# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FLISSENA	CHINAGLIA	ZAROTTO	SARDINHA
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	\ .	<i></i>	17/11/11/11/11/A

Respostas de pêlos radiculares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) submetidos a estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade

Piracicaba

2010

### ELISSENA CHINAGLIA ZABOTTO SARDINHA

Respostas de pêlos radiculares de tomateiro (Solanum lycopersicum L. cv Micro	)-Tom)
submetidos a estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade	

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello

Piracicaba

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

### Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Sardinha, Elissena Chinaglia Zabotto

Respostas de pêlos radiculares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) submetidos a estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade / Elissena Chinaglia Zabotto Sardinha; orientador Victor Alexandre Vitorello. - - Piracicaba, 2010.

86 f.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Acidez do solo 2. Estimulantes do crescimento vegetal 3. Mecanismo de controle vegetal 4. Parede celular vegetal I. Título

CDU 576:634.675

# a toda minha familia principalmente meu esposo Roberto Sardinha Jr. e a meu "anjo" Eduardo Sardinha e aos meus queridos amigos.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais

volta ao seu tamanho original "

(EINSTEIN)

### **AGRADECIMENTOS**

A Deus, sempre presente.

A minha família, meus pais e irmãs pelo estímulo e encorajamento em todos os momentos.

Ao meu marido e amigo de todas as horas, alguém com quem eu posso contar Sardinha.

Ao meu filho Dudu, a alegria de todos os dias.

Aos amigos de sempre e os de hoje.

Ao Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello pela oportunidade, orientação e compreensão.

A amiga Lucélia Borgo, pela amizade, convivência e por toda a ajuda prestada.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela estrutura oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos e auxiliares do Lab. De Biologia Celular e Molecular Francisco Montrazi, Fábio Duarte e Wagner Piccinini por todo o auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica em Pesquisa Agropecuária-Esalq/USP (NAPMEPA) em especial aos Profs. Eliotti Kitajima e Franscisco Tanaka pela disponibilidade do uso do microscópio óptico.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

### **RESUMO**

SARDINHA, E. C. Z. Respostas de pêlos radiculares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) submetidos a estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade. 2010. 86 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

A acidez do solo é um dos principais fatores limitantes à produção vegetal. A toxicidade por alumínio, que ocorre apenas a pH baixo, tem sido extensamente investigada, enquanto o estresse causado pelo pH baixo tem recebido pouca atenção. Os estudos nesta área quase sempre presumem efeitos aditivos, e, portanto independentes, da toxicidade por Al<sup>3+</sup> e H<sup>+</sup>. Este provavelmente não é o caso, sendo que o pH baixo pode ser um fator de predisposição das células ao Al<sup>3+</sup>. As evidências indicam que o pH baixo causa desarranjos na parede de células em crescimento, gerando estresse que pode comprometer a sua funcionalidade e integridade. É provável que a susceptibilidade a este estresse deva ser dependente da pressão de turgor. Por sua vez, o metabolismo oxidativo e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na parede celular podem modular a sua extensibilidade por romper ou criar ligações dentro ou entre cadeias de polissacarídeo. Há grande interesse em conhecer se, assim como em leveduras, as células vegetais possuem um sistema de percepção e resposta a estresse da parede. Os pêlos radiculares em crescimento são sensíveis a pH baixo e estresse hipoosmótico e constituem um bom modelo experimental para estes estudos. Os objetivos deste trabalho foram: a) Otimizar um sistema experimental para o estudo de pêlos radiculares de tomateiro (Solanum lycopersicum L. cv Micro-Tom); b) Avaliar as respostas dos pêlos radiculares ao estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade; c) Examinar o papel da modulação oxidativa da parede celular nestas respostas; e d) Avaliar a resposta de diferentes mutantes hormonais de Micro-Tom a estes fatores de estresse. Os principais parâmetros avaliados foram a taxa de alongamento (µm.min<sup>-1</sup>) e a freqüência de rompimento dos pêlos. Tanto o estresse por pH baixo quanto choques hipo-osmóticos resultaram em taxas de alongamento significativamente diminuídos e o rompimento de pêlos radiculares, mas os efeitos dos tratamentos hipo-osmóticos foram mais marcantes. Uma curva de resposta frente à osmolaridade da solução externa revelou que a taxa de alongamento aumentou com a diminuição da osmolaridade até alcançar um limiar em que houve redução drástica da taxa de alongamento e começou-se a observar o rompimento de pêlos. Também se observou uma interação entre hipo-osmolaridade e pH baixo. O emprego do inibidor difenileno iodônio não forneceu evidências do envolvimento de NADPH oxidases da membrana plasmática na resposta de pêlos radiculares a choque hipo-osmótico ou pH baixo. Já no caso do inibidor ácido salicilhidroxâmico, encontrou-se evidências do envolvimento de peroxidases da parede. Nos mutantes hormonais dgt (pouco sensível a auxina) e epi (super produtor de etileno), mas não em not (deficiente em ácido abscísico), os pêlos radiculares apresentaram uma melhor resposta de ajustamento a choque hipo-osmótico do que Micro-Tom, reduzindo o alongamento e o rompimento dos pêlos. Este trabalho fornece boas evidências de que os pêlos radiculares possuem um mecanismo de percepção e resposta a estresse da parede visando à manutenção de sua integridade e que apresentam bom potencial como sistema modelo nesta linha de pesquisa.

Palavras-chave: Pêlos radiculares. pH baixo. Hipo-osmótico. Pressão de turgor. Modulação oxidativa. Parede celular. Mutantes hormonais. Tomateiro. Espécies reativas de oxigênio.

### **ABSTRACT**

SARDINHA, E. C. Z. Response of tomato (*Solanum lycopersicum L. cv Micro-Tom*) root hairs to low pH and hypo-osmotic stress. 2010. 86 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Soil acidity is a major factor limiting plant growth worldwide. Aluminum toxicity, which occurs only at low pH, has been extensively studied, whereas low pH stress has received much less attention. Studies on Al<sup>3+</sup> and H<sup>+</sup> toxicity make the underlying assumption that the effects of these stress factors are additive, and, therefore independent of each other. However, this is most likely not the case and low pH may be a factor which increases susceptibility to further injury by Al<sup>3+</sup>. There is evidence that low pH causes disruption in cell wall structure of growing cells, which might jeopardize cell wall functionality and integrity. It is likely that turgor pressure plays an important role in cell wall stress caused by low pH. The apoplastic metabolism of reactive oxygen species (ROS) can modulate cell wall extensibility by making or breaking bonds within and between cell wall polysaccharides. A major question is whether, similarly to yeast, plant cells have a cell wall integrity signaling and response system. Growing root hairs are sensitive to low pH and hypo-osmotic stress and are potentially good experimental systems for such investigations. The objectives of this study were: a) Optimize an experimental system to examine tomato (Solanum lycopersicum L. cv Micro-Tom) root hairs; b) Examine the response of root hairs to low pH and hypo-osmotic stress; c) Examine the role of oxidative modulation of the cell wall in these responses; and d) Evaluate the response of different hormonal mutants of Micro-Tom to these stress factors. Root hair elongation rates (µm.min<sup>-1</sup>) and the frequency of cell bursting were the major experimental parameters which were evaluated. Both low pH and, more markedly, hypo-osmotic stress caused significant reductions in elongation rates and the bursting of root hair tips. In a response curve to varying osmolarities of the external medium, root hair elongation rates increased with decreasing osmolarities until a threshold was reached and elongation rates decreased drastically and the bursting of root hairs began to be observed. Interactions between low pH and hypo-osmolarity were observed. The use of the inhibitor diphenylene iodonium (DPI) did not provide evidence for the involvement of plasma membrane NADPH in the response of root hairs to low pH and hypo-osmotic shock. However, a role for cell wall peroxidases was provided by use of the inhibitor salicylhydroxamic acid (SHAM). Root hairs of the hormonal mutants dgt (low sensitivity to auxin) and epi (ethylene super producer), but not *not* (deficient in abscisic acid), displayed a more effective response to hypo-osmotic shock than Micro-Tom, by decreasing elongation rates and cell bursting to a greater degree. This study provides good evidence to suggest that root hairs have a cell wall integrity response system and that root hairs are potentially good cell model systems for such research.

Key-words: Root hairs. Low pH. Hypo-osmolarity. Turgor pressure. Oxidative modulation. Cell wall. Hormonal mutants. Tomato. Reactive oxygen species.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA ácido abscísico

BR brassinosteróides

CV% coeficiente de variação

d.p. desvio padrão

dgt mutante diageotropica - pouco sensível à auxina

dms diferença mínima significativa

DPI difenileno iodônio (diphenylene iodonium)

dpy mutante dumpy - deficiente em brassinosteróides

e.p. erro padrão da média

epi mutante epinastic - super produtor de etileno

GA ácido giberélico MMin meio mínimo

MS meio de Murashige e Skoog (1962)

MT cultivar Micro-Tom de tomateiro

not mutante notabilis - deficiente em ácido abscísico

pro mutante procera - super sensível ao ácido giberélico

ROS espécies reativas de oxigênio

SHAM ácido salicilhidroxâmico (salicylhydroxamic acid)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISAO DA LITERATURA	15
2.1. Pêlo radicular como sistema modelo	15
2.2. Acidez e a parede celular	16
2.3. Sistema de resposta a estresse da parede celular	17
2.4. Modulação oxidativa da parede celular	18
2.5. Interações com hormônios	19
2.6. O cultivar Micro-Tom de tomateiro e seus mutantes hormonais	20
3. HIPÓTESES	22
4. OBJETIVOS	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1. Material vegetal	24
5.2. Desinfestação e germinação das sementes	24
5.3. Desenvolvimento do sistema experimental para estudo de pêlos radiculares	25
5.4. Transferência e aclimatação das plântulas nas câmaras de crescimento	27
5.5. Tratamentos e as respectivas soluções utilizadas	28
5.5.1. Aplicação e troca de soluções de tratamento	29
5.5.2. Tratamentos com soluções de diferentes valores de pH (4,5 e 5,8)	30
5.5.3. Tratamentos com variações na osmolaridade das soluções — tratamentos hipo- osmóticos	30
5.6. Medição do alongamento dos pêlos radiculares	31
5.7. Avaliação de pêlos radiculares rompidos	32
5.8. Avaliação da modulação oxidativa da parede celular	33
5.8.1. Aplicação exógena de ROS (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e ácido ascórbico	33
5.8.2. Aplicação exógena de inibidor de NADPH oxidase (DPI)	34
5.8.3. Aplicação exógena de inibidor de peroxidase de parede (SHAM)	34

5.9. Avaliação dos mutantes hormonais de MT	34
5.9.1 Tratamento hipotônico em mutantes super produtores de etileno (epi)	35
5.9.2 Tratamento hipotônico em mutantes	35
5.10. Estudo complementar do efeito de tampões para uso a pH baixo, sobre célula vivas	
5.11. Delineamento experimental	36
6. RESULTADOS	37
6.1. Avaliação do alongamento de pêlos radiculares e sua variabilidade no sistema experimental desenvolvido	
6.1.1. Análise da relação entre a taxa de alongamento e o comprimento inicial do pêlo	38
6.1.2. Análise da variabilidade da taxa de alongamento dos pêlos radiculares dentro e raízes	
6.1.3. Análise temporal da taxa de alongamento do pêlo radicular ao longo do período observação	
6.2. Resposta dos pêlos radiculares expostos diretamente a MMin em pH baixo	41
6.3. O fornecimento dos sais do meio MS afeta a taxa de alongamento dos pêlos pe mudanças de osmolaridade não de nutrientes	
6.4. Curva de resposta da taxa de alongamento do pêlo radicular em função da osmolaridade da solução de tratamento	45
6.5. Estabelecimento de uma solução de referência para o tratamento inicial dos por radiculares	
6.6. Choque hipo-osmótico associado a alterações de pH	49
6.7. Evidências de possível papel da modulação oxidativa da parede celular na res ao choque hipo-osmótico	
6.7.1 Choque hipo-osmótico a pH 5,8, na presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e ácido ascórbico	54
6.7.2. Choque hipo-osmótico a pH 5,8 e 4,5 na presença de inibidor (DPI) de NADPH oxidase	57
6.7.3. Choque hipo-osmótico na presença de inibidor de peroxidases (SHAM)	60
6.8. Caracterização de mutantes hormonais de MT quanto à formação e alongame pêlos radiculares	
6.9. Tratamento hipo-osmótico de pêlos de mutantes hormonais de MT	64

6.9.1. Exposição direta de pêlos do mutante super produtor de etileno (epi) a solução hi osmótica	-
6.9.2. Choque hipo-osmótico em mutantes selecionados	65
6.10. Efeito de diferentes tampões sobre o alongamento de pêlos	67
7. DISCUSSÃO	70
7.1. A resposta dos pêlos radiculares ao estresse da parede	70
7.2. Mecanismos de resposta do pêlo ao estresse da parede	72
7.2.1. Ajustamento de turgor celular	72
7.2.2. Enrijecimento da parede por meio da sua modulação oxidativa	73
7.3. A resposta de mutantes hormonais ao estresse da parede (hipo-osmótico)	75
7.4. A variabilidade nas taxas de alongamento à luz do modelo proposto e observaç relatadas na literatura	
8. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79

### 1. INTRODUÇÃO

Solos ácidos ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais recobrindo cerca de 40% da área agricultável do mundo (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005), essa característica é um dos principais fatores que limitam a produção agrícola nos trópicos. O Cerrado brasileiro ocupa 205 milhões de hectares do território nacional e, apesar de apresentar excelentes qualidades no que se refere à topografia, luminosidade, temperatura e estrutura física do solo, se caracteriza por possuir baixa fertilidade, pH baixo e elevada saturação de alumínio (CANÇADO et al., 2001).

A toxicidade pelo alumínio (Al) tem sido objeto de muitas pesquisas e revisões (HORST; WANG; ETICHA, 2010; KOCHIAN; HOEKENGA; PINEROS, 2004), mas ela só ocorre quando o Al está presente sob a forma solúvel que se dá em pH abaixo de 5,0 (PARENTONI et al., 2001), condição esta que sozinha pode também gerar toxicidade. No entanto, há poucos trabalhos sobre o efeito de pH baixo em si em plantas (KOYAMA; TODA; HARA, 2001).

Nos trabalhos que investigam a toxicidade pelo Al, os seus efeitos geralmente são comparados com tratamentos idênticos, também a pH baixo, mas na ausência de Al. Muitas vezes o efeito do Al é avaliado subtraindo valores de medições obtidos na ausência de Al de valores obtido na sua presença. Embora, na falta de melhores informações, este procedimento é correto, esta comparação presume efeitos aditivos e, portanto, totalmente independentes de pH e Al. No entanto, este pode não ser o caso (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). Assim, o pH baixo pode afetar a estrutura de diversos componentes da superfície da célula, alguns em si podendo causar efeitos deletérios, mas que também podem alterar drasticamente o acesso e a interação do Al com seus alvos. Assim, por exemplo, alguns trabalhos mostram correlação entre toxicidade por H<sup>+</sup> e por Al (OFEI-MANU et al., 2001) e entre a absorção de Al e a permeabilidade da membrana plasmática em meio ácido (SOUZA, 1999).

Entender como ocorrem e quais são os eventos celulares frente ao abaixamento de pH externo é importante, inclusive porque muitos processos bioquímicos ocorrem apenas a uma faixa relativamente estreita de pH. Uma questão importante é que as células apresentam sensibilidade diferenciada a pH baixo. Ou seja, há variações não genotípicas na sensibilidade celular a pH baixo. Alguns trabalhos mostram que, assim como ocorre com o Al (YAMAMOTO et al., 1994), a sensibilidade ao pH baixo depende da fase de crescimento e/ou

desenvolvimento das células (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; KOYAMA et al., 1995; VITORELLO; HAUG, 1996).

Os pêlos radiculares são bastante sensíveis a pH baixo. Bibikova et al. (1998) relataram que a pH < 4,5 o alongamento dos pêlos de *Arabidopsis thaliana* foi inibido e cerca de 25% dos pêlos em alongamento romperam-se na ponta enquanto aqueles que já haviam interrompido o alongamento antes do tratamento a pH baixo mantiveram-se intactos. No caso dos pêlos que sofreram ruptura em suas pontas (BIBIKOVA et al., 1998), os autores sugerem que o abaixamento do pH a valores menores que 4,5 poderia enfraquecer a estrutura da parede ou afetar seus processos de síntese e organização na extremidade do pêlo, a ponto do turgor celular causar a ruptura da célula. No caso dos pêlos em que o alongamento já havia sido interrompido, é possível que a parede destes seja insensível ao abaixamento de pH.

Outros trabalhos também sugerem um efeito do pH baixo sobre a parede celular. Koyama et al. (2001) apresentaram evidências de que o pH baixo poderia causar injúrias às raízes devido a sua interação com pectina. É provável que valores baixos de pH possam induzir mudanças moleculares no contínuo parede celular – membrana plasmática – citoesqueleto (CW-PM-CSK) (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005).

Recentemente, Monshausen et al. (2007) confirmaram os resultados de Bibikova et al. (1998) e forneceram maiores evidências do envolvimento da parede celular na resposta celular a pH baixo. Estes autores relataram que 100% dos pêlos observados em crescimento sofreram ruptura quando expostos a pH 4,5, e obtiveram evidências indiretas de que isto ocorreu devido ao afrouxamento da parede celular em função do pH. A elevação do pH externo levou a interrupção do crescimento celular enquanto o abaixamento do pH resultou na ruptura celular. Respostas semelhantes foram observadas com a manipulação de espécies reativas de oxigênio (ROS, "reactive oxygen species") na parede celular. A adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) resultou na interrupção do crescimento enquanto a remoção de ROS via antioxidantes levou à ruptura celular.

Vários trabalhos têm demonstrado o papel de ROS na extensibilidade da parede celular (LISZKAY; KENK; SCHOPFER, 2003; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004). Sabe-se que espécies reativas de oxigênio (O<sup>2</sup>·-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH) e enzimas do metabolismo oxidativo, como a NADPH oxidase e as peroxidases do tipo III, desempenham papel importante na modulação da extensibilidade da parede celular (LISZKAY; KENK; SCHOPFER, 2003; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004) e do crescimento e desenvolvimento (FOREMAN et al., 2003; SWANSON; GILROY, 2010). Ligações intra e intermoleculares podem ser quebradas ou formadas em cadeias de polissacarídeos ou outras

moléculas estruturais da parede pela ação direta de ROS ou em conjunto com a ação de enzimas como as peroxidases do tipo III da parede.

A ruptura celular em função do desbalanceamento entre a pressão de turgor e a resistência da parede celular, é conhecida em pêlos radiculares e tubos polínicos (JONES; RAYMOND; SMIRNOFF, 2006). Apesar de poucos casos descritos, o mesmo também pode ocorrer em outros tipos de células vegetais (PROSEUS; BOYER, 2006), o que nos leva a acreditar que a ruptura celular causada por pH baixo possa ser um evento mais comum do que se imagina. A razão exata dos desarranjos na estrutura da parede quando exposta ao pH baixo que resultam na ruptura celular ainda não é conhecida.

Atualmente há grande interesse em se determinar se plantas, à semelhança do que ocorre em leveduras, possuem um sistema de monitoramento e resposta a estresse da parede visando à manutenção da integridade da parede celular (HAMANN et al., 2009; LEVIN, 2005).

Neste contexto, alguns aspectos sobre os trabalhos existentes até o momento devem ser ressaltados. A partir dos poucos relatos existentes e observações preliminares em nosso laboratório, fica evidente que nem todos os pêlos se rompem quando expostos a pH baixo. Além disso, deve ser ressaltado que o procedimento experimental empregado nestes estudos é artificial, já que as células são expostas a pH baixo de maneira abrupta e muitas vezes essas exposições são acompanhados de estresse hipo-osmótico, o que por si só causa um aumento na pressão de turgor. Possivelmente se a exposição a pH baixo ocorrer de forma gradual, talvez a célula possa ajustar esse afrouxamento da parede celular não resultando em ruptura. Estudos sobre os fatores e condições determinantes para que alguns pêlos não sofram ruptura, ou do possível processo de ajustamento das células ao pH baixo poderão contribuir para o entendimento desses eventos celulares.

