

ENERGIZAÇÃO E SINALIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE
REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR VIA
MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺ POR ÁCIDOS HÚMICOS E
FITORMÔNIOS

DANIEL BASÍLIO ZANDONADI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO – 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ENERGIZAÇÃO E SINALIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE
REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR VIA
MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺ POR ÁCIDOS HÚMICOS E
FITORMÔNIOS

DANIEL BASÍLIO ZANDONADI

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

DEZEMBRO - 2009

ENERGIZAÇÃO E SINALIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE
REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR VIA
MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺ POR ÁCIDOS HÚMICOS E
FITORMÔNIOS

DANIEL BASÍLIO ZANDONADI

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 07 de dezembro de 2009.

Comissão Examinadora:

Prof. Leonardo Oliveira Medici (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) -
UFRRJ

Prof. Márcio Alves Ferreira (D.Sc., Ciências Biológicas) - UFRJ

Prof. Anna Okorokova-Façanha (D.Sc., Química Biológica) - UENF

Prof. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc., Química Biológica) – UENF
Orientador

“Ama, Trabalha, Espera e Perdoa.”

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho:
MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Os fitormônios.....	19
2.2. A matéria orgânica.....	22
2.2.1. Breve histórico.....	22
2.2.2. Decifrando as substâncias húmicas.....	23
2.2.3. A vida no planeta e as substâncias húmicas.....	24
2.2.4. Antes da auxina, os <i>auximones</i>	25
2.2.5. Substâncias húmicas como ferramenta biotecnológica....	30
2.3. O sistema radicular vegetal.....	33
2.3.1. Desenvolvimento das raízes laterais: Papel da auxina, etileno e ON.....	34
2.4. O pH como mensageiro e sinalizador nas células vegetais.....	42
2.4.1. O papel do pH na fisiologia da raiz.....	42
2.4.2. A regulação do pH e as bombas de H ⁺	43
2.4.3. Sinalizando em distâncias maiores.....	

2.4.4. Sinal elétrico para o enraizamento: participação das substâncias húmicas?.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 1 - Óxido nítrico como mediador do desenvolvimento radicular e da ativação da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática induzida por ácidos húmicos.....	50
Resumo.....	61
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1. Extração de ácidos húmicos.....	65
2.2. Análises estatísticas.....	65
2.3. Crescimento e tratamentos das plântulas.....	65
2.4. Purificação das vesículas de membrana plasmática.....	66
2.5. Determinação da atividade ATPásica de Membrana Plasmática..	67
2.6. Bombeamento de H ⁺ da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática...	68
2.7. pH da rizosfera.....	68
2.8. Localização do ON por microscopia de fluorescência.....	69
3. RESULTADOS.....	70
3.1. O ON está relacionado com os efeitos do AIA e dos AHs no desenvolvimento radicular.....	71
3.2. A atividade da H ⁺ -ATPase de membrana plasmática foi aumentada por AIA, AH e SNP e reduzida por inibidores de auxina e ON.....	74
3.3. AH, AIA e SNP induzem ao acúmulo de ON em tipos específicos de células das raízes de milho.....	78
4. DISCUSSÃO.....	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
CAPÍTULO 2 - O papel das bombas de prótons na sinalização via ácidos húmicos durante o desenvolvimento radicular do tomateiro <i>Never ripe</i>	94
Resumo.....	94
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1. Extração de ácidos húmicos.....	99

2.2. Material vegetal.....	99
2.3. Tratamento das plantas.....	100
2.4. Análises estatísticas.....	102
2.5. Avaliação do número de primórdios formadores de RLs.....	102
2.6. Número de RLs e CEP.....	102
2.7. Purificação das vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática.....	103
2.8. Determinação da atividade H ⁺ -ATPase de Membrana Plasmática.....	105
2.9.1. Determinação da atividade da H ⁺ -PPase.....	105
2.9.2. Expressão relativa de RNAm.....	106
2.9.2.1. Extração de RNA total.....	106
2.9.2.2. Transcrição Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	107
2.9.2.3. PCR quantitativo em tempo real.....	109
3. RESULTADOS.....	110
3.1. A atividade da H ⁺ -ATPase de MP em plantas WT e <i>Nr</i> é alterada por diferentes concentrações de auxina.....	110
3.2. A atividade da H ⁺ -ATPase de MP em plantas WT e <i>Nr</i> é alterada por diferentes concentrações de AH.....	112
3.3. A Atividade da H ⁺ -PPase de tonoplasto em plantas WT e <i>Nr</i> é alterada por diferentes de concentrações de auxina.....	114
3.4. A Atividade da H ⁺ -PPase de tonoplasto em plantas WT e <i>Nr</i> é alterada por diferentes de concentrações de AH.....	116
3.5. A aplicação de AIA, SNP, AH e de inibidores da ação da auxina e ON altera o desenvolvimento radicular de plantas do tomateiro WT e <i>Nr</i>	117
3.6. A atividade da H ⁺ -ATPase de MP e expressão do gene <i>LHA4</i> em plantas WT são induzidas por SNP.....	121
4. DISCUSSÃO.....	124
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
CAPÍTULO 3 - Modulação das bombas de H ⁺ por ácidos húmicos e auxina em plantas transgênicas com super-expressão da H ⁺ -pirofosfatase (AVP1).....	134

Resumo.....	134
1. INTRODUÇÃO.....	135
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	138
2.1. Extração de ácidos húmicos.....	138
2.2. Material vegetal.....	139
2.3. Tratamento das plantas.....	139
2.4. Análises estatísticas.....	140
2.5. Número de raízes laterais (RLs) e comprimento do eixo principal (CEP).....	140
2.6. Isolamento da fração microsomal.....	140
2.7. Determinação da atividade H ⁺ -ATPase de Membrana Plasmática.....	141
2.8. Determinação da atividade da H ⁺ -PPase e da V- ATPase.....	142
2.8. Localização do ON por microscopia de fluorescência.....	142
2.7.3. Determinação da atividade da V-ATPase e H ⁺ -PPase.....	
2.7.4. Bombeamento de H ⁺ da V-ATPase e H ⁺ -PPase.....	
3. RESULTADOS.....	143
3.1. AIA AH alteram o desenvolvimento das raízes de plantas de arroz transgênicas AVP1-7 e AVP1-10.....	143
3.2. O AH altera a atividade de hidrólise das bombas de H ⁺ das plantas de arroz transgênicas AVP1-10.....	147
3.3. A produção de ON é alterada nas raízes de plantas de arroz transgênicas AVP1-7 e AVP1-10 e em plantas de <i>Arabidopsis</i> transgênicas AVP1-1 e AVP1-2.....	149
4. DISCUSSÃO.....	152
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
6. CONCLUSÕES.....	166
APÊNDICES.....	167

RESUMO

ZANDONADI, Daniel B. Dsc.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Dezembro de 2009. ENERGIZAÇÃO E SINALIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR VIA MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺ POR ÁCIDOS HÚMICOS E FITORMÔNIOS. Orientador: Arnaldo Rocha Façanha. Co-orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

Para as plantas reagirem às constantes mudanças do ambiente e ao mesmo tempo manter condições metabólicas ideais para o desenvolvimento, a expressão, a atividade e a interação entre as bombas de prótons (H⁺) precisam ser fortemente reguladas. Os fitormônios e os sinais ambientais regulam coordenadamente o desenvolvimento de raízes laterais (RLs) e a atividade das bombas de H⁺, sendo a interação entre auxina e etileno um elemento chave nesse processo. O objetivo deste trabalho foi elucidar parte dos mecanismos pelos quais as bombas de H⁺ energizam e regulam o desenvolvimento radicular das plantas. No capítulo 1 foi explorada a hipótese de que a sinalização pelo gás óxido nítrico (ON) está relacionada aos efeitos dos ácidos húmicos (AHs) e do ácido indol acético (AIA) sobre o crescimento radicular. Observou-se que ambos regulam o desenvolvimento radicular e a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) de maneira coordenada e dependente na sinalização de ON. Os resultados obtidos neste capítulo apresentam um cenário inédito, no qual a emissão de RLs e a ativação

associada da H^+ -ATPase, disparada tanto por AH quanto por AIA exógeno, dependem essencialmente de mecanismos que utilizam o ON como um mensageiro induzido em sítios específicos nos estágios iniciais do desenvolvimento de RLs. O papel do etileno nesse processo foi explorado no capítulo seguinte. No capítulo 2 foi abordada a importância da percepção do etileno para o desenvolvimento de RLs induzidas por AHs, AIA e SNP (doador de ON) por meio de plântulas de tomateiro *Never ripe (Nr)*. Este é o primeiro trabalho que caracteriza a atividade das bombas de H^+ e o desenvolvimento radicular de plântulas do tomateiro *Nr*. As atividades da H^+ -ATPase de MP e da H^+ -PPase são menores no mutante *Nr* em relação ao genótipo controle (WT). A mutação do gene *Nr* incrementou significativamente os efeitos da aplicação exógena de AIA, SNP e AHs sobre as RLs. Os resultados deste capítulo sugerem que o etileno, a auxina e o ON podem interagir numa seqüência de eventos que resultam na formação da RL, processo no qual as bombas de H^+ estão envolvidas. A importância da atividade da H^+ -PPase para a resposta das plantas aos AHs e AIA foi observada no capítulo 3. Neste capítulo foi apresentado o estudo da ativação das bombas de H^+ em plantas transgênicas que expressam maior quantidade da enzima H^+ -PPase (isoforma AVP1), e o reflexo desta transformação no desenvolvimento radicular e na produção de ON. As plantas AVP1 possuem maior desenvolvimento de RLs, atividade da H^+ -ATPase de MP e da H^+ -PPase e maior produção de ON nas raízes comparadas as plantas controle (WT). Plantas AVP1 tratadas com inibidores da produção enzimática de ON são capazes de sustentar a produção deste gás em níveis maiores do que as plantas WT, possivelmente por um mecanismo de produção apoplástica dependente de pH ácido. É possível sugerir que o aumento do crescimento radicular das plantas AVP1 está relacionado à maior produção de ON. Os dados da presente Tese tomados em conjunto sugerem existir uma seqüência de eventos desencadeados pela ativação da H^+ -PPase que culmina no desenvolvimento radicular. Os AHs podem atuar mantendo a sincronia de ativação das bombas de prótons para o crescimento de raízes utilizando a modificação de pH e o ON como sinais. Observou-se que tanto a utilização de plantas AVP1, como a aplicação de AHs são poderosas ferramentas biotecnológicas que podem ser aproveitadas como alternativas para o cultivo em solos de baixa fertilidade.

ABSTRACT

ZANDONADI, Daniel B. Dsc.- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, December 2009. ENERGIZATION AND SIGNALING OF THE ROOT DEVELOPMENT REGULATION MECHANISM VIA PROTON PUMPS MODULATION BY HUMIC ACIDS AND PHYTOHORMONES. Advisor: Arnaldo Rocha Façanha. Co-advisor: Luciano Pasqualoto Canellas.

Plants need to keep the expression and interaction of proton pumps tightly regulated to cope with the environment challenges while they maintain the optimum metabolic condition. The phytohormones and environment signals coordinately regulate the lateral root development and the proton pumps activity. Auxin, ethylene and nitric oxide interaction is a key component in this process. In this context, the objective of the present work was to understand part of the mechanisms by which the proton pumps energize and regulate plant root development. In the first chapter, it was explored the hypothesis that the nitric oxide signalization is related to humic and indol acetic acid effects on root growth. It was shown that both HA and IAA regulates root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation through a coordinate mode dependent of nitric oxide signalization. The results presented in this chapter depict an inedited scenario, which the LR emergence and the H⁺-ATPase activation, triggered either by HA as by exogenous IAA, are dependent upon mechanisms that use NO as a messenger in specific sites during early stages of LR development. The role of ethylene in this process was studied in the next chapter. In the second chapter it was shown the importance of ethylene perception to the LR development stimulated by HA, IAA and SNP (NO donor) using the tomato mutant *Nr*, which has reduced ethylene perception. This is the first work to characterize the proton pumps activity and the LR development in *Nr* plants. The PM H⁺-ATPase and the vacuolar H⁺-PPase activity was smaller in *Nr* than in control genotype (WT). The lack of *Nr* gene enhanced the IAA, SNP and HA effects on LR emergence. These results suggest that ethylene, auxin and NO could interact in a sequence of events that result in LR formation, a process which the proton pumps are linked. The relevance of the H⁺-PPase activity for the plants response to HA and IAA was addressed in the

chapter 3. In this chapter was studied the proton pumps activation in transgenic plants over expressing the H⁺-PPase enzyme (AVP1 isoform), and the consequence of this plant transformation in root development and NO production. The AVP1 plants had greater LR development, PM H⁺-ATPase and H⁺-PPase activity and NO production in roots than control plants (WT). The transgenic plants treated with the inhibitors of the NO enzymatic production are capable to sustain the emission of this gas in higher levels than WT ones, possible by a mechanism that depends upon the apoplastic acidification. It is suggested that the root increment of AVP1 plants is related to the enhanced NO production. Taken together, the data of this work suggests that there is a sequence of events triggered by the H⁺-PPase activation that culminates in the root development. The HA might act maintaining the proton pumps synchrony necessary to the root growth using the pH and NO as signals. It was showed that both transgenic AVP1 plants and HA application are powerful tools of biotechnology which can be used as a crop alternative in low fertility soils.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do foco da maioria da literatura científica ser direcionada aos estudos de hormônios vegetais produzidos pela própria planta (os fitormônios endógenos), sinais exógenos presentes no ambiente foram descritos em estudos prévios por serem reconhecidos como reguladores do crescimento vegetal (Bottmoley, 1917). De fato, mesmo antes de Frits Went classificar o fitormônio auxina, Bottmoley utilizou-se do prefixo grego *aux* (que significa crescer) para nomear compostos húmicos com a capacidade de promover o crescimento radicular, os então denominados *auximones*. Embora exista um progresso rápido na compreensão do modo de ação dos diferentes fitormônios vegetais em nível celular, bioquímico e molecular, relativamente ainda se conhece pouco sobre os efeitos das substâncias húmicas (SH).

A maior parte da matéria orgânica do solo, água e sedimentos é formada pelas SH. Apesar do longo tempo de estudo e experimentação, somente recentemente chegou-se a um entendimento do que seriam essas substâncias. Piccolo (2002) demonstrou que as SH são agregados de compostos orgânicos que se mantêm unidas por interações fracas (Van der Waals, π - π e CH- π) numa conformação supramolecular de massa aparentemente elevada. Sugere-se que mudanças na composição da solução do solo, tais como, presença de ácidos orgânicos possam romper esse arranjo e liberar diferentes compostos (Conte et al., 2007).

O papel das SH na sustentação da vida no planeta origina-se de sua importância na bioquímica do carbono orgânico e relação com a emissão de CO₂ atmosférico, no destino de poluentes e no crescimento vegetal (Piccolo, 1996; Piccolo et al. 2004). No que concerne a vida das plantas, é de suma importância a relação entre o conteúdo de auxina e a matéria orgânica em determinados ambientes (Whitehead, 1963; O'Donnell, 1973). Essas descobertas vêm ao encontro do que diferentes grupos de pesquisa têm demonstrado nas últimas três décadas: a

atividade hormonal das substâncias húmicas em plantas (Vaughan e Malcolm, 1985; Nardi et al., 2002; Canellas et al., 2002; Muscolo et al., 2007). Há trabalhos clássicos que relataram a atividade de estimulação na iniciação (Schnitzer e Poapst, 1967; O'Donnell, 1973) e expansão de raízes (Vaughan, 1974), ambos efeitos típicos da auxina. Embora já houvesse a comprovação de que tanto SH de massa molecular aparentemente pequena (Schnitzer e Poapst, 1967) como as de massa aparente mais elevada (Vaughan, 1974; O'Donnell, 1973) alterassem o metabolismo vegetal, o paradigma relacionando o efeito biológico ao tamanho molecular da SH permanecia. O conceito dominante da relação atividade biológica versus tamanho molecular se baseia na hipótese de que SH de pequena massa molecular sejam responsáveis pela ação do tipo hormonal das SH (Nardi et al., 1994; Muscolo et al., 2007), uma vez que SH de tamanho molecular aparentemente elevado (como os ácidos húmicos) não poderiam acessar o interior das células, e por isso seu efeito sobre o crescimento deveria ser atribuído a outros fatores, tais como a complexação e disponibilização de micronutrientes importantes como o Fe^{2+} e Zn^{2+} (Chen et al., 2004).

Apesar da menor atenção dada aos trabalhos com ácidos húmicos, os eventos de divisão e expansão celular estimulados por SH (Schnitzer e Poapst, 1967; Vaughan, 1974) têm sido relacionados, em trabalhos do nosso grupo de pesquisa, com a teoria do crescimento ácido promovido por auxinas (Hager *et al.*, 1971; Rayle e Cleland, 1970), e assim como ocorre na presença dessa classe de hormônios, os efeitos observados no crescimento foram associados ao aumento da atividade bioquímica e expressão dos genes que codificam para as H^+ -ATPases de membrana plasmática (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007). Outros grupos de pesquisa estudaram a alteração do nível de RNAm dessa enzima e confirmaram a importância da mesma na resposta vegetal à SH tanto de menor (Quaggiotti et al., 2004) como de maior tamanho molecular (Elena et al., 2009). Entretanto, enquanto Quaggiotti et al. (2004) demonstraram a presença de AIA na SH utilizada, o grupo de Elena et al. (2009) não relacionou o efeito estimulatório sobre as diferentes isoformas de ATPase com a presença daquele fitormônio. Devido à complexidade das SH e a interação hormonal intrincada existente durante o processo de desenvolvimento radicular, é necessário o investimento em novos estudos para auxiliar o esclarecimento do mecanismo envolvido na ação das SH sobre crescimento das plantas.

