

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VALQUÍRIA MIKAELA RABÊLO

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE HÍBRIDO DE MILHO
SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO COM APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA
E SEUS DERIVADOS**

Alfenas/MG

2018

VALQUÍRIA MIKAELA RABELO

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE HÍBRIDO DE MILHO
SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO COM APLICAÇÃO FOLIAR DE QUITOSANA
E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais pela
Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG.

Orientador: Dr. Thiago Corrêa de Souza

Coorientador: Dr. Paulo César Magalhães

Colaboradores: Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho

Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Letícia Aparecida Bressanin

Alfenas/MG

2018

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

R114r Rabelo, Valquíria Mikaela
Respostas bioquímicas e fisiológicas de híbrido de milho
submetido ao déficit hídrico com aplicação foliar de quitosana e seus
derivados / Valquíria Mikaela Rabelo -- Alfenas/MG, 2018.
61 f.: il. --

Orientador: Thiago Corrêa de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade
Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Quitosana. 3. Antioxidantes. I. Souza, Thiago
Corrêa de. II. Título.

CDD-572

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3705-9685 (Coordenação) / (35) 3704-9262 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



VALQUÍRIA MIKAELA RABELO

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE HÍBRIDO DE MILHO SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO COM APLICAÇÃO

FOLIAR DE QUITOSANA E SEUS DERIVADOS

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

Aprovada em: 05 de julho de 2018.

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori

Instituição: UFLA

Assinatura:

Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Dedico este trabalho a minha filha Maria Eduarda, e ao meu namorado Lucas que sempre acreditaram em mim e foram grandes incentivadores neste progresso.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me iluminou e guiou meus passos.

Ao meu namorado Lucas, que me faz viver o amor. Que sempre me apoiou e incentivou. Muito obrigada amor, pelo carinho, apoio e compreensão nas horas de alegrias e dificuldades. Obrigada por me ajudar a direcionar minha vida profissional. Seu amor e seu apoio me faz ser mais forte.

A minha filha Maria Eduarda, que tantas vezes precisou ficar longe para que eu concluísse meus estudos, mas mesmo assim sempre estava ao meu lado, pois, sabe que tudo que faço é pensando no futuro dela.

Ao meu orientador Thiago que foi mais que um orientador, foi um amigo. Muito obrigada por me fazer viver a ciência, pelos ensinamentos transmitidos neste período.

As minhas amigas Sônia e Patrícia que sempre me apoiaram.

A minha família, que me apoiou e ajudou com a Maria Eduarda.

Ao professor Plínio por todos os ensinamentos bioquímicos.

Ao pesquisador Paulo César e a Embrapa Milho e Sorgo, pelo acolhimento e ensinamentos.

A equipe do Laboratório de Bioquímica, onde nele passei grande parte do meu mestrado. Obrigada por deixarem meus dias mais alegres.

Ao Técnico George e Gabriel, pelos ensinamentos, vocês foram muito importantes para meu desenvolvimento.

As amigas e companheiras de Laboratório Letícia Bressanin e Maria Carolina. Obrigada pela ajuda, pelas conversas e apoio.

Ao BIOGEN. Laboratório com pessoas excelentes. Gratidão por tudo e principalmente pela humanidade.

A secretária do Programa de Ciências Ambientais, Denise. Você é muito importante para todos do programa.

A Universidade Federal de Alfenas, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Coordenador do Programa Rogério Grassetto por toda dedicação com o curso.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPEMIG e CNPq pelo financiamento do projeto (APQ-00651-14).

“Há um ditado chinês que diz que, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando um pão, ao se encontrarem, eles trocam os pães; cada um vai embora com um. Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando uma ideia, ao se encontrarem, trocam as ideias; cada um vai embora com duas. Quem sabe, é esse mesmo o sentido do nosso fazer: repartir ideias, para todos terem pão...”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

Em condições de casa de vegetação, o híbrido BRS 1030 (sensível a seca) foi submetido a déficit hídrico. Neste estudo, levantamos a hipótese de que a aplicação da quitosana e seus derivados nas folhas seriam capazes de minimizar os efeitos da imposição do déficit hídrico, associando uma proteção antioxidante eficaz através de mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. Alguns estudos já evidenciaram que a quitosana induz uma certa tolerância e proteção as plantas. A mesma, em outros estudos conferiu uma maior atividade das enzimas antioxidantes, dos compostos fenólicos e prolina. A quitosana apresenta uma estrutura química nucleofílica o que a torna propícia a modificações estruturais. Tais modificações podem conferir um reconhecimento mais rápido dos seus sítios na célula vegetal, proporcionando uma cascata de reações químicas que conferem a ativação de mecanismos de defesa a planta contra o déficit hídrico. A quitosana e seus derivados (N-succinoílico (SUC) e N, O-dicarboximetílico (MCA)) foram aplicadas no híbrido BRS 1030 através de pulverização foliar no estágio de pré- florescimento. Após a aplicação as plantas foram induzidas ao déficit hídrico por 15 dias. As análises de trocas gasosas foram realizadas no primeiro e décimo quinto dia de déficit hídrico, através de um sistema portátil de fotossíntese. Para este parâmetro avaliou-se a taxa fotossintética e a condutância estomática das plantas. Para as análises bioquímicas foram coletas as folhas da espiga no primeiro e décimo quinto dia de déficit hídrico. A aplicação dos derivados e da quitosana potencializaram as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e guaicol peroxidase; e de moléculas osmoprotetoras como prolina, açúcares solúveis totais, aminoácidos totais e amido. A aplicação dos derivados conferiu principalmente uma maior atividade fotossintética e condutância estomática e defesa antioxidante evidenciando uma maior indução a tolerância ao déficit hídrico.

Palavras – chave: *Zea mays* L. Bioestimulantes. Antioxidantes

ABSTRACT

Under greenhouse conditions, hybrid BRS 1030 was submitted to water deficit. In this study, we hypothesized that the application of chitosan and its derivatives in the leaves would be able to minimize the effects of water deficit imposition, associating an effective antioxidant protection through enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms. Some studies have already shown that chitosan induces a certain tolerance and protection of plants. The same, in other studies conferred a higher activity of antioxidant enzymes, phenolic compounds and proline. Chitosan has a chemical structure of nucleophile, which makes it possible for structural modifications. Such modifications may confer a faster recognition of their sites in the plant cell, providing a cascade of chemical reactions that confer the activation of plant defense mechanisms against water deficit. Chitosan and its derivatives (N-succinoylic (SUC) and N, O-dicarboximethyl (MCA)) were applied to the BRS 1030 hybrid by foliar spraying at the pre-flowering stage. After the application the plants were induced to the water deficit for 15 days. The gas exchange analyzes were performed on the first and fifteenth day of water deficit, using a portable photosynthesis system (IRGA, Model LI-6400 XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). For this parameter the photosynthetic rate and the stomatal conductance of the plants were evaluated. For the biochemical analyzes the leaves of the spike were collected on the first and fifteenth day of water deficit. The application of the chitosan and chitosan derivatives potentiated the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase and guaicol peroxidase; and of osmoprotective molecules like proline, total soluble sugars, total amino acids and starch. The application of the molecules conferred a greater photosynthetic activity and stomatal conductance evidencing a greater induction of this plant the tolerance to the water deficit.

Key words: *Zea mays* L. Biostimulants. Antioxidants

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO PLANTAS.....	13
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	14
2.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO.....	16
2.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD EC 1.15.1.1)	16
2.3.2 CATALASE (CAT EC1.11.1.6)	16
2.3.3 ASCORBATO PEROXIDASE (APX EC1.1.11.1)	17
2.3.4 GLUTATIONA REDUTASE (GR EC1.6.4.2)	17
2.3.5 GUAIACOL PEROXIDASE (GPX EC 1.11.1.9)	18
2.3.6 REDUTASE DEIDROASCORBATO (DHAR, EC 1.15.1.1)	18
2.3.7 FENILALANINA AMÔNIALIASE (FAL EC 4.3.1.5) E TIROSINA AMÔNIALIASE (TAL, EC 4.3.1)	19
2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO.....	19
2.4.1 AMINOÁCIDOS EM PLANTAS.....	19
2.4.2 PROLINA.....	20
2.4.3 AÇÚCARES TOTAIS EM PLANTAS.....	20
2.4.4 AMIDO EM PLANTAS.....	21
2.4.5 COMPOSTOS FENÓLICOS ME PLANTAS.....	22
2.5 BIOESTIMULANTES.....	22
2.6 QUITOSANA.....	23
3.7 EFEITO DA APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM PLANTAS.....	25
3 JUSTIFICATIVA.....	28
4 OBJETIVOS.....	30
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO II: AUMENTO DAS TROCAS GASOSAS, DEFESA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO PRIMÁRIO EM MILHO SENSÍVEL AO DÉFICIT HÍDRICO ATRAVÉS DA APLICAÇÃO FOLIAR DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE QUITOSANA.....	37

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

As alterações climáticas provocaram grandes impactos ao meio ambiente. Prevê-se que as temperaturas médias globais do ar aumentem em média 0,3-0,6 ° C por década no próximo século, com as ondas de calor se tornando mais frequentes e intensas (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas-IPCC, 2013). Frente a estas ondas de calor e ao aumento da temperatura na Terra, o ciclo hídrico sofreu sérios impactos e sua disponibilidade tornou-se um sério problema, gerando a preocupação de comunidades científicas, governo e da sociedade (JIANPING, 2015).

Um dos setores impactados pelas alterações climáticas é a agricultura, uma vez que os rendimentos das culturas são influenciados pela duração do período de crescimento, sendo este determinado pela temperatura e manejo agrônômico (HE et al., 2015). Dessa forma a escassez de chuvas pode impactar negativamente na produção final das culturas, aumentando a prevalência de estresses abióticos (PERDOMO et al., 2017).

A fim de minimizar a perda de culturas agrícolas, as áreas de agricultura irrigadas aumentaram no mundo, entretanto a mesma passou a utilizar mais de 70% das águas dos rios. Ressalva-se que este tipo de agricultura é inviável, devido a diminuição dos recursos hídricos e a competição por água limpa (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura-FAO, 2002).

Culturas como o milho, apresentam grande interesse econômico mundial, sendo amplamente utilizado tanto para produção de alimentos humanos quanto animal, contudo seu rendimento vem sendo afetado devido as alterações climáticas. Em 2015 o Brasil apresentou uma grande queda na produção desta cultura, e o clima seco foi um dos principais responsáveis pela perda de produção (CONAB, 2015).

A limitação hídrica no solo induz o estresse osmótico nas plantas, diminuindo o volume celular, inibindo as enzimas do Ciclo de Calvin, provocando danos no aparato fotossintético, e diminuição da assimilação de carbono (PORCEL et al. 2015). O déficit hídrico aumenta a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio e superóxido, podendo alterar totalmente o ciclo fisiológico da planta (APEL; HIRT, 2004).

Para minimizar os efeitos da seca em milho e buscar uma agricultura sustentável e menos impactante ao meio ambiente pesquisas vem sendo

desenvolvidas utilizando a aplicação de biopolímeros, como a quitina/quitosana. Os biopolímeros apresentam baixa ou nenhuma toxicidade ao meio ambiente e podem conferir tolerância à seca (IBRAHIM, 2015).

A quitina é o segundo polissacarídeo, mais abundante na natureza e sua desacetilação resulta no produto quitosana, que vem sendo utilizado em cultivos agrícolas, inclusive no milho (MÁRMOL et al., 2013), devido ao seu potencial elicitador, antifúngico, protetor e amenizador do déficit hídrico (SAHARAN, 2016).

Entretanto a maioria dos trabalhos envolvendo a quitosana estão direcionados à área médica e farmacêutica. Na agricultura a mesma é mais utilizada no combate a patógenos e na permeabilização de alimentos para sua conservação (RAMÍREZ et al. 2010). Neste contexto é importante que se tenham pesquisas que analisem os efeitos e os mecanismos de ação da quitosana e de seus derivados em milho submetido a déficit hídrico. Contribuindo assim para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e menos impactante ao meio ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE MILHO

O déficit hídrico ou seca é um dos principais estresses abióticos que limitam o crescimento das plantas e a produtividade das culturas (PERDOMO et al. 2017).

Assim que o déficit hídrico se intensifica, o potencial de água nas folhas começa a decrescer, diminuindo o volume celular, inibindo as enzimas do Ciclo de Calvin, impedindo assim o acréscimo da concentração de solutos estomáticos, e por conseguinte a inibição regulatória ou dano do aparato fotossintético (SUN et al., 2017).

A intensificação do déficit hídrico diminuiu o potencial de água nas folhas, diminuindo o volume celular, inibindo as enzimas do Ciclo de Calvin (concentração de substratos e possível cristalização proteica), impedindo assim o acréscimo da concentração de solutos das células estomáticas, e por conseguinte a inibição regulatória ou dano do aparato fotossintético (DO CARMO, 2009). Estas alterações diminuem a assimilação do carbono, provocando um acúmulo de ATP e NADPH que associados a alta radiação provocam um excesso de energia na antena dos fotossistemas (principalmente no fotossistema II) (DE SOUZA et al., 2013).

A baixa disponibilidade de água no solo interrompe o gradiente de potencial de hídrico solo-planta-atmosfera (CASSANA, 2016). Esta interrupção ocasiona o Ponto de Murchamento Permanente (PMP), onde as plantas apresentam turgescência nula mesmo à noite, propiciando o fechamento dos estômatos a fim de evitar a transpiração excessiva (saída de água) (KERBAUY, 2008). O fechamento dos estômatos limita também a assimilação do carbono (entrada de gás carbônico com subsequente fixação) (TAIZ E ZEIGER, 2010; MARTIN - STPAUL; DELZON; COCHARD, 2017

Sob déficit hídrico, as clorofilas recebem grande quantidade de energia e os pigmentos fotoprotetores (caroteóides e xantofilas) não conseguem dissipar toda a energia em forma de calor. Dessa forma, parte desta dissipação vai para o oxigênio formando as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que em maiores concentrações gera o estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010).

O déficit hídrico, pode afetar diversas fases fenológicas do milho. Quando atinge a fase de germinação o estresse provoca a redução de plantas por estande. Já em fase vegetativa ocorre a redução da área foliar e da taxa fotossintética. Em estágio V5 o déficit hídrico afeta o potencial produtivo, uma vez que é nesta fase que ocorre

a diferenciação floral. E na fase de florescimento a seca reduz o número de grãos e induz a senescência das folhas reduzindo a assimilação de nutrientes para os grãos (MAGALHÃES, 2006).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio e a água são substâncias essenciais para manutenção da vida na Terra. Entretanto, este elemento pode apresentar alguns efeitos adversos aos organismos aeróbicos. As altas concentrações de O_2 atmosférico podem inibir ou inativar enzimas (AHMAD, 2013). Dessa forma as EROs são compostos químicos resultantes da absorção de energia ou transferência de elétrons do oxigênio molecular (CHOUDHURY et al., 2017).