Outro aspecto que também deve ser examinado é o que ocorre nas células expostas a pH baixo que não se rompem. Alguns trabalhos indicam que pêlos radiculares crescem mais lentamente (BIBIKOVA et al., 1998), isto, de certa maneira, se contrapõe ao aumento do afrouxamento da parede celular, já que o esperado seria que com o afrouxamento a célula crescesse mais rapidamente. Sendo assim, uma questão ainda sem resposta é se o alongamento mais lento seria o resultado de um ajustamento celular tentando diminuir o intenso afrouxamento causado pelo pH baixo, ou seria decorrente de outros danos celulares.

Outro fator que possivelmente deve afetar a resposta da célula a pH baixo é a ação de hormônios, como as auxinas e etileno, que têm efeito marcante sobre a expansão celular. Além disto, o controle hormonal da expansão celular pode envolver ROS (SCHOPFER et al.,

2002), que desempenham papel na determinação da extensibilidade da parede celular (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004). Uma das enzimas geradoras de ROS apoplástico é a NADPH oxidase, cuja atividade já foi relacionada com a suscetibilidade à ruptura celular em outras condições não relacionadas a pH baixo (MACPHERSON et al., 2008). Assim, o uso de mutantes hormonais poderá melhor elucidar os mecanismos de ação e de resposta celular ao H<sup>+</sup>.

Em função do que foi discutido, é provável que a susceptibilidade de pêlos radiculares a pH baixo deva ser dependente da pressão de turgor. Deve ser colocado que este é um fator que tem sido em grande parte ignorado, embora a maioria dos trabalhos com toxicidade por Al e acidez envolve a transferência de plantas de uma solução mais rica em nutrientes e de osmolaridade mais elevada para outra bem mais diluída e de baixa força iônica. Ou seja, nestes experimentos, um tratamento hipo-osmótico geralmente está embutido. No campo também o estresse hipo-osmótico pode ter relevância em função das grandes variações das condições hídricas do solo, principalmente quando cai chuva sobre solos previamente secos.

Assim, neste trabalho, serão estudadas as respostas de pêlos radiculares a estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade, dando ênfase à taxa de alongamento destes pêlos à integridade da parede celular.

### 2. REVISAO DA LITERATURA

### 2.1. Pêlo radicular como sistema modelo

Nos últimos anos muito tem sido descoberto sobre a biologia das plantas através dos estudos genômicos, proteômicos, transcriptômicos, etc. Esses resultados acabam não refletindo o que acontece em células isoladas, mas sim em tecidos, órgãos ou mesmo na planta inteira. A falta dessa resposta isolada pode mascarar resultados ou mesmo diluir outros efeitos. Essa é uma das razões da necessidade da definição de um sistema modelo.

No estudo da biologia vegetal existem alguns candidatos a sistema modelo como pêlos radiculares, tricomas e pólen. Todos são unicelulares, apresentam sistema de diferenciação celular, e podem ser obtidos em grande quantidade. Dentre esses três modelos os pêlos radiculares são os mais interessantes. Pêlos radiculares possuem mecanismo conhecidos de determinação e diferenciação celular (BIBIKOVA; GILROY, 2003) de alongamento (CAROL; DOLAN, 2002), e atuam no acúmulo de água e nutrientes (FOREMAN; DOLAN, 2001). São células de crescimento polar com forma tubular que emergem do final da base de células especializadas chamadas tricoblastos. Eles são responsáveis por ancorar a raiz e por aumentar a área de superfície para o acúmulo de água e de nutrientes (FOREMAN; DOLAN, 2001; HEPLER; VIDALI; CHEUNG, 2001). A presença de pêlos radiculares na superfície da raiz torna fácil sua visualização, sendo acessíveis a vários tipos de manipulações experimentais. Além disso, a ausência de uma camada cuticular permite que análises físicas e químicas sejam aplicadas facilmente (GRIERSON; SCHIEFELBEIN, 2002).

Os pêlos radiculares também apresentam alongamento rápido e, mais importante, o local da expansão celular é conhecido e tem sido intensamente estudado (CARDENAS, 2009; MONSHAUSEN et al., 2007). O bombeamento e fluxo de prótons e de íons como o Ca <sup>2+</sup> e o K<sup>+</sup> (GILROY; JONES, 2000; LEW, 1996; MONSHAUSEN; MESSERLI; GILROY, 2008) desempenham papel fundamental na expansão dessas células. Outro fator fisiológico de importância para o alongamento dos pêlos é a produção extracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS – "reactive oxygen species"), juntamente com a sinalização de fosfolipídios tem atuado na regulação do alongamento dos pêlos.

Estudos com pêlo radicular têm sido realizados principalmente em *Arabidopsis* thaliana graças às numerosas vantagens oferecidas para o estudo básico do desenvolvimento,

da biologia celular e fisiologia destas células nesta planta (CAROL; DOLAN, 2002). O uso de *Arabidopsis* é bem estabelecida como um sistema modelo para estudos de biologia de plantas e, teve o seqüenciamento de seu genoma publicado (KAUL et al., 2000).

### 2.2. Acidez e a parede celular

As causas da acidificação do solo podem ser naturais como lixiviações, liberação de ácidos orgânicos pelas raízes e pelos microrganismos, a percolação de ácidos húmicos e fúlvicos dos horizontes superiores, como também pelo resultado das ações humanas, como a chuva ácida e utilização de fertilizantes (LARCHER, 2000). A acidificação do subsolo pode causar danos às plantas reduzindo a profundidade do sistema radicular, aumentando desta maneira a suscetibilidade à seca e diminuindo o uso de nutrientes pelas plantas (FOY; CHANEY; WHITE, 1978).

Yan et al. (1992) encontraram indícios morfológicos de que a alta concentração de prótons afeta mais a região de alongamento do que a região meristemática de raízes de *Zea mays* e *Vicia faba*. Em raízes de milho, a pré-incubação por 20 horas em solução tampão pH 4,0 causou um grande influxo de prótons na região de alongamento (SHABALA; NEWMAN; MORRIS, 1997), mas não em células mais maduras. Outros trabalhos também confirmam que nas raízes as células mais sensíveis são as da região de alongamento (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; YOKOTA; OJIMA, 1995; KOYAMA et al., 1995) e em suspensões celulares, as células na fase logarítmica são mais sensíveis do que as na fase estacionária (VITORELLO; HAUG, 1996).

O pH ácido atua no alongamento celular, e juntamente com outros moduladores como, hormônios, cálcio e boro modificam a extensibilidade da parede celular. O abaixamento do pH causa modificações na estrutura da parede celular, através de interações dos prótons com a pectina, gerando um afrouxamento da parede celular e conseqüentemente um aumento da sua extensibilidade (HESLOP-HARRISON, 1987; HOLDAWAY-CLARKE et al., 2003).

Para que ocorra o alongamento do pêlo radicular, a parede celular deve ser reestruturada apenas na sua extremidade, permitindo a inserção de novos materiais produzidos. Expansinas são proteínas dependentes do pH que estão envolvidas no afrouxamento da parede (COSGROVE, 2005). Células em crescimento apresentam o pH da parede celular entre 4,5 e 6,0 que é justamente o intervalo ótimo de atividade das expansinas. Monshausen et al. (2007) mostra através de monitoramento do alongamento do pêlo radicular

com sonda fluorescente que o alongamento da extremidade do pêlo radicular de *Arabidopsis* está associado a mudanças cíclicas no influxo de H<sup>+</sup> ao redor da ponta da célula.

O alongamento da parede celular começa com a diminuição da rigidez da parede permitindo que as células absorvam água aumentem o turgor.

Expansinas são um grupo de proteínas não enzimáticas que atuam nessa diminuição de rigidez da parede mediando o crescimento ácido, dificultando a ocorrência das ligações não-covalentes que mantêm as microfibrilas arranjadas na parede celular (COSGROVE, 2005).

### 2.3. Sistema de resposta a estresse da parede celular

Sabe-se que um dos fatores que leva a expansão celular é o aumento da pressão de turgor gerada (TAIZ, 1984), juntamente como a deposição de novo material da parede (CAROL; DOLAN, 2002). Durante o alongamento da célula vegetal o balanço entre a síntese de parede e extensão celular pode ser facilmente afetado por fatores bióticos e abióticos, comprometendo a funcionalidade e integridade da parede celular. Mesmo tendo várias das etapas bem estabelecidas o mecanismo responsável pela acidificação da parede celular durante a expansão, ainda é incerto (WU et al., 2007).

Para manter a sua integridade a célula deve ser capaz perceber variações mínimas que possam causar danos e bloqueá-las em um curto período. Essa estreita relação pode ser observada em trabalhos como Monshausen, Messerli e Gilroy (2008) que mostra uma oscilação na taxa de alongamento dos pêlos radiculares de *Arabidopsis* em função da acidificação do pH na extremidade do pêlo radicular que é acompanhado do aumento da produção de ROS e do gradiente da Ca<sup>2+</sup>.

Os hormônios também podem estar envolvidos nessa regulação (JUNG; SHIN; SCHACHTMANA, 2009) embora existam indicações claras de que ROS e hormônios interagem, não está claro, se esta interação ocorre nas vias de sinalização específicas ou no próprio mecanismo de crescimento (CAROL; DOLAN, 2006).

O mecanismo de expansão da extremidade da parede celular é semelhante para os pêlos radiculares e hifas de *Chara* e *Nitella*, apesar de haver diferenças sua composição, indicando que é uma característica de crescimento da extremidade (ZONIA; MUNNIK, 2007). Assim como em leveduras, existem boas evidências de que células vegetais possuem um sistema de monitoramento e resposta à integridade da parede celular (HAMMAN, 2009).

### 2.4. Modulação oxidativa da parede celular

O acúmulo de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) na Terra tornou possível a evolução de organismos aeróbicos que utilizam o O<sub>2</sub> como aceptor final de elétrons. O O<sub>2</sub> é pouco reativo, mas tem a capacidade de originar estados excitados reativos (espécies reativas de oxigênio – ROS) como radicais livres (OH) e derivados (MORI; SCHROEDER, 2004) (Figura 1). Essas moléculas são formadas durante funções metabólicas normais nos peroxissomos ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as plantas estão constantemente expostas (MITTLER, 2002) sendo, sobretudo, subprodutos do metabolismo celular regular.

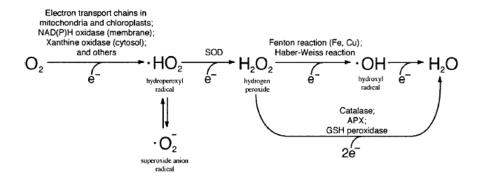


Figura 1 – Estágios de redução do O<sub>2</sub> e algumas da suas principais vias metabólicas (MORI; SCHROEDER, 2004)..

A produção acentuada de ROS durante o estresse pode representar uma ameaça para as células. Apesar disso, elas também podem agir como sinalizadores na ativação de resposta ao estresse e como vias de defesa. Assim, as ROS podem ser consideradas, inicialmente, um indicador celular de estresse e um mensageiro secundário envolvido na transdução de sinal em resposta ao estresse (GECHEV et al., 2006; MITTLER, 2002).

Os principais locais de produção de ROS em células vegetais são as organelas com altas atividades metabólicas de oxigenação ou com fluxo substancial de elétrons, são elas: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (APEL; HIRT, 2004). Outra fonte de ROS nas células são as NADPH oxidases. Ligadas a membrana plasmática, assim como as peroxidases a parede celular, as NADPH oxidases são as principais produtoras de O<sup>-2</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoplástico (SAGI; FLUHR, 2006).

As NADPH oxidases são reguladas por diversos estímulos ambientais e de desenvolvimento. O acumulo de ROS no apoplasto gera o chamado "estouro" (burst) oxidativo observado como parte da resposta de hipersensibilidade a agentes patogênicos como fungos, bactérias, insetos, etc. Também atuam na regulação da morte celular programada e no crescimento e desenvolvimento celular (GECHEV et al., 2006).

As peroxidases em plantas pertencem a uma superfamília que é dividida em 3 diferentes classes: a classe I das intracelulares (EC 1.11.1.5/.6/.11), a classe II encontrada em fungos (EC 1.11.1.13/.14) e a classe III extracelulares (EC 1.11.1.7). A classe III catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>através de elétrons retirados de várias moléculas doaras como os compostos fenólicos, precursores da lignina, auxinas e do metabolismo secundário (PASSARDI et al., 2005).

Para proteção das organelas e das membranas celulares dos efeitos danosos de concentrações tóxicas de ROS, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa incluindo um sistema enzimático, que compreende a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidases (POXs), ascorbato peroxidase (APX), glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR) e um sistema não-enzimático composto por moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, glutationa reduzida (GSH), carotenóides, α-tocoferol (MITTLER, 2002).

ROS está envolvido na regulação de vários processos do desenvolvimento celular, incluindo o alongamento dos pêlos radiculares. As NADPH oxidases atuam oxidando o NADPH do citoplasma e gerando O<sup>2-</sup> apoplastico que pode ser rapidamente desmutado para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e voltar para dentro da célula, atuando como um regulador, ou pode formar OH<sup>-</sup>, através dos peroxissomos (SWANSON; GILROY, 2009). Este radical atua no alongamento celular afrouxando as paredes celulares (CROSGROVE, 2005).

### 2.5. Interações com hormônios

Os fitormônios, como também são chamados os hormônios vegetais, são substâncias orgânicas atuantes nos diferentes órgãos das plantas que agem como mensageiros químicos responsáveis por desencadear ou inibir atividade como, por exemplo, o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Entre as categorias de hormônios vegetais relacionados à divisão

celular, crescimento e diferenciação, destacam-se as auxinas, o ácido giberélico (giberelinas – GA), o etileno, o ácido abscísico (ABA) e citocininas.

O alongamento da parede celular é a resposta inicial dos tecidos vegetais às auxinas. A auxina estimula uma bomba de prótons que promove a secreção de íons hidrogênio em um compartimento da parede celular causando acidificação. A acidificação promove a ativação de enzimas preexistentes causadoras do afrouxamento da parede celular.

A auxina e o etileno desempenham papel importante na iniciação e desenvolvimento dos pêlos radiculares (BIBIKOVA; GILROY, 2003; RAHMAN et al., 2002). Mutantes hormonais e as mudanças morfológicas envolvendo esses dois hormônios são muito conhecidas em *Arabidopsis* (GRIERSON; SCHIEFELBEIN, 2002). Pitts, Cernac e Estelle, (1998), avaliaram a relação entre os hormônios e o desenvolvimento do pêlo radicular em raízes de *Arabidopsis thaliana* tipo selvagem e de mutantes hormonais.

A interação de ROS com hormônios vegetais pode ser outro determinante de especificidade. Por exemplo, auxina, ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico juntamente com ROS regulam diversos processos como crescimento, fechamento dos estômatos e resposta a injúrias (KWAK; NGUYEN; SCHROEDER, 2006) Da mesma forma, etileno e ácido salicílico atuam juntamente com ROS (WANG; LI; ECKER, 2002). O aumento da síntese de etileno e ácido salicílico é observado sob estresse abiótico e ataque por patógenos, que por sua vez pode potencializar a produção de ROS. Evidências recentes (WANG; LI; ECKER, 2002) sugerem a atuação do etileno em complexas interações com ABA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para regular o fechamento dos estômatos (GECHEV et al., 2006).

### 2.6. O cultivar Micro-Tom de tomateiro e seus mutantes hormonais

O tomate é uma alternativa interessante ao modelo experimental comumente utilizado em plantas, a *Arabidopsis thaliana* (MEISSNER et al., 1997), pois além de possuir muitas das características vantajosas de *Arabidopsis*, possui algumas características diferenciadas como a produção de frutos suculentos (CAMPOS et al., 2010). Além disto, o tomate possui valor comercial elevado, sendo uma espécie importante no mercado de vegetais frescos. Possui um genoma pequeno (950Mb) rico em características e marcadores mapeados (CAMPOS et al., 2010).

O cultivar Micro-Tom (MT) de tomate foi originalmente obtido para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989). No entanto, o seu ciclo de vida curto (10 semanas), seu

pequeno porte e o fato do genoma do tomate já ter sido sequenciado, tornaram o MT interessante como sistema modelo em plantas. Outro importante fator é a relativa facilidade de obtenção de plantas transgênicas desta variedade. A transformação da planta permite que a função de genes seja verificada através da sua expressão (LIMA et al., 2004). Com essas características, a cultivar Micro-Tom (MT) pode crescer em laboratório com exigências de estruturas semelhantes à requerida para *Arabidopsis*.

Em tomateiro ocorrem mutações naturais e mutações induzidas para diversos genes que fazem parte da sinalização, percepção ou biossíntese de hormônios vegetais (LIMA et al., 2004; ZSÖGÖN et al., 2008). Para a classe das auxinas, o mutante *diageotrópica* (*dgt*) apresenta alteração na via de transdução de sinal da auxina, culminando em pouca sensibilidade a auxina (OH et al., 2006), para etileno o mutante *epinastic* (*epi*) superproduz este hormônio (FUJINO et al., 1988). Um gene defectivo para o NCEG ("carotenoid cleavage enzyme") torna o mutante *notabilis* (*not*) deficiente em ácido abscísico (BURBIDGE et al., 1999). O mutante *procera* (*pro*) apresenta super sensibilidade ao ácido giberélico causada por uma mutação pontual no gene que converte VHVID em VHEID (BASSEL et al., 2008) e o *dumpy* (*dpy*) não converte 6- deoxocatasterone para 6- deoxoteasterone, sendo assim deficiente em brassinosteróide (KOKA et al., 2000).

O interessante é que esses mutantes hormonais foram introgredidos em Micro-Tom no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento da ESALQ/USP (CAMPOS et al., 2009). Assim, estas mutações estão contidas em um mesmo background de referência que facilita a comparação de respostas entre plantas.

### 3. HIPÓTESES

- A suscetibilidade de células vegetais a pH baixo está relacionada a desarranjos na parede de células em crescimento;
- Estes desarranjos podem comprometer a integridade da parede celular;
- Variações na pressão de turgor, através de variações na osmolaridade do meio externo, também contribuem para comprometer a integridade da parede celular;
- A célula vegetal deve possuir um sistema de monitoramento e resposta a ameaças à integridade da parede celular, modificando sua parede e levando a alteração na sua extensibilidade;
- A modulação oxidativa da parede é um dos mecanismos de resposta ao comprometimento da integridade da parede celular;
- A respostas descritas acima devem acarretar em maior enrijecimento da parede e, portanto, em menores taxas de alongamento celular;
- Os pêlos radiculares, pela facilidade de avaliar sua ruptura e medir sua taxa de alongamento quando comparada com outros tipos de células vegetais, devem servir como bom modelo experimental para examinar as hipóteses acima descritas.

### 4. OBJETIVOS

**4.1.** Objetivo geral: Elucidar processos celulares que determinam a sensibilidade a pH baixo e estresse hipo-osmótico em células vegetais e examinar a resposta celular ao estresse da parede e ameaças à sua integridade.

### **4.2.** Objetivos específicos:

- a) Otimizar um sistema experimental para o estudo do estresse por pH baixo e hipoosmolaridade em pêlos radiculares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom);
- b) Avaliar como o estresse por pH baixo e hipo-osmótico afeta a taxa de alongamento dos pêlos radiculares;
- c) Avaliar a suscetibilidade dos pêlos radiculares à ruptura quando expostos a estresse por pH baixo e hipo-osmótico;
- d) Avaliar o papel da modulação oxidativa na resposta celular ao estresse da parede causado por pH baixo e hipo-osmolaridade;
- e) Avaliar a resposta de diferentes mutantes hormonais de Micro-Tom frente ao estresse por pH baixo e hipo-osmolaridade.