Teorizamos que o desenvolvimento de raízes e a relação desse processo com a ativação das bombas de H^+ pode ser a chave para o entendimento do mecanismo de ação de hormônios e de SH presentes no ambiente. Com base na interpretação de Lynch (1995), morfologia radicular se refere a características superficiais de um eixo radicular como um órgão, incluindo características da epiderme, tais como, diâmetro, coifa, pêlos radiculares, a forma do surgimento de raízes secundárias, sinuosidade do eixo radicular e a senescência. A arquitetura da raiz se refere a configuração espacial do sistema radicular, i.e. a disposição geométrica explícita dos eixos radiculares. Geralmente os estudos da arquitetura da raiz não incluem detalhes estruturais sutis, como pêlos, mas estão relacionados com o sistema radicular como um todo. A arquitetura radicular está relacionada com a eficiência na aquisição dos recursos dos solos e na adaptação a condições sub-ótimas do ambiente, ou seja, a disposição espacial do sistema radicular pode determinar a capacidade da planta em explorar os recursos dos solos. Isto é especialmente importante nos casos de solos intemperizados, como os Latossolos e os Argissolos, nos quais a disponibilidade de P, Ca e outros nutrientes estão numa fina camada superficial. Portanto, a importância da arquitetura radicular para a produtividade vegetal deriva diretamente da necessidade da planta em explorar ambientes espacialmente heterogêneos (Lynch, 1995).

A auxina é um hormônio fundamental para a regulação da emissão de raízes laterais nas plantas (Blakely et al., 1982). Como previsto para os efeitos mediados por hormônios aplicados exógenamente, a ação da auxina sobre o desenvolvimento radicular é dependente da sua concentração (Mulkey et al., 1982). Casimiro et al. (2001) demonstraram que o transporte polar da auxina em ambas as direções, basípeto (no sentido da ponta para a base da raiz) e acrópeto (no sentido base para a ponta da raiz), é necessário para a iniciação e emergência da raiz lateral, respectivamente.

Há vários processos que são controlados de maneira combinada tanto pela auxina quanto pelo etileno, inclusive os referentes ao desenvolvimento radicular, como comprovado em mutantes de *Arabidopsis* (Stepanova et al., 2005). Esses autores demonstraram que a super-expressão e a perda da função dos genes que codificam subunidades da enzima responsável pela biosíntese de triptofano, o qual serve como substrato na biosíntese de auxina, alteram o padrão de desenvolvimento das raízes; o etileno estimula a biosíntese de auxina (elevando sua concentração

endógena), resultando em inibição do crescimento. O efeito do etileno sobre o desenvolvimento da raiz também é dependente da concentração (Ivanchenko et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que 1 μM de etileno pode reduzir a formação de RLs pelo aumento do transporte de AIA tanto no sentido basípeto quanto acrópeto (Negi et al., 2008). Por outro lado, em concentrações baixas (0,04 μM) o etileno é capaz de regular a iniciação da RL no periciclo, e a emissão e expansão de RLs (Ivanchenko et al., 2008). Os mecanismos da interação entre esses dois hormônios, ora de forma sinérgica, ora antagônica ainda necessitam de mais estudos.

Os efeitos da interação hormonal nas plantas são complexos e necessitam de mais estudos para auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos. O gás óxido nítrico (ON) foi descrito como fundamental no processo de formação de raízes laterais em plântulas de tomate, fenômeno classicamente promovido por auxinas (Correa-Aragunde et al., 2004). Os autores sugeriram que ON endógeno é necessário para a emissão de raízes laterais promovida pela auxina sintética NAA (ácido naftaleno-acético). Apesar do papel central da auxina no desenvolvimento radicular comprovado por muitos trabalhos, existem outros reguladores do crescimento que parecem agir sem a mediação desse fitormônio, mas por intermédio do ON. Por exemplo, as afininas podem alterar a arquitetura do sistema radicular, regulando os processos de divisão e de diferenciação celular em *Arabidopsis* de maneira independente da auxina (Ramírez-Chávez et al., 2004). Interessante observar que esta classe de reguladores do crescimento também pode regular a emissão de raízes adventícias provavelmente via sinalização por ON (Campos-Cuevas et al., 2008).

As plantas possuem um complexo e ainda pouco explorado sistema de percepção das mudanças no ambiente para responder de maneira apropriada e crescer adequadamente (Malamy e Ryan, 2001). Dentre as várias respostas da planta está a formação de RLs, processo utilizado com sucesso como modelo para o entendimento das mudanças da morfologia vegetal em resposta as condições ambientais (Malamy e Ryan, 2001). Para as plantas reagirem as constantes mudanças do ambiente e ao mesmo tempo manter condições metabólicas ideais para o desenvolvimento, a expressão, a atividade e a interação entre as bombas de H^+ precisa ser fortemente regulada (Gaxiola et al., 2007).

A presente Tese apresenta evidências experimentais que subsidiam um modelo mais completo da participação das principais moléculas sinalizadoras do desenvolvimento radicular endógenas (auxina, etileno e ON) e exógenas (ácidos húmicos) na modulação dos principais sistemas de transporte de H^+ da célula vegetal, tornando possível uma integração destes elementos numa seqüência de eventos que medeia a sinalização e a energização da formação de RLs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os fitormônios

Os hormônios vegetais são moléculas sinalizadoras presentes em quantidades traço, cuja mudança na concentração e sensibilidade do tecido alvo pode influenciar uma gama de processos ligados ao desenvolvimento vegetal, muitos dos quais envolvem interações com fatores ambientais (Crozier et al., 2000).

Através do balanço entre essas moléculas, determinado evento celular pode ocorrer ou ser inibido nos diversos órgãos vegetais, em diferentes estádios do desenvolvimento. O uso de modelos genéticos com mutações hormonais e das técnicas de biologia molecular, somados aos experimentos clássicos de aplicação de hormônios, têm produzido uma série de resultados que ajudam a compreender o mecanismo de ação das diferentes classes hormonais. Assim, para todos os hormônios que possuem sua via de transdução de sinal conhecida, efeitos imediatos na transcrição gênica têm sido ligados as respostas das plantas a estes hormônios (Woodward e Bartel, 2005).

Apesar dos alvos moleculares da ação hormonal estarem sendo determinados, a especificidade e a concomitante redundância de efeitos promovidos pelos hormônios parece ser o grande enigma a ser desvendado (Gazzarrini e McCourt, 2003). Por exemplo, auxinas, giberelinas e brassinoesteróides regulam a

expansão no sentido longitudinal e influenciam fortemente a estatura das plantas e o tamanho dos órgãos, enquanto etileno e citocininas atuam primariamente no aumento da expansão celular no sentido transversal e reduzem a altura de plantas crescidas no escuro (Nemhauser et al., 2006).

Existem duas linhas principais de interpretação dos fenômenos ligados a regulação de genes mediada por hormônios: uma defende a família de proteínas DELLAs como repressores da regulação central do crescimento vegetal promovido por diferentes hormônios (Achard, 2006), enquanto a outra afirma que diferentes hormônios regulam processos semelhantes através de respostas transcricionais não sobrepostas, excluindo a hipótese de um módulo central de controle (Nemhauser et al., 2006). Estes autores revelaram que a maior parte das respostas de curto prazo (<180min.) sobre o nível de transcritos é específica para cada hormônio e independente da ação de outros hormônios (Figura 1A). No entanto, isto não exclui o fato de que um hormônio possa influenciar o metabolismo do outro (Figura 1B).

Este modelo de regulação de crescimento vegetal é bastante complexo. Serão necessários experimentos para avaliar a ação efetiva das proteínas codificadas pelos transcritos estudados a fim de validar bioquimicamente a teoria proposta por Nemhauser et al. (2006).

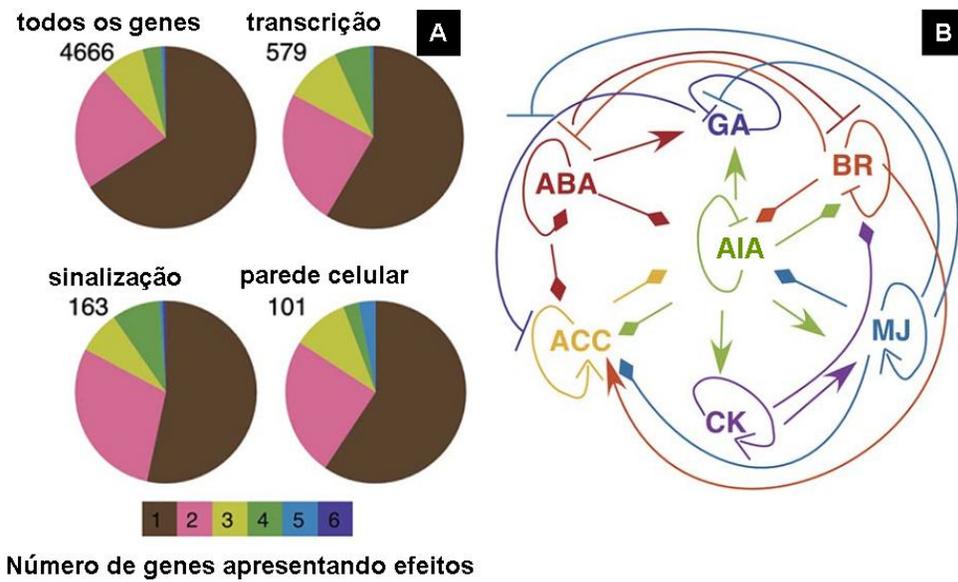


Figura 1. Distribuição de genes regulados por um ou mais hormônios em *Arabidopsis thaliana* (A). As diferentes cores representam o número de genes. Rede dos efeitos sobre o metabolismo dos hormônios (B). AIA (ácido-3-indol acético), ABA (ácido abscísico), ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), MJ (metil jasmonato, GA (ácido giberélico) e BR (brassinosteróides). Regulação positiva de genes da biosíntese do hormônio ou regulação negativa de genes repressores (→). Resposta ambígua da expressão dos genes (→◇). Regulação negativa de genes da biosíntese do hormônio ou regulação positiva de genes repressores (—|). Adaptado de Nemhauser et al. (2006).

2.2. A matéria orgânica

2.2.1. Breve histórico

A matéria orgânica é colocada em destaque atualmente pelos estudiosos da ciência do solo devido a sua proeminente função no controle da capacidade dos recursos deste em sustentar a agricultura e outros serviços à sociedade no âmbito local e global. É milenar a relação entre áreas com solos escuros, muitas vezes chamados de “terra preta”, e a capacidade produtiva da mesma. O início da domesticação de plantas e animais se deu na área conhecida como “Crescente Fértil” há mais de 11 mil anos na antiga Mesopotâmia, em uma faixa de terra que começa onde se localiza hoje o Líbano estendendo-se até o Irã, região de influência dos rios *Tigris* e *Euphrates*. A elevada atividade humana naquela região é relacionada pelos historiadores com a água de irrigação farta e fértil proveniente dos rios. Naturalmente a domesticação de plantas e animais ocorreu paralelamente em várias partes do mundo, mas a presença da matéria orgânica foi quase sempre constante. No entanto, a importância deste “compartimento”, presente não só nos solos, mas também nos rios e mares, perdeu seu destaque na agricultura devido ao uso de fertilizantes industriais e agrotóxicos. Os resíduos de pesticidas e herbicidas, a elevação da salinidade e erosão e a queda na fertilidade dos solos, a redução dos lençóis freáticos e até mesmo desertificação são algumas das conseqüências do modelo agrícola adotado a partir da década de 1960. Nas regiões tropicais do globo a aplicação dessa estratégia de produção, que esgota os recursos naturais, tem gerado enormes perdas de matéria orgânica do solo e, portanto, Carbono (C) para a atmosfera devido às características do clima e solos dessas áreas.

Desde suas origens, o sucesso da atividade agrícola está ligado à utilização de materiais orgânicos como fertilizantes. A matéria orgânica do solo pode ser definida como um sistema complexo integrado por diversos componentes, cujo dinamismo está ligado à incorporação de resíduos vegetais, animais e microbianos ao solo e a transformação e evolução destes mediada pela interação de vários fatores (por exemplo, material de origem, biota, clima e manejo agrícola). O conteúdo da matéria orgânica influencia várias características que contribuem para melhorar a qualidade do solo como, por exemplo, capacidade de retenção de água, atividade microbiana e disponibilidade de nutrientes, as quais por sua vez,

influenciam a produtividade vegetal, colaborando para o equilíbrio do sistema. Além dos efeitos indiretos sobre as plantas (através da melhoria da estrutura física e química dos solos), a matéria orgânica, principalmente através das substâncias húmicas, pode atuar de forma direta sobre o desenvolvimento vegetal via uma atividade do tipo hormonal.

2.2.2. Decifrando as substâncias húmicas

A maior parte do carbono orgânico da superfície terrestre (cerca de 90%) encontra-se nas substâncias húmicas. O restante do C se encontra nos compostos pouco alterados da degradação de resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano e, em menor proporção, nos organismos vivos, tais como, microorganismo e raízes. As substâncias húmicas não têm uma definição bioquímica clara e a concepção de sua estrutura tem sido motivo de debates recentes. Na tentativa de caracterizar as propriedades desse material húmico, foi estabelecido um fracionamento em laboratório reconhecido pela IHSS (sigla em inglês para a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas) resultando numa classificação baseada na solubilidade em condições ácidas ou básicas: ácidos fúlvicos, solúveis em soluções ácidas ou alcalinas; ácidos húmicos (AHs), solúveis soluções alcalinas, mas não em ácidas ($\text{pH} < 2,0-1,0$) e; huminas, fração resultante pouco solúvel.

Com base numa série de trabalhos que culminaram numa extensa revisão em 2002, Alessandro Piccolo definiu as substâncias húmicas como associações supramoleculares de moléculas orgânicas de pequena massa molecular que se mantêm reunidas devido a forças de atração fraca (ligações hidrofóbicas Van der Waals, π - π e CH- π e pontes de H). Trabalhos realizados por outros grupos de pesquisa independentes confirmaram essa nova visão da estrutura química das substâncias húmicas. Assim, a definição das frações das SH foi revista: Os ácidos fúlvicos são pequenas moléculas hidrofílicas associadas de forma que existam grupos funcionais ácidos suficientes para mantê-los dispersos em qualquer pH; os AHs são compostos predominantemente hidrofóbicos associados que são estabilizados em pH neutro e podem flocular conforme o pH é reduzido. A estrutura dos AHs em especial afeta diversos processos centrais na funcionalidade do ecossistema solo incluindo a biodisponibilidade de poluentes e a atividade biológica.

2.2.3. A vida no planeta e as substâncias húmicas

A taxa de mudança na concentração do CO₂ atmosférico desde a industrialização possui uma ordem de magnitude duas vezes maior do que a taxa dos 11000 anos que a precederam (Indermuhle et al., 1999). A expansão do uso de combustíveis fósseis e o aumento em larga escala do uso de áreas cada vez maiores para o cultivo agrícola, desmatamento e urbanização têm influenciado a concentração de gases na atmosfera que afetam a mudança do clima (Watson et al., 1996). As mudanças observadas produzem efeitos na degradação dos solos e nas fontes de água doce, refletindo na produção agrícola e na saúde da população do planeta.

Com base no primeiro Inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa recém divulgado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, observou-se que as emissões desses gases aumentaram 62% de 1990 até 2005 (Alencastro, 2009). Computada somente a emissão de CO₂ o aumento foi de quase 70%, sendo o desmatamento e a agricultura as duas principais atividades responsáveis por esse aumento.

A agricultura convencional, de intensa utilização de máquinas e fertilizantes, contribui para a emissão de gases do efeito estufa (Paustian et al., 1997). Nos solos das regiões tropicais e subtropicais a conservação da matéria orgânica pode ser uma das maneiras de se reduzir o nível de CO₂ atmosférico, e de fato, sistemas naturais possuem um estoque de C maior em comparação aos sistemas agrícolas (Bayer *et al.*, 2002). A preocupação com a melhoria da qualidade do ambiente tem mudado o foco das discussões em torno dos sistemas agrícolas e da importância da matéria orgânica (Lal e Pierce, 1991; Piccolo, 1996; Nardi et al., 2004). Existem diversos fatores que controlam a degradação da matéria orgânica. Os estoques da matéria orgânica dos solos resultam do balanço entre as entradas de carbono (detritos vegetais e animais) e as saídas (dominada pelo efluxo de CO₂ e também outros gases como CH₄). A maioria dos modelos relaciona a liberação de CO₂ dos solos (resultante da “respiração do solo” – raízes e microorganismos) à temperatura (Davidson e Janssens, 2006). A manutenção da matéria orgânica do solo é de suma importância por preservar a fertilidade do solo através das suas propriedades físicas e biológicas. Devido a sua sensibilidade em relação às diferentes práticas de manejo adotadas, a matéria orgânica é um importante indicador da qualidade do solo

(Mielniczuck et al., 2003). A redução da intensidade do manejo dos solos pode ser um dos modos de viabilizar o aumento do estoque de carbono orgânico nos mesmos (Piccolo et al., 2002; Mielniczuck et al., 2003).

