



LORENA GABRIELA ALMEIDA

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT
HÍDRICO EM HÍBRIDOS DE MILHO**

LAVRAS - MG

2018

LORENA GABRIELA ALMEIDA

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM
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.

Quitosana na indução de tolerância ao déficithídrico em híbridos de milho : Quitosana na indução de tolerância ao déficithídrico em híbridos de milho / Lorena Gabriela Almeida. - 2018.

70 p.

Orientador(a): Amauri Alves de Alvarenga.

Coorientador(a): Paulo César Magalhães.

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

Bibliografia.

1. Antitranspirante. 2. Biopolímero. 3. Estresse hídrico. I. de Alvarenga, Amauri Alves. II. Magalhães, Paulo César. III. Título.

LORENA GABRIELA ALMEIDA

**QUITOSANA NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM
HÍBRIDOS DE MILHO**

**CHITOSAN IN INDUCING THE TOLERANCE TO WATER DEFICIT IN 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.

APROVADA em 5 de março de 2018.

Dra. Vânia Aparecida da Silva

EPAMIG

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

IFMG Campus Bambuí

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho

Embrapa

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

Orientador

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.

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.

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 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 taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, carbono interno, teor relativo de clorofila, eficiência fotoquímica do fotossistema II, potencial hídrico, avaliação do sistema radicular 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: Antitranspirante. Biopolímeros. Estresse hídrico. Metabolismo. trocas gasosas.

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 corn plant to tolerance water deficit. Chitosan, considered a biostimulant, can stimulate physiological responses, acting as an antitranspirant 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: Antitranspirant. Biopolymers. Hydrical stress. Metabolism. Gas exchange.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Cultura do milho	14
2.2	Tolerância à seca e os efeitos do déficit hídrico	15
2.3	Déficit hídrico e características ecofisiológicas	16
2.4	Relação déficit hídrico e osmoreguladores	17
2.5	Ácido Abscísico, estresse oxidativo e sistema de defesa	17
2.6	Quitosana	19
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
	REFERÊNCIAS	23
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	26
	ARTIGO 1 - CHITOSAN EXOGENOUS APPLICATION IN THE WATER DEFICIT TOLERANCE INDUCTION IN MAIZE PLANTS	26
	ARTIGO 2 - APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA APRESENTA POTENCIAL PARA INDUZIR TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO	50

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 agronômico.

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 agronômico.

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.

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 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. 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_2 , 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_2 , 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_2 . 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 mesófilica e estomática de danos causados ao aparato fotoquímico, uma vez que menor condutância pode reduzir a quantidade de CO₂ que chega ao local de carboxilação onde a RUBISCO atua. A condutância mesófilica é definida como a capacidade/facilidade que o CO₂ 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 CO₂ 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. Além disso 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).

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 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 ($O_2 \bullet^-$). 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 ($O_2 \bullet^-$) que leva a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet) e de outras espécies reativas tais como o oxigênio singleto (1O_2), radical alcoxila (RO^\bullet), radical peróxido (ROO^\bullet) e hidroperóxido orgânico (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 glutathiona (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 $O_2 \bullet^-$ através de sua dismutação em O_2 e H_2O_2 . Evitando dessa forma a formação futura de OH^\bullet através da reação de Haber-Weiss e/ou de Fenton quando na presença de íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} . O H_2O_2 formado pela reação catalisada pela dismutase do superóxido é dismutado em água (H_2O) e 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) (WORKOSKI 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 β - (1 \rightarrow 4). Este polímero natural pode ser encontrado na parede celular de micro-organismos, 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 (-NH₂) 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 agrônômico 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 manter alto 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. 2017.
- 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.1 95, 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 diferentes híbridos de milho, contrastantes para tolerância a restrição hídrica, DKB 390 e BRS 1010, tolerante e sensível, respectivamente. 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 (1, 7 e 15 dias após a aplicação do biopolímero). A fim de compreender o comportamento na indução da tolerância a restrição hídrica, foram realizadas avaliações biofísicas, tal como, potencial hídrico, índice SPAD, 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, avaliações do sistema radicular e parâmetros de produção. Dentre os tratamentos, as plantas de milho submetidas a aplicação foliar de quitosana na dose de 140 mg/L apresentou um 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, um sistema radicular bem desenvolvido e uma manutenção dos parâmetros agronômicos. 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, sistema radicular, 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 evaluations on the root system and production parameters. 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 a well developed root system and a maintenance of the agronomic parameters. The results obtained provide evidence on the CHT potential use in order to increase tolerance to water stress.

Keywords: Water stress, antioxidant enzymes, dry, root system, gas exchange.

Introdução

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. Em circunstâncias ambientais que causam déficit hídrico, como a seca, os impactos ocasionados dependem da duração do estresse, intensidade e taxa de progressão, bem como do genótipo, estágio de desenvolvimento das plantas e da interação com outros estresses (Chaves et al., 2016; Feng et al., 2016). O período de pré florescimento é considerado como o estágio mais sensível e determinante do potencial produtivo. Dois dias de estresse hídrico, no florescimento, são suficientes para diminuir o rendimento da cultura em até 20%, quatro a oito dias resultam em uma queda de mais de 50% (Magalhães et al., 2002).

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 CO₂ 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). Como resposta a esta condição desfavorável de cultivo tende a ocorrer uma 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 (Das; Roychoudhury, 2014).

Um importante processo de adaptação é a manutenção do crescimento e desenvolvimento 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.

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 sem comprometer negativamente o rendimento das culturas.

O uso de químicos antitranspirantes, que atuem 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 da elevação da temperatura do ar e a menor precipitação, juntamente com as crescentes limitações dos recursos hídricos disponíveis nas áreas agrícolas, faz-se necessário a adoção de estratégias alternativas que visam um maior conhecimento dos fatores biológicos e climáticos relacionados à tolerância ao déficit hídrico. Diante do exposto, o presente estudo, teve como objetivo avaliar o desempenho de dois híbridos contrastantes à seca, submetidos a aplicação de diferentes doses de Quitosana a fim de induzir tolerância ao déficit hídrico.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de cultivo

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 dm³ de Latossolo Vermelho Amarelo distróficotípico, textura média a moderado, retirado de área de platô.

Determinação da umidade do solo

Tensiômetros foram instalados nos vasos a uma profundidade de 20 cm. A reposição hídrica, através da irrigação, foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água reposta até a capacidade de campo. Em paralelo, foram realizados os tratos culturais e fitossanitários necessários para a cultura.

Imposição dos tratamentos

Ao atingirem o estágio de pré florescimento, as plantas de milho foram submetidas aos efeitos do déficit hídrico no solo. Essa condição foi imposta pelo fornecimento diário de 50% da água disponível até o potencial da água no solo atingir aproximadamente o valor de -138kPa (Souza et al., 2014). Os tratamentos foram caracterizados pela utilização de diferentes doses de CHT nas concentrações de 60, 100, 140 e 180 mg/L, além da água acidificada, irrigado e déficit 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. Em seguida, essa solução foi diluída nas concentrações correspondentes.

As soluções foram fornecidas via foliar, por meio de um pulverizador costal, cuja pressão de pulverização foi obtida através de um cilindro de CO₂ e controlada por um manômetro de baixa pressão e uma vazão de 102L/ha, pressão de 3 BAR. 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. Todas as avaliações foram realizadas no primeiro dia após a imposição dos tratamentos, sétimo e ao final de 15 dias (1, 7, 15 DAA) Em seguida, o fornecimento de água foi restabelecido e mantido em níveis próximos ao da capacidade de campo. O experimento foi conduzido até o momento da colheita.