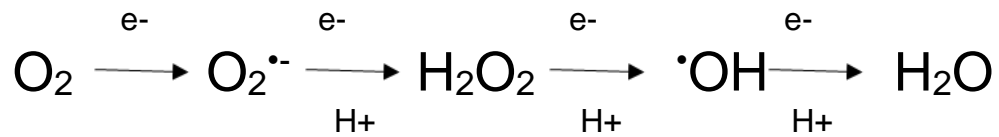
Pesquisas passadas retratavam as EROs, como subprodutos tóxicos do metabolismo, entretanto com o avanço científico, sabe-se que as EROs quando em pequenas concentrações, atuam como mensageiros na célula, provendo uma cascata de reação que podem levar a tolerância a estresses bióticos e abióticos (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014).

O equilíbrio entre a produção e eliminação das EROs pode ser alterado por estresses bióticos e abióticos na planta, provocando um aumento da concentração destas moléculas nos compartimentos celulares, gerando um estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004; BARBOSA et al., 2014). As EROs são formadas em diferentes compartimentos celulares como: cloroplasto, mitocôndrias, peroxissomas, apoplasto (ROYCHOUDHURY; BASU; SENGUPTA, 2012).

As EROs se formam pelo oxigênio molecular (O_2) através de absorção energia ou transferência de elétrons. A redução do oxigênio em água resulta na formação de EROs devido a transferência unieletrônica de 4 elétrons promovendo as espécies reativas: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), sendo este último altamente reativo e com alto potencial destrutivo as células.

O radical de hidroxila pode ser gerado em presença de metais de transição (Fe^{+2} , Cu^{+1} , Mn^{+2}) pela redução de $O_2^{\cdot-}$ ou na decomposição de H_2O_2 (reação de Haber-Weiss e reação de Fenton), como apresentado na Figura 1 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Figura 1: Reação de Haber-Weiss



Fonte: a autora

Já o oxigênio singlete é uma EROs atípica que não é gerado por transferência de elétrons a O_2 , mas sim por meio da reação de estado da clorofila no sistema antena com o O_2 , assim esta EROs pode colocar em risco todo o aparato fotossintético (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

A tabela 1 apresenta as principais espécies reativas de oxigênio, local de sua formação, modo de ação e remoção nas células.

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio: produção, ação e remoção nos compartimentos celulares

ESPÉCIE REATIVA	PRODUÇÃO	MODO DE AÇÃO	REMOÇÃO
Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Membrana Cloroplasto Mitocôndria	Reativo, com ligação dupla em componentes como Fe e S	SOD
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Membrana Cloroplasto Mitocôndria Peroxisomo	Reativo, oxida proteínas e forma OH^\bullet através do $\text{O}_2^{\cdot-}$	Flavonoides e prolina
Hidroxila (OH^\bullet)	Membrana Cloroplasto Mitocôndria	Altamente reativa	CAT, POXs, flavonoides
Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)	Membrana Cloroplasto Mitocôndria	Reativo, oxida proteínas e DNA	Carotenóides e α -tocoferol

Fonte: (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Todas as EROs são reativas e citotóxicas. A nível molecular, grandes concentrações de EROs pode promover a oxidação do DNA, remoção de nucleotídeos, modificação de bases e ligações cruzadas do DNA (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al. 2012).

2.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

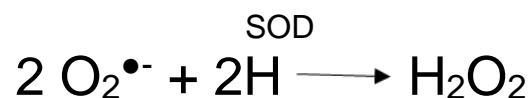
Para combater o estresse oxidativo provocado pelas EROs, as plantas desencadeiam uma transdução de sinal que visa promover ajustes metabólicos e uma maior atividade de enzimas antioxidantes. Assim, o sistema antioxidante é caracterizado por componentes enzimáticos, que atuam na neutralização das EROs, prevenindo danos aos componentes celulares e mantendo a homeostase (SHARMA et al. 2012).

2.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD EC 1.15.1.1)

A SOD é a primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante enzimático, removendo o superóxido, eliminando a possibilidades da formação do radical hidroxila (LUIS et al. 2018).

Esta enzima é denominada metaloenzima, sendo encontrada em três diferentes formas de acordo com o componente metálico que está associada: Mn-SOD (localizada nas mitocôndrias), Fe-SOD (localizada nos cloroplastos) e Cu / Zn-SOD (localizada no citosol, peroxissomos e cloroplastos) (LU; WANG; LIU 2015). Temos como produto final da ação da SOD o peróxido de hidrogênio (Fig. 2). (DEUNER et al. 2008).

Figura 2: Reação de ação da enzima superóxido dismutase



Fonte: a autora

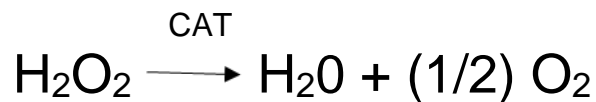
Assim, a SOD está intimamente ligada com a atividade da enzima catalase e peroxidase, mantendo a interação com tais enzimas reduzindo os riscos de danos oxidativos (DEUNER et al. 2008).

2.3.2 CATALASE (CAT EC1.11.1.6)

A CAT é a única enzima que degrada o peróxido de hidrogênio em molécula de água e oxigênio, não requerendo um equivalente redutor (Fig. 2) (MALLICK; MOHN,

2000). Nas plantas são encontradas três isoenzimas: CAT 1 responsável por 80% da atividade desta enzima produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos, está localizada no interior dos peroxissomos e citossol; CAT 2, encontrada nos tecidos vasculares; CAT 3 encontrada no mesófilo da folha, entretanto em milho a CAT 3 é encontrada nas mitocôndrias (SCANDALIOS et al., 2000; MHAMDI et al., 2010). A CAT remove o H_2O_2 de maneira eficiente em termos energéticos.

Figura 2: Reação de ação da enzima catalase

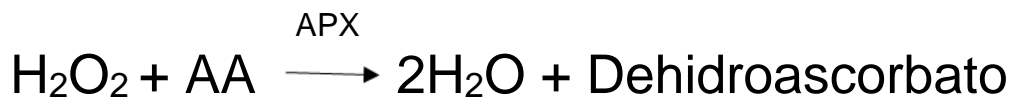


Fonte: a autora

2.3.3 ASCORBATO PEROXIDASE (APX EC1.1.11.1)

A APX é um componente integral do ciclo Ascorbato-Glutationa (AA-GSH). Esta enzima utiliza o ácido ascórbico (AA) como seu doador de elétrons para reduzir H_2O_2 à água (Fig. 3), desempenhando sua função principalmente no citosol e cloroplastos, esta enzima é possuidora de isoformas denominadas de acordo com seu compartimento: mitocôndria (miAPX), peroxissomo/glioxissomo (mAPX), cloroplastos (chlAPX) e no citosol (cAPX) sendo este último compartimento possuidor da função fisiológica de proteção as plantas sob as diversas condições de estresse (SHARMA et al. 2012).

Figura 3: Reação de ação da enzima ascorbato peroxidase



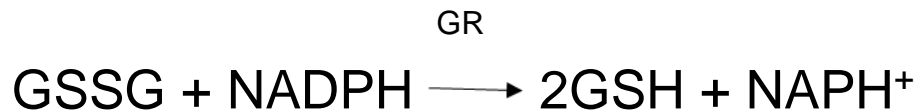
Fonte: a autora

2.3.4 GLUTATIONA REDUTASE (GR EC1.6.4.2)

A GR é responsável por manter os níveis de glutathiona reduzida (GSH). Dessa forma é importante que a GR esteja ativa nos compartimentos celulares, uma vez que a GSH evita a oxidação de tióis, evitando que estes reajam com as EROs. A GR utiliza o NADPH para reduzir a glutathiona oxidada (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH) (Fig.

4). A GR, uma enzima crucial do ciclo Ascorbato-Glutationa. É encontrada nos compartimentos mitocondriais e no citossol (DAS, ROYCHOUDHURY, 2014; HERRERO, 2015).

Figura 4: Reação de ação da enzima glutaciona redutase



Fonte: a autora

2.3.5 GUAIACOL PEROXIDASE (GPX EC 1.11.1.9)

É considerada uma enzima chave para a remoção de H_2O_2 , pois remove o excesso desta EROs tanto em condições de estresse como em condições normais da planta. Esta enzima utiliza compostos aromáticos como guaicol para doadores de elétrons. A GPX também desempenha um papel fundamental na síntese de lignina. A enzima GPX catalisa o H_2O_2 usando a glutaciona reduzida (GSH), e, em seguida, estabelece a regeneração da GSSG que é executado pela glutaciona redutase (Fig. 5) (GIL, TUJETA, 2010; DAS, ROYCHOUDHURY, 2014).

Figura 5: Reação de ação da enzima guaicol peroxidase

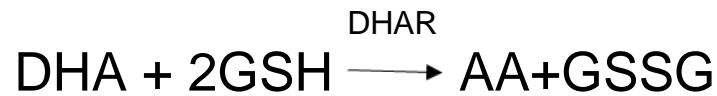


Fonte: a autora

2.3.6 REDUTASE DO DEIDROASCORBATO (DHAR, EC 1.15.1.1)

A enzima redutase do deidroascorbato desempenha um papel de defesa contra o H_2O_2 , regenerando o ácido ascórbico em uma reação que requer GSH (Fig. 6). A DHAR mantém o pool reduzido de AA para a eliminação de H_2O_2 no ciclo AA-GSH (ELTAYEB et al., 2007). Estudos revelaram que a alta expressão de DHAR aumentaram a tolerância ao sal em *Arabidopsis* e ao déficit hídrico em plantas de tabaco (USHIMARU et al., 2006; ELTAYEB et al., 2006).

Figura 6: Reação de ação da enzima redutase do deidroascorbato



Fonte: a autora

2.3.7 FENILALANINA AMÔNIALIASE (FAL EC 4.3.1.5) E TIROSINA AMÔNIALIASE (TAL, EC 4.3.1)

A FAL e a TAL são enzimas situadas entre os metabolitos primários e secundários, e estão relacionadas com a síntese da via dos fenilpropanóides. Via importante para a síntese de compostos fenólicos que também atuam como antioxidantes (HATFIELD et al. 2009). A FAL é considerada uma das enzimas mais importantes na regulação do metabolismo secundário. Ela é responsável pela produção de ácidos trans-cinâmico e a TAL por ácido p-cumárico. Estes ácidos são incorporados na formação de diferentes compostos fenólicos, os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (KUHN, 2007; SCHWAN-ESTRADA et al. 2008; HATFIELD et al. 2009).

2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO

O sistema antioxidante não enzimático, é constituído por componentes como: ácido ascórbico, α -tocoferol, glutathiona, carotenóides, fenólicos, flavonóides e aminoácidos totais, prolina entre outros formando a outra metade do maquinário antioxidante em plantas. Os antioxidantes não enzimáticos desempenham um papel vital no desenvolvimento das plantas através de moduladores da mitose, alongamento celular, senescência e morte celular. Entretanto estes antioxidantes funcionam como “buffers redox” na eliminação de EROs (DE PINTO; DE GARA, 2004; NOCTOR, 2005).

2.4.1 AMINOÁCIDOS EM PLANTAS

Os aminoácidos fazem parte do metabolismo das plantas desempenhando funções biológicas e fisiológicas. Suas funções estão relacionadas a síntese de proteínas, compostos intermediários dos hormônios vegetais endógenos, efeito complexante em nutrientes e outros agroquímicos e maior resistência ao estresse hídrico (CASTRO; CARVALHO, 2014).

Os aminoácidos são responsáveis pelo transporte de nitrogênio em plantas. Pesquisas demonstraram que o acúmulo de aminoácidos em folhas podem ser considerados um sinal de tolerância das plantas frente a estresses ambientais, principalmente em condições de déficit hídrico (CARVALHO, 2005)

2.4.2 PROLINA

Um dos mecanismos mais eficazes frente aos déficit hídrico em plantas é o ajustamento osmótico, que ocorre através do acúmulo de solutos compatíveis com o metabolismo celular. Dentre estes solutos citamos o aumento do osmorregulador prolina (SERVET, et al., 2012).

Em estudos com milho em condições de estresse abióticos, observa-se que a prolina é um importante osmorregulador para indução de tolerância (ASHRAF; FOOLAD, 2007; SANDHY, et al., 2010; TERZI et al., 2015).

Neste contexto a prolina é um importante aminoácido de estudo em plantas submetidas a estresses ambientais, principalmente aquelas sob estresse salino e déficit hídrico, sendo considerada também como antioxidante não enzimático. Os níveis de prolina variam de espécie para espécie, entretanto pesquisas constaram que plantas submetidas a estresse hídrico podem aumentar 100 vezes mais suas concentrações de prolina em seus compartimentos celulares (BORGIO; MARUR; VIEIRA, 2015; PER et al. 2017).

Este osmorregulador é eficiente na eliminação de OH^{\bullet} e $^1\text{O}_2$, podendo inibir os danos causados pela peroxidação lipídica (DAS,ROYCHOUDHURY, 2014). A síntese de prolina no citosol e cloroplasto, enquanto a degradação ocorre apenas nas mitocôndrias (ZANELLA et al. 2016).

2.4.3 AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS EM PLANTAS

Os açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) desempenham um papel importante na estrutura geral e no crescimento das plantas. Estes são os reguladores de processos fisiológicos, como: fotossíntese, germinação de sementes, floração, senescência entre outros sob estresses abióticos (SAMI et al., 2016).

Estudos mostraram que o acúmulo de açúcares solúveis totais aumentaram o conteúdo de prolina e estimularam a atividade de enzimas antioxidantes sob estresse abiótico (HELLMAN et al., 2000; HU et al., 2012; SINGH et al., 2015).

O acúmulo de açúcar impede a oxidação de células da membrana sob deficiência de água, mantêm a turgidez das folhas e previne a desidratação de membranas e proteínas (KRASENSKY; JONAK, 2012; ARABZADEH, 2012).

Em condições de estresse as plantas podem acumular carboidratos na forma de açúcares solúveis. O potencial osmótico da célula pode ser ajustado aumentando a concentração de açúcar solúvel total podendo diminuir o potencial de água das células sem inibir a função das enzimas e não reduzindo a turgidez da célula. Em situações de déficit hídrico as concentrações de açúcares auxiliam na manutenção e estabilidade da membrana, além de manter as proteínas de modo a permanecerem funcionais (LIPIEC et al. 2013; GIDEON; RICHA; ADEKUNLE, 2016).