Entretanto, para tornar as áreas agrícolas drenos de carbono orgânico é necessário aumentar as frações mais estáveis a degradação microbiana, tais como os ácidos húmicos e huminas, os quais são a parte mais persistente do carbono orgânico, com permanência de centenas de anos nos solos (Piccolo, 1996). De fato, quanto maior for a hidrofobicidade do AH maior sua capacidade de proteger a degradação das frações orgânicas mais lábeis, aumentando o estoque de carbono do solo (Spacini *et al.*, 2002).

Existe um número expressivo de trabalhos demonstrando que moléculas húmicas liberadas pelas associações supramoleculares das substâncias húmicas afetam o desenvolvimento das plantas através efeitos que mimetizam fitormônios e aumentam absorção de nutrientes essenciais, culminando em aumento significativo da produtividade agrícola. No entanto, o entendimento dos mecanismos envolvidos nesses processos encontra-se num estágio embrionário. São necessários mais estudos que aliem a análise estrutural das substâncias húmicas aos efeitos bioquímicos e celulares dessas substâncias sobre as plantas.

2.2.4. Antes da auxina, os *auximones*

Anos de estudos na área da fisiologia e biologia molecular das plantas têm demonstrado que diversos grupos de pequenas moléculas podem regular todos os passos da ontogênese vegetal.

Em 1881 Charles e Francis Darwin notaram que após a percepção da luz por plântulas de aveia e alpiste, um “fator de influência” era transportado do ápice para base, causando a curvatura do coleótilo na direção da luz. Ainda não se conhecia exatamente o que era esse fator, porém, o conceito de hormônio vegetal ou fitormônio começava a ser discutido por Julius Von Sachs em 1887 na Alemanha. No entanto, somente em 1926, a “influência” que se movia através do tecido vegetal observada pelos Darwin, a molécula de auxina, seria descrita como um fitormônio por Frits Went também na Alemanha.

As discussões em torno de moléculas moduladoras do crescimento vegetal se concentraram nos hormônios produzidos pelas próprias plantas (endógenos).

Contudo, a atuação de fatores exógenos que poderiam influenciar o crescimento vegetal de maneira semelhante ao que foi descrito como auxina já havia sido relatada anos antes por Bottomley (1917). O prefixo “aux”, empregado na palavra auxina, deriva do Grego e significa crescer. Bottomley, numa série de trabalhos publicados na Inglaterra no início do século XX (entre 1914 e 1920), demonstrou que substâncias húmicas aumentavam o crescimento vegetal através do possível fornecimento de substâncias denominadas “auximones”. Pesquisas realizadas independentemente chegaram a conclusões semelhantes, confirmando os resultados de Bottomley alguns anos depois.

As plantas contam com uma variedade de sinais químicos produzidos endogenamente, tais como os fitormônios, fundamentais para o seu desenvolvimento. Através do balanço entre essas moléculas, determinado evento celular pode ocorrer ou ser inibido nos diversos órgãos vegetais, em diferentes estádios do desenvolvimento. Os fitormônios da classe das auxinas governam potencialmente todos os aspectos relacionados ao desenvolvimento vegetal, incluindo o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, o movimento em relação à luz e a gravidade, a dominância apical e a iniciação de raízes (Taiz e Zeiger, 2002a).

O papel da auxina no desenvolvimento radicular é bastante estudado. A auxina mais comum na natureza, o ácido-3-indol acético (AIA), é produzido endogenamente no meristema apical dos ramos vegetais e pode ser transportado rapidamente para as raízes através do floema. As raízes laterais se originam de células maduras do periciclo da raiz. A sinalização desencadeada pela auxina leva a divisão das células do periciclo, formando-se sítios mitóticos precursores de raízes laterais. A arquitetura e morfologia das raízes não estão necessariamente sob o controle somente da auxina endógena. As observações experimentais têm demonstrado que a indução de raízes laterais por auxinas exógenas é um fenômeno natural, uma vez que este fitormônio está presente no ambiente em diferentes formas, inclusive associado às substâncias húmicas (Whitehead 1963, Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004).

Embora existam muitos dados relativos às bases celulares, bioquímicas e moleculares da ação dos diferentes grupos de hormônios no contexto da regulação do crescimento vegetal, pouco se sabe em relação a atividade das substâncias húmicas. A ação hormonal das substâncias húmicas pode ser atribuída a atividade

semelhante a de auxinas sobre as raízes, tais como iniciação de raízes laterais e aumento da expansão celular. No final da década de 1960 e início da década de 1970 trabalhos de diferentes autores expuseram claramente os efeitos de SH nos dois processos supracitados e suscitaram uma polêmica bastante atual: A relação entre a qualidade das SH e os efeitos fisiológicos observados nas plantas.

O primeiro trabalho, publicado em 1967 na Revista *Nature* por Schnitzer e Poapst sob o título “*Effects of a Soil Humic Compound on Root Initiation*”, versa sobre o efeito de concentrações elevadas de ácidos fúlvicos extraídos do horizonte B de um Espodossolo sobre a iniciação de raízes de feijões. Os autores verificaram que a iniciação de raízes é um fenômeno dependente da dose do composto húmico, estando o ponto ótimo em 3000 ppm, no caso da planta utilizada. Os grupamentos funcionais comumente presentes nessas substâncias húmicas, tais como, ácidos carboxílicos e hidroxilas fenólicas e alcoólicas até então eram reputados como responsáveis, pelo menos em parte, pelas propriedades dos ácidos fúlvicos em determinar a iniciação de raízes. O bloqueio dos grupamentos hidroxílicos por acetilação reduziu a iniciação de raízes, enquanto que o bloqueio dos grupamentos carboxílicos por esterificação não teve efeito algum. O bloqueio simultâneo dos grupamentos reduziu a iniciação de raízes ao nível das plântulas não tratadas. Desta forma, a princípio, a presença de grupamentos fenólicos seria mais importante no processo de iniciação das raízes. Esses efeitos significativos foram apontados no contexto da capacidade dos ácidos fúlvicos em complexar metais, especialmente o Ferro. De qualquer forma, já era levantada neste trabalho pioneiro a questão da relação entre a estrutura química das substâncias húmicas e sua atividade biológica.

Em 1968, a visão da época sobre os efeitos fisiológicos induzidos por substâncias húmicas sobre as plantas foi explorada por Guminski, com base em duas principais tendências. De acordo com uma das hipóteses a substâncias húmicas influenciavam *diretamente* os processos bioquímicos enquanto que a outra defendia que estes compostos teriam apenas efeitos *indiretos*. Os efeitos diretos são aqueles que alteram o metabolismo vegetal, enquanto os efeitos indiretos afetam as qualidades físicas do solo (aumento do conteúdo de água e redução da compactação do solo, por exemplo) ou a eficiência dos fertilizantes químicos. De qualquer forma, a maioria dos trabalhos apresentados por Guminski concentrava-se na atividade estimulatória da fração reconhecida como AHs, e na capacidade ou não das substâncias húmicas penetrarem na célula. Nesta revisão Gumimiski deixa claro

que mesmo que uma determinada fração húmica não fosse capaz de penetrar as células vegetais, isto não a classificaria necessariamente como uma substância fisiologicamente inerte, e que, além disso, ambos os efeitos, diretos e indiretos estavam envolvidos na ação destas substâncias.

Seguindo os trabalhos de Guminski, em 1974 Vaughan sugeriu um mecanismo pelo qual os AHs estimulariam a expansão celular em raízes de ervilha (*Pisum sativum*). Resumidamente, Vaughan retirou segmentos de pontas de raízes e manteve-as em meio asséptico contendo concentrações crescentes de ácidos húmicos. Como já observado por outros pesquisadores, concentrações elevadas (acima de 100 ppm de AHs) inibiram a expansão dos segmentos de raízes. O brilhantismo deste trabalho está na hipótese de que a complexação de Ferro (Fe^{2+}) pelos AHs afetaria a conversão de uma proteína presente na matriz da parede celular (de prolina para hidroxiprolina), permitindo a expansão das raízes. Existe uma relação inversa entre a quantidade de hidroxiprolina na parede celular e a capacidade da célula se expandir. Desta forma, a quantidade de hidroxiprolina ligada a parede celular seria reduzida por AHs, devido a remoção do Fe^{2+} de um processo bioquímico importante para a interrupção da expansão celular.

Embora os trabalhos até então houvessem admitido os efeitos diretos e indiretos dos AHs, mais tarde foi levantada a questão de que elevado tamanho molecular aparente dessas substâncias era inconsistente com aqueles efeitos diretos observados (Chen and Aviad, 1990; Nardi et al., 2002). Muitos trabalhos explicam a estimulação do crescimento pelos efeitos indiretos das substâncias húmicas sobre a complexação de íons importantes à nutrição mineral vegetal (Chen and Aviad, 1990; Chen et al., 2004). Realmente a absorção de íons é alterada pela presença de AHs (Vaughan e Malcom, 1985), os quais podem estimular síntese de proteínas carreadoras de íons (Dell'Agnola et al., 1981). As substâncias húmicas podem facilitar a absorção de Fe auxiliando a redução de Fe (III) para Fe (II) em plantas sob deficiência de Fe (Pinton et al., 1998).

Entretanto, além de fornecer nutrientes para as plantas através da mineralização, os AHs também podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Os efeitos das substâncias húmicas sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte de obtenção, das doses utilizadas e da espécie da planta estudada (Vaughan e Malcolm, 1985). Apesar do histórico da ação direta dos AHs sobre as plantas, o estudo da ação das substâncias

húmicas sobre o metabolismo e o crescimento das plantas acabou se concentrando na fração húmica considerada de menor massa molecular (Nardi et al., 2002) em função do modelo de concepção estrutural admitido até pouco tempo. O fato de uma substância do tamanho dos AH (na ordem de micrômetros) (Cameron et al., 1972) atravessarem poros ou espaços aparentes no apoplasto (na ordem de nanômetros) não era concebido. No entanto, baseando-se na concepção nova do arranjo supraestrutural das substâncias húmicas, compostos de reconhecida capacidade de regulação e estimulação do crescimento vegetal, tais como os hormônios vegetais, podem estar fracamente unidos à supraestrutura das substâncias húmicas e serem liberados para a solução do solo e para a absorção das plantas por uma simples variação de pH na interface das raízes decorrente, por exemplo, da exsudação de ácidos orgânicos como experimentado por Façanha et al. (2002). Nardi et al. (2005), utilizaram exsudatos radiculares na extração de substâncias húmicas e observaram um aumento na atividade hormonal dessas substâncias, confirmando que a rizosfera pode alterar o arranjo supra-estrutural das substâncias húmicas. Apesar do desafio enorme para se estabelecer uma relação entre a atividade biológica e a composição química das substâncias húmicas, avanços realizados recentemente demonstram a ação dos AHs se deve a sua hidrofobicidade mais do que o seu aparente tamanho molecular (Canellas et al., 2008, Canellas et al., 2009, Aguiar et al., 2009).

Nos últimos 30 anos, com o avanço das técnicas de isolamento de membranas celulares para análise de transporte de íons, a alteração da bioenergética celular por substâncias húmicas foi investigada sob a vertente da ativação das bombas de prótons e assimilação de nutrientes. Assim, mostrou-se inicialmente que as H⁺-ATPase da membrana plasmática eram ativadas por substâncias húmicas de menor massa molecular, estimulando a absorção de nitrato (Maggioni et al., 1987; Varanini et al. 1993), assim como a H⁺-ATPase da membrana do vacúolo (Pinton et al., 1992). Começava a se estabelecer a idéia de que um dos principais mecanismos bioquímicos envolvidos na ação das substâncias húmicas passava pela estimulação dos sistemas primários de transporte de H⁺. Até então não era admitido que substâncias húmicas tais como os AHs produzissem efeitos desta natureza. Entretanto, a indução da atividade e expressão da H⁺-ATPase de MP isoladas de raízes de milho foi correlacionada com a presença de AIA em AHs e com uma alteração no padrão de desenvolvimento radicular de plântulas de milho

(Canellas et al., 2002). Estes efeitos foram estendidos às bombas de H⁺ do vacúolo vegetal (Zandonadi et al. 2007). Recentemente foi confirmado que os AHs podem ativar tanto a atividade quanto o nível de transcritos para das H⁺-ATPases de MP (gene CsHa2) em raízes crescidas em condições de nutrição de Fe suficiente (Elena et al., 2009). Os autores demonstraram ainda que a atividade de enzimas ligadas a absorção de Fe o nível de transcritos dos genes da Fe(III) quelato redutase (CsFRO1) e transportador de Fe(II) (CsIRT1) também foram alterados pelos AHs de uma maneira dependente da dose. O ON é conhecido por estimular a indução destes genes em raízes de tomateiro, recuperando o crescimento das plantas deficientes (Graziano e Lamattina, 2007) de maneira semelhante ao observado anteriormente para as substâncias húmicas (Pinton et al., 1999). Recentemente, verificou-se que os AHs são capazes de afetar o crescimento de RLs utilizando a mudança da concentração de ON e H⁺ como possíveis sinais (Capítulo 1).

2.2.5. Substâncias húmicas como ferramenta biotecnológica

Uma série de trabalhos demonstra a utilização biotecnológica dos AHs. A aplicação de AHs pode aumentar a concentração de nutrientes nas folhas e o rendimento de cana-de-açúcar no campo (Govindasmy e Chandrasekaran, 1992). O uso de AHs também promoveu o aumento da altura, área foliar, massa seca da parte aérea e, principalmente, da massa seca da raiz de plantas de tomateiro e pepino (Atiyeh et al., 2002). Masciandaro et al., (1999) avaliaram o efeito da adição de dois tipos de materiais orgânicos ao solo: (i) incorporação direta de vermicomposto proveniente de lodo de esgoto e (ii) fertirrigação com substâncias húmicas totais extraídas de vermicomposto e solubilizada em água residual de esgoto tratado. Foi observado um aumento na atividade de enzimas relacionadas com a atividade biológica e nutrição vegetal extraídas de aveia (*Avena sativa*) cultivada nos solos tratados com matéria orgânica. Houve uma correlação positiva entre o índice de crescimento e as características químicas e bioquímicas dos solos após os tratamentos. Os materiais orgânicos incorporados contribuíram para a recomposição da fertilidade dos solos áridos e semi-áridos avaliados. A aplicação de vermicompostos produzidos a partir de diferentes materiais (esterco bovino, resíduos de alimentos e resíduos de papel) em condições de campo pode aumentar

significativamente o crescimento e a produtividade da pimenteira (*Capsicum annuum*) (Arancon et al., 2003).

O uso local (na região Campos dos Goytacazes) de AHs como alternativa biotecnológica para o aumento do enraizamento de toletes de cana-de-açúcar foi demonstrado recentemente (Marques Jr. et al., 2008). A maioria dos solos da região Norte Fluminense onde há o cultivo convencional da cana-de-açúcar é pobre em matéria orgânica (Canellas et al., 2007) e a utilização de AHs combinados às bactérias promotoras do crescimento foram apresentados como uma forma possível para melhorar a eficiência do estabelecimento da cana no campo (Marques Jr. et al., 2008). O uso desta tecnologia é importante para ajudar na recuperação de solos vítimas de técnicas de manejo inadequadas, como a queima da cana (Canellas et al., 2007). De fato, utilizando-se de manejo conservacionista, os quais primam pela manutenção da matéria orgânica do solo, há o aumento da fertilidade dos solos (Canellas et al., 2007), resultando na ativação da enzima H⁺-ATPase responsável pelos principais mecanismos bioquímicos de absorção de nutrientes nas plantas (Busato et al., 2009).

Recentemente foi estabelecida uma correlação entre o estímulo do crescimento e as características químicas dos AHs (Canellas et al., 2008). A atividade da H⁺-ATPase foi utilizada com sucesso como marcadora bioquímica da atividade biológica dos AHs (Tabela 1). A confirmação da atividade biológica dos diferentes produtos oferecidos deveria ser certificada através da confirmação dos efeitos positivos sobre o crescimento vegetal e da atividade da H⁺-ATPase.

Tabela 1. Correlação de Pearson entre as características químicas dos AHs e seus efeitos sobre o crescimento. As plantas foram tratadas com 20 mg C L⁻¹ de AH as características de crescimento massa seca e área das raízes e atividade da H⁺-ATPase de MP foram avaliadas. **P*<0,001, ***P*<0,05, ****P*<0,1. Radicais livres tipo semi-quinona (RTSQ). Extraído de Canellas et al. (2008).

Características	Crescimento radicular		
	Massa seca	Área	H ⁺ -ATPase
C	0,86*	0,90*	0,79**
H	NS	0,81**	0,79**
N	NS	NS	NS
O	-0,85**	0,95**	-0,80**
Cinzas	NS	NS	NS
C/N	NS	NS	NS
H/C	-0,85**	-0,59***	-0,45 ^{NS}
O/C	-0,84**	-0,93*	-0,78*
E ₄ /E ₆	-0,84**	-0,90*	-0,92*
Acidez COOH	-0,83*	-0,92*	-0,87*
Acidez total	-0,81**	-0,89*	-0,88*
Fluorescência	0,87*	0,98*	0,89*
RTSQ	0,87**	0,82**	0,78***
C-COOH	NS	NS	NS
C-Aromático	NS	NS	NS
C-Carboidratos	NS	NS	NS
C-Nitrogênio	NS	NS	NS
C-Alquil	NS	0,70***	0,80**
C-Hidrofóbico	0,80***	NS	0,70***
C-Hidrofílico	NS	NS	NS
H ⁺ -ATPase	0,75**	0,90**	1,00

2.3. O sistema radicular vegetal

Com base na interpretação de Lynch (1995), morfologia radicular se refere a características superficiais de um eixo radicular como um órgão, incluindo características da epiderme, tais como, diâmetro, coifa, pêlos radiculares, a forma do surgimento de raízes “filhas”, sinuosidade do eixo radicular e a senescência. A arquitetura da raiz se refere a configuração espacial do sistema radicular, i.e. a disposição geométrica explícita dos eixos radiculares. Geralmente os estudos da arquitetura da raiz não incluem detalhes estruturais sutis, como pêlos, mas estão relacionados com o sistema radicular como um todo. A arquitetura radicular é muito importante na aquisição eficiente dos recursos dos solos e na adaptação a condições sub-ótimas do ambiente. A disposição espacial do sistema radicular pode determinar a capacidade da planta em explorar os recursos dos solos. Isso é especialmente importante nos casos dos solos tropicais, como os Latossolos e os Argissolos, onde a disponibilidade de P, Ca e outros nutrientes se concentram numa fina camada superficial. Portanto, a importância da arquitetura radicular para a produtividade vegetal deriva diretamente da necessidade da planta em explorar ambientes espacialmente heterogêneos (Lynch, 1995).

