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

**Aliviação do estresse por baixo pH na raiz do cultivar Micro-Tom de
tomateiro via exposição gradual ou tratamento hipo-osmótico
prévio: possível papel de modificações na parede celular**

Jonathas Pereira das Graças

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

Jonathas Pereira das Graças
Bacharel em Biologia

**Aliviação do estresse por baixo pH na raiz do cultivar Micro-Tom de tomateiro
via exposição gradual ou tratamento hipo-osmótico prévio: possível papel de
modificações na parede celular**

Orientador:
Prof. Dr. **VICTOR ALEXANDRE VITORELLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2013

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

Graças, Jonathas Pereira das

Aliviação do estresse por baixo pH na raiz do cultivar Micro-Tom de tomateiro via exposição gradual ou tratamento hipo-osmótico prévio: possível papel de modificações na parede celular / Jonathas Pereira das Graças.- - Piracicaba, 2013.
95 p: il.

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

1. Acidez 2. Crescimento radicular 3. Explosão oxidativa 4. Guaiacol peroxidase
5. Priming 6. Sistema radicular 7. SHAM 8. Tomate 9. Viabilidade celular I. Título

CDD 635.642
G279a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Antônio e Marta
e a minha irmã Pollyana,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me mantido seguro nos momentos difíceis;

Ao Dr. Victor A. Vitorello pela orientação e contribuições para melhoria da minha formação;

A Dra Lucia Mattiello pela co-orientação e auxílio na realização dos experimentos;

Ao Lucas Diego Figueiredo pelo companheirismo e auxílio nas diversas situações no laboratório;

Ao Rodrigo Ruiz Romero por sempre estar disposto a ajudar e ensinar durante a realização dos experimentos;

A Natalia da Silva Martins pela ajuda nas análises estatísticas;

A Lucélia Borgo pelo auxílio no início de meu aprendizado no laboratório;

Ao Enéas Ricardo Konsen e Gustavo H. Recchia pelos conselhos e momentos de descontração;

As amigas Jamille Santos e Naiara Célida pela alegria na rotina de trabalho e por sempre acreditarem no melhor em todas as situações;

A todos da DVATCOM, em especial a Áurea O. C. Toledo e Solange C. C Souza.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Baixo pH e toxicidade no sistema radicular	17
2.2 Alumínio e toxicidade no sistema radicular	19
2.3 Modificações na parede celular de raízes em crescimento: uma possível relação com o estresse por baixo pH, alumínio e atividade de peroxidases do tipo III	21
2.3.1 A parede celular e o crescimento radicular: alvos para H^+ e Al^{3+}	21
2.3.2 Tratamento hipo-osmótico e possíveis modificações na parede celular: uma maneira de aliviar o estresse por H^+ e Al^{3+} ?	23
2.4 Cultivar Micro-Tom de tomateiro.....	25
3 HIPÓTESES	27
4 OBJETIVOS	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Material vegetal e condução das plantas	31
5.2 Germinação de sementes	31
5.3 Condições de desenvolvimento das plantas	31
5.4 Condições de exposição das raízes e curva de resposta ao pH	34
5.5 Curva de resposta ao alumínio	35
5.6 Exposição direta e gradual ao baixo pH	35
5.7 Aplicação de tratamento hipo-osmótico nas raízes	37
5.8 Avaliação do crescimento radicular	38
5.8.1 Avaliação do recrescimento radicular	38
5.9 Avaliação qualitativa e quantitativa da viabilidade celular	38
5.10 Avaliação da atividade total de guaiacol peroxidase no apoplasto	39
5.11 Análise estatística	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Caracterização do crescimento radicular frente ao baixo pH	41
6.2 Respostas do ápice radicular frente à exposição direta ou gradual ao baixo pH.....	41

6.2.1 Crescimento e viabilidade celular da raiz	42
6.2.2 Recrescimento radicular	48
6.2.3 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX)	49
6.3 Respostas do ápice radicular frente ao tratamento hipo-osmótico prévio e baixo pH	51
6.3.1 Crescimento e viabilidade celular da raiz	51
6.3.2 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX)	55
6.3.3 Inibição da atividade de guaiacol peroxidase (GPX) via aplicação de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) no <i>priming</i> de 1 h	58
6.4 Respostas do ápice radicular ao alumínio tóxico (Al^{3+})	62
6.4.1 Caracterização do crescimento e viabilidade da raiz	62
6.4.2 Crescimento e viabilidade celular da raiz frente ao alumínio após tratamento hipo-osmótico	63
7 DISCUSSÃO	67
7.1 A exposição gradual ao baixo pH induz respostas da raiz que amenizam os efeitos do estresse sobre a viabilidade das células radiculares.....	68
7.2 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) e sua possível relação com modificações na parede celular na exposição direta e gradual ao baixo pH	71
7.3 O tratamento hipo-osmótico induz efeitos que melhoram o crescimento e viabilidade celular da raiz sob baixo pH	74
7.4 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) e sua possível relação com crescimento e viabilidade celular em baixo pH após o tratamento hipo-osmótico	75
7.5 Tratamento hipo-osmótico e exposição das raízes ao alumínio: um comportamento diferente da toxicidade revertida em pH 4,0	78
8 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	89
APÊNDICES	91

RESUMO

Aliviação do estresse por baixo pH na raiz do cultivar Micro-Tom de tomateiro via exposição gradual ou tratamento hipo-osmótico prévio: possível papel de modificações na parede celular

Os solos ácidos ($\text{pH} < 5,0$) representam cerca de 40 % das áreas agricultáveis no mundo. Nestes solos ocorre a solubilização de formas tóxicas de alumínio que inibe o crescimento radicular. Independente da presença do Al, o baixo pH pode ser tóxico à raiz, afetando a viabilidade celular no ápice e o crescimento radicular. Há evidências de que o estresse por H^+ e/ou Al^{3+} afetam a parede celular. Por outro lado, modificações na parede podem determinar o grau de tolerância da planta quando submetidos a estes estresses. Assim, utilizou-se de duas abordagens para investigar se possíveis modificações na parede celular melhorariam o crescimento e viabilidade celular na exposição a H^+ e Al^{3+} . Na primeira, raízes de plantas do cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), com 2 e 13 dias de desenvolvimento, foram expostas de forma direta ou gradual ao baixo pH. Na segunda abordagem, as raízes foram submetidos a um tratamento hipo-osmótico antes de serem expostas a pH 4,0 ou 4,5 + Al. Em plantas com 2 e 13 dias, a exposição gradual foi realizada alterando o pH ao longo de 12 e 24 h, respectivamente. No tratamento hipo-osmótico (*priming*), as plantas foram transferidas de uma solução de alta osmolaridade (150 mM) para uma com baixa osmolaridade (0,5 mM), a pH 5,8, por 0; 0,5; 1 e 2 h antes de serem expostas a pH 4,0 ou 4,5 + Al por 12h. Como controles, raízes não receberam tratamento osmótico ou foram mantidas continuamente em alta osmolaridade. O crescimento de raízes expostas diretamente a pH 4,5 foi cerca de metade do controle a pH 5,8 e a pH 4,0 foi nulo. Ao contrário do esperado, na exposição gradual a pH 4,5, as raízes cresceram menos do que aquelas expostas diretamente a este pH e a pH 4,0 o crescimento continuou insignificante. No entanto, raízes expostas gradualmente ao pH 4,0 mantiveram a viabilidade das células do ápice, ao contrário daquelas expostas diretamente. Assim, a redução do crescimento radicular pela exposição a baixo pH pode ser uma resposta gerada pela própria planta, não sendo necessariamente decorrente da ação direta do pH. O *priming* hipo-osmótico antes da exposição a pH 4,0 permitiu a manutenção da viabilidade celular e um crescimento radicular de até 38% das raízes controle a pH 5,8, enquanto que nos controles a pH 4,0 as células morreram e o crescimento foi praticamente nulo. Em pH 4,5 + 5 μM de Al o *priming* não reverteu a inibição do crescimento radicular, indicando que as respostas para H^+ e Al^{3+} são diferentes. Ficou evidente que a atividade de GPX está envolvida nas respostas encontradas tanto na exposição gradual a baixo pH como no tratamento hipo-osmótico anterior ao baixo pH, mas não foi possível determinar se é consequência ou uma das possíveis causas destas respostas. No seu conjunto, os dados indicam que possíveis mudanças na parede celular podem estar envolvidas na melhoria do crescimento radicular e viabilidade celular do ápice durante o estresse.

Palavras-chave: Acidez; Guaiacol peroxidase; Priming; Viabilidade celular; Crescimento radicular; Explosão oxidativa; SHAM

ABSTRACT

Alleviation of low pH stress in roots of Micro-Tom cultivar of tomato by gradual exposure or hypo-osmotic pre-treatment: possible role of modifications in the cell wall

Acidic soils (pH <5.0) represent about 40% of the arable land in the world. In these soils, toxic aluminum becomes soluble and inhibits root growth. Regardless of Al, low pH is, in itself, also toxic, decreasing cell viability and root growth. There is evidence that H⁺ and Al³⁺ can affect the cell wall. Reversely, modifications in the wall may determine the degree of tolerance of roots subjected to these stresses. Therefore, we used two approaches to investigate whether possible changes in the cell wall improve growth and cell viability upon exposure to H⁺ and Al³⁺. In the first approach, roots of plants of the Micro-Tom (MT) cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), at 2 and 13 days of development, were exposed directly or gradually to low pH. In the second approach, the roots were subjected to hypo-osmotic treatment prior to being exposed to pH 4.0 or 4.5 + Al. In 2- and 13-day plants, gradual exposure was achieved by changing the pH over a 12 and 24 h period, respectively. In the hypo-osmotic pre-treatment (priming), plants were transferred from a high osmolarity solution (150 mM) to another with low osmolarity (0.5 mM), at pH 5.8, for 0, 0.5, 1 and 2 h before being exposed to pH 4.0 or 4.5 + Al for 12h. As controls, roots did not receive any osmotic treatment or were maintained continuously at high osmolarity. Growth of roots exposed directly to pH 4.5 was about half that of control roots at pH 5.8 and at pH 4.0 root growth was suppressed. Different from expected, roots exposed gradually to pH 4.5 grew less than those exposed directly to pH 4.5 and at pH 4.0, root growth remained negligible. However, cell viability was maintained in roots exposed gradually to pH 4.0, unlike those exposed directly. Thus, decreased root growth upon exposure to low pH may be a response generated by the plant itself rather than the direct effect of pH. In roots subjected to hypo-osmotic priming prior to exposure to pH 4.0, cell viability was maintained and root growth was up to 38% of that of control roots at pH 5.8, whereas in control roots at pH 4.0, cell death occurred and root growth was insignificant. At pH 4.5 + 5 μ M Al, priming did not reverse the inhibition of root growth, suggesting that responses to H⁺ and Al³⁺ are different. GPX was involved in responses to both gradual exposure to low pH and to hypo-osmotic treatment prior to low pH, but it was not possible to determine whether this was a consequence or one of the possible causes of these responses. Taken together, the data indicate that possible changes in the cell wall may be involved in improving root growth and cell viability of the root apex during stress.

Keywords: Acidity; Guaiacol peroxidase; Priming; Cell viability; Root growth; Oxidative burst; SHAM

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA	Diacetato de fluoresceína (Fluorescein diacetate)
GPX	Guaiacol peroxidase
pCMB	p-cloromercuriobenzoato
PI	Iodeto de Propideo (Propidium iodide)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)
SHAM	Ácido salicilhidroxâmico (Salicylhydroxamic acid)

1 INTRODUÇÃO

Os solos ácidos representam cerca de 40 % das áreas agricultáveis no mundo (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). A acidez no solo ($\text{pH} < 5,0$) ocorre naturalmente em áreas tropicais e subtropicais, dentre as quais se situa o Brasil onde cerca de 500 milhões de hectares são cobertos por este tipo de solo (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005).

Em solos ácidos o desenvolvimento do sistema radicular de culturas pode ser comprometido. Normalmente, neste tipo de solo há a solubilização de formas tóxicas de alumínio (Al^{3+}) e, por vezes, outros metais associados a uma baixa concentração de nutrientes, uma situação desfavorável para o crescimento das plantas (ARNON; JOHNSON, 1942; SCHUBERT; SCHUBERT; MENGEL, 1990; KOCHIAN, 1995; HORST; WANG; ETICHA, 2010). Independente da associação com outros fatores do solo, o baixo pH individualmente pode ser tóxico pois inibe o crescimento radicular (YAN; SCHUBERT; MENGEL, 1992). Devido a isto é importante separar os efeitos e respostas em função de H^+ daqueles causados por outros agentes, especialmente o Al (LAZOF; HOLLAND, 1999; BOSE et al., 2010).

Embora em menor número comparado a trabalhos envolvendo o Al, alguns estudos já demonstraram efeitos deletérios em decorrência somente do baixo pH em raízes. Desde algum tempo a inibição do crescimento radicular pela acidez já foi constatada em diferentes culturas, evidenciando que este efeito é comum em plantas, não sendo específico para determinadas espécies (ARNON; JOHNSON, 1942). Das respostas que podem ser observadas em um curto prazo de exposição ao baixo pH, um aumento na extrusão de prótons pela membrana, o comprometimento na absorção de íons e a modificação da atividade de H^+ -ATPase já foram demonstrados, o que traz indícios da interação entre toxicidade por H^+ e a membrana plasmática (FAWZY; OVERSTREET; JACOBSON, 1954; PAVLOVKIN et al., 2009; ZHU et al., 2009). Dentre as consequências irreversíveis da toxicidade por H^+ destaca-se a morte de células no ápice radicular, local de sensibilidade ao baixo pH (KOYAMA; TODA; HARA, 2001).

Assim como na exposição ao baixo pH, a toxicidade por Al se manifesta no ápice radicular e a maior sensibilidade ocorre onde as células estão em processo de expansão, na parte distal da zona de transição (SIVAGURU; HORST, 1998). Em células em crescimento e expansão as modificações na parede celular ocorrem

continuamente (KEEGSTRA, 2010). Estas modificações são em função da deposição de material novo (BOYER, 2009) e alterações nas propriedades físicas da parede, processos estes que são realizados por enzimas (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004).

Algumas revisões de literatura têm chamado atenção para as possíveis interações de baixo pH e Al com a parede celular (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005; HORST; WANG; ETICHA, 2010). A produção de ROS na explosão oxidativa durante o estresse por Al possivelmente é direcionada para modificações na parede (YAMAMOTO et al., 2003). As modificações por sua vez podem constituir uma resposta da planta na tentativa de adquirir uma tolerância ao estresse. Em concordância com isto, há indícios de que a redução do crescimento durante o estresse a baixo pH e Al possa estar associada a um enrijecimento de parede celular (JONES et al., 2006; YANG et al., 2008), entretanto, não está claro se isto ocorre em função de uma resposta da planta ou ação direta do agente de estresse.

Peroxidases da classe III (anteriormente denominadas por diversos termos, como guaiacol peroxidase) são enzimas que participam da formação e modificação da parede celular e na presença de alguns substratos como H_2O_2 podem afrouxá-la ou enrijecê-la, sendo o último comum em situações de estresse (PASSARDI et al., 2005). Em tratamento hipo-osmótico, uma ferramenta para forçar mecanicamente a parede celular há evidências do aumento da produção de ROS e atividade de peroxidases (YAHRAUS et al., 1995; CAZALÉ et al., 1998) assim como no estresse por Al (SIMONOVICOVÁ et al., 2004).

Através das informações descritas anteriormente, evidencia-se que estudos sobre a toxicidade do baixo pH e alumínio nas plantas são importantes, pois estes podem constituir fatores limitantes para o desenvolvimento. Por ser potencialmente danoso, o comportamento de plantas sob baixo pH deve ser analisado separadamente do que tradicionalmente vêm sendo feito nos tratamentos que combinam baixo pH com Al. Sendo assim neste trabalho será investigado alguns efeitos e respostas das raízes de Micro-Tom frente ao baixo pH e alumínio tendo como foco relacionar uma possível modificação de parede celular com crescimento, viabilidade celular e atividade de peroxidases da classe III durante o estresse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Baixo pH e toxicidade no sistema radicular

Um dos efeitos comuns da toxicidade por baixo pH nas culturas, constiuí-se na observação de que a exposição ao mesmo acarreta na redução do crescimento radicular e que a região de maior sensibilidade se dá nos locais onde as células estão em crescimento e divisão, no ápice radicular (SIVAGURU; HORST, 1998; KOYAMA; TODA; HARA, 2001). Desde os trabalhos pioneiros já é sabido que nos solos ácidos os danos em decorrência do baixo pH estão sempre associados a outros fatores como solubilidade de formas tóxicas de Al ou baixa concentração de nutrientes como cálcio e magnésio, entretanto, a atividade de prótons (H^+) individualmente pode provocar distúrbios na fisiologia celular e como consequência levar a efeitos marcantes como a redução no crescimento radicular (ARNON; JOHNSON, 1942; SCHUBERT; SCHUBERT; MENGEL, 1990; YAN; SCHUBERT; MENGEL, 1992).