2.4.4 AMIDO EM PLANTAS

O amido é formado por cadeias de alfa-D-glucose, existindo em duas formas: linear (amilose) ou ramificadas (amilopectina). O grão do milho apresenta aproximadamente 25% de amilose e 75% de amilopectina (STREB; EICKE; ZEEMAN, 2012).

A luz absorvida pela fotossíntese é convertida em energia química, sendo parte desta energia acumulada em forma de amido dentro dos cloroplastos. Plantas de milho e aveia entretanto, reservam parte dos carboidratos excedentes no interior dos vacúolos em forma de sacarose acumulando pouco amido (SPARLA, 2015).

O amido apresenta a função de sustentar o metabolismo da planta. Neste contexto o amido é uma forma eficiente de armazenamento de carboidratos pelas plantas, podendo este ser utilizado em situações onde não haja presença de luz ou ainda em condições de estresse (ZANELLA et al., 2016).

As β -amilases são as únicas enzimas que produzem a β -maltose, conectando assim a degradação do amido nos cloroplastos com o metabolismo do açúcar no citoplasma. (SANTELIA; TROST; SPARLA, 2015).

2.4.5 COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS

Os compostos fenólicos fazem parte do metabolismo secundário das plantas, sendo amplamente reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, conferindo o equilíbrio do metabolismo celular, minimizando os efeitos de estresse oxidativo nas células vegetais. Os flavonoides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético (AHMAD et al., 2016; MACHEIX, 2017).

A propriedade antioxidante dos compostos fenólicos, está associada a sua capacidade de quelar íons metálicos, envolvidos na produção de radicais livres e no seu potencial de interação com proteínas, sequestrando radicais livres como o $O_2^{\bullet-}$, (ASIF, 2015).

Alguns compostos fenólicos também apresentam propriedades aleloquímicas, reduzindo o crescimento de plantas adjacentes, ou conferindo resistência física aos vegetais, como a lignina (GOYAL et al., 2012).

2.5 BIOESTIMULANTES

Segundo Du Jardim (2015) biostimulantes é uma denominação usada a qualquer substancia ou micro-organismos que promova a tolerância frente a estresses bióticos ou abióticos em plantas.

Um bioestimulante de plantas é qualquer substância ou micro-organismo, que quando aplicado em plantas melhora sua nutrição e uso eficiente de nutrientes, auxiliando e promovendo a tolerância aos estresses bióticos e / ou características de qualidade da cultura, independentemente de seu conteúdo de nutrientes (DU JARDIM, 2015 p. 3).

Os bioestimulantes promovem o crescimento de plantas, estimulam a expressão de genes, a produção de ácido abscísico, a produção de enzimas como, superóxido dismutase, catalase e fenilalanina amônialiase (PAL). Promovem ação protetora no fotossistema II. Em culturas os bioestimulantes proporcionam um maior

rendimento, além de minimizar o uso de agroquímicos prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014; BEHIE; BIDOCHKA, 2014; HALPERN et al., 2015; DU JARDIN, 2015).

Os bioestimulantes são classificados de acordo com seu componente base, estando assim dividido em três grupos: Bioestimulantes compostos de substâncias húmicas, biostimulantes contendo hormônios e bioestimulantes contendo aminoácidos. (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014; DU JARDIN, 2015).

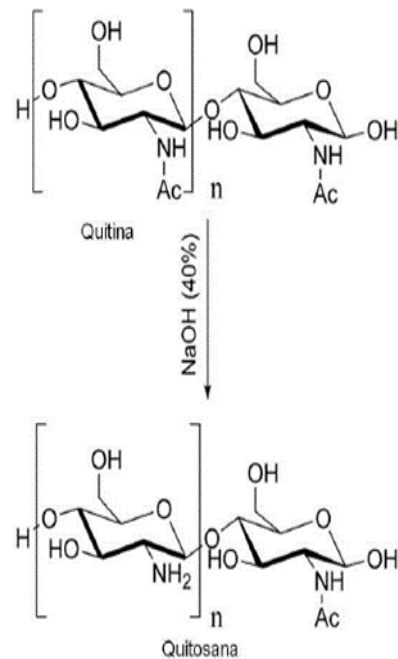
2.6 QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando apenas atrás da celulose; Esta quitina pode ser extraída de diversas fontes como: exoesqueleto de crustáceos, insetos, e nas paredes celulares de fungos principalmente da classe Zygomycetes (AZEVEDO et. al., 2007).

O nome de quitosana foi proposto em 1894, por Hoppe-Seyler, onde analisando a quitina modificada, observou-se que ambas possuíam a mesma quantidade de nitrogênio (STAMFORD et al., 2008). Este biopolímero hidrofílico é formado por duas moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (RABEA, 2003).

A quitosana é obtida por desacetilação (hidrólise de amida) da quitina através de processos biológicos (desacetilação enzimática) (BENGER, STAMFORD, STAMFORD, 2011), ou ainda através de processos químicos utilizando-se NaOH entre (40% a 50%) em temperatura de 110° C (BADAWY; RABEA 2011) A figura 7 mostra o processo de desacetilação da quitina em produção industrial.

Figura 7. Processo de formação da quitosana (desacetilação) através da quitina.



Fonte: Rabea (2003)

Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes, a quitosana pode ser facilmente solubilizada em ácidos orgânicos ou inorgânicos. Este polissacarídeo apresenta uma boa biocompatibilidade, sendo praticamente nula sua toxicidade ao ser humano e animais e plantas (BADAWY, RABEA 2011). Segundo Martins et al., (2018) a quitosana não apresentou efeito tóxico em na germinação de híbridos de milho.

O grupo amino da quitosana é desacetilado, apresentando permeabilidade seletiva e ação polieletrólítica, além de sua ótima atividade antimicrobiana e habilidade para formação de gel e filme (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

A quitosana apresenta um comportamento nucleófilo, tornando-a propícia a modificações químicas estruturais e dentre as principais modificações pode-se obter acetilações, quaternizações, alquilações, carboxilações, acilações, sulfonações e amidações (TAKAKI, 2015).

A síntese dos derivados de quitosana por meio da inserção de grupos funcionais à cadeia polimérica, confere a este polímero diferentes propriedades

permitindo sua utilização em áreas médicas, biotecnológicas, farmacológicas e agrícolas (XU et al., 2010).

2.7 EFEITO DA APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM PLANTAS

As pesquisas utilizando quitosana na agricultura, iniciaram-se através de estudos promovidos por Hadwiger e Beckman (1980). A pesquisa compreendida utilizou a aplicação da quitosana em ervilhas (*Pisum sativum*). Resultados demonstraram que a quitosana apresentou propriedades elicitoras na promoção de defesa contra o patógeno fúngico *Fusarium solani*.

A partir de tal estudo iniciaram-se as pesquisas de como este bioestimulante atua nas células vegetais. Neste contexto a quitosana vem sendo descrita como "impulsionadora da defesa das plantas" (KATIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015). Tal descrição pode ser conferida, pois a mesma apresenta em sua constituição química nucleotídeos açúcares (difosfato de uridina *N-acetil- d glucosamina* (UDP-GlcNAc)), que quando aplicada em plantas, a célula reconhece este sítio através das enzimas: sintetase de quitina e quitosano quitina deacetilase. Estas enzimas reconhecem os resíduos de *N-acetil glucosamina* β -1,4-ligadas e clivam estas regiões, produzindo oligômeros (HADWIGER, 2013).

Os oligômeros de quitosana agem sobre a transmissão de genes de defesa da planta, proporcionando uma alteração da estrutura do DNA helicoidal, clivando cadeias simples e removendo histonas H2A e H2B, juntamente com a redução do fator de transcrição de arquitetura. Este processo permite com que a polimerase bloqueada continue a transcrever através dos quadros de leitura abertos de genes PR, promovendo assim uma cascata de reações químicas no interior da célula (KIM et al. 2005; HADWIRGER, 2013).

A quitosana possui cargas iônicas positivas, o que lhe confere a capacidade de se ligar facilmente com lipídios carregados negativamente, íons metálicos, proteínas, macromoléculas. Ainda por apresentar cargas iônicas positivas a quitosana ativa genes de defesa através de alterações na cromatina (HADWIGER, 2015).

Estudos demonstraram que a aplicação da quitosana em plantas agrícolas induz a produção de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio em pequenas concentrações atua como sinalizador de estresse. Dessa

forma a planta ativa seu mecanismo de defesa enzimático e não enzimático (LEI et al., 2011).

A aplicação exógena da quitosana proporcionou uma maior atividade da enzima catalase no sistema antioxidante de plantas de jaborandi (DOUSSEAU et al. 2016). Em folhas de tabaco a quitosana induziu a produção de várias enzimas de defesa, como superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, além de aumentar a produção de óxido nítrico responsável pela ativação de quinases aumentando o sistema de defesa da planta (ZHANG et al. 2011).

Vários estudos demonstraram que a quitosana promoveu o aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-licase e de compostos fenólicos, em seu sistema de defesa antioxidante contra patógenos (BHASKARA REDDY, 1999; FAORO, 2008; IRIT et al. 2011). A quitosana combinada com óleo de cravo mostrou-se eficaz no combate ao fungo *P. digitatum* causador do bolor verde em mandarins, além de melhorar a atividade da fenilalanina amônia-licase (PAL) enzima-chave do metabolismo dos fenóis (SHAO et al. 2015).

Pesquisas demonstraram que a quitosana aliviou o processo de peroxidação lipídica e diminuiu a fitotoxicidade nas células vegetais (XU et al. 2007; CHOUDHARY et al. 2017; PIRBALOUTI et al. 2017).

Segundo Martins et al. (2018) a quitosana proporcionou um aumento na porcentagem de germinação de sementes de milho transgênicos, onde este apresentou modificações anatômicas ligadas à proteção e sobrevivência a estresses abióticos. Já estudos realizados por Lizárraga-Paulín et al., (2011) mostraram que a aplicação de quitosana em plântulas de milho submetidos a estresse abiótico proporcionou na maioria dos tratamentos um índice de germinação de 100%.

Em condições de déficit hídrico a aplicação exógena de quitosana desencadeou em *Trifolium repens* uma cascata de reações que promoveram a planta uma maior tolerância ao déficit hídrico. Neste experimento a quitosana proporcionou um maior acúmulo de açúcares, amido, ácidos orgânicos e outros metabolitos como: ascorbato, glutatona, flavonóides, putrescina e espermidina. Estes compostos estão associados ao ajuste osmótico e defesa antioxidante de plantas em condições de estresse (LI et al., 2017).

Ainda em situações de déficit hídrico a quitosana atua como anti-transpirante, estimulando a produção de ABA, provocando um fechamento estomático, que

contribuiu para aliviar o estresse fisiológico da planta em condições de seca (IRITI, et al. 2009).

A quitosana estimula o crescimento da planta, aumenta o número de ramificações da parte aérea, o número de folhas e biomassa (MONDAL, 2012). A aplicação da quitosana em plantas de morango, proporcionou o aumento do número de frutos por plantas (ABDEL-MAWGOUD et al. 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente observa-se em noticiários e boletins técnicos que muitos produtores de milho no país tem sofrido com danos em sua produção, provenientes da exposição desta cultura ao déficit hídrico em época de safra e safrinha. Esta perda de produção se dá em decorrência de que a maioria das regiões de plantio não contam com sistema de irrigação, ficando totalmente dependentes de precipitações da época, contudo nos últimos anos estas precipitações estão ficando mais espaçadas ocasionando uma estiagem prolongada nos meses de janeiro e fevereiro.

O milho é uma cultura de grande importância econômica, já que o mesmo é utilizado tanto para alimentação humana quanto animal. A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015) emitiu uma circular mostrando que o Brasil produziu em sua safra 2015/2016 aproximadamente 79,95 milhões de toneladas de milho, mencionando ainda que “o clima foi o grande responsável pelo baixo desempenho da lavoura em todo o país (CONAB, 2015).

Para 2018 a Companhia estima uma produção de 24,74 milhões de toneladas na primeira safra, onde esta deverá ser 18,8% inferior à safra passada e de uma produção de 63,26 milhões de toneladas na segunda safra com uma redução de aproximadamente redução de 6,6% quando comparada a safra anterior (CONAB, 2018).

Frente a estas limitações hídricas, as técnicas relacionadas apenas a melhoria de cultivo estão ficando falhas, sendo um processo resultante da sua incapacidade de usar o potencial biológico intrínseco do cultivar. Neste sentido, a fim de minimizar o déficit hídrico, e consequentemente aumentar o rendimento, pesquisas estão sendo realizadas na agricultura com a utilização de bioestimulantes naturais, onde os mesmos vem apresentando resultados favoráveis a cultivares além de não apresentarem toxicidade ao meio ambiente (KOŁODZIEJCZYK et al., 2016).

Neste contexto de uma agricultura sustentável, que utilize a água de forma racional, mas que proporcione a cultura seu desenvolvimento e produção, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que levem a aumento de produtividade sob déficit hídrico e mostre, os mecanismos de tolerância destas plantas devido a aplicação de novos biopolímeros. O estudo destes mecanismos ligados a proteção antioxidante ainda pode ajudar em pesquisas de novos genótipos e novos produtos no mercado, relacionando a ação da quitosana em genótipos sensíveis à seca.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da aplicação da quitosana e seus derivados no aumento à tolerância ao déficit hídrico em genótipo de milho sensível, analisando as trocas gasosas e seu sistema antioxidante.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar 2 modificações químicas na quitosana por semissíntese: derivados *N*-succinoílico e *N, O*-dicarboximetílico;
- b) Verificar os mecanismos de defesa antioxidante enzimático e não enzimático em dois híbridos de milho submetidos a estresse hídrico, com e sem aplicação de quitosana e seus derivados na planta;
- c) Medir a taxa fotossintética e a condutância estomática nas folhas submetidas ao déficit hídrico após a aplicação da quitosana e seus derivados;
- d) Quantificar a peroxidação lipídica, teor de H₂O₂, prolina, aminoácidos, açúcares solúveis totais e amido nas folhas submetidas ao déficit hídrico após a aplicação da quitosana e seus derivados.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.R. et al. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. **European Journal of Scientific Research**, United Kingdom, v. 39, p. 170-177, 2010.
- AHMAD, P. Oxidative damage to plants, antioxidant networks and signaling. Academic. Elsevier, San Diego, 2013
- AHMAD, Naveed et al. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80-89, 2016.
- APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**., v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARABZADEH, Naser. H aloxylon persicum and H aloxylon aphyllum. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 11, n. 1, p. 44-51, 2012.
- ASIF, Mohammad. Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. **Chemistry international**, v. 1, n. 1, p. 35-52, 2015
- ASHRAF, M.; FOOLAD, MRv. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and experimental botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BARBOSA, Marta Ribeiro et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, 2014.
- BHASKARA REDDY, M. V. et al. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to Fusarium graminearum and improves seed quality. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1208-1216, 1999.
- BADAWY, Mohamed El; RABEA, Entsar I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, 2011
- BERGER, Lucia R. Ramos; STAMFORD, Thayza Ch Montenegro; STAMFORD, Newton Pereira. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.
- BEHIE, Scott W.; BIDOCHKA, Michael J. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. **Trends in plant science**, v. 19, n. 11, p. 734-740, 2014
- BORGO, Lucélia; MARUR, Celso Jamil; VIEIRA, Luiz Gonzaga Esteves. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 37, n. 2, p. 191-199, 2015

CASSANA, Francine F. et al. Effects of soil water availability on foliar water uptake of *Araucaria angustifolia*. **Plant and Soil**, v. 399, n. 1-2, p. 147-157, 2016.