### **4.3.** Objetivos complementares:

a) Testar o efeito de tampões, para a realização de estudos a pH baixo (4,0 a 5,0), sobre o alongamento de pêlos radiculares.

### 5. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP. Foi estudado o efeito de pH baixo (4,5) e da hiposmolaridade sobre o alongamento e a integridade da parede de pêlos radiculares da cv. Micro-Tom de tomateiro.

### 5.1. Material vegetal

Como modelo experimental, foi utilizado o cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) e alguns de seus mutantes hormonais (Tabela 1). Sementes destes materiais foram fornecidas pelo Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento da ESALQ/USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Lazaro E. P. Peres. As mutações hormonais foram introduzidas no Micro-Tom através de introgressão e os mutantes são praticamente isogênicos. Informações mais detalhadas sobre o Micro-Tom como sistema modelo seus mutantes podem ser obtidos em Campos et al. (2010) e Meissner et al. (1997) e nas referências citadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação de mutantes hormonais de Micro-Tom (MT) testados e seus respectivos fenótipos

Mutante	Fenótipo	Referência
diageotropica (dgt)	Pouco sensível à auxina	Oh et al., 2006
epinastic (epi)	Super produtor de etileno	Fujino et al., 1988
notabilis (not)	Deficiente em ácido abscísico (ABA)	Burbidge et al., 1999
procera (pro)	Super sensível ao ácido giberélico	Bassel et al., 2008
dumpy (dpy)	Deficiente em brassinosteróides (BR)	Koka et al., 2000

### 5.2. Desinfestação e germinação das sementes

Foram colocadas de 20 a 30 sementes de Micro-Tom em um Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de hipoclorito de sódio comercial diluído a 30 %, além de algumas gotas de

detergente com agitação de aproximadamente 150 rpm por 1 hora, para que ocorresse a desinfestação.

Em seguida, as sementes foram lavadas de três a quatro vezes com água destilada e autoclavada e, posteriormente colocadas para germinar em placas de Petri contendo 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,5% de ágar onde permaneceram por três a quatro dias, no escuro e em temperatura ambiente.

### 5.3. Desenvolvimento do sistema experimental para estudo de pêlos radiculares

Para estabelecer um sistema experimental onde fosse possível medir o alongamento dos pêlos radiculares e manipulá-los sem que estes fossem danificados, permanecendo imobilizados, diferentes metodologias foram testadas e modificadas até chegar à utilizada. Este processo mostrou-se desafiador, alcançando mais complexidade do que se esperava inicialmente.

As primeiras tentativas de acompanhar o alongamento do pêlo foram realizadas com a raiz crescendo diretamente sobre meio semi-sólido em placa de Petri e os pêlos observados ao microscópio estereoscópico. Este sistema foi inadequado por não proporcionar aumento suficiente sendo em seguida abandonado. Posteriormente foi testada a transferência de plântulas para lâminas de microscópio, contendo uma camada de meio semi-sólido, com a raiz em crescimento imersa no meio. Sistemas semelhantes foram empregados na literatura anteriormente, principalmente com Arabidopsis (HALPERIN; GILROY; LYNCH, 2003; JONES et al., 2007; WYMER; BIBIKOVA, 1998). Sua principal vantagem é que a raiz e os pêlos radiculares ficam imobilizados e protegidos, além do gel ser um meio que favorece o desenvolvimento de pêlos radiculares. Em muitas espécies, o cultivo em meio líquido inibe o desenvolvimento de pêlos radiculares (FARR, 1927). A princípio, este sistema parecia ser o mais promissor, tendo sido investido considerável tempo no seu desenvolvimento. No entanto, o principal impedimento deste sistema foi a impossibilidade de troca de soluções de tratamento, que não se difundiam através do gel com a rapidez necessária. A difusão de soluções foi avaliada com a utilização de corantes. Curiosamente, já foi descrita a utilização de sistema semelhante, com troca de soluções de tratamento, em *Arabidopsis* (PREUSS et al., 2004). Nesses relatos, talvez a espessura do gel fosse suficientemente fina. Tentativas de reduzir a espessura ou a concentração do ágar não melhoraram a difusão das soluções de modo satisfatório, fazendo com que este sistema tivesse de ser substituído.

Passou-se então à construção de uma câmara de alongamento com uso de lâminas de microscópio e espaçadores. As câmaras de alongamento utilizadas foram desenvolvidas a partir de descrições da literatura (PREUSS et al., 2004), mas com modificações específicas para este trabalho. Essas modificações foram sendo testadas e aprimoradas com o decorrer dos experimentos.

Foi testado o tipo de material utilizado como espaçador (tiras de polipropileno ou vidro) e sua espessura (de 1,0 a 2,0 mm), assim como o modo de fixá-lo às lâminas. Os adesivos foram avaliados quanto à liberação aparente de substâncias tóxicas, a melhor fixação na lâmina e a capacidade de suportar temperaturas de autoclavagem. Foi testado um adesivo à base de borracha de silicone de cura ácida (silicone) e uma cola instantânea (cianoacrilato, Super Bonder). Para fixar a segunda lâmina, que forma a tampa da câmara, foram testados elásticos de látex, fita adesiva comum (Durex) e elásticos siliconados.

A configuração final da câmara de crescimento foi a seguinte: cada câmara é formada por duas metades, cada uma composta por uma lâmina de microscópio com dois espaçadores de vidro de espessura igual à da lâmina (aproximadamente 1,0 mm) (Figura 2A e B). Esses espaçadores foram colados às laterais das lâminas com silicone. Sobre leito formado pala lâmina e os espaçadores o meio de crescimento foi vertido sob condições assépticas. Depois do resfriamento e gelificação do meio, as plântulas foram transferidas para a superfície do meio de crescimento e cobertas com a segunda lâmina de microscópio modificada com os espaçadores. As duas metades foram mantidas unidas por dois pequenos elásticos siliconados em cada extremidade (Figura 2C). Assim, a configuração da câmara permite a raiz crescer no espaço entre o meio semi-sólido e a lâmina de vidro da tampa da câmara, ficando relativamente imobilizada e ao mesmo tempo permitindo o fornecimento e troca de soluções de tratamento.

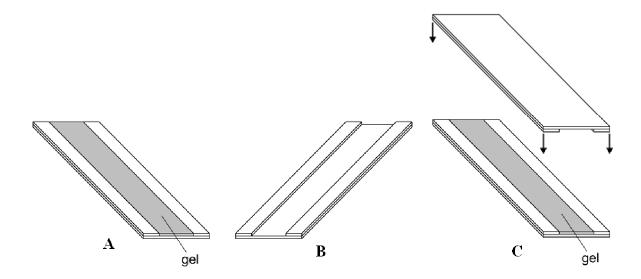


Figura 2 - Esquema ilustrando o conjunto de lâminas que formam a câmara de crescimento da plântula. Cada câmara é formada por duas metades (A, B), cada uma composta por uma lâmina de microscópio com dois espaçadores de vidro de espessura igual à da lâmina (aproximadamente 1,0 mm). (A) Lâmina com os espaçadores e no centro o meio de crescimento (em cinza). A plântula era colocada por cima desse meio. (B) Segunda lâmina com os mesmos espaçadores e sem meio de crescimento que era colocada por cima da primeira. (C) Notar que entre a plântula e a lâmina de cima havia um espaço por onde as soluções eram aplicadas.

A composição do meio de crescimento das plântulas também foi testada. Inicialmente foi utilizado o mesmo meio tanto para a germinação quanto para o crescimento da raiz na câmara (CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM e 1,5 % de ágar). Na tentativa de uma padronização e obtenção de maior uniformidade no alongamento dos pêlos radiculares, o meio de crescimento foi modificado, passando a ser composto pela metade da concentração dos sais do meio de Murashige e Skoog (1962) (MS/2), acrescido de 1% de sacarose e 0,4 % de phytagel.

### 5.4. Transferência e aclimatação das plântulas nas câmaras de crescimento

Após a germinação (3 a 4 dias), as plântulas foram transferidas das placas de Petri para as câmaras de crescimento contendo meio composto pelos sais do MS/2, acrescido de 1% de sacarose e 0,4 % de phytagel. As plântulas permaneceram nas câmaras por mais 24 h, no escuro, em caixa de isopor, à temperatura ambiente do laboratório (24 ± 1 °C), para permitir o crescimento da raiz e a formação de pêlos novos. Isto evita a utilização de pêlos eventualmente danificados na transferência. A posição da extremidade de cada raiz era

marcada com caneta no início e no final do período de aclimatação. O crescimento das raízes era de aproximadamente 1,5 cm quando transferidas para as câmaras. Raízes com crescimento abaixo deste valor eram descartadas. Durante este período, o espaço livre da câmara (onde a plântula cresce) foi mantido sem solução. As câmaras foram mantidas inclinadas para baixo com intenção de estimular o crescimento da raiz contra o ágar (auxiliando na imobilização). As condições de acondicionamento das câmaras, contendo as plântulas, durante o período de 24 h após a transferência, também passaram por aperfeiçoamentos. Inicialmente, a extremidade inferior das câmaras foi mantida em contato com água destilada autoclavada, ficando o restante em contato com o ar do interior da caixa de isopor. Depois foram mantidas da mesma maneira, mas em béquer de 250 mL vedado com filme plástico. Depois de mais testes, chegou-se a conclusão que a melhor opção seria as câmaras permanecerem em frascos Magenta<sup>®</sup> tampados, contendo ao seu fundo aproximadamente 2,0 mL de meio com sais de MS/2, acrescido de 1% de sacarose, no escuro, à temperatura ambiente.

### 5.5. Tratamentos e as respectivas soluções utilizadas

Depois da aclimatação por 24 h, as plântulas foram tratadas com soluções de duas maneiras distintas:

- a) Em uma delas, os pêlos foram expostos diretamente a diferentes soluções de tratamento. Estas soluções eram constituídas por um meio mínimo (MMin) com osmolaridade de aproximadamente 41 mOsm, contendo 2 mM de CaCl<sub>2</sub>; 10 mM de KCl; e 10 mM do tampão ácido-2-morfolinoetanosulfônico (MES) a pH 5,8 ou 4,5. A osmolaridade do MMin foi ajustada com manitol em um dos tratamentos e no outro não (controle). Estas concentrações foram ajustadas com manitol para valores dependendo da finalidade de cada experimento.
- b) Na outra, os pêlos foram sempre expostos primeiramente a um meio de referência por cerca de 30 min, para depois serem expostos às diferentes soluções de tratamento. A composição do meio de referência era a mesma do meio mínimo, pH 5,8, mas com osmolaridade ajustada sempre para 150 mOsm pela adição de manitol. O uso deste procedimento permitiu duas vantagens; primeira e mais importante foi a constatação de variabilidade na taxa de alongamento dos pêlos radiculares. Este procedimento permitiu, portanto, avaliar a taxa de alongamento de cada pêlo sob condições padrões, de modo que o efeito do tratamento subsequente pudesse ser expresso em valores relativos, sendo comparado

com a condição de referência. Segunda vantagem: os pêlos passaram por um período de adaptação ao meio líquido.

A osmolaridade do meio de referência foi determinada considerando que deveria permitir uma boa taxa de alongamento do pêlo radicular, mas que não deveria ser baixa a ponto de não ser possível realizar tratamentos hipo-osmóticos (choques hipo-osmóticos).

Como ponto de partida, para se obter parâmetros de comparação, primeiramente foi determinado a osmolaridade da solução externa (meio mínimo mais manitol) que fosse aproximadamente isotônica em relação ao citoplasma. Isto foi determinado observando-se a presença de plasmólise incipiente e pela paralisação do alongamento celular.

Em seguida, foram avaliados os efeitos sobre os pêlos quando estes foram primeiramente tratados com meio mínimo (MMin), pH 5,8, com osmolaridade aproximadamente isotônica e outras duas concentrações mais baixas (300, 200 e 150 mOsm), seguido de exposição ao mesmo meio com outra osmolaridade mais baixa (41 ou 76 mOsm). A osmolaridade foi ajustada com manitol e cada período de tratamento foi de 30 min.

### 5.5.1. Aplicação e troca de soluções de tratamento

Para a aplicação e/ou trocas das soluções de tratamento, as câmaras contendo as plântulas foram mergulhadas, cuidadosamente e inicialmente, na orientação vertical e nas respectivas soluções de tratamento. Como as câmaras eram abertas em ambas as extremidades, as soluções preenchiam facilmente o espaço livre das câmaras. Por outro lado, como o espaço livre tinha uma espessura pequena, as soluções ficavam retidas na câmara, desde que estas fossem mantidas aproximadamente na posição horizontal, permitindo realizar observações em microscópio óptico com solução preenchendo a câmara. Para a remoção e/ou troca de solução, as câmaras eram colocadas na posição vertical para o escorrimento das soluções, e depois a extremidade inferior era encostada contra borrão de papel absorvente para a remoção completa da solução. Alternativamente, as soluções também foram adicionadas às câmaras com auxílio de micro-pipeta, mantendo-se a câmara ligeiramente inclinada durante a aplicação.

Durante os intervalos entre a obtenção de imagens no microscópio, as câmaras contendo as plântulas e soluções eram mergulhadas novamente nas soluções de tratamento correspondentes àquele intervalo de tempo.

No final dos tratamentos, os pêlos foram corados com trypan blue (0,4 %, diluído 1:1 em água) para a identificação de pêlos rompidos.

### 5.5.2. Tratamentos com soluções de diferentes valores de pH (4,5 e 5,8)

Para avaliar o efeito de pH sobre o alongamento e a integridade da parede dos pêlos radiculares, foram empregados três diferentes modos de tratamento:

- a) Exposição direta ao meio mínimo (MMin) com diferentes valores de pH (4,5 e 5,8), com variação de 90 a 135 min;
- b) Exposição primeiramente ao meio de referência (pH 5,8, 150 mOsm) seguido de exposição ao mesmo meio a pH 4,5 (ausência de tratamento hipo-osmótico), por 30 min cada vez;
- c) Tratamentos combinando alterações de pH com tratamentos hipo-osmóticos. Nestes ensaios, os pêlos eram expostos por 30 min primeiramente ao meio de referência (pH 5,8, 150 mOsm), seguido de exposição por 30 min ao MMin, pH 4,5, com osmolaridade mais baixa (tratamento hiposmótico), variando de 123 a 41 mOsm.

### 5.5.3. Tratamentos com variações na osmolaridade das soluções – tratamentos hipoosmóticos

Para avaliar o efeito de tratamentos hipo-osmósticos (também chamados de choques hipo-osmósticos), sem variações de pH, sobre o alongamento e a integridade da parede dos pêlos radiculares, foram empregados dois modos de tratamento:

- a) Exposição direta a meio mínimo (MMin), pH 5,8, com valores de osmolaridade variando de 41 a 300 mOsm, ajustadas com manitol. Os pêlos radiculares permaneceram nestas soluções por 30 min;
- b) Exposição primeiramente ao meio de referência (pH 5,8, 150 mOsm) seguido de exposição ao meio mínimo, sem ajuste com manitol (41 mOsm), por 30 min cada vez.

### 5.6. Medição do alongamento dos pêlos radiculares

O comprimento dos pêlos foi avaliado por microscopia óptica antes e durante a aplicação de cada tratamento e nos respectivos controles. Para isto, partimos de metodologias usadas em *Arabidopsis thaliana*, onde a taxa de alongamento do pêlo radicular é de aproximadamente 1 µm.min<sup>-1</sup> (HALPERIN; GILROY; LYNCH, 2003). As observações microscópicas foram realizadas em microscópio óptico Zeiss, Modelo Axioskop 40, localizado nas dependências do Laboratório de Carbono C-14 (CENA-USP) ou em microscópio óptico Zeiss, Modelo Axioskop 2, no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA-ESALQ). Nos dois casos, as imagens foram geradas através do sistema de captura AxioCamMR3 (Carl Zeiss) acoplado ao microscópio óptico.

Aproximadamente dez pêlos por raiz de uma mesma região foram observados em tempos diferentes. Escolheu-se uma região da raiz próxima à zona de elongação onde estivessem presentes ao mesmo tempo, pêlos radiculares no início do alongamento e mais desenvolvidos. Para acompanhar a mesma região de cada raiz ao longo do tempo, foi marcada a posição inicial da lâmina no microscópio através das escalas presentes no conjunto charriot e platina. Foram obtidas, no mínimo, quatro fotos por raiz em períodos de tempo variando entre 20 a 40 min entre cada foto.

O ajuste e a captação das imagens digitais foram realizadas com a utilização do software AxioVision, versão 4.5, sendo salvas no formato **jpg.**, juntamente com informações como objetiva empregada, escala, data e horário. A análise das imagens e a medição do comprimento dos pêlos foi feita com auxílio do software ImageJ (ABRAMOFF; MAGELHAES; RAM, 2004; RASBAND, 2009) (Figura 3). Para a medição do comprimento, foram escolhidos os pêlos possíveis de serem visualizados em todas as fotos. Para as medidas, a escala foi estabelecida a partir da barra de escala nas imagens.

A partir das medidas dos comprimentos dos pêlos, foi calculada a taxa de alongamento (μm.min¹) de cada pêlo, a média para cada tratamento, bem como o desvio padrão (d.p.), o coeficiente de variação (CV %) e o erro padrão da média (e.p.).

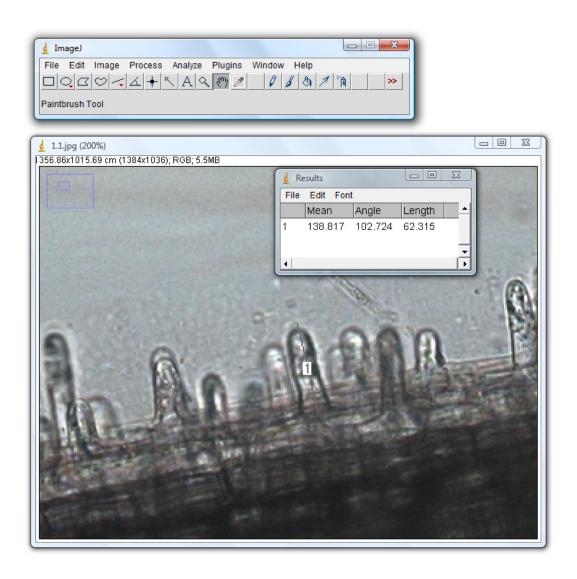


Figura 3 - Ilustração do uso do programa ImageJ (NIH) para a medição do comprimentos dos pêlos radiculares. O inserto mostra o registro de dados à medida que estes são obtidos

### 5.7. Avaliação de pêlos radiculares rompidos

Alguns dos tratamentos desencadeiam a ruptura de pêlos radiculares. Estes foram contabilizados das seguintes maneiras:

a) No caso de tratamento inicial com meio de referência (que não causa ruptura de pêlos), seguido por solução de tratamento: dos pêlos que tiveram seu alongamento medido durante a exposição ao meio de referência, determinou-se a percentagem destes que se romperam no tratamento subsequente;

b) No caso dos pêlos expostos diretamente à solução de tratamento, foi amostrada uma área da imagem em que todos os pêlos inteiros e rompidos foram contados. Em alguns casos, esta contabilidade foi feita para a imagem inteira. Não se contabilizou pêlos fora de foco ou que não estivessem bem visíveis.