Há uma série de danos no desenvolvimento vegetal causados somente pelo baixo pH, independente da presença de Al e poucos estudos realizam abordagens individuais quanto a estes agentes (SAMAC; TESFAYE 2003; BOSE et al., 2010). Além disto, na maioria dos experimentos que analisam efeitos do Al, a aplicação do baixo pH é realizada nos mesmos valores utilizados para se testar efeitos do Al, sem observar uma extensão mais ampla de pH, o que reduz as perspectivas de entender as causas da toxicidade por H^+ (LAZOF; HOLLAND, 1999). Tendo em vista estas considerações, faz-se necessário a realização de estudos que analisem separadamente a ação do Al e do baixo pH observado sob diferentes concentrações, os quais fornecerão informações sobre a resposta específica gerada para cada um desses fatores e a possível interação entre os dois. Em algumas abordagens são claras as tentativas de separar os efeitos da toxicidade por H^+ e Al com objetivo de destacar as diferenças ou similaridades das respostas durante o estresse o que torna os estudos interessantes e permite a observação do comportamento de diferentes sistemas frente a toxicidade por baixo pH.

Desde algum tempo têm se buscado através de experimentos em condições controladas, monitorar os efeitos do baixo pH sobre o sistema radicular a fim de observar apenas o comportamento frente ao mesmo ou determinar as causas da toxicidade. Os cultivares de trigo, Atlas (tolerante ao Al) e Scout (sensível ao Al)

respondem de maneira diferenciada ao Al, tendo em vista que baixas concentrações (2 μ M) reduz o crescimento de maneira pronunciada no cultivar sensível. Entretanto, quando analisado o crescimento radicular frente ao baixo pH, entre 4,5 e 4,0, há uma tendência semelhante na maioria das concentrações observadas dando indícios que mecanismos de toxicidade e a resposta a estes fatores podem ser diferenciadas (KINRAIDE, 1993).

Das respostas clássicas de toxicidade por H^+ em culturas a inibição do crescimento radicular é um evento marcante, pois, desperta atenção no que pode influenciar em longo prazo, especificamente na aquisição de água e nutrientes pela raiz (ARNON; JOHNSON, 1942). Todavia, ela se manifesta em função de eventos que podem acontecer em regiões específicas na raiz, sobretudo no ápice, antes mesmo de se detectar uma parada no crescimento.

Na célula vegetal o baixo pH induz a modificações ao interagir com estruturas como parede celular, membrana plasmática, elementos do citoplasma e do citoesqueleto (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). Neste sentido várias abordagens têm buscado relacionar as causas de toxicidade por H^+ sobretudo com as respostas que ocorrem na membrana plasmática. Quando raízes são expostas a baixo pH, mesmo em um período de 20 minutos, alterações fisiológicas podem ser mensuradas a nível celular, uma vez que o citoplasma torna-se ácido e paralelamente podem ocorrer mudanças no potencial de membrana causado pelo efluxo de K^+ (BOSE et al., 2010). Na solução do solo, compostos podem ser absorvidos com maior ou menor taxa pela planta, em função da necessidade, ou da interação entre eles. Em condições de baixo pH a absorção de potássio pode ser comprometida, além disto em pH baixo quanto 2,0 pode haver uma perda do K^+ pelo tecido que pode ser aliviada pela adição de cátions (FAWZY; OVERSTREET; JACOBSON, 1954). Em *Lotus corniculatus* a exposição de raízes a pH 4,0 causa rapidamente uma despolarização da membrana plasmática próximo ao ápice e a longo prazo o crescimento radicular é comprometido (PAVLOVKIN et al., 2009). O aumento de matéria observado em função do acúmulo de nitrogênio em arroz e suprido com NH_4^+ já foi correlacionado com um aumento da quantidade e atividade de H^+ -ATPases de membrana em planta cultivadas à pH 3,0 (ZHU et al., 2009). Por estes trabalhos citados, percebe-se que a atividade de H^+ pode influenciar o metabolismo celular de maneira variada e os alvos de resposta/interação podem ser múltiplos.

A inibição do crescimento radicular por baixo pH ainda necessita de esclarecimentos se ocorre somente pela toxicidade em função da atividade de H^+ ou como uma resposta da própria planta. Entretanto, há trabalhos evidenciando que raízes expostas gradualmente ao baixo pH podem se aclimatar, mantendo o crescimento continuamente ou que o crescimento é comprometido pela perda da viabilidade celular no ápice sob estresse. Em plantas de milho que foram expostas gradualmente ao baixo pH (adição diária de 100 μM de H^+) até atingir o valor final de 3,5, o crescimento radicular não foi comprometido durante o período observado (33 dias) e esta resposta foi associada a atividade de bombeamento de prótons via H^+ -ATPase de membrana (YAN et al., 1998). Em *Arabidopsis thaliana* já foi demonstrado que a exposição direta a baixo pH, mesmo em um curto prazo pode provocar danos ao sistema radicular, tendo em vista que plantas expostas a pH 4,5 durante 2 h apresentaram morte celular na região do ápice radicular (KOYAMA; TODA; HARA, 2001).

Por serem sésseis as plantas devem ser capazes de responder aos fatores do meio ambiente de maneira rápida, além disto, quando a planta é exposta em um primeiro momento a uma condição desvantajosa ocorre um tipo de preparação que habilita uma resposta mais eficiente em uma futura exposição (BRUCE et al., 2007). Pelos estudos citados anteriormente, há diversos efeitos relacionados ao baixo pH sobre o sistema radicular e sobretudo relacionados a interações com membrana plasmática. Entretanto, há outros alvos de interações pouco abordados na literatura, especificamente a parede celular. Se as plantas são capazes de se aclimatar a situações estressantes do meio, como poderão se manifestar os efeitos do baixo pH ou a resposta de plantas quando expostas gradualmente à este em comparação à exposição direta? A pronunciada redução do crescimento radicular durante o estresse pode ter relação com uma possível interação entre H^+ e parede celular e pode ser aliviada de alguma maneira?

2.2 Alumínio e toxicidade no sistema radicular

Dentre os metais, o alumínio é o mais abundante na crosta terrestre e possui potencial fitotóxico, afetando negativamente o crescimento vegetal (KOCHIAN, 1995). Entretanto, para que ocorra a fitotoxicidade é necessário que o alumínio esteja em sua forma solúvel, um cátion trivalente (Al^{3+}) em condições de baixo pH (<

5,0), sendo esta situação encontrada em solos ácidos (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2001; RENGEL, 2002).

De acordo com Vitorello, Capaldi e Stefanuto (2005), no Brasil cerca de 500 milhões de hectares (2/3 do território) são cobertos por solos ácidos, e uma vez que a atividade agrícola possui grande importância no cenário econômico, estudos abordando os efeitos do alumínio sobre o desenvolvimento vegetal são relevantes.

Solos que demonstram ser potencialmente fitotóxicos devido à concentração de Al apresentam-na em níveis de 10 a 100 μM (CIAMPOVORÁ, 2002). Ao penetrar nos tecidos o Al causa modificações na fisiologia celular por interagir com componentes da parede celular, membrana plasmática e citoplasma, modificá-los, influenciar processos de transporte iônico ou até mesmo induzir a produção de determinadas substâncias, como a calose, um indicador de sensibilidade ao alumínio (CIAMPOVORÁ, 2002; SAMAC, TESFAYE, 2003; JONES et al., 2006).

Por afetar as células, as respostas conseqüentemente ocorrem a um nível de tecido e dentre os efeitos observados a inibição do crescimento radicular apresenta-se como um evento marcante (LAZOF; HOLLAND 1999). Esta inibição é um efeito que pode ser observado curto prazo, pois há indícios de que o Al pode diminuir a expansão e divisão celular, aspectos primordiais para que haja um aumento em extensão de tecidos (KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005). Em uma abordagem contrastante, foram colhidas evidências de que a toxidez por alumínio pode induzir a divisões celulares no meristema, a tal ponto que este perda sua identidade e a população de células meristemáticas sejam extintas, o que interrompe o crescimento radicular (NEZAMES et al., 2012).

Além de sua ligação na membrana plasmática, elementos do citoplasma e núcleo (SAMAC; TESFAYE, 2003) é provável que um dos sítios primários de ligação do Al^{3+} seja na parede celular, na matriz de pectina devido a carga negativa de seus grupos carboxílicos (YANG et al., 2008; HORST; WANG; ETICHA, 2010). Embora o crescimento normal seja interrompido em decorrência da exposição ao Al, há uma atividade metabólica no sentido de gerar respostas ao estresse, principalmente a explosão oxidativa, que induz a produção de ROS (PAN; ZHU; CHEN, 2001). As ROS podem atuar no apoplasto, formando ligações entre compostos e enrijecendo a parede celular (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004).

Alguns efeitos observados em função do alumínio na raiz ainda são matéria de debate. O enrijecimento de parede celular como resposta da planta ou somente

causado pela ligação do alumínio a parede ainda não está claro na literatura. Em milho foi observada uma deposição de calose, produção de ROS e enrijecimento da raiz, associados a ligação do alumínio na parece em uma provável substituição de Ca^{2+} na matriz de pectina, o que contribui para a redução do crescimento radicular (JONES et al., 2006). Raízes de plântulas de soja podem produzir um espessamento de camadas de células da coifa com uma mucilagem, na qual o Al se liga, o que reduz a sua entrada nas células (CAI et al., 2011). Neste ultimo caso, o espessamento de tecidos pode ser uma forma de proteção e resposta das raízes.

2.3 Modificações na parede celular de raízes em crescimento: uma possível relação com o estresse por baixo pH, alumínio e atividade de peroxidases do tipo III

2.3.1 A parede celular e o crescimento radicular: alvos para H^+ e Al^{3+}

Os recursos de água e nutrientes no solo não são inesgotáveis e podem se tornar fatores limitantes ao desenvolvimento da planta (SCHULZE; BECK; MÜLLER-HOHESNSTEIN, 2002). Para a aquisição, a planta precisa se mover continuamente na direção destes, o que é alcançado através do crescimento radicular. O desenvolvimento da raiz é coordenado por uma série de eventos incluindo a expressão de genes, divisão e diferenciação celular mediados por hormônios (BALUSKA et al., 2010).

Na raiz, há diferentes tecidos que são originados inicialmente pela protoderme, procâmbio e meristema fundamental presentes na radícula (APPEZZATO-DA-GLORIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2009). Na medida em que o órgão cresce a diferenciação de epiderme, parênquima e tecidos condutores ocorrem continuamente graças à população de células meristemáticas que se localizam próximo ao ápice radicular (DOLAN; DAVIES, 2004). Em termos de anatomia e função a região denominada ápice radicular pode ser dividida em zonas distintas: coifa, zona meristemática, zona de transição e zona de alongamento (VERBELEN et al., 2006; BALUSKA et al., 2010). Curiosamente, o processo de toxicidade por baixo pH e alumínio se manifesta na região do ápice radicular, sendo mais proeminente na região meristemática e de transição, onde as células estão em processo de divisão e expansão (SIVAGURU; HORST, 1998).

Recentemente há trabalhos que abordam possíveis mecanismos de interações e respostas durante o estresse com alumínio (em baixo pH) no ápice radicular, porém, com informações inovadoras para transportadores de membrana e interações do núcleo da célula durante o estresse (NEZAMES et al., 2012). De acordo com Vitorello, Capaldi e Stefanuto (2005), a toxicidade por baixo pH e Al pode estar associada a interações com a parede celular, todavia, tal abordagem ainda é incipiente na literatura.

Nos processos de crescimento, inicialmente há a divisão celular associada com a expansão, o que promove um aumento no volume dos órgãos (TAIZ; ZEIGER 2009). Para que ocorra a expansão celular, ocorrem vários eventos, mas principalmente é necessário que a parede celular seja afrouxada o que faz com que haja um acréscimo no volume, ou alongação (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004). O afrouxamento da parede ocorre, pois, em geral a mesma deve se comportar como uma estrutura compacta, o que confere proteção a planta e rigidez o suficiente para suportar a pressão de turgor (BOISSON-DERNIER; KESSIER; GROSSNIKLAUS, 2011). Para que ocorra o afrouxamento da parede celular, há o envolvimento simultâneo de moléculas como ROS e enzimas no apoplasto como expansinas, extensinas e peroxidases, que atuarão na modificação bioquímica dos compostos da parede celular (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; GAPPER; DOLAN, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Ao contrário do afrouxamento, em algumas situações a célula necessita enrijecer sua parede. Um dos momentos deste evento se dá quando a célula se diferencia, e visto que não haverá mais expansão tem início o processo de enrijecimento (GAPPER; DOLAN, 2006). Experimentos *in vitro* com coleóptilos de milho já evidenciaram uma possível interação de ROS (H_2O_2) e peroxidases no enrijecimento da parede celular, onde se postula que o H_2O_2 atue na formação de ligações cruzadas dos compostos fenólicos da parede resultando em um enrijecimento da estrutura (SCHOPFER, 1996). O enrijecimento da parede pode atrasar o crescimento, entretanto, ele pode ser necessário em situações de estresse (PASSARDI et al., 2005).

2.3.2 Tratamento hipo-osmótico e possíveis modificações na parede celular: uma maneira de aliviar o estresse por H^+ e Al^{3+} ?

Durante o processo de infecção por patógenos há uma resposta controlada pela planta conhecida como explosão oxidativa (“oxidative burst”), com indução por ácido salicílico onde há a participação de ROS e enzimas como peroxidases e catalases que fazem parte de um processo de sinalização e defesa (DEMPSEY; KLESSIG, 1994). Em estresse por baixo pH, já foi constatado uma mudança na expressão de genes envolvidos com remodelagem da parede celular, sendo alguns de resposta a patógenos (LAGER et al., 2010). Para simular situações de estresse à membrana/parede trabalhos empregando o tratamento hipo-osmótico em cultura de células demonstraram uma explosão oxidativa como resposta, similarmente ao que ocorre no processo de ataque por patógenos (YAHRAUS et al., 1995). O tratamento hipo-osmótico consiste-se em expor as células/tecidos há uma mudança de osmolaridade na solução, sempre de uma maior para uma menor, ou de um menor para um maior potencial hídrico. Borgo (2010) demonstrou que células de tabaco que passaram pelo tratamento hipo-osmótico foram capazes de manter a viabilidade durante a exposição ao baixo pH, o que traz indícios de que possíveis modificações na parede celular melhoram a resposta ao estresse por H^+ .

Das moléculas e enzimas que podem estar envolvidas no processo de enrijecimento/afrouxamento da parede destacam-se as ROS ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2) e peroxidases do tipo III que são secretadas para o apoplasto (SCHOPFER, 1996; PASSARDI et al., 2005). A atividade de peroxidases acoplada a produção de ROS no apoplasto é importante para o desenvolvimento da raiz, tendo em vista que a aplicação de inibidores de peroxidase anula o efeito da enzima na manutenção do crescimento (DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007). Em situações onde células são submetidas ao tratamento hipo-osmótico, um modelo para estudos do *oxidative burst*, as mesmas são transferidas de soluções com alta osmolaridade (± 180 mOsm) para meios com baixa osmolaridade (± 10 mOsm) e observa-se um aumento na produção de ROS assim como na atividade de peroxidases (CAZALÉ et al., 1998; ROUET et al., 2006). A mudança de osmolaridade pode ser uma forma de pressionar a parede celular através da pressão de turgor, uma vez que a células são transferidas de menor para um maior potencial hídrico. Ao ser forçada as células devem ser capazes de responder no sentido de enrijecerem rapidamente a parede

celular e uma via para isto pode ser através de *oxidative burst* e aumento na atividade de peroxidases.

Embora situações possam forçar o enrijecimento da estrutura e a parede funcione como um sistema sólido, em regiões de crescimento isto pode se comportar de maneira diferente. Na formação de parede, basicamente há a deposição de celulose e a secreção de proteínas, ambos, para fora da membrana plasmática, o que expõe ao exterior as partes que foram depositadas no primeiro processo de construção (ROSE; LEE, 2010; KEEGSTRA, 2010). Isto implica que a parede pode apresentar descontinuidade em algumas regiões, em outras palavras, menor compactação, o que pode se tornar um local para possível ajuste/enrijecimento se uma pressão for aplicada. Na região de divisão/diferenciação celular e crescimento da raiz é provável que tais situações mencionadas ocorram, portanto, na interação de H^+ e Al^{3+} com parede celular de raízes há sentido em pensar que tais locais sejam possíveis alvos destes? Se uma pressão for aplicada, objetivando enrijecer a estrutura será possível reverter/aliviar os efeitos da toxicidade por baixo pH e alumínio?

