI et al., 2017). The adverse consequences observed in agronomic parameters, in plants under water restriction, become an adaptive resource for the plants survival under stress. One of the reasons that may have led to a better grain yield, especially for the application of CHT 140 mg/L and irrigated plants of genotype DKB 390, is the

harvest index (HI) which means a larger differential of photoassimilates allocation to the ear during its life cycle.

The CHT mode of action is not well elucidated yet. The action routes potential diversity of this biolopolymer can be unlimited due to the positive charges uniformity along its length thus allowing a vast interaction with the other molecules in the cell matrix. The role of CHT as an antitranspirant in agriculture may be related to the fact that when deposited in the cell wall the CHT promotes a decrease in stomatal conductance, increasing the leaves resistance to water vapor loss, thus improving the water use in plants to assimilate carbon, and in turn, the biomass production. Another approach to reduce H<sub>2</sub>O through transpiration is the leaves solar reflection increase through the reflective type of antitranspirant action, thus limiting the water vapor loss, providing a leaves evaporative cooling ((EMAM et al., 2014). With this, the transpiration efficiency would be increased without negatively affect the photosynthesis and the harvest agronomic yield, translating into tolerance mechanism under water deficit.

## CONCLUSION

. Chitosan leaf application at the dose of 140 mg/L provided similar responses to maize plants grown under favorable irrigation conditions. The use of chitosan fits as a non-toxic and effective alternative to sustainable agriculture.

## REFERENCES

- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, 116 (2), 651-658, 1998.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods in Enzymology**. 52, 302-310, 1978.
- Chaves, M.M.; Costa, J.M.; Zarrouk, O.; Pinheiros, C.; Lopes, C.M.; Pereira, J.S. (2016). Controlling stomatal aperture in semi-arid regions -The dilemma of saving water or being cool? **Plant Science**, 251, 54-64.
- DZUNG, N. A.; KHANH, V.T.P; DZUNG, T.T. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. **Carbohydrate Polymers**. 84 (2), 751–755, 2011.

EMAM, M. M.; KHATTAB, H. E.; HELAL, N. M.; DERAZ, A. E. Effect of selenium and Silicon on yield quality of rice plant grown under drought Stress. **Australian Journal of Crop Science**, 8 (4), 596-605, 2014.

FENG, W.; LINDNER, H.; ROBBINS, N.E.; DINNENY, J.R. Growing out of Stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. **Plant Cell**, 28 (8), 1769-1782, 2016.

GIANNOPOUTIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59, 309-314, 1977.

HADWIGER, L. A. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid Science or hype. **Plant Science**, 208, 42-49, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.007>

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84, 450-455, 1987.

IRITI, M.; PICCHI, V.; ROSSONI, M.; GOMARASCA, S.; LUDWIG, N.; GARGANO, M.; FAORO, F. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany**, 66 (2), 493-500, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.01.004>

KATIYAR, D., HEMANTARANJAN, A., SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, 20 (1), 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6>

LI, F. J.; DONG, S. C.; LI, F. A system dynamics model for analyzing the eco-agriculture System with policy recommendations. **Ecological Modelling**, 227 (24), 34-45, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2011.12.005>

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. Fisiologia da produção. **A cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo**. Embrapa: Sete Lagoas, Brasil, 2008.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, 22 (5), 867-880, 1981.

PICHYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. **Scientia Horticulture**, 196 (30), 49-65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>

PIRBALOUTI, A.G.; MALEKPOOR, F.; SALIMI, A.; GOLPARVAR, A. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. **Scientia Horticulture**, 201 (15), 114-122, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.031>

RIZZI, V.; FINI, P.; SEMERARO, P.; COSNA, P. Detailed investigation of ROS arisen from chlorophyll a/Chitosan based-biofilm. **Colloids Surfaces B-Biointerfaces**. 142 (1), 239-247, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.062>

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; HEMINGSEN, E.A.; BRADSTREET, E.D. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of National Academy of Science**, 51, 119-125, 1964.

SILVEIRA, J. A. G.; ARAÚJO, S.A.M.; LIMA, J.P.M.S.; VIÉGAS, R. A. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex numularia*. **Environmental and Experimental Botany**. 66 (1) 1-8, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.015>

SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; CASTRO, E. M.; CARNEIRO, N. P.; PADILHA, F. A. JÚNIOR, C.C.G. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. **Plant Growth Regulation**, 73, 205-217, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9881-9>

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative Stress and some antioxidant Systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, 151, 59-66, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, 40, 779-784, 1965.

**ARTIGO 2 - SISTEMA RADICULAR EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS  
SOB APLICAÇÃO DE QUITOSANA EM CONDIÇÕES DE DEFICIT HÍDRICO**

*Artigo redigido conforme norma da Revista Brasileira de Milho e Sorgo*

## **SISTEMA RADICULAR EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS SOB APLICAÇÃO DE QUITOSANA EM CONDIÇÕES DE DEFICIT HÍDRICO**

**RESUMO** - A baixa disponibilidade hídrica caracteriza-se como um estresse abiótico que representa um fator limitante para a produção agrícola. Em virtude das características físicas e químicas da quitosana (CHT), tal químico pode estimular respostas fisiológicas para tolerância ao déficit hídrico. Diante do exposto, o presente estudo, teve como objetivo avaliar o desempenho do sistema radicular, de dois híbridos de milho contrastantes à seca, submetidos a aplicação foliar de quitosana, em condições de casa de vegetação, a fim de induzir tolerância ao déficit hídrico. Nesse sentido, as plantas de milho foram submetidas ao déficit hídrico e aplicação foliar de quitosana ( $140 \text{ mgL}^{-1}$ ) no pré florescimento, em híbridos de milho contrastantes em relação a tolerância ao estresse de seca, tolerante (DKB 390) e sensível (BRS1010). Para tal foram realizadas avaliações do sistema radicular e componentes de produção. As plantas de milho submetidas a aplicação foliar de quitosana na dose de  $140 \text{ mgL}^{-1}$  apresentaram um comportamento específico, em relação aos híbridos, as plantas tolerantes, apresentaram um sistema radicular mais desenvolvido, um rendimento agrônômico expressivo, quando comparado as plantas sensíveis. Provavelmente os resultados foram obtidos devido ao efeito estimulante da CHT no crescimento das plantas, promovendo o desenvolvimento do sistema radicular, contribuindo com um aumento na absorção de água e nutrientes. Sugere-se que a quitosana apresenta potencial para reduzir o efeito nocivo do estresse hídrico, sobre o sistema radicular, sem comprometer negativamente o rendimento agrônômico.

**Palavras-chave:** Biopolímeros, estresse hídrico, WinRHIZO.

**ABSTRACT-** Low water availability as abiotic stress that represents a limiting factor for agricultural production. Due to the physical and chemical characteristics of chitosan (CHT), such a chemical can stimulate physiological responses to tolerance to water deficit. Given the above, the present study had the objective of evaluating the performance of the root system of two hybrids of maize against drought, submitted to foliar application of chitosan under greenhouse conditions, to induce tolerance to the water deficit. In this sense, maize plants introduced to water deficit and foliar application of chitosan ( $140 \text{ mgL}^{-1}$ ) in pre-flowering, in contrasting maize hybrids concerning tolerance to drought stress, tolerant (DKB 390) and sensitive (BRS 1010). For this, root system and production components evaluated. The maize plants submitted to a foliar application of chitosan at  $140 \text{ mgL}^{-1}$  presented a specific behavior,



concerning the hybrids, the tolerant plants presented a more developed root system, an expressive agronomic yield when compared to the sensitive plants. Probably the results were obtained due to the stimulating effect of CHT on plant growth, promoting the development of the root system, contributing with an increase in the absorption of water and nutrients. It suggested that chitosan has the potential to reduce the harmful effect of water stress on the root system without adversely affecting the agronomic yield.

**Keywords:** Biopolymers, water stress, WinRHIZO.

A baixa disponibilidade hídrica caracteriza-se por ser um fator limitante que reduz o crescimento das plantas e a produtividade dos cultivos, sobretudo na cultura do milho (Boyer et al., 2013). A reposição hídrica ao solo por irrigação, na quantidade e no momento oportuno, é decisiva para obter a maximização da produção. Dois dias de estresse hídrico, no florescimento, são suficientes para diminuir o rendimento da cultura em até 20%, enquanto que, quatro a oito dias resultam em uma queda de mais de 50% (Magalhães et al., 2002).

Por conseguinte, faz-se necessário uma maior compreensão dos mecanismos subjacentes à adaptação das plantas às condições de déficit de água, assim como formas alternativas que visam um aumento da tolerância a restrição hídrica. Um importante processo de adaptação é a manutenção do crescimento radicular durante períodos de diminuição da disponibilidade hídrica, o que permite que a planta tenha acesso à água a partir de perfis de solos mais profundos (Zhu et al., 2010). As características das raízes, especialmente relacionadas ao comprimento, área superficial e volume de raiz, tem sido vistas como características críticas para melhorar a adaptação das culturas em condições de baixa disponibilidade hídrica. Nessa situação, é necessário um maior conhecimento de estratégias que visam um aumento a tolerância ao déficit hídrico, influenciando o desenvolvimento do sistema radicular sem comprometer negativamente o rendimento das culturas.

