**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de um método para estimativa da
condutância hidráulica e avaliação da atividade de aquaporinas
em plântulas de milho**

Karina Lima Reis

**Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestra em Ciências.
Programa: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas**

**Piracicaba
2013**

Karina Lima Reis
Bacharel em Ciências Biológicas

**Desenvolvimento de um método para estimativa da condutância hidráulica e
avaliação da atividade de aquaporinas em plântulas de milho**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Programa: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBOVSALQ/USP**

Reis, Karina Lima

Desenvolvimento de um método para estimativa da condutância hidráulica e avaliação da atividade de aquaporinas em plântulas de milho / Karina Lima Reis. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2013.
58 p: il.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Condutância hidráulica 2. Canais de água 3. *Zea mays* l. Título

CDD 633.15
R375d

Ao querido avô Luiz Lima, com amor,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Ao Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ/USP, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Ao prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, pela orientação, paciência e acima de tudo pela amizade.

Aos meus queridos amigos do LEPSE: Marina Gentil, Francynês Macedo, Eliane Nascimento, Bruno Domingues, Gabriel Daneluzzi, Lucas Riboldi e Diogo Capelin. Obrigada pelo apoio, cumplicidade e agradável convivência.

À equipe da MS Tecnopon Instrumentação, em especial a João e Aloísio, pelo apoio técnico.

À Maria Solizete, pelos conselhos, amizade e disponibilidade em ajudar.

À Dra. Gláucia Granti, pela colaboração e ensinamentos.

Aos meus amigos Guilherme Franco e Luis Paulo Gomes pela doação das sementes de milho.

Aos professores e funcionários da ESALQ, pela boa convivência e auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Jane e Ofini, pelo amor, ensinamentos e por me concederem a oportunidade de estudar. Amo muito vocês!

Aos meus avós, pelas orações e por serem exemplos de vida e perseverança.

Aos meus segundos pais, Janete e Eduardo, e aos meus irmãos, Juninho e Renato, agradeço pelo carinho e incentivo. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos Larissa, Lyvia, Rafael e Valéria, pela amizade e companheirismo.

A todos meus tios e tias, em especial à Dilma, Mariinha, Paulo, Anísio, Neuza, Janice, Dulce, Cristina e Adriana, agradeço pelo apoio e torcida.

Às minhas amigas Fernanda Castro e Mônica Ferreira, pelo carinho, apoio e amizade.

À todos os meus familiares e amigos, de modo especial à Bruno Borges, Neidiquele Silveira, Ingrid Santana, Juliano Saib, Marcela Mendes, Izabela Oliveira, Melina Andrade, Fernando Toledo, Andréisa Lima, Riviane Donha e Rizzia Fojo.

Às minhas grandes amigas, Maria Tereza e Thalita, pelo carinho e amizade sincera.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Transporte de água em plantas.....	21
2.2 Aquaporinas vegetais	23
2.3 Condutância hidráulica (LPr)	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Descrição da área de trabalho	31
3.2 Material vegetal e condições de crescimento	31
3.3 Solução nutritiva.....	32
3.3.1 Temperatura.....	33
3.3.2 pH.....	33
3.3.3 Oxigênio dissolvido.....	34
3.4 Sistema hidráulico de sucção.....	34
3.4.1 Medidas de LPr	36
3.4.2 Estimativa da área superficial da raiz.....	37
3.5 Atividade de aquaporinas.....	38
3.6 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Análises de correlação	44
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	533

RESUMO

Desenvolvimento de um método para estimativa da condutância hidráulica e avaliação da atividade de aquaporinas em plântulas de milho

O transporte de água nas plantas é um processo complexo e que envolve a passagem por membranas celulares. Nelas existem aquaporinas, proteínas integrais de membrana, que facilitam o fluxo passivo de água e pequenos solutos. Um fator importante que influencia o transporte de água nas plantas é a condutância hidráulica radicular (LPr), que pode contribuir com até 50% de toda a resistência ao fluxo de água na planta. Várias metodologias são propostas para estimar a LPr, porém os dados obtidos são altamente variáveis, ainda que para a mesma espécie vegetal. Diante do exposto, pretende-se desenvolver e propor uma nova metodologia, o sistema hidráulico de sucção para estimativa da LPr e avaliar a contribuição das aquaporinas no transporte de água radicular em plântulas de milho. O sistema hidráulico de sucção foi construído no Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse (LEPSE/USP) em parceria com Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux de Montpellier, França. Os experimentos foram conduzidos no LEPSE, onde as plântulas cresceram em hidroponia na casa de vegetação. Para avaliação da atividade de aquaporinas foi utilizado o tratamento com peróxido de hidrogênio, que em concentrações milimolares inibe os canais de água. As medidas de condutância foram realizadas sempre na mesma hora do dia, uma vez que a própria LPr e as aquaporinas apresentam ritmo circadiano. Houve redução de 53% da condutância no tratamento com peróxido em relação ao controle e correlação significativa entre a LPr e o pH, de modo que o aumento do pH provocou queda de LPr, provavelmente causada por alterações na abundância e/ou atividade de aquaporinas nas raízes de milho. Esses resultados permitem afirmar que o método de sucção foi eficaz na estimativa da condutância hidráulica, podendo ser adotado como técnica alternativa na estimativa da LPr em plantas.

Palavras-chave: Condutância hidráulica; Canais de água; *Zea mays*

ABSTRACT

Development of a method for estimating the hydraulic conductance and evaluation of the activity of aquaporins in maize seedlings

The water transport in plants is a complex process which involves passage through cell membranes. In them there are aquaporins, integral membrane proteins, that facilitate passive flux of water and small solutes. An important factor influencing the water transport in plants is root hydraulic conductance (LPr), which can contribute up to 50% of the water flow resistance in the plant. Various methods are proposed for estimating LPr, but the data are highly variable, even for the same plant species. Therefore, we intend to develop and propose a new methodology, the hydraulic suction system to estimate LPr and evaluate the contribution of aquaporins in root water transport in maize seedlings. The hydraulic suction system was built at the Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse (LEPSE / USP) in partnership with Laboratoire d'Ecophysiologie Plants des sous Stress Environnementaux Montpellier, France. The experiments were conducted in LEPSE where the seedlings grew in the hydroponics greenhouse. To evaluate the activity of aquaporins was used treatment with hydrogen peroxide, which in millimolar concentrations inhibits water channels. The conductance measurements were performed at the same time of day, since the LPr itself and aquaporins presents the circadian rhythm. There was a 53% reduction in conductance peroxide treatment compared to control and significant correlation between LPr and pH, so that the pH increase caused a drop LPr probably caused by alterations in the abundance and/or activity of aquaporins in maize roots. These results indicate that the suction method was efficient in estimated hydraulic conductance, may be adopted as an alternative technique to estimate the LPr in plants.

Keywords: Hydraulic conductance; Water channels; *Zea mays*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Plântula de milho estiolada após 7 dias no escuro, a 25°C em câmara de crescimento.....	31
Figura 2 – Plântulas de milho com 15 dias de idade em hidroponia na casa de vegetação do LEPSE.....	32
Figura 3 – Esquema do sistema hidráulico de sucção.....	35
Figura 4 – Sistema hidráulico de sucção. A figura mostra as plântulas de milho acopladas ao sistema em funcionamento.....	37
Figura 5 – Etapas da estimativa da área superficial da raiz de milho com 15 dias de idade processada pelo software Safira®. A) Disposição da raiz sobre o telepanorâmico de led. B) Limiarização manual. C) Esqueleto colorido, em que as cores diferenciam os tipos de diâmetros.....	38
Figura 6 – LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) nos tratamentos controle e peróxido de hidrogênio. A linha pontilhada representa a média geral.....	42
Figura 7 – Variação do pH com a idade das plântulas em dias. A linha pontilhada representa a média geral.....	43
Figura 8 – Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e área superficial da raiz em cm^2	45
Figura 9 – Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e pH.....	46
Figura 10 – Correlação entre LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a idade das plântulas em dias. A linha pontilhada representa a média geral.....	47
Figura 11 – Comportamento da LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e data das medidas. A linha pontilhada representa a média geral.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do fertilizante Miracle-Gro®.....	32
Tabela 2 – Fontes de nutrientes utilizadas na solução nutritiva.....	33
Tabela 3 – Resumo do teste F da ANOVA para os tratamentos em que LPr é expressa em $\text{m MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$	41
Tabela 4 – Teste de médias entre os tratamentos, em que LPr é expressa em $\text{m MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$	41
Tabela 5 – Tabela da análise de correlação entre LPr e variáveis área superficial da raiz, pH, idade das plantas e oxigênio dissolvido. São apresentados os coeficientes de Pearson, que varia de -1 a 1.....	44

1 INTRODUÇÃO

A água é o principal constituinte das células vegetais. De todos os recursos de que as plantas necessitam para crescer e funcionar, a água é o mais abundante e, ao mesmo tempo, o mais limitante. Cerca de 97% do conteúdo de água absorvido pelas raízes é transportado através do corpo da planta e perdido para atmosfera por transpiração (TAIZ; ZEIGER, 2010). Quando a planta perde água por transpiração são criadas pressões hidrostáticas negativas no xilema, fenômeno que explica o mecanismo de ascensão da seiva em plantas (DIXON; JOLY, 1894).