### 5.8. Avaliação da modulação oxidativa da parede celular

O possível envolvimento da modulação oxidativa da parede celular, na resposta dos pêlos frente aos tratamentos com pH baixo e choque hipo-osmótico foi avaliado de duas maneiras:

- a) Manipulação de ROS extracelular, por aplicação exógena ou aplicação de antioxidantes. Dentre as espécies de ROS envolvidas na modulação oxidativa da parede celular, a única que tem estabilidade suficiente para ser empregada experimentalmente é o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);
- b) Uso de inibidores de enzimas chaves na modulação oxidativa da parede celular. Inibidores de NADPH oxidase e peroxidases foram testados para avaliar o papel destas enzimas frente ao estresse por pH baixo e hiposmolaridade. Estes inibidores são bem estabelecidos (CROSS; JONES, 1986; FOREMAN et al., 2003) e comumente empregados para avaliar o papel destas enzimas em processos biológicos.

### 5.8.1. Aplicação exógena de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ácido ascórbico

Foi avaliado o efeito do  $H_2O_2$  e do ácido ascórbico no alongamento do pêlo radicular frente a um choque hiposmótico (MONSHAUSEN et al., 2007).

As raízes foram expostas ao meio de referência (150 mOsm) a pH 5,8, de 30 a 40 min. Após esse período, as raízes foram divididas em três lotes, cada lote passou por um tratamento de 30 a 40 min. O primeiro com meio mínimo, o segundo com meio mínimo acrescido por 1  $\mu$ M de  $H_2O_2$ , e o terceiro por meio mínimo mais 100  $\mu$ M de ascorbato (MONSHAUSEN et al., 2007).

### 5.8.2. Aplicação exógena de inibidor de NADPH oxidase (DPI)

O inibidor da NADPH oxidase, difenileno-iodônio (diphenylene iodonium, DPI) foi empregado conforme descrito por Foreman et al. (2003).

Por meio do uso de DPI, durante choque hiposmótico, foi avaliado o alongamento dos pêlos radiculares. Raízes foram expostas ao meio de referência a pH 5,8 por um período de 30 a 40 min. Em seguida, as raízes foram divididas em lotes e tratadas de 30 a 40 min. O primeiro foi tratado com meio mínimo, o segundo com meio mínimo acrescido por 50 μM de DPI (FOREMAN et al., 2003).

### 5.8.3. Aplicação exógena de inibidor de peroxidase de parede (SHAM)

O inibidor de peroxidase ácido salicilhidroxâmico (salicylhydroxamic acid, SHAM) foi empregado conforme descrito em Dunand, Crevecoeur e Penel (2007).

SHAM foi usado durante choque hiposmótico para a avaliação do alongamento do pêlo radicular. Raízes foram expostas ao meio de referência a pH 5,8 por um período de 30 a 40 min. Após este período, as raízes foram divididas em lotes e tratadas de 30 a 40 min. O primeiro foi tratado com meio mínimo, o segundo com meio mínimo acrescido por 50 μM de SHAM (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007). Também foram testadas outras concentrações de SHAM (entre 10 μM, 200 μM e 1 mM).

### 5.9. Avaliação dos mutantes hormonais de MT

Alguns mutantes hormonais de MT, *dgt; epi; not; pro* e *dpy* (Tabela 2) passaram por uma caracterização inicial, onde foi avaliado o alongamento dos pêlos radiculares, além das diferenças morfológicas na distribuição dos pêlos. O MT, que foi utilizado em todos os demais ensaios, foi usado como controle frente aos mutantes. As raízes foram tratadas com meio mínimo a pH 5,8 por aproximadamente 1 h e 30 min.

### 5.9.1 Tratamento hipotônico em mutantes super produtores de etileno (epi)

Raízes de MT e de *epi* foram divididas em três lotes e foram tratados com meio mínimo e meio mínimo acrescido de manitol em duas outras osmolaridades (76 e 300 mOsm). As raízes foram mantidas em contato com as soluções a pH 5,8 por aproximadamente 60 min.

### 5.9.2 Tratamento hipotônico em mutantes

As raízes foram expostas ao meio de referência a pH 5,8 entre 20 a 40 min. Após esse tempo foi trocado o meio de referência pelo meio mínimo a pH 5,8, permanecendo em contato por 20 a 30 min.

# 5.10. Estudo complementar do efeito de tampões para uso a pH baixo, sobre células vivas

O emprego de tampões em experimentos com células vivas a pH baixo é problemático, pois a maioria dos tampões com pKa adequado aos ensaios de sensibilidade ao pH baixo são ácidos orgânicos que afetam o metabolismo celular ou a permeabilidade da membrana plasmática. Alguns tampões, que já foram utilizados em outros trabalhos e/ou parecem ter potencial para uso neste tipo de abordagem, foram examinados quanto à possível interferência no crescimento e/ou metabolismo celular.

Mais especificamente, os testes com os tampões tiveram objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos para os pêlos radiculares. A escolha dos tampões foi feita com base em seus valores de pKa e com base em relatos na literatura do uso destes compostos em células vegetais (KINRAIDE; SWEENEY, 2001; KOCHIAN et al., 2003; SAMAC et al., 2003; BIBIKOVA et al., 1998; BRACCINI et al., 2000; MADHAVA RAO et al., 2006; FOUAD; RATHINASABAPATHI, 2006;)

### Foram eles:

- a) Homopiperazina-1,4-bis (2-ácido etanosulfônico) homopipes (pK<sub>a1</sub> 4,4 e pK<sub>a2</sub> 8,1) (BABOURINA et al., 2005; BABOURINA et al., 2006; KINRAIDE; SWEENEY, 2001);
- b) Ácido 3,3 dimetilglutárico (DMGA) (pKa<sub>1</sub> 3,73 e pKa<sub>2</sub> 6,71) (BIBIKOVA, 1998; YOUNG; DE WITT; SUSSMAN, 1998);

- c) Biftalato de potássio (BIF) (pKa<sub>1</sub> 2,89 e pKa<sub>2</sub> 5,51) BRACCINI et al., 2000;
- d) β-alanina (pK<sub>a1</sub> 3,7 e pK<sub>a2</sub> 10, 10) (HAMMER; BALTZ, 2003).

O tampão MES, que é um tampão biológico bastante conhecido (pKa 6,15), foi usado como controle. Todas as raízes foram expostas ao meio de referência a pH 5,8 com MES por 30 a 40 min. Em seguida, foram transferidas para o mesmo meio de referencia adicionado dos respectivos tampões na concentração de 10 mM a pH 4,5 e 5,8. As raízes permaneceram nesses tratamentos por mais 20 a 30 min.

## 5.11. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo cada pêlo tratado como uma repetição

#### 6. RESULTADOS

## 6.1. Avaliação do alongamento de pêlos radiculares e sua variabilidade no sistema experimental desenvolvido

Os pêlos radiculares são muito utilizados para estudos sobre a biologia de células de alongamento polarizado, e também possuem características que as tornam interessantes como sistema modelo para o estudo de diversos outros processos celulares (FOREMAN; DOLAN, 2001). São, no entanto, sistemas delicados, sensíveis a diferentes perturbações, inclusive mecânicas (GALWAY; LANE; SCHIEFELBEIN, 1999; JONES; RAYMOND; SMIRNOFF, 2006). Assim, é importante ter um bom sistema experimental para o estudo destas células. Existem alguns métodos que já foram desenvolvidos e utilizados para Arabidopsis (BABOURINA et al., 2001; PREUSS et al., 2004; WYMER; BIBIKOVA; GILROY, 1997).

Para que possa ser utilizado com êxito, um sistema experimental deve possuir algumas características como: a produção de boa quantidade de pêlos, boa visualização em microscópio, permitindo a análise do alongamento, além de possibilitar a realização de uma série de manipulações, como a troca de soluções de tratamento, com o mínimo possível de interferência indesejável sobre as células. Para as medidas de alongamento celular, é preferível que a raiz esteja imobilizada.

*Arabidopsis thaliana* apresenta taxa de alongamento do pêlo radicular de aproximadamente 1 μm.min<sup>-1</sup> (HALPERIN; GILROY; LYNCH, 2003). Já em *Limnobium stoloniferum*, encontrou-se taxas de alongamento dos pêlos radiculares de cerca de 0,5 a 0,6 μm.min<sup>-1</sup> (JONES; SHAFF; KOCHIAN, 1995), semelhantes às taxas que foram encontradas no presente estudo.

Mesmo tendo otimizado o sistema experimental para o estudo dos pêlos radiculares, observou-se alta variabilidade nas taxas de alongamento mensuradas. Com o objetivo de se caracterizar a natureza desta variação, e possivelmente identificar a sua fonte, algumas análises foram feitas.

### 6.1.1. Análise da relação entre a taxa de alongamento e o comprimento inicial do pêlo

Sabe-se que a taxa de alongamento do pêlo varia durante seu desenvolvimento (VOLGGER et al., 2010). Portanto, uma das primeiras fontes da variabilidade na taxa de alongamento a ser cogitada foi o fato dos pêlos examinados se encontrarem em diferentes fases de desenvolvimento, já que o comprimento inicial dos mesmos variou bastante.

Quando se comparou o comprimento inicial dos pêlos tratados diretamente com meio mínimo (MMin) a pH 5,8 com a taxa de alongamento dos mesmos, não se observou nenhuma relação aparente (Figura 4). Pêlos de comprimentos próximos exibem taxas de alongamento bem distintas. Por exemplo, pêlos com comprimento inicial de 50 a 60 µm apresentaram taxas de alongamento que variaram de 0,09 a 0,54 µm.min<sup>-1</sup>.

A única exceção talvez seja o caso de pêlos muito longos, maiores que 200 μm, pois podem estar próximos de encerrar seu alongamento. Os dados apresentados por Volgger et al. (2010) mostram que a variação na taxa de alongamento ocorre principalmente quando os pêlos são ainda pequenos ou estão se aproximando de sua extensão final.

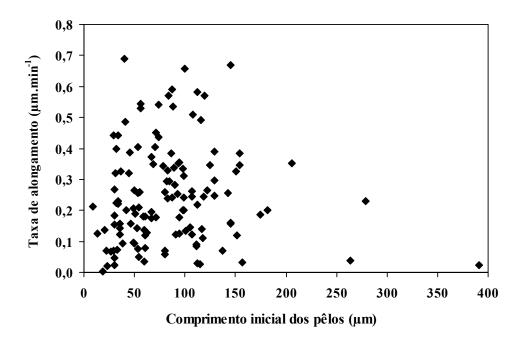


Figura 4 - Correlação entre o comprimento inicial dos pêlos radiculares e a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>), acompanhados por 90 a 135 min. O número total de pêlos analisados foi de 127, de 16 raízes, analisados em 4 experimentos independentes. O comprimento inicial médio dos pêlos foi de 84,5 μm e o alongamento absoluto médio e a taxa de alongamento médio no período foi de 29,6 μm e 0,25 μm.min<sup>-1</sup>, respectivamente.

6.1.2. Análise da variabilidade da taxa de alongamento dos pêlos radiculares dentro e entre raízes

Analisando os resultados obtidos de cada raiz e dos diferentes dias em que foram realizados os experimentos, verifica-se que a principal fonte de variabilidade foi ao nível de cada raiz individual (Tabela 2). A taxa de alongamento encontrada em cada ensaio, realizados em dias diferentes, não teve variação significativa (de 0,21 a 0,27 µm.min<sup>-1</sup>), mas o desvio padrão dos dados obtidos em cada experimento (dia) foi alto (de 0,10 a 0,21).

Isso indica que a variação na taxa de alongamento ocorre principalmente entre as raízes, fato este confirmado quando comparamos a taxa de alongamento dos pêlos de cada raiz. Assim, a taxa de alongamento médio dos pêlos de cada raiz variou de 0,07 a 0,51 µm.min<sup>-1</sup>, e o desvio padrão também variou consideravelmente de 0,04 a 0,22. No total, foram acompanhadas 16 raízes e em cada uma delas, um número variado de pêlos teve seu alongamento acompanhado.

Quando comparamos a taxa de alongamento dos pêlos em uma mesma raiz com o seu desvio padrão correspondente, observamos que a variação do alongamento é baixa. Por exemplo, a raiz 2 tem taxa de alongamento de 0,30 µm.min<sup>-1</sup>, com desvio padrão de 0,082.

Tabela 2 - Variabilidade das taxas de alongamento de pêlos radiculares de Micro-Tom em MMin, a pH 5,8, dentro de cada raiz, entre raízes e entre experimentos realizados em dias diferentes

Experiment o (dia)	Raiz	Média da taxa de alongamento (μm.min <sup>-1</sup> ) – por raiz	Desvio padrão	Média da taxa de alongamento (μm.min <sup>-1</sup> ) – por dia	Desvio padrão
1	1	0,15	0,114	0,21	0,102
	2	0,30	0,082		
	3	0,14	0,057		
	4	0,20	0,093		
2	5	0,35	0,119	0,25	0,117
	6	0,25	0,078		
	7	0,19	0,090		
	8	0,21	0,061		
	9	0,13	0,047		
3	10	0,09	0,108	0,26 0,1	0,199
	11	0,51	0,101		
	12	0,36	0,060		
	13	0,12	0,070		
4	14	0,26	0,070	0,27	0,209
	15	0,07	0,040		
	16	0,51	0,216		
	Média	0,24	0,088		
Desvio	padrão	0,135			

# 6.1.3. Análise temporal da taxa de alongamento do pêlo radicular ao longo do período de observação

Embora não se tenha realizado experimentos com o objetivo específico de avaliar a taxa de alongamento ao longo do tempo, diversos experimentos foram realizados onde imagens foram obtidas em diferentes intervalos de tempo. Os dados obtidos nestes casos foram analisados para examinar se alterações na taxa de alongamento ao longo do tempo poderiam estar causando a alta variabilidade na taxa de alongamento dos pêlos.

A Figura 5 ilustra a curva de alongamento em função do tempo de diferentes pêlos de uma mesma raíz. Nota-se que a taxa de alongamento dos pêlos radiculares é relativamente constante ao longo do tempo para cada pêlo, embora seja bastante variável, conforme mencionado acima, entre os pêlos e, principalmente, entre os pêlos de diferentes raízes.

Por exemplo, quando são comparadas diferentes raízes, como as raízes 9 e 12 (Tabela 2), verifica-se que os pêlos radiculares da raiz 9 apresentaram uma taxa de alongamento de

0,13 μm.min<sup>-1</sup> com desvio padrão de 0,047, enquanto que os pêlos da raiz 12 apresentaram taxa de alongamento quase três vezes maior, de 0,36 μm.min<sup>-1</sup> com desvio padrão de 0,06.

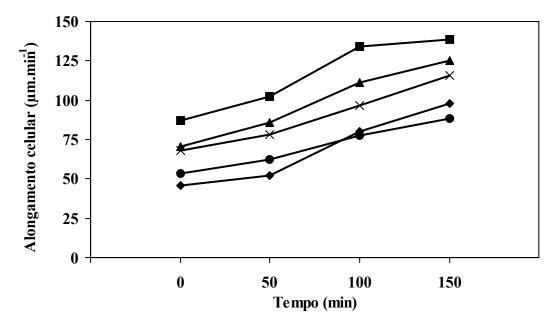


Figura 5 - Alongamento celular dos pêlos de uma raiz (raiz 9 da Tabela 2) tratada com meio mínimo (MMin) a pH 5,8 por 150 min. O alongamento foi acompanhado em períodos de 50 min em um total de 150 min. Observa-se um alongamento linear de todos os pêlos durante o tempo de tratamento.

#### 6.2. Resposta dos pêlos radiculares expostos diretamente a MMin em pH baixo

Pêlos radiculares de Micro-Tom foram tratados diretamente com MMin a pH 5,8 (controle) e pH 4,5, e seu alongamento acompanhado por 150 min. Os dados de taxa de alongamento estão apresentados na Tabela 3, e são referentes a quatro experimentos distintos, realizados em dias diferentes. Ao todo foram examinados o alongamento de 127 pêlos a pH 5,8, e de 150 pêlos a pH 4,5.

A taxa de alongamento médio dos pêlos do tratamento controle (pH 5,8) foi de 0,24 μm.min<sup>-1</sup>, o que é elevado em termos de alongamento celular em geral, mas não para pêlos radiculares. Em Arabidopsis, relatam-se taxas da ordem de 1 μm.min<sup>-1</sup> (HALPERIN; GILROY; LYNCH, 2003). Encontrou-se também uma variabilidade elevada das taxas de alongamento entre os pêlos.

O comprimento inicial dos pêlos, cujo alongamento foi avaliado, variou bastante. Nos pêlos observados no tratamento a pH 5,8, o comprimento inicial variou de 9,0 a 391,2 μm, e nos pêlos tratados com pH 4,5, variou de 10,6 a 405,6 μm. Isto demonstra que foram

analisados pêlos em várias fases de seu alongamento, e que não houve diferenças no comprimento inicial dos pêlos entre os dois tratamentos.

Comparando a taxa de alongamento dos pêlos tratados a diferentes valores de pH, foi possível observar que os pêlos expostos a pH 4,5 alongaram a uma velocidade quase metade dos pêlos expostos a pH 5,8. Apesar dos elevados desvios padrões e coeficientes de variação (CV%), o elevado número de repetições fez com que os valores de erro padrão da média fossem baixos, de modo que a diferença entre as médias foi estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 3 - Taxas de alongamento de pêlos radiculares de Micro-Tom expostos diretamente a MMin (MMin) a pH 5,8 e 4,5. A diferença mínima significativa (dms) calculada pelo Teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade foi de 0,04

	Tratamentos		
	pH 5,8	рН 4,5	
Taxa de alongamento (μm.min <sup>-1</sup> )	0,24	0,13	
Total de pêlos observados	127	150	
Desvio padrão (d.p.)	0,160	0,093	
Coeficiente de variação (CV%)	65,9	74,9	
Erro padrão da média (e.p.)	0,014	0,008	

Outro efeito da exposição a pH 4,5 foi a ruptura dos pêlos. Nos pêlos tratados com MMin a pH 4,5, de um total de 381 pêlos observados, 10,5 % destes se romperam (Figura 6). Não foi observado nenhum pêlo rompido entre aqueles tratados em pH 5,8 (Figura 6).

Efeitos semelhantes já foram relatados na literatura, embora ainda sejam poucos. Destes, a maioria relata apenas a ruptura dos pêlos (JONES; SHAFF; KOCHIAN, 1995; MONSHAUSEN et al., 2007). Alguns outros trabalhos já relataram o efeito do abaixamento do pH sobre a redução da taxa de alongamento (BIBIKOVA et al., 1998; HERRMANN; FELLE, 1995).

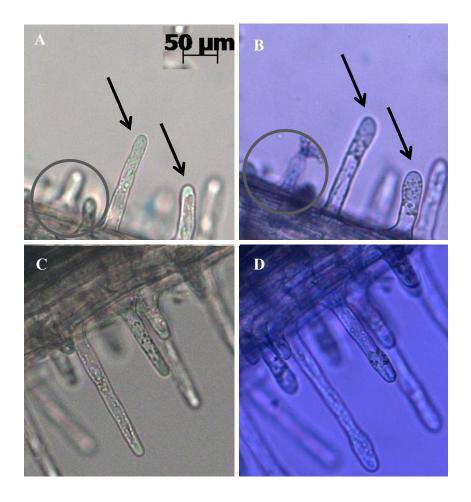


Figura 6 - Pêlos radiculares de Micro-Tom tratados com meio mínimo (MMin) a pH 4,5 (A) e pH 5,8 (C) e coradas com trypan blue (B e D). Os pêlos que não estouraram tiveram seu crescimento acompanhado (setas), e os que estouraram estão indicados com circulado na foto (A e B).

# 6.3. O fornecimento dos sais do meio MS afeta a taxa de alongamento dos pêlos pelas mudanças de osmolaridade não de nutrientes

Foi postulado que pequenas variações nos níveis de nutrientes no meio semi-sólido poderiam causar variações no alongamento dos pêlos, já que o MMin continha poucos nutrientes minerais e em níveis não muito elevados. Assim, visando testar esta hipótese, os pêlos foram expostos a meio contendo os sais de MS na sua concentração completa e pela metade (MS/2). Ao contrário do que se esperava, a taxa de alongamento dos pêlos no meio MS/2 foi mais elevada do que no meio MS (Figura 7).