O uso de químicos antitranspirantes, que atuam como bioestimulante é uma estratégia que vem sendo utilizada ativamente (Katiyar et al. 2014). A quitosana (CHT), considerada um bioestimulante, induz respostas fisiológicas para tolerância ao déficit hídrico. Os resultados das últimas décadas têm indicado que esse biopolímero tem potencial para ser desenvolvido como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse, induzindo a tolerância à seca via aumento da defesa contra o estresse oxidativo, sem comprometer o rendimento agrônomico. O efeito estimulante da CHT está relacionado ao crescimento e desenvolvimento das culturas, manutenção dos processos fisiológicos, sobretudo a um aumento na absorção de água e

nutrientes essenciais através do ajuste da pressão osmótica celular. Diante do exposto e visando uma melhoria da tolerância, ao déficit hídrico a presente investigação teve por objetivo avaliar a influência da aplicação foliar de quitosana, no sistema radicular, de plantas de milho, contrastantes em relação a tolerância a restrição hídrica.

### **Material e Métodos**

Híbridos de milho contrastantes para tolerância à seca, DKB390 e BRS1010, tolerante e sensível, respectivamente, foram cultivados sob condições de casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, Minas Gerais (19°28'S, 44°15'08''W, 732m de latitude). Ambos foram cultivados em vasos plásticos contendo 20 dm<sup>3</sup> de Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico, textura média a moderado, retirado de área de platô.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9 e 15 horas), com o auxílio de um sensor de umidade *watermark* (tensiômetro) modelo 200SS – 5'' (IRROMETER, Califórnia – USA), instalado no centro de cada repetição, na profundidade de 20 cm. Estes sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica e foram acoplados a medidores digitais (Watermark meter) da mesma empresa. A reposição hídrica foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água foi repostada 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, feita em função da curva de retenção de água do solo.

### **Imposição dos tratamentos**

Ao atingirem o estágio de pré florescimento, as plantas de milho foram submetidas aos efeitos do déficit hídrico no solo, e a aplicação dos tratamentos. O déficit hídrico foi imposto até o potencial da água no solo atingir aproximadamente o valor de -138kPa (Souza et al., 2014). Os tratamentos foram caracterizados como irrigado, estressado sem aplicação de CHT (estressado) e estressado sob aplicação de CHT (quitosana) na dose 140 mgL<sup>-1</sup>. A dose de CHT utilizada, foi pré determinada em experimentação realizada anteriormente sob condições de casa de vegetação, onde pode-se observar que esta dose proporcionou efeitos benéficos em plantas de milho, submetidas a condições de estresse hídrico. Os tratamentos foram aplicados em ambos os híbridos.

Para o fornecimento das doses de CHT, foi preparada uma solução conforme Dzung et al. (2011), mediante dissolução da CHT em 100 mL de ácido acético 0,5% durante 12h. Devido as características químicas e físicas da CHT e por ser um polímero relativamente insolúvel em água. A solubilidade pode ser alcançada quando ocorre um ajustamento do pH por meio da diluição em ácido acético (Hadwirger, 2013). Em seguida, essa solução foi diluída na concentração correspondente. Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se um pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, (2,15 kgf cm<sup>2</sup>), equipado com bico tipo XR-Teejet 110.02 VS, aplicando-se o equivalente a 120 l ha<sup>-1</sup> de calda.

Todas as medidas cabíveis para evitar deriva das soluções de CHT pulverizadas, para as plantas vizinhas, foram tomadas. A imposição dos tratamentos foi realizada no primeiro dia após a exposição ao estresse hídrico, o qual teve uma duração de 15 dias. Em seguida, o fornecimento de água foi restabelecido e mantido em níveis próximos ao da capacidade de campo. Todas as avaliações do sistema radicular foram realizadas após a colheita dos componentes de produção.

### **Avaliação do sistema radicular**

O Sistema computadorizado WinRHIZO (Pro, Regente Inc. Instr., Canadá) foi utilizado para medir o comprimento, área de superfície e o volume das raízes por classe de diâmetro, da seguinte forma: raízes muito finas ( $\emptyset$  menos do que 0,5 mm), raízes finas ( $> 0,5 \emptyset < 2,0$  mm) e raízes grossas ( $\emptyset > 2,0$  mm) (Magalhães, et al., 2011). Para esta análise, as raízes foram coletadas de quatro repetições por tratamento.

### **Componentes de produção**

Na colheita, a altura da planta, foi medida com auxílio de uma régua milimetrada. Além disso, foram analisados: peso de espiga (EAW), comprimento de espigas (EL), diâmetro de espiga (ED), número de grãos por fileira (NGR), número de grãos por espiga (NGE), índice de colheita (HI) [peso seco do grão/(peso seco da planta+peso seco do grão)\*100, biomassa seca de parte aérea (TDB) (Durães, Magalhães, Oliveira, 2008). A biomassa seca total, foi estimada através da secagem das plantas em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, durante 72h.

### **Análise dos dados**

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o  $\pm$  erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ( $P \leq 0.05$ ), no programa Sisvar versão 4.3 (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

Na presente investigação, pode-se observar que a aplicação de CHT na dose de 140  $\text{mgL}^{-1}$  resultou em comportamentos específicos, em relação aos híbridos. O híbrido sensível apresentou comprimentos total de raízes, comprimento de raízes muito finas, finas e grossas (CRT, CRMF, CRF, CRG) inferiores ao híbrido tolerante (Figura 1). Ao analisar o comportamento do comprimento de raiz, das plantas de milho, do híbrido tolerante (DKB 390), pode-se observar que a aplicação foliar de CHT resultou em um aumento significativo no comprimento das raízes.

Comportamentos similares podem ser observados em relação as outras variáveis, do sistema radicular, analisadas. A aplicação foliar de CHT resultou em uma maior área superficial total das raízes (ASTR), área superficial de raízes muito finas e finas (ASRMF, ASRF), nas plantas de milho tolerantes ao déficit hídrico (DKB 390) (Figura 2). Em relação a área superficial de raízes grossas (ASRG), todos os tratamentos, foram significativamente superiores ao híbrido sensível (BRS 1010).

O volume total de raiz (VTR), o volume de raízes muito finas, finas e grossas (VRMF, VRF, VRG), nas plantas de milho, cultivadas sob condição de restrição hídrica, e aplicação foliar de quitosana, no híbrido tolerante (DKB 390), apresentaram desempenho análogo as demais variáveis do sistema radicular. A aplicação foliar de CHT proporcionou um maior volume de raízes, quando comparado aos demais tratamentos e as plantas sensíveis a condição de déficit hídrico (BRS 1010).

Sob condição de seca, um sistema radicular bem desenvolvido absorve mais água para manter a umidade estável. A aplicação foliar de CHT pode reduzir a inibição das raízes, promovendo efetivamente o desenvolvimento do sistema radicular fortalecendo assim, a capacidade de absorção da água, de modo a aumentar a tolerância à seca. Estes resultados corroboram com aqueles observados em experimentos realizados em mudas de trigo (Zeng e Luo, 2012).

O tamanho, as propriedades e distribuição do sistema radicular, determinam o acesso das plantas à água e, assim, estabelecem limites na tolerância a condição de restrição hídrica.

O sistema radicular das plantas de milho, é composto sobretudo por raízes grossas e finas, as raízes grossas apresentam funções de ancoragem e tipicamente estabelecem a arquitetura geral do sistema radicular, controlando a profundidade e capacidade das plantas em crescer em direção a camadas mais profundas do solo (Henry et al., 2012). As raízes finas são a parte mais ativa do sistema radicular na absorção de água e compreendem a maior parte do comprimento e área de superfície desses sistemas radiculares (Comas et al., 2013). Pode-se constatar que a aplicação foliar de CHT, apresentou influência significativa em todas as variáveis do sistema radicular analisadas, na presente investigação. Justificando assim, a capacidade da CHT em permitir uma maior absorção de nutrientes, água e manutenção do metabolismo fisiológico em condições desfavoráveis de cultivo (Lavinsky et al., 2015).

De acordo com a teoria do equilíbrio funcional, as plantas aumentam a alocação de biomassa para a parte aérea se o ganho de carbono for afetado por recursos limitados acima do solo, como a luz e o CO<sub>2</sub>. Na presença de baixos níveis de recursos subterrâneos, como água e nutrientes, as plantas tendem a aumentar a alocação de biomassa para as raízes (Brouwer, 1962, Pooter e Nagel, 2000). Estas alterações da estrutura do sistema radicular a fim de proporcionar um aumento do ângulo de crescimento das raízes, torna-se uma estratégia de prevenção aos danos causados devido à restrição hídrica, permitindo uma maior exploração das camadas mais profundas do solo, gerando uma melhoria acentuada no rendimento de grãos.

Tais relações justificam os resultados obtidos na presente investigação onde observou-se que o híbrido sensível (BRS 1010), apresentou um sistema radicular maior, em condições sem aplicação de CHT, menor biomassa de parte aérea e uma produção de grãos não significativa (Tabela 1). As plantas tolerantes ao déficit hídrico (DKB 390), sob aplicação de CHT, apresentaram um sistema radicular mais desenvolvido quando comparado aos demais tratamentos. Os resultados encontrados no DKB 390 confirmam maior tolerância em relação ao BRS 1010, onde pode-se observar que as plantas de milho, do híbrido sensível, cultivadas em condição de restrição hídrica, sem aplicação de CHT, não resultaram em uma produção de grãos expressiva (Tabela 1). Constatou-se através dos parâmetros analisados que as plantas de milho cultivadas em CHT 140 mgL<sup>-1</sup> e irrigadas apresentaram respostas semelhantes (Tabela 1).