As raízes, portas de entrada de água nas plantas, estabelecem a conexão entre o contínuo solo-planta-atmosfera, que deve ser mantido mesmo em condições fisiológicas e ambientais adversas. Elas desempenham um papel crucial nas relações hídricas vegetais e consequentemente apresentam propriedades hidráulicas sofisticadas (JACKSON; SPERRY; DAWSON, 2000; STEUDLE, 2001)

O transporte de água nas plantas é um processo complexo e que envolve passagem por membranas celulares. Os vegetais são capazes de ajustar sua capacidade de transportar água, ou seja, manipulam a condutância hidráulica, em períodos curtos (minutos ou horas) baseando-se na regulação de aquaporinas localizadas na membrana plasmática. As aquaporinas facilitam a difusão passiva de água através das membranas biológicas e são moléculas-chave para regulação do transporte de água a nível celular e de órgãos. Sugere-se que sua regulação na raiz pode fornecer um forte acoplamento entre a absorção de água e seu papel fisiológico na planta. Enquanto facilita o fluxo de água, elas proporcionam condições ideais de crescimento que podem ser críticas quando o sistema radicular enfrenta situações de estresses, fato que reduz a absorção de água ou ocasiona perda dela para a solução do solo (JAVOT; MAUREL, 2002).

A condutância hidráulica radicular é um dos principais parâmetros que refletem na capacidade de absorção de água pela raiz, sendo assim importante estimá-la para fazer inferências sobre o estado hídrico das plantas (MU et al., 2006).

A habilidade das raízes vegetais em absorver água, especialmente nos estádios de plântula, tem recebido bastante atenção dos fisiologistas de plantas, segundo Li e Liu (2010), pois nessa fase do desenvolvimento há maior fragilidade dos indivíduos, principalmente sobrevivendo em condições de estresse.

Vários métodos são encontrados na literatura para estimar a condutância hidráulica em plantas, porém os dados gerados por eles são bastante variáveis até mesmo para plantas da mesma espécie, além disso, as técnicas não refletem a situação real das plantas no campo em função da aplicação de pressões positivas para coleta da seiva xilemática. Diante disso o objetivo deste trabalho foi desenvolver e propor uma técnica alternativa que visa estimar a condutância hidráulica radicular aplicando-se pressões negativas no xilema, semelhante às pressões geradas pela transpiração, e desse modo aumentar a confiabilidade das medidas, utilizando um sistema prático e versátil. Além disso, tem-se por objetivo a avaliação da contribuição das aquaporinas radiculares no transporte de água em milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transporte de água em plantas

A água é uma das substâncias mais importantes para qualquer tipo de célula viva e, por esse motivo, seu suprimento é essencial para vários processos biológicos (KRUSE; UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006). As plantas dependem de um suprimento eficiente de água para garantir seu crescimento e desenvolvimento. Devido à falta de mobilidade elas são capazes de controlar seu balanço hídrico, que é determinado pela taxa de absorção de água, transporte através da planta e perdas por transpiração (MAUREL, 1997).

Nas plantas superiores as raízes são as portas de entrada de água, por isso, elas desempenham papel essencial no balanço hídrico dos vegetais (JAVOT; MAUREL, 2002). Enquanto a maior parte da resistência ao fluxo de água nas plantas é devido à abertura estomática, o sistema radicular pode representar uma barreira significativa (STEUDLE, 1994; STEUDLE; PETERSON, 1998) podendo contribuir com até 50% de toda a resistência hidráulica da planta (MARTRE; NORTH; NOBEL, 2001). Quando a água está em estado de vapor, a maior resistência ao fluxo deve-se à abertura estomática, porém em fase líquida, o sistema radicular é a resistência mais importante (STEUDLE, 2000).

As raízes desempenham um papel crucial nas relações hídricas das plantas e conseqüentemente apresentam propriedades hidráulicas sofisticadas. Elas estabelecem a conexão entre o contínuo solo-planta-atmosfera, que deve ser mantido mesmo em condições fisiológicas e ambientais adversas (JACKSON; SPERRY; DAWSON, 2000; STEUDLE, 2001). Sob altas taxas de transpiração algumas plantas terrestres podem perder para a atmosfera todo seu conteúdo de água em poucas horas, e nessas condições a absorção de água não deve ser limitante. Desse modo, a raiz deve possuir morfologia adaptada às restrições físicas e nutricionais que ocorrem nos diferentes tipos de solos (JACKSON; SPERRY; DAWSON, 2000). Em todas essas situações as propriedades de transporte de água na raiz devem ser ajustadas à demanda fisiológica da planta (JAVOT; MAUREL, 2002).

No solo o transporte de água é feito predominantemente por fluxo de massa, governado por gradientes de pressão. Entretanto, em contato com a superfície radicular, a natureza de seu transporte se torna mais complexa. A água se move na raiz pelas rotas apoplástica, simplástica e transmembranar, governada pela

atmosfera através de leis físicas e diferenças de energia-livre ou potencial hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2010). Assim como ocorre com outros órgãos, as três rotas de transporte de água citadas anteriormente coexistem nas raízes. A via apoplástica envolve passagem de água através das paredes celulares ou de espaços entre as células. Na rota simplástica o fluxo de água ocorre pelos plasmodesmas, conexões citoplasmáticas que unem células adjacentes e permitem a troca de substâncias. A via transmembranar envolve a passagem de água por pelo menos duas membranas, a do lado de entrada e do lado oposto, de saída da célula. As vias simplástica e transmembranar podem ser associadas em uma única, denominada via célula-a-célula. Apesar da importância relativa das três vias ainda não estar completamente estabelecida pela ciência, outra forma de se entender o movimento de água através da raiz é considerá-la uma única rota, tendo uma só condutância radicular generalizada.

Na passagem da solução do solo para o interior dos tecidos vasculares da raiz a água deve fluir radialmente e atravessar uma série de camadas de células. Essas camadas incluem, em direção ao centro, os seguintes tecidos: epiderme, exoderme (que nas raízes encontra-se diferenciada), parênquima cortical, endoderme, periciclo e parênquima xilemático (STEUDLE; PETERSON, 1998). Acredita-se que as estrias de Caspary, espessamentos de lignina e suberina nas paredes das células da endoderme, formam uma barreira ao fluxo apoplástico, impedindo o refluxo de solutos para o cilindro central (TESTER; LEIGH, 2001). As estrias de Caspary quebram a continuidade da rota apoplástica forçando a água e os solutos atravessarem a endoderme pela membrana plasmática. A obrigatoriedade da água em mover-se simplasticamente na endoderme explica porque a permeabilidade das raízes à água é tão dependente da presença das aquaporinas, proteínas de membrana que facilitam a passagem de água e pequenos solutos pelas membranas celulares (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Estudos têm mostrado que a exoderme impede o refluxo de água (ZIMMERMANN; STEUDLE, 1998). Segundo Steudle e Peterson (1998), a via apoplástica pode ser inibida pela presença das estrias de Caspary, presentes nas paredes radiais e transversais da endoderme e da exoderme.

A passagem de água através de tecidos vivos, essencialmente ao longo do eixo radial, oferece grande resistência à absorção de água pela raiz. Estima-se que de 70 a 90% da resistência radial ao fluxo é devida aos tipos

celulares encontrados externamente aos vasos xilemáticos, enquanto que o restante da resistência é atribuída à transferência de água através das paredes dos vasos condutores (STEUDLE; PETERSON, 1998).

Durante o dia, sob altas taxas de transpiração, geralmente aceita-se que forças hidrostáticas governam o fluxo radial de água pela raiz e que a via apoplástica seja predominante. Já à noite, quando a transpiração é baixa ou nula, acredita-se que o fluxo ocorra impulsionado por um gradiente osmótico, criado pelo acúmulo de solutos no xilema, e então o fluxo apoplástico é desprezível enquanto a rota de célula-a-célula é favorecida (STEUDLE; PETERSON 1998).

A literatura indica que de acordo com as taxas de transpiração, as raízes são capazes de optar entre as rotas apoplástica ou de célula-a-célula, de acordo com o modelo de transporte complexo proposto por Steudle (2000; 2001), que será discutido posteriormente.

Numerosos estudos têm abordado mecanismos fisiológicos e biofísicos de relações hídricas em plantas (STEUDLE, 1994; BOYER, 1982; DAINITY, 1963) e apontaram para uma variedade de processos envolvendo o transporte de água para expansão celular e osmorregulação, que demandam a passagem de água através de membranas celulares. No entanto, mecanismos de permeabilidade das membranas celulares ao fluxo de água permaneceram obscuros até a descoberta em 1991, em plantas e animais, das aquaporinas. Essas proteínas facilitam o intercâmbio passivo de água e outras substâncias entre as membranas e sua identificação nos vegetais demonstrou a limitação do transporte transmembrana e seus efeitos sobre uma série de processos fisiológicos (MAUREL, 1997).

2.2 Aquaporinas vegetais

Proteínas integrais de membrana que facilitam o fluxo de água e o transporte de pequenas moléculas, as aquaporinas estão envolvidas em diversas funções nos vegetais como aquisição de nutrientes, fixação de carbono, sinalização celular e respostas a diferentes tipos de estresses (KALDENHOFF; FISCHER, 2006; MAUREL, 1997). Presentes em diversos táxons elas podem ser encontradas de protozoários a mamíferos (KRUSE; UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006; AGRE; BONHIVERS; BORGNIA, 1998) e são expressas em membranas de vários compartimentos celulares, incluindo a membrana plasmática e a membrana do vacúolo, denominada tonoplasto.

