

Efeito da Quitosana na Anatomia Radicular de Híbridos Transgênico e não Transgênico de Milho

Thiago Corrêa de Souza⁽¹⁾; Mayron Martins⁽²⁾; Valdir Veroneze Júnior⁽³⁾; Marília Carvalho⁽⁴⁾; Paulo César Magalhães⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Professor do Instituto de Ciências da Natureza; Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG); Alfenas, Minas Gerais; thiago.souza@unifal-mg.edu.br; ⁽²⁾ Estudante de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais; UNIFAL-MG; ⁽³⁾ Estudante do curso de Ciências Biológicas-Licenciatura e bolsista de Iniciação Científica, UNIFAL-MG; ⁽⁴⁾ Pesquisadora em estágio Pós-doutoral, UNIFAL-MG; ⁽⁵⁾ Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: A quitosana é um biopolímero derivado da quitina que é extraída de crustáceos e tem sido levantada na literatura a sua ação sobre as plantas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da quitosana na anatomia radicular em dois híbridos de milho. Foram utilizados os híbridos DKB 390 e DKB 390 Pró, sendo o último, transgênico, e estes foram expostos a 6 tratamentos de quitosana (50, 150, 300, 600, 1200 e 2400 ppm) dissolvidos em água acidificada (0,1%). Quinze sementes foram germinadas em placas de Petri de 12 cm de diâmetro, forradas com 2 folhas de papel filtro e umedecidas com 3,6 mL das respectivas soluções. As raízes foram coletadas após 7 dias de tratamento e foram confeccionadas lâminas microscópicas com cortes transversais. Os parâmetros avaliados foram espessura da epiderme, espessura do córtex, espessura da endoderme, número de xilemas, espessura de xilemas e espessura de floema. A análise estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância e do teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância. As concentrações de 150 e 300 ppm de quitosana no híbrido DKB 390 Pró levaram aumento da espessura da epiderme se comparados aos demais tratamentos. A quitosana levou a uma redução da espessura do córtex no DKB 390 Pró a partir da concentração de 150 ppm e uma redução na espessura do xilema nas nos tratamentos 300, 600, 1200 ppm. Foi observado, principalmente no material transgênico, que a quitosana levou a uma modificação das características anatômicas ligadas a proteção e sobrevivência a estresses abióticos e bióticos. Conclui-se que a quitosana pode favorecer a modificações anatômicas, permitindo maior adaptação das plântulas às condições adversas.

Termos de indexação: biopolímero, epiderme radicular, quitina.

INTRODUÇÃO

Atualmente os polissacarídeos naturais, incluindo a quitina, vêm ganhando destaque na pesquisa e na indústria devido às suas propriedades biológicas, fonte renovável, elevada abundância e fácil obtenção, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade e baixa toxicidade (Badawy & Rabea, 2011). A quitosana é um derivado desacetilado da quitina sendo estruturalmente similar Assim, é constituída de unidades de N-acetilglicosamina e glicosamina. Para ser considerado quitosana, o biopolímero desacetilado deve conter uma porcentagem de desacetilação (DDA%) acima de 40 % (Badawy & Rabea, 2011).

A aplicação da quitosana na agricultura vem trazendo bons resultados para proteção de plantas, antes e após a colheita, contra pragas e doenças (estimula o sistema de defesa) (Iriti & Varoni, 2015) e regula o crescimento e desenvolvimento de plantas (Katiyar & Singh, 2015) entre outros.

A transgenia vem contribuindo com a agricultura no mundo todo, principalmente no cultivo de cereais (Rani & Usha, 2013), porém poucos trabalhos tem analisado o efeito biológico em genótipos de plantas transgênicas.

Devido à importância da cultura do milho e aos bons resultados oriundos da aplicação de quitosana no desenvolvimento de plantas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da quitosana na anatomia radicular de dois híbridos de milho (transgênico e não transgênico).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade (BIOGEN) da Universidade Federal de Alfenas, e foram utilizadas sementes de 2 híbridos, DKB 390 e DKB 390 PRÓ, sendo o último transgênico, cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo.