Potencial hídrico, Eficiência Fotoquímica e Índice SPAD

O potencial hídrico foliar (ψ_w) foi avaliado usando uma câmara de pressão (modelo 1000. PMS Instrument Company – Albany OR, EUA). As medições foram realizadas as 12 horas de acordo com a metodologia descrita por Scholander (1964). A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi determinada por meio de um fluorímetro (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments King's Lynn, UK). O índice SPAD foi estimado de forma não destrutiva utilizando um medidor de clorofila SPAD – 502 (Minolta Corp, Ramsey, EUA). Todas as leituras foram realizadas no período da manhã, na primeira folha abaixo da folha bandeira.

Medidas de trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram feitas através de um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, Model LI-6400, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) com câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40 *leaf chamber fluorometer*, Li-Cor). Todas as medidas foram realizadas no período da manhã entre 8 e 11h em uma folha totalmente expandida (folha da espiga). Os parâmetros avaliados foram taxa fotossintética foliar (P_n), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (C_i). As medidas foram feitas em uma área foliar de 2 cm^2 , com fluxo de CO_2 controlado utilizando cilindros (Licor) de 12 gramas numa concentração de $380\ \mu\text{mol mol}^{-1}$. A densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de $1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e temperatura foliar foi controlada ($26\text{ }^\circ\text{C}$).

Extração e atividade enzimática

A extração das enzimas foi feita pela maceração de 200 mg de folha em nitrogênio líquido, adicionando-se 1,5 mL do tampão de extração constituído de: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,8 mM PMSF, 1% de PVPP e 1 mM de ácido ascórbico (ASC). O extrato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante foi coletado e armazenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ no período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises de todas as enzimas (Biemelt et al. 1998).

A quantificação da atividade das enzimas analisadas, seguiram protocolos já estabelecidos. A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi avaliada pela capacidade em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). A catalase (CAT) foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 240 nm por 3 minutos. (Havir e Mchale 1987). Peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm por 3 minutos (Nakano e Asada

1981). Fenilalanina amonioliasa (PAL) foi determinada pela formação de ácido cinâmico a 290 nm (Zucker, 1965).

Extração e quantificação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)

Amostras contendo 200 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP, homogeneizados em 5 mL de tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados, a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e MDA. O teor de H₂O₂ foi medido em espectrofotômetro de acordo com Velikova et al. 2000. O teor de malonaldeído (MDA) que é um produto final da peroxidação lipídica foi utilizado para determinar o nível de dano nas membranas. O método utilizado foi de acordo Buege e Aust (1978).

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 ($\emptyset > 0,5$ $\emptyset < 2,0$ mm) e raízes grossas ($\emptyset > 2,0$ mm) (Magalhães, et al., 2011). Para esta análise, as raízes foram coletadas de quatro repetições por tratamento.

Avaliação dos parâmetros agronômicos

Na colheita, a altura da planta, tamanho e diâmetro da espiga foram medidos com auxílio de uma régua milimetrada e um paquímetro, respectivamente. Também foram quantificados o número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira e peso final de grãos. Em seguida, as plantas foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 70°C, durante 72 h, com base no valor de biomassa seca total foi estimado o índice de colheita através da relação (massa seca de grãos/massa seca total da plantas)*100 (Durães; Magalhães; Oliveira, 2002).

Análise dos dados

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Scott-Knott, a 0,05% de significância ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Ferreira, 2013).

Resultados

Parâmetro de relação hídrica

Os tratamentos irrigados e a aplicação de CHT na dosagem de 140 mg/L não apresentaram diferenças nas avaliações realizadas para os dois híbridos. Contudo, para todos os demais tratamentos houve uma redução efetiva desse parâmetro (Fig. 1). O híbrido DKB 390 (tolerante) apresentou, de modo geral, menor redução do potencial hídrico que o híbrido BRS 1010 (sensível).

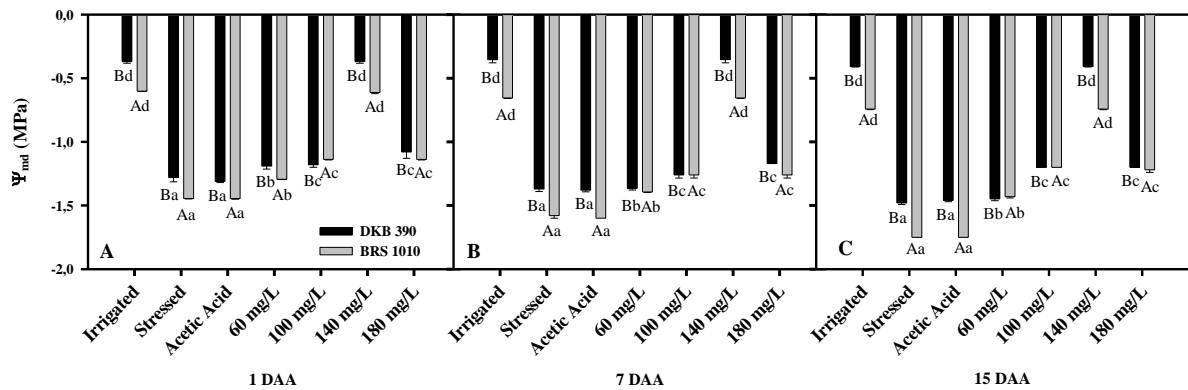


Figura 1: Potencial hídrico foliar ao meio dia Ψ_{md} , durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos aos diversos tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os genótipos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ($P \leq 0,05$).

Índice SPAD

A aplicação foliar de CHT, especialmente na dosagem de 140 mg/L, resultou em uma influência significativa para o índice SPAD em ambos os híbridos, ao serem comparados aos tratamentos sob condições de déficit hídrico e pulverização com água acidificada (Figura 3). Uma comparação ao longo do tempo, observou-se um declínio desse índice, na presença dos tratamentos, exceto nas plantas irrigadas e com aplicação de CHT 140 mg/L. Não obteve-se diferenças entre os híbridos.

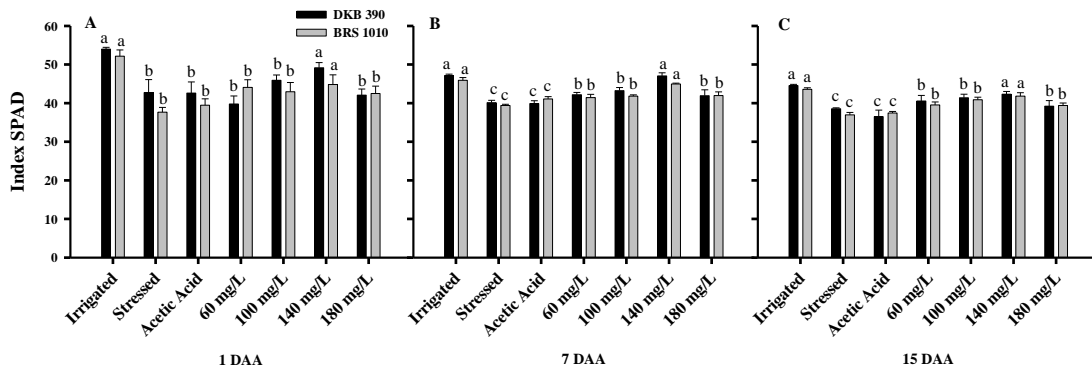


Figura 3: Índice SPAD durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos com e sem aplicação de diferentes doses de CHT. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os genótipos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ($P \leq 0,05$)

Eficiência Fotoquímica

Uma significativa diminuição na relação Fv/Fm (eficiência fotoquímica máxima), foi verificada em ambos os híbridos, porém, de forma mais acentuada no BRS 1010, em todos os tratamentos, exceto nas plantas sob condição irrigada e aplicação de CHT 140 mg/L, ao longo do período de avaliações. Não houve diferença significativa ao comparar os híbridos (Tabela 1).