As aquaporinas pertencem à superfamília multigênica de proteínas MIP (*Major Intrinsic Proteins*). De acordo com Johanson et. al. (2001) as aquaporinas vegetais foram classificadas inicialmente em quatro diferentes subfamílias, denominadas PIPs (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*), TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*), NIPs (*Nodulin-26-like Proteins*) e SIPs (*Small Intrinsic Proteins*). Com base na similaridade da sequência de aminoácidos essa divisão está diretamente associada à localização subcelular específica dos membros de algumas subfamílias, da membrana plasmática e do tonoplasto. A subfamília PIP foi mais tarde dividida em PIP1 e PIP2, sendo que PIP2 agrupa proteínas com maior capacidade de transporte de água (CHAUMONT et al., 2001). Recentemente foi proposta uma quinta subfamília, XIPs (*X Intrinsic Proteins*), identificada primeiramente em líquens e algumas espécies de plantas superiores (DANIELSON; JOHANSON, 2008).

Essas proteínas são particularmente abundantes em plantas superiores. Segundo Wudick, Luu e Maurel (2009) a grande variedade de aquaporinas em plantas poderia estar relacionada à seletividade dos diferentes substratos, aos diversos padrões de localização celular e tecidual, ao alto nível de compartimentalização das células vegetais e às diversas funções celulares que promovem o equilíbrio hídrico e osmótico entre os compartimentos.

Até o momento, 13 homólogos de aquaporinas foram descritos em humanos (MAGNI et al., 2006) enquanto os genomas de plantas como arroz e milho possuem mais de 30 homólogos já identificados (CHAUMONT et al., 2001; SAKURAI et al., 2005). Aquaporinas são codificadas por uma vasta família multigênica, com 35 genes já identificados somente em *Arabidopsis thaliana* e 36 genes expressos em milho (CHAUMONT et al., 2001), sendo que algumas proteínas exibem expressões específicas em células radiculares (JAVOT; MAUREL, 2002).

A expressão de genes de aquaporinas pode ser controlada por diversos fatores ambientais, como luz azul, estresse hídrico, infecção por patógenos, além de hormônios, como ácido abscísico e giberelinas. Todos esses fatores podem interagir resultando em diferentes padrões de expressão que se refletem no seu papel fisiológico na planta (MAUREL, 1997).

São proteínas de baixo peso molecular, de 26 a 34 kDa, e atuam como poros finos ou canais que conferem alta condutividade hidráulica à membrana, permitindo uma passagem mais rápida da água através dela (SUI et al., 2001). A permeabilidade à água das membranas que possuem aquaporinas é, pelo menos 10

vezes maior, em comparação com membranas artificiais, constituídas unicamente por lipídeos, o que destaca o papel dessas proteínas, essenciais ao transporte de água entre as células (TYERMAN et al., 1999).

Desde 1993, quando a primeira aquaporina vegetal (γ TIP) foi clonada e expressa tem crescido o interesse em relação à sua biologia molecular e comportamento biofísico no fluxo de água através das membranas das células vegetais (STEUDLE; HENZLER, 1995; MAUREL, 1997; SCHAFFNER, 1998).

Devido à alta diversidade de aquaporinas em plantas, são possíveis vários mecanismos de regulação, como por exemplo, fosforilação e multimerização de proteínas de membrana, cátions bivalentes e pH (KALDENHOFF; FISCHER, 2006). A dinâmica de funcionamento das aquaporinas, abertura e fechamento do poro, é regulada por múltiplos fatores, tais como pH e concentrações de Ca^{2+} (TAIZ; ZEIGER, 2010). O acionamento de aquaporinas vegetais tem sido sugerido por experimentos realizados em células da alga *Chara corallina* (HENZLER et al., 2004) e mais recentemente com raízes de milho (YE; STEUDLE, 2006).

Segundo Tyerman, Niemietz e Bramley (2002) aquaporinas podem ser reversivelmente fechadas ou oscilarem entre um estado aberto e fechado, em resposta a parâmetros fisiológicos e isso permite que as plantas regulem ativamente a permeabilidade de suas membranas à água. Diante disso, a atividade dos canais de água requer uma fina regulação, que pode ser influenciada, por exemplo, pelo metabolismo celular em função da fosforilação de aquaporinas (DANIELS; MIRKOV; CHRISPEELS, 1994; MAUREL, et al., 1995; JOHANSSON et al., 1998). Na raiz, a atividade de aquaporinas pode ser essencial quando esta se encontra fortemente suberizada ou quando a via apoplástica está bloqueada (TYERMAN et al., 1999).

Mais que simples canais de água, aquaporinas são proteínas multifuncionais que podem exibir uma ampla gama de perfis de seletividade no transporte (TYERMAN; NIEMIETZ; BRAMLEY, 2002). Além de água e glicerol, o transporte de várias moléculas como dióxido de carbono (CO_2), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), amônia (NH_3), arsenito ($\text{As}(\text{OH})_3$), ácido bórico ($\text{B}(\text{OH})_3$) e ureia já foi demonstrado para várias aquaporinas vegetais (GASPAR, 2011).

Devido à sua eficiência em bloquear os canais de água, o cloreto de mercúrio foi bastante utilizado como ferramenta para estimar a contribuição das aquaporinas ao transporte de água em raízes de diversas espécies vegetais, com

níveis de inibição de 32 a 90% (JAVOT; MAUREL, 2002). No entanto, o uso desse inibidor não permite determinar com precisão o papel das aquaporinas no transporte de água em raízes, tendo em vista a presença de aquaporinas insensíveis ao mercúrio (DANIELS et al., 1994), a sua baixa penetração nos tecidos (GASPAR, 2011) e seus efeitos tóxicos e inespecíficos, devido à propriedade do HgCl_2 de se ligar aos resíduos de cisteína de quaisquer proteínas.

Ye e Steudle (2006) sugeriram que concentrações milimolares de peróxido de hidrogênio podem afetar diretamente abertura/fechamento dos canais de água por oxidação, interferindo assim na atividade das aquaporinas. Os trabalhos realizados por Ye e Steudle (2006) e Ehlert et al. (2009) permitem afirmar que o peróxido de hidrogênio, dependendo da concentração, pode causar inibição das aquaporinas.

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) gerada em muitos processos metabólicos e de grande importância em vias biológicas. Em baixas concentrações, H_2O_2 funciona como mensageiro na via de transdução de sinais nas células, podendo influenciar a expressão de genes, ativar ou modificar fatores transcricionais, desencadeando tolerância a estresses ambientais. As espécies reativas de oxigênio são elementos cruciais na sinalização celular e podem desencadear reações em cascata de eventos que levariam ao *downregulation* de aquaporinas em células vivas (BOURSIAC et al., 2008).

Uma vez atuante nas vias de transdução de sinais, é desejável que o transporte de H_2O_2 através das membranas seja eficiente. Sua difusão pela membrana plasmática é lenta, além disso, há várias membranas pouco permeáveis ao composto (BIERNET et al., 2006). Um incremento no transporte de peróxido de hidrogênio é observado através das aquaporinas e evidências experimentais sugerem algumas atuam como peroxiaquaporinas por facilitar a difusão de H_2O_2 através das membranas biológicas (HENZLER; STEUDLE, 2000).

Henzler et al. (2004) propôs que através da reação Felton, com suprimento exógeno de H_2O_2 são produzidos radicais hidroxila que atuam diretamente na oxidação de aquaporinas ou indiretamente oxidando lipídeos das membranas, formando radicais secundários. Plantas de *Arabidopsis thaliana* quando tratadas com concentrações milimolares de H_2O_2 tiveram sua condutância hidráulica rapidamente inibida em mais de 90% (BOURSIAC et al., 2008).

A literatura aponta que as aquaporinas, abundantes nas membranas plasmáticas de células radiculares, desempenham um papel importante na rota célula-a-célula em milho (CHAUMONT et al., 2001; AROCA et al., 2005). A alta plasticidade dessas proteínas nos vegetais, representada pelo fato delas serem reguladas por inúmeros fatores associados à alta diversidade metabólica e de arquitetura que as raízes exibem, resulta em grande variabilidade da condutância hidráulica radicular, em diferentes contextos ambientais. Segundo Javot e Maurel (2002) membranas ricas em aquaporinas facilitam o intenso fluxo de água através das células radiculares, especialmente a endoderme e as células vizinhas aos vasos xilemáticos. As aquaporinas podem apresentar papel importante como eficientes controladoras da absorção de água e nutrientes minerais na raiz.

Em parte devido à grande diversidade, o conhecimento que se tem sobre aquaporinas em plantas, sua expressão, localização subcelular e função ainda está longe de ser satisfatório. No entanto, dados obtidos nos últimos anos indicam claramente que a completa expressão e propriedades regulatórias ocorrem em proteínas especializadas no transporte de água nas raízes (JAVOT; MAUREL, 2002). Estudos da caracterização detalhada do papel das aquaporinas na fisiologia vegetal, em particular nas relações hídricas, são ainda insuficientes.