Provavelmente os resultados foram obtidos devido ao efeito estimulante da CHT no crescimento das plantas, o sistema radicular desenvolvido pode contribuir com um aumento na disponibilidade, absorção de água e nutrientes essenciais através do ajuste da pressão osmótica celular e da redução da acumulação de radicais livres através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Perbalouti et al., 2017, Pichyangkura e Chadchawan, 2015),

proporcionando assim um balanço entre a alocação de fotossimilados, entre a parte aérea e raiz, sem prejudicar o rendimento agronômico.

### Conclusões

A aplicação foliar de quitosana na dose de  $140 \text{ mgL}^{-1}$  apresentou efeitos benéficos no desenvolvimento do sistema radicular em plantas de milho, sob condição de restrição hídrica, sem afetar negativamente o rendimento agronômico da cultura.

Devido as suas propriedades biológicas a quitosana pode ser considerada como um composto bioestimulante promissor para uso na agricultura.

### Referências

- BOYER, J.S.; BYRNE, P.; CASSMAN, K.G.; COOPER, M.; DELMER, D.; GREENE, T. GRUIS, F. The U.S. drought of 2012 in perspective: a call to action. **Global Food Security**, Japão, v.2, n.3, p. 139-143, 2013.
- BROUWER, R. Distribution of dry matter in the plant. **Journal of Agriculture Science**, Netherlands, v.10, p.399-408, 2000.
- COMAS, L.H.; BECKER, S.R.; CRUZ, V.M.R.; BYRNE, P.F.; DIERIG, D. Root traist contributing to plant productivity under drought. **Frontier of Plant Science**, v.4, p.442, 2013.
- DURÃES, F.O.M.; MAGALHÃES, P.C.; OLIVEIRA, A.C. Índice de colheita genético e as possibilidades da genética fisiológica para melhoramento do rendimento do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, p.33-40, 2008.
- DZUNG, N. A.; KHAN, T. P.; DZUNG, T. T. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 751–755, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

HADWIGER, L. A. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid Science or hype. **Plant Science**, 208, 42-49, 2013.

HENRY, A.; CAL, A.F.; BATOTO, T.C.; TORRES, R.O.; SERRAJ, R. Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought. **Journal of Experimental Botanic**, Lancaster, v.63, n.13, p.4751-63, 2012.

KATIYAR, D., HEMANTARANJAN, A., SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, India, v. 20, p. 1-9, 215.

LAVINSKY, A.O.; MAGALHÃES, P.C.; ÁVILA, R.G.; DINIZ, M.M.; SOUZA, T.C. Partitioning between primary and secondary metabolism of carbon allocated to roots in four maize genotypes under water deficit and its effects on productivity. **The Crop Journal**, China, v.3, p.379-386, 2015.

MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; CANTÃO, F.R. Early evaluation of root morphology of maize genotypes under phosphorus deficiency. **Plant Cell Environmental**, v.57, p.135-138, 2011.

PICHYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. **Scientia Horticulturae**, Georgia, v.196, p.49-65, 2015.

PIRBALOUTI, A.G.; MALEKPOOR, F.; SALIMI, A.; GOLPARVAR, A. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. **Scientia horticulturae**, v, 201, p.114-122, 2017.

POOTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, Rockville, v.27, n.12, p.1191-1191, 2000.

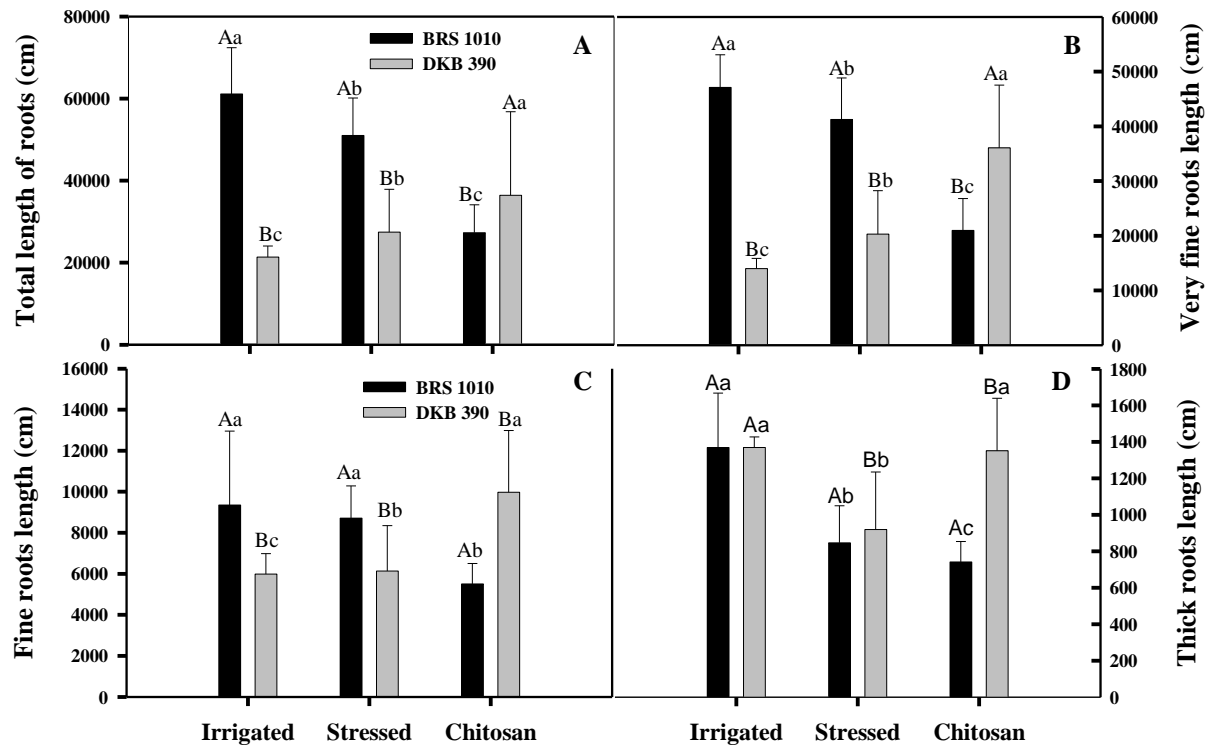
SCOTT, A. J., KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v.30, n.3, 507-512, 1974.

SOUZA, T. C.;MAGALHÃES, P. C.;CASTRO, E. M.; CARNEIRO, N. P.; PADILHA, F. A. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. **Plant Growth Regulation**, China v.73, p.205-217, 2014.

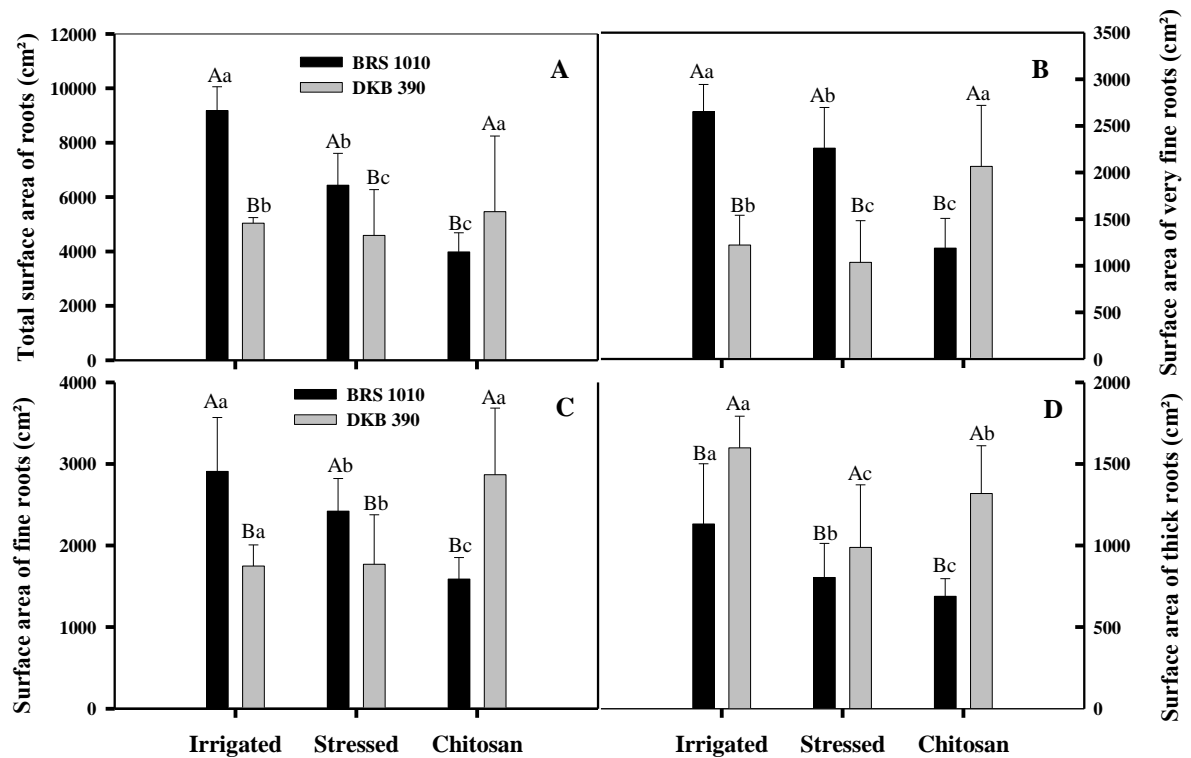
ZENG, D.; LUO,X. Physiological Effects of Chitosan Coating on Wheat Growth and Activities of Protective Enzyme with Drought Tolerance. **Journal of Soil Science**, Hubei Province, v.2, p.282-288, 2012.