A estrutura das plantas superiores é constituída de células que estão arrumadas em populações de células em divisão chamados meristemas. Uma vez fora dos meristemas essas células se expandem. A orientação da expansão celular é o fator mais importante da forma da célula e do órgão. Dado o papel das raízes na ancoragem ao substrato e absorção de nutrientes, a expansão das células das raízes é fundamental para o desenvolvimento de um sistema radicular funcional (Dolan e Davies, 2004). Esses autores definem a expansão celular como o aumento do volume celular governado pelo aumento do volume do vacúolo vegetal e o concomitante aumento da área da superfície celular. Com relação à expansão celular que ocorre fora do meristema, essa pode ocorrer sobre toda a superfície da célula ou em áreas restritas. Em resposta a estímulos ambientais ou mesmo tratamentos exógenos com reguladores de crescimento vegetal, ocasionalmente o alongamento deixa de ser o modo principal pelo qual ocorre a expansão e a direção do crescimento é alterada. Por exemplo, em solos compactados, ou sob o tratamento com etileno, a extensão do alongamento celular é reduzida para em seu

lugar ocorrer a expansão radial das células, dando origem a raízes engrossadas (Taiz e Zeiger, 2002b).

2.3.1. Desenvolvimento das raízes laterais: Papel da auxina, etileno e ON

Durante a formação do primórdio da raiz lateral (RL) ocorre uma intensa organização e diferenciação celular. A formação da RL é iniciada pelas divisões periclinais e anticlinais das células do periciclo da raiz principal (Dolan et al., 1993). Após a formação do primórdio da RL é formado um meristema originado das células derivadas das divisões no periciclo. Este processo tem sido melhor entendido, e mais detalhes foram revelados para a elaboração de um modelo de organização das células durante a formação do primórdio precursor da RL (Malamy e Benfey, 1997, Casmiro et al., 2009). Após várias divisões anticlinais das células do periciclo é criada uma camada de células que compõem o estágio I (Figura 2). A partir daí novas divisões anticlinais e periclinais criam um primórdio com um formato côncavo (estágios III-VII) que pode então emergir da raiz principal (estágio VIII).

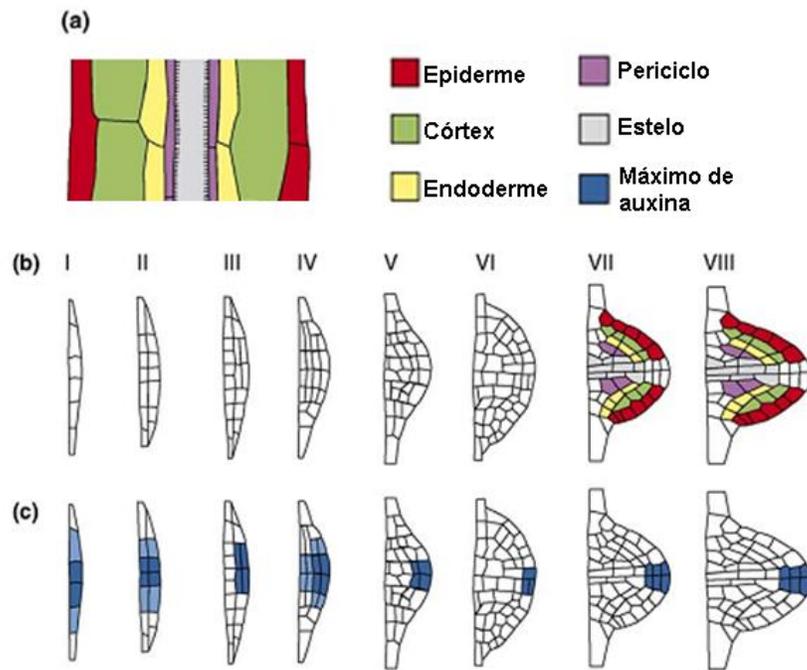


Figura 2. Mudanças morfológicas durante o desenvolvimento da raiz lateral (RL). A RL origina-se das células do periciclo no interior da raiz primária (a). Os oito estágios do desenvolvimento do primórdio estão apresentados em (b). O estabelecimento da sinalização via o “máximo de auxina” é representado em (c). Adaptado de Péret et al. (2009).

A formação das RLs é influenciada por sinais provenientes da própria planta (endógenos) e do ambiente (exógenos). A auxina é o principal sinal endógeno neste processo (Laskowski et al., 1995) e tanto seu transporte (Casimiro et al., 2001; Benková et al., 2003) como sua sinalização (Fukaki et al., 2002; Dharmasiri et al., 2005) são necessários para a formação de RLs. O influxo de auxina é mediado pelas proteínas carreadoras de alta afinidade AUX1 e LAX (Like AUX) (Casimiro et al., 2001; Swarup et al., 2008). Mutantes *aux1* possuem baixo transporte de AIA no sentido basípeto (da ponta da raiz em direção a base da raiz), não sendo capazes de formar RLs (Marchant et al., 2002). O carreador de influxo similar ao AUX1, chamado LAX3, também pode regular a emergência da RL (Swarup et al., 2008). Na presença de AIA, LAX3 é induzido especificamente nas células corticais e da epiderme localizadas sobre a região onde o primórdio da RL emerge. Interessante observar que o mutante *lax3* não tem redução da formação de primórdios, mas sim da emergência de RLs. Por outro lado, a mutação reduz a expressão de diversas enzimas relacionadas com a expansão da parede celular localizadas nas camadas sobre a região de emergência do primórdio radicular, demonstrando a importância de LAX3 no desenvolvimento de RLs (Swarup et al., 2008).

A formação da raiz assim como outros órgãos necessita de um gradiente dinâmico de auxina, a qual concentra-se na ponta dos primórdios formando o chamado “máximo de auxina” (Benková et al., 2003; Grieneisen et al., 2007; Petersson et al., 2009). O gradiente de auxina é dependente da proteína PIN1 (PINformed1) que promove o efluxo deste hormônio (Benková et al., 2003). Mutantes *pin* são defectivos na produção de RLs (Benková et al., 2003). De fato quando o tráfego de vesículas contendo proteínas PIN1 é bloqueado a formação de RLs é inibida (Geldner et al., 2001). Estes autores observaram ainda que o tráfego de vesículas contendo H⁺-ATPases de MP também foi inibido pelo inibidor de transporte auxina TIBA. A atividade desta enzima é um importante fator na sustentação do modelo quimiosmótico de transporte de AIA (Lomax et al., 1985), o qual foi estendido por Li et al. (2005), que demonstraram o aumento da expressão de PIN1 e da H⁺-ATPases de MP em plantas com maior transporte de auxina e maior número de RLs (Li et al., 2005).

O desenvolvimento de RLs também é dependente da sinalização da auxina mediada pelas famílias de reguladores de transcrição Aux/IAA (Proteína responsiva a Auxina/proteína induzida por Ácido Indol Acético) e ARF (Fatores de Resposta a

Auxina), e pela estabilidade dessas proteínas mediada pela percepção da auxina por TIR1 (Fukaki et al., 2002; Okushima et al., 2005; Dharmasiri et La., 2005). Os ARF podem ligar-se aos AuxREs (elementos de REsposta a Auxina) no promotores de genes responsivos a auxina, e mediar as respostas gênicas induzidas por auxina (Ulmasov et al., 1997). A auxina é percebida pelo receptor TIR1 que direciona a degradação das proteínas repressoras Aux/IAA, liberando os ARF (Dharmashiri et al., 2005; Kepinski e Leyser, 2005). Mutantes com a expressão da Aux/IAA *IAA14* aumentada leva ao bloqueio do desenvolvimento de RLs (Fukaki et al., 2002). Em consonância, mutantes com a perda da função de ARF (*arf7* e *arf19*) também não são capazes de produzir RLs (Okushima et al., 2005).

Apesar dos avanços em relação ao mecanismo de ação da auxina no desenvolvimento de RLs, a participação do gás etileno (C_2H_4) neste processo tem sido negligenciada. O etileno é produzido a partir da metionina: a conversão da S-Adenosli-Metionina (SAM) para ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano (ACC) é o primeiro passo da conversão, facilitada pela ACC sintases (ACS). ACC é convertido em etileno pela ACC oxidase (Wang et al., 2002). O etileno produzido é percebido por uma família de receptores (ETR, EIN, ERS). Uma vez ligados ao etileno esses receptores são inativados e como resposta a repressão da proteína EIN2 (Etileno INsensível2) por CTR1 (Resposta Tríplice Constitutiva1) é desfeita. A ativação de EIN2 estabiliza o fator de transcrição EIN3, o qual leva o sinal do etileno para o núcleo e como resultado a transcrição de diversos genes relacionados com o etileno são regulados (Stepanova et al., 2005). (Figura 3).

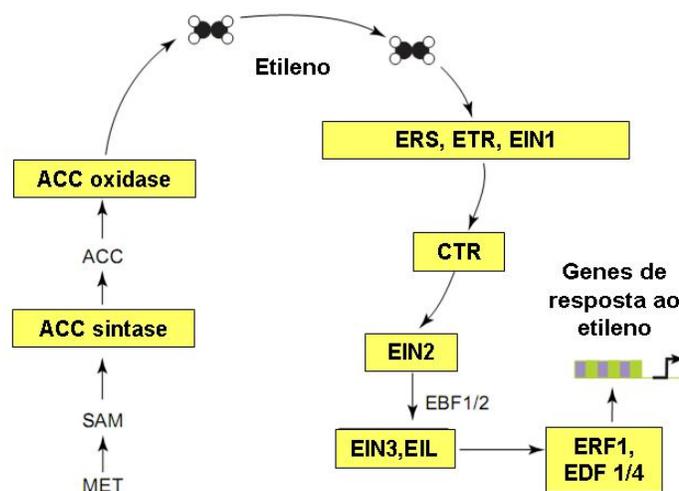


Figura 3. Biossíntese, percepção e sinalização de etileno. Adaptado de Pierik et al. (2006).

A maior parte das interações conhecidas entre a auxina e etileno na raiz se refere a influência recíproca na biossíntese de ambos (Stepanova et al., 2007). O etileno poderia ativar localmente a via de sinalização de auxina através da regulação da biossíntese e do transporte deste hormônio (Ruzicka et al., 2007). Muito pouco se conhece do efeito do etileno sobre a formação de RLs. Somente recentemente este assunto recebeu maior atenção. O controle genético da inibição das RLs por etileno foi avaliado por Negi et al., (2008) que demonstraram que o mutante *ctr1* com a sinalização de etileno aumentada reduz a formação de RLs, enquanto os mutantes *ein2* e *etr1* com a sinalização para o etileno suprimida produziram maior número de RLs. Enquanto este trabalho propõe a regulação negativa do número de RLs por etileno, trabalho subsequente demonstrou a importância deste gás para o desenvolvimento de RLs em doses baixas ($< 0,02 \mu\text{M}$) (Ivanchenko et al., 2008). Os autores observaram que o etileno foi capaz de aumentar tanto a frequência de primórdios formadores de RLs quanto a emergência destas raízes. Com base nos resultados obtidos foi possível construir um modelo da participação do etileno na formação de RLs numa interação com auxina, onde em doses baixas o etileno estimula a biossíntese de auxina, que por sua vez promove a iniciação da RL através de um mecanismo que envolve as proteínas Aux/IAA e ARF. Neste modelo a auxina interage sinergisticamente com o etileno na ponta da raiz primária para regular sua expansão, gerando uma resposta que controla o nível e a extensão da atuação de ambos os fitormônios (Figura 4). O etileno promove o transporte de auxina da parte aérea para raiz e da ponta da raiz para a zona de expansão da raiz, afetando o descarregamento de auxina nas células através de AUX1 (Ivanchenko et al., 2008; Negi et al., 2008).

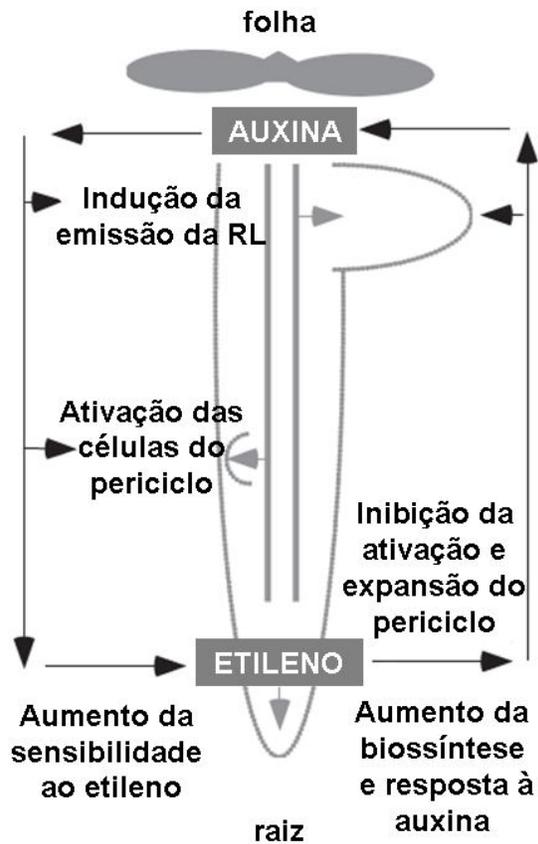


Figura 4. Modelo proposto para a participação do etileno na formação de raízes laterais em *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Ivanchenko et al. (2008).

Outro sinal gasoso presente nas células vegetais vem sendo fortemente relacionado com o desenvolvimento de RLs: O gás óxido nítrico (ON). O ON é uma molécula reativa pequena, solúvel em meio hidrofílico e hidrofóbico conhecido tradicionalmente por atuar como mensageiro em células animais (Schmidt e Walter, 1994). Apesar de envolvido em diversos processos do desenvolvimento vegetal, um dos efeitos mais marcantes desta molécula é sobre a formação de primórdios precursores de RLs (Correa-Aragunde et al., 2004; Kolbert et al., 2008; Flores et al., 2008). A forma pela o ON é produzido pelas plantas ainda é motivo de discussão intensa (Yamasali et al., 2000; Stohr et al., 2001; Bethke et al., 2004; Planchet et al., 2005). Parecem existir duas vias de produção enzimática, das quais uma seria dependente de L-Arg via atividade de uma provável óxido nítrico sintase (ONS) (Cueto et al., 1996; Ribeiro, 1999). A outra via enzimática envolve a nitrato redutase (NR) citoplasmática (Yamasali et al., 2000) e a nitrito/ON redutase (Ni-NOR) da membrana plasmática (Stohr et al., 2001) (Figura 5). Por outro lado, há evidências de um mecanismo independente das enzimas citadas anteriormente, no qual o ON é sintetizado no apoplasto em pH baixo a partir do nitrito (Bethke et al., 2004).

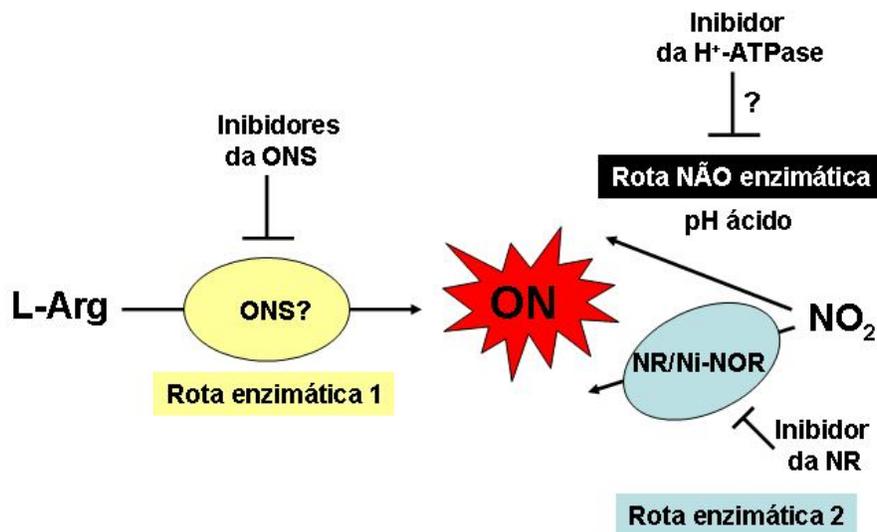


Figura 5. Representação das rotas possíveis para a produção de óxido nítrico (ON). A rota enzimática 1 representa a produção de ON via ON sintase (ONS) a partir de L-Arginina. A rota enzimática 2 é dependente da nitrato redutase (NR) e nitrito/nitrato redutase (Ni-NOR). Uma rota não enzimática dependente de nitrito e pH baixo é apresentada. Neste caso pode haver a participação da H⁺-ATPase de MP. Esquema montado com base nos dados de diversos autores, incluindo os obtidos no capítulo 1 da presente Tese.