Tabela 1. Eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm) híbridos de milho com características contrastantes para a tolerância à seca cultivadas sob diferentes tratamentos.

DKB 390*								
	Irrigated	Stressed	Acetic Acid	60 mg/L	100mg/L	140mg/L	180 mg/L	CV%
1DAA	0,80a	0,69 b	0,69 d	0,69 c	0,73 b	0,79 a	0,70 b	15,1
7DAA	0,81 a	0,63 c	0,65 c	0,69 b	0,72 b	0,79 a	0,68 b	16,2
15DAA	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	100mg/L	140 mg/L	180 mg/L	CV%
1DAA	0,79 a	0,68 b	0,69 b	0,70 b	0,72b	0,78 a	0,69 b	15,0
7DAA	0,78 a	0,62 c	0,64 c	0,71 b	0,73 b	0,77 b	0,69 b	14,5
15DAA	0,74 a	0,55 c	0,59 c	0,67 b	0,68 b	0,72 a	0,68 b	14,1

*Híbrido tolerante DKB 390, sensível BRS 1010, não houve diferenças estatísticas entre os híbridos.

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

Trocas gasosas

Observou-se um comportamento específico em relação aos parâmetros de trocas gasosas analisados, exceto na C_i (concentração intracelular de CO_2), no primeiro dia, o déficit hídrico afetou significativamente os tratamentos estressados, porém houve um comportamento específico das plantas submetidas a CHT 140 mg/L, apresentando uma similaridade com as plantas sob condição de irrigação. As reduções dos parâmetros analisados foram mais pronunciadas no híbrido BRS 1010 (Fig. 4). Com 15 dias de estresse ambos os híbridos apresentaram uma redução desses parâmetros, porém DKB 390, obteve resultados superiores quando comparado ao BRS 1010. Ao analisar a concentração intracelular de CO_2 , pode-se observar que o híbrido sensível apresentou um comportamento superior, quando comparado ao tolerante, além disso, os menores teores analisados ocorreram nas plantas de milho submetidas aos tratamentos CHT 140 mg/L e em condições favoráveis de irrigação.

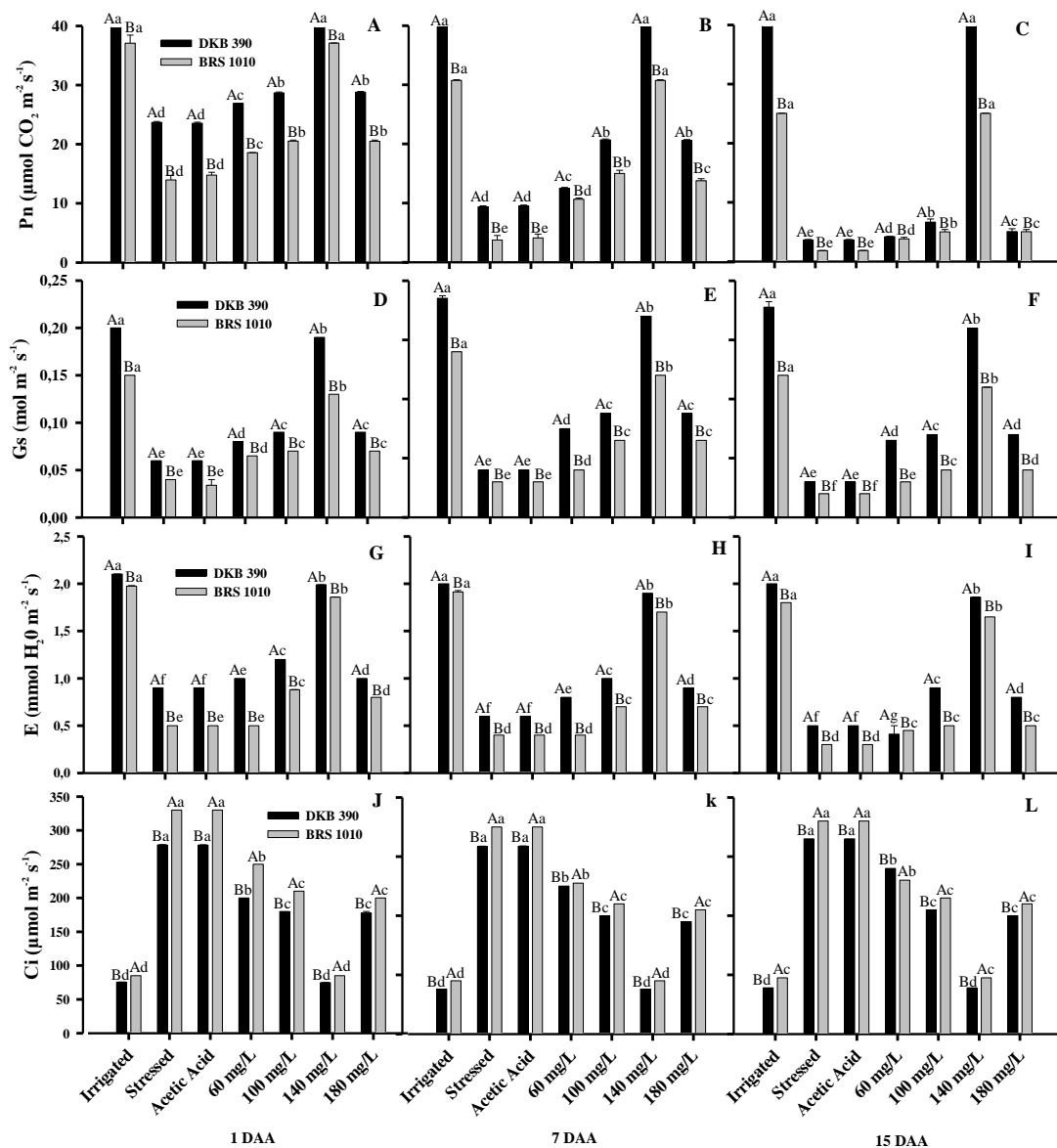


Figura 4: Parâmetros de trocas gasosas durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos aos diversos tratamentos, P_n (taxa fotossintética, Figs A, B e C), g_s (condutância estomática, Figs D, E e F), E (taxa transpiratória, Figs. G, H e I) e C_i (carbono interno, Figs. J, K e L). 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 ($P \leq 0,05$).

Atividade enzimática

O aumento dos dias de estresse hídrico acarretou menor atividade das enzimas, em ambos os híbridos analisados(Fig. 5).Os tratamentos irrigados e sob aplicação de CHT 140 mg/L, apresentaram comportamentos semelhantes quanto a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e PAL, expressando um desempenho elevado, quando comparados as demais condições. Assim como nos outros parâmetros avaliados, observou-se que o híbrido tolerante (DKB 390) apresentou uma maior atividade das enzimas que o híbrido sensível (BRS 1010).