Pelos trabalhos citados até aqui percebe-se que o enrijecimento da parede celular pode ser uma resposta em função de estresses e ROS juntamente com peroxidases podem estar envolvidos ou serem os principais agentes destes eventos. O tratamento hipo-osmótico pode rapidamente aumentar a atividade de peroxidases e ROS que por sua vez podem participar da modelagem de parede. Somada a estes fatos, um dos alvos da toxicidade por baixo pH e alumínio é a parede celular (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005) que ao ser modificada em função do tratamento hipo-osmótico pode apresentar respostas diferenciadas ao estresse. Em decorrência do que foi postulado, se raízes forem expostas ao tratamento hipo-osmótico em um primeiro momento resultando em um possível enrijecimento da estrutura, ou pelo menos um aumento na pressão sobre a mesma, haverá uma modificação na resposta frente ao estresse por baixo pH e alumínio? Caso haja uma resposta diferenciada, tendo como base o crescimento e viabilidade da raiz, peroxidases estariam participando deste processo?

Há alguns trabalhos que relacionam o enrijecimento da parede celular a processos como produção de ROS e calose que resultam na redução do crescimento radicular durante o estresse por Al (JONES et al., 2006;). Entretanto a interpretação da redução do crescimento é sempre relacionada ao agente causador

da toxicidade. Pelos trabalhos citados há indícios da toxicidade por Al e baixo pH, que pode ser tão nocivo quanto o Al, entretanto, há evidências de que as células geram uma resposta, que neste caso não deve ser tratada como um sintoma de toxicidade.

Em leveduras já foi demonstrado um sistema de monitoramento da integridade na parede (LEVIN, 2005). Atualmente há o interesse em modelos vegetais para se estudar o sensoriamento que ocorre na parede celular a várias situações (RINGLI, 2010). Uma resposta positiva para as interrogações anteriores poderá trazer evidências do envolvimento de respostas de parede ainda pouco esclarecidas durante o estresse por baixo pH e alumínio, e mais do que isto, poderá servir como uma ferramenta para estudar interações de baixo pH e alumínio com a parede celular.

2.4 Cultivar Micro-Tom de tomateiro

A utilização de organismos modelos é uma valiosa ferramenta em pesquisa de biologia vegetal. Para análise da toxicidade por baixo pH e Al será utilizado o cultivar Micro-Tom de *Lycopersicon esculentum* Mill. que de acordo com Meissner et al. (1997) possui várias características que o tornam viável para utilização como modelo experimental em estudos, dentre elas: cresce em alta densidade de plantas, requer pequena quantidade de substrato para o crescimento (200 ml) e sobretudo têm um pequeno ciclo de vida (70 a 90 dias) permitindo observar variáveis durante todo ciclo de vida.

Dentre os mutantes hormonais de tomateiro, a mutação relacionada com a produção de brassinosteroides origina o Micro-Tom *dwarf* (d) de pequeno porte (15 cm) (CAMPOS et al., 2010). Dado que as condições para cultivo e obtenção de sementes do mesmo demonstra-se simplificada e em curto prazo, torna-se viável sua utilização como modelo neste estudo de caracterização de respostas ao baixo pH e Al.

3 HIPÓTESES

Pelos trabalhos aqui citados percebe-se que baixo pH e Al podem gerar estresse na parede celular. Este estresse deverá gerar uma resposta por parte da célula, envolvendo a remodelagem da parede. Por sua vez, a resposta de remodelagem deverá tornar a célula mais tolerante a outros fatores de estresse da parede. Assim, raízes submetidas gradualmente ao baixo pH deverão apresentar uma resposta diferenciada quando comparada a raízes expostas diretamente. Por outro lado, um aumento na pressão de turgor (via soluções hipo-osmóticas), poderá aumentar o estresse de parede quando aplicado simultaneamente ao de baixo pH e Al, ou poderá induzir a uma tolerância a baixo pH e Al se for aplicado previamente.

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram verificar a resposta de crescimento radicular frente diferentes valores de pH, avaliar correlacionar as respostas de crescimento, viabilidade celular e atividade de peroxidase na raiz durante a exposição direta e gradual ao baixo pH. Avaliar os efeitos do tratamento hipo-osmótico sobre a exposição a baixo pH examinando o crescimento radicular e viabilidade celular no ápice e relacioná-los com a atividade de peroxidases tendo como foco possíveis modificações na parede celular. Em menor escala objetivou-se avaliar os possíveis efeitos do tratamento hipo-osmótico com subsequente exposição das raízes ao alumínio, observando-se o crescimento radicular e viabilidade celular no ápice.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal e condução das plantas

Como modelo experimental para realizar este estudo foram utilizadas plantas do cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). As sementes foram fornecidas pelo Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal do Prof. Dr. Lázaro E. Pereira Peres da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo em Piracicaba.

5.2 Germinação de sementes

Sementes de tomateiro cv. Micro-Tom foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (10%) por 15 minutos sob agitação. Após isto as mesmas foram lavadas três vezes durante 5 minutos com água destilada e depois colocadas em erlenmeyer com água destilada e mantidas em incubadora com agitação (± 100 rpm) por 2 dias a 28°C no escuro (ZHOU et al., 2009).

5.3 Condições de desenvolvimento das plantas

Após a germinação, as plântulas foram transferidas diretamente para os respectivos tratamentos ou cultivadas por 10 dias. No caso da transferência direta para os tratamentos, as mesmas foram colocadas em erlenmeyer com solução (50 ml) aerada no escuro. A temperatura média da solução foi de 24 °C.

Para o cultivo das plântulas, estas foram colocadas em sacos plásticos (15x8cm) contendo substrato comercial (plantmax) e vermiculita expandida numa proporção de 1:1 (v/v) com adição de adubo NPK tipo 10-10-10 (1 g. L⁻¹) e calcário (4 g. L⁻¹). Os sacos contendo as plântulas foram arranjados dentro de bandejas plásticas e foi adicionada água destilada diariamente para manter a capacidade de campo do substrato. Este sistema de cultivo foi realizado em estantes de crescimento com temperatura média de 24°C e luminosidade de cerca de 110 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Apesar da intensidade luminosa ser um pouco baixa, foi suficiente para a curta duração dos experimentos, sendo inclusive suficiente para as plantas emitirem flores com cerca de 30 dias e conseguirem completar o seu ciclo com frutos maduros (Figura 1).

Figura 1 - Desenvolvimento do cultivar Micro-Tom de tomateiro aos 29 dias de cultivo sob sistema artificial de iluminação com $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h

Após dez dias de cultivo, as plantas foram retiradas do substrato e transferidas para hidroponia com solução de macro e micronutrientes a metade da concentração da que está descrita para o meio Murashige & Skoog no Manual do Modelo Vegetal Micro-Tom (PERES, 2012). Para retirar as plantas do substrato os sacos foram colocados em bandejas com água e a seguir cortados para que o substrato se soltasse das raízes e estas pudessem ser retiradas sem danos. O sistema hidropônico consistiu de potes plásticos (2 L) encapados com EVA preto para proteger as raízes da luminosidade (Figura 2). Para flutuação das plantas, foram feitos furos em bandejas de isopor onde foram encaixados segmentos cortados de tubos do tipo Falcon com diâmetro de 1,5 cm de diâmetro e 1 cm de altura, onde as plantas foram colocadas, ficando somente com a raiz na solução. A temperatura média da solução hidropônica era de $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

Figura 2 - Sistema de cultivo hidropônico de Micro-Tom em solução de Murashige & Skoog a metade da concentração ou em CaSO_4 a 0,5 mM

Para se observar efeitos do baixo pH nas raízes é importante que as mesmas estejam em crescimento e, de preferência, de modo constante. Para assegurar que as raízes estivessem crescendo de modo contínuo, antes do início dos tratamentos estas foram aclimatadas na solução de Murashige & Skoog a metade da concentração por três dias (Figura 3). Em seguida, as plantas foram transferidas para os tratamentos.

Figura 3 - Crescimento radicular em plantas de Micro-Tom durante sete dias em solução hidropônica de Murashige & Skoog, a metade da concentração. Inicialmente as plantas estavam com 10 dias de desenvolvimento. As barras indicam o erro padrão. (n= 18)

5.4 Condições de exposição das raízes e curva de resposta ao pH

A solução utilizada nos tratamentos com plantas com 13 dias de desenvolvimento que permitiu que o pH não variasse na presença de baixas concentrações de tampão foi de CaSO_4 0,5 mM. O tamponamento da solução foi realizado com 1 mM de Homopipes (Homopiperazina-N,N'-bis-2-(ácido etanosulfônico - Sigma®). De acordo com Borgo (2010) o tampão não demonstrou toxicidade à cultura de células de tabaco BY-2 e em um ensaio realizado com plantas de Micro-Tom com 13 dias de desenvolvimento o mesmo não afetou o crescimento radicular na concentração de 2 mM (Figura 4).

Para se obter informações básicas do comportamento do sistema radicular de Micro-Tom à acidez, foi inicialmente realizada uma análise do crescimento radicular frente a diferentes concentrações de H^+ em plantas com 10 dias de cultivo e também com plântulas. Para isto plantas que passaram por 3 dias em solução de Murashige & Skoog foram tratadas com diferentes concentrações de pH, variando de 5,8 a 4,0. Foram realizadas três repetições independentes deste experimento onde se mensurou o crescimento radicular.

5.5 Curva de resposta ao alumínio

Para se avaliar a resposta das plantas ao alumínio, foi analisado o crescimento radicular em função de diferentes concentrações deste, em baixo pH (4,5 e 4,0) em plantas com 2 dias de desenvolvimento.

Foram montados experimentos onde controles foram os tratamentos a pH 5,8, 4,5 e 4,0 sem adição de alumínio. O alumínio foi fornecido na forma de AlCl_3 em pH 4,5 e 4,0. Em ambas as situações cada tratamento foi composto por 10 plantas e os experimentos foram realizados com três repetições independentes.

Figura 4 - Crescimento Radicular de Micro-Tom com 13 dias de desenvolvimento sob diferentes concentrações de homopipes. As barras indicam o erro padrão. (n = 10)

5.6 Exposição direta e gradual ao baixo pH

Neste conjunto de experimentos, foi observado com maiores detalhes a exposição das raízes diretamente ao baixo pH (4,5 e 4,0) ou com o abaixamento gradual de pH até atingir o valor de 4,5 e 4,0. Este experimento foi realizado com plantas aos 2 e 13 dias de desenvolvimento. Cada tratamento foi constituído por 10 plantas.

Plantas com 13 dias de desenvolvimento, já aclimatadas em solução nutritiva por 3 dias, foram transferidas diretamente a soluções com pH de 5,8 (controle) 4,5 e 4,0, por 48 h. No abaixamento gradual do pH, as plantas foram inicialmente

colocadas em solução à pH 5,0, e a cada 4 h, o pH foi abaixado por meio da adição de H_2SO_4 para se atingir os valores desejado. O abaixamento do pH, de 5,0 até 4,5 foi realizado em dois tempos diferentes: o primeiro ao longo de 8 h, onde se adicionou em média $10,8 \mu\text{M}$ de H^+ a cada 4 h e o segundo ao longo de 24 h onde foi adicionado em média $7,9 \mu\text{M}$ de H^+ a cada 4 h. O abaixamento do pH de 5,0 até 4,0 foi realizado em 24 h, sendo que uma média de $15,9 \mu\text{M}$ de H^+ foi adicionado a cada 4 h.

Em plantas com 2 dias de desenvolvimento o abaixamento gradual do pH foi realizado ao longo de 4 e 12 h e a duração do experimento foi de 24 h. Para isto a cada 2 h as plântulas foram trocadas de solução e as mudanças no pH foram as mesmas que em plantas com 13 dias descrito anteriormente (Figura 5).

		Regime de exposição a pH					
Idade das plantas		Exposição direta			Exposição gradual		
2d	13d	5,8	4,5	4,0	5,0 → 4,5 (4/8 h)	5,0 → 4,5 (12/24 h)	5,0 → 4,0 (12/24 h)
tempo (h)		pH da solução					
0	0	5,8	4,5	4,0	5,0	5,0	5,0
2	4				↓ 4,7	↓ 4,8	↓ 4,7
4	8				↓ 4,5	↓ 4,7	↓ 4,5
6	12					↓ 4,7	↓ 4,4
8	16					↓ 4,6	↓ 4,2
10	20					↓ 4,6	↓ 4,1
12	24	5,8	4,5	4,0	4,5	4,5	4,0
24	48	5,8	4,5	4,0	4,5	4,5	4,0

Figura 5 - Cronograma de mudança de pH das soluções de tratamento utilizado nos regimes de exposição direta e gradual ao baixo pH em plantas de Micro-Tom aos 2 e 13 dias de desenvolvimento. Em plantas com 2 dias de desenvolvimento o pH foi abaixado durante 4 e 12 h e a troca de solução foi realizada a cada 2 h. Em plantas com 13 dias de desenvolvimento o pH foi abaixado durante 8 e 24 h e o pH da solução foi ajustada a cada 4 h. As setas indicam mudança de pH da solução de tratamento

A solução de tratamento de plantas com 2 dias de desenvolvimento foi composta por $0,5 \text{ mM}$ de CaCl_2 mais 1 mM de homopipes. A solução de tratamento de plantas com 13 dias de desenvolvimento foi composta por $0,5 \text{ mM}$ de CaSO_4 mais 1 mM de homopipes.

Para verificar a resposta das raízes frente a exposição direta ou gradual foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento radicular, recrescimento radicular, viabilidade celular pela fluorescência de diacetato da fluoresceína e iodeto de propídeo, quantificação da absorção de azul de Evans e medida da atividade total de guaiacol peroxidase.

5.7 Aplicação de tratamento hipo-osmótico nas raízes

No experimento de tratamento hipo-osmótico, após a germinação plantas com 2 dias de desenvolvimento foram transferidas para solução com baixa osmolaridade (CaSO_4 0,5 mM) ou para solução com alta osmolaridade (Sorbitol 150 mM mais CaSO_4 0,5 mM). Em seguida foram transferidas para solução de tratamento com ou sem exposição prévia a solução de CaSO_4 a pH 5,8. As soluções de tratamento (CaCl_2 0,5 mM mais Homopipes 1 mM) foram a pH 4,0 e pH 4,5+ Al^{3+} tendo como controle plantas em pH 5,8 e 4,5 respectivamente. No tratamento controle após 12 h em solução com baixa osmolaridade as plantas foram colocadas nas soluções de tratamento. No segundo tratamento, após 12 h em solução de alta osmolaridade as plantas foram transferidas para as soluções de tratamento, mas com a adição de 150 mM de sorbitol para se manter a alta osmolaridade. No terceiro tratamento após 12 h em solução de alta osmolaridade as plantas foram colocadas diretamente nas soluções de tratamento, consistindo em tratamento hipo-osmótico, de pH baixo ou pH baixo e alumínio ao mesmo tempo, chamado de *priming* (0h). Nos outros tratamentos as raízes inicialmente foram expostas ao tratamento hipo-osmótico e depois ao pH baixo ou alumínio, chamado de *priming*. Para isto, após 10, 11 e 11,5 h em solução de alta osmolaridade as plantas foram colocadas por 2, 1 e 0,5 h respectivamente em solução de CaSO_4 (0,5 mM) a pH 5,8. Após isto as mesmas foram transferidas para soluções de tratamento. A solução de tratamento sempre foi composta por 0,5 mM de CaCl_2 mais 1 mM de homopipes. O alumínio sempre foi fornecido na forma de AlCl_3 . Cada tratamento foi composto por 10 plantas, cada experimento foi repetido três vezes.

Quanto aos parâmetros analisados, às 12 h de experimento foi avaliado crescimento radicular, viabilidade celular no ápice pelo método de fluorescência por FDA e PI (KOYAMA; TODA; HARA, 2001) e quantificação da absorção de azul de Evans (SIMONOVICOVÁ et al., 2004). A atividade de guaiacol peroxidase foi medida após 10 e 12 h nas soluções de baixa e alta osmolaridade, ao final do *priming* e 12 h

de tratamentos. Todos os parâmetros citados anteriormente foram avaliados com a aplicação de SHAM.