2.3 Condutância hidráulica (LPr)

A condutância hidráulica radicular é um dos principais parâmetros que refletem a habilidade de absorção de água das raízes e está diretamente relacionada às relações hídricas da planta, sob condições normais ou estressantes (MU et al., 2006).

As plantas podem regular sua capacidade de transportar água através de mudanças rápidas na condutância hidráulica, em intervalos de minutos ou horas, baseando-se na regulação de aquaporinas, situadas nas membranas. Vários fatores influenciam a LPr, dentre eles destacam-se: tipo de íon presente na seiva e a concentração do mesmo; geometria dos vasos de xilema do sistema radicular; temperatura; hora do dia; idade e anatomia do sistema radicular (OLIVEIRA, 2008, dados não publicados). Além disso, estresses abióticos como seca, salinidade, compactação de solo, alagamento e baixas temperaturas, bem como intensidade luminosa e o estado nutricional das plantas, afetam a condutância hidráulica dos tecidos, alterando sua resistência ao fluxo de água, onde o papel das aquaporinas é

essencial (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2003). Sabe-se que sob estresses abióticos, como salino, baixas temperaturas, anoxia ou privação de nutrientes ocorre redução da LPr em muitas espécies. Essa diminuição considerável da LPr está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (BOURSIAC et al., 2008; AROCA et al., 2005).

Consideráveis mudanças de permeabilidade à água, ou seja, de condutância hidráulica podem ocorrer nas raízes. Durante o dia, a corrente transpiratória gera alta tensão no xilema da raiz e altos gradientes de potencial hídrico através do cilindro radicular. Como a condutância hidráulica da raiz é menor que em outras partes da planta, esses gradientes dirigem uma parte considerável do fluxo de água no sentido axial, o que explica ascensão da seiva pelo xilema até a parte aérea. À noite quando a transpiração do vegetal é reduzida, os gradientes de pressão hidráulica através do cilindro radicular declinam. De acordo com as condições ambientais podem ocorrer mudanças nas forças que governam o fluxo de água através dos tecidos, causando alterações na condutância hidráulica. Dependendo da situação em que a planta se encontra, a relativa contribuição das aquaporinas para o fluxo de água através das raízes pode ser variável. Essa pode ser a evidência de um provável mecanismo usado pelas plantas para responder às alterações ambientais (TYERMAN et al., 1999).

O transporte de água é um processo complexo, conforme citado anteriormente, que envolve a estrutura celular, tecidos e órgãos. O modelo de transporte complexo tem sido proposto (STEUDLE, 1994; STEUDLE; FRENSCH, 1996; STEUDLE; PETERSON, 1998) e permite variabilidade hidráulica de tecidos e órgãos, essencial à sobrevivência das plantas em condições adversas. De acordo com este modelo as diferenças entre as propriedades hidráulicas das raízes dependem de mudanças nas forças que governam o fluxo de água, relacionadas diretamente com a demanda da parte aérea e as condições ambientais a que as plantas estão sujeitas.

As raízes possuem notável capacidade de alteração da LPr em resposta a vários estímulos, como ciclos dia/noite, deficiência nutricional, estresses, porém antes disso pode-se observar mudanças morfológicas e anatômicas (STEUDLE et al., 2000). Esses processos são relevantes em adaptação a estresses como seca ou salinidade (JAVOT; MAUREL, 2002).

O estado nutricional das plantas é um dos principais determinantes das propriedades hidráulicas da raiz (CLARKSON et al., 2000). Fragmentos de raízes jovens de milho e cevada crescendo sob deficiência de nitrato e sulfato exibiram redução de 20% da condutância hidráulica em relação às plantas com suprimento normal de nutrientes. Em milho esses efeitos foram completamente revertidos após 15h de suprimento com nitrato (KARMOKER et al., 1991).

Sabe-se que o metabolismo vegetal é regulado por ritmo circadiano. Uma vez que o transporte de água e de outras substâncias é mediado por aquaporinas, sugere-se então que também a expressão e função dessas proteínas seguem mudanças fisiológicas dependentes dos regimes dia/noite. Há alterações significativas de condutância hidráulica de acordo com a hora do dia. (UEHLEIN; KALDENHOFF, 2006). Henzler et al., (1999) encontrou variação diurna na LPr em raízes de *Lotus japonicus* crescidas aeronicamente ou em areia.

O balanço hídrico nas plantas é determinado principalmente pela taxa de absorção de água. A capacidade de absorção das raízes é dada pelo produto da área superficial radicular pela condutância hidráulica (KRAMER; BOYER, 1995), o que reforça a necessidade de se determinar a LPr.

A relação entre as rápidas mudanças na condutância hidráulica da raiz com a expressão/função das aquaporinas tem sido demonstrada ultimamente, porém estudos relacionando condutância hidráulica e atividades dessas proteínas são escassos.

Várias técnicas são utilizadas por pesquisadores para determinar as propriedades hidráulicas em plantas, incluindo fluxo evaporativo ou medidor de fluxo de alta pressão (TSUDA; TYREE, 2000), método de exudação radicular induzida por pressão hidrostática (MARTINEZ-BALLESTA et al., 2003), técnica de exudação natural (LÓPEZ-PEREZ et al., 2007), câmara de pressão (JAVOT et al., 2003), técnica de tensão induzida (LOVISOLO et al., 2008) e a sonda de pressão (STEUDLE; OREN; SCHULZE, 1987).

A técnica de fluxo evaporativo envolve taxa de transpiração e gradientes de potencial hídrico, é prática para uso em campo, porém gera medidas de baixa precisão. Em ambientes controlados, com adequada demanda evaporativa, a transpiração é mantida estável e as diferenças de pressão osmótica são minimizadas prevenindo mudanças no conteúdo de água do tecido. É muito utilizada em plantas de grande porte (TSUDA; TYREE, 2000).

O método de exudação induzida por pressão hidrostática, descrito por Martínez-Ballesta et al. (2003), é um dos mais utilizados em condições de laboratório. Nele o sistema radicular inteiro é destacado por um corte na altura do caule que é encaixado ao tubo que aplicará a pressão hidrostática. Essa técnica impõe gradientes artificiais de potencial hídrico e pode levar a modificações irreversíveis na interface solo-raiz. A condutância estimada por esta técnica não reflete fielmente o valor real encontrado em condições naturais, particularmente em sistemas radiculares crescendo no solo.

A coleta de exudatos da raiz sob pressões radiculares para estimativa da condutância hidráulica é uma técnica muito utilizada. No entanto, a taxa de fluxo detectada por este método não representa fielmente o estado de plantas naturalmente transpirando, podendo haver subestimação (LÓPEZ-PEREZ et al., 2007).

Descrita por Javot et al. (2003) a câmara de pressão utiliza aplicação de pressões na câmara por meio de cilindro de gás nitrogênio. O hipocótilo das plântulas é encaixado no sistema em hidroponia e a coleta dos exudatos é feita com micropipeta graduada. A taxa de fluxo da seiva pode então ser calculada e juntamente com a área da raiz e a pressão é possível estimar a LPr. Trata-se, no entanto, de mais uma técnica que aplica pressões positivas, que empurram a seiva da planta e não reflete a situação natural.

Dentre as técnicas mencionadas acima, a sonda de pressão é historicamente o método mais utilizado e confiável. Ela tem sido usada para determinar a pressão radicular e estimar fluxos de água e solutos. Porém, devido à alta plasticidade do sistema radicular em relação à arquitetura e metabolismo, além das diferentes propriedades metodológicas das técnicas, os valores estimados de LPr podem ser altamente variáveis, mesmo para plantas da mesma espécie (MU et al., 2006).

Diante da alta variabilidade dos dados obtidos com essas diferentes técnicas e dificuldades metodológicas, o método de sucção é proposto visando aumentar a confiabilidade na estimativa da LPr, permitindo mais de uma observação por parcela, e principalmente por aplicar tensões (pressões negativas) no caule, de modo semelhante ao que ocorre no interior do corpo da planta transpirando, em condições ambientais normais. Além da técnica, tem-se o objetivo de avaliar o comportamento das aquaporinas radiculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área de trabalho

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse (LEPSE), localizado nas dependências do departamento de Ciências Biológicas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

3.2 Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays* L.) da cultivar AGROCERES 5055. As sementes foram previamente desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, em agitação, e em seguida lavadas com água deionizada. Posteriormente elas foram envolvidas individualmente em papel germitest tipo cel 0-65, umedecido com água deionizada, e colocadas para germinar em câmara de crescimento do tipo B.O.D. com temperatura controlada (25°C) e no escuro, para estiolamento do caule. Após 7 dias as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo solução nutritiva e mantidas em cultivo hidropônico em casa de vegetação. As medidas de LPr foram tomadas de plântulas com idades de 14 a 18 dias. O conceito de plântulas não tem sido precisamente definido na literatura e há controvérsias entre os autores principalmente ao definir o ponto final deste estágio de desenvolvimento da planta. Melo et al. (2004) considera que o indivíduo é classificado como plântula enquanto depender da reserva da semente, além de reconhecer indivíduos jovens com até 50cm de altura. Deste modo, neste trabalho será considerado tal qual como na última definição, indivíduos jovens.