ZHU, J.; BROWN, K.M.; LYNCH, P.J. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Environmental*, v.33, p.740-749, 2010.

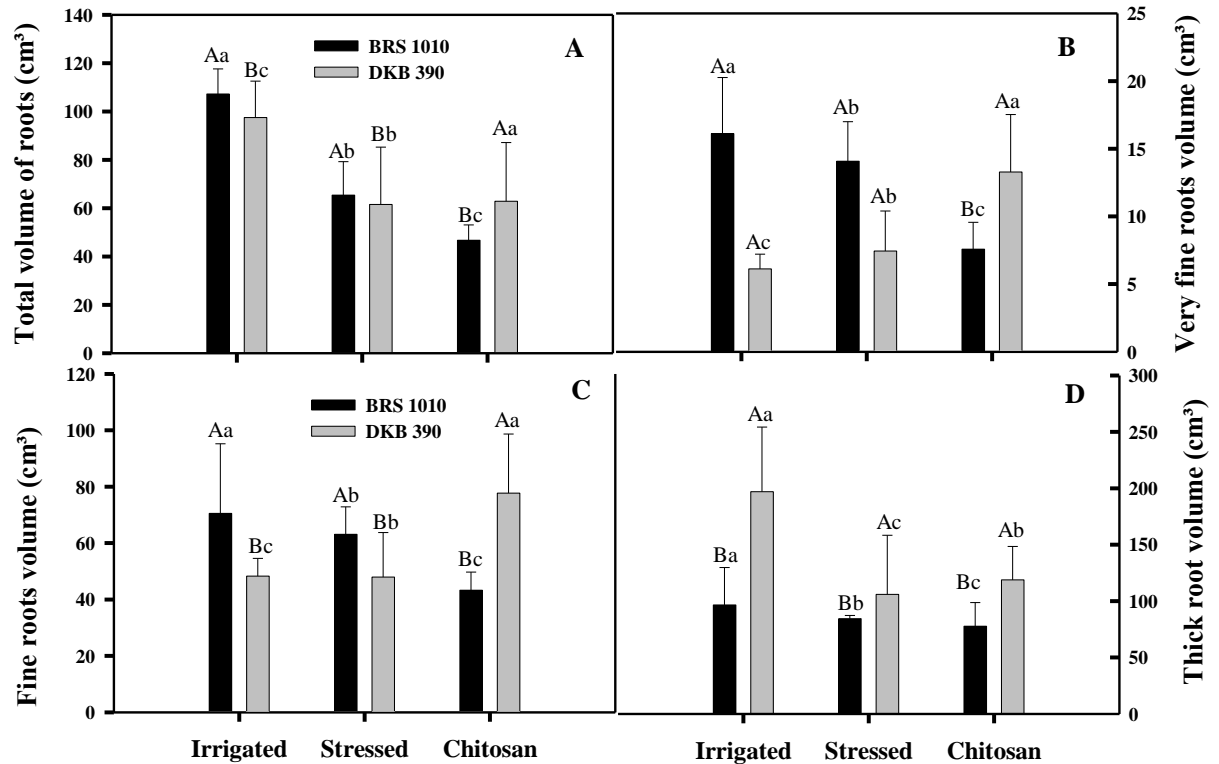




**FIGURE 1.** A: Comprimento total de raízes (cm), B: comprimento de raízes muito finas (cm) (CRMF), C: comprimento de raízes finas (cm) (CRF), D: comprimento de raízes grossas (cm) (CRG) submetidas a diferentes tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).



**FIGURE 2.** A: Área Superficial total de raízes (cm<sup>2</sup>), B: área superficial de raízes muito finas (cm<sup>2</sup>) (ASRMF), C: área superficial de raízes finas (cm<sup>2</sup>) (ASRF), D: área superficial de raízes grossas (cm<sup>2</sup>) (ASRG) submetidas a diferentes tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. . Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).



**FIGURE 3.** A: Volume total de raízes (cm<sup>3</sup>), B: volume de raízes muito finas (cm<sup>3</sup>) (VRMF), C: volume superficial de raízes finas (cm<sup>3</sup>) (VSRF), D: volume de raízes grossas (cm<sup>3</sup>) (VSRG) submetidas a diferentes tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).

**TABELA 1.** Características de produção em híbridos de milho contrastantes para a tolerância à seca cultivadas sob diferentes tratamentos.

Parameters	Tolerant DKB 390			Sensitive BRS 1010		
	Irrigated	Chitosan	Stressed	Irrigated	Chitosan	Stressed
	<b>PH</b>	2,47 Aa	2,46 Aa	2,02 Ab	2,18 Ba	2,19 Ba
<b>ED</b>	49,10 Aa	49 Aa	35 Ab	43,31 Ba	43,1 Ba	*
<b>NGR</b>	26 Aa	26,8 Aa	10,8 Ab	17,2 Ba	16,9 Ba	*
<b>NGE</b>	15,80 Aa	15,8 Aa	8,4 Ab	13,2 Ba	13,1 Ba	*
<b>TDB</b>	175,84 Aa	173,9 Aa	91 Ab	129 Ba	128,1 Ba	37,5
<b>DGB</b>	61,89 Aa	61,11 Aa	28,2 Ab	25,3 Ba	25 Ba	*
<b>HI</b>	35% Aa	35% Aa	30% Ab	31 % Ba	31 Bb	*

Híbrido tolerante DKB 390, sensível BRS 1010 PH: altura da planta (m); ED: diâmetros da espiga (mm); NGR: número de grãos por fileira; NRE: número de fileiras por espiga; TDB: biomassa seca total (g); DGB: biomassa de grãos total (g); HI: índice de colheita ( $\text{g.g}^{-1}$ ). \* não houve produção.

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os genótipos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ )

**ARTIGO 3 - APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA APRESENTA POTENCIAL  
PARA INDUZIR TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO**

**Artigo redigido conforme norma da Revista *Field Crops Research***

## **APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA APRESENTA POTENCIAL PARA INDUZIR TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO**

### **Resumo**

Diante da elevação da temperatura do ar, juntamente com as crescentes limitações dos recursos hídricos, faz-se necessário a adoção de estratégias que visam um aumento da tolerância as condições de restrição hídrica. Os resultados das últimas décadas têm indicado que a quitosana (CHT) tem potencial para ser desenvolvido como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse. Diante do exposto a presente investigação busca elucidar a viabilidade do uso da quitosana na indução a tolerância ao déficit hídrico em diferentes híbridos de milho. A fim de compreender o comportamento na indução da tolerância a restrição hídrica, plantas de milho foram cultivadas em campo e submetidas ao déficit hídrico e aplicação foliar de quitosana ( $140 \text{ mgL}^{-1}$ ) no pré florescimento. Foram realizadas avaliações morfofisiológicas ao longo do período de trinta dias de estresse e componentes de produção no final do ciclo. As plantas de milho submetidas a aplicação de quitosana apresentaram um comportamento específico, apresentando respostas similares as plantas sob condição favorável de irrigação. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências que a aplicação foliar de quitosana, sob condições de restrição hídrica, apresenta potencial em melhorar a resiliência das plantas de milho, às perturbações ambientais relacionadas a falta de água.

**Palavras-chave:** Estresse hídrico, seca, trocas gasosas

### **Abstract**

Given the increase in air temperature, together with the increasing limitations of water resources, it is necessary to adopt strategies that aim to increase tolerance to water restriction conditions. The results of the last decades have indicated that chitosan (CHT) has the potential to be developed as an antiperspirant in agricultural stress situations. Given the above, the present investigation seeks to elucidate the feasibility of the use of chitosan in the induction of tolerance to water deficit in different hybrids of maize. Understand the behavior in the introduction of tolerance to water restriction, the maize plants were cultivated in the field and submitted to water deficit and foliar application of chitosan ( $140 \text{ mgL}^{-1}$ ) in pre-flowering. Morphophysiological evaluations were carried out over the period of thirty days of stress and production components at the end of the cycle. Maize plants submitted to chitosan application showed a specific behavior, presenting similar responses to plants under favourable irrigation conditions. The results obtained in the present study provide evidence that the foliar application

of chitosan, under water restriction conditions, has the potential to improve the resilience of corn plants to environmental disturbances related to lack of water.