CALVO, Pamela; NELSON, Louise; KLOEPPER, Joseph W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1-2, p. 3-41, 2014.

CASTRO, Paulo Roberto de Camargo; CARVALHO, Marcia Eugenia Amaral. Aminoácidos e suas aplicações na agricultura. **Piracicaba: ESALQ/USP**, 2014.

Companhia Nacional de Abastecimento. CONAB. – **Levantamento safra 2015/2016** Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_09_03_26_boletim_graos_maio_2016.pdf. Acesso em 10 de maio de 2016

CHOUDHARY, Ram Chandra et al. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9754, 2017.

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

DAS, Kaushik; ROYCHOUDHURY, Aryadeep. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 53, 2014.

DE SOUZA, Thiago Corrêa et al. The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 515-527, 2013.

DEUNER, Sidnei et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, n. 2, 2008.

DE PINTO, Maria Concetta; DE GARA, Laura. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2559-2569, 2004.

DU JARDIN, Patrick. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.

ELTAYEB, Amin Elsadig et al. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. **Physiologia Plantarum**, v. 127, n. 1, p. 57-65, 2006.

ELTAYEB, Amin Elsadig et al. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. **Planta**, v. 225, n. 5, p. 1255-1264, 2007.

Food and Agriculture Organization. FAO –. **Statistics Division**. Faostat at. <http://faostat3.fao.org/home/E>. 24 out. 2002.

FOYER, Christine H.; NOCTOR, Graham. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

FAORO, Franco et al. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. **Biocontrol**, v. 53, n. 2, p. 387-401, 2008.

GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIDEON, O. Okunlola; RICHARD, O. Akinwale; ADEKUNLE, A. Adesusi. Proline and soluble sugars accumulation in three pepper species (*Capsicum* spp) in response to water stress imposed at different stages of growth. 2016

GOYAL, Shaily et al. Secondary metabolites and plant defence. In: **Plant defence: biological control**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 109-138.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

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

HADWIGER, Lee A. Anatomy of a nonhost disease resistance response of pea to *Fusarium solani*: PR gene elicitation via DNase, chitosan and chromatin alterations. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 373, 2015.

HE, Liang et al. Impacts of recent climate warming, cultivar changes, and crop management on winter wheat phenology across the Loess Plateau of China. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 200, p. 135-143, 2015.

HELLMANN, Hanjo et al. Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. **Plant Physiology**, v. 122, n. 2, p. 357-368, 2000.

HU, Mengyun et al. Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. **Plant growth regulation**, v. 68, n. 2, p. 177-188, 2012.

IBRAHIM, Ehab A.; RAMADAN, Whaba A. Effect of zinc foliar spray alone and combined with humic acid or/and chitosan on growth, nutrient elements content and yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants sown at different dates. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 101-105, 2015.

IPCC (2013). **Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report Climate Change 2013: The Physical Science Basis Summary for Policymakers**.

IRITI, Marcello et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 493-500, 2009.

IRITI, M. et al. A new chitosan formulation induces grapevine resistance against powdery mildew and improves grape quality traits. **Aust J Grape Wine Res**, v. 17, p. 263-9, 2011.

JIANPING, Guo. Advances in impacts of climate change on agricultural production in China. **Journal of Applied Meteorological Science**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 2015.

KATIYAR, Deepmala; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, Bharti. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2015

KERBAUY, G. B **Fisiologia Vegetal/** Gilberto Barbante Kerbauy 2ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

KIM, Hyun-Jin et al. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3696-3701, 2005.

KRASENSKY, Julia; JONAK, Claudia. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** Piracicaba, 2007. Tese (Doutorado em Agronomia). 138p. ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LIZÁRRAGA-PAULÍN, Eva Guadalupe et al. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 34, p. 6439-6446, 2011.

LI, Zhou et al. Metabolic pathways regulated by chitosan contributing to drought resistance in white clover. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 8, p. 3039-3052, 2017.

LEI, Caiyan et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LIPIEC, J. et al. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. **International Agrophysics**, v. 27, n. 4, p. 463-477, 2013.

LUIS, A. et al. Plant Superoxide Dismutases: Function Under Abiotic Stress Conditions. In: **Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants**. Springer, Cham, 2018. p. 1-26.

LU, Xia; WANG, Chao; LIU, Baozhong. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 1, p. 58-65, 2015.

MAGALHAES, Paulo C.; DURÃES, Frederico OM. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa milho e Sorgo, 2006.

MARTINS, Mayron et al. Physicochemical characterization of chitosan and its effects on early growth, cell cycle and root anatomy of transgenic and non-transgenic maize hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 1, p. 56, 2018.

MARTIN-STPAUL, Nicolas; DELZON, Sylvain; COCHARD, Hervé. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. **Ecology letters**, v. 20, n. 11, p. 1437-1447, 2017.

MHAMDI, Amna et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.

MÁRMOL, Zulay et al. Quitina y Quitosano pol meros amigables. Una revisión de sus aplicaciones/Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications. **Revista Tecnocient fica URU**, n. 1, p. 53-58, 2013.

MACHEIX, Jean-Jacques. **Fruit Phenolics: 0**. CRC press, 2017.

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONDAL, M. M. A. et al. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 5, p. 918, 2012.

PIRBALOUTI, A. Ghasemi et al. 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. 217, p. 114-122, 2017.

PERDOMO, Juan A. et al. Rubisco and rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 490, 2017.

PER, Tasir S. et al. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126-140, 2017.

PORCEL, Rosa et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. **Journal of plant physiology**, v. 185, p. 75-83, 2015.

RABEA, Entsar I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAMÍREZ, M. A. et al. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. **Bioteconología Aplicada**, v. 27, n. 4, p. 270-276, 2010.

REJEB, Kilani Ben; ABDELLY, Chedly; SAVOURÉ, Arnould. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, 2014.

ROYCHOUDHURY, Aryadeep; BASU, Supratim; SENGUPTA, Dibyendu N. Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, n. 3, p. 835-847, 2012.

SAHARAN, Vinod; PAL, Ajay. Current and Future Prospects of Chitosan-Based Nanomaterials in Plant Protection and Growth. In: **Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection**. Springer, New Delhi, 2016. p. 43-48.

SAMI, Fareen et al. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 54-61, 2016.

SANTELIA, Diana; TROST, Paolo; SPARLA, Francesca. New insights into redox control of starch degradation. **Current opinion in plant biology**, v. 25, p. 1-9, 2015

SANDHYA, V. S. K. Z. et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n. 1, p. 21-30, 2010.

SERVET, Caroline et al. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. **Front Biosci**, v. 17, p. 607-620, 2012.

SINGH, Madhulika et al. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 3, p. 407-426, 2015.

SHARMA, Pallavi et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v. 2012, 2012.

SHAO, Xingfeng et al. Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 37-43, 2015.

SCANDALIOS, John G.; ACEVEDO, Alberto; RUZSA, Stephanie. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. *Plant Science*, v. 156, n. 1, p. 103-110, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. **Interação Planta Patógeno–fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ**, p. 227-248, 2008.

STAMFORD, TCM; STAMFORD, TLM; FRANCO, L. de O. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**, v. 1, p. 52-55, 2008.

STREB, Sebastian; EICKE, Simona; ZEEMAN, Samuel C. The simultaneous abolition of three starch hydrolases blocks transient starch breakdown in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 41745-41756, 2012.

SUN, Jiali et al. The inhibition of photosynthesis under water deficit conditions is more severe in flecked than uniform irradiance in rice (*Oryza sativa*) plants. **Functional Plant Biology**, v. 44, n. 4, p. 464-472, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2010) **Plant Physiology**, Fifth edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. (In press), 690p.

TAKAKI, Mirelle. **Estudo físico-químico da atividade fungicida de derivados anfifílicos de quitosana contra fungos do gênero Aspergillus: interação com modelos de membranas**. 2015.

TERZI, Rabiye et al. Exogenous ascorbic acid mitigates accumulation of abscisic acid, proline and polyamine under osmotic stress in maize leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 43, 2015.

USHIMARU, Takashi et al. Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 11, p. 1179-1184, 2006.

XU, Qiu-jin et al. Effects of chitosan on growth of an aquatic plant (*Hydrilla verticillata*) in polluted waters with different chemical oxygen demands. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 2, p. 217-221, 2007.

XU, Tao et al. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N, N, N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 931-936, 2010.

ZANELLA, Martina et al. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 6, p. 1819-1826, 2016.

ZHANG, Hongyan et al. Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitoooligosaccharide. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 6, p. 1153-1162, 2011.

CAPÍTULO II

AUMENTO DAS TROCAS GASOSAS, DEFESA ANTIOXIDANTE E METABOLISMO PRIMÁRIO EM MILHO SENSÍVEL AO DÉFICIT HÍDRICO ATRAVÉS DA APLICAÇÃO FOLIAR DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE QUITOSANA

AUTORES: Valquíria Mikaela Rabêlo, Paulo César Magalhães, Letícia Aparecida Bressanin, Plínio Rodrigues dos Santos Filho, Diogo Teixeira Carvalho, Caroline Oliveira dos Reis, Antônio Carlos Doriguetto, Marcelo Henrique dos Santos, Thiago Corrêa de Souza

Artigo redigido conforme as normas da Revista Plant Growth Regulation.

Aumento das trocas gasosas, defesa antioxidante e metabolismo primário em milho sensível ao déficit hídrico através da aplicação foliar de novos derivados semissintéticos de quitosana

Valquíria Mikaela Rabêlo ¹, Paulo César Magalhães ², Leticia Aparecida Bressanin ¹, Plínio Rodrigues dos Santos Filho ¹, Diogo Teixeira Carvalho¹, Caroline Oliveira Reis¹, Antônio Carlos Doriguetto¹, Marcelo Henrique dos Santos¹, Thiago Corrêa de Souza ¹

¹ Federal University of Alfenas - UNIFAL-MG, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Street Gabriel Monteiro da Silva, 700, P.O. Box 37130-000, Alfenas-MG, Brazil

² Maize and Sorghum National Research Center, P. O. Box 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brazil

Corresponding author: Thiago Corrêa de Souza, Federal University of Alfenas – UNIFAL-MG, Institute of Nature Sciences- ICN, Street Gabriel Monteiro, 700.

Phone: +553 532 991 419, FAX: +553 532 991 419, P. O. Box 37130-000, Alfenas-MG, Brazil.

E-mail: thiago.souza@unifal-mg.edu.br . ORCID: 0000-0002-4991-7704

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (APQ-00651-14).

Resumo

Neste estudo, levantamos a hipótese de que a aplicação de derivados de quitosana N-succinílico (SUC) e N, O-dicarboximetílico (MCA) seriam capazes de minimizar os efeitos do estresse em milho associando uma proteção antioxidante eficaz através de mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. Estudos já evidenciaram que a quitosana induz uma tolerância e proteção as plantas, mas poucos trabalhos exploraram modificações químicas de quitosana e seus efeitos em plantas sob estresse hídrico. A quitosana e seus derivados foram aplicadas no híbrido sensível ao déficit hídrico em condições de casa de vegetação através de pulverização foliar, em uma concentração de 0,5mg/planta no estágio de pré- florescimento. Após a aplicação as plantas foram induzidas ao déficit hídrico por 15 dias. As análises de trocas gasosas na folha da espiga (fotossíntese e condutâncias estomática) foram realizadas no primeiro e décimo quinto dia de déficit hídrico, através de um sistema portátil de fotossíntese. Para as análises bioquímicas foram coletas as folhas da espiga também no primeiro e décimo quinto dia de déficit hídrico. A aplicação dos derivados de quitosana ou a mistura dos dois potencializaram as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e guaicol peroxidase, além de diminuir a peroxidação lipídica (teor de malonaldeído) e aumentarem as trocas gasosas e teor de prolina no final do estresse. Os derivados também aumentaram o teor de compostos fenólicos e a atividade de enzimas envolvidas na sua produção (fenilalanina amonialiase e tirosina amonialiase). Compostos como açúcares solúveis totais, aminoácidos totais e amido aumentaram tanto para os derivados quanto para a quitosana. A aplicação das moléculas semissintéticas derivadas de quitosana conferiram maior trocas gasosas foliares e condição bioquímica aliviando o estresse nas plantas

Key words: Seca; *Zea mays* L; Fotossíntese; Amido; Enzimas antioxidantes, Compostos fenólicos,; Prolina

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial, associado ao aumento da produção agrícola, provocou uma série de alterações ambientais negativas no planeta. As modificações climáticas estão ocasionando fortes secas que interferem no ciclo fisiológico de muitas plantas cultivadas. E adicionalmente as altas temperaturas vêm atingindo a maior parte dos países produtores de milho, cultura esta de grande importância econômica, pois é utilizada tanto para consumo humano quanto animal. Estresses abióticos como a seca são considerados os que mais limitam a produção de culturas agrícolas ao redor do mundo (Filippou et al., 2013).

No mundo e no Brasil as regiões que mais cultivam milho, não dispõem de tecnologias de irrigação, e a mesma não seria uma técnica totalmente viável, já que estamos em uma época de buscar alternativas sustentáveis que minimizem o uso da água em culturas agrícolas, assim na maioria das regiões estes tipo de cultura fica sempre exposta e dependente de fatores ligados à água (Camara et al., 2007).

A limitação hídrica no solo induz o estresse osmótico nas plantas, diminuindo o volume celular, inibindo as enzimas do Ciclo de Calvin, provocando danos no aparato fotossintético e diminuição da assimilação de carbono e consequentemente diminui a produtividade (Porcel et al., 2015).

A alta radiação nas plantas e inibição das enzimas do Ciclo de Calvin provocam um excesso de energia no complexo de antena dos fotossistemas, processo pelo qual as clorofilas recebem grande quantidade de energia e os pigmentos fotoprotetores como carotenoides e xantofilas não conseguem realizar todo processo de dissipação de energia fotoquímica e a dissipação na forma de calor, assim acabam dissipando esta energia para o oxigênio, formando as espécies reativas de oxigênio (EROS), que em grandes quantidade geram um estresse oxidativo que podem levar a morte das plantas (Anjum et al., 2015).

