



RESPOSTA FENOTÍPICA A BAIXA UMIDADE E ESTRESSE HÍDRICO DO MUTANTE DE MILHO PAN-1

Abner Souza¹; Lucas Barreira²; Vivinae Silva³; Juliana Yassitepe⁴

Nº 18605

RESUMO – A proteína Pangloss 1 (PAN1) participa da formação de estômatos em milho. Plantas mutantes em PAN1 formam estômatos anormais e muito provavelmente têm os processos de fotossíntese e respiração celular comprometidos, o que poderia acarretar em um desenvolvimento anormal das plantas, principalmente quando crescidas em condições de estresse. Nesse trabalho, o objetivo foi estudar o efeito da baixa umidade relativa do ar (UR) e do estresse hídrico no crescimento e desenvolvimento de plantas de milho selvagem e mutante PAN1. A hipótese do trabalho era que as plantas teriam o crescimento e desenvolvimento comprometidos em função da baixa UR e ausência de água. O experimento foi conduzido em uma câmara de crescimento (CC) sob ambiente controlado e foram utilizadas 16 plantas de cada genótipo, seguindo o delineamento inteiramente casualizado. As plantas foram cultivadas em condições ótimas de crescimento até o estágio V4, com exceção da umidade relativa que foi sempre mantida a 20%. Após atingirem V4, as plantas foram submetidas a 4 ciclos de estresse e recuperação, onde a irrigação foi suspensa, sem alteração nas demais variáveis ambientais, até surgimento de sintomas visuais de estresse hídrico. Após esse período, a irrigação foi restabelecida por dois dias, até recuperação. Foram avaliados o estágio de desenvolvimento, número de folhas, altura de planta, comprimento e largura de folha e peso seco. As plantas mutantes apresentaram reduções significativas em várias características mensuradas. Como esperado, a mutação na proteína PAN1 comprometeu o desenvolvimento e crescimento de plantas de milho quando crescidas em condições de estresse.

Palavras-chaves: milho, mutante, pan1, estresse hídrico.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biologia, PUCC, Campinas-SP; abnerfsouza@gmail.com

2 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Agrícola, UNICAMP, Campinas-SP; lucasdb1993@gmail.com

3 Colaborador: Bióloga, Bolsista pós doutorado Fapesp, UNICAMP, Campinas-SP

4 Orientador: Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, UMiP GenClima, Campinas-SP; juliana.yassitepe@embrapa.br



ABSTRACT – *Pangloss 1 protein (PAN1) participates in the formation of stomata in maize. Mutant plants in PAN1 form abnormal stomata and most likely have the processes of photosynthesis and cellular respiration compromised, which could lead to an abnormal development of the plant, especially when grown under stress conditions. In this work, the objective was to study the effect of low air humidity (RH) and water stress on the growth and development of wild and mutant PAN1 plants. The hypothesis of the work was that plants would have growth and development compromised due to low RH and absence of water. The experiment was conducted in a controlled growth chamber (CC) and 20 plants of each genotype were used, following the completely randomized design. The plants were cultivated in optimal growth conditions up to the V4 stage, with the exception of the humidity that was always maintained at 20%. After reaching V4, the plants were submitted to 4 cycles of stress and recovery, where irrigation was suspended, without alteration in the other environmental variables, until the appearance of visual symptoms of water stress. After this period, irrigation was restored for two days until recovery. The development stage, leaf number, plant height, leaf length, leaf width and dry weight were evaluated. The mutant plants had a significant reduction in many traits. As expected, the mutation in the PAN1 protein compromised the development and growth of maize plants when grown under stress conditions.*

Keywords: maize, mutant, pan1, drought stress.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho é a segunda maior cultura agrícola plantada no Brasil e também uma das mais plantadas no resto do mundo. No país, é cultivada em 2 safras por ano, sendo que a segunda safra, ou safrinha, como era conhecida, representa hoje a maior produção e área plantada. A produção da segunda safra vem aumentando todos os anos, mesmo não sendo realizada nas melhores condições ambientais para o cultivo da cultura. A segunda safra com milho ocorre em sucessão com a cultura da soja, e geralmente é plantada entre fevereiro/março, no final da estação chuvosa nas maiores regiões produtoras (Acompanhamento Safra Brasileira de Grãos, 2017).