Figura 1 - Plântula de milho estiolada após 7 dias no escuro, a 25°C em câmara de crescimento

Figura 2 - Plântulas de milho com 15 dias de idade em hidroponia na casa de vegetação do LEPSE

3.3 Solução nutritiva

A solução nutritiva foi preparada utilizando-se o fertilizante Miracle-Gro® Water Soluble All Purpose Plant Food, cuja composição é mostrada na tabela 1.

Tabela 1- Composição do fertilizante Miracle-Gro®

Nutriente	Quantidade (%)
Nitrogênio total (N)	24
Fósforo (P)	8
Potássio (K)	16
Boro (B)	0,02
Cobre (Cu)	0,07
Ferro (Fe)	0,15
Manganês (Mn)	0,05
Molibidênio (Mo)	0,0005
Zinco (Zn)	0,06

As informações contidas no rótulo indicaram baixas concentrações dos íons K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} , tornando necessária a correção desses nutrientes. A quantidade de sais utilizada para o preparo de um litro de solução nutritiva encontra-se detalhada na tabela 2.

Tabela 2 - Fontes de nutrientes utilizadas na solução nutritiva

Fonte de nutrientes	Quantidade
Miracle-Gro®	0,23g
KCl	0,05g
CaCl ₂	0,13g
MgCl ₂	0,05g
Fe-EDTA	1mL

Para o preparo de 1L de Fe-EDTA: dissolveram-se 26,2g de EDTA dissódico em 286mL de NaOH (M), após dissolveram-se 24,0g de FeSO₄.7H₂O, arejando-se por 12 horas e completando-se o volume com água deionizada.

As soluções nutritivas foram preparadas com água deionizada e homogeneizadas com o auxílio de agitador magnético. A substituição da solução nutritiva foi realizada a cada 5 dias.

As plântulas cultivadas com a solução passaram por testes de análise foliar, realizados no Laboratório de Tecidos Vegetais pertencente ao Departamento de Ciência do Solo da ESALQ. Os resultados, não exibidos no presente trabalho, foram satisfatórios para o desenvolvimento vegetativo das plântulas.

Foi mantido durante todo o experimento o monitoramento de vários parâmetros da solução nutritiva como temperatura, pH e oxigênio dissolvido.

3.3.1 Temperatura

A faixa de temperatura adequada para germinação de sementes de milho é bastante ampla e situa-se na faixa entre 15 e 30°C, dependendo da cultivar. Foi fixada temperatura de 25°C na B.O.D., no banho termostático e na solução nutritiva, com monitoramento feito por termômetros digitais e termopares Termoshaw®. Em condições de casa de vegetação as temperaturas de abril e maio oscilaram em torno de 22,4°C e 19,7°C, respectivamente (POSTO METEOROLÓGICO ESALQ, 2013). No momento da medida de LPr as plântulas foram aclimatadas no laboratório, em torno dos 25°C.

3.3.2 pH

Segundo Furlani et al. (1999) em boletim divulgado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) variações de pH na faixa de 4,5 a 7,5 são toleradas,

não apresentando problemas ao crescimento das plantas. No entanto, valores abaixo de 4,0 afetam a integridade das membranas celulares e valores superiores a 6,5 deve-se ter atenção redobrada com possíveis sintomas de deficiência de Fe, P, B e Mn. Para as medidas foi utilizado pHmetro Digimed®, modelo DM 20 além de pHmetros digitais Hanna®, modelo HI 98103.

3.3.3 Oxigênio dissolvido

Não existem dados na literatura relatando a concentração ideal de oxigênio nas soluções nutritivas. No entanto, o fornecimento adequado de oxigênio às raízes é imprescindível, uma vez que as aquaporinas são sensíveis à hipoxia. Segundo Agudo (1992) a concentração de saturação de O₂ dissolvido na superfície da água líquida pura à 25°C é de 8,4 mg.L⁻¹. O bombeamento de ar na solução nutritiva foi promovido por bombas de aquário (Alea air pump, modelo AP-2000) com pressão de 0,01MPa. Para medir a quantidade de O₂ dissolvido na solução foi utilizado oxímetro Digimed®, modelo DM-4P.

3.4 Sistema hidráulico de sucção

A condutância hidráulica (LPr) foi estimada utilizando-se um sistema hidráulico de sucção construído no LEPSE em parceria com Laboratoire d'Ecophysiologie des Plants sous Stress Environnementaux de Montpellier – França (OLIVEIRA, 2008, dados não publicados).

O equipamento consiste das seguintes partes: a) uma bomba de sucção fabricada pela TecnoPON; b) um sensor de medida de pressão; c) tubo de uretano com diâmetro de 4mm, no qual uma das extremidades interconecta-se a um tubete metálico com volume 4cm³ contendo em seu interior uma amostra de algodão de massa conhecida. Na outra extremidade (d) um tubo de silicone flexível de diâmetro 4mm é acoplado ao mesocótilo das plântulas contidas num (e) recipiente de vidro contendo a solução nutritiva, com fornecimento de ar por bombas de aquário. Um esquema simplificado do sistema hidráulico de sucção está representado na figura 3.

Figura 3 - Esquema do sistema hidráulico de sucção

O procedimento de medida da LPr foi baseado em pesagens sequenciais de amostras de algodão em intervalos de tempo conhecidos, permitindo o cálculo do fluxo gravimétrico (J_g) em kg s^{-1} absorvido pelo sistema radicular, que dividido pela tensão aplicada (T) em MPa e pela área do sistema radicular (A) em m^2 , fornece estimativas da condutividade hidráulica radicular conforme a equação abaixo:

$$\text{LPr} = \frac{J_g}{T.A},$$

em que:

LPr: condutância hidráulica radicular em $\text{kg s}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{m}^{-2}$;

J_g : fluxo gravimétrico de seiva através do segmento de raiz em kg s^{-1} ;

T : tensão aplicada em MPa;

A : área do sistema radicular em m^2 .

As amostras de algodão têm uma massa seca inicial conhecida (P_s). Com a sucção da seiva, que ocorre quando a tensão é aplicada ao sistema, as amostras se tornam umedecidas, adquirindo massa (P_u). Para cálculo de LPr em $\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ (unidade adotada pelo SI), o fluxo gravimétrico da seiva precisa ser convertido em fluxo volumétrico ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$). Tal conversão é feita dividindo-se o fluxo gravimétrico pela densidade da seiva:

$$J_v = \frac{P_u - P_s}{t.\rho},$$

em que:

J_v : fluxo volumétrico de seiva através do segmento do sistema radicular em $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$;

P_u : peso do algodão úmido em kg;

P_s : peso do algodão seco em kg;

t : intervalo de tempo em s^{-1} ;

ρ : densidade da seiva inorgânica em kg m^{-3} .

Assim sendo, temos:

$$LPr = \frac{J_v}{T.A}.$$

Desse modo, a condutância hidráulica radicular é expressa em unidades de volume de seiva por unidade de área radicular por unidade de tempo por unidade de pressão aplicada, na qual existe um gradiente de temperatura uniforme ao longo do sistema radicular e cuja secção transversal dos vasos condutores seja reta, uniforme e desprovida de rugosidade.

3.4.1 Medidas de LPr

As plântulas foram transferidas da casa de vegetação para o banho-maria Biothec® modelo BT 55/30/B/PID. O banho continha um recipiente de vidro com solução nutritiva e capacidade de suporte para 4 plântulas; aberturas no tampo superior deste recipiente permitiram bombeamento de ar continuamente, utilizando bombas de aquário, além do monitoramento dos parâmetros citados para a solução nutritiva. As plântulas foram seccionadas na altura do mesocótilo com auxílio de lâmina de barbear, encaixadas no tubo de silicone de 4mm de diâmetro e vedadas com auxílio de esmalte incolor e AquasilUltra XLV, uma cola especial de uso odontológico e que se polimeriza rapidamente em contato com o ar. Esta cola foi aplicada com auxílio da pistola Dentsply Caulk e promoveu a criação do vácuo no sistema.

Foi feita pesagem do eppendorf contendo o fragmento de algodão, utilizando-se a balança analítica Ohaus®, modelo Explorer. Posteriormente o algodão foi colocado no interior do tubete de metal, que interconecta o material vegetal e a bomba peristáltica. A tensão de 0,3 atm foi fixada na bomba e houve sucção da seiva. Vale a pena ressaltar que a atmosfera foi utilizada como referência (pressão zero), sendo assim, a força de sucção assume o sinal negativo. Essa

convenção de utilizar a atmosfera como referência é comum na literatura botânica. Após 10 minutos de sucção houve uma nova pesagem do eppendorf com o algodão, agora umedecido, para calcular o fluxo gravimétrico, conforme descrição anterior.

A figura 4 mostra o sistema hidráulico de sucção com as plântulas de milho acopladas.

Figura 4 - Sistema hidráulico de sucção. A figura mostra as plântulas de milho acopladas ao sistema em funcionamento

3.4.2 Estimativa da área superficial da raiz

As raízes foram dispostas sobre um telepanorâmico de led Biotron® e fotografadas em uma cabine fechada, de dimensões 38x41x31cm, constituída de MDF, material opaco para evitar a luminosidade externa e a formação de sombra e outros artefatos. Ela possui um encaixe padronizado para a câmera fotográfica, com 6,5cm de diâmetro, a uma distância fixa do objeto para manter a escala padrão. As imagens geradas foram analisadas pelo software Safira®, cedido pela Embrapa Instrumentação Agropecuária. Os valores de área superficial da raiz, em cm^2 , foi utilizada nos cálculos de LPr, como demonstrado no tópico anterior.