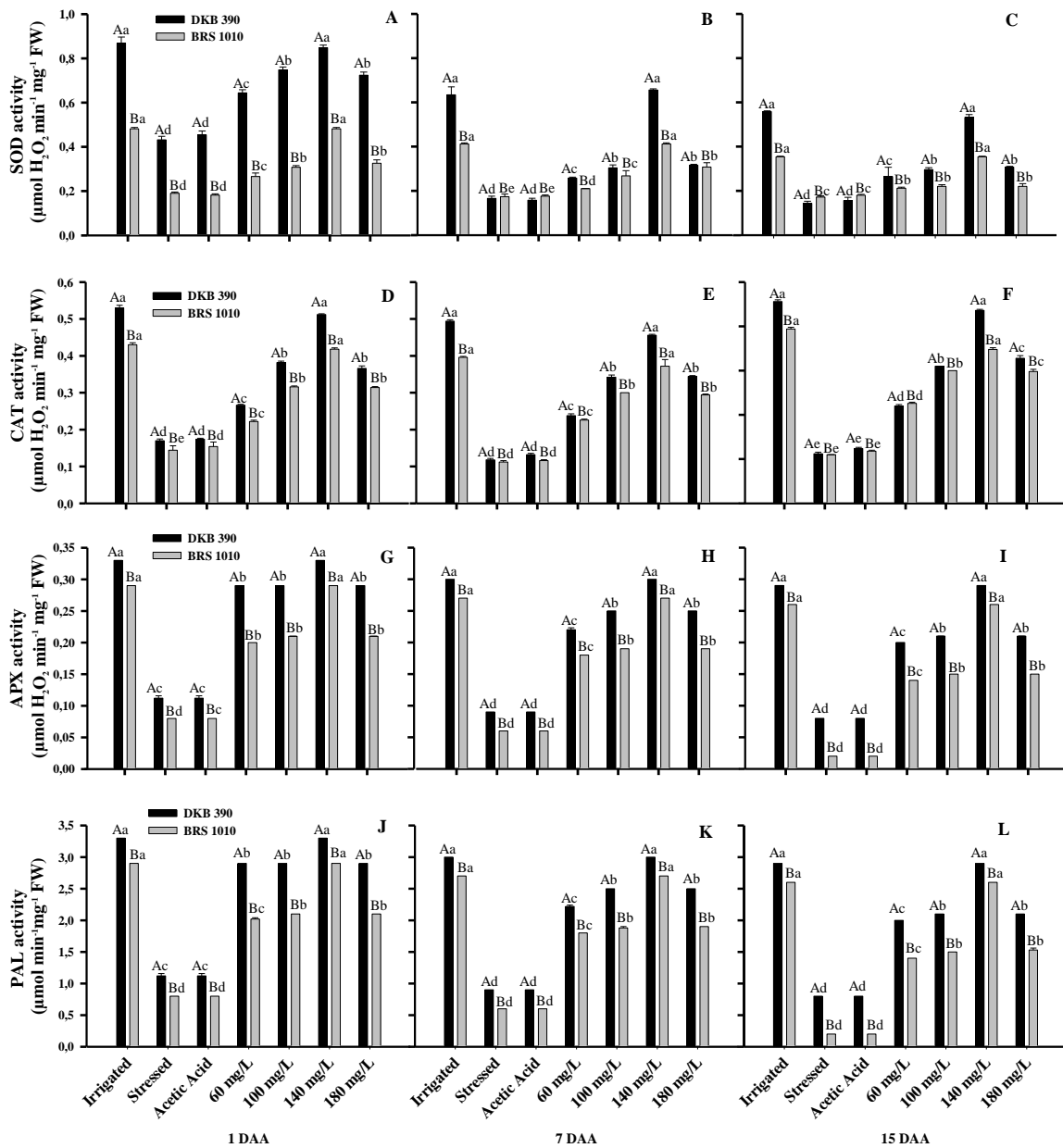


Figura 5: Atividade das enzimas antioxidantes SOD (Fig A, B e C), CAT (Fig D, E e F), APX (Fig. G, H e I) e PAL (Fig. J, K e L) durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos aos diversos tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem 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 ($P \leq 0,05$)

Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA)

Corroborando com os resultados obtidos em relação a atividade das enzimas analisadas, no geral, os tratamentos estressados e sob aplicação de ácido acético 0,5%, independente dos híbridos, tiveram um aumento no teor de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio, esse comportamento específico foi observado ao longo dos dias de restrição

hídrica (figura 6). Observa-se que, os tratamentos irrigados e CHT 140 mg/L, resultaram nos menores teores de H₂O₂ e peroxidação lipídica. Em relação aos híbridos em estudo, observou-se que as plantas de milho sensíveis ao déficit hídrico (BRS 1010) apresentaram maiores teores dos conteúdos analisados, quando comparadas as plantas tolerantes (DKB 390).

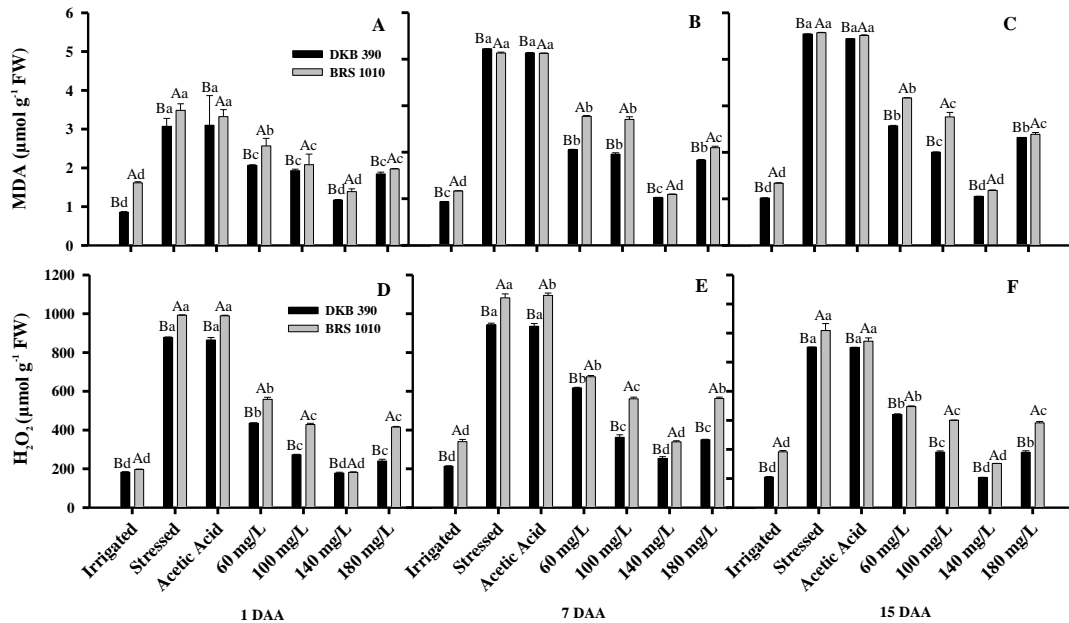


Figura 6: Conteúdo de malondialdeído (MDA) (Fig A, B e C) e H₂O₂ (Fig D, E, F) durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos aos diversos tratamentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os genótipos, e minúsculas comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo genótipo pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância ($P \leq 0,05$)

Avaliação do sistema radicular

Na presente investigação, foi analisado o sistema radicular das plantas de milho, submetidas a dose de CHT 140 mg/L, a qual proporcionou uma maior eficiência nas análises de trocas gasosas, enzimas antioxidantes. Pode-se observar que a aplicação de CHT na dose de 140 mgL⁻¹ resultou em comportamentos específicos, em relação aos híbridos. O híbrido sensível apresentou comprimento total de raízes, comprimento de raízes muito finas, finas e grossas (CRT, CRMF, CRF, CRG) inferiores ao híbrido tolerante (Figura 7). 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 8). 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 (Figura 9). 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).