As EROS são encontradas em pequenas concentrações em organelas celulares como nos cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomos, ou ainda como subprodutos dos processos de fotossíntese, fotorrespiração ou respiração (Choudhury, 2017). Contudo no estresse hídrico a produção destes compostos é exagerada levando a danos na membrana plasmática (peroxidação lipídica), degradação de pigmentos, proteínas e DNA (Huang, 2016).

O controle de níveis estáveis de EROS nos compartimentos celulares e nas situações de estresse são ou podem ser mantidos pela atuação de mecanismos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, peroxidase do ascorbato, catalase, glutathione redutase, polifenoloxidase, L-fenilalanina amonialiase, peroxidase do guaiacol monohidroascorbato redutase) e não enzimáticos (compostos fenólicos, α -tocoferol, ácido ascórbico, entre outros) (Gratão et al., 2012; Lu et al., 2014).

Para controlar o estresse hídrico as plantas ativam também mecanismos de ajuste osmótico, processo

fisiológico eficaz para turgescência celular, sob condições de baixo potencial hídrico no solo (Marijuan & Bosch, 2013). Este mecanismo confere acúmulo de solutos como prolina, glicina betaína, trealose, sacarose, poliaminas, manitol, pinitol, entre outros, no citosol ou no vacúolo das células (Xu, 2016).

Em busca de uma agricultura sustentável e menos impactante ao meio ambiente pesquisas tem buscado a amenização do estresse hídrico com o uso de biopolímeros como a quitina/quitosana, pois estes apresentam baixa ou nenhuma toxicidade ao meio ambiente e podem conferir tolerância ao déficit hídrico (Ibrahim, 2015). A quitina é o segundo polissacarídeo, mais abundante na natureza e sua desacetilação resulta no produto quitosana, que vem sendo utilizado em várias culturas agrícolas, inclusive no milho (Mármol et al., 2013; Mondal, 2013) devido ao seu potencial de elicitador, antifúngico, protetor e amenizador do estresse hídrico (Saharan, 2016).

A quitosana apresenta um comportamento nucleófilo, tornando-a propícia a modificações químicas estruturais; e dentre as principais modificações pode-se obter acetilações, quaternizações, alquilações, carboxilações, acilações, sulfonações e amidações (Takaki, 2015). A síntese dos derivados de quitosana por meio da inserção de grupos funcionais à cadeia polimérica confere a este polímero diferentes propriedades permitindo sua utilização em áreas médicas, biotecnológicas, e agrícolas (Xu et al., 2010; Saharan, 2016). Contudo na agricultura são poucos os trabalhos baseados em derivados de quitosana. Estes derivados são moléculas que podem potencializar a atividade já que a própria quitosana possui funções importantes na indução de tolerância ao déficit hídrico (Martins et al., 2018).

Dessa forma visando à importância econômica da cultura do milho e as constantes perdas de safras devido ao recurso hídrico, o presente trabalho teve como objetivo aplicar novos derivados de quitosana (*N*-succinoílico e *N,O*-carboximetílico) e avaliar as trocas gasosas, o sistema antioxidante e o metabolismo primário em híbrido de milho sensível ao déficit hídrico.

2. MÉTODO

2.1. Síntese dos derivados de quitosana *N*-succinoílico (SUC) e *N,O*-carboximetílico (MCA)

O derivado-*N*-succinoílico (SUC) foi preparado, com ligeiras modificações, conforme consta em metodologia proposta por Li (2014). A Quitosana (Galena Química e Farmacêutica Ltda) (1 g) foi dissolvida, sob agitação magnética e temperatura ambiente, em 100 mL de solução aquosa de ácido acético glacial a 1% (v/v). Na sequência, foi adicionada, gota a gota e ainda sob agitação, uma solução de anidrido succínico (1, 8g) em acetona (20 mL). A mistura formada foi submetida à irradiação ultrassônica de 40-50 Hz em banho a 50 °C por 60 min. Então, a solução resultante foi resfriada até a temperatura ambiente, foi adicionado álcool etílico hidratado (100 mL) e a mistura transferida para freezer onde permaneceu por 24 horas. Após este período, adicionou-se

solução aquosa de hidróxido de sódio a 1 mol.L^{-1} até que o pH da mistura atingisse 10. Em seguida, adicionou-se acetona até que ocorresse a precipitação do produto como uma massa caseosa e esbranquiçada. A mistura foi novamente acondicionada em freezer pelo prazo de 48 horas. Após este tempo, o produto foi separado por filtração a pressão reduzida, utilizando-se álcool etílico (cerca de 1000 mL) para lavagem do sólido retido, que foi revolido com bastão de vidro durante todo este processo de limpeza. O produto final foi obtido na forma de um sólido amorfo, grosseiro e branco-amarelado após secagem em dessecador sob vácuo e protegido da luz. Utilizando-se o mesmo procedimento, quantidades adicionais do produto foram obtidas.

O preparo do derivado *N,O*-carboximetílico (MCA) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Fei Liu (2001). Quitosana (5 g) foi adicionada a álcool isopropílico (60 mL) sob agitação magnética a temperatura ambiente. Adicionou-se então solução aquosa (12 mL) de hidróxido de sódio a 10 mol.L^{-1} , dividida em cinco porções, durante um período de 25 minutos. Agitou-se a mistura magneticamente por 30 minutos a temperatura ambiente. Na sequência, adicionou-se ácido monocloroacético (30 g) dividido em cinco porções ao longo de cinco minutos. Aqueceu-se a mistura formada a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação magnética por 3 horas. Então, resfriou-se a mistura reagente e o produto sólido obtido foi separado por filtração a vácuo e lavado com metanol absoluto (100 mL).

Secou-se o produto em estufa rapidamente a uma temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ o que resultou em um sólido amarelo. Quantidades adicionais do produto foram obtidas utilizando-se o mesmo procedimento. A quitosana utilizada para obtenção dos derivados possui uma porcentagem de desacetilação (DDA%) de 63,5% (Martins et al., 2018). As estruturas dos derivados e da quitosana estão apresentadas na Figura 1.

2.2 Material Vegetal e condições de crescimento

Foi utilizado um híbrido sensível ao déficit hídrico (BRS 1030) (Souza et al., 2013) oriundo do Programa de Melhoramento da Embrapa. O ensaio foi conduzido em Casa de Vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, localizada na cidade de Sete Lagoas, MG (altitude de 732 m, latitude Sul $19^\circ 28'$, longitude Oeste $44^\circ 15'$). As médias de temperaturas registradas durante o período de avaliação foram máxima de $36,3^\circ\text{C}$ e mínima de $17,6^\circ\text{C}$. A umidade relativa do ar oscilou entre 72% a 40%.

O experimento foi realizado em vasos com capacidade de 20 litros, preenchidos previamente com latossolo vermelho distrófico. A adubação foi feita de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio 10g de 08-28-16 a cada 20 kg de solo. A cobertura foi realizada aplicando-se 6g de sulfato de amônio por vaso aos 30 e 60 dias após o plantio. Foram plantadas três sementes por vaso, e após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando assim duas plantas por vaso. As plantas foram irrigadas regularmente mantendo uma ótima umidade do solo até a imposição do déficit hídrico.

2.3 Imposição do estresse hídrico, aplicação da quitosana e seus derivados e design experimental

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 dos vasos de cada repetição, na profundidade de 20 cm. 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.

No pré-florescimento, foram impostos dois tratamentos hídricos: irrigado (IR) e déficit hídrico (WD). No primeiro, a reposição hídrica foi realizada diariamente até o solo atingir a umidade próxima a capacidade de campo (CC) (tensão da água no solo de aproximadamente -0,18 MPa), enquanto que, no segundo tratamento, a indução do déficit hídrico foi realizada diariamente aplicando-se no mínimo 50% da água total disponível, ou seja, até a tensão da água no solo atingir no mínimo -1,38 MPa, cujo valor corresponde ao solo especificado. O período de imposição do déficit hídrico foi de 15 dias.

O preparo das soluções para aplicação foi realizado a partir da diluição de 0,5mg de quitosana e seus derivados em 250 mL de água na relação de 0,5mg/planta. A quitosana e seus derivados (SUC e MCA) e a mistura destes dois (MS) foram aplicados utilizando um pulverizador costal, com vasão de 120L/ha. Cada planta recebeu um jato de pulverização aérea em concentração de 0,5 mg planta⁻¹, através de um pulverizador costal pressurizado a CO₂ (2,15 kg f cm²) equipado com bico tipo XR – Teejet 110.02 VS, aplicando o equivalente a 120 L ha⁻¹ de calda. Esta pulverização ocorreu um dia antes da imposição do déficit hídrico (55º dia após plantio) no estádio de pré-florescimento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 6 tratamentos: irrigado (IR), déficit hídrico (WD), déficit hídrico com aplicação de SUC (WD+SUC), déficit hídrico com aplicação de MCA (WD+MCA), déficit hídrico com aplicação de MCA e SUC (WD+MS), déficit hídrico com aplicação de quitosana (WD+CHI), com 4 repetições, totalizando 24 vasos. Todas as análises foram realizadas em duas épocas de coleta (1, 15 dias de déficit hídrico), mas essas não foram comparadas estatisticamente.

2.4 Medidas de trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram feitas no 1º e 15º de imposição ao déficit hídrico, através de um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, Model LI-6400 XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). Todas as medidas foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 11:00 em uma folha totalmente expandida (folha da espiga). As variáveis avaliadas foram taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs). As medidas foram feitas em

uma área foliar de 6 cm², com fluxo de CO₂ controlado na concentração de 380 μmol CO₂ mol⁻¹ ar. A densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de 1500 μmol m⁻² s⁻¹ com fonte de luz LED azul-vermelho (6400-02B LED) e temperatura foliar controlada (30°C).

2.5 Coleta de material para análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas coletou-se a folha da espiga, no primeiro e último (15 dias) dia de imposição do déficit hídrico, a mesma foi emergida em nitrogênio líquido e congelada a -80°C.

2.6 Análise de dados

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 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

2.7 Extração e quantificação de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Macerou-se 500 mg de material vegetal em nitrogênio líquido, adicionou-se 2,5 mL de tricloroacético a 0,1%, o material foi centrifugado a 4.000rpm por 30 minutos a temperatura de 4°C. A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wu et al. (2006) e MDA (peroxidação lipídica) foi quantificado conforme metodologia de Cakma Horst (1991).

2.8 Extração e quantificação de enzimas antioxidantes

Para extração das enzimas utilizou-se 500 mg de material vegetal macerados em nitrogênio líquido. A extração foi realizada com tampão fosfato de potássio a 50mM, pH 7.5. Na solução de extração adicionou-se 1mM de EDTA, 1mM PMSF e 5% de PVPP. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000rpm, temperatura de 4°C e os sobrenadantes coletados para quantificação. A atividade das enzimas foi expressa em miligramas (mg) de proteína que foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT); a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm por 3 minutos, sendo o coeficiente de extinção 36 mM⁻¹ cm⁻¹; a atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm por 3 minutos, com coeficiente de extinção 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹; a atividade da peroxidase do guaiacol (GPX, EC 1.11.1.7) foi determinada pela oxidação do guaiacol a 470 nm, coeficiente de extinção 26.6 mM⁻¹ cm⁻¹, A atividade da glutathione redutase (GR, EC1.6.4.2) foi determinada através da oxidação do NADPH a 340 nm por 3 minutos, coeficiente de extinção 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹. Todas as atividades dessas foram feitas de acordo com a metodologia proposta por (García-limones et al., 2002).

A atividade da redutase do deidroascorbato (DHAR, EC 1.15.1.1) foi determinada pela redução do DHA a ácido ascórbico via GSH a 265nm, sendo o coeficiente de extinção $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ segundo a metodologia proposta por (Hossain e Assada, 1984).

2.9 Extração e quantificação da *L*-Fenilalanina amônialiase (PAL EC 4.3.1.5), Tirosina amônialiase (TAL, EC 4.3.1) e Compostos Fenólicos

Para a atividade das enzimas, alíquotas de 500 mg de material congelado foram homogeneizados com 2 mL de tampão fosfato de sódio a 50 mM, pH 6,5. O material foi centrifugado a 4 °C (14000 rpm, 20 min) e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. As atividades foram determinadas pela adição de 50 µL do extrato enzimático a 1 mL do meio de reação (25 mM Tris-HCl pH 8,8 com 25 mM de *L*-fenilalanina ou 25 mM de *L*-tirosina). A reação ocorreu por 1 h a 37 °C, e foi paralisada pela adição de 60 µL de 6 N HCl. Os produtos das reações, ácidos trans-cinâmico (PAL) ou p-cumárico (TAL), foram determinados pela leitura da absorbância a 290 nm e 310 nm, respectivamente. A extração e quantificação seguiram a metodologia proposta (Mehta e Bhavnarayana 1981).

Para a extração dos Compostos Fenólicos macerou-se 500 mg de material vegetal em nitrogênio líquido e adicionou-se 2 mL de metanol. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a uma temperatura de 20°C. Coletou-se o sobrenadante e repetiu o procedimento com o pellet. A leitura das amostras foi realizada a 720nm. A quantificação foi realizada através de curva padrão de ácido gálico, segundo metodologia proposta por Singleton et al. (1999).

2.11 Extração e quantificação de prolina, açúcares solúveis totais, aminoácidos totais e amido

Para a extração da prolina, macerou-se 100 mg de material vegetal em nitrogênio líquido, com 10 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. A solução foi colocada em tubos e agitadas por 60 minutos. Após separação do material a amostra foi filtrada e analisada segundo metodologia proposta por Bates (1973).

Para os açúcares solúveis, aminoácidos e amido, utilizou-se 300 mg de material vegetal macerados em nitrogênio líquido. A extração deu-se pela adição da solução composta de 3 mL de metanol, 1,250 mL de clorofórmio e 750 µL água. As amostras foram deixadas em overnight e no dia seguinte centrifugadas por 30 minutos a 1300 rpm. Coletou-se o sobrenadante para análise de açúcares e aminoácidos totais. No pellet adicionou-se 1,5 mL de ácido perclórico a 30%.

Novamente o material foi colocado em overnight e ao final coletou-se o sobrenadante para quantificação de amido. A quantificação de açúcares totais e aminoácidos totais foi proposta segundo metodologia descrita por Gibon et al. (2004). A quantificação de amidos foi realizada segundo metodologia descrita por Fernie et al. (2001).