Tratamentos e amostragens

As soluções foram preparadas dissolvendo-se a quitosana em água acidificada (ácido acético) a 0,1%. As concentrações das soluções utilizadas foram determinadas em pré-testes de acordo com a quantidade de ácido acético necessária para sua dissolução, sendo: controle (solução acidificada (0,1%), 50, 150, 300, 600, 1200 e 2400 ppm, umedecendo-se duas folhas de papel filtro com 3,6 mL das respectivas soluções, dispostas em placas de Petri de 12 cm. As placas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. (SOLAB SL-225), com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Anatomia Radicular

Para avaliar os efeitos da quitosana na anatomia radicular foram coletadas, após 7 dias de exposição aos tratamentos, 2 raízes de cada repetição e realizadas secções transversais de acordo com Souza et al. (2009) em uma região de 2 cm a partir do ápice da raiz. Posteriormente, as lâminas microscópicas foram confeccionadas, coradas e fotografadas em microscópio óptico de luz AXIO ZEISS SCOPE A1 com câmera digital acoplada. Os parâmetros avaliados foram espessura da epiderme (ET), espessura do córtex (CT), espessura da endoderme (EnT), número de xilemas (NX), espessura de xilemas (XT) e espessura de floema (FT).

Todas estas medições foram feitas pelo programa de análise de imagens AxionVisionSE64 Rel 4.8, utilizando-se calibrações feitas com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias.

Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental foi em DIC r composto de 7 tratamentos (controle, 50, 150, 300, 600, 1200 e 2400 ppm), com 4 repetições, contendo 15 sementes por placa. Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o \pm erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ($P \leq 0,05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando-se os híbridos de milho, o DKB 390 Pró, quando exposto a 300 ppm de solução de quitosana, apresentou espessura de epiderme radicular (ET) significativamente maior se comparado ao DKB 390 (Figura 1A). Observando a ET do híbrido DKB 390, entre as concentrações, percebe-se que as concentrações de 50 e 600 ppm levaram a um aumento das médias porém equipararam-se ao tratamento controle. Já as concentrações de 150 e 300 ppm no híbrido DKB 390 Pró levaram aumento da ET se comparados aos demais tratamentos (Figura 1A).

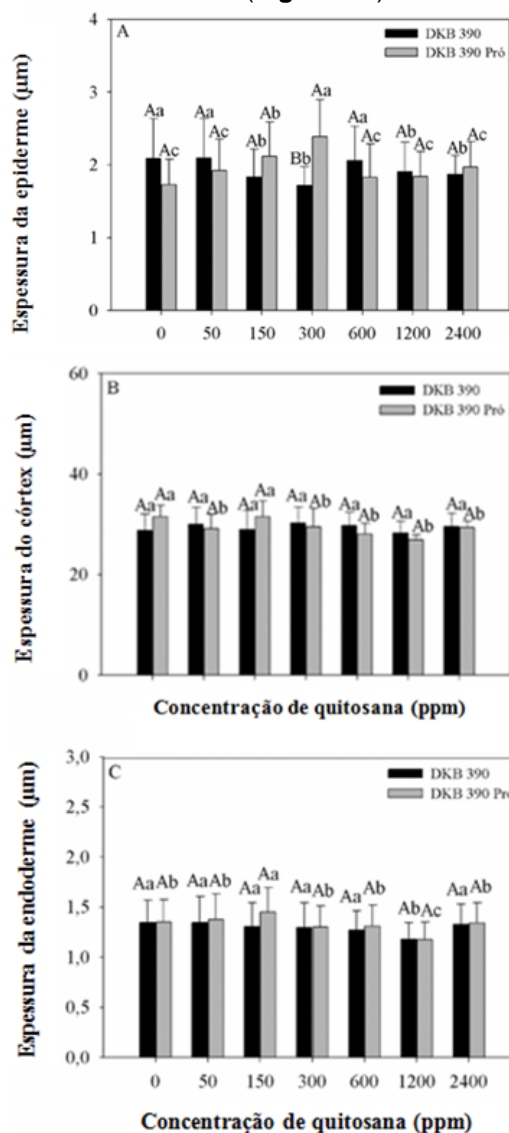


Figura 1. A – Espessura da Epiderme, B – Espessura do córtex, C – Espessura da Endoderme. Médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula para os híbridos e minúscula para as concentrações) em cada barra não diferem entre si

pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Souza et al., (2009) trabalhando com uma variedade de milho tolerante e não tolerante ao estresse hídrico (alagamento) observaram que uma das adaptações anatômicas de sobrevivência do milho tolerante é um aumento da espessura da epiderme da raiz, entendendo tal fato como uma maneira de dificultar a entrada de patógenos e substâncias tóxicas através da raiz. Neste âmbito, a quitosana, quando aplicada no substrato, pode favorecer a sobrevivência das plantas de milho a estresse abiótico e biótico pelo espessamento da epiderme radicular.