Por ser plantada fora das condições ideais de crescimento e desenvolvimento, o milho cultivado na segunda safra apresenta vários desafios. O uso de um sistema de irrigação é quase que mandatório para aliviar os efeitos negativos causados pela falta de água durante o crescimento e desenvolvimento da planta. No entanto, nem todos os produtores dispõe de recursos para implantar esse sistema ou mesmo quando o sistema é implementado, pode ocorrer



indisponibilidade hídrica para irrigação. Em algumas regiões produtoras, altas temperaturas se aliam a falta ou má distribuição de chuva dificultando uma boa produção da cultura (Acompanhamento Safra Brasileira de Grãos, 2017).

Tentando contornar os desafios climáticos, novas cultivares são disponibilizadas quase todos os anos no mercado, muitas vezes mais produtivas e mais adaptadas que as plantadas em anos anteriores. É cada vez mais comum observar os programas de melhoramento de milho das várias empresas privadas e públicas se esforçarem continuamente para desenvolverem genótipos mais tolerantes às restrições hídricas e ao calor. Plantas que conseguem se desenvolver mais rapidamente, tentando fugir das épocas de maior estiagem e plantas que possuem mecanismos genéticos que conseguem burlar os efeitos prejudiciais da falta de água e calor excessivo, como tolerância a seca ou maior eficiência do uso da água, são as estratégias mais empregadas no desenvolvimento de genótipos melhores (Ferrão et al., 2016).

Um dos mecanismos genéticos importantes que auxiliam em uma menor perda de água pela planta é o fechamento dos estômatos. Em uma situação de falta de água ou calor excessivo, uma das primeiras reações da planta é fechar os estômatos para evitar perda de água e diminuir as trocas gasosas. O correto funcionamento dos estômatos é então um mecanismo chave na busca de genótipos mais adaptados a baixa disponibilidade hídrica. Uma das proteínas que participam da formação dos estômatos em milho é a proteína PAN1 (Pangloss1). PAN1 é responsável por polarizar corretamente a divisão de células mães subsidiárias durante o desenvolvimento de estômatos em milho, garantindo que os estômatos formados funcionem corretamente (Sutimantanapi et al., 2014). Plantas com mutações no gene PAN1 possuem muitos estômatos anormais, os quais parecem não fechar completamente quando são requeridos, comprometendo os processos de fotossíntese e respiração celular.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a resposta de plantas mutantes em PAN1 quando cultivadas em condições de estresse hídrico e baixa umidade. A hipótese do trabalho é que plantas mutantes em PAN1 tem o crescimento e o desenvolvimento prejudicado em função da falta de água e do calor excessivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma câmara de crescimento sob condições controladas, (CC) localizada na Embrapa Informática Agropecuária. Dois genótipos de milho foram utilizados, a linhagem B73, que neste estudo é considerada um genótipo selvagem e o mutante PAN1, que



possui uma mutação no gene PAN1 no *background* genético B73. Para cada genótipo, 8 plantas foram utilizadas, seguindo o delineamento inteiramente casualizado.

As plantas foram cultivadas em condições ótimas de crescimento (Temperatura 29°C, fotoperíodo de 14hs de luz e 10hs escuro, irrigação diária) até o estágio V4, com exceção da umidade relativa que foi sempre mantida a 20%. Após atingirem o estágio V4, as plantas foram submetidas a 4 ciclos de estresse e recuperação, onde a irrigação foi suspensa, sem alteração nas demais variáveis ambientais, até o surgimento de sintomas visuais de estresse hídrico. Após esse período, a irrigação foi restabelecida por dois dias, até recuperação.