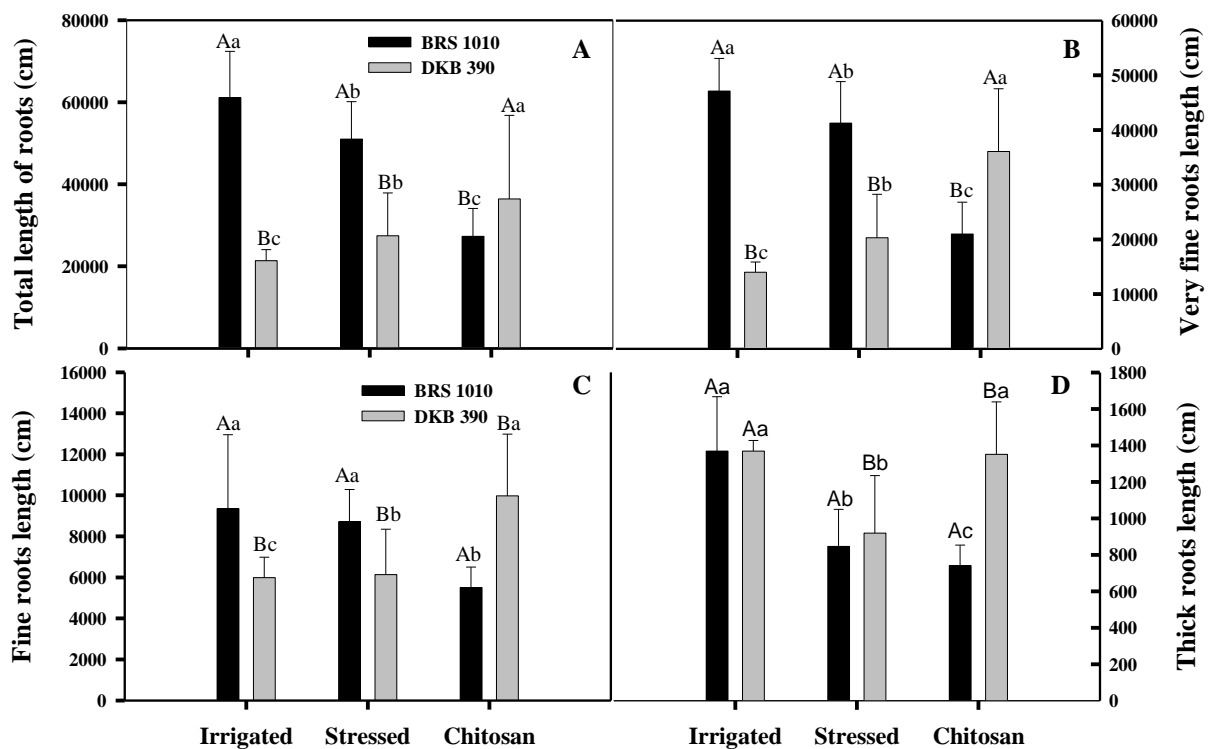


FIGURE 7. A: Comprimento total de raízes (cm), B: comprimento de raízes muito finas (cm) (CRMF), C: comprimento de raízes finas (cm) (CRF), D: comprimento de raízes grossas (cm) (CRG) submetidas a diferentes tratamentos.

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 ($P \leq 0,05$).

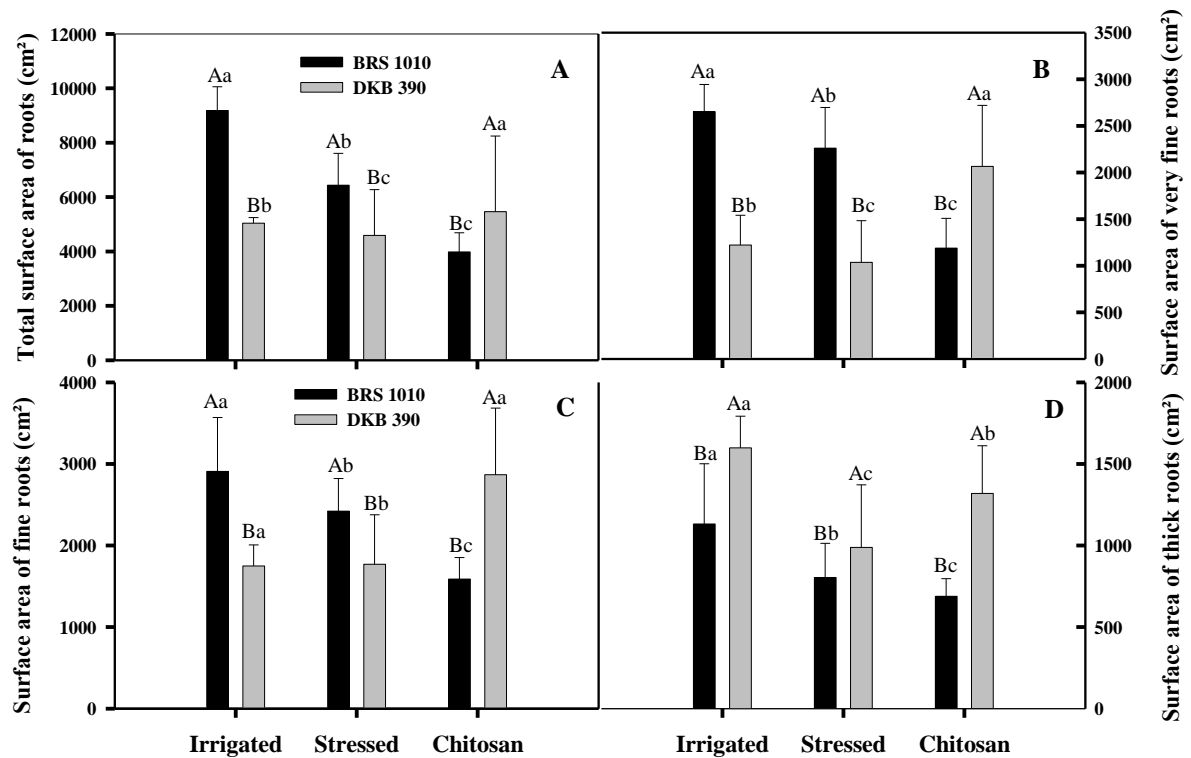


FIGURE 8. A: Área Superficial total de raízes (cm²), B: área superficial de raízes muito finas (cm²) (ASRMF), C: área superficial de raízes finas (cm²) (ASRF), D: área superficial de raízes grossas (cm²) (ASRG) submetidas a diferentes tratamentos.

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 ($P \leq 0,05$).