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação de malonaldeído (MDA) e sistema enzimático

No primeiro dia de imposição ao déficit hídrico (Fig. 2A) o teor de MDA foi reduzido nos tratamentos (WD+SUC) e (WD+MCA) quando comparado ao tratamento (WD). Após 15 dias de déficit hídrico o teor de MDA reduziu nos tratamentos (WD+MS) e (WD+CHI).

Para o sistema antioxidante, pode-se observar que a atividade da enzima SOD (Fig. 2B) aumentou com a aplicação do derivado MCA e da mistura dos dois derivados, seguido da quitosana e derivado SUC. Após 15 dias de imposição do déficit hídrico a atividade da enzima não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Já a atividade da enzima catalase (CAT) (Fig. 2C) com um dia de déficit hídrico aumentou sua atividade nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MCA) e (WD+MS) e após 15 dias teve sua maior atividade no tratamento (WD+SUC), quando comparado ao tratamento (WD).

A enzima APX (Fig. 2D) no início do déficit hídrico apresentou uma maior atividade no tratamento (WD+SUC). E ao final do déficit hídrico (15 dias) apresentou um aumento de sua atividade em todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana.

A atividade da enzima GPX (Fig. 3E) aumentou nos tratamentos (WD+SUC) e (WD+MS) com 1 dia de déficit hídrico, quando comparada ao tratamento (WD). Com 15 dias de déficit hídrico sua atividade foi aumentada nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MS) e (WD+CHI). A atividade da GR (Fig. 3F) com 1 dia de déficit hídrico aumentou apenas no tratamento com a mistura dos derivados (WD+MS), entretanto após 15 dias esta enzima teve sua atividade aumentada em todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana. A atividade da enzima DHAR (Fig. 3G) teve sua atividade aumentada em todos os tratamentos com aplicação da quitosana e seus derivados no primeiro e último dia de déficit hídrico.

Com a imposição de 1 dia de déficit hídrico, as enzimas PAL (Fig. 4H) e TAL (Fig. 4I) tiveram suas atividades aumentadas em todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana ressaltando maiores médias para as plantas que receberam SUC (WD+SUC) e a mistura (WD+SUC+MCA). No 15º dia de imposição ao déficit hídrico a atividade da enzima PAL, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, enquanto a enzima TAL apresentou uma maior atividade nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MS) e (WD+CHI).

O teor de compostos fenólicos (Fig. 4J) apresentou uma maior concentração nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MCA) e (WD+MS) após 1 e 15 dias de déficit hídrico, quando comparados ao tratamento (DW).

3.2 Análises das trocas gasosas

Com 1 dia de déficit hídrico a aplicação dos derivados e da quitosana não aumentaram a taxa fotossintética

(A) (Tabela 1) no híbrido BRS 1030, quando comparado ao tratamento irrigado (IR). Já no 15^a dia de imposição ao déficit hídrico observa-se que a taxa fotossintética caiu no tratamento (DW), entretanto os tratamentos (WD+SUC), (WD+MCA) e (WD+MS) aumentaram esta taxa quando comparados ao tratamento (WD). Para o parâmetro condutância estomática (gs) (Tabela 1), observa-se o mesmo efeito que a taxa fotossintética com diminuição nos tratamentos com derivados e quitosana com 1 dia de déficit hídrico. No 15^o dia de déficit hídrico observa-se um aumento da condutância estomática nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MCA) e (WD+MS), comparados ao tratamento (WD).

3.3 Quantificação de prolina e peróxido de hidrogênio H₂O₂

O teor de prolina (Fig. 5A) aumentou nos tratamentos (WD+MCA), (WD+MS) e (WD+CHI) com a imposição de 1 dia de déficit hídrico. No 15^o dia todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana apresentaram uma maior concentração deste osmorregulador quando comparados ao tratamento (WD).

As concentrações de H₂O₂ aumentaram nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MCA) e (WD+MS) com 1 dia de déficit hídrico. Ao final da imposição do déficit hídrico todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana apresentaram maiores concentrações H₂O₂, quando comparados ao tratamento (WD).

3.4 Quantificação de açúcares solúveis totais, aminoácidos totais e amido

Ao analisar os açúcares solúveis totais (Fig. 6A), observa-se uma maior concentração em todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana com 1 e 15 dias de imposição ao déficit hídrico. Os aminoácidos totais (Fig. 6B) apresentaram uma maior concentração nos tratamentos (WD+MS) e (WD+CHI) com 1 dia de déficit hídrico. No 15^o dia de déficit hídrico as maiores concentrações foram nos tratamentos (WD+SUC), (WD+MS) e (WD+CHI). O teor de amido (Fig. 6C) foi evidenciado em maiores concentrações nos tratamentos (WD+MCA), (WD+MS) e (WD+CHI) com 1 dia de déficit hídrico. Já no 15^o de imposição todos os tratamentos com aplicação dos derivados e da quitosana apresentaram uma maior concentração de amido quando comparados ao tratamento (WD).

4. DISCUSSÃO

O estresse hídrico está entre os estresses mais severos para a produção agrícola. Em milho, dois dias de déficit hídrico no estágio de florescimento diminuem seu rendimento em mais de 20%, quatro a oito dias diminuem em mais de 50% Magalhães (2006). O déficit hídrico provoca diversas reações na planta, diminuindo seu potencial hídrico, danificando e alterando os fotossistemas além de aumentar as espécies reativas de oxigênio que, provocam uma degradação das membranas lipídicas (Souza et al., 2013).

Essa degradação da membrana lipídica (peroxidação lipídica) pode ser observada pela formação de um metabólito secundário conhecido como Malonaldeído (MDA). Genótipos sensíveis de milho sob déficit hídrico apresentam um maior teor de MDA (Anjum et al., 2015; Souza et al., 2014; Avramova et al., 2017).

A aplicação dos derivados *N*-succinílico (SUC) e *N,O*-carboximetílico (MCA) diminuíram a peroxidação lipídica mostrando-se mais indutores da tolerância ao déficit hídrico do que a sua estrutura inicial: a quitosana. A aplicação da quitosana em plantas de tomate amenizou a peroxidação lipídica nas células (Jiao et al., 2012). Esta diminuição da peroxidação lipídica também foi observada em plantas de milho e pêssego (Li & Yu, 2001; Guan et al., 2009).

Em plantas de milho tolerantes ao déficit hídrico, uma das respostas fisiológicas a esta exposição é ativação do sistema antioxidante enzimático para sequestrar as EROs (Souza et al., 2014; Noman et al., 2015). Já os genótipos sensíveis de milho tendem não apresentar esta capacidade de sequestrar as EROs, além de apresentarem baixa taxa fotossintética quando expostas a estresse prolongado (Souza et al., 2013^a; Souza et al., 2014), porém estudos mostram que a aplicação de quitosana pode induzir este processo de defesa antioxidante nas plantas, além de aumentar a assimilação de carbono (Khan, Prithviraj and Smith, 2002; Zhang et al. 2011; Dosseau et al., 2016; Bistgani et al., 2017).

Nesse presente estudo, observa-se uma maior atividade enzimática antioxidante (SOD, CAT, APX, GPX e GR) quando se aplica os derivados ou sua mistura. Esse aumento da atividade enzimática poderia explicar os menores danos celulares (peroxidação lipídica), maior taxa fotossintética e condutância estomática nesses tratamentos. De certa forma os derivados de quitosana podem ter induzido maior tolerância ao híbrido BRS 1030, devido à sua atuação em processos a nível fisiológico e molecular das folhas.

Estudos mostram que a quitosana pode atuar em genes do núcleo e no cloroplasto envolvendo o aumento das atividades fotossintéticas e enzimáticas antioxidantes (Chamnanmanoontham et al. 2015). A quitosana possui cargas iônicas positivas, o que lhe confere a capacidade de se ligar facilmente com lipídios carregados negativamente, íons metálicos, proteínas, macromoléculas. Ainda por apresentar cargas iônicas positivas a quitosana ativa genes de defesa através de alterações na cromatina (Hadwiger, 2015).

A quitosana apresenta em sua constituição química nucleotídeos açúcares (difosfato de uridina *N*-acetil-*D* glucosamina (UDP-GlcNAc)), que quando aplicada em plantas, a célula reconhece este sítio através das enzimas: sintetase de quitina e quitosano quitina deacetilase. Estas enzimas reconhecem os resíduos de *N*-acetil glucosamina

β -1,4-ligadas e clivam estas regiões, produzindo oligômeros de quitosana que são importantes sinalizadores para as células vegetais (Hadwiger 2015; Malerba and Cerana, 2016).

Estes oligômeros de quitosana chegam no núcleo e no cloroplastídeo e atuam em reações em cascata induzindo burst oxidativo, produção de hormônios e modificando a cromatina e expressão de enzimas antioxidantes e fotossintéticas (Zeng et al. 2010; Zhang et al. 2011; Hadwiger 2013; Pichyangkura and Chadchawan 2015; Chamnanmanoontham et al. 2015; Hadwiger 2015). Um possível motivo dessa melhor resposta dos derivados estudados neste trabalho é que os oligossacarídeos oriundos da clivagem dos derivados MCA e SUC contendo grupos *N*-succinílico e *N,O*-dicarboximético por quitinases parecem ser mais ativos em potencializar respostas enzimáticas no milho sensível do que os oligômeros originados apenas da quitosana.

O aumento do H₂O₂ no início do déficit hídrico nas plantas de milho podem estar ligados ao papel da quitosana (e derivados) na sinalização do estresse e limitação estomática (diminuição de gs sob seca). A produção inicial de H₂O₂ em milho também pode estar correlacionado a ativação das enzimas antioxidantes (Souza et al., 2014). A quitosana é considerada como promotora do fechamento estomático em estágios iniciais de estresse hídrico (Pospisilova 2003, Iriti et al. 2009), fato observado neste trabalho com maiores proporções para as plantas tratadas com derivados SUC e MCA no primeiro dia de déficit hídrico. Essa limitação estomática ocorre porque quitosana pode induzir produção de sinalizadores de estresse como H₂O₂ e ácido abscísico (ABA) (Lee et al. 1999, Iriti et al. 2009, Khokon et al. 2010, Pongprayoon et al. 2013).

Neste estudo observamos a associação do aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia-ase (PAL) e tirosina amônia-ase (TAL) com o aumento da concentração de Compostos Fenólicos. A PAL e a TAL são enzimas situadas entre os metabolitos primários e secundários, e estão relacionadas com a síntese da via dos fenilpropanóides. Via importante para a síntese de compostos fenólicos (Hatfield et al. 2009). A PAL é considerada uma das enzimas mais importantes na regulação do metabolismo secundário. A PAL é responsável pela produção de ácidos trans-cinâmico e a TAL por ácido p-cumárico. Estes ácidos são incorporados na formação de diferentes compostos fenólicos, os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e

ligninas (Kuhn, 2007; Schwan-Estrada et al. 2008; Hatfield et al. 2009). Os genótipos tolerantes de milho tendem a apresentar maior quantidade desses compostos (Hura et al., 2008).

Vários estudos demonstraram que a quitosana promoveu o aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-ase e de compostos fenólicos, em seu sistema de defesa antioxidante contra estresses abióticos e bióticos (Bhaskara Reddy, 1999; Faoro, 2008; Irit et al. 2011; Katiyar, 2015).

Neste estudo os derivados SUC, MCA, a mistura induziram a produção dos compostos fenólicos, sendo este aumento importante para a tolerância ao déficit hídrico, inclusive para o milho (Hura et al., 2008; Gholizadeh, 2011). Compostos fenólicos como flavonoides atuam frente ao déficit hídrico no sequestro de radicais livres e proteção contra o estresse oxidativo (Hura et al., 2008; Gholizadeh, 2011; Souza et al., 2014).

Tanto a prolina quanto os açúcares são importantes osmorreguladores em milho permitindo permanência de água no interior das células foliares, mesmo em condição de déficit hídrico (Ahmad et al., 2016; Sousa et al., 2016; Sun et al., 2016). Quitosana e seus derivados induziram maior acúmulo desses compostos favorecendo a tolerância do híbrido sensível (BRS 1030) ao déficit hídrico. Em condições de déficit hídrico a aplicação exógena de quitosana desencadeou em *Trifolium repens* uma cascata de reações que promoveram a planta uma maior tolerância ao déficit hídrico. Neste experimento a quitosana proporcionou um maior acúmulo de aminoácidos, açúcares, amido, ácidos orgânicos e outros metabolitos como: ascorbato, glutatona, flavonóides, putrescina e espermidina. Estes compostos estão associados ao ajuste osmótico e defesa antioxidante de plantas em condições de estresse (LI et al. 2017).

Vale ressaltar que mesmo ao final de 15 dias de déficit hídrico (menor status hídrico) as plantas que receberam os derivados de quitosana apresentaram maiores trocas gasosas foliares (maior A e gs) e A prolina e os açúcares podem estar facilitando este comportamento fisiológico frente ao estresse.

Com relação ao efeito de estimular o crescimento e desenvolvimento das plantas, além da modulação na expressão de genes da fotossíntese e na homeostase redox, a quitosana pode modular o metabolismo de carboidratos (Chamnanmanoontham et al. 2015; Zhang et al., 2017). Para maior sobrevivência e crescimento das plantas sob estresse seria importante a obtenção de energia e produtos do metabolismo primário. A quitosana pode aumentar a expressão de genes de enzimas envolvidas na Glicólise (Chamnanmanoontham et al. 2015). A aplicação foliar dos derivados e da quitosana proporcionaram maior produção de açúcares solúveis e amido mostrando-se também indutores do metabolismo do carbono para a tolerância ao estresse hídrico.

5. CONCLUSÃO

Em condições de casa de vegetação o híbrido BRS 1030 sob imposição de déficit hídrico apresentou uma indução de tolerância aos efeitos da restrição hídrica, através da aplicação foliar dos derivados SUC, MCA. Tal indução de tolerância deve-se ao aumento da atividade das enzimas SOD, CAT, APX, GPX, GR, PAL e TAL em minimizar os efeitos oxidativos causados pelas EROs.

A maior atividade das enzimas PAL e TAL também conferiram uma maior concentração de compostos fenólicos no híbrido. Os derivados também conferiram uma maior concentração de osmorreguladores como açúcares e prolina, auxiliando a permanência de água nas células. Todos estes fatores associados evidenciam que estas moléculas (N-succinílico e N, O-dicarboximetílico) podem minimizar os danos celulares causados pelo déficit hídrico, melhorando as condições fisiológicas e bioquímicas do híbrido sensível ao estresse tornando-o mais tolerante.