Após finalização do experimento, foram medidas as seguintes variáveis biométricas: estágio de desenvolvimento, número de folhas, altura de planta, comprimento de folha, largura de folha e peso seco. Como as variáveis foram medidas? As variáveis estágio de desenvolvimento e número de folhas foram realizadas através de contagem. Altura de planta, comprimento e largura de folha foram obtidas por medição com régua. O peso seco foi obtido após secagem completa da parte aérea das plantas em estufa, até estabilização do valor do peso.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas de milho selvagens e mutantes PAN1 foram cultivadas em condições controladas de temperatura (29°C), luz (14hs de luz e 10hs de escuro, intensidade luminosa média), umidade relativa (20) e água (irrigação diária) em uma câmara de crescimento por 35 dias. Quando atingiram o estágio de desenvolvimento V4, que ocorreu 23 dias após o plantio, as plantas foram submetidas a ciclos de estresse e recuperação. Em cada ciclo de estresse e recuperação a irrigação era suspensa até o aparecimento dos primeiros sintomas visuais de estresse hídrico – folhas murchas, encarquilhadas, opacas. Após esse período, a irrigação era retomada até a completa recuperação das plantas, onde os sintomas anteriormente observados não estavam mais presentes. Esse ciclo de estresse e recuperação se repetiu 4 vezes, em um período de 12 dias.

A Figura 1 mostra a disposição das plantas dentro da câmara de crescimento. Em verde, plantas selvagens B73 e em vermelho, plantas mutantes PAN1.

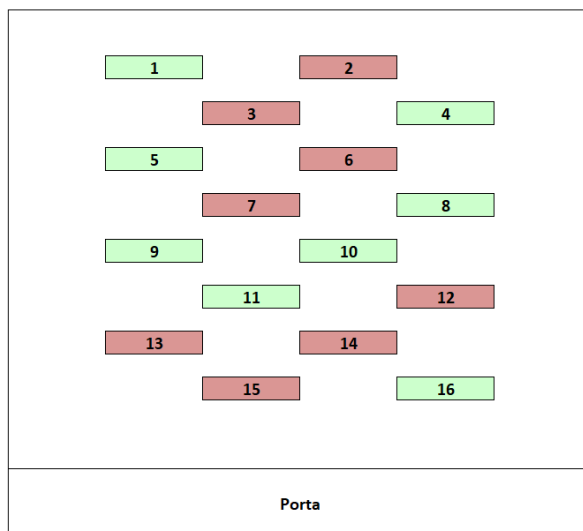


Figura 1. Disposição das plantas dentro da câmara de crescimento. Em verde, genótipo B73 e em vermelho, mutante PAN1.

A Figura 2 mostra diferentes momentos do crescimento e desenvolvimento das plantas dentro da câmara de crescimento. É possível observar na imagem da Figura 1 diferenças de biomassa entre as plantas.

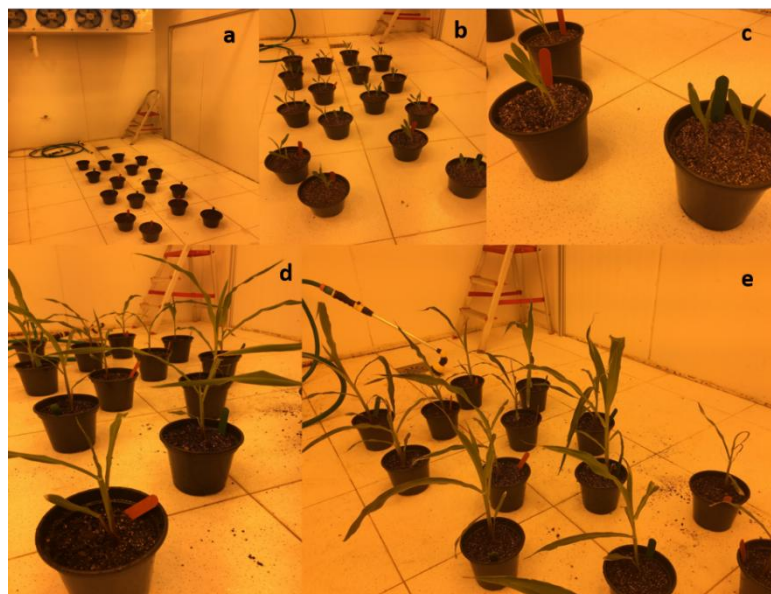


Figura 2. Diferentes momentos do crescimento e desenvolvimento das plantas. (especificar a, b, c, d, e: dias após plantio?)