Suspeitou-se que estes resultados foram causados pelas diferenças na osmolaridade das duas soluções, e não dos seus níveis de nutrientes. Para testar isto, pêlos radiculares foram

expostos a MMin, cuja osmolaridade foi corrigida com manitol para que alcançasse os valores das soluções de MS (123 mOsm) e MS/2 (76 mOsm), ambos acrescidos de 1% de sacarose.

O alongamento dos pêlos radiculares tratados com MS e MS/2 foi respectivamente, 0,344 e 0,469 µm.min<sup>-1</sup>, muito próximo do alongamento dos pêlos tratados com MMin em 123 mOsm (MS) e 76 (MS/2), que foi de 0,368 e 0,437 (Figura 7). Portanto, foi observado um aumento da taxa de alongamento com a diminuição da osmolaridade, um resultado esperado, já que o aumento da pressão de turgor é um fator que influencia o alongamento celular (TAIZ, 1984). Estes resultados colocaram em evidência a importância da osmolaridade da solução de tratamento, e serviram de base para os experimentos seguintes.

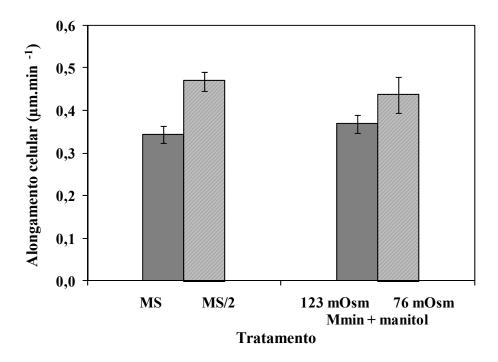


Figura 7 - As taxas de alongamento de pêlos radiculares de Micro-Tom quando expostas diretamente a soluções com diferentes níveis de nutrientes e diferentes osmolaridades. As soluções empregadas foram: (MS) os sais do meio de MS + 1% de sacarose; (MS/2) metade da concentração dos sais de MS + 1 % de sacarose; (MMin + manitol) meio mínimo com adição de manitol para ajustar a osmolaridade da solução para 123 e 76 mOsm, os quais são de osmolaridade equivalente ao do meio MS e MS/2, respectivamente. As barras indicam o erro padrão da média (n= 52 a 126).

# 6.4. Curva de resposta da taxa de alongamento do pêlo radicular em função da osmolaridade da solução de tratamento

O efeito da osmolaridade da solução de tratamento (MMin + manitol) sobre a taxa de alongamento dos pêlos radiculares está apresentada na Figura 8. Observa-se que, à medida que a osmolaridade da solução de tratamento diminuiu de 300 a 76 mOsm, ocorreu um aumento na taxa de alongamento dos pêlos, de 0,129 a 0,437 µm.min<sup>-1</sup>. Este resultado era esperado conforme já ilustrado na Figura 8, pois se sabe que, quanto mais hipotônico o meio externo, maior será a pressão de turgor celular e, portanto, a taxa de alongamento.

A velocidade de crescimento de tubos polínicos tratados com solução hipertônica (1,8% manitol, p/v) caiu pela metade quanto comparada com aqueles tratados com solução hipotônica (1,0% manitol, p/v) (ZONIA; MÜLLER; MUNNIK, 2006). Vollger et al. (2010) relatam que pêlos radiculares de *Triticum aestivum* tratados em solução hipertônica (200 a 650 mOsm) apresentaram parada no alongamento.

O resultado interessante da Figura 8 é que, a partir da diminuição da osmolaridade do MMin de 76 para 41 mOsm, ao invés de um aumento na taxa de alongamento, este caiu de 0,437 para 0,137 µm.min<sup>-1</sup>. Ou seja, há uma curva de resposta onde há uma queda muito acentuada na taxa de alongamento dos pêlos em um intervalo relativamente pequeno de variação na osmolaridade da solução. Denominaremos de choque hipo-osmótico os tratamentos hipo-osmóticos mais acentuados, principalmente aqueles que resultem em redução na taxa de alongamento ou ruptura do pêlo radicular.

Outra observação relevante é que foi possível observar o rompimento de pêlos nas osmolaridades mais baixas. Na solução de 50 mOsm houve rompimento de 2,4 % dos pêlos (de um total de 205), e a 41 mOsm foi de 1,3 % (de um total de 528). Com exceção da concentração de 100 mOsm, que apresentou o rompimento de 2 pêlos entre 157, não foi observado o rompimento de pêlos nas demais osmolaridades. Além do rompimento de pêlos, observou-se o intumescimento da extremidade do pêlo radicular nas osmolaridades mais baixas.

Há semelhanças interessantes entre o comportamento frente ao pH baixo e aos tratamentos hipo-osmóticos. Estes dados indicam que, tanto no caso do tratamento a pH baixo, como nos tratamentos de choque hipo-osmótico, que chegou próximo ou mesmo ultrapassou o limite de resistência da parede celular. Em aparente contradição, em ambos os casos estas condições também estavam associadas a reduções acentuadas na taxa de alongamento.

Assim como em leveduras, existem boas evidências de que células vegetais possuem um sistema de monitoramento e resposta ao comprometimento da integridade da parede celular (LEVIN, 2005).

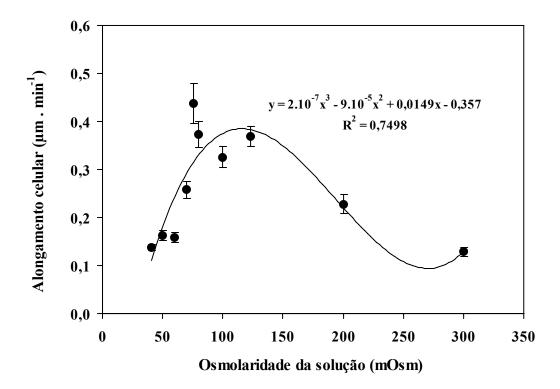


Figura 8 - Curva de resposta das taxas de alongamento de pêlos radiculares de Micro-Tom quando expostas diretamente a soluções com diferentes osmolaridades. O meio consistia em MMin (pH 5,8) + manitol para ajustar a solução à osmolaridade final. As barras indicam o erro padrão da média (n= 59 a 354).

## 6.5. Estabelecimento de uma solução de referência para o tratamento inicial dos pêlos radiculares

Conforme descrito, observou-se alta variabilidade na taxa de alongamento dos pêlos radiculares. Em quase todos os trabalhos que analisam o alongamento de pêlos radiculares, este fator é contornado, pois os experimentos são realizados acompanhando-se pêlos individuais. Selecionam-se pêlos com determinado comprimento e taxa de alongamento, e depois aplica-se os tratamentos experimentais. Embora haja dúvidas sobre a representatividade desta abordagem, ela possui uma vantagem interessante, que é a possibilidade de se avaliar os resultados em termos relativos à condição padrão ou controle

inicial. Assim, no presente caso, a avaliação inicial de todos os pêlos radiculares, a uma única condição aqui denominada de referência, com a aplicação subsequente do tratamento, permitiria a expressão dos resultados em termos relativos, e deveria reduzir a variabilidade dos resultados.

O estabelecimento de uma condição de referência inicial precisa atender a duas condições: permitir, primeiro, boas condições para o alongamento dos pêlos e, segundo, a aplicação subsequente dos tratamentos. Considerando o efeito da osmolaridade sobre o alongamento dos pêlos radiculares, e a intenção de se aplicar tratamento hipo-osmóticos subsequentes, o estabelecimento do meio de referência foi dirigido no sentido de se encontrar a osmolaridade ideal para esta finalidade, que não poderia ser muito alta, de maneira a inibir o alongamento do pêlo, ou muito baixa, de maneira a inviabilizar a aplicação de tratamentos hipo-osmóticos.

Como ponto de partida, primeiramente se determinou a osmolaridade da solução externa (MMin + manitol) que fosse aproximadamente isotônica em relação ao citoplasma. Isto foi determinado observando-se a presença de plasmólise incipiente e pela paralisação do alongamento celular. Estimou-se que esta condição seria aproximadamente de 300 mOsm.

Em seguida, experimentos foram realizados onde os pêlos foram primeiramente expostos a MMin acrescido de manitol, com osmolaridade final de 150, 200 e 300 mOsm, por cerca de 30 min, e depois expostos por mais 30 min em solução de MMin + manitol com osmolaridade de 76 ou 41 mOsm. Ou seja, testou-se a condição de aplicação do choque hipo-osmótico.

Os resultados das taxas de alongamento, tanto na condição do meio de referência como no choque hipo-osmótico subsequente estão apresentados na Figura 9. O alongamento dos pêlos foi claramente inibido com o choque hipo-osmótico, mas foi mais acentuado a 41 do que a 76 mOsm. Pêlos tratados inicialmente com 150 mOsm tiveram seu alongamento diminuído para 91% a 76 mOsm e para 64% a 41 mOsm. Aqueles tratados com 200 mOsm tiveram o alongamento diminuído para 74% a 76 mOsm e a 43% a 41 mOsm. Por fim, aqueles tratados com 300 mOsm sofreram redução no seu alongamento a 54% a 76 mOsm.

A porcentagem do número de pêlos que se romperam com os tratamentos hipoosmóticos variou. No choque hipo-osmótico de 150 a 76 mOsm, cerca de 7 % dos pêlos se romperam. Já de 150 para 41 mOsm, o número de pêlos rompidos praticamente triplicou (29%).

A partir destes resultados, optou-se pelo uso do meio a 150 mOsm (MMin + manitol) como meio de referência.

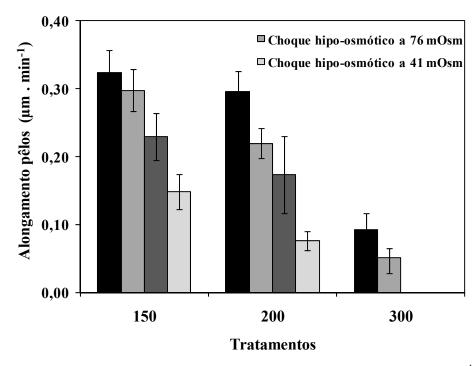


Figura 9 - Efeito de diferentes choques osmóticos sobre a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>) absoluto de pêlos radiculares de Micro-Tom. As soluções consistiam de MMin (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 10 mM MES, pH 5,8) + manitol para alcançar a osmolaridade final. As barras indicam o erro padrão da média (n= 18 a 79).

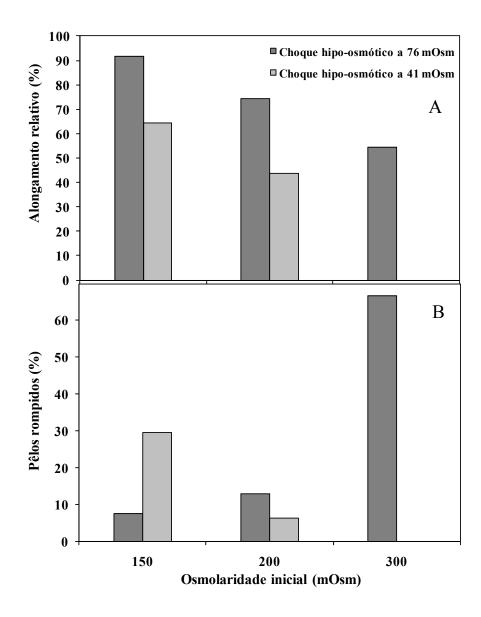


Figura 10 - Efeito de diferentes choques osmóticos sobre a taxa de alongamento relativo (A) e a porcentagem de pêlos rompidos (B) em pêlos radiculares de Micro-Tom. Os dados são relativos ao ensaio apresentado na Figura anterior. O alongamento relativo foi calculado dividindo-se a média da taxa de alongamento dos pêlos em solução hipo-osmótica pela média na solução inicial.

### 6.6. Choque hipo-osmótico associado a alterações de pH

A partir da determinação do meio de referência, foi testado o efeito do choque hipoosmótico e da variação de pH no alongamento dos pêlos. Pêlos radiculares foram primeiramente expostos a meio de referência (150 mOsm) a pH 5,8 por 30 a 40 min. Após esse período, o meio foi trocado pelo outro de osmolaridade menor (76 e 41 mOsm) de pH igual ou menor (5,8 ou 4,5). Os pêlos permaneceram incubados neste meio de 20 a 30 min. Na Figura 11 encontram-se as taxas de alongamento, em valores absolutos, durante os dois períodos de tratamento. Em todos os casos houve uma queda maior na taxa de alongamento dos pêlos com o abaixamento do pH do que no choque hipo-osmótico, com exceção somente do choque para 41 mOsm a pH 5,8 onde o alongamento foi um pouco menor que em 41 mOsm a pH 4,5 (Figura 11).

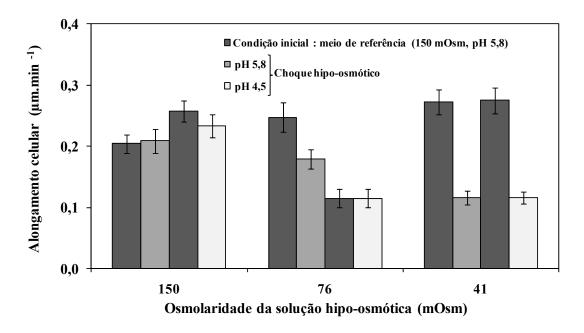


Figura 11 - Efeito de diferentes choques osmóticos, realizados a pH 5,8 e 4,5, sobre a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>) absoluto de pêlos radiculares de Micro-Tom. Com exceção do pH e da osmolaridade, que foi ajustada com manitol, as soluções foram semelhantes às descritas na Figura 9. As barras indicam o erro padrão da média (n= 43 a 79).

Na Figura 12A está representado o alongamento relativo dos mesmos pêlos. Quando se manteve a osmolaridade do meio (150 mOsm), e diminuiu-se o pH (de 5,8 para 4,5), observou-se uma queda de 10% no alongamento dos pêlos. Quando se diminuiu a osmolaridade para 76 mOsm, o alongamento caiu a 72%. Para 41 mOsm, o alongamento caiu para 42% nessas mesmas osmolaridades mas, variando o pH de 5,8 para 4,5, as taxas de alongamento caem ainda mais (51% e 52%).

Quando comparamos a porcentagem de pêlos rompidos (Figura 12), observamos que a maior porcentagem ocorreu no choque osmótico para 41 mOsm a pH 5,8 (20%), seguido do choque de mesma osmolaridade a pH 4,5 (13%); o mesmo não é observado no choque para 76

mOsm. Durante o choque osmótico a 76 mOsm a pH 5,8, a porcentagem de pêlos rompidos (3,8%) foi menor que durante o choque a mesma osmolaridade a pH 4,5 (12%).

A Figura 13 mostra o alongamento dos pêlos tratados com outras duas osmolaridades mais próximas de 150 mOsm (123 e 100 mOsm), enquanto na Figura 14A está ilustrado o crescimento relativo. Ao contrário do que aconteceu com as concentrações menores (41 e 76 mOsm), o alongamento a 123 e 100 mOsm a pH4,5 foi maior do que a pH 5,8 (104 / 91% a 123 mOsm e 93 / 79% a 100 mOsm). O mesmo aconteceu a 76 mOsm, que apresentou maior alongamento a pH 4,5 que a pH 5,8 (61 / 33%).

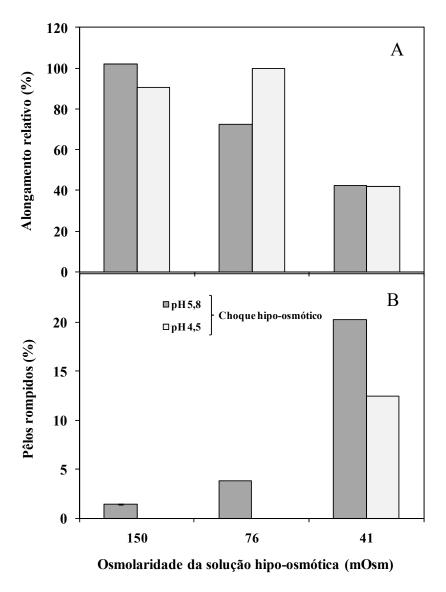


Figura 12 – Efeito de diferentes choques osmóticos, realizados a pH 5,8 e 4,5, sobre a taxa de alongamento relativo (A) e a porcentagem de pêlos rompidos (B) em pêlos radiculares de Micro-Tom. Os dados são relativos ao ensaio apresentado na Figura anterior. O alongamento relativo foi calculado dividindo-se a média da taxa de alongamento dos pêlos em solução hipo-osmótica pela média da solução inicial.

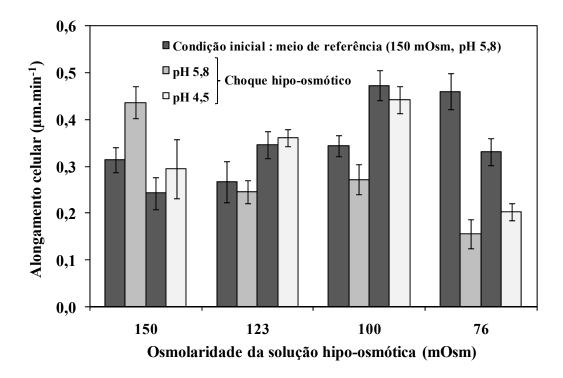


Figura 13 - Efeito de diferentes choques osmóticos, realizados a pH 5,8 e 4,5, sobre a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>) absoluto de pêlos radiculares de Micro-Tom. As soluções consistiam de MMin (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 10 mM MES, pH 5,8) + manitol para alcançar a osmolaridade final Com exceção do pH e da osmolaridade, que foi ajustada com manitol, as soluções foram semelhantes às descritas na Figura 9. As barras indicam o erro padrão da média (n= 39 a 60).

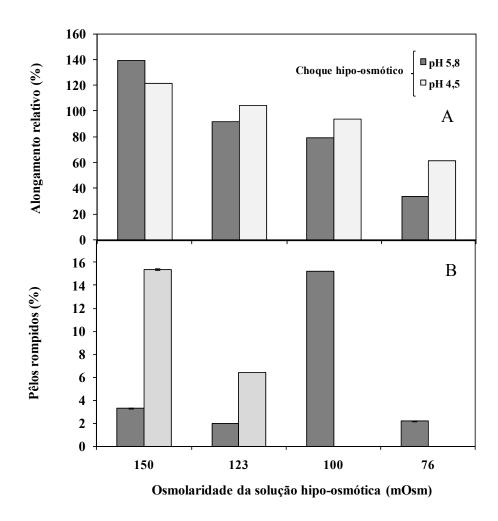


Figura 14 - — Efeito de diferentes choques osmóticos, realizados a pH 5,8 e 4,5, sobre a taxa de alongamento relativo (A) e a porcentagem de pêlos rompidos (B) em pêlos radiculares de Micro-Tom. Os dados são relativos ao ensaio apresentado na Figura anterior. O alongamento relativo foi calculado dividindo-se a média da taxa de alongamento dos pêlos em solução hipo-osmótica pela média da solução inicial.

# 6.7. Evidências de possível papel da modulação oxidativa da parede celular na resposta ao choque hipo-osmótico

Os dados apresentados evidenciam a existência em pêlos radiculares de um sistema de percepção e resposta a estresse e ao comprometimento da integridade da parede destas células. Quando os pêlos foram submetidos a condições em que a parede ficou ameaçada de ceder, uma resposta celular resultou na diminuição do alongamento destas células. Quando a resposta não ocorreu a tempo, ocorreu o rompimento do pêlo radicular, conforme já descrito.