REFERÊNCIAS

1. Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I. & Shahzad, B. (2015). Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 17022-17030.
2. Ahmad, N., Zuo, Y., Lu, X., Anwar, F., & Hameed, S. (2016). Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. *Food chemistry*, 190, 80-89.
3. Avramova, V., AbdElgawad, H., Vasileva, I., Petrova, A. S., Holek, A., Mariën, J., ... & Beemster, G. T. (2017). High antioxidant activity facilitates maintenance of cell division in leaves of drought tolerant maize hybrids. *Frontiers in plant science*, 8, 84.
4. Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G., & Hashemi, M. (2017). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, 5(5), 407-415.
5. Bhaskara Reddy, M. V., Arul, J., Angers, P., & Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 47(3), 1208-1216.
6. Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, v.39, p.205-207, 1973. D
7. Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V (2010) The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection: Phenolics in *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
9. Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide ismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83:463–468
10. Chamnanmanoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S., & Chadchawan, S. (2015). Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. *Plant growth regulation*, 75(1), 101-114.
11. Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867
12. Choudhary, R. C., Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., ... & Saharan, V. (2017). Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 9754.
13. Dousseau, S., Rodrigues, A. C., Lira, J. M. S., Júnior, P. M. R., Pacheco, F. V., De Alvarenga, A. A., Resende, M. L. V. (2016). Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. *Ciencia rural*, 46(1), 191-197.
14. Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212:250–263
15. Filippou, P.; Antoniou, C.; Fotopoulos, V. The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine*, v.56, p.172-183, 2013
16. Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z., & De Yao, K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science*, 79(7), 1324-1335.
17. Faoro, F., Maffi, D., Cantu, D., & Iriti, M. (2008). Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. *Biocontrol*, 53(2), 387-401.
18. García-Limones, C, Herv a, Navas RA, Cort es R, MJim enez D, Tenaaf IM Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological And Molecular Plant Pathology*, [s.l.], v. 61, n. 6, p.325-337, dez. 2002. Elsevier BV.
19. Grat o, P.L.; Polle, A.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A. Review: Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 32, p. 481- 494, 2005.
20. Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, et al (2004) A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in *Arabidopsis* Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell* 16:3304–3325. doi:10.1105/tpc.104.025973
21. Guan, Y. J., Hu, J., Wang, X. J., & Shao, C. X. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(6), 427-433.

22. Hadwiger, L.A., 2015. Anatomy of a nonhost disease resistance response of pea to *Fusarium solani*: PR gene elicitation via DNase, chitosan and chromatin alterations. *Front. Plant Sci.* 12, <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00373>
23. Hossain, M. Anwar; Asada, Kozi. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, v. 25, n. 7, p. 1285-1295, 1984.
24. Huang S, Van Aken O, Schwarzländer M, Belt K, Millar AH (2016) The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress responses in plants. *Plant Physiol* 171: 1551–1559
25. Hura, T., Hura, K., & Grzesiak, S. (2008). Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single - cross hybrids of different drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2), 104-112.
26. Ibrahim, E. A., & Ramadan, W. A. (2015). Effect of zinc foliar spray alone and combined with humic acid or/and chitosan on growth, nutrient elements content and yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants sown at different dates. *Scientia Horticulturae*, 184, 101-105.
27. Iriti, Marcello et al. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, v. 66, n. 3, p. 493-500, 2009.
28. Khan, W. M., Prithiviraj, B., & Smith, D. L. (2002). Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica*, 40(4), 621-624.
29. 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), 1-9.
30. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 51–63 (2010)
31. Kuhn, O. J. (2007). Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
32. Li, H., & Yu, T. (2001). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 269-274.
33. Li, Fang; Ding, Chunmei. Optimization of ultrasonic synthesis of N-succinyl-chitosan and adsorption of Zn²⁺ from aqueous solutions. *Desalination and Water Treatment*, v. 52, n. 40-42, p. 7856-7865, 2014.
34. Li, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Merewitz, E., Peng, Y., Ma, X., ... & Yan, Y. (2017). Metabolic pathways regulated by chitosan contributing to drought resistance in white clover. *Journal of proteome research*, 16(8), 3039-3052.
35. Li, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Merewitz, E., Peng, Y., Ma, X., ... & Yan, Y. (2017). Metabolic pathways regulated by chitosan contributing to drought resistance in white clover. *Journal of proteome research*, 16(8), 3039-3052.
36. Lei, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, Oxford, v. 33, n. 1, p. 176- 182, 2011.
37. Lu, S, Zhuo C, Wang X, Guo Z. Nitrate reductase (NR)-dependent NO production mediates ABA- and H₂O₂-induced antioxidant enzymes. *Plant Physiology And Biochemistry*, [s.l.], v. 74, p.9-15, jan. 2014
38. Magalhaes, Paulo C.; Durães, Frederico OM. *Fisiologia da produção de milho*. Embrapa Milho e Sorgo, 2006.
39. Martins, Mayron et al. Physicochemical characterization of chitosan and its effects on early growth, cell cycle and root anatomy of transgenic and non-transgenic maize hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, v. 12, n. 1, p. 56, 2018.
40. Malerba, M., & Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 996.
41. Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C, Gutiérrez, E. (2013). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones/ChitinandChitosanfriendlypolymer. A review of their applications. *Revista TecnocientíficaURU*, (1), 53-58.
42. Marijuan,M.P.;Bosch,S.M.Ecophysiologyofinvasiveplants:osmotic adjustment and antioxidants. *Trends in Plant Science*,v.18, p.660-666, 2013
43. Mondal, M. M. A., Puteh, A. B., Dafader, N. C., Rafii, M. Y., & Malek, M. A. (2013). Foliar application of chitosan improves growth and yield in maize. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(2), 520-523
44. Pichyangkura, R.;Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia*

- Horticulturae, 196, 49-65.
45. Porcel, R., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Aroca, R., Garcia, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. *Journal of plant physiology*, 185, 75-83.
 46. Pospíšilová, J. (2003). Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biologia Plantarum*, 46(4), 491-506.
 47. Pongprayoon, W., Roytrakul, S., Pichayangkura, R., & Chadchawan, S. (2013). The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant growth regulation*, 70(2), 159-173.
 48. Saharan, V., & Pal, A. (2016). Current and Future Prospects of Chitosan-Based Nanomaterials in Plant Protection and Growth. In *Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection* (pp. 43-48). Springer India.
 49. Saharan, V. et al. Cu-Chitosan Nanoparticle Mediated Sustainable Approach To Enhance Seedling Growth in Maize by Mobilizing Reserved Food. *J. Agric. Food Chem.* 64, 6148–6155 (2016)
 50. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
 51. Souza, Thiago Corrêa. et al. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, Poland, v. 35, p. 3201-3211, 2013a.
 52. Souza, T. C., Magalhães, P. C., de Castro, E. M., de Albuquerque, P. E. P., & Marabesi, M. A. (2013b). The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. *Acta physiologiae plantarum*, 35(2), 515-527.
 53. Souza, T. C., Magalhães, P. C., de Castro, E. M., Carneiro, N. P., Padilha, F. A., & Júnior, C. C. G. (2014). ABA application to maize hybrids contrasting for drought tolerance: changes in water parameters and in antioxidant enzyme activity. *Plant growth regulation*, 73(3), 205-217.
 54. Sun, T., Zhou, D., Xie, J., & Mao, F. (2007). Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 225(3-4), 451-456.
 55. Takaki, Mirelle. Estudo físico-químico da atividade fungicida de derivados anfífilos de quitosana contra fungos do gênero *Aspergillus* : interação com modelos de membranas. 2015. 77 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.
 56. Wu J, Baldwin IT (2010) New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review of Genetics* 44:1–24
 57. XU, T.; XIN, M.; LI, M.; HUANG, H.; ZHOU, S. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 81, 931-936, 2010.
 58. Zhang, H., Zhao, X., Yang, J., Yin, H., Wang, W., Lu, H., & Du, Y. (2011). Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitoooligosaccharide. *Plant cell reports*, 30(6), 1153-1162.
 59. Zeng, K., Deng, Y., Ming, J., & Deng, L. (2010). Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Scientia horticulturae*, 126(2), 223-228.

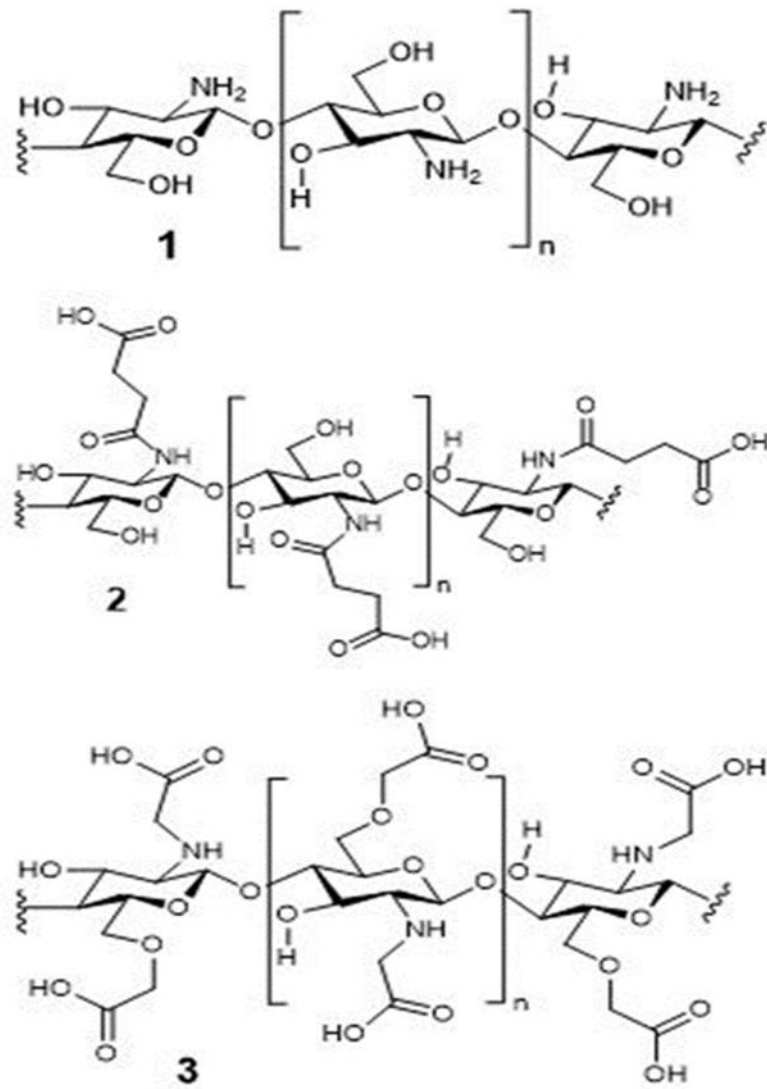


Figura 1: Estrutura química da quitosana (CHI) (1); do *N*-succinoílico (SUC) (2); e do *N,O*-carboximetílico (MCA-) (3)

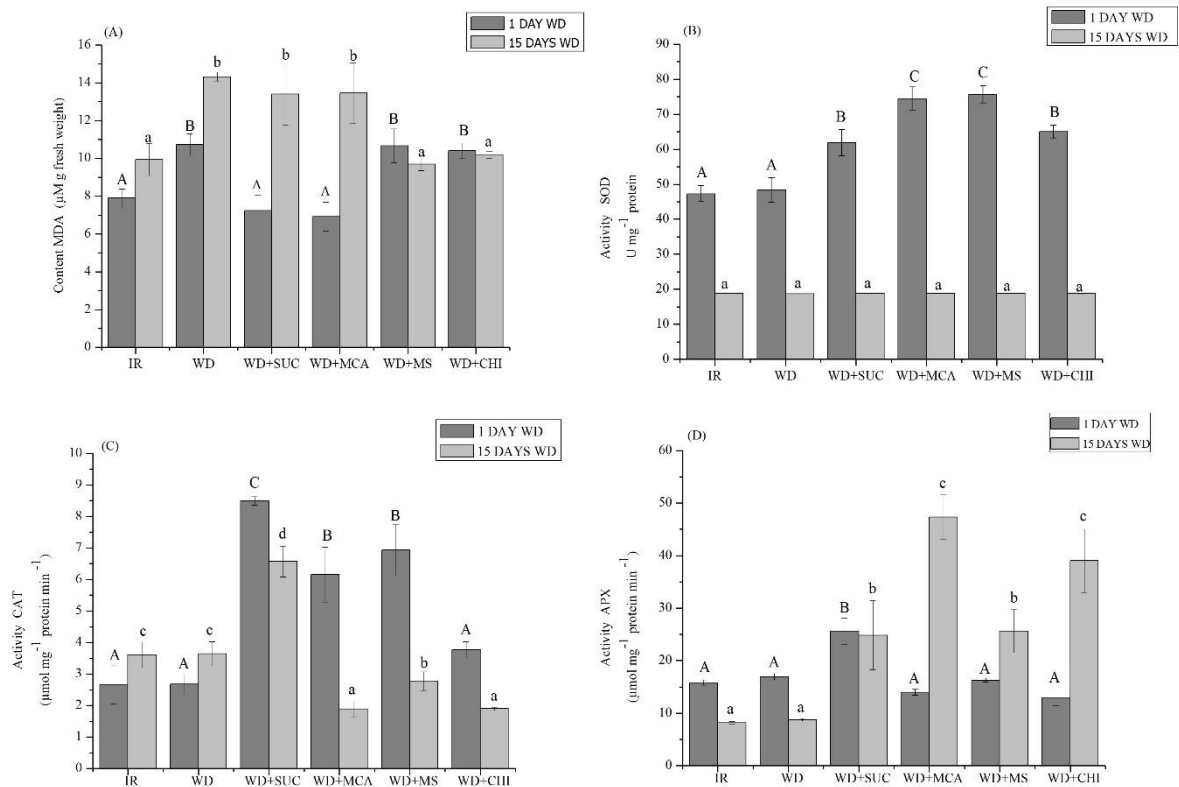


Figura 2: Concentração de malonaldeído (MDA); Atividade da Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); ascorbato peroxidase (APX). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamentos com 1 dia de déficit hídrico e minúscula para os tratamentos com 15 dias de déficit hídrico, não diferem entre si pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. IR, irrigado; WD, déficit hídrico; WD+SUC, déficit hídrico com aplicação foliar de SUC, WD+MCA, déficit hídrico com aplicação foliar de MCA, WD+MS, déficit hídrico com a aplicação foliar de SUC e MCA; WD+CHI, déficit hídrico com aplica foliar de quitosana.