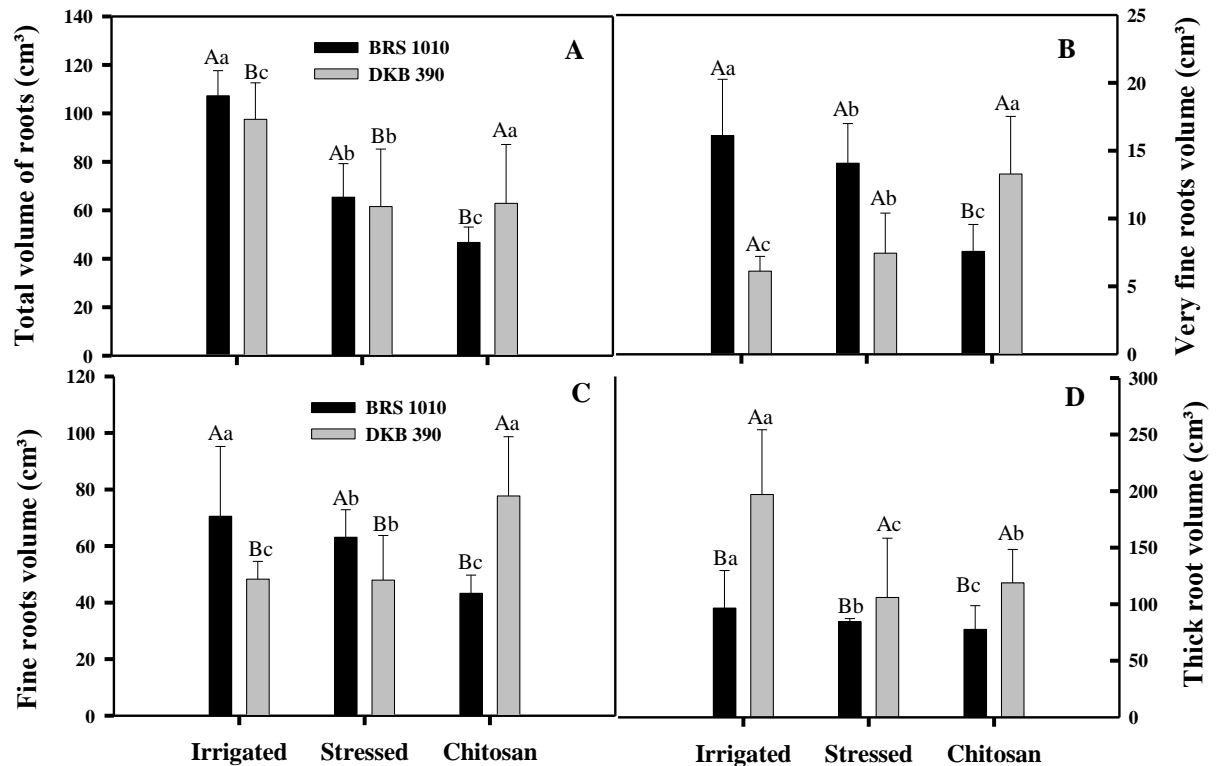


FIGURE 9. A: Volume total de raízes (cm³), B: volume de raízes muito finas (cm³) (VRMF), C: volume superficial de raízes finas (cm³) (VSRF), D: volume de raízes grossas (cm³) (VSRG) submetidas a diferentes tratamentos.

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 ($P \leq 0,05$).

O efeito do estresse causado pela falta de água foram evidenciados entre as condições estressadas, doses de CHT e irrigada para os atributos de produção (Tabela 2). Os resultados encontrados no DKB 390 confirmaram maior tolerância em relação ao BRS 1010, onde pode-se observar que as plantas de milho, do híbrido sensível, não resultaram em uma produção de grãos expressiva. Constatou-se através dos parâmetros analisados que as plantas de milho cultivadas em CHT 140 mg/L e irrigadas apresentaram respostas semelhantes.

Tabela 2. Características de produção em híbridos de milho contrastantes para a tolerância à seca cultivadas sob diferentes tratamentos.

DKB 390

	Irrigated	Stressed	AceticAcid	60 mg/L	100mg/L	140 mg/L	180 mg/L	CV%
PH	2,47 Aa	2,02 Ad	2,03Ad	2,31Ab	2,31 Ab	2,46Aa	2,26Ac	13,8
ED	49,10 Aa	35 Ad	35 Ad	46 Ab	46 Ab	49 Aa	46,1Ab	14,7
NGR	26 Aa	10,0 Ac	10,8Ac	24,2Ab	24,8 Ab	26,8 Aa	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	139,1Ac	12,3
DGB	61,89 Aa	28,2 Ac	28,4 Ac	51,3 Ab	50,9 Ab	61,12Aa	51,2Ab	14,6
HI	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	AceticAcid	60 mg/L	100mg/L	140mg/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	128,1Ba	60,9Bb	15,8
DGB	25,3 Ba	*	*	*	*	25 Ba	*	13,5
HI	0,31%Ba	*	*	*	*	0,31%Ba	*	15,5

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 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). * 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 ($P \leq 0,05$).

Discussão

Para entender a base da resiliência e plasticidade das plantas às pressões ambientais, faz-se necessário uma compreensão dos mecanismos celulares e de desenvolvimento que determinam as consequências funcionais sobre o metabolismo vegetal. As plantas de milho submetidas a dose de CHT 140 mg/L e irrigadas obtiveram um resultado positivo em relação aos demais tratamentos, em todos os parâmetros analisados e independente do híbrido. As diferenças observadas entre os híbridos estão relacionadas às suas características genéticas, as quais permitem que esses sejam caracterizados como tolerante ou sensível à condição de restrição hídrica.

As estruturas químicas e físicas da CHT estão relacionadas às suas fortes ligações β -1,4, 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. Essas características são críticas na avaliação das propriedades biológicas desse polímero, a transferência de CHT insolúvel diminuiria as repostas celulares (Hadwiger, 2013). No presente estudo, observou-se que a diluição da CHT em ácido acético 0,5% não resultou em

efeitos negativos sobre as características metabólicas das plantas de milho, independente dos híbridos analisados.

Estudos que envolvem estresse hídrico, devem apresentar um monitoramento diário da umidade do solo. Na presente investigação foram observados que durante os 15 dias de restrição hídrica, a umidade do solo foi igual ou menor a 50% da capacidade total de água disponível no solo, resultando assim, na presença de estresse, o qual pode ser descrito como moderado nos primeiros dias e severo nos últimos (Bettaie et al., 2011).

Os resultados obtidos em relação ao teor de clorofila, estão relacionados ao fato que sob condições de restrição hídrica a diminuição desse parâmetro é um fenômeno comumente observado (Pirbalouti et al., 2017). Esse comportamento pode ser atribuído à redução da síntese dos principais complexos proteicos de pigmentos, que protegem o aparelho fotossintético, danos oxidativos a lipídeos e proteínas do cloroplasto (Nikolaeva et al., 2010). A diminuição no conteúdo desse pigmento é uma consequência negativa do déficit hídrico, no entanto, tem sido considerada como uma característica adaptativa em plantas cultivadas sob restrição hídrica (Hadwirger et al., 2013). A CHT, assemelha-se a celulose, a única diferença está relacionada ao grupo amina (-NH₂) na posição C2 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 SPAD observados na presente investigação (Rizzi et al., 2016).

A aplicação foliar de CHT 140 mg/L e os tratamentos irrigados, resultaram em manutenção na relação Fv/Fm, indicando assim que os transportes fotossintéticos de elétrons não foram afetados, assim como provavelmente não ocorreu uma fotoinibição nos complexos do fotossistema II (PSII). CHT pode estimular o ciclo das xantofilas, refletindo em mudanças correspondentes na razão zeaxantina/violaxantina (Iriti 2009). Provavelmente CHT regule 9 cis-epoxicarotenoidedioxigenase (NCED), uma enzima chave da biossíntese de ABA através da via dos carotenoides. De fato, na presente investigação observou-se que CHT 140 mg/L proporcionou uma diminuição da condutância estomática, atuando assim como um antitranspirante, não afetando negativamente a taxa fotossintética e a concentração intracelular de Carbono. Esse resultado sugere uma diminuição na eficiência de assimilação e transporte de CO₂, porém prevalecendo a atividade fotossintética.

O H_2O_2 pode desempenhar um papel como mensageiro secundário para as respostas ao estresse abiótico, levando assim a um aumento da tolerância a essas condições desfavoráveis, sobretudo a baixa disponibilidade hídrica, por meio da manutenção da homeostase celular através da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX (Pongprayoon et al., 2013). A resposta de defesa da CHT inclui a atividade melhorada das enzimas do metabolismo secundário, tal como da PAL. 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). Interações carga-carga entre os grupos amina da CHT, carregados positivamente, e os fosfolipídios, carregados negativamente, promovem um sinal que levará a ativação da via dos octadecanóides, essa via metabólica está diretamente relacionada a formação do H_2O_2 , assim como a ativação da enzima PAL (Pichyangkura e Chadchawan, 2015).