5.8 Avaliação do crescimento radicular

Nos experimentos em que se utilizou de plantas com 13 dias de desenvolvimento, o comprimento radicular foi mensurado com uma régua após 0, 24 e 48 h do início do experimento. Nos experimentos em que se utilizou de plantas com 2 dias de desenvolvimento, estas foram fotografadas a 0, 12 ou 24 h de tratamento. Neste caso, usou-se o software ImageJ para determinar o comprimento radicular (ABRAMOFF; MAGELHAES; RAM, 2004).

5.8.1 Avaliação do recrescimento radicular

O recrescimento radicular foi utilizado para indicar se as raízes poderiam se recuperar dos possíveis danos causados pelo baixo pH ao sistema radicular (MOTODA et al., 2010; MATSUMOTO; MOTODA, 2012). Nos experimentos que se usou de plantas com 13 dias de desenvolvimento após o término dos tratamentos com baixo pH as mesmas foram colocadas em solução de Murashige & Skoog a metade da concentração e o crescimento radicular foi avaliado após 24 h.

5.9 Avaliação qualitativa e quantitativa da viabilidade celular

Para determinar se as células do ápice radicular mantinham-se viáveis após tratamento com baixo pH e alumínio, a viabilidade celular foi avaliada por mais de um método.

Em um método a viabilidade foi avaliada com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (PI) (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; GUNSÉ; GARZÓN; BARCELÓ, 2003; TRUERNIT; HASELOFF, 2008). Com esta combinação de corantes, células viáveis fluorescem verde (FDA) e as não viáveis fluorescem em vermelho (PI). Ao final de cada experimento, as raízes foram coradas em solução com FDA + PI por 3 minutos. Logo após foram enxaguadas em água deionizada e imediatamente observadas em microscópio de epi-fluorescência Leica DM6000B. O cubo de filtro usado para visualizar FDA foi o L5 (filtro de excitação BP 480/40 nm, espelho dicróico 505 e filtro de emissão BP 527/30 nm; Leica). O cubo de filtro usado para visualizar PI foi N2.1 (filtro de excitação BP 515/60 nm, espelho dicróico 580 nm

e filtro de emissão LP 590 nm; Leica). As concentrações de FDA e PI utilizadas foram de 12 e 7 μ M respectivamente.

Outro método empregado para avaliação da viabilidade da raiz em termos qualitativos e quantitativos foi a coloração por azul de Evans. Em células viáveis este corante não permeia a membrana e sua absorção no tecido é um indicativo de morte celular (YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001). Ao final de cada experimento as raízes foram colocadas em placas de petri e coradas com azul de Evans 0,25% (p/v) por 15 minutos. A seguir foram enxaguadas e observadas por microscopia de campo claro.

Para a avaliação quantitativa da viabilidade com azul de Evans, empregou-se o método descrito nos trabalho de Simonovicová et al. (2004), com algumas modificações. Após serem coradas e enxaguadas, segmentos de 0,5 cm do ápice radicular foram cortados e colocados em frascos plásticos onde se adicionava 1 ml de DMSO (Dimetilsulfoxido). A incubação em DMSO foi durante 1 h, em seguida realizou-se a leitura da densidade óptica da solução em espectrofotômetro a 600 nm.

O método qualitativo de azul de Evans foi utilizado em raízes de plantas com 13 dias de desenvolvimento. As raízes com 2 dias eram mais espessas que as de plantas com 13 dias e por este motivo, não permitiam boa visualização da coloração por microscopia. O método quantitativo com azul de Evans foi empregado apenas em raízes de plantas com 2 dias de desenvolvimento. Já o método com FDA e PI foi utilizado apenas em raízes de plantas com 2 dias de desenvolvimento, pois a coloração de raízes com 13 dias não demonstrou qualidade, possivelmente pela interferência de compostos (mucilagem) na superfície destas.

5.10 Avaliação da atividade total de guaiacol peroxidase no apoplasto

Para detecção da atividade de guaiacol peroxidase utilizou-se a metodologia descrita no trabalho de Amako, Chen e Asada (1994) com algumas modificações. Inicialmente 0,5 cm do ápice radicular de dez raízes ($\pm$ 0,04 g) foram cortados e colocadas em tubos plásticos contendo KH_2PO_4 (50 mM) e pCMB (p-cloromercuriobenzoato, 0,05 mM) por 5 minutos. Logo após foi adicionado guaiacol (1mM) e a reação foi iniciada com adição de H_2O_2 (2 mM). O volume total de reação foi de 1,5 ml e sob temperatura ambiente (24 °C). Após 10 minutos de incubação foi feita a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 436 nm. Como controle foi

avaliada a atividade enzimática em reações sem adição de guaiacol ou H_2O_2 . Para calcular a atividade da enzima utilizou-se o coeficiente de extinção molar do guaiacol, $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (MROCZEK-ZDYRSKA; WÓJCIK, 2011).

5.11 Análise estatística

A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk seguido de análise de variância (ANOVA) com um único fator. Em seguida aplicou-se o teste de Duncan para estabelecer a diferença entre as médias. Quando necessário foi realizado o teste T de Student para comparar duas médias de um mesmo e de tratamentos diferentes. Foram utilizados o software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002), Statistica 8.0 (2007) e Excel (2010) para as análises.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização do crescimento radicular frente ao baixo pH

Em um primeiro experimento plantas do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com 13 dias de desenvolvimento foram expostas diretamente a soluções com pH variando de 5,8 a 4,0 com intuito de levantar a curva de resposta do crescimento radicular. O crescimento radicular foi pouco afetado na faixa de pH de 5,8 a 5,0, seja em 24 ou 48 h de tratamento. Em pH abaixo de 5,0 foi observada uma queda no crescimento radicular até o pH 4,0 sendo que neste último o crescimento radicular foi completamente inibido (Figura 6). Assim, a resposta do crescimento radicular a pH baixo foi aproximadamente linear na faixa de pH de 4,0 a 5,0.

Independente do pH o crescimento radicular nas primeiras 24 h foi menor que em 48 h de experimento possivelmente devido a perturbações sofridas pela mudança das raízes de uma solução rica em nutrientes (Murashige & Skoog a metade da concentração) para uma com poucos nutrientes (0,5 mM CaSO_4) em que se aplicou os tratamentos (Figura 6).

6.2 Respostas do ápice radicular frente à exposição direta ou gradual ao baixo pH

Em um segundo conjunto de experimentos plantas aos 2 e 13 dias de desenvolvimento foram expostas diretamente a baixo pH assim como gradualmente ao mesmo. O intuito foi examinar as resposta de crescimento radicular e viabilidade celular da raiz.

Figura 6 - Crescimento radicular de Micro-Tom (MT) com 13 dias de desenvolvimento em pH de 5,8 até 4,0. As barras indicam o erro padrão de três replicas

6.2.1 Crescimento e viabilidade celular da raiz

Quando plantas com 13 dias de desenvolvimento foram expostas diretamente a pH 4,5 o crescimento radicular foi cerca da metade do crescimento daquelas em pH 5,8 em ambos os tempos de amostragem (24 ou 48 h) (Figura 7). Quando expostas diretamente a pH 4,0 praticamente não houve crescimento das raízes, conforme já havia sido demonstrado na curva de resposta ao baixo pH (Figura 6). Ao se abaixar o pH gradualmente de 5,0 até 4,5, ao longo de um período de 8 ou 24 h foi observado uma tendência de menor crescimento radicular comparado ao de plantas expostas diretamente a pH 4,5, principalmente entre 24 e 48 h onde houve significância estatística. O abaixamento gradual do pH de 5,0 até 4,0, ao longo de 24 h, resultou em pequeno crescimento radicular durante as primeiras 24 h experimentais, mas entre 24 e 48 h ele foi totalmente inibido assim como em plantas expostas diretamente ao pH 4,0 (Figura 7).

Figura 7 - Crescimento radicular de Micro-Tom com 13 dias de desenvolvimento em diferentes regimes de exposição a baixo pH. A esquerda, as raízes foram expostas diretamente a solução controle (pH 5,8), pH 4,5 ou 4,0. A direita, as raízes foram expostas ao abaixamento gradual durante 8 h (pH 5,0 a 4,5) ou 24 h (5,0 a 4,5 ou 5,0 a 4,0). As barras indicam o erro padrão de quatro réplicas. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo tempo foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um unico fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo pH em tempos diferentes pelo teste T de Student com 5 % de significância

Em plantas com 2 dias de desenvolvimento a tendência foi semelhante à observada em plantas com 13 dias. A exposição direta ao pH 4,5 reduziu o crescimento comparado ao controle em pH 5,8 e no pH 4,0 as raízes não cresceram (Figura 8). Na exposição gradual ao pH 4,5, durante um período de 4 h, o crescimento foi semelhante ao de plantas expostas diretamente ao pH 4,5, mas curiosamente, quando o pH foi abaixado ao longo de 12 h a redução no crescimento foi mais pronunciada. Na exposição gradual a pH 4,0 houve um pequeno crescimento após 24 h, mas este não diferiu significativamente do controle exposto diretamente ao mesmo pH (Figura 8).

De modo geral, estes resultados não foram o esperado. De acordo com nossa hipótese inicial, o abaixamento gradual do pH deveria induzir que as raízes continuassem o crescimento mesmo após atingir o valor final de pH (seja 4,5 ou 4,0). No entanto isto não foi verificado.

Além de o baixo pH reduzir o crescimento radicular, também pode levar a uma perda da viabilidade celular (KOYAMA; TODA; HARA, 2001). É possível que as

diferentes maneiras de exposição a baixo pH pudessem ter efeitos diferentes sobre este parâmetro. Para verificar isto foi analisada a viabilidade celular na exposição direta ou gradual ao baixo pH em plantas com 2 dias de desenvolvimento através da aplicação simultânea de diacetato da fluoresceína e iodeto de propídeo assim como pela quantificação da absorção de azul de Evans. A coloração por estes compostos depende de danos na membrana plasmática, sendo assim um indicativo de morte celular (SIMONOVICOVÁ et al., 2004; TRUERNIT; HASELOFF, 2008). Em plantas com 13 dias de desenvolvimento a viabilidade celular no ápice radicular foi visualizada apenas através da coloração por azul de Evans.

Figura 8 - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento em diferentes regimes de exposição a baixo pH, após 24 h. A esquerda, as raízes foram expostas diretamente a solução controle (pH 5,8), pH 4,5 ou 4,0. A direita as raízes foram expostas ao abaixamento gradual durante 4 h (pH 5,0 a 4,5) ou 12 h (5,0 a 4,5 ou 5,0 a 4,0 12h). As barras indicam o erro padrão de três réplicas. A comparação estatística entre tratamentos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um unico fator, seguido por um teste de Duncan

Em plantas aos 2 ou 13 dias de desenvolvimento, foi observado que a viabilidade das células do ápice de raízes expostas diretamente a pH 4,5 foi mantida semelhante à aquelas em condição controle, de pH 5,8, uma vez que a fluorescência da fluoresceína foi marcante e houve pouca penetração de azul de Evans (Figuras 9 B e 10 B). Estas observações foram reforçadas pela quantificação da absorção deste último, o qual foi semelhante ao controle (Figura 11).

Plantas aos 2 ou 13 dias de desenvolvimento expostas diretamente a pH 4,0 tiveram uma redução da viabilidade celular no ápice pois foi observado fluorescência em vermelho devido à ligação de iodeto de propídeo ao DNA (TRUERNIT; HASELOFF, 2008) ou também a absorção marcante de azul de Evans (Figuras 9 C e 10 C). Estas observações estão de acordo com a quantificação da absorção de azul de Evans no pH 4,0, que foi maior do que nos outros tratamentos (Figura 11). Quando o pH foi abaixado gradualmente de 5,0 para 4,5 em 4 ou 12 h em plantas com 2 dias, ou durante 8 e 24 h em plantas com 13 dias de desenvolvimento a fluorescência de FDA e PI e a coloração por azul de Evans se manteve semelhante a de plantas que foram expostas diretamente a pH 4,5 (Figuras 9 D e E, 10 D e E). Houve uma tendência de plantas em que o pH foi abaixado até 4,5 em 12 h absorverem mais azul de Evans do que aquelas em que o abaixamento foi em 4 h mas sem diferença estatística (Figura 11).

Embora o crescimento radicular seja interrompido e a viabilidade seja afetada na exposição direta a pH 4,0, acima do ápice radicular durante o estresse há a formação de raízes laterais, conforme observado na figura 10 (G).

O abaixamento gradual do pH 5,0 até 4,0 em plantas aos 2 e 13 dias de desenvolvimento aumentou a viabilidade no ápice quando comparado ao daquelas que foram expostas diretamente à pH 4,0, indicado pela maior fluorescência da fluoresceína e menor penetração de azul de Evans (Figuras 9 F e 10 F). Isto pode ser confirmado pela menor quantificação da absorção de azul de Evans em raízes na exposição gradual (Figura 11).

Figura 9 - Viabilidade celular no ápice radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento em diferentes regimes de exposição a baixo pH, após 12 h. A viabilidade foi avaliada empregando-se diacetato da fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (PI). A fluorescência em verde do FDA é um indicativo de viabilidade celular e em vermelho do PI é indicativo de células mortas. A, B e C = Raízes expostas diretamente a pH 5,8 (controle), 4,5 e 4,0, respectivamente. D = raízes expostas a abaixamento gradual durante 4 h (pH 5,0 a 4,5); E = raízes expostas a abaixamento gradual durante 12 h (5,0 a 4,5); F = raízes expostas a abaixamento gradual durante 12 h (5,0 a 4,0). As barras brancas representam 200 μm . Cada imagem é representativa de 10 a 13 observações

Figura 10 - Viabilidade celular no ápice radicular de Micro-Tom com 13 dias de desenvolvimento em diferentes regimes de exposição a baixo pH, após 48 h. A viabilidade foi avaliada pro coloração de azul de Evans. A coloração em azul é indicativo de morte celular. A, B e C = Raízes expostas diretamente a pH 5,8 (controle), 4,5 e 4,0, respectivamente. D = raízes expostas a abaixamento gradual durante 8 h (pH 5,0 a 4,5); E = raízes expostas a abaixamento gradual durante 24 h (5,0 a 4,5); F = raízes expostas a abaixamento gradual durante 24 h (5,0 a 4,0); G = Surgimento de raízes laterais em raíz tratada a pH 4,0 (exposição direta) próximo ao ápice. As barras representam 500 µm. Cada imagem é representativa de 10 a 13 observações

Figura 11 - Quantificação da absorção de azul de Evans no ápice radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento em diferentes regimes de exposição a baixo pH, após 24 h. A esquerda, as raízes foram expostas diretamente a solução controle (pH 5,8), pH 4,5 ou 4,0. A direita as raízes foram expostas ao abaixamento gradual durante 4 h (pH 5,0 a 4,5) ou 12 h (5,0 a 4,5 ou 5,0 a 4,0 12h). As barras indicam o erro padrão de três réplicas. A comparação estatística entre tratamentos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um unico fator, seguido por um teste de Duncan

6.2.2 Recrescimento radicular

Vários trabalhos têm utilizado o recrescimento radicular após tratamento com baixo pH e alumínio para avaliar possíveis danos ao tecido meristemático radicular (MOTODA et al., 2010; MATSUMOTO; MOTODA, 2012). Assim, foram realizados ensaios de recrescimento em solução de Murashige & Skoog a metade da concentração apenas com plantas com 13 dias de desenvolvimento.

Raízes que foram expostas diretamente a pH 4,5 por 48 h aumentaram o crescimento após o retorno para solução de Murashige & Skoog, inclusive apresentando tendência de crescimento maior que aquelas mantidas anteriormente em pH 5,8. Estes dados reforçam as evidências de que o meristema manteve viável neste pH durante o estresse (Figura 12). Já nas raízes tratadas diretamente com pH 4,0, não houve uma recuperação do crescimento durante as primeiras 24 h após o retorno para solução de Murashige & Skoog, indicando que os danos causados neste valor de pH comprometeu a viabilidade meristemática e corroboram com avaliação de morte celular pela fluorescência de iodeto de propídeo e quantificação da absorção de azul de Evans (Figuras 9 F, 10 e 11).

Plantas que foram expostas gradualmente ao pH 4,5 durante 8 ou 24 h recuperaram o crescimento radicular de forma semelhante quando transferidas para solução de Murashige & Skoog. Em ambas situações houve crescimento semelhante ao de raízes que foram expostas diretamente ao pH 4,5 (Figura 12).

Ao contrário das raízes que foram colocadas diretamente em pH 4,0, raízes que foram expostas gradualmente a este foram capazes de retomar o crescimento radicular nas primeiras 24 h de recrescimento (Figura 12). Assim, a exposição gradual não resultou em melhoria do crescimento radicular durante o estresse em si, conforme o esperado, mas sim na manutenção da viabilidade celular no ápice.