A participação do ON na indução de sítios precursores de RLS e no estímulo da expansão de RLs foi demonstrada por Correa-Aragunde et al. (2004). Estes autores detectaram a produção de ON especificamente nos primórdios formadores das RLs e demonstraram que a aplicação do doador de ON (SNP) estimulam a produção de RLs na presença do inibidor de transporte de auxina NPA e que o efeito da auxina sintética NPA não seria capaz de induzir a formação de RLs na presença do bloqueador da ação do ON. As observações de que o ON poderia atuar estimulando o desenvolvimento das RLs foi confirmado mais tarde por outros grupos independentes (Kolbert et al., 2008; Guo et al., 2008). Apesar disso, a fonte necessária à produção de ON durante o desenvolvimento de RLs permanece obscura.

Recentemente foi demonstrado a ação da NR seria a fonte responsável pela produção de ON em durante desenvolvimento de RLs induzidos pelo ácido indol butírico, precursor de AIA (Kolbert et al., 2008). Estes autores utilizaram mutantes *nia1* e *nia2* deficientes na enzima NR e o inibidor da ONS L-NMMA para excluir a hipótese da participação da ONS como fonte de produção de ON durante o desenvolvimento de RLs mediado por auxina. Em contraste, observou-se que mutantes com a atividade reduzida da enzima que degrada a Arginina (*argah1-1* e *argah2-1*) possuem maior capacidade de acumular ON nas raízes resultando em maior número de RLS (Flores et al., 2008). Os autores observaram que a aplicação do ácido naftaleno acético (NPA) aumentou o número de RLs duas vezes mais nos mutantes em comparação as plantas WT. Os autores atribuíram este fato ao aumento na expressão do gene repórter sensível a auxina *DR5::GUS* nos mutantes *argah1-1* e *argah2-1*.

Não existem relatos do uso de mutantes na via de sinalização de auxina ou entender melhor a ação do ON durante o desenvolvimento de RLs. Nem mesmo a ação de inibidores da via de sinalização, como o PCIB, tem sido empregada. Portanto, ainda é cedo para afirmar que os efeitos do ON são independentes da via de sinalização de auxina como afirmado por Correa-Aragunde et al. (2004).

2.4. O pH como mensageiro e sinalizador nas células vegetais

Pelo fato de serem organismos sésseis, as plantas passam por diferentes situações impostas pelo ambiente que as circundam e precisam reconhecer e responder aos diferentes sinais e estímulos externos, em adição aos sinais endógenos. Dentre todos estes estímulos estão os metabólitos orgânicos, nutrientes minerais, luz, gravidade, calor, frio, reguladores do crescimento e pH (Trewavas, 2000). A integração de várias formas de sinais pode ser crucial para a resposta da planta.

As plantas necessitam distinguir os sinais presentes de maneira contínua e de oscilação lenta (como a luz e temperatura) dos sinais repentinos (como ferimentos causados por insetos), os quais modificam a programação básica modulada pelos sinais contínuos (Felle, 2001). Segundo este autor o termo “sinal” pode ser utilizado tanto para expressar um processo que ocorreu ou está a ponto de ocorrer, como no sentido de iniciar um processo ou uma sequência de eventos. Neste caso entende-se o sinal como o responsável por disparar determinados eventos.

Os dois principais elementos das vias de transdução de sinais são o Ca^{2+} intracelular (cuja variação na concentração está relacionada às reações imediatas) e as proteínas quinases, enzimas que fosforilam proteínas alvo alterando suas atividades (Harmon *et al.*, 2000). Entretanto, mudanças ambientais repentinas também alteram o pH citosólico (Felle e Bertl, 1986). As moléculas envolvidas na transmissão de sinais provenientes de fontes extracelulares que influenciam enzimas alvo dentro da célula são conhecidas como mensageiras secundárias (Trewavas, 2000). A atuação do Ca^{2+} como mensageiro secundário envolve a regulação de sua concentração, a qual, durante a sinalização celular, varia enormemente causando a chamada onda de Ca^{+2} (Ca^{+2} *transients* ou Ca^{+2} *waves*) frequentemente associada ao início das respostas celulares (Trewavas, 1999). A despolarização da MP induzidas por ABA em suspensão de células de *Arabidopsis* é um bom exemplo do controle de eventos celulares pela variação da concentração de Ca^{+2} (Brault *et al.*, 2004). Mediante o aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico ocorrem dois processos independentes que despolarizam a MP: ativação de canais de ânions e inibição da H^+ -ATPase de MP. Por outro lado, sob anoxia a concentração de H^+ citoplasmático é aumentada imediatamente (Fox *et al.*, 1995). Apesar da flutuação da concentração de H^+ , assim como a de Ca^{2+} , ocorrer em resposta a diferentes

sinais, somente o Ca^{2+} tem sido reconhecido amplamente como mensageiro secundário (Felle, 2001). É importante ressaltar que Ca^{2+} e H^+ possuem diferente mobilidade na célula, sendo o primeiro altamente móvel entre os compartimentos celulares, enquanto o segundo move-se lentamente (Felle, 2001). Dessa forma, o Ca^{2+} possui uma ação mais localizada enquanto o H^+ atua de maneira mais ampla.

2.4.1. O papel do pH na fisiologia da raiz

Apesar do papel do pH apoplástico ser muito importante na sinalização intercelular, a regulação deste processo é pouco conhecida nas raízes. A variação de pH na superfície das raízes depende da região avaliada (Pillet et al., 1983; Versel e Mayor, 1985), sendo o fluxo de H^+ da região em crescimento relacionado com a ação da auxina (Evans et al., 1980; Moloney et al., 1981; Miller e Gow, 1989). A teoria do crescimento ácido estabelece que a auxina pode acidificar o apoplasto através do estímulo da extrusão de H^+ mediada pela H^+ -ATPase da MP, resultando na ativação de vários processos necessários para o aumento da plasticidade da parede celular e subsequente expansão (Rayle e Cleland, 1970; Hager et al., 1971; Revisado por Hager, 2003). Esta teoria clássica foi estabelecida inicialmente em coleótilos e mais tarde comprovada em raízes (Moloney et al., 1980). Entretanto, a seguinte pergunta ainda é motivo de debate: O pH é um mensageiro neste processo ou somente um componente químico básico para ativar enzimas ou modificar o transporte de membrana? Sabe-se que após a adição de AIA, o potencial de membrana, a concentração de Ca^{2+} e H^+ do citosol podem oscilar (Felle et al., 1988). Estes autores demonstraram que as mudanças do pH do citosol ocorreram antes da modificação do potencial de membrana, sugerindo que a acidificação do citosol alterou a atividade das bombas de H^+ , que por sua vez polarizou a membrana e causou as oscilações observadas. Entretanto, esta hipótese ainda não foi comprovada.

2.4.2. A regulação do pH e as bombas de H^+

A estabilidade do pH celular é o resultado de uma variedade de processos, tais como as reações metabólicas que consomem e liberam H^+ e o transporte de H^+

através das membranas (Felle, 2001). A regulação do pH citosólico, apoplástico e vacuolar das células vegetais é fortemente dependente das bombas de H^+ (Gaxiola et al., 2007) (Figuras 6 e 7). Na membrana plasmática (MP) localizam-se H^+ -ATPases do tipo P, as quais acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de H^+ para fora da célula (do citoplasma para o apoplasto), tendo seu papel fisiológico associado a nutrição e expansão celular (Revisado por Duby e Boutry, 2009). A H^+ -ATPases de MP das plantas é um monômero de cerca de 100 kDa (Briskin et al., 1989) a qual pode se oligamerizar para formar complexos dímeros e hexâmeros (Kanczewska et al., 2005). A região C terminal auto-inibitória da H^+ -ATPases de MP pode ser fosforilada servindo como sítio de ligação para as proteínas reguladoras 14-3-3 que ativam a H^+ -ATPase (Fuglsang et al., 1999). Este complexo ativado consiste em um arrançamento formado por seis monômeros de H^+ -ATPases arrumados em uma estrutura hexamérica juntamente com seis moléculas da proteína 14-3-3 (Kanczewska et al., 2005). A H^+ -ATPases de MP é regulada mais efetivamente ao nível pós-traducional, principalmente pelo aumento do acoplamento mais eficiente do transporte de H^+ à hidrólise de ATP, sugerindo que esta enzima pode responder mais rápido aos desafios impostos pelo ambiente (Gaxiola et al., 2007). A super-expressão da H^+ -ATPase de MP (isoforma 4 de tabaco, *PMA4*), ativada constitutivamente pela deleção de seu domínio auto-inibitório, resulta em plantas com maior capacidade de acidificar a rizosfera e resistir à salinidade (Gévaudant et al., 2007). Existem 11 isoformas da H^+ -ATPase de MP (*AHA1-AHA11*) descritas em *Arabidopsis* (Palmgren et al., 2001; Gaxiola et al., 2007). A função celular de tantas isoformas distintas ainda não é clara. Entretanto, sabe-se, por exemplo, que as isoformas *AHA1* e *AHA2* são expressas praticamente em todos os tecidos e órgãos vegetais, enquanto que outras isoformas, como *AHA6* e *AHA8* têm expressão específica nas anteras (Revisado por Gaxiola et al., 2007). Desta maneira, postula-se que determinadas situações durante a ontogênese vegetal requeiram isoformas específicas de H^+ -ATPases para desempenhar funções específicas do tecido ou órgão em questão (Gaxiola et al., 2007).

No vacúolo se encontram duas bombas de H^+ : uma H^+ -ATPase do tipo V e uma H^+ -PPase (Rea e Sanders, 1987; Maeshima, 2000). As V-ATPases são enzimas heteromultiméricas constituídas de um complexo periférico catalítico (V_1) e de um complexo integral transmembrana responsável pela translocação de íons (V_0) (Sze et al., 1992; Huss et al., 2002). Esta é a enzima mais antiga e complexa entre

as três bombas de H⁺ vegetais, compartilhando características semelhantes a sua ancestral F-ATPase (Nishi e Forgac, 2003; Gaxiola et al., 2007). A redução da expressão da subunidade C (domínio V₁) da V-ATPase no mutante *det3* de *Arabidopsis* pode gerar plantas anãs com expansão celular reduzida (Schumacher et al., 1999). A super-expressão das subunidades c1 e c3 do setor transmembrana (V₀) também foi evidenciada como fundamental para a expansão celular em raízes e para a tolerância moderada ao estresse salino (Padmanaban et al., 2004). Além da função clássica reputada a esta enzima, é provável que a mesma participe na sinalização de açúcares por meio da subunidade B1 (Cho et al., 2006). Dada a sua participação no tráfego de membranas, digestão endocítica, entre outros processos, o papel da V-ATPase sobre a fisiologia vegetal ainda pode ser ainda mais complexo (Beyenbach e Wiczorek, 2006).

As H⁺-PPases são polipeptídeos de aproximadamente 80 kDa que, diferente das ATPases, utilizam pirofosfato inorgânico (PPi) como substrato para transportar H⁺ para o interior do vacúolo (Revisado por Maeshima, 2000). Além do vacúolo, as H⁺-PPases podem estar localizadas no complexo de Golgi (Mitsuda et al., 2001) e na MP (Li et al., 2005). Existem dois tipos de H⁺-PPases filogeneticamente distintas: (1) A H⁺-PPase do tipo 1, a qual é dependente do K⁺ do citosol para sua atividade e possui moderada inibição pela presença de Ca²⁺; e (2) A H⁺-PPase do tipo 2, a qual é insensível a K⁺, mas extremamente sensível a Ca²⁺ (Maeshima, 2000; Gaxiola et al., 2007). Ainda não está claro o significado da existência de dois tipos de H⁺-PPases, assim como a presença desta enzima na MP. Plantas transgênicas com a expressão aumentada da H⁺-PPase vacuolar ou de tonoplasto (gene *AVP1*, *Arabidopsis* Vacuolar H⁺-Pirofosfatase) possuem elevada resistência ao estresse salino e hídrico (Gaxiola et al., 2001). Recentemente, foi observado que a super-expressão de *AVP1* em alfafa também aumenta a tolerância de plantas de alfafa a salinidade e a seca (Bao et al., 2009). Em conformidade ao observado por estes autores, a super-expressão do gene *TsVP*, que codifica a H⁺-PPase de *Thellungiella halophila*, aumentou a resistência de algodoeiro a seca (Lv et al., 2009). Plantas transformadas com o gene *AVP1* têm um aumento significativo da biomassa radicular (Gaxiola et al., 2001; Li et al., 2005; Yang et al., 2007), maior capacidade de transporte de auxina e de extrusão de H⁺ fato este ligado a maior atividade e expressão da H⁺-ATPase de MP (Li et al., 2005).

O transporte de solutos dependente de energia que ocorre através de transportadores e canais nas membranas plasmática e vacuolar são dependentes do gradiente potencial eletroquímico de H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$). O $\Delta\mu_{H^+}$ é definido pela soma do potencial elétrico e químico do íon. Cada espécie iônica possui uma determinada diferença de potencial químico através da membrana dependendo de sua concentração. Por outro lado, o potencial elétrico possui um valor constante devido a carga inerente do íon. As bombas de H^+ são as principais fontes do $\Delta\mu_{H^+}$ e desta forma geram a força motriz necessária para o fluxo de solutos que dependem desta energia (Sze, 1985, Nelson, 1988).

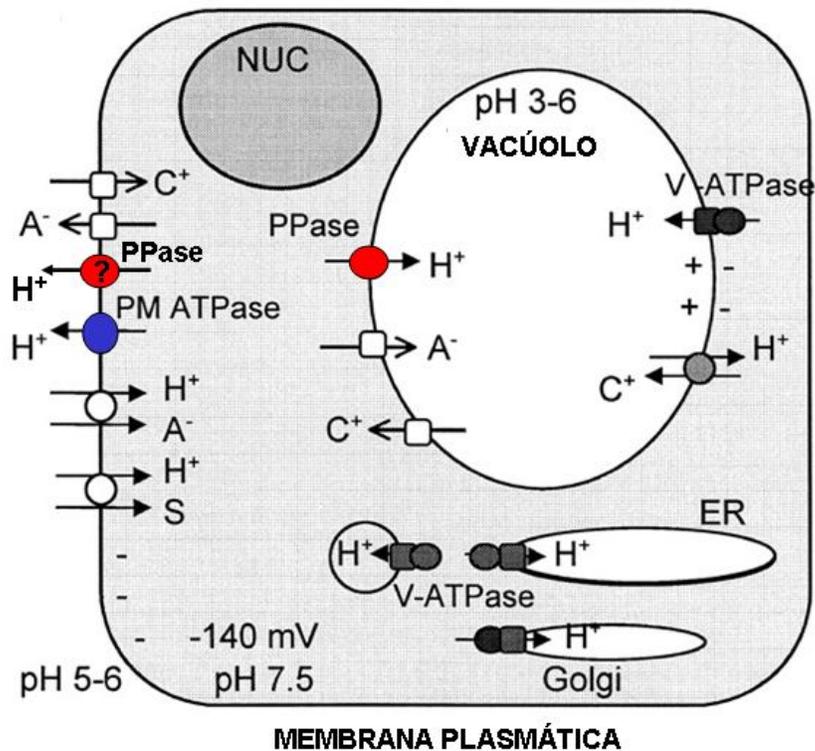


Figura 6. As bombas de H^+ da célula vegetal e transporte de íons e solutos. A H^+ -ATPase da membrana plasmática (azul) transporta H^+ para fora da célula gerando o gradiente eletroquímico (de -120 a -160 mV relativo ao meio externo). A H^+ -ATPase do tonoplasto (V-ATPase, preto) acidifica o vacúolo e outras endomembranas. A H^+ -PPase vacuolar (PPase, vermelho) acidifica o vacúolo e possivelmente o apoplasto (Li et al., 2005). A força próton motora fornece a energia para a troca de solutos por proteínas carreadoras simporteres (círculos brancos), antiporteres (círculos cinzas) e canais (quadrados brancos). Solutos orgânicos (S), cátions (C^+) e ânions (A^-) e o núcleo (NUC) estão representados. Adaptado de Sze et al. (1999).

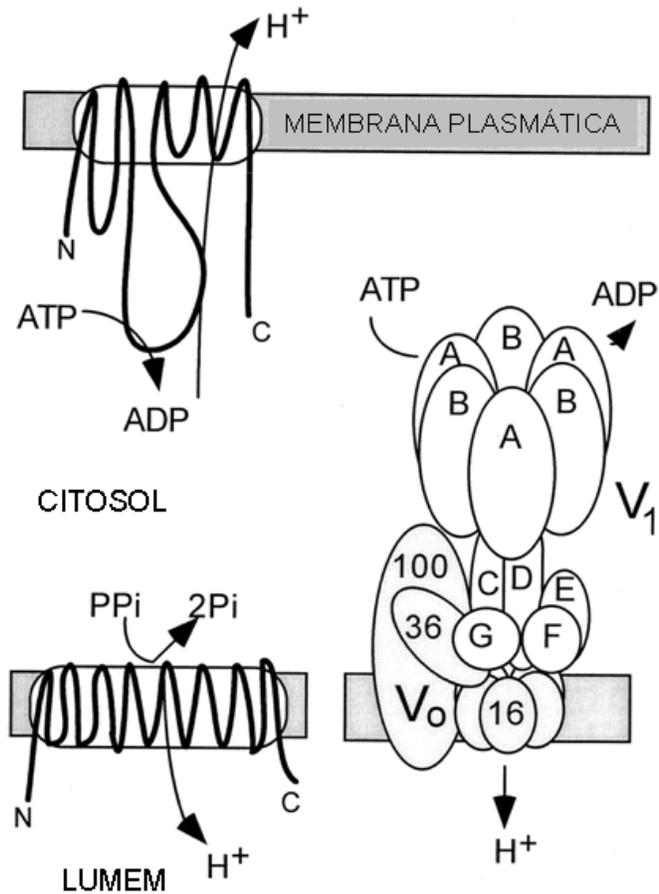


Figura 7. As estruturas simplificadas das bombas de H^+ da célula vegetal. A H^+ -ATPase de MP (acima a esquerda) é representada na forma de um monômero de ~100 kDa. H^+ -ATPase da vacúolo (abaixo a direita): Possui um complexo preiférico catalítico (V_1) e um transmembrana (V_0) unidos pelas subunidades C, E e G. H^+ -PPase do vacúolo (Abaixo a esquerda): uma proteína de subunidade única de ~80 kDa. Adaptado de Sze et al., (1999).