Provavelmente, o elevado teor de MDA encontrados nas plantas submetidas ao estresse hídrico, exceto no tratamento de 140 mg/L, resultaram em danos negativos aos fosfolipídios, resultando assim, em uma baixa interação entre células vegetais e CHT, promovendo uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes.

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. 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 CO₂. Na presença de baixos níveis de recursos subterrâneos, como água e nutrientes, as plantas tendem a aumentar a alocação de biomassa para as raízes (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.

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). As consequências adversas observadas nos parâmetros agronômicos, nas plantas sob restrição hídrica, tornam-se um recurso adaptativo para a sobrevivência das plantas sob estresse. Um dos motivos que podem ter levado a um melhor rendimento nos parâmetros agronômicos analisados, sobretudo para a aplicação de CHT 140 mg/L e plantas irrigadas do genótipo DKB 390, é o aumento do índice de colheita (HI), ou seja, uma maior alocação diferencial de fotoassimilados para a espiga durante seu ciclo de vida.

O modo de ação da CHT ainda não está bem elucidado. 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. O papel da CHT como antitranspirante na agricultura pode estar relacionado ao fato de que ao serem depositados na parede celular tal químico promova uma diminuição da condutância estomática, aumentando a resistência das folhas a perda de vapor d'água melhorando assim o uso da água nas plantas para assimilar o carbono, e por sua vez, a produção de biomassa. Outra abordagem para reduzir a perda de H₂O, através da transpiração, é o aumento da reflexão solar das folhas através do tipo reflectante de atuação dos antitranspirantes, limitando assim a perda de vapor de água, proporcionando um resfriamento evaporativo das folhas (EMAM et al., 2014).

Provavelmente os resultados foram obtidos devido ao efeito estimulante da CHT no crescimento e desenvolvimento das plantas, além disso 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 agrônomico.

Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências sobre o potencial uso da Quitosana, a fim de aumentar a tolerância ao estresse hídrico. A aplicação foliar de quitosana na dose de 140 mg/L proporcionou respostas semelhantes às plantas de milho cultivadas sob condição favorável de irrigação. A diferença obtida em relação aos híbridos em estudo está relacionada também com as diferenças genéticas que os diferem quanto a sensibilidade e tolerância.

Referências Bibliográficas

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.

BIEMELT, S. et al. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

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.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310. 1978.

CHAVES, M.M.; COSTA, J.M.; ZARROUK, O.; PINHEIROS, C.; LOPES, C.M.; PEREIRA, J.S. Controlling stomatal aperture in semi-arid regions -The dilemma of saving water or being cool? **Plant Science**, v.251, v.54-64, 2016.

COMAS, L.H.; BECKER, S.R.; CRUZ, V.M.R.; BYRNE, P.F.; DIERIG, D. Root traits contributing to plant productivity under drought. **Frontiers of Plant Science**, v.4, p.442, 2013.

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.

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.

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.

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. **The Plant Cell**, V.28, 1769-1782, 2016.

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

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

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

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, Jun. 1987.

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.

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.

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. 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.

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

- 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.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n.5, p. 867-880, Aug. 1981.
- 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.
- PICHYANGKURA, R. and CHADCHAWAN, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Science Horticulture*, 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.
- PONGPRAYOON, W.; ROYTRAKUL, S.; PICHAYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Growth Regulation**, v.70, p.159-173, 2013.
- POOTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, Rockville, v.27, n.12, p.1191-1191, 2000.
- 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
- SCHOLANDER, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 52, n. 1, p. 119-125,
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 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.
- 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**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

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.

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.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant physiology**. V.40, n.5, p. 779-784. September 1965.

ARTIGO 2 - 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 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 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 deficit 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⁻¹, 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 CO₂, (2,15 kgf cm⁻²), equipado com bico tipo XR-Teejet 110.02 VS, aplicando-se o equivalente a 120 l ha⁻¹ 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 m². 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, Ψ_{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 acondicionamento 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 temperatura 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 (Ψ_{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 mesmocomportamento, 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 Fv/Fm (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 (Fv/Fm). 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 (-NH₂) 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 Ψ_{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

paramêtros 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 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 (E mbrapa), 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., Rosenqvst, 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* 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., Kofoed, 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. Morpho-physiology 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

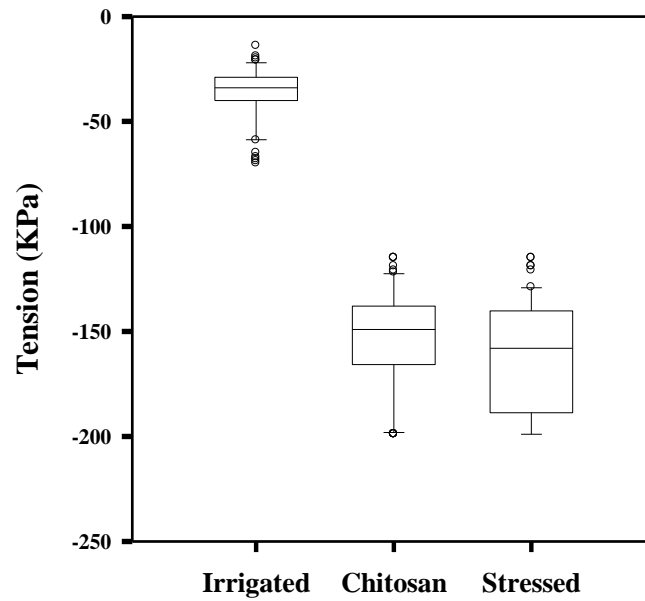


Fig. 1 Valores médios da tensão da água no solo medidos com tensiômetros Watermark durante o período de avaliações.

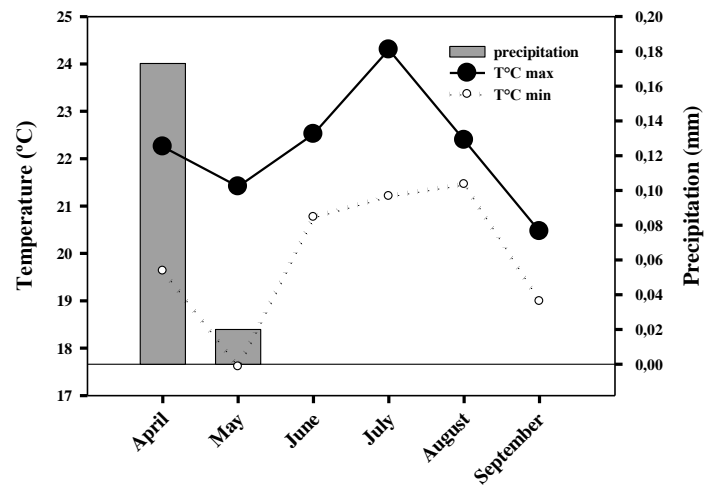


Fig. 2: Valores médios de temperatura máxima, mínima e precipitação no período de duração do ensaio.