Figura 12 - Recrescimento radicular de Micro-Tom com 13 dias de desenvolvimento em solução de Murashige & Skoog a metade da concentração durante 24 h após serem submetidas a diferentes regimes de exposição a baixo pH. A esquerda, as raízes foram expostas diretamente a solução controle (pH 5,8), pH 4,5 ou 4,0. A direita, as raízes foram expostas ao abaixamento gradual durante 8 h (pH 5,0 a 4,5) ou 24 h (5,0 a 4,5 ou 5,0 a 4,0). As barras indicam o erro padrão de três réplicas. A comparação estatística entre tratamentos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan

6.2.3 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX)

Peroxidases são enzimas responsáveis por diversos eventos que ocorrem na célula, e as da classe III, secretadas para o apoplasto atuam na formação e rearranjos que ocorrem na parede celular que podem promover afrouxamento ou enrijecimento da estrutura (PASSARDI et al., 2005). Por estarem ligadas ao desenvolvimento e modificações na parede celular, levantamos a hipótese de que

estas enzimas possa responder ao estresse causado por baixo pH modificando a parede celular. Para isto foi mensurada a atividade total de guaiacol peroxidase (GPX) no ápice radicular de plantas na exposição direta e gradual ao baixo pH às 12 e 24 h de experimento.

A atividade total GPX nos tratamentos a baixo pH, 4,5 ou 4,0, foram maiores que no controle a pH 5,8 durante as 12 h iniciais de experimento indicando que a atividade da enzima aumenta sob este tipo de estresse (Figura 13). Nas 12 h iniciais de exposição direta ao baixo pH, raízes em pH 4,5 tiveram a tendência de maior atividade que aquelas em pH 4,0, contudo não diferiram entre si e com aquelas expostas gradualmente a pH 4,5 ao longo de 4 horas e a pH 4,0. Em raízes expostas gradualmente ao pH 4,0, apesar de manterem a viabilidade não foi observado um aumento significativo na atividade de GPX comparada à aquelas expostas diretamente ao pH 4,0. A atividade de GPX em raízes expostas diretamente a pH 4,5 e 4,0 foi semelhante no início e 24 h, já os outros tratamentos apresentaram uma redução em 24 h, sendo semelhantes ao controle a pH 5,8 (Figura 13).

Figura 13 - Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) em Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento em diferentes regimes de exposição ao baixo pH. A esquerda, as raízes foram expostas diretamente a solução controle (pH 5,8), pH 4,5 ou 4,0. A direita as raízes foram expostas ao abaixamento gradual durante 4 h (pH 5,0 a 4,5) ou 12 h (5,0 a 4,5 ou 5,0 a 4,0 12h). As barras indicam o erro padrão de três réplicas. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo tempo foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo pH em 12 e 24 h de tratamento pelo teste T de Student com 5 % de significância

6.3 Respostas do ápice radicular frente ao tratamento hipo-osmótico prévio e baixo pH

6.3.1 Crescimento e viabilidade celular da raiz

De acordo com nossas hipóteses, uma mudança na pressão de turgor celular causada, por exemplo, pela transferência de raízes de uma solução com alta osmolaridade (menor potencial hídrico) para soluções com baixa osmolaridade (maior potencial hídrico) poderia gerar uma modificação na parede celular, possivelmente o enrijecimento da mesma, que por sua vez poderá alterar a susceptibilidade das raízes a baixo pH.

Em leveduras já foi demonstrado a existência de um sistema de monitoramento de estresse na parede celular (LEVIN, 2005). Com exceção de alguns estudos em que houve indícios do envolvimento de enzimas na manutenção da integridade de parede vegetal (MONSHAUSEN et al., 2007), em geral, há carência de trabalhos com foco nesta área, principalmente para o caso do estresse por baixo pH e alumínio.

Para realizar o tratamento hipo-osmótico, é necessário primeiramente expor as raízes a soluções de alta osmolaridade por determinado período de tempo para depois retorná-las a soluções de baixa osmolaridade. Assim inicialmente foram realizados alguns ensaios preliminares e determinado que a permanência das plantas por 12 h em solução de alta osmolaridade (150 mM de sorbitol mais 0,5 mM de CaSO_4) foi adequada e permitiu que as células mantivessem a viabilidade após serem transferidas para uma solução de 0,5 mM de CaSO_4 a pH 5,8. Desta forma, o tratamento hipo-osmótico consistiu em transferir raízes de uma solução a 150,5 mM (- 0,37 MPa) para uma a 0,5 mM (- 0,001 MPa) ou diretamente para soluções a pH 4,0 ou 5,8.

Este tratamento hipo-osmótico é aqui chamado de *priming* hipo-osmótico ou simplesmente de *priming*. Como controles, algumas raízes foram expostas a pH 4,0 ou 5,8, sem manipulação osmótica ou ainda em outros casos, mantidas em solução a 150 mM, continuamente, inclusive durante a exposição a pH baixo.

Quando as raízes permaneceram em solução a 150 mM (- 0,37 MPa), houve menor crescimento a pH 5,8 comparado ao controle (Figura 14). No pH de 5,8, o crescimento radicular tendeu sempre a aumentar na sequência de tratamentos: alta osmolaridade contínua (150 mM), *priming* (0h), *priming* (0,5h), *priming* (1h) e *priming*

(2h). Em seu conjunto estes dados indicam que a permanência das raízes em alta osmolaridade reduziu o crescimento, provavelmente devido a alterações na pressão de turgor das células. A transferência para soluções com maior potencial hídrico foi suficiente para melhorar o crescimento.

A viabilidade celular parece não ser afetada em decorrência de quaisquer uns dos tratamentos a pH 5,8, uma vez que prevaleceu a fluorescência da fluoresceína e a absorção de azul de Evans não foi diferente do controle (Figuras 15 e 16).

Quando expostas a pH 4,0 na condição controle o crescimento radicular foi quase nulo, conforme já encontrado nos experimentos anteriores (Figura 14). Além disto, as células perderam a viabilidade, indicado pela fluorescência de iodeto de propídeo e maior absorção de azul de Evans comparado ao controle a pH 5,8 (Figuras 15 e 16). Quando a exposição a pH 4,0 foi realizada mantendo as raízes em alta osmolaridade (150 mM) ou quando esta foi simultânea como o tratamento hiposmótico *priming* (0h) não houve melhoria da viabilidade celular. Entretanto, houve uma pequena tendência em aumentar o crescimento radicular (Figuras 14). Quando as raízes passaram por *priming*, o crescimento radicular em pH 4,0 foi maior que nos outros tratamentos e aumentou de 0,5 para 1 h de *priming*, onde atingiu o maior crescimento, 0,21 cm em 12h (Figura 14). O crescimento radicular foi semelhante entre pH 5,8 e 4,0 no *priming* de 0,5 e 1 h. No *priming* de 1 h houve maior proteção da viabilidade celular em relação ao controle pois prevaleceu a fluorescência da fluoresceína e menor absorção de azul de Evans. No *priming* de 0,5 e 2 h marcadamente houve fluorescência de iodeto de propídeo na parte distal do ápice e pela quantificação da absorção de azul de Evans, estes foram semelhantes ao controle (Figuras 15 e 16).

Figura 14 - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento frente ao tratamento hipo-osmótico e por baixo pH. Controle = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8 e 4,0. 150 mM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram tratadas em pH 5,8 e 4,0 mantendo-se esta osmolaridade. *Priming (0h)* = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram colocadas diretamente em tratamentos a pH 5,8 e 4,0. *Priming (0,5h)* = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. *Priming (1h)* = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. *Priming (2h)* = plantas que após 48 h de germinação e 10 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 2 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo pH foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa entre pH 5,8 e 4,0 do mesmo tratamento pelo teste T de Student com 5 % de significância

Figura 15 – Viabilidade celular no ápice radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento frente o tratamento hipo-osmótico e baixo pH. A viabilidade foi avaliada empregando-se diacetato da fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (PI). A fluorescência em verde do FDA é um indicativo de viabilidade celular e em vermelho do PI indica células mortas. A e B = Controle, plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8 e 4,0.; C e D = 150 mM, plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram tratadas em pH 5,8 e 4,0 respectivamente, mantendo-se a osmolaridade da solução em 150 mM; E e F = *Priming* (0h) = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram colocadas diretamente em tratamentos a pH 5,8 e 4,0 respectivamente; G e H = *Priming* (0,5h), plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 respectivamente; I e J = *Priming* (1h), plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 respectivamente; K e L = *Priming* (2h), plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 respectivamente. As barras brancas representam 200 μ m. Cada imagem é representativa de 10 a 13 observações

Figura 16 - Quantificação da absorção de azul de Evans em Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento frente ao tratamento hipo-osmótico e de baixo pH. Controle = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8 e 4,0. 150 mM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram tratadas em pH 5,8 e 4,0 mantendo-se esta osmolaridade. *Priming* (0h) = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram colocadas diretamente em tratamentos a pH 5,8 e 4,0. *Priming* (0,5h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. *Priming* (1h) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. *Priming* (2h) = plantas que após 48 h de germinação e 10 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 2 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo pH foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa entre pH 5,8 e 4,0 do mesmo tratamento pelo teste T de Student com 5 % de significância

6.3.2 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX)

Para investigar o possível envolvimento de peroxidases durante e após o tratamento hipo-osmótico e na resposta das raízes ao baixo pH foi mensurada a atividade total de guaiacol peroxidase (GPX) no apoplasto. Primeiramente foi examinada a atividade antes e após a aplicação do *priming*. A manutenção de raízes em solução com alta osmolaridade (menor potencial hídrico) por 12 h estimulou um aumento na atividade de GPX comparada ao controle (Figura 17). Quando as raízes foram transferidas de uma solução com 150 mM para uma com

0,5 mM (*priming*) por 0,5 h a atividade diminuiu, sendo semelhante ao controle. A atividade de GPX aumentou de acordo com o tempo em *priming*, sendo a maior atividade no final do *priming* de 2 h (Figura 17).

Figura 17 - Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) antes e ao final do *priming* em plantas de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento. Controle = plantas que germinaram por 48 h e após 12 h em solução a 0,5 mM tiveram a atividade de GPX mensurada; 150 mM (10h) = plântulas que germinaram por 48 h e após 10 h em solução a 150 mM tiveram a atividade de GPX mensurada; 150 mM (12h) = plantas que germinaram por 48 h e após 12 h em solução a 150 mM tiveram a atividade de GPX mensurada; *Priming* (0,5h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tiveram a atividade de GPX mensurada. *Priming* (1h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tiveram a atividade de GPX mensurada. *Priming* (2h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 2 h e logo após tiveram a atividade de GPX mensurada. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan.

No experimento de exposição direta e gradual ao baixo pH foi demonstrado que a atividade de GPX aumentou em função do estresse. O *priming* de 1 h melhorou crescimento e viabilidade de raízes em pH 4,0. Somados estes fatores, procuramos saber se atividade enzimática responde aos efeitos de *priming*, o que poderá reforçar um possível envolvimento desta e as respostas a baixo pH.

Raízes em pH 5,8 dos tratamentos *priming* (0h) e *priming* (1h) apresentaram atividade de GPX semelhante ao controle (Figura 18). Raízes que foram mantidas em solução com alta osmolaridade, 150 mM, e que passaram por *priming* (2h) onde

apresentaram a maior atividade a pH 5,8 (Figura 18). Houve uma tendência da duração do *priming* aumentar a atividade de GPX de 0,5 para 2 h.

Em raízes em pH 4,0, conforme o esperado, a atividade de GPX aumentou em relação ao pH 5,8 no tratamento controle e somente em raízes que foram mantidas em alta osmolaridade (150 mM) a atividade entre pH 5,8 e 4,0 não diferiu. A atividade de GPX tendeu a aumentar na sequência dos seguintes tratamentos: *priming* (0h), *priming* (0,5h), *priming* (1h) e *priming* de 2 h que apresentou a máxima atividade, diferindo dos demais tratamentos (Figura 18).

Figura 18 - Atividade total de guaiacol peroxidase (GPX) ao final do tratamento hipo-osmótico e por baixo pH em plantas de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento. Controle = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8 e 4,0. 150 mM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram tratadas em pH 5,8 e 4,0 mantendo-se esta osmolaridade. *Priming* (0h) = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram colocadas diretamente em tratamentos a pH 5,8 e 4,0. *Priming* (0,5h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. *Priming* (1h) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. *Priming* (2h) = plantas que após 48 h de germinação e 10 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 2 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo pH foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa entre pH 5,8 e 4,0 do mesmo tratamento pelo teste T de Student com 5 % de significância

6.3.3 Inibição da atividade de guaiacol peroxidase (GPX) via aplicação de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) no *priming* de 1 h

Pelos resultados anteriores foi demonstrado que quando as raízes passaram por um *priming* hipo-osmótico houve melhoria no crescimento e viabilidade celular, principalmente no *priming* de 1 h de duração. Somado a isto, a atividade de guaiacol peroxidase (GPX) aumentou em solução com alta osmolaridade (Figura 17) e sob baixo pH. Juntos estes dados sugerem que a atividade de GPX pode ser importante para a alívio do estresse observadas no baixo pH induzida pelo *priming*.

A aplicação de inibidores da atividade enzimática é uma maneira de relacionar o envolvimento destas com determinados processos. Assim durante o *priming* de 1 h, foi aplicado o ácido salicilhidroxâmico (SHAM), um inibidor da atividade de peroxidases (DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007; KUKAVICA et al., 2012). Caso a aplicação de SHAM resulte na reversão dos efeitos do *priming* no crescimento e viabilidade celular de raízes tratadas a pH baixo, isto será indício da participação da enzima neste processo.

Inicialmente, foram testadas algumas concentrações de SHAM. A concentração de 0,1 mM não demonstrou efeitos sobre o crescimento e viabilidade da raiz em pH 5,8. A concentração escolhida foi 0,5 mM, uma vez que houve redução no crescimento a pH 5,8 mas sem afetar a viabilidade celular. Em concentrações de 1 e 3 mM além de reduzir o crescimento radicular a viabilidade foi afetada (apêndices A, B e C).

A aplicação de 0,5 mM de SHAM durante o *priming* de 1 h reduziu o crescimento a pH 5,8 comparado ao *priming* sem adição de SHAM (Figura 19). O crescimento radicular em pH 4,0 alcançado pelos efeitos do *priming* também foi revertido com a aplicação de SHAM. Estes resultados já eram esperados, uma vez que a aplicação de SHAM afeta o crescimento em condições controle inibindo a atividade de peroxidases, importantes para o crescimento (DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007).

Embora o SHAM afete o crescimento, a atividade de peroxidases durante o *priming* pareceu ser importante para a viabilidade da raiz quando exposta a baixo pH, pois sua inibição reverteu os efeitos do *priming* para a viabilidade em pH 4,0 e afetou a viabilidade das células epidérmicas de raízes em pH 5,8 conforme observa-se na figura 20. Estes resultados foram confirmados pela quantificação da absorção de azul de Evans, onde raízes tratadas a pH 5,8 e 4,0 que receberam SHAM durante

o *priming* absorveram mais o corante comparado aquelas com *priming* sem aplicação de SHAM (Figura 21), indicando que houve morte celular.

Figura 19 - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento com ou sem aplicação de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) no *priming* antes da exposição ao pH 5,8 ou pH 4,0. *Priming* (-SHAM) = plantas que após a de germinação e 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas a pH 5,8 e 4,0. *Priming* (+SHAM) = plantas que após a de germinação e 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) mais SHAM (0,5 mM) ádurante 1 h e logo após tratadas a pH 5,8 e 4,0. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam significância entre tratamentos de mesmo pH e asterisco (*) diferença entre diferentes pH do mesmo tratamento pelo teste de T de Student com 5 % de significância

Figura 20 - Viabilidade celular no ápice radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento com ou sem aplicação de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) no *priming* antes da exposição ao pH 5,8 ou pH 4,0. A fluorescência em verde do diacetato da fluoresceína (FDA) é um indicativo de viabilidade celular e em vermelho do iodeto de propídeo (PI) indica células mortas. A e B = plantas que após a de germinação e 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas a pH 5,8 e 4,0 respectivamente; C e D = plantas que após a de germinação e 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) mais SHAM (0,5 mM) durante 1 h e logo após tratadas a pH 5,8 e 4,0 respectivamente. As barras brancas representam 200 μ m. Cada imagem é representativa de 10 a 13 observações

Figura 21 - Quantificação da absorção de azul de Evans no ápice radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento com ou sem aplicação de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) no *priming* antes da exposição ao pH 5,8 ou pH 4,0. *Priming* (-SHAM) = plantas que após a de germinação e 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas a pH 5,8 e 4,0. *Priming* (+SHAM) = plantas que após a de germinação e 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) mais SHAM (0,5 mM) durante 1 h e logo após tratadas a pH 5,8 e 4,0. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. Letras diferentes indicam significância entre tratamentos de mesmo pH e asterisco (*) diferença entre diferentes pH do mesmo tratamento pelo teste de T de Student com 5 % de significância

Para saber o quanto da atividade de GPX foi afetada pela aplicação do inibidor foram realizadas medidas ao final do *priming* de 1 h. Como controle, foi medida a atividade no tratamento em que não foi adicionado SHAM no *priming* assim como durante a reação (Figura 22). A adição de SHAM durante a reação reduziu a atividade de GPX para cerca de 50 % em relação ao controle. Quando SHAM foi aplicado somente durante o *priming* a atividade foi em média 70 % menor que o controle. A aplicação de SHAM durante o *priming* e reação inibiu cerca de 60% da atividade de GPX em relação ao controle.