2.4.3. Sinalizando em distâncias maiores

A propagação da mudança de pH através da planta ainda não é comprovada. Apesar disso, não se exclui a possibilidade de uma possível mudança em cascata do pH através do xilema ou floema. A alteração do potencial de membrana (V_m ou $\Delta\psi$) dependente de dois componentes principais: a difusão potencial dos íons e o transporte eletrogênico promovido pelas bombas de H^+ (Spanswick, 1981).

O gradiente de H^+ nas células vegetais são mantidos através de diversas membranas, e o fluxo de saída e entrada através delas constitui o circuito bioenergético (López-Marques, 2004; Gaxiola e tal., 2007). A formação do gradiente de H^+ requer energia, entretanto a dissipação do gradiente pode ser utilizada como fonte de energia, a qual pode ser convertida: a energia osmótica e elétrica acumulada no gradiente de H^+ pode de ser convertida em energia luminosa ou energia química livre acumulada em produtos do metabolismo e vice-versa.

As mudanças transitórias no potencial de membrana estão relacionadas a percepção e transdução de sinais extracelulares. A despolarização da membrana, por exemplo, necessita do acoplamento do fluxo de íons através da MP, e pode ser induzida pela: (i) inibição da H^+ -ATPase de MP e/ou; (ii) abertura de canais de entrada de cations (e.g., Ca^{2+} e K^+) e/ou; abertura de canais de anions (e.g., Cl^-).

Ainda é tema de discussão a participação das bombas de H^+ em suposto sistema de sinalização elétrico (Brenner et al., 2006). O evento inicial da sinalização elétrica é uma mudança no V_m , o qual é transformado em uma resposta bioquímica. A sinalização elétrica requer canais dependentes de voltagem e uma bomba eletrogênica com a finalidade de estabelecer a polarização da membrana (como a H^+ -ATPase vegetal ou a Na^+/K^+ -ATPase animal).

No sistema nervoso animal, o potencial de ação é iniciado pela despolarização localizada da membrana, resultando na abertura de canais dependentes de voltagem de maneira transitória, que leva a entrada de cátions e uma subsequente despolarização da membrana. Como resultado o potencial de ação se propaga como uma onda. Os tecidos vegetais também são capazes de conduzir sinais elétricos através da continuidade do simplasto através dos plasmodesmos (Wildon et al., 1992). Entretanto, como os sinais elétricos de longa distância regulam as respostas vegetais ainda é um mistério. Uma nova área da pesquisa, conhecida como Neurobiologia, tem focado neste estudo. A Neurobiologia

procura entender a maneira pela qual as plantas percebem e respondem ao ambiente que as cercam de maneira integrada, os componentes moleculares, químicos e elétricos da sinalização intracelular (Brenner et al., 2006). Entretanto, essa visão ainda é bastante controversa. Recentemente, foi proposto um novo sinal de longa distância apoplástico em plantas em resposta a injúrias chamado de “potenciais sistêmicos” (Zimmermann *et al.*, 2009). Estes autores demonstraram que após injúria numa determinada folha da planta viva foi possível detectar um sinal elétrico em outra folha distante cerca de 25 cm em *Hordeum vulgare* e até 40 cm distante em *Vicia faba*. Dentre as características que diferem este potencial do potencial de ação e do potencial de variação estão: o movimento iônico, o qual segue a mudança de voltagem e o mecanismo de hiperpolarização ativado pela H⁺-ATPase de MP.

2.4.4. Sinal elétrico para o enraizamento: participação das substâncias húmicas?

Dentre as várias “estratégias” vegetais está a formação de RLs, processo utilizado com sucesso como modelo para o entendimento das mudanças da morfologia vegetal em resposta as condições ambientais (Malamy e Ryan, 2001). O AH presente na matéria orgânica é um dos fatores do ambiente que pode alterar o padrão de crescimento das raízes via ativação da H⁺-ATPase de MP (Canellas et al., 2002). Levando em conta que a H⁺-ATPase de MP é fundamental para a sinalização elétrica nas plantas (Zimmermann *et al.*, 2009), seria possível postular que o AH participa da formação de corrente elétrica para sinalização do crescimento de raízes?

O desenvolvimento de RLs a partir da raiz primária é associado com uma corrente elétrica na direção do primórdio precursor da RL (Hamada et al., 1992). De fato, a aplicação de corrente elétrica pode aumentar significativamente o número de RLs e o comprimento destas RLs em plântulas de milho (Takamura, 2006). Observou-se recentemente que a iniciação de RLs também ocorre mediante estímulos mecânicos em *Arabidopsis* (Ditengou et al., 2008; Richter et al., 2009), os quais são capazes de aumentar a expressão da H⁺-ATPases de MP (Oufattole et al., 2000) e podem estar relacionados com a produção de corrente elétrica. Estímulos

produzidos em uma parte da planta podem ser propagados em longa distância como sinal elétrico dependente da atividade da H⁺-ATPase de MP (Zimmermann *et al.*, 2009). Além do comprovado efeito fisiológico semelhante ao da auxina, os radicais redox (quinonas e semiquinonas) presentes na estrutura dos AH poderiam contribuir para a formação de uma corrente elétrica ao redor das raízes. Esta hipótese é plausível uma vez que existe uma correlação positiva entre o conteúdo de radicais semi-quinonas presente no AH e o aumento do crescimento radicular (Canellas *et al.*, 2008). São necessários mais estudos para entender a interação entre os sistemas primários de transporte H⁺ nos processos fisiológicos associados ao desenvolvimento radicular e a resposta a fatores ambientais exógenos que podem influenciar a sinalização elétrica nas plantas.

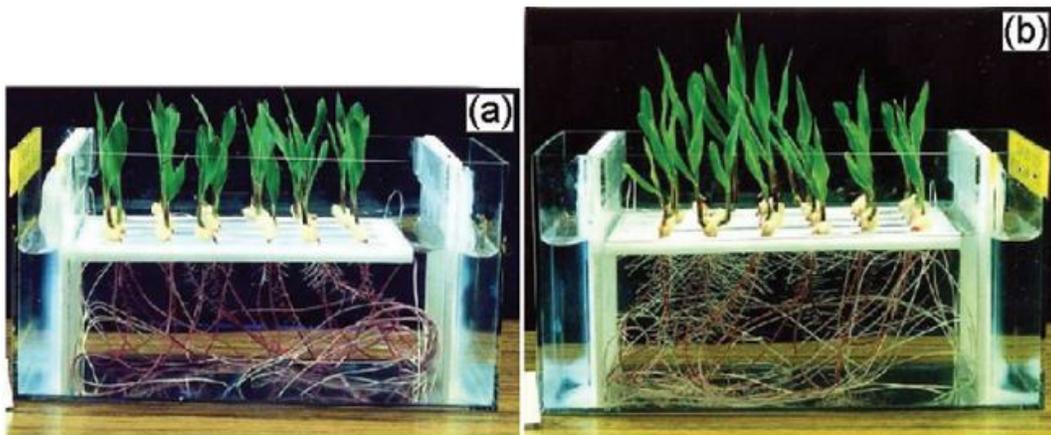


Figura 8. Plântulas de milho com uma semana de idade crescidas na ausência (a) e presença (b) de corrente elétrica (amplitude de 3,5 V sob frequência de 20 Hz em ondas de pulsos quadrado). Extraído de Takamura (2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311: 91–94.
- Aguiar, N.O, Canellas, L.P, Dobbss, L.B., Zandonadi D.B. (2009) Distribuição de massa molecular e bioatividade de ácidos húmicos. *Rev. Bras. Cienc. Solo. in press*.
- Alencastro, C. (2009) Emissões de CO₂ no país aumentam 69%. *O Globo*, Rio de Janeiro, 26. Nov. p. 38.
- Arancon, N.Q., Lee, S., Edwards, C.A., Atiyeh, R. (2003) Effect of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposting on growth of greenhouse plants. *Pedobiologia*, 47.
- Bayer, C., Dick, D.P., Ribeiro, G.M., Scheuermann, K.K. (2002) Carbon stocks in organic matter fractions as affected by land use and soil management, with emphasis on no-tillage effect. *Cienc. Rural*, 32:401-406
- Benková , E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., Friml, J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115:591–602.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16:332–41.

- Beyenbach, K.W., Wieczorek, H.W. (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.*, 209:577-589.
- Blakely, L.M., Durham M., Evans T.A., Blakely, R.M. (1982) Experimental studies on lateral root-formation in radish seedling roots 1. general-methods developmental stages, and spontaneous formation of laterals roots. *Bot Gazet.*, 143:341-352.
- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proc. R. Soc. A. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 89:481-505.
- Brault, M., Amiar, Z., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Zhang, Z., Cornel, D., Dellis, O., Knight, H., Bouteau, F., Rona, J.P. (2004) Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca²⁺ dependent. *Plant Physiol.*, 135:231-243.
- Brenner, E.D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluska, F., Van Volkenburgh, E. (2006) Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plant Sci.*, 11:413-419.
- Briskin, D.P., Reynolds-Niesman, I. (1989) Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.*, 90:394-397.
- Busato, J.G.; Zandonadi, D.B., Dobbss, L.B, Velloso, A.C.X., Façanha A.R., Canellas L.P. (2009) Humic substances isolated from residues of sugarcane industry as root growth promoter. *Sci. Agríc.*, artigo aceito.
- Cameron, R.S., Thornton, B.K., Swift, R.S., Posner, A.M. (1972) Molecular weight and shape of humic acids from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J. Soil Sci.*, 23:394-408.
- Campos-Cuevas, J.C, Pelagio-Flores, R., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Ortiz-Castro, R., López-Bucio J. (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Sci.*,174:165-173.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130:1951-1957.

- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2009) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 78:457-466.
- Canellas, L.P., Baldotto, M.A., Busato, J.G., Silva, N.M., Marciano, C.R., Velloso, A.C.X. (2007) Estoque e qualidade da matéria orgânica de um solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. *Rev. Bras. Cienc. Solo*, 31:331-340.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130:1951-1957.
- Canellas, L.P., Zandonadi, D.B., Busato, J.G., Baldotto, M.A., Simões, M.L., Martineto, L., Façanha, A.R., Spaccini, R., Piccolo, A. (2008) Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Sci.*, 173:624-637.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandber, G., Casero, P.J., Benett, M. (2001) Auxin transport promotes arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*, 13:843-852.
- Chen, Y., Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. (eds) *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*. Madison, WI: American Society of Agronomy Inc., Soil Science of America, Inc. p. 161-186.
- Chen, Y., Clapp, C., Magen, H. (2004) Mechanism of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50:1089-95.
- Conte, P., Spaccini, R., Šmejkalová, D., Nebbioso, A., Piccolo, A., (2007) Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acids. *Chemosphere*, 69:1032–1039.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218: 900-905.
- Cho, Y.H., Yoo, S.D. and Sheen, J. (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127: 579–589.
- Cleland, R. (1971) Cell wall extension. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 22:197–222.

- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218: 900-905.
- Crozier, A., Kamiya Y., Bishop, G, Yokota, T. Biosynthesis of Hormones and Elicitor Molecules. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, p. 850-929.
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J. (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.*, 398:159–64.
- Darwin, F., Darwin, C. (1880) *The Power of Movement in Plants*. London: John Murray.
- Davidson, E.A., Janssens, I.A. (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440:165-173.
- Dell’Agnola, G., Ferrari, G., Nardi, S. (1981) Antidote action of humic substances on atrazine inhibition of sulphate uptake in barley roots. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 15:101–104.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435:441-443.
- Ditengou, F.A., Teale, W.D., Kochersperger, P., Flittner, K.A., Kneuper, I., Van der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., Laux, T., Palme, K. (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:18818-18823.
- Dolan, L., Davies, J. (2004) Cell expansion in roots. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:33-39.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.*, 457:645-655.
- Elena, A., Diane, L., Eva, B., Marta, F., Roberto, B., Zamarreño, A.M., Garcia-Mina, J.M. (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 47 215–223.
- Evans, M.L., Vesper, M.J. (1980) An Improved Method for Detecting Auxin-induced Hydrogen Ion Efflux from Corn Coleoptile Segments. *Plant Physiol.*, 66:561-565.

- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil F., Schripsema, J., Braz-filho, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropecu. Bras.*, 37:1301-1310.
- Felle, H.H. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.*,3:577-591
- Felle, H. H. (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*, 174:495-499.
- Felle, H., Bertl, A. (1986) Light-induced cytoplasmic pH-changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 848: 176-182.
- Flores, T., Todd, C.D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P.K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M.E., Brownfield, D.M., Mullen, R.T., Lamattina, L., Polacco, J.C. (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.*, 147:1936-1946.
- Fox, G. G., McCallan, N. R., Ratcliffe, R. G. (1995) Manipulating cytoplasmic pH under anoxia: a critical test of the role of pH in the switch from aerobic to anaerobic metabolism. *Planta*, 195:323-330.
- Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., and Palmgren, M.G. (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947. *J. Biol. Chem.*, 274: 36774–36780.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., Tasaka, M. (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 29:153–168.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett.*, 581:2204-2214.
- Gazzarrini, S., McCourt, P. (2003) Cross-talk in plant hormone signalling: what *Arabidopsis* mutants are telling us. *Annu. Bot.*, 91,605–612.
- Geldner, N., Friml, J.K., York-Dieter, S., Jürgens, G., Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413:425-428.

- Gevaudant, F., Duby, G., von Stedingk, E., Zhao, R., Morsomme, P., Boutry, M. (2007) Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiol.*, 144:1763–1776
- Govindasmy, R., Chandrasekaran, S. (1992) Effect of humic substances on the growth, yield, and nutrient content of sugar cane. *Sci. Tot. Environ.*, 118:575-581.
- Graziano, M., Lamattina, L. (2007) Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *Plant J.*, 52:949–960.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Maree, A.F., Hogeweg, P., and Scheres, B. (2007) Polar transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449: 1008–1013.
- Guminski, S. (1968) Present days view on physiological effects induced in plant organisms by humic compounds. *Sov. Soil Sci.*, 9:1250-1255.
- Guo, K., Xia, K., Yang, Z.M. (2008) Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide. *J. Exp. Bot.*, 59:3443-3452.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 116:483-505.
- Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971) Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. *Planta*, 100:47-75.
- Hamada, S., Ezaki, S., Hayashi, K., Toko, K., Yamafuji, K. (1992) Electric current precedes emergence of a lateral root in higher plants. *Plant Physiol.*, 100:614-619.
- Harmon, A.C., Gribskov, M., and Harper, J.F. (2000) CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci.*, 5:154-159.
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gabel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K., Wieczore, H. (2002) Concanamycin A, the Specific Inhibitor of V-ATPases, Binds to the Vo Subunit c. *J. Biol. Chem.*, 277:40544-40548.
- Indermuhle, A., Stocker, T.F., Joos, F., Fischer, H., Smith, H.J., Wahlen, M., Deck, B., Mastroianni, D., Tschumi, J., Blunier, T., Meyer, R., Stauffer, B. (1999) Holocene carbon-cycle dynamics based on CO₂ trapped in ice at Taylor Dome, Antarctica. *Nature*, 398:121-126.

- Ivanchenko, M.G., Muday, G.K., Dubrovsky, J.G. (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 55:335–347.
- Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J.L. and Boutry, M. (2005) Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:11675–11680.
- Kepinski, S., Leyser, O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435:446–451.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L. (2008b) Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.*, 133:406-416.
- Lal, R., Pirce, F. J. (1991) The vanishing resource, *In*: Lal, R., Pirce, F. J. (eds.) *Soil management for sustainability*. Ankeny: Soil and Water Conservation Society, p. 1-5.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E. Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral root-meristems is a 2-stage. *Process. Develop.*, 121:3303-3310.
- Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E. L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. *Science*, 310:121-125.
- Lomax, T.L., Mehlhorn, R.J., Briggs, W.R. (1985) Active auxin uptake by zucchini membrane vesicles: quantitation using ESR volume and ΔpH determinations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:6541-6545.
- López-Marques, R.L., Schiott, M., Jakobsen, M.K., Palmgren, M.G. (2004) Structure, function and regulation of primary Ca²⁺ e H⁺ pumps. *In*: Blatt, M.R. *Membrane Transport In Plants*. Blackwell publishing, p. 72-95.
- Lynch, J. (1995) Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiol*, 109:7-13.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim.Biophys. Acta*, 1465:37-51.
- Maggioni, A., Varanini, Z., Nardi, S., Pinton, R. (1987) Action of soil humic matter on plant roots: Stimulation of ion uptake and effects on (Mg²⁺ K⁺) ATPase activity. *Sci. Tot. Envir.*, 62:355-363.