**Keywords:** Water stress, dry, gas exchange.

## Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes para a economia mundial. Em função das características edafoclimáticas, as principais épocas de semeadura variam de acordo com a região geográfica. Em escala global, a água disponível para as culturas agrícolas é limitada, cobrindo apenas 20% da área total utilizada para a agricultura, sendo que para obter a produção máxima, com período médio de amadurecimento, o milho necessita de 380 a 550 mm de água (Boaretto et al., 2014). Diante da elevação da temperatura do ar, juntamente com as crescentes limitações dos recursos hídricos, faz-se necessário a adoção de estratégias que visam um aumento da tolerância as condições de restrição hídrica.

Diversos químicos têm sido utilizados como antitranspirantes em plantas sob condição de déficit hídrico. Entretanto, ao reduzirem as trocas gasosas, tais antitranspirantes inibem não apenas a perda de vapor d'água pelas folhas, como também a fotossíntese, comprometendo o crescimento e rendimento dos cultivos (Tworkoski et al., 2011). A quitosana (CHT), considerada um bioestimulante, apresenta eficiência e eficácia aprimoradas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta permeabilidade, custo-benefício e não toxicidade (Dzung et al., 2011). A diversidade potencial de rotas de ação desse biopolímero pode ser ilimitada devido a uniformidade de cargas positivas ao longo de seu comprimento permitindo assim, uma vasta interação com as demais moléculas na matriz celular (Katiyar et al. 2015).

O papel da quitosana como antitranspirante na agricultura ainda não foi completamente elucidado, mas é possível que ao serem depositados na parede celular tais químicos criem uma barreira física que dificulta a perda de vapor de água, sem necessidade de aumento nos níveis de ABA para diminuição da condutância estomática. Com isso, a eficiência de transpiração seria aumentada sem afetar negativamente a fotossíntese e o rendimento agrônômico dos cultivos, traduzindo-se em um mecanismo de tolerância sob déficit hídrico (Jardin, 2015). De fato, diversos trabalhos evidenciam os efeitos benéficos da CHT no rendimento de diversas culturas sob condições de baixa disponibilidade de água (Katiyar et al., 2015; Emam et al., 2014).

Embora haja muitas pesquisas sobre a influência da aplicação da quitosana em diferentes culturas agrícolas, cultivadas em casa de vegetação, pouco se sabe como a aplicação foliar desse bioestimulante afetaria o crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas, sob condição de campo, onde se faz necessário ressaltar a interação entre os estresses ambientais, gerando impactos que podem diferir dos resultados obtidos em situações controladas. Portanto, o objetivo da presente investigação foi determinar sob condições de campo, a capacidade da



quitosana em aliviar os efeitos deletérios do estresse hídrico em híbridos de milho, contrastantes em relação a tolerância a seca.

## **Material e métodos**

### *Material Vegetal e condições de crescimento*

Foram utilizados dois híbridos contrastantes ao estresse de seca, DKB 390 e BRS 1010, tolerante e sensível, respectivamente. O ensaio foi conduzido em condições de campo na estação experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, localizada a 19°28' de latitude S, longitude 44°15'08" W e 732 m de altitude. A precipitação pluviométrica foi praticamente zero durante a realização do ensaio (Figura 2). O experimento foi realizado em solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico Argiloso, de fertilidade média, as adubações de base e cobertura foram realizadas de acordo com a análise do solo, seguindo recomendação para o milho no Estado de Minas Gerais. As plantas foram irrigadas regularmente mantendo uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse. Todos os tratamentos fitossanitários necessários para a cultura foram aplicados.

O teor de água no solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9 e 15 horas), com o auxílio de um sensor de umidade *watermark* (tensiômetro) modelo 200SS – 5' (IRROMETER, Califórnia – USA), instalado no centro das parcelas de cada repetição, na profundidade de 20 cm. Estes sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica e foram acoplados a medidores digitais (Watermark meter) da mesma empresa. A reposição hídrica foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água foi repostada 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, feita em função da curva de retenção de água do solo.

Ao atingirem o estágio de pré florescimento, as plantas de milho foram submetidas aos efeitos do déficit hídrico no solo, e a aplicação dos tratamentos. Essa condição de déficit hídrico foi imposta até o potencial da água no solo atingir aproximadamente o valor de -138kPa (Souza et al., 2014). Os tratamentos utilizados foram os seguintes: irrigado, estressado com aplicação de quitosana (chitosana), estressado sem aplicação de quitosana (estressado), sendo aplicados em ambos os híbridos. Em condições irrigadas, a reposição hídrica foi realizada diariamente até o solo atingir a umidade próxima a CC, enquanto que, nos tratamentos estressados não houve reposição hídrica. A dose de CHT utilizada foi de 140 mgL<sup>-1</sup>, pré determinada em experimentação realizada anteriormente sob condições de casa de vegetação, onde observou-se que esta dose proporcionou efeitos benéficos em plantas de milho, submetidas a condições de estresse hídrico.

Para o fornecimento da dose de CHT foi preparada uma solução cuja solubilidade foi alcançada através do ajustamento do pH (pH 6). Essa característica é crítica na avaliação das propriedades biológicas desse polímero, permitindo sua solubilidade, uma vez que a transferência de CHT insolúvel diminuiria as repostas celulares (Hadwirger, 2013). Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se um pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub> (2,15 kgf cm<sup>-2</sup>), equipado com bico tipo XR-Teejet 110.02 VS, aplicando-se o equivalente a 120 l ha<sup>-1</sup> de calda.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com seis tratamentos (DKB 390 irrigado, estressado e quitosana, BRS 1010 irrigado, estressado e quitosana) e quatro repetições. As dimensões da parcela experimental foram de 10m x 4,2m; com 6 fileiras de plantio, espaçadas de 0,70m, perfazendo uma área total de 42 m<sup>2</sup>. As duas fileiras externas foram utilizadas como bordadura, enquanto que as duas centrais para a coleta de dados de produtividade e as duas intermediárias para as avaliações morfofisiológicas que foram realizadas no primeiro, décimo, vigésimo e trigésimo dia após a imposição do estresse e aplicação dos tratamentos.

#### *Características morfofisiológicas*

O teor relativo de clorofila (unidades de *spad*) foi determinado em folhas completamente expandidas acima da espiga, utilizando um clorofilometro (*Model SPAD 502*, Minolta, Japan) e 10 leituras por planta foram realizadas por repetição.

O potencial hídrico médio foliar (midday,  $\Psi_{md}$ ) foi determinado as 11h através de uma câmara de pressão do tipo Scholander (Soil Moisture Equipment Corp., Modelo 3005, Santa Barbara CA, USA) em quatro folhas totalmente expandidas acima da espiga por repetição.

A condutância estomática foliar foi obtida através de um porômetro (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). Cinco leituras por folha por repetição foram feitas entre 8 e 10h da manhã nas folhas totalmente expandidas acima da espiga.

A eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) foi determinada em folhas adaptadas ao escuro por meio de um fluorímetro (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments King's Lynn, UK). O condicionamento das folhas foi realizado com a ajuda de cliques foliares, e a intensidade de luz no sensor foi de 60% da capacidade total do aparelho, durante cinco segundos em cada leitura. Todas as leituras também foram realizadas nas folhas completamente expandidas acima da espiga, no período da manhã, entre as 8 e as 10 horas.

O intervalo entre o florescimento masculino e feminino (ASI) foi calculado como a diferença, em dias, entre o florescimento masculino e feminino. Os florescimentos masculino e

feminino foram obtidos como número de dias do plantio até que 50% das plantas de cada parcela tivessem, respectivamente antese e estilo-estigmas visíveis.

A área foliar (LA) foi determinada com um medidor de área foliar (LI-COR).

#### *Componentes de produção*

Na colheita os seguintes dados foram analisados: biomassa seca de parte aérea (TDB), comprimento de espigas (EL), diâmetro de espiga (ED), número de grãos por fileira (NGR), número de grãos por espiga (NGE), peso de espiga (EAW), peso de 100 grãos (W100) e rendimento de grãos (RY), os quais foram determinados ajustando-se a umidade para 13% de umidade. Foi calculado também o índice de colheita (HI) [peso seco do grão(peso seco da planta+peso seco do grão)\*100, (Magalhães e Durães, 2008).

#### *Análise dos dados*

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o  $\pm$  erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ( $P \leq 0.05$ ), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

## **Resultados**

#### *Monitoramento da umidade do solo*

A figura 1 ilustra a tensão de água no solo em todos os tratamentos nos 30 primeiros dias, após o estágio de pré florescimento, tanto no híbrido DKB 390 quanto no BRS 1010. Observou-se que os valores de tensão de água no solo variaram entre -139 a -199 kPa, nos tratamentos estressado e quitosana, indicando umidade do solo características de estresse de seca. No tratamento irrigado os valores de tensão de água do solo variaram menos e tiveram médias mais próximas da capacidade de campo entre -18 a -50 kPa.

#### *Monitoramento das condições meteorológicas*

As condições meteorológicas, ao longo do período de todo ensaio, estão expressas na figura 2. Pode-se observar que, nos dias de estresse e aplicação dos tratamentos, entre os meses de junho e julho a precipitação pluviométrica foi praticamente zero. As temperaturas máximas permaneceram entre 20 e 25°C, em julho esse índice apresentou a maior elevação. As temperaturas mínimas variaram entre 18 e 21°C.