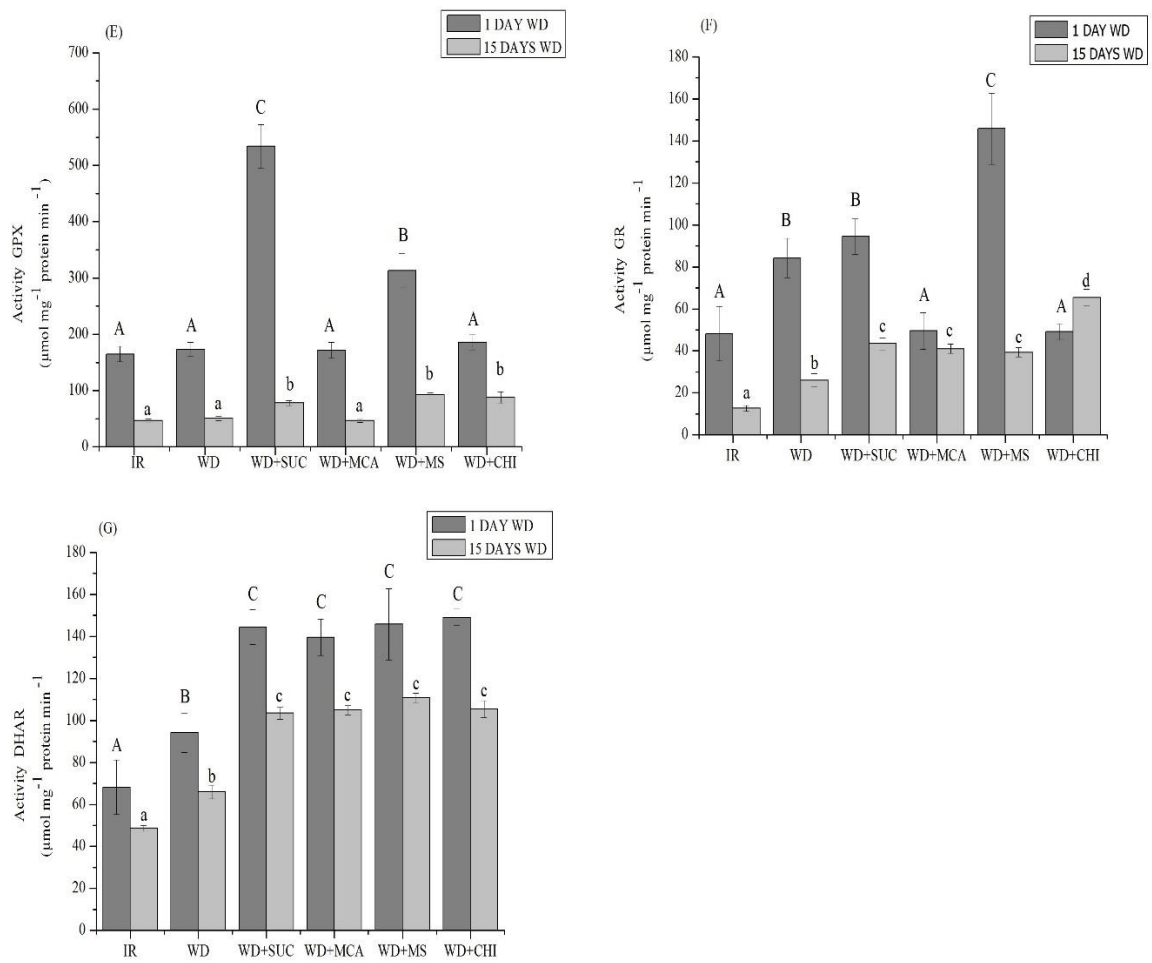


Figura 3: Atividade da Guaiacol Peroxidase (GPX); Glutaciona Redutase (GR); Atividade da Deidroascorbato redutase (DHAR) durante 15 dias de déficit hídrico no híbrido de milho BRS 1030 após a aplicação da quitosana e seus derivados. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamentos com 1 dia de déficit hídrico e minúscula para os tratamentos com 15 dias de déficit hídrico, não diferem entre si pelo teste *Skott-Knott* a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. IR, irrigado; WD, déficit hídrico; WD+SUC, déficit hídrico com aplicação foliar de SUC, WD+MCA, déficit hídrico com aplicação foliar de MCA, WD+MS, déficit hídrico com a aplicação foliar de SUC e MCA; WD+CHI, déficit hídrico com aplica foliar de quitosana.

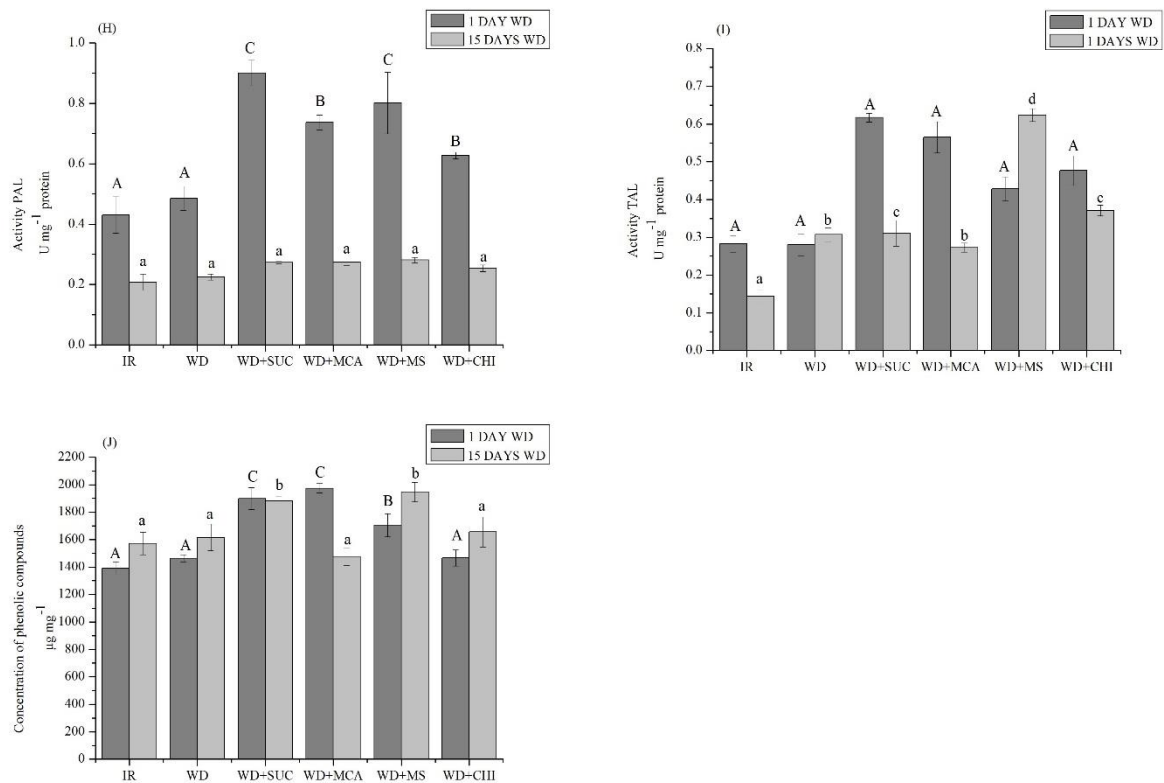


Figura 4: Atividade da L-fenilalanina amonialiase (PAL); tirosina amonialiase (TAL) e concentração de Compostos Fenólicos durante 15 dias de déficit hídrico no híbrido de milho BRS 1030 após a aplicação da quitosana e seus derivados. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamentos com 1 dia de déficit hídrico e minúscula para os tratamentos com 15 dias de déficit hídrico, não diferem entre si pelo teste *Skott-Knott* a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. IR, irrigado; WD, déficit hídrico; WD+SUC, déficit hídrico com aplicação foliar de SUC, WD+MCA, déficit hídrico com aplicação foliar de MCA, WD+MS, déficit hídrico com a aplicação foliar de SUC e MCA; WD+CHI, déficit hídrico com aplica foliar de quitosana.

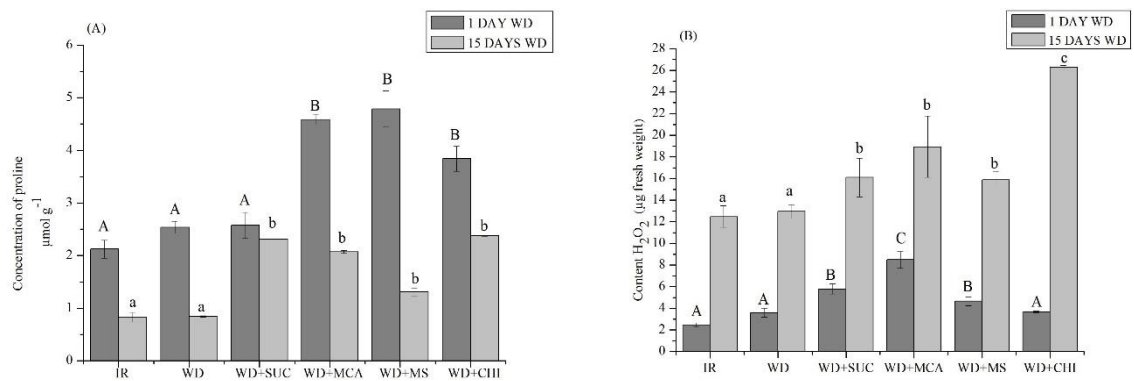


Figura 5: Concentração de Prolina e Teor de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) durante 15 dias de déficit hídrico no híbrido de milho BRS 1030 após a aplicação da quitosana e seus derivados. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamentos com 1 dia de déficit hídrico e minúscula para os tratamentos com 15 dias de déficit hídrico, não diferem entre si pelo teste *Skott-Knott* a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. IR, irrigado; WD, déficit hídrico; WD+SUC, déficit hídrico com aplicação foliar de SUC, WD+MCA, déficit hídrico com aplicação foliar de MCA, WD+MS, déficit hídrico com a aplicação foliar de SUC e MCA; WD+CHI, déficit hídrico com aplica foliar de quitosana.

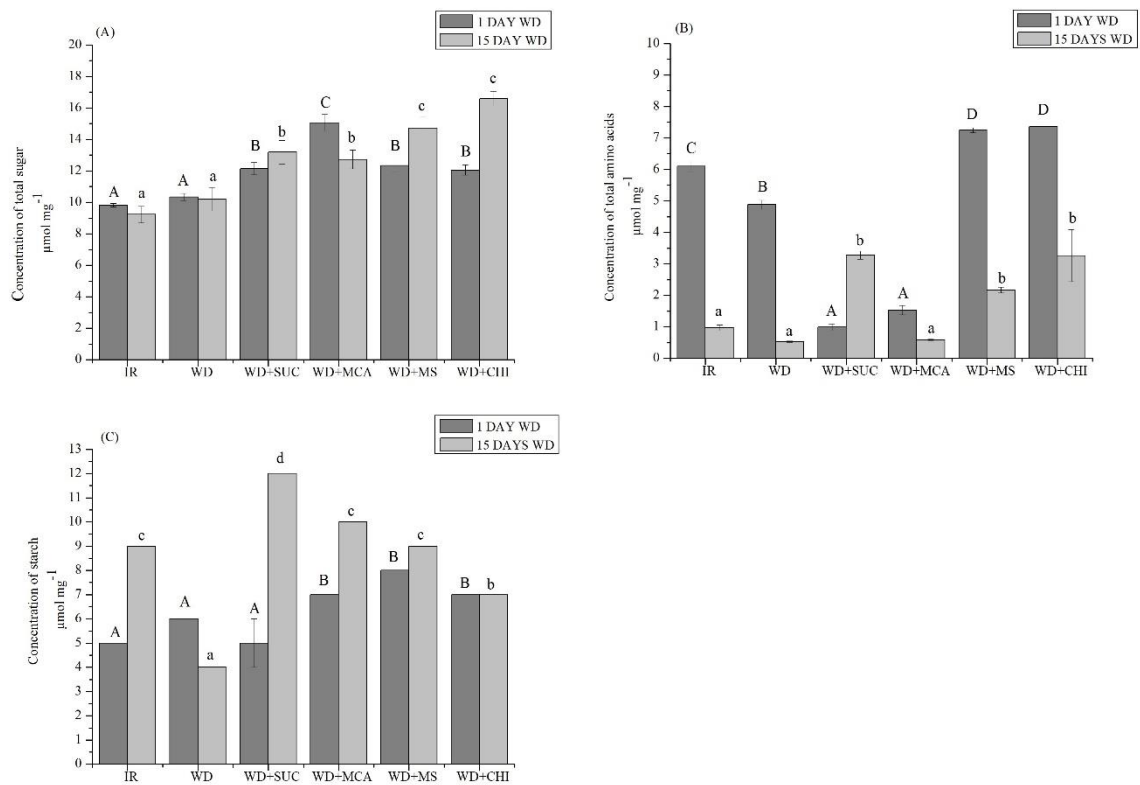


Figura 6: Concentração de açúcares solúveis totais; aminoácidos totais e amido durante 15 dias de déficit hídrico no híbrido de milho BRS 1030 após a aplicação da quitosana e seus derivados. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamentos com 1 dia de déficit hídrico e minúscula para os tratamentos com 15 dias de déficit hídrico, não diferem entre si pelo teste *Skott-Knott* a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. IR, irrigado; WD, déficit hídrico; WD+SUC, déficit hídrico com aplicação foliar de SUC, WD+MCA, déficit hídrico com aplicação foliar de MCA, WD+MS, déficit hídrico com a aplicação foliar de SUC e MCA; WD+CHI, déficit hídrico com aplica foliar de quitosana.

Tabela 1. Trocas gasosas: Taxa fotossintética foliar (A) e condutância estomática (gs) durante 15 dias de déficit hídrico no híbrido de milho BRS 1030 após a aplicação da quitosana e seus derivados.

TREATMENT	A (mmol CO₂ m⁻²s⁻¹)	gs (mol m⁻² s⁻¹)	A (mmol CO₂ m⁻²s⁻¹)	gs (mol m⁻² s⁻¹)
Dias de estresse	1 day WD	1 day WD	15 days WD	15 days WD
IR	28,7E*	0,29E	27,77c	0,32c
WD	26,39E	0,16C	14,23a	0,19b
WD+SUC	21,2D	0,24D	19,89b	0,46e
WD+MCA	2,64A	0,04A	22,77b	0,41d
WD+MS	7,02B	0,07B	22,16b	0,23b
WD+CHI	10,81C	0,06B	16,1a	0,15 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamentos com 1 dia de déficit hídrico e minúscula para os tratamentos com 15 dias de déficit hídrico, não diferem entre si pelo teste *Skott-Knott* a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). IR, irrigado; WD, déficit hídrico; WD+SUC, déficit hídrico com aplicação foliar de SUC, WD+MCA, déficit hídrico com aplicação foliar de MCA, WD+MS, déficit hídrico com a aplicação foliar de SUC e MCA; WD+CHI, déficit hídrico com aplica foliar de quitosana.