- Malamy, J.E., Benfey, P.N. (1997) Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.*, 2:390-396.
- Malamy, J.E., Ryan, K.S. (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 127:899–909.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M. and Sandberg, G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell*, 14:589–597.
- Marques, J., R., Canellas, L.P., Silva, L.G., Olivares, F.L. (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Rev. Bras. Cienc. Solo*, 32:1121-1128.
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., Garcia, C. (1999) Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59:199–206.
- Mielniczuck, J., Bayer, C., Vezzani, F.M., Lovato, T., Fernandes, F.F., Debarba, L. (2003) Manejo do solo e culturas e sua relação com estoque de carbono e nitrogênio do solo. In: Curi *et al.*, (eds.) *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa: SBCS, p. 209-248.
- Miller, A. L., Gow, N. A. R. (1989) Correlation between root-generated ionic currents, pH, fusaric acid, indoleacetic acid, and growth of the primary root of Zea mays. *Plant Physiol.*, 89, 1198-1206.
- Mitsuda, N., Enami, K., Nakata, M., Takeyasu, K. and Sato, M.H. (2001) Novel type Arabidopsis thaliana H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.*, 488, 29–33.
- Moloney, M.M., Elliott, M.C., Cleland, R.E. (1981) Acid-growth effects in maize roots: evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. *Planta*, 152:285-291.
- Mulkey, T.J., Kuzmanoff, K.M., Evans, M.L. (1981) The agar-dye method for visualizing acid efflux patterns during tropistic curvatures. *What's New Plant Physiol.*, 12:9-12.
- Muscolo, A., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2007) The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *Chem. Ecol.*, 33:115–129.

- Nardi, S., Morari, F., Berti, A., Tosoni, M., Giardini, L. (2004) Soil organic matter properties after 40 years of different use of organic and mineral fertilizers. *Europ. J. Agron.* 21:357-367.
- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1341-1346.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello A. (2002) Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, 34:1527-1537.
- Nardi, S., Tosoni, M., Pizzeghello, D., Provenzano, M.R., Cilenti, A., Sturaro, A., Rella, R., Vianello, A. (2005) Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 69:2012-2019.
- Negi, S., Ivanchenko, M.G., Muday, G.K. (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 55:175–187.
- Nelson, N. (1988) Structure, function, and evolution of proton ATPases. *Plant Physiol.* 86:1-3.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., Chory, J. (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, 126: 467-475.
- Nishi, T., Forgac, M. (2003) The vacuolar (H⁺)-ATPases – Nature`s most versatile proton pumps. *Nature*, 3:94-103.
- O'Donnell, R.W. (1973) The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Sci.*, 116:106-112.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., Theologis, A. (2005) Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell*, 17:444–463.
- Oufattole, M., Arango, M., and Boutry, M. (2000) Identification and expression analysis of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma membrane H⁺-ATPase and one of which is induced by mechanical stress. *Planta*, 210:715-72.

- Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y., Sze, H. (2004) Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol.*, 134, 1514-1526.
- Paustian, K., Levine, E., Post, W.M., Ryzhova, I.M. (1997) The use of models to integrate information and understanding of soil C at regional scale. *Geoderma*, 79:227-260.
- Péret, B., Rybel, B.R., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., Bennett, M.J. (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Cell*, 14:399-408.
- Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., Ljunga, K. (2009) An Auxin Gradient and Maximum in the Arabidopsis Root Apex Shown by High-Resolution Cell-Specific Analysis of IAA Distribution and Synthesis. *Plant Cell*, 21:1659-1668.
- Piccolo, A. (1996) Humus and soil conservation, *In: Piccolo, A. Humic substances in terrestrial ecosystems*. Amsterdam: Elsevier, p. 225-264.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agr.*,75:57-133.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J., and Voesenek, L.A. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11:176–183.
- Pillet, P.E., Versel, J.M., Mayor, G. (1983) Growth distribution and surface pH patterns along maize roots. *Planta* 158, 398 – 402.
- Pinton, R., Cesco, S., De Nobili, M., Santi, S., Varanini, Z. (1998) Water and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron Fe-deficient cucumber plants. *Biol. Fertil. Soil*, 26:23–27.
- Pinton, R., Varanini, Z., Vizzoto, G., Maggioni, A. (1992) Soil humic substances affect transport-properties of tonoplasto vesicles isolated from oat roots. *Plant Soil*, 142:203-210.
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999) Modulation of NO₃-uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Soil*, 215:155-161.

- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M., Kaiser, W.M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.*, 41:732-43.
- Planchet, E., Jagadis, G.K., Sonoda, M., Kaiser, W.M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.*, 41:732–43.
- Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 55:803-813.
- Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., Molina-Torres, J. (2004) Alkamides isolated from plants promotes growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 134:1058-1068.
- Rayle, D.L., Cleland, R. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.*, 46:250-253.
- Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiol. Plant.*, 71:131-141.
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M., Martins, I.S. (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.*, 445:283–86.
- Richter, G.L., Monshausen, G.B., Krol, A., Gilroy, S. (2009) Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *Plant Physiol.*, artigo no prelo DOI:10.1104/pp.109.142448.
- Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J., Benkova, E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*, 19: 2197–2212.
- Schmidt, H.H.H.W., Walter, U. (1994) NO at work. *Cell*, 78:919–25.
- Schnitzer, M., Poapst, P.A. (1967) Effects of a soil humic compound on root initiation. *Nature*, 11:598-599.
- Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, Thea, Chory, J. (1999) The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev.*, 13:3259–3270.

- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., and Gerzabek, M. H. (2002) Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, 34:839–1851.
- Spanswick, R.M. (1981) Electrogenic Ion Pumps. *Ann, Rev. Plant Physiol.*, 32:267-289.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., Alonso, J.M. (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell*,19:2169–2185.
- Stepanova, A.N. Alonso, J.M. (2005) Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiol. Plant.* 123, 195-206.
- Stohr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835– 41
- Swarup, K. Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennett M (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.*, 10, 946–954.
- Sze H., Li X., Palmgren, M.G. (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell*, 11:677-68.
- Sze, H. (1985) H⁺ translocating ATPases: advances using membranes. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 36:175-208.
- Sze, H., Ward, J. M., Lai, S., Perera, I. (1992) Vacuolar-type H⁺-translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. *J. Exp. Biol.*, 172:132-135.
- Taiz, L. Zeiger, E. (2002a) Auxins, *In: Taiz, L., Zeiger, E. (eds) Plant Physiology*. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 543-589.
- Taiz, L. Zeiger, E. (2002b) Ethylene: The Gaseous Hormone, *In: Taiz, L., Zeiger, E. (eds.) Plant Physiology*. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 543-589.
- Takamura, T. (2006) Electrochemical Potential around the Plant Root in Relation to Metabolism and Growth Acceleration, *In: Volkov, A.G. (ed.) Plant Electrophysiology – Theory & Methods*. Berlin: Springer, p. 341-373.

- Trewavas, A. (2000) Signal perception and transduction. *In: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (eds) Biochemistry and molecular biology of plants.* American Society of Plant Physiologists, p. 930-987.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997) Aux IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, 9:1963–1971.
- Varanini, Z., Pinton, R., De Biase, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa L.*) roots. *Plant Soil*, 153:61-69.
- Vaughan, D. (1974) A possible mechanism for humic acid action on cell elongation in root segments of *Pisum sativum* under aseptic conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 6:241-247.
- Vaughan, D. (1974) A possible mechanism for humic acid action on cell elongation in root segments of *Pisum sativum* under aseptic conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 6:241-247.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. *In: Vaughan, D Malcolm, R.E. (eds.) Soil Organic Matter and Biological Activity.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 37-75.
- Versel, J.M., Mayor, G. (1985) Gradients in maize roots: local elongation and pH. *Planta*, 164:96-100.
- Wang, K.L.C. et al. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14:5131–5151.
- Watson, R.T., Zinywera, M.C., Moss, R.H. (1996) Climate Change Impacts. Impacts, adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analyses. Cambridge: Cambridge University Press.
- Went, F.W. (1928) Wushstoff und wachstum *Rec. Trav. Need.*, 25:1-116.
- Whitehead, D.C. (1963) Some aspects of the influence of organic matter on soil fertility. *Soils Fert.*, 26:217–223.
- Wildon, D.C., Thain, J.F., Minchin, P.E.H., Gubb, I.R., Reilly, A.J., Skipper, Y.D., Doherty, H.M., O'Donnell, P.J., Bowles, D.J. (1992) Electrical signaling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Science*, 360:62-65.
- Woodward, A. W., Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.*, 95:707–735.

- Yamasaki, H., Sakihama, Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.*, 468:89–92.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.

CAPÍTULO 1

ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR E DA ATIVAÇÃO DA H⁺-ATPASE DE MEMBRANA PLASMÁTICA INDUZIDA POR ÁCIDOS HÚMICOS

RESUMO

A ação das substâncias húmicas como fonte de atividade auxínica e sua influência sobre o crescimento radicular é bastante relatada, mas ainda não completamente compreendida. Esse trabalho explora a hipótese de que a sinalização por óxido nítrico está relacionada aos efeitos dos ácidos húmicos sobre o crescimento radicular. Plântulas de milho foram tratadas com 20 mg C L⁻¹ de AH, 0,1 nM de AIA e 200 µM de doadores de ON (SNP ou GSNO), com ou sem o inibidor da via de sinalização de auxina (PCIB), o inibidor de efluxo de auxina (TIBA) ou o capturador de ON (PTIO). Vesículas de membrana plasmática foram isoladas de raízes para investigar uma possível ligação entre o bombeamento de H⁺ induzidos por ON e a bioatividade de AH. As plantas tratadas com AH ou SNP estimularam a emergência de raízes laterais de maneira semelhante mesmo na presença de

inibidores de auxina, enquanto o uso de PTIO reduziu esse efeito. AH, AIA ou SNP estimularam em cerca de 3 vezes a atividade de hidrólise de ATP e o transporte de H^+ associado, os quais foram reduzidos por PTIO, PCIB e TIBA. O aumento da síntese de ON por AH também foi detectada nos sítios de emergência de RLs. Esses dados apresentam um novo cenário onde o desenvolvimento radicular e a ativação associada da H^+ -ATPase disparada tanto por AH quanto por AIA exógeno dependem essencialmente de mecanismos que utilizam o ON como um mensageiro induzido em sítios específicos nos estágios iniciais do desenvolvimento de raízes laterais.

1. INTRODUÇÃO

As substâncias húmicas (SH) são misturas complexas de resíduos orgânicos transformados, sendo o material orgânico mais abundante encontrada no ambiente (Hayes e Malcolm, 2001). Estruturalmente as SH são definidas como associações supramoleculares de moléculas orgânicas relativamente pequenas arranjadas basicamente por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, as quais podem ser rompidas por ácidos orgânicos (Piccolo 2002) exudados por raízes de plantas (Canellas et al. 2008). Essas substâncias estão presentes naturalmente nos solos ou em resíduos orgânicos processados, controlando diferentes processos biológicos, químicos e físicos, os quais contribuem direta ou indiretamente para o crescimento vegetal e adaptação aos ambientes. As SH podem aumentar a estabilidade dos agregados dos solos (Piccolo e Mbagwu 1999), o fluxo de íons e a absorção de nutrientes (Pinton et al. 1999; Quaggiotti et al. 2004), e o metabolismo do carbono (Nardi et al. 2007). Há uma crescente produção de estudos que sustentam que SH classificadas como AH isoladas de diferentes fontes são dotadas de atividade similar ao fitormônio auxina, influenciando a morfologia radicular e o metabolismo vegetal (e.g., Canellas et al. 2002; Zandonadi et al. 2007; Canellas et al. 2008); uma propriedade que tem sido atribuída também a SH caracterizadas como ácidos fúlvicos (Muscolo et al. 1999; Nardi et al., 2002). Além disso, esses estudos

fornecem evidências de que SH com características distintas e extraídas através de métodos diferentes podem ser consideradas fontes ambientais da auxina - ácido indol acético (IAA). Esse AIA exógeno parece ser o responsável pela regulação da arquitetura radicular através da via de sinalização da auxina por mecanismos ainda não esclarecidos (Zandonadi et al. 2007).

As auxinas fazem parte da classe hormonal mais estudada e que tem sido relacionada com praticamente todos os aspectos do desenvolvimento vegetal, dentre eles a divisão e a expansão celular (Davies, 1995). Esse fitormônio tem um papel fundamental no desenvolvimento vegetal por ser responsável pela formação de sistema radicular ramificado repleto de raízes laterais (RLs) as quais absorvem água e nutrientes (Malamy e Benfey 1997; Ivanchenko et al. 2006). A iniciação de RLs é influenciada por sinais do ambiente como a disponibilidade de nutrientes, água, NaCl e matéria orgânica (Malamy 2005; Dobbss et al. 2007). Está estabelecido na literatura que o mecanismo de ação da auxina envolve a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (Hager et al. 1991; Frías et al. 1996), enzima responsável pela regulação de funções chaves na célula vegetal, incluindo a absorção de nutrientes, expansão da parede celular e respostas a estresses. O mecanismo do crescimento ácido fundamentado na acidificação da parede celular é relacionado também com a ativação da H⁺-ATPase e o conseqüente decréscimo do pH apoplástico (Hager 2003). Tem sido proposto que as SH podem aumentar o crescimento das raízes de uma maneira semelhante à promovida pela auxina, por ativar também, além da bomba de prótons (H⁺) da plasmalema (Canellas et al. 2002; Quaggiotti et al. 2004; Elena et al. 2009), as bombas de H⁺ do vacúolo (Zandonadi et al. 2007).

Embora estudos prévios tenham demonstrado que algumas SH podem aumentar o desenvolvimento de raízes provenientes de ramos por afetar o transporte de auxina (Nardi et al. 1994), outras frações (solúveis em água) parecem atuar de uma maneira independente dos elementos de resposta a auxina (AuxRes) em raízes de *Arabidopsis thaliana* (Schmidt et al. 2007). Além disso, AHs provenientes de diferentes solos e resíduos normalmente estimulam o crescimento radicular mais intensamente do que o IAA fornecido exógenamente, sugerindo a presença de moléculas com atividade biológica nessas substâncias ainda não identificadas (Zandonadi et al. 2007). Aparentemente ainda não está claro se a

fração AH poderia alterar o desenvolvimento vegetal influenciando o transporte e/ou a sinalização da auxina, ou mesmo por outra via hormonal não estudada.

O óxido nítrico (ON) é um radical livre que participa de uma grande variedade de processos fisiológicos nas plantas (Besson-Bard et al. 2008). Em 1997, o um grupo brasileiro foi o primeiro a demonstrar que substâncias que liberam ON poderiam alterar a expansão celular de raízes provavelmente compartilhando passos da via de sinalização de auxina (Gouvêa et al. 1997). Posteriormente foi demonstrado que o ON está envolvido na cascata de sinalização de auxina durante a formação de raízes adventícias e laterais (Pagnussat et al. 2002; Correa-Aragunde et al. 2004). De fato, as células do periciclo que dão origem as RLs produzem uma quantidade elevada de ON (Correa-Aragunde et al. 2004). A produção enzimática de ON durante o desenvolvimento de RLs estimuladas por auxina parece ser dependente tanto da enzima nitrato redutase (Kolbert et al. 2008a) quanto da ON sintase (Flores et al. 2008). Anteriormente, no entanto, um mecanismo de produção de ON não enzimático foi descrito a partir da acidificação do apoplasto, ocorrendo a produção de ON a partir de NO_2^- (Stöhr e Ullrich 2002; Bethke et al. 2004).

Uma vez que a ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática é essencial para a acidificação do apoplasto durante o crescimento (Hager 2003), e a atividade e expressão dessa enzima é aumentada não somente por AIA e AH (Canellas et al. 2002) mas também por ON (Zhao et al. 2004; Zhang et al. 2007), o presente trabalho estuda um mecanismo de ação ainda inexplorado, pelo qual AH e auxinas poderiam regular o crescimento e a morfologia das raízes por ativação específica e conjunta das bombas de prótons e as vias de produção de ON. Com esse objetivo, no presente trabalho foram utilizados inibidores da ação da auxina e do ON para esclarecer a participação das vias de sinalização de auxina e ON na atividade biológica do AH.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração de ácidos húmicos

Os ácidos húmicos (AH) de vermicomposto foram isolados de acordo com o procedimento preconizado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (Schnitzer e Skinner, 1982). Resumidamente, foi utilizado NaOH 0,5 mol L⁻¹ como solvente na razão vermicomposto:solvente de 1:10 (m:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos AH foi realizada com o abaixamento do pH da solução até 1-1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A redissolução e precipitação foi repetida três vezes. Em seguida, adicionou-se 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl [5 mL HCl (12 mol L⁻¹) + 5 mL HF (48%) L⁻¹]. Após uma centrifugação (5000 g) por 15 minutos, os AH foram lavados seguidamente com água até teste negativo com AgNO₃. Foi realizada a diálise contra água desionizada usando uma membrana 12-14 KDa (Thomas Scientific Inc.). As amostras dializadas foram liofilizadas e caracterizadas quimicamente.

2.2. Análises estatísticas

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para a avaliação de todas as características. A diferença do efeito dos tratamentos em relação ao controle foi determinada pelo Teste de média Dunnett ($P < 0,05$).