Figura 5 - Etapas da estimativa da área superficial da raiz de milho com 15 dias de idade processada pelo software Safira®. A) Disposição da raiz sobre o telepanorâmico de led. B) Limiarização manual. C) Esqueleto colorido, em que as cores diferenciam os tipos de diâmetros

3.5 Atividade de aquaporinas

Para estimar a contribuição das aquaporinas no transporte de água radicular foi adicionado à solução nutritiva o inibidor peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em concentração 2mM, de acordo com Ehlert et al. (2009) e após 30 minutos foram feitas novas medidas de LPr.

3.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, que consistiu-se de dois tratamentos (controle e com aplicação do peróxido de hidrogênio); para tratamento controle tomou-se três observações, enquanto que para o tratamento com H_2O_2 tomaram-se quatro observações, sendo que a mesma parcela recebeu ambos tratamentos. A coleta de dados foi realizada de Abril a Maio de 2013. De cada planta foram tomadas medidas da quantidade de oxigênio dissolvido e o pH da solução nutritiva, no momento da medida de LPr. Após as medidas foi feita estimativa da área superficial da raiz. Foram avaliadas 36 plantas no total.

O modelo estatístico empregado foi:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

y_{ij} é o valor de LPr do i -ésimo tratamento e na j -ésima repetição;

μ é uma constante associada a cada observação;

t_i é o efeito do i -ésimo tratamento, $i=1,2$;

e_{ij} é o erro experimental (entre);

ε_{ijk} é o erro amostral (dentro) na k -ésima parcela.

Para análises estatísticas dos dados foi utilizado o software R versão 3.0.1 (R Development Core Team, 2013). Os resultados foram avaliados pela ANOVA e comparação das médias pelo teste de Tukey. Utilizou-se também o teste de correlação de Pearson, cujo coeficiente é calculado dividindo-se as covariâncias pela raiz quadrada dos desvios padrões da média, no intuito de avaliar a correlação entre a LPr e demais variáveis monitoradas durante o experimento. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ ou $\alpha = 5\%$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostrado na tabela 3, houve significância para o efeito de tratamentos, ou seja, a condutância hidráulica do controle se diferiu estatisticamente da condutância obtida após o contato das raízes com o inibidor H_2O_2 , sendo que a última foi aproximadamente três vezes menor que o controle. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 4.

Tabela 3 - Resumo do teste F da ANOVA para os tratamentos em que LPr é expressa em $m\ MPa^{-1}\ s^{-1}$

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Teste F	P valor
Tratamentos	1	$3,22 \times 10^{-13}$	$3,22 \times 10^{-13}$	124,5	< 0,001*
Erro entre	70	$1,81 \times 10^{-13}$	$2,60 \times 10^{-15}$	-	-
Erro dentro	180	$4,18 \times 10^{-13}$	$2,32 \times 10^{-15}$	-	-

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4 - Teste de médias entre os tratamentos em que LPr é expressa em $m\ MPa^{-1}\ s^{-1}$

Tratamentos	Repetições	Média de LPr	Erro padrão
Controle	108	$11,08 \times 10^{-8}\ a$	$5,83 \times 10^{-9}$
H_2O_2	144	$3,85 \times 10^{-8}\ b$	$3,16 \times 10^{-9}$

As letras diferentes indicam que as médias dos tratamentos diferiram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Li e Liu (2010), comparando métodos de determinação da LPr em plântulas de milho cultivadas em hidroponia, observaram uma redução maior que 50% da LPr em plântulas estressadas. Isso indica que a permeabilidade das raízes decresce significativamente quando as plantas sofrem restrição hídrica, com valores de condutância hidráulica radicular das plantas controle em torno de $7 \times 10^{-8}\ m\ s^{-1}\ MPa^{-1}$. Foi utilizado o método da câmara de pressão para essas medidas e resultados similares foram obtidos usando a técnica da sonda de pressão.

Trabalhos utilizando outras metodologias para estimar a LPr em plântulas de milho, aos 15 dias de idade, têm sido feitos ultimamente (LOPEZ et al., 2003; MU et al., 2006; EHLERT et al., 2009; LI; LIU, 2010). A LPr estimada pelo método de sucção é semelhante aos valores encontrados nesses trabalhos, evidenciando a eficácia da metodologia proposta, cujo diferencia está na aplicação de tensões ou pressões negativas.

A maior parte dos trabalhos testa os efeitos de tratamentos com diferentes níveis de estresses abióticos, como o hídrico principalmente, e apesar de no presente trabalho não termos avaliado o efeito do estresse hídrico diretamente, o tratamento com o peróxido de hidrogênio simulou uma situação estressante, ou seja, expôs as raízes das plântulas ao H_2O_2 . Possivelmente houve a formação de radicais hidroxila ($OH^\cdot$), o que explicaria o aumento nos níveis de pH, e provavelmente interagiram com as aquaporinas, reduzindo sua atividade e/ou abundância, resultando em uma redução de 53% da LPr, como pode ser visto na figura 6. Ehlert et al. (2009) estudando alterações de LPr mediada por aquaporinas em plântulas de milho encontrou redução de 54% na condutância do tratamento que recebeu peróxido de hidrogênio.

Estudos indicaram recentemente um possível papel benéfico das ROS nas propriedades hidráulicas regulatórias da raiz. Vários mecanismos tem sido propostos para explicar a diminuição da LPr provocada por ROS. Ye e Steudle (2006) sugeriram que H_2O_2 , mais especificamente, o radical hidroxila ($OH^\cdot$), pode causar mudanças na conformação das aquaporinas, dificultando o transporte de água. Boursiac et al. (2008) relataram diminuição na condutividade hidráulica da membrana plasmática, em raiz de *Arabidopsis* tratada com H_2O_2 exógeno. Ambos experimentos trabalharam com curto período de exposição ao agente, de 15 a 120 minutos.

Figura 6 - LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) nos tratamentos controle e peróxido de hidrogênio. A linha pontilhada representa a média geral

Os estudos realizados por Ehler et. al. (2009), Aroca et. al. (2005) e Ye e Steudle (2006) confirmaram propostas anteriores de decréscimo da LPr em milho em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Boursiac et. al. (2008) mostrou recentemente que em *Arabidopsis thaliana* o decréscimo da LPr induzido por H_2O_2 foi mediado por uma cascata de sinalização que envolveu o rearranjo das aquaporinas PIPs em compartimentos intracelulares. A amplitude e rapidez da inibição de LPr em raízes de milho, associada à inibição do transporte de água a nível celular comprovadas nos trabalhos citados acima, sustentam a ideia que os tratamentos com peróxido de hidrogênio resultaram em inibição das aquaporinas.

A liberação de radicais OH^- no meio hidropônico, após a introdução de H_2O_2 à solução nutritiva, pode ser comprovada pelo aumento no pH mostrado pela figura 7. O pH se manteve neutro e oscilou pouco. Embora essas oscilações sejam aparentemente pequenas, sabe-se que as plantas são capazes de perceber variações mínimas de pH, capazes de alterações no comportamento das aquaporinas radiculares. As proteínas PIPs no milho são abundantemente expressas na membrana plasmática das células radiculares (HACHEZ et al., 2006) e apresentam resíduos conservados de histidina que podem ser críticos sensores de pH, que é um dos fatores envolvidos na regulação das aquaporinas.

Figura 7 - Variação do pH com a idade das plântulas em dias. A linha pontilhada representa a média geral

Alterações citosólicas de pH e H_2O_2 têm sido consideradas sinalizadores celulares ligados à vários estímulos externos e funcionam mediando rápidas e significativas mudanças na LPr (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2003). Como será mostrado a seguir, houve correlação significativa entre a condutância hidráulica e o pH em ambos os tratamentos.

4.1 Análises de correlação

As análises de correlação de Pearson são exibidas na tabela 5.

Tabela 5 - Tabela da análise de correlação entre LPr e variáveis área superficial da raiz, pH, idade das plantas e oxigênio dissolvido. São apresentados os coeficientes de Pearson, que variam de -1 a 1

Variável	LPr (controle)	LPr (H_2O_2)
Área superficial	- 0,167 ^{ns}	0,114 ^{ns}
pH	- 0,155*	0,076*
Idade	-0,069 ^{ns}	0,042*
Oxigênio dissolvido	- 0,103 ^{ns}	0,14 ^{ns}

*Significativo ($p < 0,05$); ^{ns} não significativo.

Não houve correlação entre a LPr e as variáveis área superficial da raiz e oxigênio dissolvido. A figura 8 evidencia correlação entre área superficial da raiz e a condutância hidráulica, não significativa a 5% de probabilidade.