Antes do início dos ciclos de estresse e recuperação, observou-se uma diferença visual no desenvolvimento das plantas, o tamanho do caule e das folhas nos vasos identificados como o genótipo selvagem B73 estavam maiores do que as plantas identificadas como o genótipo mutante. Essa observação foi apenas visual, nenhuma medição biométrica foi realizada para confirmar a diferença. Essa diferença visual no crescimento pode ser uma resposta a baixa umidade relativa do ar (UR) presente no experimento desde o início do plantio, sugerindo que uma situação de estresse ambiental - neste caso baixa UR, pode influenciar negativamente o crescimento de plantas mutantes PAN1.

O experimento foi finalizado 35 dias após o plantio, quando as plantas tinham completado 4 ciclos de estresse e recuperação. Neste momento foram realizadas as medições biométricas das seguintes variáveis, em todas as plantas: estágio de desenvolvimento, número de folhas, altura de planta, comprimento de folha, largura de folha e peso seco. Para a análise dos dados, foi calculado a média e o desvio padrão, e os genótipos foram comparados.

A Figura 3 mostra a diferença visual observada entre plantas selvagens B73 (as 3 plantas da esquerda) e mutantes PAN1 (as 3 plantas da direita).



Figura 3. Plantas de B73 (as três plantas da esquerda) e mutantes PAN1 (as três plantas da direita) após finalização do experimento.

As Figuras 4, 5 e 6 mostram os resultados obtidos para as características biométricas estágio de desenvolvimento, número de folhas, comprimento de folha, largura de folha, altura de planta e peso seco. Como pode ser observado, houve diferença significativa entre os genótipos para as características estágio de desenvolvimento, comprimento de folha, altura de planta e peso seco. Plantas mutantes PAN1 se desenvolveram mais rápido que as selvagens B73, apresentaram estágio de desenvolvimento mais avançado, mas cresceram menos (menor comprimento de folha e menor altura de planta) e acumularam menos biomassa (peso seco). Para número de folhas e largura de folha não foi observada diferenças significativas.

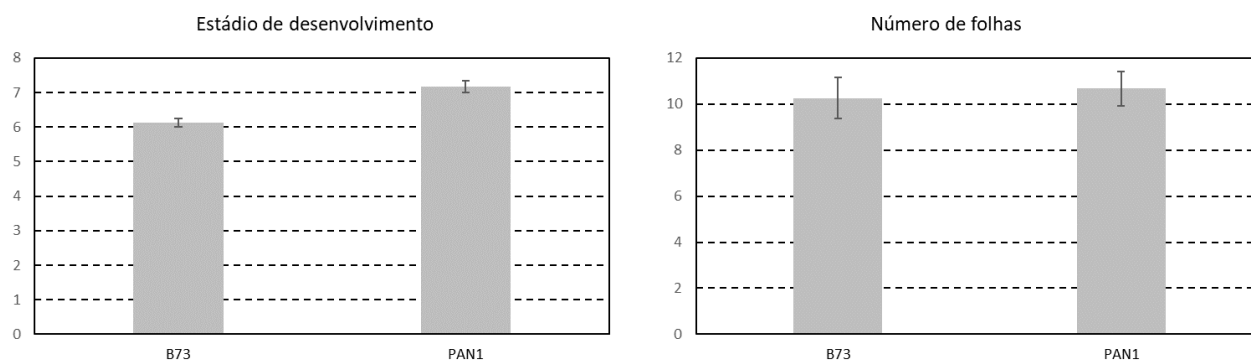


Figura 4. Estádio de desenvolvimento (gráfico da esquerda, medida obtida em escala V) e número de folhas (gráfico da direita) em B73 e PAN1.