Em geral, o SHAM reduziu a atividade enzimática o que pode estar relacionado com a perda de viabilidade quando a raiz foi tratada com baixo pH. Além disto, quando o SHAM foi aplicado somente no *priming* a atividade de GPX foi reduzida na reação. Isto indica que quando o SHAM foi aplicado no *priming* e as raízes foram tratadas a baixo pH, a atividade de GPX possivelmente ainda estava

reduzida, o que pode ter contribuído para a perda de viabilidade sob baixo pH (Figuras 20 e 21)

Figura 22 - Atividade total de guaiacol peroxidase (GPX) no final do *priming* com ou sem aplicação de 0,5 mM de ácido salicílico (SHAM) em plantas de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento. Após a germinação as plantas passaram por 11 h em solução a 150 mM e depois foram transferidas para solução a 0,5 mM por 1 h (*priming*). Durante o *priming* e reação para atividade de GPX o SHAM foi aplicado (+) ou não (-). As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan

6.4 Respostas do ápice radicular ao alumínio tóxico (Al^{3+})

6.4.1 Caracterização do crescimento e viabilidade da raiz

Em um primeiro experimento plantas com 2 dias de desenvolvimento foram expostas a concentrações variando de 0 a 10 μM de AlCl_3 com o objetivo de observar o crescimento radicular no estresse e determinar uma concentração para realizar os experimentos de tratamento hipo-osmótico e exposição ao Al.

Em plantas com 2 dias de desenvolvimento a pH 4,5, a medida que aumentou-se a concentração de AlCl_3 , de 2,5 até 10 μM , o crescimento radicular diminuiu, sendo menor que no controle a pH 4,5 sem alumínio (Figura 23). A pH 4,0 em plantas com 2 dias de desenvolvimento não foi encontrada uma tendência clara em relação aos efeitos do Al nas concentrações utilizadas pois o crescimento não

difere do controle tratado com somente pH 4,0, entretanto as respostas podem estar relacionadas com viabilidade celular e não crescimento.

Com base nestes resultados a concentração de alumínio escolhida para o experimento de tratamento hipo-osmótico foi de 5,0 μM a pH 4,5 por inibir o crescimento cerca da metade do controle a pH 4,5 sem alumínio.

Figura 23 - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento em diferentes valores de pH e concentrações de AlCl_3 (μM). As barras representam o erro padrão de três réplicas independentes

6.4.2 Crescimento e viabilidade celular da raiz frente ao alumínio após tratamento hipo-osmótico

Para verificar se o tratamento hipo-osmótico simultâneo com o de Al, *priming* (0h), ou o *priming* de 0,5 a 2 h modificam o crescimento radicular na presença de alumínio foi realizado este experimento.

Raízes expostas ao pH 4,5 que foram mantidas em alta osmolaridade (150 mM) ou que passaram por tratamento hipo-osmótico direto e de pH, *priming* (0h), não diferiram do crescimento apresentado pelo controle, cerca de 0,4 cm em 12 h (Figura 26). No *priming* de 0,5, e 2 h o crescimento radicular a pH 4,5 tendeu a diminuir em relação ao controle e *priming* (0h), mas sem diferença estatística. No *priming* de 1 h houve o menor crescimento, 0,07 cm em 12 h. Todos os tratamentos absorveram azul de Evans de maneira semelhante ao controle a pH 4,5 (Figura 27).

No tratamento controle a aplicação de 5 μM de alumínio diminuiu o crescimento radicular comparado à aquelas somente expostas a pH 4,5 (Figura 26). Raízes que foram mantidas em alta osmolaridade, 150 mM, com tratamento hipo-osmótico simultâneo ao de alumínio, *priming* (0h), ou diferentes tempos de *priming* (0,5, 1 e 2 h) não diferiram do crescimento apresentado pelo controle. Isto indica que o crescimento radicular na presença de alumínio não foi modificado em função do *priming*.

A absorção de azul de Evans nos tratamentos com alumínio em todos os tratamentos foi semelhante ao controle (Figura 27). O controle que recebeu a aplicação de alumínio não diferiu quanto a absorção comparado as raízes controle em pH 4,5. Pelos resultados do experimento de exposição direta a pH 4,5, a viabilidade neste é semelhante ao pH 5,8, portanto neste tratamento hipo-osmótico esta também parece não ter sido afetada.

Figura 24 - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento frente ao tratamento hipo-osmótico por baixo pH e alumínio. Controle = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 4,5 e 4,5+Al. 150 mM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al mantendo-se esta osmolaridade. *Priming* (0h) = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram colocadas diretamente em tratamentos a pH 4,5 e 4,5+Al. *Priming* (0,5h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al. *Priming* (1h) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al. *Priming* (2h) = plantas que após 48 h de germinação e 10 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 2 h e logo após tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo pH foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa entre pH do mesmo tratamento pelo teste T de Student com 5 % de significância

Figura 25 - Quantificação da absorção de azul de Evans em Micro-Tom (MT) com 2 dias de desenvolvimento frente ao tratamento hipo-osmótico direto por baixo pH e alumínio. Controle = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 4,5 e 4,5+Al. 150 mM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al mantendo-se esta osmolaridade. *Priming* (0h) = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 150 mM foram colocadas diretamente em tratamentos a pH 4,5 e 4,5+Al. *Priming* (0,5h) = plantas que após a germinação e 11,5 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 0,5 h e logo após tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al. *Priming* (1h) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al. *Priming* (2h) = plantas que após 48 h de germinação e 10 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 2 h e logo após tratadas em pH 4,5 e 4,5+Al. As barras indicam o erro padrão de três réplicas independentes. A comparação estatística entre tratamentos do mesmo pH foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com um único fator, seguido por um teste de Duncan. O asterisco (*) indica diferença significativa entre pH 4,5 e 4,5+Al do mesmo tratamento pelo teste T de Student com 5 % de significância

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, verificou-se que o baixo pH, em soluções simples, de baixa força iônica, afetou o crescimento radicular de modo acentuado, chegando a praticamente suprimi-lo a pH 4,0. Desta forma, este fator de estresse pode ser tão nocivo ao crescimento radicular quanto o Al. O crescimento radicular diminuiu, de modo aproximadamente linear, principalmente na faixa de pH de 5,0 a 4,0, sendo que nos valores de pH mais baixos observou-se, além da inibição de crescimento, uma diminuição da viabilidade das células do ápice.

A partir da caracterização inicial do crescimento das raízes em função do pH da solução de tratamento, procurou-se explorar se determinadas alterações ou respostas efetuadas pela raiz poderiam alterar a sensibilidade destas ao pH baixo, conforme descrito nas hipóteses deste trabalho. Assim, duas abordagens foram exploradas. Em uma, as raízes foram expostas gradualmente ao abaixamento de pH, buscando verificar se estas poderiam responder e se ajustar a este fator de modo a torná-las menos sensíveis. Em outra abordagem, buscou-se verificar se um tratamento hipo-osmótico prévio, antes da exposição da raiz a baixo pH, poderia gerar alterações que também pudessem diminuir a sensibilidade ao baixo pH.

7.1 A exposição gradual ao baixo pH induz respostas da raiz que amenizam os efeitos do estresse sobre a viabilidade das células radiculares

Inicialmente postulamos que o abaixamento gradual de pH poderia permitir que as raízes se ajustassem e como resultado haveria uma menor inibição do crescimento radicular. Ao contrário do esperado, em plantas com 13 dias de desenvolvimento, as raízes expostas gradualmente ao pH 4,5 cresceram menos do que aquelas expostas diretamente a este pH, entre 24 e 48 h de observação (Figura 7). Comportamento semelhante foi encontrado em plantas com 2 dias de desenvolvimento onde a exposição gradual a pH 4,5, ao longo de um maior período de tempo, de 12h, diminuiu o crescimento da raiz em relação a exposição direta ou uma exposição gradual mais rápida, realizada ao longo de apenas 4h (Figura 8). A pH 4,0, a exposição gradual não teve efeito, pois tanto como na exposição direta, o crescimento radicular foi fortemente inibido.

No entanto, sabe-se que o baixo pH também afeta a viabilidade das células do ápice radicular, podendo inclusive ser determinante na redução ou parada do

crescimento das raízes (KOYAMA; TODA; HARA, 2001). Assim, foi importante determinar se o ápice radicular se mantinha viável ou não, mesmo diante da redução no crescimento em decorrência da exposição gradual ao baixo pH. Em pH 4,5 a exposição direta ou gradual não afetou a viabilidade da raiz, indicado pela fluorescência de FDA e PI (diacetato da fluoresceína e iodeto de propídeo), coloração de azul de Evans e quantificação da absorção de azul de Evans (Figuras 9, 10 e 11), pois foram semelhantes a apresentada em condição controle (pH 5,8).

Já em pH 4,0, a exposição direta diminuiu a viabilidade das células do ápice, com predomínio de células mortas, conforme indicado pela maior fluorescência de iodeto de propídeo e absorção de azul de Evans. Entretanto, a exposição gradual a pH 4,0 resultou na manutenção da viabilidade da maior parte das células do ápice, conforme indicado pela menor absorção do azul de Evans e prevalência da fluorescência da fluoresceína (Figuras 9, 10 e 11).

Para examinar melhor as consequências dos aparentes danos causados pelo baixo pH no ápice radicular, especialmente nas células meristemáticas, foi avaliado o recrescimento radicular, a pH 5,8, após os tratamentos a pH baixo em plantas aos 13 dias de desenvolvimento (MOTODA et al., 2010; MATSUMOTO; MOTODA, 2012). Todas as raízes tratadas em baixo pH retomaram o crescimento após o estresse, com exceção daquelas expostas diretamente a pH 4,0 (Figura 12). Em contraste, nas raízes expostas gradualmente a pH 4,0, houve o recrescimento das mesmas. Isto confirma os indícios de danos causados por H^+ às células do ápice radicular (KOYAMA; TODA; HARA, 2001) e demonstra que as raízes conseguiram se aclimatar na exposição gradual, mantendo-se viáveis, uma vez que retomaram o crescimento. A pH 4,5, o crescimento foi reduzido na exposição gradual e a viabilidade das células praticamente não foi afetada (Figuras 7 e 10). Estas raízes apresentaram recrescimento após o tratamento a pH baixo semelhante a raízes de tratamento controle e raízes expostas diretamente a pH 4,5.

Assim, não houve aumento do crescimento radicular na exposição gradual ao baixo pH, mas houve uma melhoria na viabilidade celular do ápice. No seu conjunto, os dados indicam que a redução do crescimento pode ter sido controlada pela própria planta como parte de um sistema de defesa e/ou resistência durante o estresse. Yan et al. (1998) aumentaram a acidez da solução gradualmente até atingir pH 3,5 em plantas de milho e encontraram uma resposta positiva para a melhoria no

crescimento que foi associada à capacidade das células liberarem H^+ do citoplasma e portanto reduzir a toxicidade, mas o período de observação foi de 33 dias.

Dentre os trabalhos que separam os efeitos do baixo pH daqueles do alumínio, há evidências com respeito aos processos celulares afetados, mas poucas informações para compreensão das causas da toxicidade e menos ainda sobre os mecanismos de resposta. Em *Vicia faba*, o baixo pH do solo foi correlacionado com a diminuição do crescimento, indicado pelo acúmulo de matéria seca. Além disto, em solução hidropônica a pH 4,0, a extrusão de H^+ foi inibida tendo como resultado a acidificação do citoplasma (SCHUBERT; SCHUBERT; MENGEL, 1990). Em *Vicia faba* e *Zea mays* houve redução do crescimento radicular em baixo pH associada a uma inibição da atividade de H^+ -ATPase, sendo o ultimo revertido com a aplicação de Ca^{2+} (YAN; SCHUBERT; MENGEL, 1992). Koyama, Toda e Hara (2001) constataram que a exposição direta a pH 4,5 provocou morte celular nas raízes em crescimento e os efeitos danosos foram revertidos pela aplicação de Ca^{2+} . Também apresentaram evidências e sugeriram que o alvo principal da toxicidade de prótons, responsável pela inibição do crescimento radicular, seria a pectina da parede.

A questão central é que os trabalhos a respeito da toxicidade por baixo pH assumem que a inibição do crescimento radicular é consequência direta da sua ação sobre alvos na raiz. Neste trabalho, encontramos evidências claras de que a inibição do crescimento pode ser uma resposta gerada pela própria planta frente a este fator, não sendo necessariamente decorrente da ação direta do pH. A importância disto é que constitui uma mudança de paradigma nesta área, com fortes implicações sobre o entendimento da toxicidade por pH baixo.

Embora não coletamos evidências sobre modificações na parede celular na exposição ao baixo pH, nossa hipótese é de que as alterações celulares responsáveis pela manutenção da viabilidade das células sejam relacionados à parede celular. Isto é em função de trabalhos da literatura como o de Koyama, Toda e Hara (2001), assim como pelos dos dados obtidos com o tratamento hiposmótico, que sugerem que alterações na parede celular possam resultar em maior tolerância a baixo pH.

7.2 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) e sua possível relação com modificações na parede celular na exposição direta e gradual ao baixo pH

Peroxidases do tipo III (EC 1.11.1.7) são secretadas para o apoplasto onde desempenham papéis variados na parede celular que são importantes para o desenvolvimento vegetal desde a germinação até a senescência. Estas enzimas são multifuncionais, promovendo diversas modificações na parede, podendo torná-la mais rígida ou mais flexível (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; PASSARDI et al., 2005). As peroxidases em geral podem estar envolvidas em respostas de plantas a patógenos (DEMPSEY; KLESSIG, 1994) e as ligadas à parede atuam na remodelagem durante este processo, promovendo o enrijecimento da estrutura (WOJTASZEK, 1997; PASSARDI et al., 2005). Em parte pelo desconhecimento de suas características e funções, esta classe de enzimas recebeu no passado diversos nomes, sendo talvez o nome mais comum a de guaiacol peroxidase. Por motivos de simplicidade, esta denominação foi usada neste trabalho como sinônimo de peroxidases classe III. Por desempenharem papéis por vezes antagônicos, a interpretação de resultados de atividade desta classe de peroxidases pode ser bastante complexa.

A parede celular, especialmente em tecidos em divisão e expansão possui descontinuidades ao longo da sua estrutura em decorrência do processo de formação e incorporação de material novo (KEEGSTRA, 2010). Tanto o H^+ quanto o Al^{3+} podem interagir com a parede nestas regiões que estão sendo modificadas, sendo uma das possíveis causas da toxicidade (VITORELLO; STEFANUTO; CAPALDI, 2005). Devido à função central que as peroxidases desempenham nas modificações da parede celular, faz-se importante verificar durante a exposição ao baixo pH se a atividade da enzima é alterada, o que poderá indicar o envolvimento destas na resposta a este estresse. Para isto foi medida a atividade total de guaiacol peroxidase (GPX) (AMAKO; CHEN; ASADA, 1994).

Foi possível observar que a atividade de GPX aumentou acentuadamente nas raízes tratadas a baixo pH (4,5 e 4,0), independente do regime de exposição, quando comparado ao controle a pH 5,8 (Figura 13). O incremento ocorreu principalmente nas primeiras 12 h de tratamento, sendo que nas 12 h seguintes a atividade diminuiu em todos os tratamentos, com exceção de raízes expostas diretamente a pH 4,5 (Figura 13).