Figura 8 - Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre LPr ($\times 10^{-6}$ m MPa $^{-1}$ s $^{-1}$) e área superficial da raiz em cm 2

Apesar de a LPr ser função da área radicular, conforme demonstrado no tópico 3.4, não podemos afirmar que exista correlação entre elas, ou seja, o comportamento de uma não necessariamente afeta a outra. Uma possível explicação para tal fato é de que há diferenças entre área superficial da raiz e área ativa de absorção. Mu et al. (2006) estudando a condutividade hidráulica em raízes de milho cultivadas em hidroponia, demonstraram que há diferenças significativas entre área ativa de absorção e área superficial total da raiz, em função da alta plasticidade de arquitetura e metabolismo das raízes. Segundo os autores raízes mais finas e jovens são mais ativas metabolicamente, apresentando maior quantidade de pelos radiculares, sendo assim responsáveis pela maior parte da função de absorção de água e nutrientes.

As propriedades hidráulicas das raízes vegetais dependem da morfologia e anatomia, além da funcionalidade da região de absorção. Essas características se alteram durante o desenvolvimento da planta e em resposta aos estímulos ambientais, através de alterações na condutividade hidráulica da raiz (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2003).

Houve correlação significativa entre condutância hidráulica e pH para ambos os tratamentos estudados, conforme mostrado na figura 9.

Figura 9 - Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre LPr ($\times 10^{-6}$ m MPa⁻¹ s⁻¹) e pH

Alterações citosólicas de pH e H₂O₂ têm sido consideradas sinalizadores celulares ligados à vários estímulos externos e funcionam mediando rápidas e significativas mudanças na LPr (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2003).

Mudanças na natureza ou intensidade das forças que governam o fluxo de água, ou variações da LPr das células e tecidos radiculares, podem ser responsáveis por alterações nas propriedades de transporte de água na raiz. Isso permite que as plantas ajustem sua capacidade de absorver água de acordo com as condições ambientais e as fases de seu desenvolvimento (JAVOT; MAUREL, 2002).

O estágio de desenvolvimento da planta é um dos fatores que interferem na LPr. A figura 10 exibe a correlação entre a LPr e a idade da planta, sendo significativa apenas para o tratamento com peróxido de hidrogênio. Nele as condutâncias hidráulicas aumentaram gradativamente acompanhando o desenvolvimento da plântula, no intervalo de 14 a 17 dias. A queda no 18º dia pode ser explicada pela ampla variação apresentada pela LPr de acordo com as

condições ambientais do dia em que a medida foi tomada, além de fatores relacionados ao indivíduo.

A condutividade hidráulica tende a declinar com o aumento da idade da raiz em função da suberização e perda do córtex, reduzindo a área superficial ativa para absorção de água (WEELS; EISSENSTAT, 2002). Segundo Martínez-Ballesta et al. (2003) alterações anatômicas são lentas e dependem da taxa de crescimento da planta e do genótipo, podendo atuar como estratégia de sobrevivência, a planta reduz a LPr a longo prazo, influenciada por mudanças ambientais. No intervalo estudado, plântulas com 14 a 18 dias, provavelmente não existiram diferenças anatômicas suficientes que conseguissem reduzir a LPr, além disso as mudanças na condutância observadas foram a curto prazo, em termos de minutos.

Figura 10 - Correlação entre LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a idade das plântulas em dias. A linha pontilhada representa a média geral

A figura 11 apresenta o comportamento da LPr para cada dia que foram tomadas as medidas.

Figura 11 - Comportamento da LPr ($\times 10^{-6} \text{ m MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e data das medidas. A linha pontilhada representa a média geral

Apesar de não ter sido encontrada correlação significativa entre LPr e a data das medidas, vale a pena fazer alguns comentários a respeito do comportamento da LPr nos dias das coletas dos dados. No dia 30/04/2013 as plântulas apresentavam 15 dias de idade e a LPr média estimada foi de $7,98 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ para o controle e de $3,02 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ para o tratamento com peróxido, praticamente a metade da média encontrada para o controle. Comportamento semelhante foi encontrado, por exemplo, nas medidas do dia 07/05/2013, com plântulas também aos 15 dias de idade, a média de LPr controle foi de $6,55 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ e $2,05 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ para o tratamento com H_2O_2 . Porém para plântulas aos 17 dias de idade houve comportamento bem diferente. No dia 02/05/2013 a média para a LPr do controle foi em torno de $4,25 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ e o tratamento com peróxido $2,90 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$. Já no dia 09/05/2013 a média do controle foi aproximadamente $16,8 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ e $5,45 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ para o tratamento com o inibidor de aquaporinas, ou seja, houve redução de aproximadamente 3 vezes na LPr do tratamento com inibidor.

A LPr é um parâmetro altamente variável de acordo com as condições ambientais, fato que justifica a oscilação encontrada, uma vez que as medidas de LPr foram tomadas em diferentes dias, ao longo de semanas. Tomamos o cuidado de padronizar o horário da medida e manter o máximo de homogeneidade possível

das condições experimentais. Vale ressaltar que as sementes de milho usadas no ensaio eram uniformes e provenientes do mesmo lote.

As dinâmicas mudanças de LPr em resposta a estímulos químicos ou ambientais podem resultar em modificações na atividade e/ou abundância de aquaporinas (BOURSIAC et al., 2005). No entanto, devido à alta plasticidade dos sistemas radiculares com relação à arquitetura e metabolismo, e as diferentes propriedades das técnicas de medida e condições experimentais, a condutância hidráulica radicular pode ser altamente variável para plantas da mesma espécie (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2003). Os dados desse experimento corroboram com a afirmação de que há, de fato, alta variação de LPr para plântulas da mesma espécie e uniformes em relação ao fenótipo, nutrição e idade.

O intuito de desenvolver o método de sucção foi o de viabilizar a estimativa da condutância hidráulica por meio de um equipamento versátil, prático e muito confiável para determinação das medidas. Trata-se, no entanto, de um sistema alternativo que pode ser adotado em laboratórios de Fisiologia Vegetal.

Como demonstrado nesse trabalho, os dados de LPr obtidos com o método de sucção foram semelhantes aos encontrados na literatura para plântulas da mesma espécie e no mesmo estágio de desenvolvimento, reforçando a eficiência da técnica que foi capaz de estimar a LPr de modo confiável. O diferencial do método de sucção está no fato de aplicar tensões, ao invés de pressões positivas.

Alguns entraves, como a obtenção de mesocótilos com diâmetro adequado para encaixe no sistema, devem ser superados para que o método seja validado em futuros trabalhos com outras espécies vegetais. Esses trabalhos podem investigar o comportamento da LPr em cultivares de milho com tolerâncias diferenciais ao estresse hídrico ou salino, além de determinar a LPr de outras espécies vegetais, utilizando abordagens com outros tipos de estresses abióticos.

5 CONCLUSÃO

O sistema hidráulico de sucção se mostrou eficaz na estimativa da condutância hidráulica radicular das plântulas de milho e em função de sua praticidade, fácil manuseio, além da semelhança com o sistema natural pela aplicação de tensões no xilema, pode ser adotado em qualquer laboratório de Fisiologia Vegetal. Além disso, ele permite acoplamento de quatro plântulas, permitindo medidas simultâneas de LPr. As condutâncias hidráulicas radiculares das plântulas de milho foram bastante variáveis ao longo do experimento, alterando-se a cada dia. A variação de LPr encontrada pelo novo método se deve exclusivamente à oscilação natural de condutância hidráulica que ocorre em função de vários fatores, como estágio de desenvolvimento e condições ambientais.

Houve rápida redução da LPr, em torno de 53%, quando as plântulas foram expostas ao tratamento com o peróxido de hidrogênio a 2mM. Essa redução provavelmente ocorreu em função de alterações na atividade e/ou abundância das aquaporinas radiculares. Além disso, foi encontrada correlação significativa entre LPr e pH, de modo que o aumento do pH provocou redução da condutância hidráulica.

REFERÊNCIAS

- AGUDO, E.G. "**Demanda Bioquímica de Oxigênio**". Curso Fundamentos Químicos do Saneamento. São Paulo: Universidade Mackenzie, 1992, p 45.
- AGRE, P.; BONHIVERS, M.; BORGNIA, M.J. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 273, p. 14659-14662, 1998.
- AROCA, R.; AMODEO, G.; FERNÁNDEZ-ILLESCAS, S.; HERMAN, E. M.; CHAUMONT, F.; CHRISPEELS, M. J. The Role of Aquaporins and Membrane Damage in Chilling and Hydrogen Peroxide Induced Changes in the Hydraulic Conductance of Maize Roots. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.137, p. 341-353, 2005.
- BIENERT, G.P.; SCHJOERRING, J K.; JAHN, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1758, p. 994-1003, 2006.
- BOURSIAC, Y.; CHEN, S.; LUU, D.T.; SORIEUL, M.; VAN DEN DRIES, N.; MAUREL, C. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots- molecular and cellular features of aquaporin expression. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 790-805, 2005.
- BOURSIAC, Y.; PRAK, S.; BOUDET, J.; POSTAIRE, O.; LUU, D.T.; TOURNAIRE-ROUX, C.; SANTONI, V.; MAUREL, C. The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependant internalization of aquaporins. **Plant Signaling and Behavior**, Seattle, v. 3, p. 1096-1098, 2008.
- BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science**, New York, v. 218, p. 443-448, 1982.
- CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS M.J.; JUNG, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, p. 1206-1215, 2001.
- CLARKSON, D.T.; CARVAJAL, M.; HENZLER, T.; WATERHOUSE, R.N.; SMYTH, A.J.; COOKE, D.T. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 51, n. 342, p. 61-70, 2000.
- DAINTY, J. Water relations of plant cells. **Advances in Botanical Research**, Utrecht, v. 1, p. 279-326, 1963.
- DANIELSON, J.Å.H.; JOHANSON, U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 45, 2008.