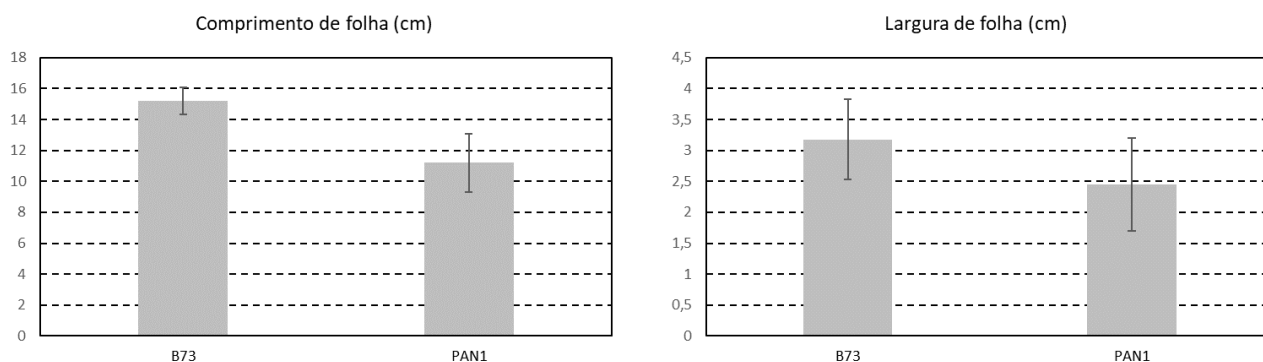


Figura 5. Comprimento (gráfico da esquerda) e largura (gráfico da direita) de folha em B73 e PAN1.

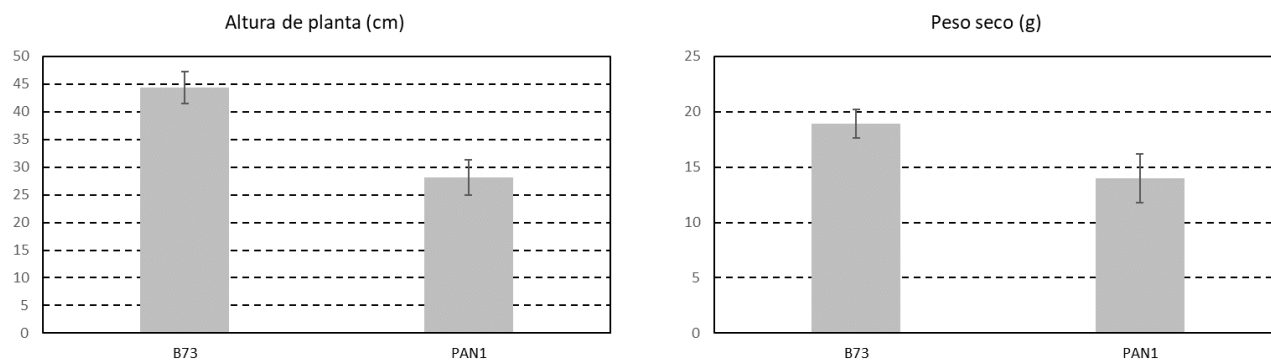


Figura 6. Altura de planta (gráfico da esquerda) e peso seco (gráfico da direita) em B73 e PAN1.

Os resultados observados indicam que a mutação no gene PAN1 que compromete a formação de estômatos normais afeta o crescimento e desenvolvimento da planta em condições de estresse de baixa umidade relativa do ar e restrição hídrica. Esse resultado era esperado em função do papel da proteína PAN1 em milho, mas não tinha sido relatado na literatura até o momento.

4. CONCLUSÃO

As plantas mutantes apresentaram redução significativa no peso seco, altura de planta, comprimento de folha e estágio de desenvolvimento. Como esperado, a mutação na proteína PAN1 comprometeu o desenvolvimento e crescimento de plantas de milho quando crescidas em condições de estresse. Novos experimentos estão sendo realizados visando explorar em detalhes a importância desse gene em situações de estresse e como podemos usar esse conhecimento no desenvolvimento de plantas mais tolerantes a estresse hídrico.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica aos bolsistas Abner Souza e Lucas Barreira.

6. REFERÊNCIAS

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Observatório Agrícola. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v.4 Safra 2016/17 – Oitavo levantamento, Brasília, p.1-144 maio 2017.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

FERRÃO, R.G.; MOREIRA, S.O.; FERRÃO, M.A.G.; RIVA, E.M.; ARANTES, L.O.; COSTA, A.F.S.; CARVALHO, P.L.P.T.; GALVEAS, P.A.O. Genética e Melhoramento: desenvolvimento e recomendação de cultivares com tolerância a seca para o Espírito Santo. **Incaper em Revista**, Vitória, v.6 e 7, n.4, p.51-71, jan 2015/dez 2016.

SUTIMANTANAPI, D.; PATER, D.; SMITH, L.G. Divergent roles for maize PAN1 and PAN 2 receptor-like proteins in cytokinesis and cell morphogenesis. **Plant Physiology**. V.164, n.4, p.1905-1917. 2014.