O aumento da atividade da peroxidase mediante o estresse por baixo pH não é inesperado. Embora não sejam numerosos, alguns trabalhos já mostraram que a peroxidase aumenta a atividade com injúrias às raízes (MINIBAYEVA et al., 2009), à exposição ao Al (CAKMAK; HORST, 1991; EZAKI; TSUGUA; MATSUMOTO, 1996; MATSUMOTO; MOTODA, 2012) e a pH baixo (SONG et al., 2010). Ainda não se sabe qual o papel do aumento desta atividade de peroxidases nestes estresses.

Em raízes de *Lemna minor*, houve um aumento da atividade de guaiacol peroxidase durante as primeiras 15 h de exposição ao alumínio, indicado como uma possível resposta de modificação da parede celular (SEVERI, 1997). Simonovicová et al., (2004) encontraram em raízes de *Hordeum vulgare* um aumento na atividade de GPX em função de estresse por Co, Cu e Cd, assim como na superimposição de estresses por alumínio e pH 4,0. Embora as interpretações sejam limitadas a indicar modificações na atividade durante o estresse, elas estão de acordo com algum tipo de envolvimento de GPX no estresse gerado por exposição direta ou gradual ao baixo pH.

Na exposição direta a pH 4,0, apesar da atividade de GPX ser semelhante à das raízes em pH 4,5, as células do ápice radicular perderam a viabilidade e as raízes não retomaram o crescimento após o estresse (Figura 12). A atividade de H^+ é mais pronunciada em pH 4,0 ($100 \mu M H^+$) do que em 4,5 ($32 \mu M H^+$) em função da quantidade de prótons. Se atividade de peroxidases possuem envolvimento na manutenção da viabilidade no ápice a mesma pode não ter sido suficiente no estresse direto para reversão dos possíveis efeitos de baixo pH na parede celular. Na exposição gradual ao pH 4,0 a viabilidade celular foi mantida, além disto no percurso do abaixamento de pH as 6 h de experimento as mesmas foram colocadas em pH 4,5 permanecendo neste por mais 2 h (Figura 5). No pH 4,5 as 12 ou 24 h houve a maior atividade de GPX deste experimento. Embora não foram coletados dados da atividade em tempo menor que 12 h, há a possibilidade de que durante o abaixamento, na faixa de pH próximo a 4,5 houve uma maior atividade de GPX que assegurou a viabilidade das raízes e a medida que o pH se aproximou de 4,0 esta decaiu, sendo semelhante a da exposição direta a pH 4,0.

Pelo fato da exposição gradual expor em etapas as raízes ao baixo pH, poderia se esperar uma atividade enzimática mais intensa que na exposição direta, mas, com os dados que foram coletados apenas pode-se observar que em ambas situações a atividade enzimática foi aumentada e no caso da exposição gradual há a

possibilidade de estar associada as respostas da manutenção da viabilidade celular da raiz em pH 4,0. Após as 12 h de experimento a atividade de GPX decresce em todos tratamentos, com excessão em raízes expostas diretamente ao pH 4,5.

Não se encontrou nenhuma relação clara entre a indução de GPX (Figura 13) e o crescimento radicular (Figura 8) ou a manutenção da viabilidade celular (Figura 9) nos diferentes tratamentos de exposição a pH baixo. No entanto, o incremento na atividade de GPX após 12h (Figura 13) parece ser resultante do efeito combinado do grau do estresse aplicado e a viabilidade celular, ou seja, a capacidade da célula em responder ao estresse aplicado. Assim, é razoável supor que a tendência de um menor incremento da GPX nas raízes expostas diretamente a pH 4,0 do que a pH 4,5 pode ser devido ao estresse ter sido muito acentuado neste primeiro, causando injúrias que limitassem a capacidade das células a responderem. Nas raízes expostas gradualmente a pH baixo, onde a viabilidade celular provavelmente não comprometeu a capacidade de resposta das células, o incremento em GPX, após 12 h, parece ter acompanhado a severidade do estresse imposto, sendo menor justamente no regime de exposição que seria supostamente a mais branda, ou seja, de pH 5,0 a 4,5, ao longo de 12h (Figura 13).

Assim, por um lado, é possível que a GPX não desempenhe papel nas alterações que ocorreram na raiz durante a exposição gradual a baixo pH e que seja principalmente uma resposta ao grau de estresse e injúria. A diminuição da atividade da GPX após 24h nas raízes expostas gradualmente a baixo pH seria decorrente então da diminuição do grau de estresse e injúria resultante da ação de algum outro mecanismo celular. Alternativamente, o incremento da atividade da GPX nas primeiras 12 h da exposição gradual teriam sido suficientes para gerar as modificações necessárias nas raízes para que estas ficassem menos sensível ao pH baixo. Deve-se lembrar que o ensaio de atividade de GPX que foi realizado reflete a atividade total de diferentes peroxidases, tornando a interpretação dos resultados bastante complexa.

Em resumo, está claro que há um envolvimento de GPX no estresse gerado por exposição direta ou gradual ao baixo pH. Entretanto não se pode concluir se este é apenas uma consequência de injúrias ou se este tem algum papel nas modificações que ocorrem no abaixamento gradual que resultem em manutenção da viabilidade do ápice radicular.

7.3 O tratamento hipo-osmótico induz efeitos que melhoram o crescimento e a viabilidade celular da raiz sob baixo pH

O tratamento hipo-osmótico consistiu em transferir raízes de uma solução com alta osmolaridade (150 mM) para uma com baixa osmolaridade (0,5 mM), ou seja, de um menor para um maior potencial hídrico. Esta mudança de potencial hídrico deveria promover a entrada de água nas células e um aumento na pressão de turgor. Em resposta as células podem modificar e enrijecer suas paredes para suportar a pressão.

Neste trabalho o tratamento hipo-osmótico foi usado como uma ferramenta para indução de modificações na parede celular a qual propomos levar a alterações na tolerância ao estresse por baixo pH e alumínio.

Experimentos com células de tabaco cv. BY-2 já demonstraram que um tratamento hipo-osmótico aplicado previamente ao estresse por baixo pH (4,2) melhorou a viabilidade celular durante o estresse (BORGGO, 2010).

Trabalhos anteriores demonstraram que o tratamento hipo-osmótico pode gerar uma explosão oxidativa, induzindo a produção de ROS e a atividade de peroxidases (YAHRAUS et al., 1995; CAZALÉ et al., 1998; ROUET et al., 2006). Supostamente, esta explosão oxidativa levaria a um enrijecimento ou fortalecimento da parede celular, mas até o momento, nenhuma consequência final foi claramente demonstrada. Rouet et al. (2006) sugeriram um enrijecimento da parede baseado em uma menor solubilidade de proteínas da parede após o tratamento hipo-osmótico, indicando um aumento de ligações entre as cadeias polipeptídicas.

Conformme relatado, o abaixamento gradual de pH promoveu um aumento na viabilidade das raízes (Figuras 9 e 10), e está claro que há um envolvimento de GPX no estresse gerado, mas não a função ou papel desta enzima neste processo (Figura 13). Estas enzimas podem enrijecer e afrouxar esta estrutura (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004) o que postulamos ter relação com estresse por H^+ e Al^{3+} . A aplicação de tratamento hipo-osmótico em raízes, com o propósito de verificar o crescimento e viabilidade celular de raízes na exposição subsequente a baixo pH e alumínio, pode ajudar a esclarecer o papel de GPX na resposta a estes estresses.

Raízes em pH 5,8 que foram mantidas em alta osmolaridade (150 mM) ou que passaram por tratamento hipo-osmótico tiveram crescimento reduzido em relação ao controle (Figura 14). Pritchard, Jones e Tomos (1991) aumentaram a osmolaridade da solução (de 200 a 400 mM) e observaram uma redução no

crescimento radicular de trigo comparado ao controle sem adição de manitol. O potencial hídrico de células em crescimento em raízes é próximo de - 0,6 MPa (MUNNS, 2002). Neste trabalho, na solução com alta osmolaridade (150 mM) o potencial hídrico foi de - 0,37 MPa e na solução com baixa osmolaridade foi - 0,001 MPa. Sendo assim, o potencial hídrico da solução com alta osmolaridade foi menor do que na solução com baixa osmolaridade, o que por sua vez deve ter diminuído a pressão de turgor nas células. Logo, isto pode ter sido uma das causas para a redução no crescimento a pH 5,8 em alta osmolaridade contínua (150 mM) ou no tratamento hipo-osmótico, (Figura 14), uma vez que a pressão de turgor é essencial para expansão celular na promoção do crescimento (BOYER, 2009).

As raízes que foram mantidas em alta osmolaridade (150 mM) durante a exposição a pH 4,0, assim como aquelas em que o tratamento hipo-osmótico foi simultâneo com o de baixo pH (*priming* 0h), apresentaram redução do crescimento e perda de viabilidade celular no ápice semelhante ao ocorrido no controle (Figuras 14 e 15 B, D, F). Independente da duração, a passagem das raízes pelo *priming* de 0,5, 1 ou 2 h melhorou o crescimento radicular comparado ao controle em pH 4,0 (Figura 14). Além disto houve um ganho de viabilidade celular, sendo que no *priming* de 1 h predominou a fluorescência da fluoresceína (Indicativo de viabilidade celular) e menor absorção de azul de Evans (Figuras 15 H, J, L e 16). Borgo (2010) encontrou um aumento na viabilidade de células de tabaco (BY-2) expostas a pH 4,2 quando as mesmas passaram por tratamento hipo-osmótico, entretanto o sistema experimental com cultura de células é limitado para avaliações de crescimento. Pelos resultados apresentados foi possível evidenciar que o *priming* além de melhorar a viabilidade celular permitiu o crescimento radicular durante o estresse por baixo pH.

7.4 Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) e sua possível relação com crescimento e viabilidade celular em baixo pH após o tratamento hipo-osmótico

Os resultados evidenciaram que o tratamento hipo-osmótico prévio (*priming*) promoveu uma melhoria na viabilidade celular e crescimento das raízes expostas a pH 4,0. Para tentar correlacionar estes dados com a atividade de GPX na parede celular a atividade da mesma foi mensurada antes e após o *priming* e ao final dos tratamentos em baixo pH.

Quando as raízes foram colocadas em solução com alta osmolaridade (150 mM) por 10 ou 12 h a atividade de GPX aumentou cerca de duas vezes mais em relação ao controle, mantido em solução de baixa osmolaridade (0,5 mM). O *priming* por 0,5 ou 1 h a pH 5,8, causou uma queda na atividade a níveis semelhante ao do controle, mas aumentou com a duração do *priming*. Após passar por 2 h em *priming* a atividade de GPX retornou aos níveis apresentados das raízes que permaneceram por 12 h em solução com alta osmolaridade (Figura 17).

A literatura indica que o tratamento hipo-osmótico pode gerar uma explosão oxidativa. Assim, Yahraus et al. (1995) diluíram a solução de cultivo de células de soja para aumentar a pressão de turgor e causar um estresse mecânico na parede celular. Os resultados evidenciaram uma explosão oxidativa indicado pelo aumento na produção de H_2O_2 . Rouet et al. (2006) correlacionaram um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com a atividade de peroxidases após tratamento hipo-osmótico em células de tabaco. Pelos dados da literatura, era de se esperar um considerável aumento da atividade de GPX imediatamente após a passagem das raízes pelo *priming*. Entretanto, ela decaiu em relação à apresentada após 12 h em solução com alta osmolaridade (Figura 17).

Neste trabalho, a atividade de GPX mensurada foi a total, sem discernir isoformas. Kukavica et al. (2012) relacionaram um possível afrouxamento na parede celular e crescimento radicular de aveia a algumas isoformas de peroxidases e uma parada no crescimento associado às outras isoformas. Em ambas as situações as enzimas foram capazes de oxidar guaiacol. Nos resultados apresentados neste trabalho, é possível que em raízes sob alta osmolaridade houvesse o predomínio da atividade de peroxidases capazes de afrouxar a parede, para permitir o crescimento em baixa pressão de turgor e, ao passarem pelo tratamento hipo-osmótico, a atividade das mesmas decaíram. Com o aumento da duração do *priming* para duas horas, e uma tendência da pressão de turgor voltar a diminuir após o tratamento hipo-osmótico, a atividade de GPX aumentou novamente, mas a interpretação disto ainda não está clara (Figura 17).

Depois das raízes passarem pelo tratamento hipo-osmótico ou respectivos controles, as raízes foram expostas a pH 5,8 ou 4,0 por 12 h. A medida da atividade de GPX no final destes tratamentos evidenciou que, a pH 5,8, esta foi semelhante nos diferentes tratamentos, com exceção em raízes mantidas em alta osmolaridade, 150 mM, que apresentaram a maior atividade (Figura 18). Esta maior

atividade reforça os dados anteriores de que a solução com alta osmolaridade induziu ao aumento da atividade de GPX.

A atividade de GPX em raízes ao final da exposição a pH 4,0 (12 h), mostrou novamente que, independente dos tratamentos osmóticos prévios, o baixo pH induziu um aumento na atividade desta enzima (Figura 18), à semelhança do que ocorreu nas raízes submetidas a exposição direta ou gradual a baixo pH (Figura 13). Houve, no entanto, um efeito do tratamento osmótico na intensidade desta indução. A atividade de GPX foi semelhante nas raízes controle (sem tratamento osmótico), nas mantidas continuamente em 150 mM e no *priming* (0h). No entanto, observou-se um aumento crescente, e aproximadamente linear, na atividade de GPX com o aumento da duração do *priming* hipo-osmótico, de 0 até 2 h (Figura 18). A interpretação desta indução ainda não está clara, mas não parece ser uma simples resposta a injúria, pois nestas raízes o crescimento e viabilidade celular foram superiores. Parece que o *priming* hipo-osmótico tenha pré-disposto as raízes a responderem com uma maior indução de GPX quando expostas a pH baixo.

Como foi o *priming* hipo-osmótico que determinou a melhoria do crescimento e viabilidade celular de raízes submetidas a pH baixo, buscou-se saber se a GPX era necessária durante o *priming* para gerar estas respostas. Isto foi testado pela inibição da mesma no tratamento onde houve a melhor resposta de crescimento e viabilidade celular em pH 4,0, o *priming* de 1 h. A aplicação de 0,5 mM de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) reduziu o crescimento radicular para metade do obtido no *priming* sem sua aplicação em pH 5,8 e paralisou totalmente o crescimento em pH 4,0 (Figura 19). Tendo em vista que a atividade de peroxidases é importante para o crescimento radicular (DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007) há indícios, mas não provas de que estas se correlacionam com o crescimento apresentado em pH 4,0. Entretanto, as prováveis mudanças que ocorreram na parede durante o *priming* e na exposição a pH 4,0 parecem ser importantes pois a inibição da atividade de GPX em cerca de 60 % no *priming* (Figura 22 *priming* com SHAM e reação sem SHAM) foi suficiente para a perda de viabilidade celular em raízes expostas a pH 4,0, indicado pela fluorescência de iodeto de propídeo e maior absorção de azul de Evans (Figuras 20 e 21).

Em situações de danos mecânicos à parede celular ou sob ataque de patógenos pode ocorrer uma explosão oxidativa que aumenta a produção de ROS. Por sua vez estes participarão do processo de defesa e também poderão atuar no

enrijecimento da parede celular (YAHRAUS et al., 1995; GLAZEBROOK, 2005). Os fitormônios ácido salicílico e ácido jasmônico são conhecidos por atuarem na sinalização em respostas a patógenos, biotróficos e necrotróficos, respectivamente (KLIEBENSTEIN; ROWE, 2008). Durante o estresse por patógenos, há respostas específicas geradas pelo ácido salicílico ou por ácido jasmônico, mas em alguns casos pode haver interações destas. Além disto, são crescentes as evidências da participação do ácido jasmônico nas modificações da parede celular (GUTJAHR; PASZKOWSKI, 2009)

O baixo pH e alumínio podem afetar a estrutura da parede celular. A atividade de peroxidase respondeu ao estresse aplicado, possivelmente atuando na remodelagem de parede celular. Pelos dados da literatura há carência de estudos com enfoque na resposta hormonal ao estresse por H^+ e Al. O uso de plantas transgênicas (níveis reduzidos do hormônio), mutantes hormonais ou a aplicação exógena dos mesmos no tratamento hipo-osmótico poderão ser úteis em estudos futuros para avaliar um possível envolvimento dos hormônios na resposta de sinalização.

7.5 Tratamento hipo-osmótico e exposição das raízes ao alumínio: um comportamento diferente da toxicidade revertida em pH 4,0

Pelos resultados do experimento com tratamento hipo-osmótico seguido da exposição ao pH 4,0 foi possível evidenciar uma melhoria da viabilidade e do crescimento quando as raízes estas passaram por *priming*. Naturalmente, foi interrogado se respostas semelhantes poderiam ser observadas ao tratar raízes com alumínio nestas condições.