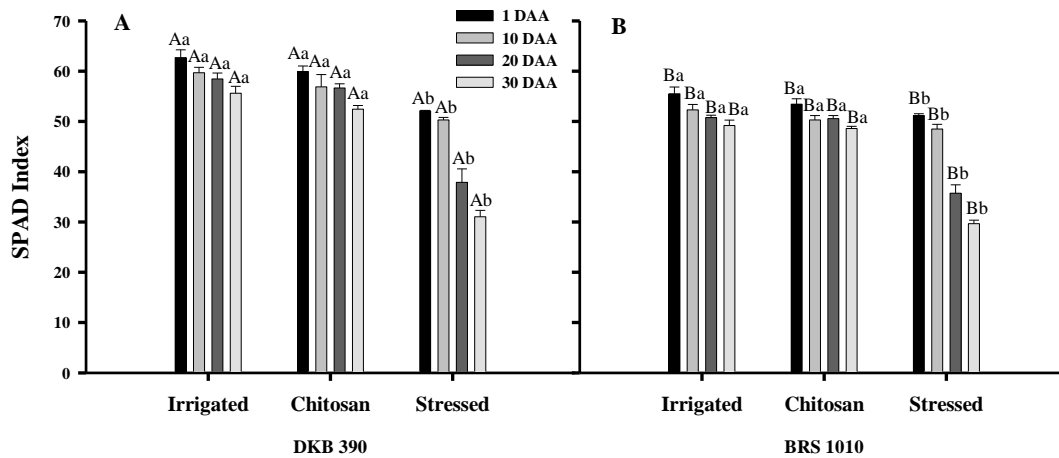


Fig. 3: Índice de clorofila SPAD durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

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 ($P \leq 0,05$).

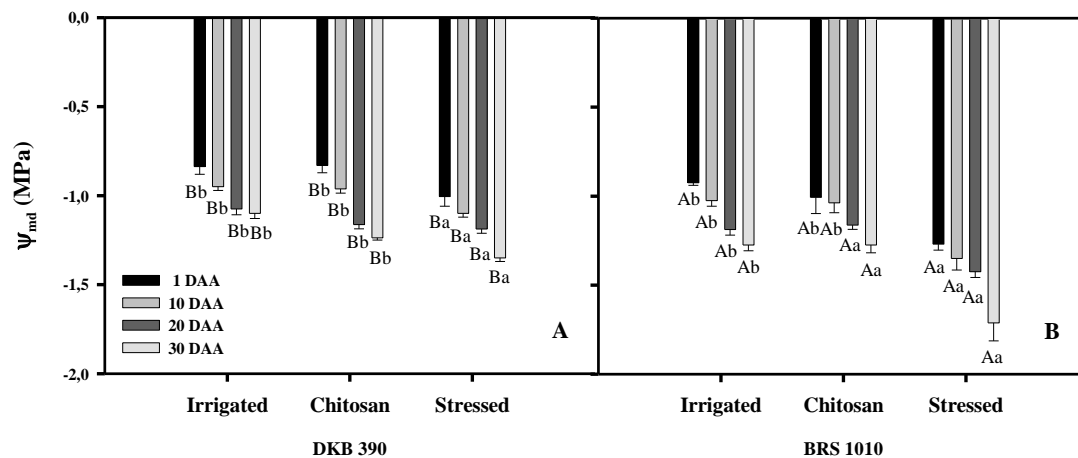


Fig. 4: Potencial hídrico médio foliar (Ψ_{md}) durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

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 ($P \leq 0,05$).

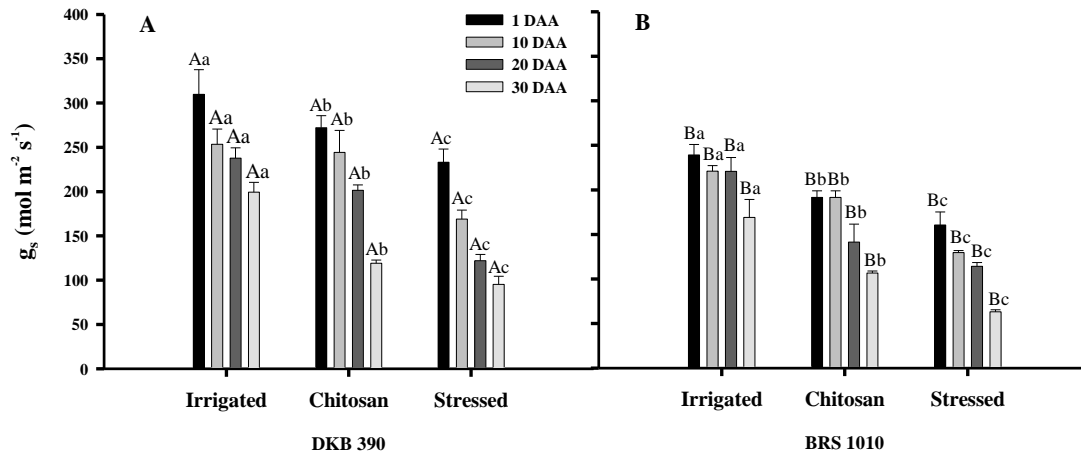


Fig. 5: Condutância estomática (g_s) durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

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 ($P \leq 0,05$).

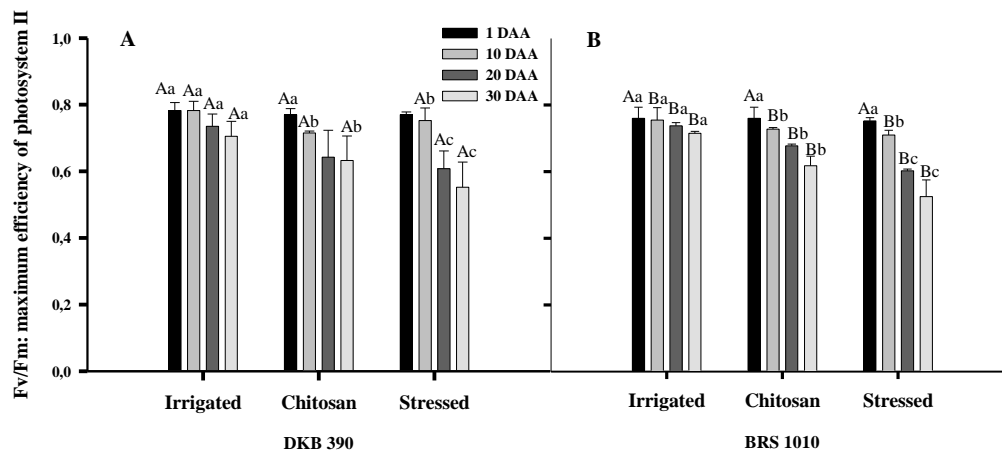


Fig. 6: Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), durante a imposição do estresse em dois híbridos contrastantes a seca (DKB 390 e BRS 1010) submetidos a diferentes tratamentos.

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 cm²); 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
TDB	275,3 Aa	215,1 Ab	192,65 Ac	229,3 Ba	198,7 Bb	185,7 Bc
EL	12,76 Aa	13,29 Aa	10,52 Ab	14,58 Aa	12,96 Ab	11,25 Ac
ED	49,34 Aa	45,91 Ab	41,39 Ac	44,52 Ba	41,9 Bb	39,42 Bc
NGR	16,99 Aa	16,72 Aa	15,44 Ab	14,55 Ba	14,36 Ba	13,63 Bb
NGE	28,61 Aa	26,37 Ab	22,55 Ac	25,96 Ba	23,6 Bb	20,26 Bb
W100	35,2 Aa	31 Ab	25,67 Ac	34,95 Ba	28,32 Bb	23,35 Bc
GY	150,88 Aa	93,92 Ab	68,04 Ac	112,14 Ba	80,33 Bb	48,52 Bc
HI	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⁻¹); HI: índice de colheita (g g⁻¹).

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 ($P \leq 0,05$).