No caso de choque hipo-osmótico, a resposta celular poderia ocorrer de duas formas gerais. Uma envolvendo o ajustamento osmótico, de modo a reduzir a pressão de turgor, e outra envolvendo o enrijecimento da parede. Ambas levam a uma redução no alongamento celular.

O efluxo de íons, principalmente de K<sup>+</sup>, poderia ser um mecanismo simples para aliviar o aumento da pressão de turgor. No entanto, uma série de trabalhos de Lew (1996, 1998 e 2004) examinou o efeito de estresse hiper- e hipo-osmótico no potencial elétrico da membrana plasmática, do vacúolo e no fluxo de íons. Estes trabalhos relataram alguns comportamentos inesperados e concluíram que alterações no fluxo de íons causados pelo choque hipo-osmótico não foram significativos e que estariam mais relacionados com mecanismos de sinalização do que com ajustamento osmótico.

Além disto, a exposição de pêlos radiculares de Micro-Tom a pH baixo (4,5) também causaram estresse da parede, ameaçando a sua integridade. Como neste caso, não há alterações osmóticas, um ajustamento osmótico não contribuiria para a manutenção da integridade da parede do pêlo radicular.

Assim, tanto para o estresse hipo-osmótico quanto para o estresse causado por pH baixo, procurou-se examinar um mecanismo que resultasse no enrijecimento da parede celular. Sabe-se que a modulação oxidativa da parede celular é um processo crítico no desenvolvimento normal do pêlo radicular (CAROL; DOLAN, 2006). Além disto, Monshausen et al. (2007) obtiveram boas evidências de que a modulação oxidativa da parede era processo que determinava se pêlos radiculares de Arabidopsis se rompiam quando submetidas a pH baixo. Por fim, sabe-se que o choque hipo-osmótico pode causar uma explosão oxidativa em células vegetais (ROUET; MATHIEU; LAURIERE, 2006), que poderia levar a modificações na extensibilidade da parede celular.

A seguir, procurou-se evidências de um papel da modulação oxidativa da parede na resposta dos pêlos ao estresse da parede gerado principalmente pelo choque hipo-osmótico.

### 6.7.1 Choque hipo-osmótico a pH 5,8, na presença de $H_2O_2$ e ácido ascórbico

Neste caso, os pêlos passaram por um choque hipo-osmótico a um pH constante de 5,8, na presença de ascorbato, um antioxidante (scavenger) geral, ou na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual é a única forma de ROS estável o suficiente para ser utilizada experimentalmente.

Semelhante aos ensaios anteriores, os pêlos foram incubados primeiramente em meio de referência a pH 5,8 por 30 a 40 min e em seguida transferidas para as soluções de tratamento.

Na Figura 15, estão apresentados as taxas de alongamento dos pêlos nos diferentes tratamentos. A presença de ascorbato ou  $H_2O_2$  no ensaio de choque hipo-osmótico não afetou a taxa de alongamento dos pêlos em relação ao controle, no qual não houve a adição de nenhum dos dois compostos. Ou seja, o choque hipo-osmótico reduziu a taxa de alongamento dos pêlos radiculares igualmente, nos três tratamentos, a patamares em torno de 33% da taxa de alongamento que ocorria no meio de referência.

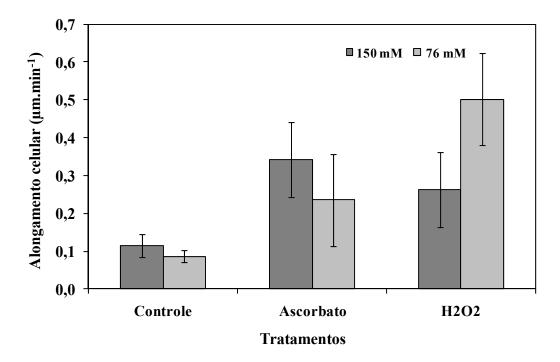


Figura 15 – Efeito do choque hipo-osmóticos, realizados a pH 5,8 na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ascorbato, sobre a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>) absoluto de pêlos radiculares de Micro-Tom. As soluções consistiam de meio de referência (MMin +manitol) + manitol para alcançar a osmolaridade final. A concentração final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi de 1 μM e a de ascorbato foi de 100 μM. As barras indicam o erro padrão da média (n= 70 a 89).

Estes resultados não foram totalmente esperados, principalmente no caso do tratamento com ascorbato. Esperava-se que a presença deste antioxidante resultasse em um aumento na porcentagem de pêlos que se rompessem com o choque hipo-osmótico, conforme relatado por Monshausen et al., (2007) em pêlos de Arabidopsis com a adição de 100 μM de ácido ascórbico. Possívelmente os efeitos do ascorbato e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tivessem sido mais acentuados se tivessem sido aplicados um pouco antes da imposição do choque hipo-osmótico.

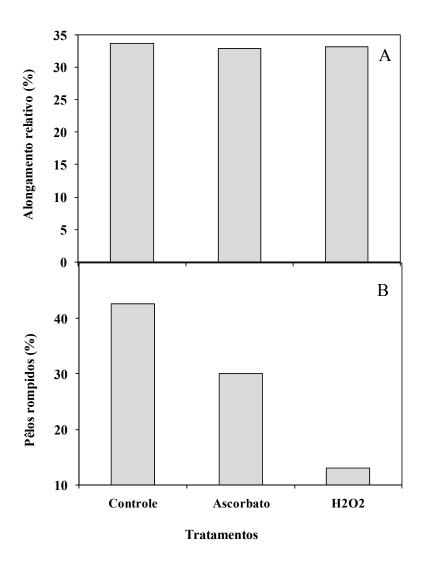


Figura 16 - Efeito de choque hipo-osmóticos, realizados a pH 5,8 na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ascorbato, sobre a taxa de alongamento relativo (A) e a porcentagem de pêlos rompidos (B) em pêlos radiculares de Micro-Tom. Os dados são relativos ao ensaio apresentado na Figura anterior. O alongamento relativo foi calculado dividindo-se a média da taxa de alongamento dos pêlos em solução hipo-osmótica pela média da solução inicial.

6.7.2. Choque hipo-osmótico a pH 5,8 e 4,5 na presença de inibidor (DPI) de NADPH oxidase

Pêlos radiculares foram expostos primeiramente ao meio de referência (150 mOsm) a pH 5,8, de 30 a 40 min. Após este período o meio foi trocado pelas soluções de tratamento; MMin (41 mOsm)  $\pm$  DPI (50  $\mu$ M) e o meio de referência  $\pm$  DPI, todos a pH de 5,8, onde permaneceram de 20 a 30 min. As determinações das taxas de alongamento estão apresentadas na Figura 17.

A aplicação de DPI não teve efeitos significativos sobre os pêlos que sofreram choque hipo-osmótico, ou seja, entre os tratamentos com MMin (41 mOsm)  $\pm$  DPI (Figura 17A). A redução na taxa de alongamento, resultante do choque hipo-osmótico, não foi afetado pela presença de DPI.

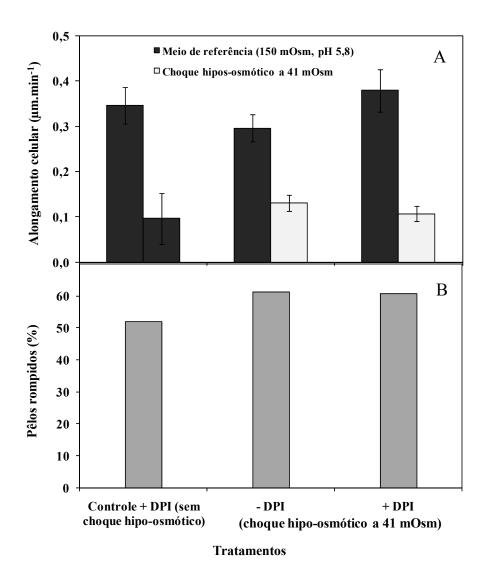


Figura 17 - Efeito do choque hipo-osmóticos a 41 mOsm, pH 5,8 na presença de DPI, sobre a taxa de alongamento relativo (A) e a porcentagem de pêlos rompidos (B) em pêlos radiculares de Micro-Tom. As soluções consistiam de meio de referência (MMin +manitol) + manitol para alcançar a osmolaridade final e MMin. A concentração final de DPI 50 μM. As barras indicam o erro padrão da média (n= 10 a 61).

No entanto, a sua aplicação em pêlos que não sofreram choque hipo-osmótico, e que permaneceram no meio de referência, reduziu a taxa de alongamento e aumentou a porcentagem de pêlos rompidos a níveis aproximadamente iguais aos pêlos que sofreram choque hipo-osmótico.

Assim, o DPI reduziu a taxa de alongamento do pêlo radicular e aumentou a porcentagem de rompimento dos pêlos, conforme já foi relatado em outros trabalhos (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007; FOREMAN et al., 2003; MACPHERSON et al., 2008). Seu efeito sobre células controle foi semelhante ao de um choque hipo-osmótico.

Houve queda no alongamento nos três tratamentos, a maior foi no controle com meio de referência mais DPI (27%). Os pêlos tratados com MMin apresentaram quase o dobro do alongamento em relação ao alongamento dos pêlos tratados com MMin mais DPI (44 e 28%, respectivamente). A porcentagem de pêlos rompidos não variou muito, 52% dos pêlos tratados com meio de referência + DPI se romperam, 60% daqueles tratados com MMin + DPI se romperam e 61% somente com MMin.

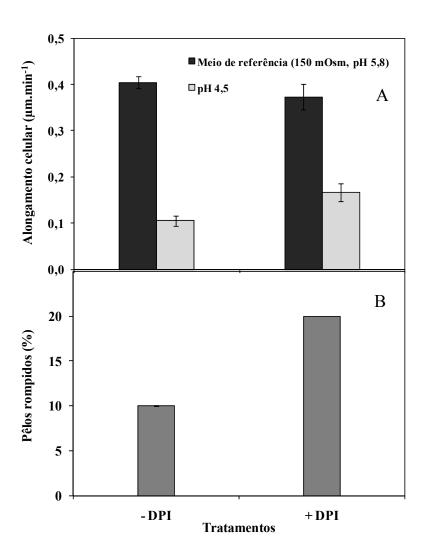


Figura 18 – Efeito de choque hipo-osmótico a 76 mOsm a pH 4,5, sobre a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>) absoluto de pêlos radiculares de Micro-Tom(A) e a porcentagem de pêlos rompidos (B) em pêlos radiculares de Micro-Tom.. As soluções consistiam de meio de referência (MMin +manitol) e MMin + manitol a 76 mOsm para alcançar a osmolaridade final. As barras indicam o erro padrão da média (n= 5 a 20).

### 6.7.3. Choque hipo-osmótico na presença de inibidor de peroxidases (SHAM)

O ácido salicilhidroxâmico (salicylhydroxamic acid, SHAM) é conhecido inibidor de peroxidases (AITKEN et al., 2001; DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007). Também é inibidor da via alternativa de oxidases, embora a inibição de peroxidases se inicia a concentrações menores do que a inibição da via alternativa (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007).

A aplicação de SHAM diminuiu o comprimento de pêlos radiculares (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007), mas não se conhece relatos dos efeitos de SHAM sobre a taxa de alongamento de pêlos.

Em comparação com o restante da raiz, já foi relatado que a extremidade do pêlo radicular possui concentrações relativamente altas de  $H_2O_2$  (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007). Neste trabalho, aparentemente não é o caso de  $O_2^{\bullet}$ , que se acumula principalmente no apoplasto de células em alongamento (zona de alongamento) e em divisão (meristema) da raiz.

Os pêlos radiculares foram expostos a meio de referência (150 mOsm) a pH 5,8 onde permaneceram de 30 a 40 min e em seguida o meio foi trocado para MMin (41 mOsm) mais SHAM, em 4 concentrações diferentes (25, 50, 200 µM e 1 mM), a pH 5,8 onde permaneceram de 20 a 30 min.

A Figura 19A e B mostra o alongamento relativo dos pêlos tratados com meio de referência + SHAM nas quatro diferentes concentrações, e o número relativo de pêlos rompidos correspondente a cada um dos tratamentos. À medida que ocorre uma diminuição no alongamento relativo (de 82% a 25 μM de SHAM, para 40% a 1 mM de SHAM) ocorre um aumento de pêlos rompidos (de 10% a 25 μM para 44% a 1 mM). A Figura 20 mostra os mesmos parâmetros medidos anteriormente, mas após tratamento com MMin nas mesmas concentrações de SHAM.

O alongamento relativo do tratamento com o MMin + 25 μM de SHAM é menor que o alongamento do MMin sozinho (29 e 41%, respectivamente). No MMin + 50 μM e a 200 μM de SHAM, os pêlos apresentaram diminuição no alongamento (de 51 e 60%) e a 1 mM o alongamento volta a cair para 82%. A porcentagem de pêlos rompidos tratados com MMin + as quatro concentrações de SHAM aumentou junto com a concentração de SHAM. O aumento foi de 31% no MMin sem SHAM a 82% no MMin + 1 mM de SHAM.

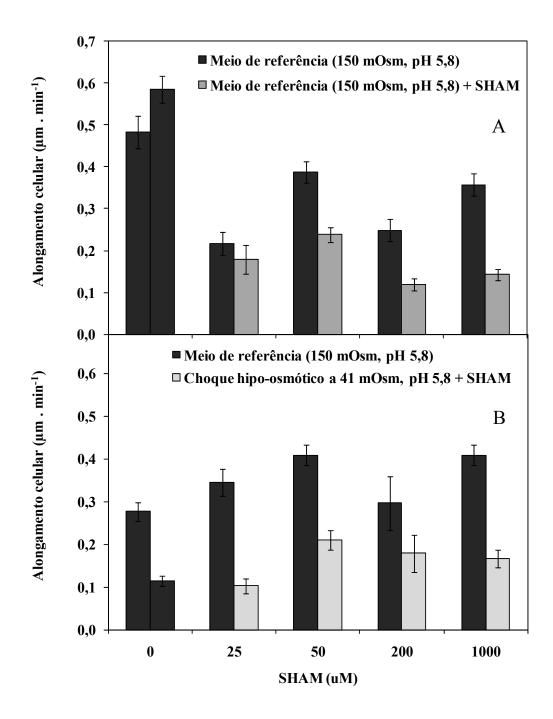


Figura 19 - Efeito do SHAM sobre a taxa de alongamento (μm.min<sup>-1</sup>) de pêlos radiculares de Micro-Tom (A) e do choque hipo-osmótico a 41 mOsm a pH 5,8 + SHAM (B). As soluções consistiam de meio de referência (MMin +manitol) e MMin a pH 5,8 e concentrações de SHAM que variaram de 0 (controle) até 1000 uM. As barras indicam o erro padrão da média (n= 19 a 107).

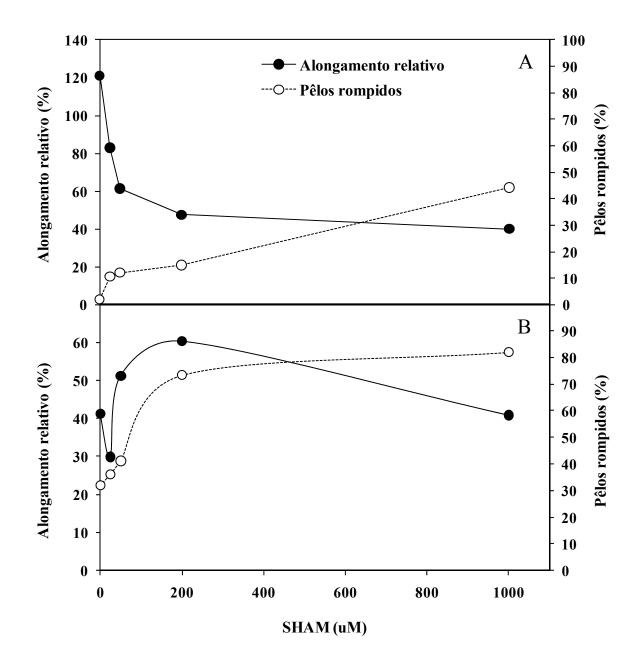


Figura 20 – Efeito do SHAM sobre o alongamento relativo e a porcentagem de pêlos rompidos em pêlos radiculares de Micro-Tom em meio de referência a pH 5,8 (A) e a choque hipo-osmótico a 41 mOsm, pH 5,8. As soluções consistiam de meio de referência (MMin +manitol e MMin. A concentração final de SHAM variou de 0 (controle) a 1000 uM.

# 6.8. Caracterização de mutantes hormonais de MT quanto à formação e alongamento de pêlos radiculares

Esta etapa teve como objetivo caracterizar e identificar diferenças no desenvolvimento dos pêlos radiculares seja na sua densidade, comprimento ou taxa de alongamento, de cinco

mutantes hormonais, os quais foram comparados com Micro-Tom. Para isto, os pêlos foram expostos diretamente ao MMin a pH 5,8.

A Figura 21 mostra os resultados de alongamento dos pêlos, de experimentos realizados em quatro dias diferentes e com duplicata de cada mutante e do controle. Não foi possível observar diferenças significativas nas taxas de alongamento entre o MT e os mutantes hormonais testados. As taxas de alongamento variaram de 0,34 μm.min<sup>-1</sup> em *dgt* a 0,24 μm.min<sup>-1</sup> em *dpy*. O Micro-Tom apresentou taxa de alongamento intermediária entre os mutantes de 0,29 μm.min<sup>-1</sup>. Em nenhum dos casos foi observado o rompimento de pêlos.

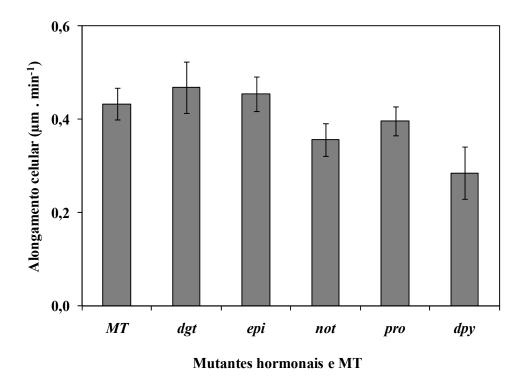


Figura 21 – Alongamento celular dos pêlos de MT e de mutantes hormonais (*dgt*, *epi*, *not*, *pro*, *dpy*) tratados diretamente com meio mínimo (MMin) a pH 5,8 por 90 min. As barras indicam o erro padrão da média (n= 24 a 51).

Apesar de não apresentarem diferenças entre as taxas de crescimento, foram observadas diferenças quanto à distribuição dos pêlos ao longo da raiz (Figura 22). Os mutantes *dgt* e *epi* (Figura 22 A e B, respectivamente) apresentaram uma distribuição semelhante entre si, e bem distinto dos demais. A densidade de pêlos foi mais alta, e observou-se um rápido aumento no comprimento dos pêlos no sentido longitudinal da raiz. Os mutantes *not* e *pro*, assemelharam-se ao Micro-Tom (controle), apresentando pêlos de comprimentos próximos e bem

distribuídos, não se concentrando em uma região determinada. O mutante *dpy* apresentou uma densidade de pêlos semelhante, mas o comprimento foi mais variável.

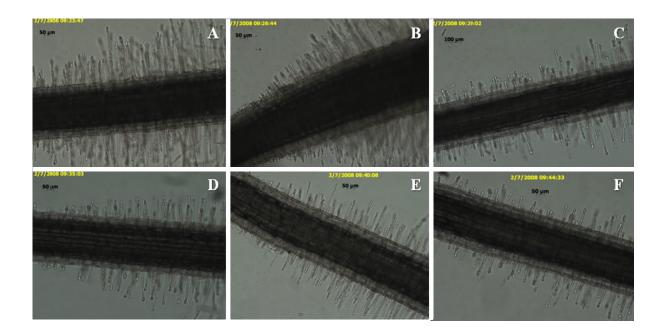


Figura 22 - Mostra a distribuição dos pêlos radiculares nos diferentes mutantes hormonais (A, B, C, D, E) e no controle Micro-Tom (G) tratados diretamente com meio mínimo (MMin) a pH 5,8.(A) *dgt*: pouco sensível a auxina; (B) *epi*: super produtor de etileno; (C) *rot*: deficiente em ABA; (D) *pro*: super sensível a GA; (E) *dpy*: deficiente a BR; e (F) Micro-Tom: controle.