Comparando-se entre os dois híbridos, não foram observadas diferenças significativas no que diz respeito à espessura do córtex (CT). No DKB 390 também não ocorreram alterações significativas da CT com a exposição às diversas concentrações. A quitosana levou a uma redução de CT no DKB 390 Pró a partir da concentração de 150 ppm (**Figura 1B**). Chimungu et al. (2015) afirmam que a espessura menor do córtex é importante para uma maior flexibilidade da raiz, o que facilita seu desdobramento e penetração em solos compactados/duros. O benefício da quitosana na diminuição da espessura do córtex então estaria ligado a melhor penetração em solos compactados, reduzindo assim, o custo metabólico para a exploração do solo e favorecendo o melhor desenvolvimento da planta sob estresse abiótico. A redução da EC pela quitosana também pode contribuir com a melhor condutividade hidráulica da raiz devido à diminuição da distância necessária para a água chegar ao cilindro vascular (xilema) (Pereira et al. 2008).

Não houve diferenças significativas no âmbito de espessura da endoderme (EnT) entre os híbridos. Em altas concentrações de quitosana (1200 ppm) a EnT diminuiu tanto no DKB 390 quanto no DKB 390 Pró. No entanto é interessante notar que o híbrido transgênico DKB 390 Pró apresentou aumento significativo de EnT no tratamento de 150 ppm de quitosana em relação aos demais tratamentos (**Figura 1C**). A endoderme é uma estrutura radicular considerada como uma barreira apoplástica. Em milho é constituída de um espessamento de lignina (e outras substâncias) em forma de “U” (Enstone et al., 2003). A quitosana aplicada em plantas pode aumentar a síntese de lignina como mecanismo de defesa contra pragas (EL HADRAMI et al., 2010). Sugere-se que no híbrido transgênico a quitosana esteja estimulando o espessamento dessa endoderme. Isso seria interessante no cultivo do milho, pois assim como a epiderme radicular e a endoderme podem servir como uma barreira física

contra microrganismos patógenos (Souza et al., 2009) levando a plantas mais saudias. Em altas concentrações (1200 ppm) este espessamento parece ser inibido talvez pela inativação do metabolismo da lignina devido ao excesso dessa substância.

Em comparação entre os híbridos no controle, percebe-se que o DKB 390 Pro apresenta maior número de xilemas (NX) que o DKB 390, mas não houve alterações no NX em ambos híbridos comparando-se as concentrações (exceto em 50 ppm) (**Figura 2A**).