#### *Características morfofisiológicas*

A aplicação foliar de CHT, resultou em uma influência significativamente positiva no índice de clorofila SPAD, em ambos os híbridos, ao serem comparados aos tratamentos sob

condições de déficit hídrico sem aplicação de quitosana (Figura 3). Uma comparação ao longo do tempo, observou-se um declínio desse índice, independente dos tratamentos.

Os tratamentos irrigados e os estressados, sob aplicação de quitosana, apresentaram menores valores de potencial hídrico médio foliar ( $\Psi_{md}$ ) quando comparados aos tratamentos estressados sem aplicação desse biopolímero. Ao longo dos períodos de avaliações, observou-se um aumento deste parâmetro, independente do tratamento. Contudo o DKB 390 (tolerante) apresentou melhor status hídrico do que o BRS 1010 (sensível) (Figura 4).

Em relação a condutância estomática ( $g_s$ ), as reduções desse parâmetro foram mais pronunciadas nos tratamentos estressados, sem aplicação de quitosana, no híbrido sensível (Figura 5). Os tratamentos irrigados, independente do híbrido e do tempo de avaliação, apresentaram valores superiores de condutância estomática. Ao longo dos dias de avaliações, pode-se observar o mesmo comportamento, onde as plantas sob condições de estresse com aplicação de quitosana, apresentaram maior condutância estomática quando comparado ao tratamento estressado, sem aplicação do biopolímero.

Uma significativa diminuição na relação  $F_v/F_m$  (eficiência fotoquímica máxima), foi verificada em ambos os híbridos, porém, de forma mais acentuada no BRS 1010, nos tratamentos sob condição de restrição hídrica, sem aplicação de quitosana, quando comparado aos demais tratamentos, ao longo dos dias de avaliações (Figura 6). Ao analisar a primeira avaliação realizada (1DAA) não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A partir da segunda avaliação as diferenças ficaram evidentes, observando uma queda dessa variável ao longo dos períodos de avaliações. O tratamento sob restrição hídrica, sem aplicação da quitosana, independente do híbrido, apresentou uma menor eficiência quântica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ). A partir do 10 DAA os danos ao fotossistema II começaram a ficar evidentes nos tratamentos estressados porém de forma mais acentuada nos tratamentos sem aplicação de quitosana,

Ao analisar o intervalo de florescimento (ASI) (Tabela 1), pode-se constatar que as plantas de milho em condição de estresse, sob aplicação de CHT, apresentaram um menor intervalo entre a emissão do pendão e dos estilo-estigmas na espiga, levando a uma melhor sincronização, quando comparadas as plantas sem aplicação deste biopolímero.

Os efeitos do déficit hídrico ficaram evidentes ao analisar a área foliar. Os tratamentos estressados, sem aplicação de quitosana, independente do híbridos, apresentaram uma redução desse parâmetro.

*Componentes de produção*

O efeito do estresse causado pela falta de água foram evidenciados entre as condições estressado, estressado com aplicação de CHT e irrigado, para os atributos de produção (Tabela 2). Constatou-se através dos parâmetros analisados que as plantas estressadas sob aplicação foliar de CHT, apresentaram resultados negativos em relação as plantas sob condição de déficit hídrico, sem aplicação do biopolímero.

Houve uma diminuição gradativa do diâmetro de espigas (ED), número de grãos por espiga (NGE) e peso de 100 grãos (W100), onde os tratamentos estressados sem aplicação de quitosana apresentaram valores inferiores, este comportamento evidente em ambos os híbridos. Houve uma diminuição do comprimento de espiga (EL) e número de grãos por fileira (NGR) nos tratamentos estressados, sem aplicação de quitosana, independente do híbrido. O rendimento de grãos do híbrido tolerante (DKB 390), foi superior ao encontrado nos híbridos sensível (BRS1010), aplicação foliar de CHT, independente do híbrido, resultou em um maior rendimento quando comparado aos híbridos sob condição de estresse, sem aplicação desse biopolímero. Ao analisar o índice de colheita observou-se que os tratamentos estressados, sob aplicação de quitosana, independente do híbrido, apresentaram valores significativamente mais elevados quando comparados aos tratamentos estressados, sem aplicação desse biopolímero.

## **Discussão**

Estudos que envolvem estresse hídrico, devem apresentar um monitoramento diário da umidade do solo. Na presente investigação foram observados que durante os 30 dias de restrição hídrica, a umidade do solo resultou na presença de estresse, o qual pode ser descrito como moderado nos primeiros dias e severo nos últimos (Bettaie et al., 2011). As diferenças observadas entre os híbridos estão relacionadas as suas características genéticas, as quais permitem que esses sejam caracterizados como tolerante ou sensível a condição de restrição hídrica. Pode-se verificar que na estação experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG existem condições propícias para experimentação com seca devido à ausência (ou baixa) precipitação e altas temperaturas, durante o período de condução da pesquisa.

Os resultados obtidos no índice de clorofila SPAD, estão relacionados ao fato que sob condições de restrição hídrica a diminuição dessa variável é um fenômeno comumente observado (Pirbalouti et al., 2017). Esse resultado pode ser atribuído à redução da síntese dos principais complexos proteicos de pigmentos, que protegem o aparelho fotossintético (Nikolaeva et al., 2010). A CHT, assemelha-se a celulose, a única diferença está relacionada ao grupo amina (-NH<sub>2</sub>) em vez do grupo hidroxila (-OH) encontrado na celulose. No entanto, ao contrário da fibra vegetal, a CHT possui cargas iônicas positivas, o que lhe confere a capacidade

de ligar-se quimicamente com macromoléculas carregadas negativamente (Katiyar et al. 2015). Tal característica química sugere que possa ocorrer uma interação entre a clorofila e CHT através do seu grupo amino protonado, corroborando assim com a manutenção do índice de clorofila SPAD observados na presente investigação (Rizzi et al., 2016). Além disso, o déficit hídrico causa reduções no turgor e volumes celulares, essas reduções estão associadas à desidratação celular e ao potencial hídrico do apoplasto, que vai se tornando mais negativo que o do simplasto, inibindo a formação das protoclorofilas, afetando diretamente a síntese de clorofilas e conseqüentemente a taxa fotossintética. A manutenção do potencial hídrico foliar, proporcionado pela aplicação de quitosana, pode estar relacionada a capacidade deste biopolímero em interagir com diferentes componentes celulares.

Na presente experimentação a aplicação foliar de quitosana proporcionou uma redução da condutância estomática, provavelmente o resultado obtido, relaciona-se a atuação desse bioestimulante como antitranspirante, passíveis de controlar a transpiração sem comprometer negativamente o rendimento fotossintético dos cultivos (Emam et al., 2014). Esse biopolímero tende a aumentar a resistência das folhas a perda de vapor d'água melhorando assim, o uso da água nas folhas para assimilar o carbono, e por sua vez, a produção de biomassa, traduzindo-se em um mecanismo de tolerância sob déficit hídrico, corroborando com os resultados obtidos em outras pesquisas (Li et al, 2008, Ma et al., 2014). Importante ressaltar que a condutância estomática e potencial hídrico ( $g_s$  e  $\Psi_{md}$ ) estão intimamente ligadas, porque um maior status hídrico pode favorecer uma maior condutância estomática levando a um fluxo de  $CO_2$  e a um resfriamento da folha pela transpiração (Mutava et al., 2011).

Uma significativa diminuição na relação  $F_v/F_m$  tende a ocorrer em plantas sob condição de restrição hídrica. Com o aumento do déficit hídrico as folhas murcham devido a diminuição da condutância estomática, a fotossíntese decresce e a atividade fotoquímica é perdida (danos no fotossistema) devido ao excesso de energia. Assim, a relação  $F_v/F_m$  é um dos principais parâmetros utilizados para as avaliações dos danos no sistema fotossintético, uma vez que a eficiência quântica máxima do fotossistema II indica quando todos os centros de reação estão abertos (Baker e Rosenqvist, 2004). A aplicação foliar de CHT em plantas de milho, sob condições de estresse, resultou em uma manutenção na relação  $F_v/F_m$ , quando comparado aos tratamentos nas mesmas condições, sem aplicação desse biopolímero, indicando assim, que a quitosana fez com que os transportes fotossintéticos de elétrons não fossem afetados, assim como provavelmente não ocorreu uma fotoinibição nos complexos do fotossistema II (PSII). É proposto que os receptores de CHT estejam presentes na membrana plasmática, no entanto, através de uma cascata de sinalização, o cloroplasto seja a organela primária de ação da CHT

(Hadwiger, 2013), justificando assim, a amenização da fotoinibição dos complexos do fotossistema II, quando comparados aos tratamentos sem aplicação de quitosana.

O estresse hídrico na fase que antecede o florescimento em plantas de milho tende a reduzir o fluxo de fotoassimilados para os órgãos reprodutivos em formação, retardando a emissão dos estilo-estigmas na espiga, levando a uma não coincidência entre a emissão destes e do pendão (Dubey et al., 2010). Desta maneira pode-se justificar, o aumento do intervalo entre o florescimento masculino e feminino em milho (ASI) observado na presente investigação. Ao analisar o ASI nas plantas de milho, sob aplicação da CHT, observou-se um menor intervalo de florescimento quando comparado as plantas sob restrição hídrica sem aplicação desse biopolímero. Provavelmente a influência da CHT no florescimento possa estar relacionada ao fato que este biopolímero tende a não influenciar negativamente as taxas fotossintéticas, permitindo assim, que ocorra a translocação dos fotoassimilados (Rizzi et al., 2016).