### 6.9. Tratamento hipo-osmótico de pêlos de mutantes hormonais de MT

6.9.1. Exposição direta de pêlos do mutante super produtor de etileno (epi) a solução hipoosmótica

Os pêlos radiculares do mutante super produtor de etileno (*epi*) e do Micro-Tom (controle) foram incubados diretamente em MMin (41 mOsm) ou MMin + manitol, a 76 e 300 mOsm, a pH 5,8. O objetivo foi avaliar a resposta dos pêlos deste mutante a soluções de osmolaridade diferentes, numa versão simplificada da curva de resposta a osmolaridade apresentada na Figura 23.

Os resultados do alongamento de pêlos de *epi* e MT nestas condições estão apresentados na Figura 23, e são provenientes de quatro experimentos independentes. O mutante *epi* apresentou taxa de alongamento inferior ao Micro-Tom em 300 e 76 mOsm, mas a 41 mOsm, a taxa de alongamento de *epi* continuou aumentando com a hipo-osmolaridade enquanto a de Micro-Tom diminuiu acentuadamente. No tratamento a 41 mOsm, observou-se o rompimento de pêlos em ambos os materiais, sendo 6,9 % em *epi* e 1,8% em MT.

A maior produção de etileno em *epi* parece afetar, de forma ainda desconhecida, a resposta de inibição do alongamento em condições que favorecem o rompimento celular.

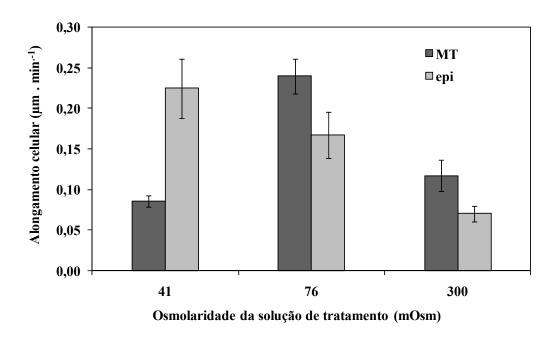


Figura 23 - Alongamento celular dos pêlos de MT e do mutante hormonal (*epi*) tratados diretamente com MMin (41 mOsm), 76 mOsm (MMin + manitol) e a 300 mOsm a pH 5,8 por 90 min. As barras indicam o erro padrão da média (n= 30 a 69).

### 6.9.2. Choque hipo-osmótico em mutantes selecionados

Os pêlos radiculares de três mutantes hormonais (*epi*, *dgt* e *not*) e do MT foram incubados em meio de referência (pH 5,8) por 30 a 40 min e depois expostos a choque hipo-osmótico com MMin (41 mOsm, pH 5,8) por mais 20 a 30 min. A resposta do pêlos a estas condições está apresentada na Figura 24A. Conforme já foi observado nos experimentos anteriores com choque hipo-osmótico, observou-se uma queda na taxa de alongamento e o

rompimento de pêlos em todos os materiais. No entanto, isto ocorreu com diferentes graus de intensidade. O mais afetado foi o MT, que apresentou uma queda de 60% no alongamento dos pêlos e 58% dos pêlos rompidos. O mutante *not* também apresentou queda no alongamento e alto índice de pêlos rompidos (58% e 57%, respectivamente). Os mutantes *dgt* e *epi* apresentaram uma menor redução no alongamento (27% e 26%, respectivamente), assim como menor porcentagem de rompimento de pêlos (16% e 26%, respectivamente).

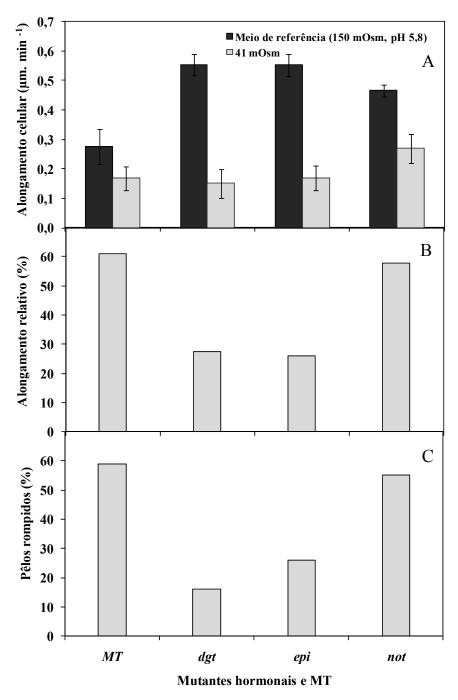


Figura 24 – Efeito do choque hipo-osmótico a 41 mOsm, pH 5,8 (A) no alongamento celular dos pêlos de MT e de mutantes hormonais (*dgt*, *epi*, *not*, *pro*, *dpy*) juntamente com o alongamento relativo (B) e a porcentagem de pêlos rompidos (C). As barras indicam o erro padrão da média (n= 20 a 46).

## 6.10. Efeito de diferentes tampões sobre o alongamento de pêlos

Pêlos radiculares de Micro-Tom foram tratados com meio de referência e tampão MES (10 mM) a pH 5,8 por aproximadamente 30 min. Em seguida, as raízes foram transferidas para meio idêntico, mas com tampão a ser testado, tanto a pH 5,8 como a 4,5.

A Figura 25A mostra o alongamento dos pêlos durante o primeiro intervalo de tempo, somente em contato com tampão MES a pH 5,8, e no segundo intervalo de tempo.

Todos os tampões, com exceção do biftalato, apresentaram aumento de alongamento a pH 5,8. Entre os tampões testados, o DMGA foi aquele que mais favoreceu o alongamento dos pêlos (120%), depois foi o homopipes (108%) bem próximo da β-alanina (104%). O único que apresentou queda no alongamento foi o biftalato (86%).

Em pH 4,5 (Figura 26A) os pêlos tratados com todos os tampões apresentaram queda na taxa de alongamento. Em β-alanina, a taxa de alongamento dos pêlos caiu aproximadamente pela metade (54%), em seguida veio o homopipes (41%) e o DMGA (28%). Os pêlos radiculares em biftalato praticamente não se alongaram (9%).

Existem alguns poucos trabalhos na literatura que relatam o uso desses tampões a pH baixo. No entanto, não existem estudos que verificaram se há interferência no alongamento e/ou metabolismo celular por estes tampões.

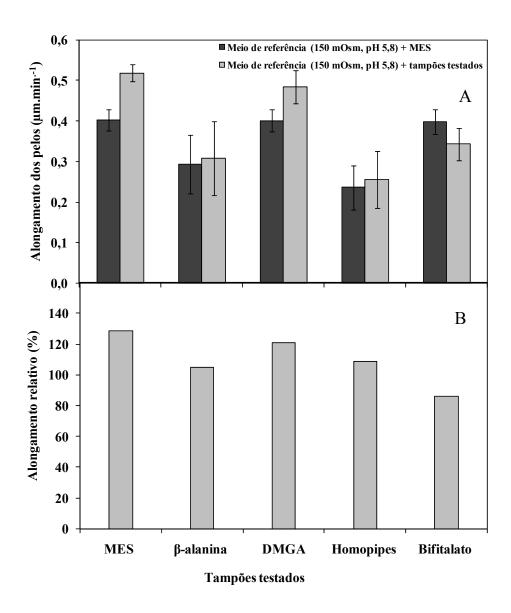


Figura 25 – Alongamento celular de pêlos radiculares em meio de referência a pH 5,8 com diferentes tampões (A) e seu valor relativo (B). As barras indicam o erro padrão da média (n= 16 a 20).

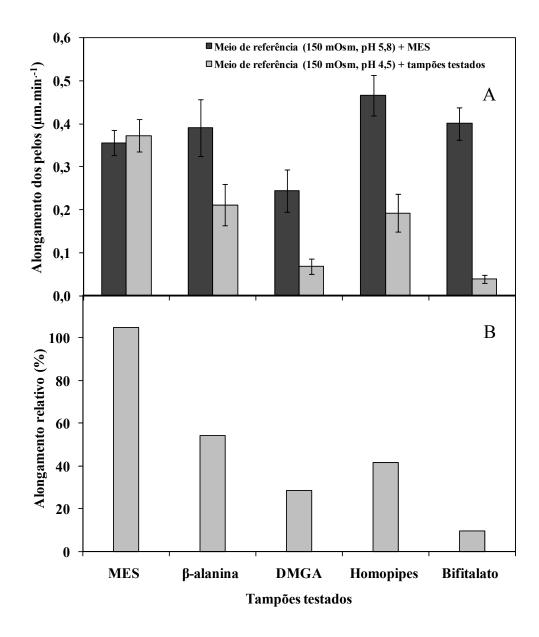


Figura 26 – Alongamento celular de pêlos radiculares em meio de referência a pH 4,5 com diferentes tampões (A) e seu valor relativo (B). As barras indicam o erro padrão da média (n= 19 a 21).

### 7. DISCUSSÃO

### 7.1. A resposta dos pêlos radiculares ao estresse da parede

Embora não sejam numerosos, alguns trabalhos já relataram que os pêlos radiculares podem sofrer ruptura quando expostas a condições de pH baixo (BIBIKOVA et al., 1998; JONES; SHAFF; KOCHIAN, 1995; MONSHAUSEN et al., 2007). No entanto, não se conhece trabalhos que mediram a taxa de alongamento dos pêlos sob estas condições. O trabalho de Bibikova et al. (1998) apenas menciona que o abaixamento do pH reduziu a taxa de alongamento de pêlos radiculares de Arabidopsis.

Por sua vez, embora seria esperado que choques hipo-osmóticos causassem a ruptura de pêlos, foi inesperado constatar que as condições em que isto ocorre são raramente abordadas na literatura, e muitas vezes se faz apenas uma menção de que se observou ruptura (ver por exemplo, LEW, 1998). Também no caso de tratamentos hipo-osmóticos, não se conhece trabalhos que mediram a taxa de alongamento dos pêlos sob estas condições. Em tubos polínicos há um pouco mais de informações sobre os efeitos de condições hipo-osmóticas, mas se limitam essencialmente a um pequeno conjunto de bons trabalhos oriundos de um único grupo (por exemplo, ZONIA; MÜLLER; MUNNIK, 2006; ZONIA; MUNNIK, 2007).

Os dados apresentados no presente estudo evidenciam a existência, em pêlos radiculares, de um sistema de percepção e resposta a estresse da parede visando manter a sua integridade. Quando os pêlos foram submetidos a condições em que a integridade da parede estava ameaçada, uma resposta celular resultou na diminuição do alongamento destas células. Quando houve uma falha nesta resposta, ou esta não ocorreu rápida o suficiente, a consequência foi o rompimento do pêlo radicular, conforme relatado nos resultados.

A resposta a estresse da parede ficou particularmente evidente na curva de resposta dos pêlos a soluções com diferentes osmolaridades (Figura 8). A taxa de alongamento aumentou com a diminuição da osmolaridade até alcançar um limiar em que houve redução drástica da taxa de alongamento e começou-se a observar o rompimento de pêlos. Seria interessante verificar se comportamento semelhante ocorre em uma curva de resposta a pH baixo. Deve-se ressaltar que os efeitos normalmente esperados, tanto do tratamento a pH baixo como do tratamento hipo-osmótico seriam de um aumento na taxa de alongamento, pois um aumentaria a pressão de turgor celular e o outro a extensibilidade da parede. No entanto, a questão chave

é o que ocorre quando estes fatores alcançam níveis críticos, alcançando o limite de resistência da parede.

Atualmente, um assunto importante é tentar entender este processo e saber se, assim como o que ocorre em leveduras, as plantas possuem um sistema de monitoramento e resposta ao estado de integridade da parede celular e elucidar os seus mecanismos (HAMANN et al., 2009). Para ilustrar, a via de sinalização responsável por esta percepção e resposta em leveduras já é bem conhecida, e está bem estabelecido que é uma via vital para a sua sobrevivência (LEVIN, 2005).

Na Figura 27, propõe-se um modelo simples para a resposta celular frente ao estresse da parede.

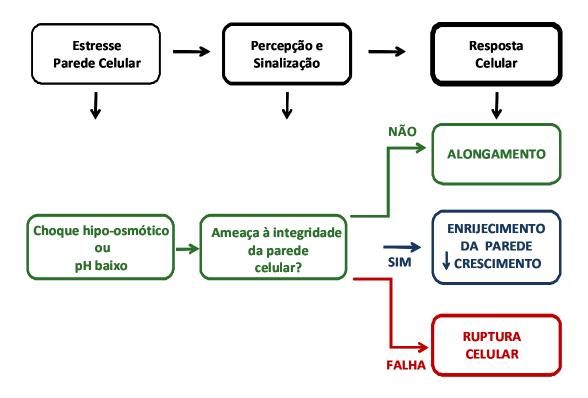


Figura 27 – Modelo ilustrando a resposta de pêlos radiculares a estresse da parede celular. Estas células necessitam ter a capacidade de monitorar a integridade de sua parede e responder de acordo. Se houver falha neste processo, o resultado será a ruptura celular.

Apesar dos problemas metodológicos encontrados em se trabalhar com pêlos radiculares e relatados aqui, devem estar evidentes as características únicas que estas células possuem para a realização destes tipos de estudo, que são a facilidade de se avaliar tanto a expansão como a ruptura celular.

Por outro lado, não se deve considerar que os processos aqui descritos estão restritos a este tipo de célula. Pelo contrário, postula-se que estes processos também ocorrem, embora talvez de modo quase imperceptível, em células em que a expansão é difusa. É possível que em células de crescimento difuso ocorram micro-rupturas que, além dos danos próprios, poderiam permitir maior entrada de Al. Esta poderia ser uma explicação para a diferença marcante no acúmulo de Al entre células de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. BY-2) expostas a Al sob condições hipo-osmóticas e não hipo-osmóticas (CAPALDI, 2006).

## 7.2. Mecanismos de resposta do pêlo ao estresse da parede

Neste trabalho, examinaram-se dois fatores de estresse para a parede; o abaixamento de pH e o choque hipo-osmótico. Em ambos os casos, a resposta celular poderia ocorrer por meio de dois mecanismos gerais. Uma envolvendo o ajustamento osmótico, de modo a reduzir a pressão de turgor, e outra envolvendo o enrijecimento da parede. Ambas levam a uma redução no alongamento celular.

#### 7.2.1. Ajustamento de turgor celular

A forma de ajustamento osmótico mais provável, e aparentemente mais simples, seria a abertura de canais para o efluxo de K<sup>+</sup> (LEW, 2004). Lew (1996; 1998; 2004) realizou uma série de experimentos visando examinar os efeitos de estresse osmótico (hiper- e hipo-osmótico) sobre as propriedades elétricas e fluxo de íons em pêlos radiculares de Arabidopsis.

Nestas células, foi demonstrado que o estresse osmótico, seja hiper- ou hipo-osmótico, gera alterações no potencial de membrana destas células. Tipicamente, o choque hiper-osmótico resulta em uma hiperpolarização da membrana plasmática da ordem de -25 a -35 mV, enquanto o choque hipo-osmótico resulta em uma despolarização da ordem de 30 a 40 mV (LEW, 1996; 2004). A despolarização da membrana plasmática seguida do choque hipo-osmótico seria consistente com um processo de efluxo de cátions como o K<sup>+</sup>.

No interior da célula, o K<sup>+</sup> é o cátion que ocorre em maiores concentrações, tendo concentrações médias no citoplasma da ordem de 140 mM (LEW, 2004). Além disto, o K<sup>+</sup> é conhecidamente envolvido com regulação de turgor celular, de modo que seria o candidato natural para um mecanismo de regulação osmótica envolvendo o seu efluxo, após um choque

hipo-osmótico. No entanto, Lew (1998; 2004) não encontrou diferenças significativas no fluxo de íons após o tratamento hipo-osmótico, embora houve uma tendência de diminuição do influxo de Ca<sup>2+</sup> e do efluxo de H<sup>+</sup> (LEW, 1998).

Além disto, a regulação osmótica geralmente ocorre ao longo de tempos relativamente longos (horas), pelo menos em comparação com a escala de tempo envolvido com o choque hipo-osmótico, em que as respostas precisam ocorrer em minutos ou segundos. O Lew (1998; 2004) sugere que os fluxos de íons observados durante o estresse osmótico está, mais provavelmente, relacionado a sinalização celular do que ao ajustamento osmótico.

Assim, o mais provável é que a resposta a estresse hipo-osmótico ocorra por meio de uma modificação na extensibilidade da parede do pêlo radicular. Existem diversos mecanismos que poderiam promover o enrijecimento da parede celular (COSGROVE, 2005), mas um mecanismo provável, evidenciado pela literatura (MONSHAUSEN et al., 2007), seria a modulação oxidativa da parede celular.

## 7.2.2. Enrijecimento da parede por meio da sua modulação oxidativa

Em função do que foi discutido sobre a regulação osmótica, a opção natural a ser examinada seria a modulação oxidativa da parede, assunto que também tem despertado muito interesse nos últimos anos (CAROL; DOLAN, 2006; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; SWANSON; GILROY, 2010).

Para examinar esta hipótese, primeiramente foram realizados alguns ensaios mais simples com o intuito de se obter indícios de uma modulação oxidativa da parede. Neste caso, optou-se por realizar o choque hipo-osmótico na presença de antioxidante (ascorbato) ou de  $H_2O_2$ .

A presença de ascorbato ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos ensaios de choque hipo-osmótico não afetou a taxa de alongamento dos pêlos, mas ambos diminuíram a porcentagem de pêlos rompidos (Figura 15). O efeito de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era esperado, pois geralmente está associado a processo de enrijecimento da parede celular. Não se esperava um efeito muito grande, pois a suposição é justamente que a resposta celular seja de um enrijecimento da parede. Assim, não se observou reduções ainda mais acentuadas na taxa de alongamento, apenas na porcentagem de pêlos rompidos.

O efeito de ascorbato foi um pouco inesperado (Figura 16A, B), pois se esperava que a porcentagem de pêlos rompidos iria aumentar (MONSHAUSEN et al., 2007) e que a taxa de

alongamento dos pêlos seria mais elevada. Por outro lado, o ascorbato tem função conhecida como pró-oxidante e, principalmente quando associado à atividade de peroxidases, pode promover tanto o afrouxamento como o enrijecimento da parede (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004). Estes resultados não comprovam que a resposta celular frente ao estresse da parede envolve a modulação oxidativa, apenas evidenciam que alterações de ROS podem afetar a freqüência de ruptura celular decorrente do estresse hipo-osmótico.

Para examinar um possível papel da modulação oxidativa na resposta da célula ao estresse da parede gerado pelo choque hipo-osmótico, o uso de inibidores de enzimas chaves é mais informativo. O DPI (diphenylene iodonium) é inibidor conhecido da NADPH oxidase da membrana plasmática. Esta enzima é considerada fonte importante de  $O_2^{\bullet-}$ , e já foi demonstrada sua necessidade para o desenvolvimento normal de pêlos radiculares (FOREMAN et al., 2003; MACPHERSON et al., 2008).

A aplicação de DPI a pêlos que foram expostas a choque hipo-osmótico (Figura 17) ou a choque hipo-osmótico mais pH baixo (Figura 18) sugere que a NADPH oxidase não é requerida para a resposta da célula frente ao estresse da sua parede. A aplicação de DPI não teve efeitos significativos sobre os pêlos que sofreram choque hipo-osmótico (Figura 17). No entanto, a sua aplicação a pêlos que não sofreram choque hipo-osmótico reduziu a taxa de alongamento e aumentou a porcentagem de pêlos rompidos de modo aproximadamente igual no controle

O DPI reduziu a taxa de alongamento do pêlo radicular e aumentou a porcentagem de rompimento dos pêlos, conforme já foi relatado em outros trabalhos (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007; FOREMAN et al., 2003MACPHERSON et al., 2008). Seu efeito sobre células controle foi semelhante ao de um choque hipo-osmótico.