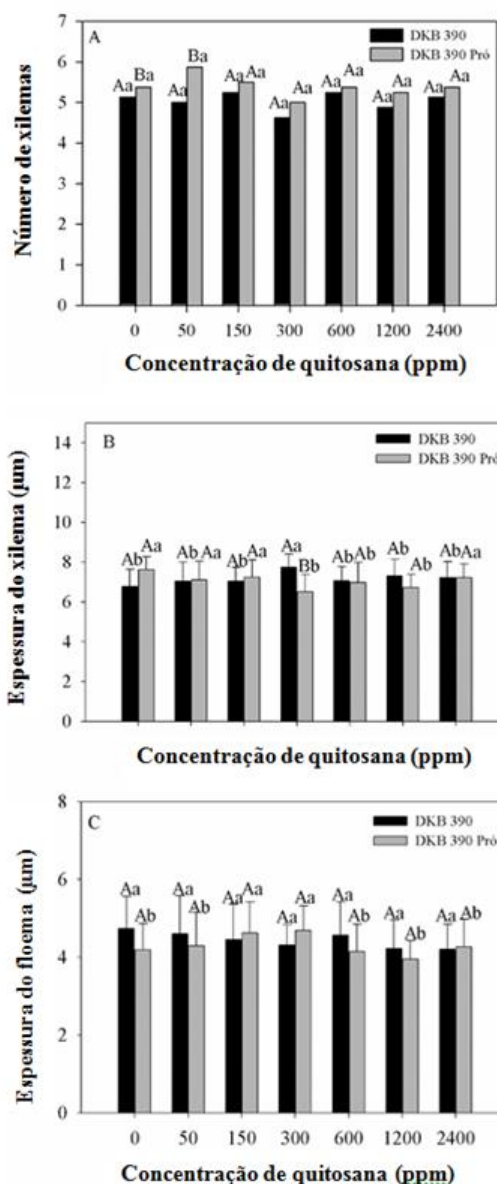


Figura 2. A – Número de Xilemas, B – Espessura do Xilema, C – Espessura do Floema. Médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula para os híbridos e minúscula para as concentrações) em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade

($P \leq 0,05$).

Na concentração 300 ppm, a espessura de xilema (TX) foi significativamente maior no DKB 390 quando comparado ao DKB 390 Pro. A TX no DKB 390 foi estatisticamente maior no tratamento 300 ppm. O DKB 390 Pro, apresentou uma diminuição da TX nos tratamentos 300, 600, 1200 ppm (**Figura 2B**). Mais uma vez a quitosana vem influenciar as relações hídricas dos genótipos, principalmente no transgênico (DKB 390 Pró). Um menor diâmetro dos vasos está relacionado com a diminuição do risco do embolismo e aumento da resistência do fluxo de água. Essas características do DKB 390 Pró podem indicar uma maior condutividade hidráulica aumentando a capacidade de transporte de água (Li et al., 2009). Apesar de não ter ocorrido influência da quitosana no número de xilema, esta característica anatômica também pode influenciar a condutividade hidráulica das raízes. Farouk & Mohsen (2011) verificaram em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) que a aplicação de quitosana aumentou a área e número de xilema nas folhas.

Não foi observada diferença significativa na espessura do floema (TP) entre os híbridos. A TP do híbrido DKB 390 não foi influenciada pelas diferentes concentrações de quitosana testadas. Já o DKB 390 Pro, teve a TP aumentada nas concentrações de 150 e 300 ppm de solução de quitosana em comparação aos demais tratamentos. (**Figura 2C**). Souza et al. (2009) afirmaram que aumentos na espessura do floema leva possivelmente, maior fluxo de carboidratos no mesmo, fornecendo mais substrato respiratório para plantas, permitindo maior tolerância a estresse hídrico. De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a quitosana tenha beneficiado as plântulas do híbrido DKB 390 Pro, um vez que a TP foi aumentada. Farouk & Mohsen (2011) também verificaram em feijão-caupi o aumento do tecido floemático devido a aplicação de quitosana.

CONCLUSÕES

A quitosana levou uma modificação das características anatômicas, principalmente no material de milho transgênico, ligadas a proteção e sobrevivência a estresses abióticos e bióticos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo auxílio financeiro (APQ-00651-14) concedido a esta pesquisa e pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.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, p. 1-29, 2011.

CHIMUNGU, J. G.; LOADES, K. W.; LYNCH, J. P. Root anatomical phenes predict root penetration ability and biomechanical properties in maize (*Zea mays*). **Journal of Experimental Botany**, April 22, 2015 online.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Chitosan in Plant Protection. **Marine Drugs**, v. 8, p. 968-987, 2010.

ENSTONE D. E.; PETERSON, A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.21, p.335–351, 2003.

FAROUK, S.; EL MOHSEN, A. R. A. Improving growth and yield of cowpea plant by foliar application of chitosan under water stress. **Journal of Plant Production**, v. 2, p. 1341 - 1358, 2011.

IRITI, M.; VARONI, E. M. Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, p.2935–2944, 2015.

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

LI, Y.; SPERRY, J.S.; SHAO, M. Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. **Environmental of Experimental Botany**, v. 66, p.341–346, 2009.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho “Saracura” em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1649 – 1656, 2008.

RANI, J.; USHA, R. Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, p. 879 -883, 2013.



SOUZA, T.C.; CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.J.; PARENTONI, S.N; MAGALHÃES, P.C. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environmental**, v. 55, p.504–510, 2009.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"