Um dos efeitos mais comuns da restrição hídrica, nas plantas de milho, é a redução no crescimento e desenvolvimento devido a cessação da expansão celular. A diminuição da perda de água é um mecanismo fisiológico que é controlado parcial ou totalmente pela diminuição da condutância estomática, culminando em uma mudança no estado hídrico da folha, que está diretamente relacionado à assimilação do carbono e às taxas fotossintéticas (Benesova et al., 2012), justificando assim, a menor área foliar observada nas plantas sob condição de estresse, sem aplicação de quitosana. Devido as interações carga-carga entre os grupos amina da CHT, carregados positivamente, e os fosfolipídios carregados negativamente, estes promovem um sinal que levará a ativação de vias metabólicas que estão diretamente relacionadas a mecanismos de manutenção da homeostase celular. Além disso, o efeito estimulante da CHT no crescimento das plantas pode ser atribuído a um aumento na disponibilidade, absorção de água e nutrientes essenciais através do ajuste da pressão osmótica celular e da redução da acumulação de radicais livres através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Perbalouti et al., 2017, Pichyangkura e Chadchawan, 2015), influenciando diretamente a área foliar e justificando os resultados obtidos na presente investigação.

É marcante o efeito do estresse causado pela falta de água nos atributos de produção. As diferenças entre as condições estressada com e sem aplicação de quitosana e irrigada, evidenciadas neste trabalho podem ser justificadas pelas implicações obtidas em todos os parâmetros analisados. Ao interagir os resultados alcançados, ao longo do experimento, em relação as características morfofisiológicas e os componentes de produção, pode-se observar que a aplicação foliar de quitosana, em plantas de milho, sob condição de estresse hídrico,

tende a aumentar a resiliência das plantas sob condições desfavoráveis de irrigação. Provavelmente a quitosana permite uma maior alocação de fotoassimilados para a espiga durante seu ciclo de vida, corroborando assim, com a manutenção dos componentes de produção avaliados e principalmente ao aumento do índice de colheita (HI), quando comparados aos tratamentos estressados, sem aplicação de quitosana. Importante ressaltar que as diferenças observadas entre os híbridos estão relacionadas principalmente as suas características genéticas, as quais permitem que esses sejam caracterizados como tolerante ou sensível a condição de restrição hídrica.

### **Conclusões**

A aplicação foliar de quitosana, sob restrição hídrica, apresenta potencial em melhorar a resiliência das plantas de milho, às perturbações ambientais por falta de água. As plantas de milho submetidas a aplicação foliar de CHT na dose de  $140 \text{ mgL}^{-1}$  resultaram em respostas morfofisiológicas positivas quando comparados aos tratamentos sob condição de restrição hídrica sem a aplicação desse biopolímero, as quais favoreceram sua sobrevivência em ambientes com deficiência hídrica resultando em maior produtividade. Esses resultados sugerem que a quitosana apresenta um eficaz potencial anti transpirante para conservar o uso da água na agricultura.

### **Agradecimentos**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Referências**

Benesova, M. et al. 2012. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? PLoS One, San Francisco, v.7, n. 6, e38017



Bettaie I, Hamrouni- Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant* 33, 1103–1111, 2011.

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.

Dubey, L., Prasanna, B.M., Hossain, F., Verma, D.K., Ramesh, B., 2010. Phenotypic evaluation of a set selected exotic maize inbred lines for drought stress tolerance. *Indian J. Genet. Plant Breeding* 70, 355–362.

Dzung, N. A.; Khan, T. P.; Dzung, T. T. 2011. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. 2011. *Carbohydrate Polymers.* 84, 751–755.

Emam, M. M.; et al. 2014. Effect of selenium and silicon on yield quality of rice plant grown under drought stress. *Australian Journal of Crop Science.* 8, 596-605.

Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042. Doi: 10.1590/S1413-70542011000600001

Iriti, M. et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany* v.66, p.493-500, 2009.

Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B. 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology.* 20, 1-9.

Li, Y., Sperry, J.S., Shao, M., 2009. Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ. Exp. Bot.* 66, 341–346.

Ma, L. J. et al. Germination and physiological response of wheat (*Triticum aestivum*) to pre-soaking with oligochitosan. *International Journal of Agricultural Biology*, v,16 ,p. 766–770, 2014.

Mutava, R.N., Prasad, P.V.V., Tuinstra, M.R., Kofoid, K.D., Yu, J., 2011. Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. *Field Crop Res.* 123, 10–18.

Magalhães, P.C.; Durães, F.O.M. *Fisiologia da produção*. 2008. A cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo. 3, 64-87.

Pirbalouti, A.G.; Malekpoor, F.; Salimi, A.; Golparvar, A. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *Scientia horticulturae*. V.201, p.114-122, 2017.

Scott, A. J., Knott, M. A. (1974). Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30 (3), 507-512. Doi: 10.2307/2529204

Souza, T. C.; Magalhães, P. C.; Castro, E. M.; Carneiro, N. P.; Padilha, F. A. ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. *Plant Growth Regulation* 73: 205-217, 2014.

Souza, T.C., Magalhães, P.C., Pereira, F.J., Castro, E.M., Parentoni, S. N., 2011. Morphophysiology and maize grain yield under periodic soil flooding in successive selection cycles. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1877–1885.

Souza, T.C., Magalhães, P.C., Pereira, F.P., Castro, E.M., Silva Junior, J.M., Parentoni, S.N., 2010. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 45, 16–24.

Rizzi, V.; Fini, P.; Semeraro, P.; Cosna, P. Detailed investigation of ROS arisen from chlorophyll a/Chitosan based-biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. V.142, p.239-247, 2016

Nikolaeva, M.K., Maevskaya, S.N., Shugaev, A.C., Bukhov, N.G. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Journal Plant Physiology*. V. 57, P.87-95, 2010.

Hadwiger, L.A. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid Science or hype. *Plant Science*, v.208, p. 42-49, 2013.

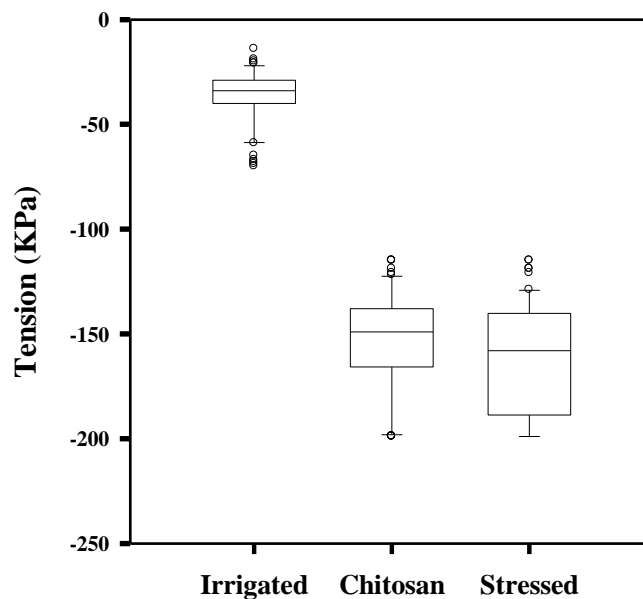
Pichyangkura, R. and Chadchawan, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Science Horticulture*, v.196, p.49-65, 2015.

Jardin, P. *Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation*, Plant microtechnique. 2.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940, 300p, 2015.

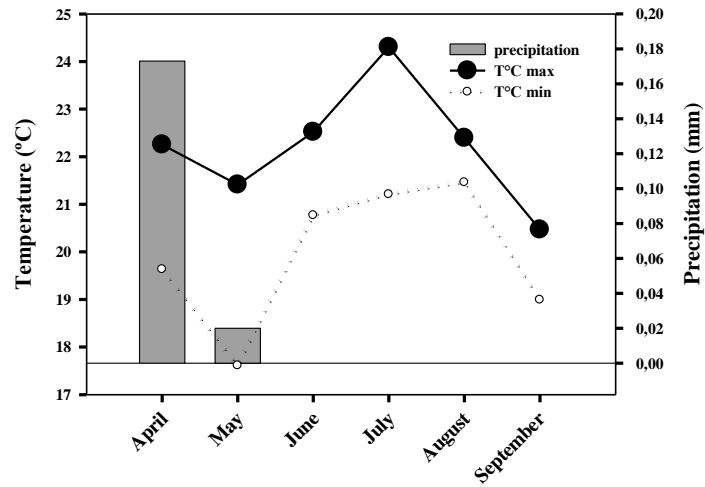
COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 3 - Safra 2015/16, n 5 - Quinto levantamento, fevereiro 2017.

Cruz, J. C.; Garcia, J. C.; Pereira Filho, I. A.; Simão, E. P. Safrinha deve superar a safra de verão. *Revista Campo & Negócio*. N. 127, 24-29, 2013.