As peroxidases geralmente estão presentes no apoplasto da maioria das células vegetais (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007) e os resultados dos ensaios em que SHAM, um inibidor de peroxidases, foi aplicado sugerem um papel de peroxidases na resposta celular frente ao estresse da parede. Embora não seja evidente à primeira vista, os resultados obtidos com a aplicação de ascorbato também são consistentes com esta hipótese.

Infelizmente, o envolvimento da modulação oxidativa na resposta dos pêlos radiculares a estresse da parede permanece em aberto neste estudo. Para uma melhor definição, teria sido interessante mensurar ou detectar ROS apoplástico durante a imposição do estresse ou a determinação da atividade de enzimas chaves, principalmente de peroxidase (DUNAND; CREVECOEUR; PENEL, 2007; LISZKAY; KENK; SCHOPFER, 2003).

# 7.3. A resposta de mutantes hormonais ao estresse da parede (hipo-osmótico)

Neste trabalho, encontraram-se diferenças entre os pêlos radiculares dos mutantes hormonais e MT com relação a suas respostas diante do estresse na parede gerado pelo tratamento hipo-osmótico (Figuras 23 e 24).

Em um primeiro ensaio, onde os pêlos radiculares foram incubados diretamente em soluções de diferentes osmolaridades (MMin + manitol; 41, 76 e 300 mOsm), a taxa de alongamento dos pêlos radiculares no mutante *epi* (super produtor de etileno) continuou aumentando com o abaixamento da osmolaridade da solução externa até 41 mOsm, enquanto que em MT houve nítida inibição do alongamento. Apesar disto, a porcentagem de pêlos rompidos em *epi* não foi muito alta (6,9%). A interpretação deste resultado é que, a 41 mOsm, por algum motivo, os pêlos radiculares de *epi* não teriam ainda alcançado o limite crítico para iniciar a resposta de inibição de alongamento.

Já no segundo ensaio em que se avaliou a resposta dos mutantes a choque hipoosmótico, foram encontradas respostas diferentes. Nos mutantes hormonais *dgt* (pouco sensível a auxina) e *epi* (super produtor de etileno), mas não em *not* (deficiente em ácido abscísico), os pêlos radiculares apresentaram uma melhor resposta de ajustamento a choque hipo-osmótico do que Micro-Tom, reduzindo o alongamento e o rompimento dos pêlos.

# 7.4. A variabilidade nas taxas de alongamento à luz do modelo proposto e observações relatadas na literatura

O modelo da Figura 27, embora simples, pode explicar a alta variabilidade dos dados de taxas de alongamento relativo encontrados após a imposição do choque hipo-osmótico. Antes da aplicação do choque hipo-osmótico, mesmo que estivessem alongando a taxas semelhantes, os pêlos poderiam apresentar diferentes níveis de pressão de turgor e, também, de extensibilidade da parede. Ao submeter o choque hipo-osmótico, aqueles pêlos cuja parede não estivesse comprometida, passariam a alongar a uma taxa mais elevada. Nos pêlos em que a integridade estivesse ameaçada, haveria uma resposta celular, seja pela perda de turgor, seja pelo enrijecimento da parede, sendo o resultado uma taxa de alongamento menor.

O fato de que a osmolaridade interna é variável entre células semelhantes e aparentemente na mesma condição fisiológica é facilmente percebida pois estas sofrem plasmólise e param de crescer em soluções com osmolaridade um pouco diferentes. Assim, em uma solução aproximadamente isotônica, haverá uma mistura de pêlos plasmolisados, outras que pararam de alongar e outras que continuam alongando (VOLGGER et al., 2010).

Na realidade, é possível que grande parte da variabilidade encontrada na taxa de alongamento dos pêlos tenha uma mesma origem em função do sistema experimental empregado. Neste sistema, a transferência de pêlos radiculares de um ambiente de ar úmido para um meio líquido pode ter gerado um estresse hipo-osmótico que poderia ter gerado respostas como as ilustradas na Figura 27, e onde alguns pêlos alongariam mais rapidamente enquanto outros teriam seu alongamento inibido.

Para ilustrar, na sua série de trabalhos, Lew (1996; 1998; 2004) utilizou um sistema experimental semelhante ao que foi utilizado no presente trabalho, embora não tenha utilizado câmaras de crescimento como as empregadas neste estudo. Após a aplicação das soluções iniciais, este autor relatou que havia a necessidade de recuperação do alongamento dos pêlos antes de se realizar medições. O mesmo autor também descreveu que, na aplicação da solução hipo-osmótica, alguns pêlos pararam de alongar, alguns continuaram alongando e outras ainda se romperam. É curioso que os dados de fluxo iônico encontrados por este autor apresentaram variabilidade muito grande. Isto seria consistente com mensurações feitas em pêlos respondendo de modo diferente a estas soluções de tratamento, de modo que em algumas poderia estar ocorrendo o influxo de K<sup>+</sup>, enquanto em outras poderia estar ocorrendo o efluxo.

#### 8. CONCLUSÕES

- Há boa evidência de que os pêlos radiculares possuem um mecanismo de percepção e resposta a estresse da parede visando à manutenção de sua integridade, à semelhança do sistema conhecido em leveduras;
- Apesar dos desafíos metodológicos, os pêlos radiculares constituem um sistema experimental e modelo biológico interessante para se investigar estresse da parede, como o causado por pH baixo ou por choque hipo-osmótico.
- A grande variabilidade encontrada na taxa de alongamento dos pêlos é, provavelmente, consequência do próprio sistema de percepção e resposta a estresse da parede, já que foi impossível se evitar alterações osmóticas para a realização dos experimentos;
- Tanto o tratamento a pH baixo como o choque hipo-osmótico resultaram em resposta celular onde houve redução da taxa de alongamento dos pêlos radiculares e encontrou-se evidências de uma interação entre estes dois fatores. No entanto, o efeito do choque hipo-osmótico foi mais marcante nas condições experimentais em que este estudo foi realizado;
- A resposta frente ao estresse da parede celular provavelmente ocorre via um enrijecimento da parede do pêlo radicular, embora não se possa descartar a possibilidade de um ajustamento osmótico;
- Embora a NADPH oxidase seja fundamental para o desenvolvimento normal e a integridade de pêlos radiculares, não foram encontradas evidências, com uso do inibidor (DPI) de NADPH oxidases, de que estas enzimas são necessárias para a resposta ao estresse da parede em pêlos radiculares de Micro-Tom;
- A aplicação de SHAM, um inibidor de peroxidases, forneceu evidências de que estas enzimas desempenham papel na resposta dos pêlos ao estresse da parede;

- Os mutantes hormonais *dgt* (auxina) e *epi* (etileno) apresentaram uma resposta ao estresse da parede mais eficiente, reduzindo mais a sua taxa de alongamento e a porcentagem de pêlos rompidos quando submetidos a choque hipo-osmótico. Estes resultados precisam ser melhor analisados e suas causas investigadas, mas ilustram o potencial de se empregar mutantes hormonais nas questões investigadas neste estudo;

# 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.

AITKEN, S.M. et al. Thermodynamic analysis of the binding of aromatic hydroxamic acid analogues to ferric horseradish peroxidase. **Biochemistry**, Washington, v. 40, n. 46, p. 13980-13989, 2001.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

BABOURINA, O. et al. K<sup>+</sup> transport by *Arabidopsis* root hairs at low pH. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 7, p. 635-641, 2001.

BABOURINA, O.; VOLTCHANSKII, K.; NEWMAN, I.; RENGEL, Z. Ca<sup>2+</sup> effects on K<sup>+</sup> fluxes in Arabidopsis seedlings exposed to A1<sup>3+</sup>. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 51, p. 733-736, 2005.

BABOURINA, O. et al. Reactive oxygen species production in wheat roots is not linked with changes in H+ fluxes during acidic and aluminium stresses. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.1, n. 2, p. 37-42, 2006.

BASSEL, G.W.; MULLEN, R.T.; BEWLEY, J.D. procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 585-593, 2008.

BASU, A.; BASU, U.; TAYLOR, G.J. Induction of microsomal membrane-proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 3, p. 1007-1013, 1994.

BIBIKOVA, T.; GILROY, S. Root hair development. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, n. 4, p. 383-415, 2003.

BIBIKOVA, T.N. et al. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 15, p. 2925-2934, 1998.

BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; BRACCINI, A.L. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. **Bragantia**, Campinas, v. 59, p. 221-226, 2000.

BURBIDGE, A. et al. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. **Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 427-431, 1999.

CAMPOS, M.L. et al. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 60, n. 15, p. 4346-4360, 2009.

- CAMPOS, M.L. et al. Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, p. 50-54, 2010.
- CANÇADO, G.M.A. et al. Novas perspectivas para adaptação de culturas ao cerrado. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 23, p. 56-61, 2001.
- CAPALDI, F.R. Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez. 2006. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- CARDENAS, L. New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 4, n. 1, p. 4-8, 2009.
- CAROL, R.J.; DOLAN, L. Building a hair: Tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 357, n. 1422, p. 815-821, 2002.
- CAROL, R.J.; DOLAN, L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1829-1834, 2006.
- COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** London, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.
- CROSS, A.R.; JONES, O.T.G. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 237, n. 1, p. 111-116, 1986.
- DUNAND, C.; CREVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytologist,** London, v. 174, n. 2, p. 332-341, 2007.
- FARR, C.H. Studies on the growth of root hairs in solutions I. The problem, previous work, and procedure. **Botanical Society of America**, St. Louis, v. 14, n. 8, p. 446-456, 1927.
- FASANO, J.M. et al. Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. **Plant Cell,** Baltimore, v. 13, n. 4, p. 907-921, 2001.
- FOREMAN, J.; DOLAN, L. Root hairs as a model system for studying plant cell growth. **Annals of Botany,** Oxford, v. 88, n. 1, p. 1-7, 2001.
- FOREMAN, J. et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, London, v. 422, n. 6930, p. 442-446, 2003.
- FOUAD, W.M.; RATHINASABAPATHI, B. Expression of bacterial L-aspartate-alphadecarboxylase in tobacco increases beta-alanine and pantothenate levels and improves thermotolerance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 60, n. 4, p. 495-505, 2006.

- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology,** Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 511-566, 1978.
- FUJINO, D.W. et al. Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar VFN8). **Plant Physiology,** Rockville, v. 88, n. 3, p. 774-779, 1988.
- GALWAY, M.E.; LANE, D.C.; SCHIEFELBEIN, J.W. Defective control of growth rate and cell diameter in tip-growing root hairs of the rhd4 mutant of Arabidopsis thaliana. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, n. 4, p. 494-507, 1999.
- GECHEV, T.S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.
- GILROY, S.; JONES, D.L. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 2, p. 56-60, 2000.
- GRIERSON, C.; SCHIEFELBEIN, J. Root hairs. In: **The Arabidopsis book**. Rockville, 2002. p. 1-22. doi: 10.1199/tab.0060. Disponível em: <a href="http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/">http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/</a>>.
- HAMANN, T. et al. 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.
- HALPERIN, S.J.; GILROY, S.; LYNCH, J.P. Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of Arabidopsis thaliana L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 385, p. 1269-1280, 2003.
- HAMMER, M.A.; BALTZ, J.M. beta-alanine but not taurine can function as an organic osmolyte in preimplantation mouse embryos cultured from fertilized eggs. **Molecular Reproduction and Development,** Hoboken, v. 66, n. 2, p. 153-161, 2003.
- HENZLER, T.; STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 353, p. 2053-2066, 2000.
- HEPLER, P.K.; VIDALI, L.; CHEUNG, A.Y. Polarized cell growth in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 159-187, 2001.
- HERRMANN, A.; FELLE, H.H. Tip growth in root hair-cells of sinapis-alba L significance of internal and external Ca<sup>2+</sup> and pH. **New Phytologist**, London, v. 129, n. 3, p. 523-533, 1995.
- HESLOP-HARRISON, J. Pollen germination and pollen-tube growth. **International Review of Cytology**, New York, v. 107, p. 1-78, 1987.

- HOLDAWAY-CLARKE, T.L. et al. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 54, n. 380, p. 65-72, 2003.
- HORST, W.J.; WANG, Y.X.; 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.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Role of calcium and other ions in directing root hair tip growth in *Limnobium stoloniferum* .1. Inhibition of tip growth by aluminum. **Planta**, Berlin, v. 197, n. 4, p. 672-680, 1995.
- JONES, M.A.; RAYMOND, M.J.; SMIRNOFF, N. Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 83-100, 2006.
- JONES, M.A. et al. NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 58, n. 6, p. 1261-1270, 2007.
- JUNG, J.Y.; SHIN, R.; SCHACHTMANA, D.P. Ethylene mediates response and tolerance to potassium deprivation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 21, p. 607–621, 2009.
- KAUL, S. et al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, n. 6814, p. 796-815, 2000.
- KINRAIDE, T.B.; SWEENEY, B.K. Buffered, phosphate-containing media suitable for aluminum toxicity studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, n. 1, p. 75-83, 2001.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PINEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.
- KOKA, C.V. et al. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 1, p. 85-98, 2000.
- KONRAD, K.R.; HEDRICH, R. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. **Plant Journal,** Oxford, v. 55, n. 1, p. 161-173, 2008.
- 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.
- KOYAMA, H. et al. Effects of aluminum and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain landsberg in hydroponic culture. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 36, n. 1, p. 201-205, 1995.

KWAK, J.M.; NGUYEN, V.; SCHROEDER, J.I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 323-329, 2006.

LARCHER, W. A utilização dos elementos minerais. In: \_\_\_\_\_. Ecofisiologia vegetal. São Carlos: RiMa, 2000. p. 183-230.

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

LEW, R.R. Pressure regulation of the electrical properties of growing *Arabidopsis thaliana* L root hairs. **Plant Physiology,** Rockville, v. 112, n. 3, p. 1089-1100, 1996.

LEW, R.R. Immediate and steady state extracellular ionic fluxes of growing *Arabidopsis thaliana* root hairs under hyperosmotic and hypoosmotic conditions. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn v. 104, n. 3, p. 397-404, 1998.

LEW, R.R. Osmotic effects on the electrical properties of Arabidopsis root hair vacuoles in situ. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 1, p. 352-360, 2004.

LIBAULT, M. et al. Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, n. 2, p. 541-552, 2010.

LIMA, J.E. et al. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, n. 4, p. 753-757, 2004.

LISZKAY, A.; KENK, B.; SCHOPFER, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. **Planta**, Berlin, v. 217, n. 4, p. 658-667, 2003.

MACPHERSON, N. et al. NADPH oxidase involvement in cellular integrity. **Planta**, Berlin, v. 227, n. 6, p. 1415-1418, 2008.

MADHAVARAO, C.N.; NAMBOODIRI, A.M.A. NAA synthesis and functional roles. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, v. 576, p. 49-66, 2006.

MEISSNER, R. et al. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal,** Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, 1997.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONSHAUSEN, G.B.; MESSERLI, M.A.; GILROY, S. Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> follow oscillating increases in growth in root hairs of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 4, p. 1690-1698, 2008.

MONSHAUSEN, G.B. et al. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root haris. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 104, n. 52, p. 20996-21001, 2007.

MORI, I.C.; SCHROEDER, J.I. Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 702–708, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OFEI-MANU, P. et al. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. **Soil Science and Plant Nutrition,** Tokyo, v. 47, n. 2, p. 359-375, 2001.

OH, K. et al. The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 1, p. 133-144, 2006.

PARENTONI, S.N. et al. Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. In: NASS, L.L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento** – plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 785-851.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 11, p. 534-540, 2004.

PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports,** New York, v. 24, n. 5, p. 255-265, 2005.

PITTS, R.J.; CERNAC, A.; ESTELLE, M. Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 553-560, 1998.

PREUSS, M.L. et al. The *Arabidopsis* Rab Gtpase Raba4b Localizes to the Tips of Growing Root Hair Cells. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, n. 6, p. 1589-1603, 2004.

PROSEUS, T.E.; BOYER, J.S. Calcium pectate chemistry controls growth rate of *Chara corallina*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 3989-4002, 2006.

RAHMAN, A. et al. Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxin influx modulators. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 4, p. 1908-1917, 2002.

RASBAND, W.S. **ImageJ**. Bethesda, Maryland: National Institutes of Health, 1997-2009. Disponível em: http://rsb.info.nih.gov/ij/.

ROUET, M.A.; MATHIEU, Y.; LAURIERE, 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.

SANCHEZ-RODRIGUEZ, C. et al. Phytohormones and the cell wall in Arabidopsis during seedling growth. **Trends in Plant Science**, London, v. 15, n. 5, p. 291-301, 2010.

SAGI, M.; FLUHR, R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 336–340, 2006.

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. et al. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. **Planta**, Berlin, v. 214, n. 6, p. 821-828, 2002.

SCOTT, J.; HARBAUGH, B. **Micro-Tom**: A miniature dwarf tomato. Gainesville: Florida Agricultural Experimental Station, 1989. 6 p. (Circular, 370).

SHABALA, S.N.; NEWMAN, I.A.; MORRIS, J. Oscillations in H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ion fluxes around the elongation region of corn roots and effects of external pH . **Plant Physiology**, Rockville,

v. 113, n. 1, p. 111-118, 1997.

SOUZA, C.A. de. Permeabilidade da membrana plasmática em condições de pH baixo e a absorção de alumínio em raízes de trigo (*Triticum aestivum l.*). 1999. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

SWANSON, S.; GILROY, S. ROS in plant development. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 138, n. 4, p. 384-392, 2010.

TAIZ, L. Plant-cell expansion - regulation of cell-wall mechanical-properties. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 35, p. 585-657, 1984.

VITORELLO, V.A.; HAUG, A. Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 97, n. 3, p. 536-544, 1996.

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, 2005.

VOLGGER, M. et al. Plasmolysis and cell wall deposition in wheat root hairs under osmotic stress. **Protoplasma**, Leipiz, v. 243, n. 1-4, p. 51-62, 2010.

WANG, K.L.C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. S131–S151, 2002.

WHEELER, D.M.; WILD, D.J.C.; EDMEADES, D.C. Preliminary results from a microscopic examination on the effects of aluminum on the root-tips of wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 146, n. 1-2, p. 83-87, 1992.

WU, J. et al. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in Nicotiana attenuata, is required for root hair development and plant growth in native soils. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 877–890, 2007.

WYMER, C.L.; BIBIKOVA, T.N.; GILROY, S. Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of Arabidopsis thaliana. The **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 427-439, 1997.

YAMAMOTO, Y. et al. Quantitative estimation of aluminum toxicity in cultured tobacco cells - Correlation between aluminum uptake and growth-inhibition. **Plant and Cell Physiology,** Tokyo, v. 35, n. 4, p. 575-583, 1994.

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.

YOKOTA, S.; OJIMA, K. Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminum stress in water culture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, p. 163-165, 1995.

YOUNG, J.C.; DEWITT, N.D.; SUSSMAN, M.R. A transgene encoding a plasma membrane H+-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Genetics**, Bethesda,

v. 149, n. 2, p. 501-507, 1998.

ZONIA, L.; MUNNIK, T. Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 3, p. 90-97, 2007.

ZONIA, L.; MULLER, M.; MUNNIK, T. Hydrodynamics and cell volume oscillations in the pollen tube apical region are integral components of the biomechanics of *Nicotiana tabacum* pollen tube growth. **Cell Biochemistry and Biophysics,** Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 209-232, 2006.

ZSOGON, A. et al. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 259-267, 2008.