DANIELS, M.J.; MIRKOV, T.E.; CHRISPPEELS, M.J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 106, p. 1325-1333, 1994.

DYXON, H.H.; JOLY, J. On the ascent of sap. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, Series B 186, 563-576, 1894.

EHLERT, C.; MAUREL, C.; TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Aquaporin mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 150, p. 1093-1104, 2009.

FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. Cultivo hidropônico de plantas. Campinas, 1999, 52p.(Boletim técnico IAC, 180).

GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.34, n.4, p. 481-491, 2011.

HACHEZ, C.; MOSHELION, M.; ZELAZNY, E.; CAVEZ, D.; CHAUMONT, F. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 305-323, 2006.

HENZLER, T.; WATERHOUSE, R.N.; SMYTH, A.J.; CARVAJAL, M.; COOKE, D. T.; SCHAFFNER, A. R.; STEUDLE, E.; CLARKSON, D. T. Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. **Planta**, Berlin, v. 210, p. 50-60, 1999.

HUSSAIN, S.S.; IQBAL, M.T.; ARIF, M.A.; AMJAD, M. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 55, p. 401-413, 2011.

IONENKO, I.F.; ANISIMOV, A.V.; DAUTOVA, N.R. Effect of temperature on water transport through aquaporins. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, p. 488-494, 2010.

JACKSON, R.B.; SPERRY, J.S.; DAWSON, T. E. Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. **Trends in Plant Sciences**. Barking, v. 5, p. 482-488, 2000.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 301-313, 2002.

JAVOT, H.; LAUVERGEAT, V.; SANTONI, V.; MARTIN-LAURENT, F.; GÜCLÜ, J.; VINH, J.; HEYES, J.; FRANCK, K.; SCHÄFFNER, A. R.; BOUCHEZ, D.; MAUREL, C. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. **The Plant Cell**, Rockville, v.15, p. 509-522, 2003.

JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, I.; GUSTAVSSON, S.; SJÖVALL, S.; FRAYSSE, F.; WEIG, A.R.; KJELLBOM, P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v.126, p. 1358-1369, 2001.

JOHANSSON, I.; KARLSSON, M.; SHUKLA, V.K.; CHRISPEELS, M.J.; LARSSON, C.; KJELLBOM, P. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 451-459, 1998.

KALDENHOFF, R.; FISCHER, M. Aquaporins in plants. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 187, p. 169-176, 2006.

KARMOKER, J. L.; CLARKSON, D. T.; SAKER, L. R.; ROONEY, J. M.; PURVES, J. V. Sulphate deprivation depresses transport of nitrogen to the xylem and hydraulic conductivity of barley roots. **Planta**, Berlin, v. 185, n. 2, p. 269-278, 1991.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 495p.

KRUSE, E.; UEHLEIN, N.; KALDENHOFF, R. The aquaporins. **Genome Biology**, London, v. 7, p. 206, 2006.

LI, Q.M.; LIU, B.B. Comparasion of three methods of determination of root hydraulic conductivity of maize (*Zea mays* L.) root system. **Agricultural Sciences in China**. Beijing, v. 9, p. 1438-1447, 2010.

LOPEZ, F.; BOUSSER, A.; SISOËFF, I.; GASPAR, M.; LACHAISE B.; HOARAU, J.; MAHÉ, A. Diurnal Regulation of Water Transport and Aquaporin Gene Expression in Maize Roots: Contribution of PIP2 Proteins. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, n.12, p. 1384-1395, 2003.

LÓPEZ-PÉREZ, L.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; OLMOS E.; CARVAJAL, M. The Phi thickening in roots of broccoli plants: An acclimation mechanism to salinity?. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.168, p. 1141-1149, 2007.

LOVISOLO, C.; TRAMONTINI, S.; FLEXAS, J.; SCHUBERT, A. Mercurial inhibition of root hydraulic conductance in *Vitis* spp. rootstocks under water stress **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 63, p. 178-182, 2008.

MAGNI, F.; SARTO, C.; TICOZZI, D.; SOLDI, M.; BOSSO, N.; MOCARELLI, P.; KIENTLE, M.G. Proteomic knowledge of human aquaporins. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 5637-5649, 2006.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M.C.; APARICIO, F.; PALLAS, V.; MARTÍNEZ, V.; CARVAJAL, M. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v.160, p. 689-697, 2003.

MARTRE, P.; NORTH, G.B.; NOBEL, P.S. Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 126, p. 352-362, 2001.

MAUREL, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 399-429, 1997.

MAUREL, C.; CHRISPPEELS, M.J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. **Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, p. 135-138, 2001.

MAUREL, C.; KADO, R.T.; GUERN J.; CHRISPPEELS, M.J. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin a-TIP. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, p. 3028-3035, 1995.

MELO, F.L.P. de; AGUIAR NETO, A.V.de; SIMABUKURO, E.A.; TABARELLI, M. Recrutamento e estabelecimento de plântulas. **Germinação do básico ao aplicado**. Artmed, Porto Alegre, 2004.

MU, Z.X.; ZHANG, S.Q.; ZHANG, L.S.; LIANG, A.H.; LIANG, Z.S. Hydraulic conductivity of whole root system is better than hydraulic conductivity of single root in correlation with the leaf water status of maize. **Botanical Studies**, Taipei, v. 47, p. 145-151, 2006.

OTEGUI, M.E.; ANDRADE, F.H.; SUERO, E.E. Growth, water use, and kernel abortion of maize subjected to drought at silking. **Field Crops Research**, Netherlands, v. 40, p. 87-94, 1995.

POSTAIRE, O.; TOURNAIRE-ROUX, C.; GRONDIN, A.; BOURSIAC, Y.; MORILLON, R.; SCHÄFFNER, A. R.; MAUREL, C. A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. **The Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 152, p. 1418-1430, 2010.

POSTO METEOROLÓGICO DE PIRACICABA, SP - BASE DE DADOS DA ESTAÇÃO CONVENCIONAL, ÁREA DE FÍSICA E METEOROLOGIA - LEB - ESALQ - USP. Copyright © 2003-2013, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T. UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, p. 1568-1577, 2005.

SCHÄFFNER, A.R. Water channel function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? **Planta**, Berlin, v. 204, p. 131-139, 1998.

STEUDLE, E. The regulation of plant water at the cell, tissue, and organ level: role of active processes and of compartmentation. In *Flux Control in Biological Systems: From Enzymes to Populations and Ecosystems*. **ED Schultze**, San Diego, p. 237-299, 1994.

STEUDLE, E.; HENZLER, T. Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 46, p.1067-1076, 1995.

STEUDLE, E.; FRENSCH, J. Water transport in plants: role of the apoplast. **Plant and Soil**, Springer Netherlands, v.187, p. 67-79, 1996.

STEUDLE, E.; PETERSON, A. How does water get through roots? **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 49, p. 775 -788, 1998.

STEUDLE, E. Water uptake by roots: Effects of water deficit. **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 51, p.1531-1542, 2000.

STEUDLE, E. The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 847-863, 2001.

STEUDLE, E.; OREN, R.; SCHULZE, E.D. Water transport in maize roots. Measurement of hydraulic conductivity, solute permeability and of reflection coefficients of excised roots using the root pressure probe. **The Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v.84, p. 1220-1232, 1987.

SUI, H.; HAN, B., LEE, J., WALIAN, P.; JAP, B. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. **Nature**, London, v. 414, p. 872-878, 2001.

TESTER, M.; LEIGH, R.A. Partitioning of nutrient transport processes in roots. **Journal of Experimental Biology**, New York, v. 52, p. 445-457, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5 th ed. Sunderland: Sinauer, 2010. 820p.

TSUDA, M.; TYREE, M.T. Plant hydraulic conductance measured by the high pressure flow meter in crops. **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 51, n.345, p. 823-828, 2000.

TYERMAN, S.D.; NIEMIETZ, C.M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **The Journal of Plant Physiology**, Minneapolis, v. 25, p. 173-194, 2002.

TYERMAN, S.D.; BOHNERT, H.J.; MAUREL, C.; STEUDLE, E.; SMITH, J.A.C. Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 50, p. 1055-1071, 1999.

UEHLEIN, N.; KALDENHOFF, R. Aquaporins and biological rhythm. **Biological Rhythm Research**, Abingdon, v. 37, p. 315-322, 2006.

WELLS, C.E.; EISSENSTAT, D.M. Defining the fine root: marked differences in survivorship among apple roots of different diameter. **Ecology**, Washington, v. 82, n. 3, p.882-892, 2001.

WUDICK, M.M.; LUU, D.T.; MAUREL, C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. **New Phytologist**, London, v. 184, p. 289-302, 2009.

YE, Q.; STEUDLE, E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in corn roots. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 459-470, 2006.

ZIMMERMANN, H.M.; STEUDLE, E. Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. **Planta**, Berlin, v. 206, p. 7-19, 1998.