O tratamento das raízes com *priming* tendeu a reduzir o crescimento a pH 4,5, o qual foi mais pronunciado no *priming* de 1 h (Figura 24), com comportamento contrário ao encontrado para pH 4,0 (Figura 14). Não se encontrou um efeito claro do *priming* sobre o crescimento radicular na exposição subsequente a Al (Figura 24). Em ambos os casos, a viabilidade parece não ter sido comprometida, uma vez que foram semelhante ao pH 4,5 do controle (Figura 25). Baseados nos experimentos de exposição direta e gradual, o pH 4,5 não provocou danos significativos no ápice radicular (Figuras 9, 10 e 11).

Alguns trabalhos têm chamado atenção para se estudar separadamente os efeitos e respostas ao baixo pH e alumínio (SAMAC; TESFAYE, 2003; VITORELLO;

CAPALDI; STEFANUTO, 2005; BOSE et al., 2010). De acordo com os resultados do tratamento hipo-osmótico na exposição ao pH 4,5 e 4,5 mais Al há indícios de que estes atuem de modo diferente sobre a raiz. O problema do alumínio para culturas é principalmente devido à inibição do crescimento radicular (LAZOF; HOLLAND 1999). No experimento de tratamento hipo-osmótico com exposição subsequente ao alumínio era esperada uma melhoria do crescimento, e se em plantas controle expostas ao alumínio houvesse uma perda significativa de viabilidade celular que esta fosse revertida. O *priming* não reverteu os efeitos de inibição do crescimento radicular causado pelo alumínio e a viabilidade celular demonstrou não ter sido afetada significativamente pelo alumínio.

As possíveis modificações de enrijecimento na parede celular que foram postuladas, somada a atividade de peroxidases pode ter feito com que as raízes se comportassem diferente frente ao alumínio comparado ao que foi observado em pH 4,0 após tratamento hipo-osmótico. No caso do alumínio há algumas evidências sugerindo que diferenças na composição e arranjo dos polissacarídeos de parede celular possuem relação com a resistência ao estresse (YANG, 2008), indicando que a modelagem de parede pode estar envolvida com o processo. A possível modificação via atividade de GPX e o estímulo mecânico na parede celular durante o *priming* foram semelhantes, mas a exposição a pH 4,5 e 4,5 mais 5,0 μM de alumínio o diferencial. Portanto é possível que H^+ e Al^{3+} atuem em vias diferentes sobre a raiz.

8 CONCLUSÕES

Neste estudo, constatou-se que o baixo pH pode inibir o crescimento radicular de modo acentuado, chegando inclusive a suprimi-lo, podendo ser um fator de estresse tão prejudicial quanto a toxicidade por Al.

A exposição gradual ao pH, de 5,0 a 4,0, resultou em menor crescimento radicular, mais aliviou o estresse quando comparado à exposição direta a pH 4,0, pois a viabilidade das células foram mantidas. Além disto, evidenciou-se que a inibição do crescimento radicular pela exposição a baixo pH pode ser uma resposta gerada pela própria planta, não sendo necessariamente decorrente da ação direta do pH. Isto gera uma nova visão e paradigma sobre o estresse por H⁺, com implicações sobre o entendimento dos mecanismos de sua toxicidade.

Tendo em vista que alguns trabalhos já relacionam a parada no crescimento durante o estresse com um possível enrijecimento de parede celular, é provável que na exposição gradual ao baixo pH, as respostas de viabilidade foram em função de modificações na parede celular.

Demonstrou-se que o *priming* hipo-osmótico melhorou a viabilidade celular e permitiu o crescimento radicular durante o estresse subsequente a pH 4,0. Esta resposta está provavelmente relacionada com modificações na parede celular, já que é esperado que o principal efeito do tratamento hipo-osmótico seja exercido sobre a parede.

Embora postulamos que a atividade de peroxidases possam estar envolvidas nas respostas ao tratamento hipo-osmótico e nas possíveis mudanças na parede, não foram coletadas provas diretas deste último. A atividade de GPX está envolvida nas respostas encontradas tanto na exposição gradual a baixo pH como no tratamento hipo-osmótico anterior ao baixo pH, mas não se sabe se é consequência ou uma das possíveis causas destas respostas. Assim, as respostas de viabilidade celular e crescimento durante o estresse podem ser associados a mudanças em algum grau na parede celular, mas desconhecidas até o momento.

Em estudos futuros a separação das isoformas das enzimas ligadas a parede celular assim como o uso de mutantes hormonais (ácido salicílico e ácido jasmônico) poderá trazer indícios sobre o tipo de modificação ocorridas e o envolvimento de hormônios na resposta ao estresse.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M.D.; MAGELHAES, P.J.; RAM, S.J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Danville, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- AMAKO, K.; CHEN, G.; ASADA, K. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 497-504, 1994.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2009. 438 p.
- ARNON, D.I.; JOHNSON, C.M. Influence of hydrogen ion concentration on the growth of higher plants under controlled conditions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 17, n. 4, p. 525-539, 1942.
- BABOURINA, O.; OZTURK, .; CAKMAK, I.; RENGEL, Z. Reactive oxygen species production in wheath roots is not linked with changes in H⁺ fluxes during acidic and aluminium stresses. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 1, n. 2, p. 71-76, 2006.
- BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D.; BARLOW, P.W. Root apex transition zone: a signaling-response nexus in the root. **Trends in Plant Science**, London, v. 15, n. 7, p. 402-408, 2010.
- BOISSON-DERNIER, A.; KESSIER, S.A.; GROSSNIKLAUS, U. The walls have ears: the role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 5, p. 1581-1591, 2011.
- BORG, L. **Caracterização e possível papel da modulação oxidativa de parede celular em alterações na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 a baixo pH durante a retomada do ciclo celular**. 2010. 85 p. Tese (Biologia na Agricultura e Meio Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BOSE, J.; BABOURINA, O.; SHABALA, S.; RENGEL, Z. Aluminum-dependent dynamics of ion transport in Arabidopsis: specificity of low pH and aluminum responses. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 1, n. 139, p. 401-412, 2010.
- BOYER, J.S.; Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 36, n. 5, p. 383-394, 2009.
- BRUCE, T.J.A.; MATTHES, M.C.; NAPIER, J.A.; PICKETT, J.A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, Clare. v. 173, n. 6, p. 603-608, 2007.
- CAI, M.Z.; WANG, F.M.; LI, R.F.; ZHANG, S.N.; WANG, N.; XU, G.D. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. **Journal of inorganic Biochemistry**, Philadelphia, v. 1, n. 105, p. 966-971, 2011.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, København, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, n. 3, p. 267-270, 2010.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary-cell walls in flowering plants - consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CAZALÉ, A.C.; ROUET-MAYER, M.A.; BARBIER-BRYGOO, H.; MATHIEU, Y.; LAURIERE, C. Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 659-669, 1998.

CIAMPOVORÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 161-171, 2002.

DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. **Trends in Cell Biology**, London, v. 4, n. 9, p. 334-338, 1994.

DOLAN, L.; DAVIES, J. Cell expansion in roots. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 33-39, 2004.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytologist**, Oxford, v. 174, n. 2, p. 332-341, 2007.

EZAKI, B.; TSUGUA, S.; MATSUMOTO, H. Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. **Physiologia Plantarum**, København, v. 96, n. 1, p. 21-28, 1996.

FAWZY, H.; OVERSTREET, R.; JACOBSON, L. The influence of hydrogen concentration on cation absorption by barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 29, n. 3, p. 234-237, 1954.

GAPPER, C.; DOLAN, L. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 341-345, 2006.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 205-227, 2005.

GUNSE, B.; GARZÓN, T.; BARCELÓ, J. Study of aluminum toxicity by means of vital staining profiles in four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 12, p. 1447-1450, 2003.

GUTJAHR, C.; PASZKOWSKI, U. Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotrophs interactions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 5, p. 763-772, 2009.

HAMANN, T.; BENNETT, M.; MANSFIELD, J.; SOMERVILLE, C. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. **Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1015-1026, 2009.

HOEKENGA, O.A.; VISION, T.J.; SHAFF, J.E.; MONFORTE, A.J.; LEE, G.P.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x Columbia) by quantitative trait locus mapping: a physiological simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 936-948, 2003.

HORST, W.J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 185-197, 2010.

JONES, D.L.; BLANCAFLOR, E.B.; KOCHIAN, L.V.; GILROY, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 29, n. 7, p. 1309-1318, 2006.

KEEGSTRA, K. Plant cell walls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, n. 2, p. 483-496, 2010.

KINRAIDE, T.B. Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media: a case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 88, n. 4, p. 619-625, 1993.

KLIEBENSTEIN, D.J.; ROWE, H.C. Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 174, n. 6, p. 551-556, 2008.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1, p. 175-195, 2005.

KOYAMA, H.; TODA, T.; HARA, T. Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 361-368, 2001.

KUKAVICA, B.M.; SONJA, D.V.; MENCKHOFF, L.; LUTHJE, S. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 12, p. 1-15, 2012.

KUMARI, M.; TAYLOE, G.J.; DEYHOLOS, M.K. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 279, n. 4, p. 339-357, 2008.

LAGER, I.; ANDRÉASSON, O.; DUNBAR, T.L.; ANDREASSON, E.; ESCOBAR, M.A.; RASMUSSEN, A.G. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 33, n. 9, p. 1513-1528, 2010.

LAZOF, D.B.; HOLLAND, M.J. Evaluation of the aluminium-induced root growth inhibition in isolation from low pH effects in *Glycine max*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 26, n. 2, p. 147-157, 1999.

LEVIN, D.E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, n. 2, p. 262-291, 2005.

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ and H_2O_2) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 2, p. 3114-3123, 2004.

MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 111, n. 1, p. 179-190, 1998.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v. 186, n. 185, p. 1-8, 2012.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, 1997.

MINIBAYEVA, F.; KOLESNIKOV, O.; CHASOV, A.; BECKETT, R.P.; LÜTHJE, S.; VYLEGZHANINA, N.; BUCK, F.; BÖTTGER, M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 32, n. 5, p. 497–508, 2009.

MONSHAUSEN G.B.; BIBIKOVA, T.N.; MESSERLI, M.A.; GILROY, S. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 52, p. 20996-21001, 2007.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 3, n. 48, p. 673-686, 2001.

MOTODA, H.; KANO, Y.; FUKUMI, H.; KENJI, K.; MATSUMOTO, H. Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 333, n. 1/2, p. 49-58, 2010.

MROCZEK-ZDYRSKA, M.; WÓJCIK, M. The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. minor plants. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 147, n. 1/3, p. 320-328, 2011.

MULLER, K.; LINKIES, A.; VREEBURG, R.; FRY, S.; KRIEGER-LISKAY, A.; LEUBNER-METZGER, G. In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 4, p. 1855-1865, 2009.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 25, n. 2, p. 239-250, 2002.

NEZAMES, C.D.; SJOGREN, C.A.; BARAJAS, J.F.; LARSEN, P.B. The Arabidopsis cell cycle checkpoint regulators TANMEI/ALT2 and ATR mediate the active process of aluminum-dependent root growth inhibition. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 2, p. 1-15, 2012.

PAN, J.; ZHU, M.; CHEN, H. Aluminum-induced cell death in root-tip cells of barley. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 71-79, 2001.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 11, p. 1-7, 2004.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Report**, Heidelberg, v. 24, n. 5, p. 255-265, 2005.

PAVLOVKIN, J.; OVE-BALANG, P.; KOLAROVIC, L.; ZELINOVÁ, V. Growth responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 166, n. 14, p. 1479-1487, 2009.

PERES, L.E.P. **Manual do modelo vegetal Micro-Tom**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/docentes/lazaropp/MMTCap5Invitro.pdf>> Acesso em: 20 jan. 2013.

PRITCHARD, J.; JONES, R.G.W.; TOMOS, A.D. Turgor, growth and rheological gradients of wheat roots following osmotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 1043-1049, 1991.

RENGEL, Z. **Handbook of plant growth: pH as the master variable**. New York: Marcel Dekker, 2002. 472 p.

RINGLI, C. Monitoring the outside: cell wall-sensing mechanisms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 4, p. 1445-1452, 2010.

ROSE, J.K.C.; LEE, S. Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, n. 2, p. 433-436, 2010.

ROUET, M.; MATHIEU, Y.; BARBIER-BRYGOO, H.; LAURIÈRE, C. Characterization of active oxygen-producing proteins in response to hypo-osmolarity in tobacco and Arabidopsis cell suspensions: identification of a cell wall peroxidase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1323-1332, 2006.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, Paris, v. 21, n. 1, p. 3-21, 2001.

SAMAC, D.A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 189-207, 2003.

SCHOPFER, P. Hydrogen peroxide-mediated cell-wall stiffening in vitro in maize coleoptiles. **Planta**, Heidelberg, v. 199, n. 1, p. 43-49, 1996.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating Radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 4, p. 1591-1602, 2001.

SCHUBERT, S.; SCHUBERT, E.; MENGEL, K. Effect of low pH of the root medium on proteon release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 124, n. 2, p. 239-244, 1990.

SCHULZE, E.; BECK, E.; MÜLLER-HOHESNSTEIN, K. **Plant ecology**. Heidelberg: Spektrum Akademischer, 2002. 702 p.

SEVERI, A. Aluminium toxicity in *Lemna minor* L.: effects of citrate and kinetin. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 53-61, 1997.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Peroxidases mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 44, n. 3, p. 267-275, 2004.

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 1, p. 155-163, 1998

SONG, H.; XU, X.; WANG, H.; WANG, H.; TAO, Y. Exogenous γ -aminobutyric acid alleviates oxidative damage caused by aluminium and proton stresses on barley seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 90, n. 9, p. 1410-1416, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. 719 p.

TRUERNIT, E.; HASELOFF, J. A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. **Plant Methods**, London, v. 4, n. 15, p. 1-8, 2008.

VERBELEN, J.; CNODDER, T.D.; LE, J.; VISSENBERG, K.; BALUSKA, F. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 1, n. 6, p. 296-304, 2006.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 129-143.

VON UEXKÜLL, H.R.; METERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 1-15, 1995.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 322, n. 3, p. 681-692, 1997.

YAHRAUS, T.; CHANDRA, S.; LEGENDRE, L.; LOW, P.S. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1259-1266, 1995.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 199-208, 2001.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, n. 1, p. 239-243, 2003.

YAN, F.; SCHUBERT, S.; MENGEL, K. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 415-421, 1992.

YAN, F.; FEUERLE, R.; SCHAFFER, S.; FORTMEIER, H.; SCHUBERT, S. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 1, p. 311-319, 1998.

YANG, J.L.; LI, Y.Y.; ZHANG, Y.J.; ZHANG, S.S.; WU, Y.R.; WU, P.; ZHENG, S.J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, n. 2, p. 602-611, 2008.

ZHOU, S.; SAUVÉ, R.; THANNHAUSER, T.W. Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1849-1857, 2009.

ZHU, Y.; DI, T.; XU, G.; CHEN, X.; ZENG, H.; YAN, F.; SHEN, Q. Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 32, n. 10, p. 1429-1440, 2009.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ATKINSON, N.J.; URWIN, P.E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to field. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 10, p. 3523-3544, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Apêndice A - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento na ausência ou presença de ácido salicilhidroxâmico (SHAM). Os tratamentos foram: pH 5,8 (-) SHAM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8; pH 5,8 (+) SHAM = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8 com 0,1 mM de SHAM. n = 10

APÊNDICE B

Apêndice B - Crescimento radicular de Micro-Tom com 2 dias de desenvolvimento na ausência ou presença de ácido salicílhdroxâmico (SHAM). Os tratamentos foram: Controle = plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8. *Priming* (1h) (- SHAM) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8. *Priming* (1h) (0,1 mM SHAM) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 com 0,1 mM de SHAM. *Priming* (1h) (0,5 mM SHAM) = plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 com 0,5 mM de SHAM. n = 10

APÊNDICE C

Apêndice C - A e B = Controle, plantas que após a germinação e 12 h em solução a 0,5 mM foram tratadas a pH 5,8 e 4,0; C e D = *Priming* (1h) (- SHAM), plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 respectivamente; E e F = *Priming* (1h) (0,1 SHAM), plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 com 0,1 mM de SHAM respectivamente; G e H = *Priming* (1h) (0,5 SHAM) plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 com 0,5 mM de SHAM respectivamente; I e J = *Priming* (1h) (3 mM SHAM) plantas que após 48 h de germinação 11 h em solução a 150 mM foram transferidas para solução a 0,5 mM (pH 5,8) durante 1 h e logo após tratadas em pH 5,8 e 4,0 com 3 mM de SHAM respectivamente. Cada imagem é representativa de pelo menos 8 observações