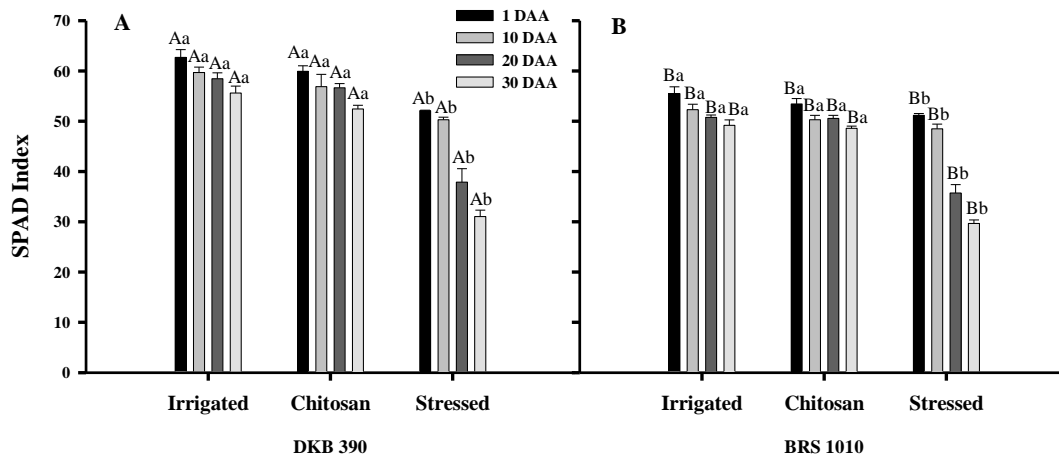
Twokoski, T.; Wisniewski, M.; Artlip, T. Application of BABA and s-ABA for drought resistance in apple. *Journal of Applied Horticulture* 13: 85-90, 2011



**Fig. 1** Valores médios da tensão da água no solo medidos com tensiômetros Watermark durante o período de avaliações.

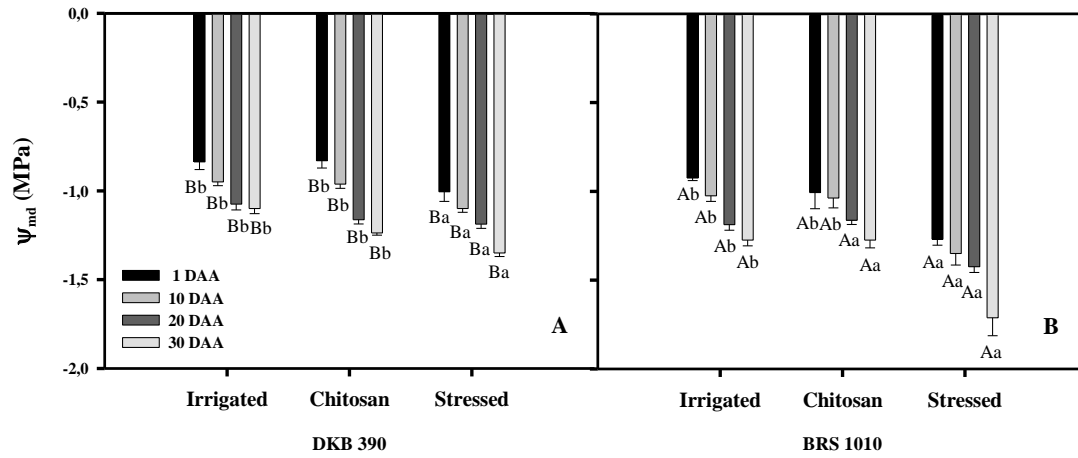


**Fig. 2:** Valores médios de temperatura máxima, mínima e precipitação no período de duração do ensaio.



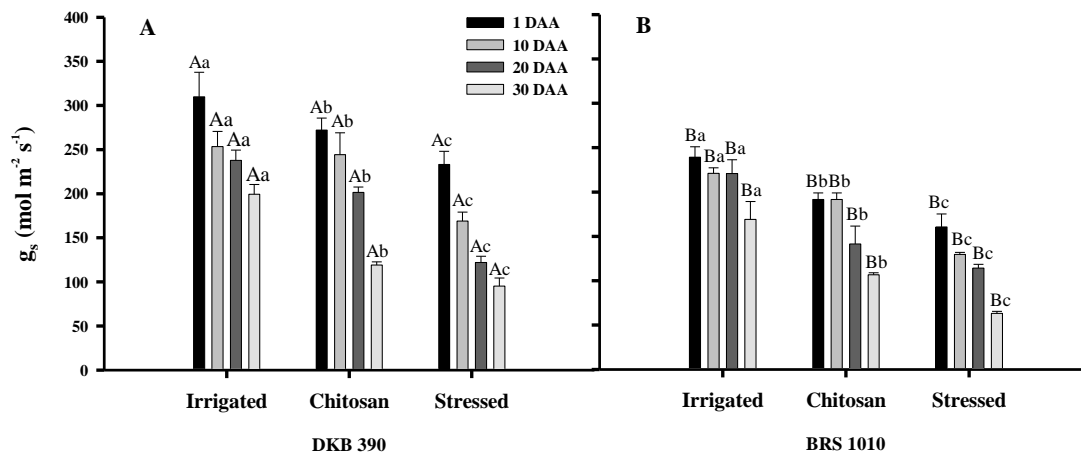
**Fig. 3:** Índice de clorofila SPAD durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).



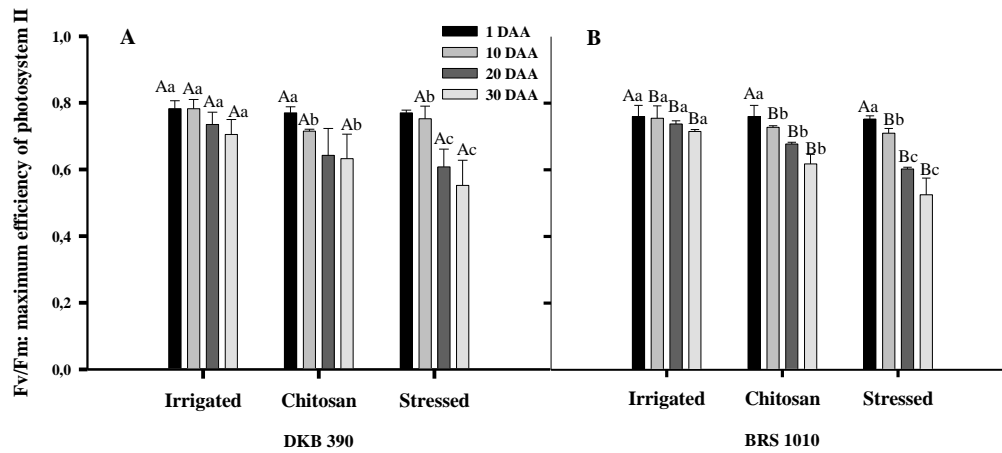
**Fig. 4:** Potencial hídrico médio foliar ( $\Psi_{md}$ ) durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).



**Fig. 5:** Condutância estomática ( $g_s$ ) durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).



**Fig. 6:** Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 1: Intervalo entre florescimento masculino e feminino em dias (ASI) e área foliar (LA  $\text{cm}^2$ ); durante a imposição do estresse hídrico em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010).

Parameters	Tolerant DKB 390			Sensitive BRS 1010		
	Irrigated	Chitosan	Stressed	Irrigated	Chitosan	Stressed
ASI (dias)	1,8 Bc	2,2 Bb	2,95 Ba	2,1 Ab	2,3 Ab	2,95 Aa
LA	5057,7Aa	4772,6Aa	3833,6 Ab	4590,2 Ba	4308,8Ba	3539,2Bb

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo híbrido pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 2: Componentes d de produção dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010).

Parameters *	Tolerant			Sensitive		
	DKB 390			BRS 1010		
	Irrigated	Chitosan	Stressed	Irrigated	Chitosan	Irrigated
<b>TDB</b>	275,3 Aa	215,1 Ab	192,65 Ac	229,3 Ba	198,7 Bb	185,7 Bc
<b>EL</b>	12,76 Aa	13,29 Aa	10,52 Ab	14,58 Aa	12,96 Ab	11,25 Ac
<b>ED</b>	49,34 Aa	45,91 Ab	41,39 Ac	44,52 Ba	41,9 Bb	39,42 Bc
<b>NGR</b>	16,99 Aa	16,72 Aa	15,44 Ab	14,55 Ba	14,36 Ba	13,63 Bb
<b>NGE</b>	28,61 Aa	26,37 Ab	22,55 Ac	25,96 Ba	23,6 Bb	20,26 Bb
<b>W100</b>	35,2 Aa	31 Ab	25,67 Ac	34,95 Ba	28,32 Bb	23,35 Bc
<b>GY</b>	150,88 Aa	93,92 Ab	68,04 Ac	112,14 Ba	80,33 Bb	48,52 Bc
<b>HI</b>	35,36 Ba	30,39 Bb	26,16 Ac	32,84 Aa	28,78 Ab	20,71 Bc

\* TDB: biomassa seca de parte aérea; EL: comprimento de espiga (cm); ED: diâmetro da espiga (mm); NGR: número de grãos por fileira; NGE: número de grãos por espiga; W100: peso de 100 grãos (g);GY: rendimento de grãos (kg ha<sup>-1</sup>); HI: índice de colheita (g g<sup>-1</sup>).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os híbridos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo híbrido pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).