2.3. Crescimento e tratamentos das plântulas

Sementes de milho (*Zea mays* L., var. Uenf 506-6) foram esterilizadas por imersão numa solução de NaClO 1,0% por 30 minutos e, em seguida, colocadas em água destilada por um período de 2h após a lavagem. Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em papel para germinação, no escuro, a 28°C, em câmara apropriada. Após 2 dias as plântulas de milho com 30-35 mm de comprimento foram colocadas em papel de filtro autoclavado na posição vertical em tubos de

capacidade de 50 ml contendo solução de CaCl_2 2mM suplementada com 20 mg C L^{-1} de ácido húmico de vermicomposto (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA) ou 200 μM do doador de ON nitroprussiato de sódio (SNP). Foram realizados experimentos com o doador de ON s-nitroso glutationa (GSNO) alternativamente. Os efeitos foram equivalentes ao do SNP e este foi escolhido para a maioria dos experimentos devido a sua aplicação bem documentada na literatura (Gouvêa et al. 1997; Correa-Aragunde et al. 2004; Ederli et al. 2009) e custo relativo menor.

Os tratamentos anteriores foram suplementados ou não com 20 μM de ácido p-cloro fenoxil isobutírico (PCIB), 20 μM de ácido 2,3,5 tri-iodo benzóico (TIBA), ou 200 μM de 2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazol-1-oxil-3-óxido (PTIO). Um estudo preliminar de respostas a doses de PCIB e TIBA foi realizado para a escolha da dose de 20 μM , a qual foi capaz de inibir cerca de 50% do comprimento radicular (Collings et al. 1992; Rahman et al. 2007).

Após a aplicação dos tratamentos, as plântulas foram mantidas em câmara tipo BOD com temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (14h) controlados. Com a finalidade de excluir qualquer efeito de interação entre os inibidores de auxina e de ON com os tratamentos AH, AIA ou SNP, as plântulas foram pré-tratadas por 24h com os inibidores e depois transferidas para os meios contendo os tratamentos por mais 72h. Os resultados foram semelhantes aos observados quando os inibidores foram utilizados conjuntamente aos tratamentos AH, AIA ou SNP por 96h. Portanto, a utilização dos inibidores em conjunto aos tratamentos foi realizada preferencialmente. Os reagentes TIBA, PCIB, AIA, PTIO e SNP foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. As plântulas foram coletadas após 4 dias de tratamento, e o número de RLs e o CEP da raiz foram avaliados. A densidade de RLs foi calculada dividindo-se o número de RLs pelo comprimento do eixo principal da raiz (RLs/cm).

2.4. Purificação das vesículas de membrana plasmática

As vesículas de tonoplasto e de MP foram isoladas de raízes das plantas tratadas utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e de Meis, 1995). Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250mM de sacarose, 10 % de glicerol (m:v), 0,5 % de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA

(ácido etileno diamino tetracético) 0,2 % de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). A manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como as centrifugações, tiveram a temperatura controlada a fim de que não excedesse 4°C. Além disso, o pH do tampão de extração também foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação numa centrífuga Himac CP (HITACHI) a 1500xg durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10000xg por 15 minutos numa ultracentrífuga Himac CP 85b (HITACHI) utilizando o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. Estas organelas foram separadas e descartadas a fim de não interferirem nos experimentos futuros. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em 1 mL de solução tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6, EGTA 1 mM) para imediata aplicação sobre o gradiente de sacarose. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

2.5. Determinação da atividade ATPásica de Membrana Plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2% + Ácido Ascórbico 1% (100:1) e após 15 minutos foi feita à leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nesta reação o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Composição do meio de reação: 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano

sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de $MgCl_2$, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 μg de proteína. Cerca de 70-90% da atividade da H^+ -ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H^+ -ATPase foi medida a 35 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo P.

2.6. Bombeamento de H^+ da H^+ -ATPase de membrana plasmática

O gradiente eletroquímico de H^+ gerado pela H^+ -ATPase de MP foi estimado pelo decréscimo de fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA) (415/485 nm excitação/emissão), e expresso em porcentagem. O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, que quando não protonada tem a capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica das membranas. A protonação do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Desta forma, a sonda distribui-se através da membrana por causa da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio de reação foi composto de 10 mM de Mops-Tris (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$, ACMA 2 μM e 50 μg de proteína. A reação foi desencadeada pela adição de ATP (1 mM). A adição de tanto 3 μM de carbonil cianeto p(trifluorometoxi)-fenilidrazona (FCCP) ou 2 μM de NH_4Cl aboliram o gradiente de H^+ formado pela hidrólise de ATP.

2.7. pH da rizosfera

Raízes de plântulas de milho tratadas ou não por 72h com AIA, AH ou ANP foram colocadas sobre uma camada de 5 mm de gel agar 1% contendo 10 mM de $CaSO_4$ e 0,03% do indicador de pH púrpura de bromocresol em pH 6,5 em placas de Petri. A mudança da cor do meio de púrpura para amarelo demonstra a acidificação da raiz (a cor amarela indica que o pH está abaixo de 6,0). As imagens foram gravadas após 70 min. de incubação. Placas contendo 500 μM de vanadato de sódio (Na_3VO_4), inibidor das H^+ -ATPases do tipo P foram utilizadas como controle e não apresentaram mudança de coloração. As mudanças do pH da rizosfera foi quantificada potenciométricamente com auxílio de eletrodo acoplado em pequeno

tubo contendo 2 g de RLs com 2 cm de comprimento extraídas de 12 plantas imersos em 25 ml de tampão com baixa força iônica (10 mM de HEPES-BTP pH 7,0) com ou sem 500 μM de Na_3VO_4 .

2.8. Localização do ON por microscopia de fluorescência

A localização do ON foi realizada com auxílio da sonda fluorescente DAF-2 DA em microscópio de fluorescência. Após 72h de tratamento foram cortadas seções transversais da região de emissão de RLs de plântulas de milho (20-30 mm da junção da semente com a raiz) e colocadas em 10 mM de tampão HEPES-BTP pH 7,5 com 10 μM de DAF-2 DA por 40 min sob agitação no escuro. Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes em tampão e analisados no microscópio (excitação 488 nm, emissão 495-575 nm). As imagens foram obtidas em microscópio ótico de fluorescência (Zeiss Axioplan com camera Canon A640 digital acoplada) e analisadas pelo programa ImageJ. Imagens dos cortes sem DAF foram utilizados como controle. As mesmas características de obtenção de imagem foram mantidas para todos os tratamentos e não houve nenhum tratamento das imagens posteriormente. Pelo menos 5 amostras foram avaliadas para cada tratamento em 4 experimentos independentes.

3. RESULTADOS

3.1. O ON está relacionado com os efeitos do AIA e dos AHs no desenvolvimento radicular

Os efeitos de AHs, AIA e SNP sobre o desenvolvimento das RLs e da raiz primária (RP) das plântulas de milho foram examinados. Com a finalidade de investigar o envolvimento de um mecanismo de ação semelhante ao da auxina durante a estimulação das RLs por AHs e SNP, as plântulas foram tratadas com 20 μM de TIBA (inibidor de transporte de auxina) ou 20 μM de PCIB (inibidor da via de sinalização de auxina) e TIBA mais PCIB por 4 dias com ou sem 0,1 nM de AIA, 20 mg de C L^{-1} de AH ou 200 μM de SNP (Figura 1). A relevância da produção de ON durante o crescimento das RLs e da RP foi avaliada utilizando-se 200 μM de PTIO como controle negativo. Plantas tratadas com AIA, AH ou ANP aumentaram o número de RLs em cerca de 2,5 vezes (Figura 1).

Os tratamentos tanto com o inibidor da ação da auxina (PCIB) como com o inibidor de efluxo de auxina (TIBA), reduziram a formação de RLs em cerca de 50%, e o uso combinado de ambos os inibidores inibiram ~60% a emissão de RLs (Fig. 1). Os dois inibidores afetaram os efeitos da auxina endógena sobre a iniciação de RLs. Quando a auxina exógena foi adicionada, o efeito dos inibidores de auxina foi pouco reduzido (~10 %). Na presença de AH, nem TIBA ou PCIB foram capazes de reduzir o número de RLs abaixo do nível do controle. Os efeitos do AIA e do AH sobre a emissão de RLs foram prejudicados pelo inibidor do ON, PTIO. Por outro lado, mesmo na presença de inibidores de auxina, plântulas tratadas com SNP exibiram um elevado número de RLs (Fig. 1).

Observou-se um ligeiro aumento no CEP das raízes das plantas tratadas com AIA, AH ou SNP, entretanto não houve diferenças significativas (Figura 1). O CEP da raiz foi reduzido em cerca de 55% por PCIB e 45% por TIBA, uma magnitude de inibição similar ao observado quando ambos foram aplicados juntos. Mesmo na presença de AIA exógeno, o CEP da raiz foi reduzido pelos inibidores de auxina utilizados separados ou em conjunto. Por outro lado, o SNP foi capaz de abolir o efeito inibitório de TIBA e PCIB sobre o CEP. O uso de PTIO não afetou o

CEP e a presença de AH ou AIA não foi capaz de alterar essa característica em relação ao controle. Por outro lado, na presença de SNP, a utilização de PTIO aumentou o CEP da raiz.

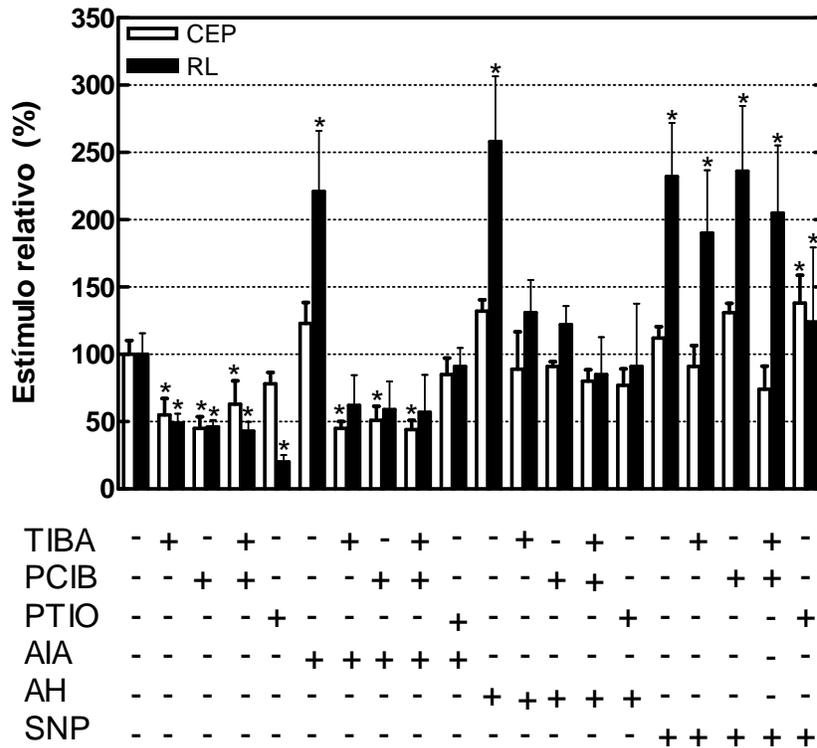


Figura 1. Crescimento radicular. Efeito de 20 mg C L⁻¹ de ácido húmico (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA), 20 μM do inibidor de efluxo de AIA (TIBA), 20 μM do inibidor da sinalização de AIA (PCIB), 200 μM do doador de óxido nítrico (SNP) e 200 μM do bloqueador do efeito do óxido nítrico (PTIO) sobre o comprimento do eixo principal (CEP) da raiz e emergência da raiz lateral (RL). Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio padrão (*n*=12 em cada experimento). As barras marcadas pelo asterisco (*) denotam diferença significativa em relação ao controle pelo teste Dunnett (*P*<0,05).

Embora AIA, AH ou SNP não tenham afetado o CEP da raiz, o efeito mais pronunciado desses tratamentos sobre as RLs resultaram numa densidade de raízes cerca de 2 vezes maior (Figura 2). Nenhum dos inibidores de auxina utilizados prejudicaram o aumento da densidade de raízes induzida por SNP. Por outro lado, a aplicação isolada ou de TIBA ou de PCIB aumentou em cerca de 2 vezes a densidade de RLs, enquanto a aplicação em conjunto aumentou quase 3 vezes a densidade de RLs nas plantas tratadas com SNP. A densidade de RLs foi fortemente reduzida por PTIO (cerca de 4 vezes). Todos os tratamentos que receberam PTIO mantiveram a densidade de RLs no nível da condição controle.

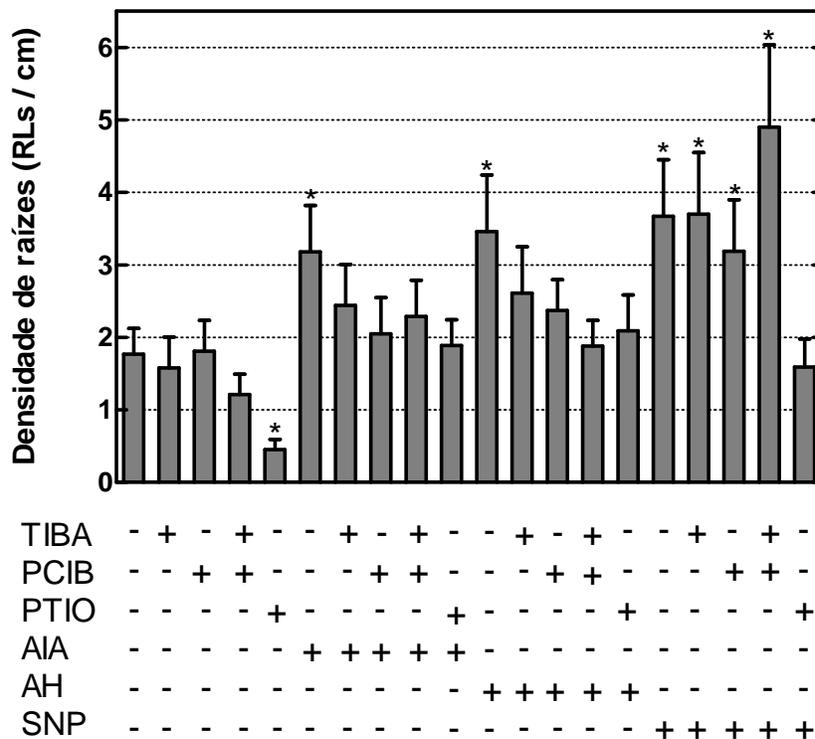


Figura 2. Densidade de raízes laterais (RLs). Efeito de 20 mg C L⁻¹ de ácido húmico (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA), 20 µM do inibidor de efluxo de AIA (TIBA), 20 µM do inibidor da sinalização de AIA (PCIB), 200 µM do doador de óxido nítrico (SNP) e 200 µM do bloqueador do efeito do óxido nítrico (PTIO) sobre a densidade de RLs (número de RLs por cm). Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio padrão (n=12 em cada experimento). As barras marcadas pelo asterisco (*) denotam diferença significativa em relação ao controle pelo teste Dunnett (P<0,05).

3.2. A atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática foi aumentada por AIA, AH e SNP e reduzida por inibidores de auxina e ON

As vesículas de membrana plasmática isoladas das raízes de milho tratadas por 4 dias com 20 mg C L⁻¹ de AH, 200 mM de SNP ou 0,1 nM de AIA exibiram um estímulo de cerca de 1,5 vezes na hidrólise de ATP sensível a vanadato (Fig. 3). A velocidade inicial da atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi inibida em 20, 30 e 25% pelos tratamentos TIBA, PCIB e PTIO, respectivamente. O efeito estimulatório do AH sobre essa enzima foi bastante reduzido por TIBA e PCIB, levando a valores próximos ao controle. O aumento da atividade promovida por AIA foi mais inibida por PCIB. A ação do SNP foi reduzida por PTIO, embora a inibição tenha sido menor do que a observada para os inibidores de auxina em relação aos tratamentos AH e AIA.

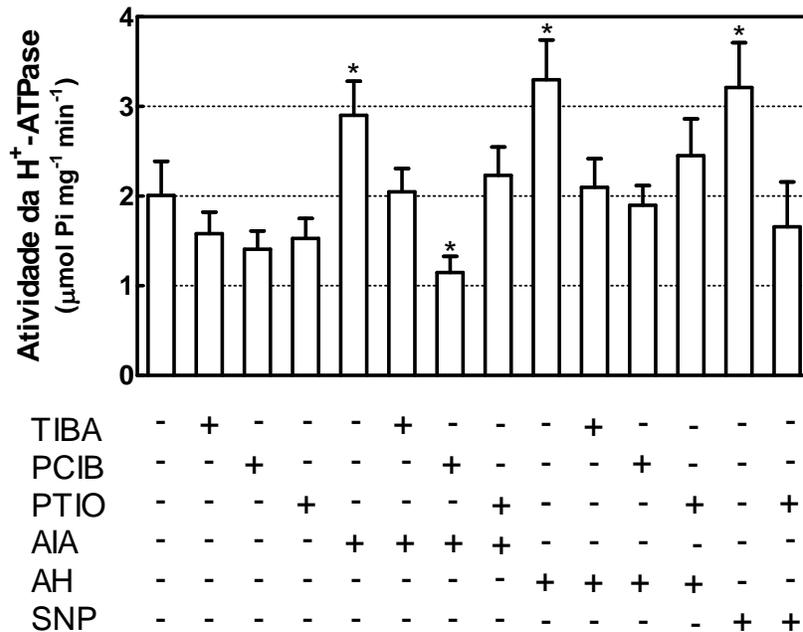


Figura 3. Atividade de hidrólise de ATP da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP). Efeito de 20 mg C L⁻¹ de ácido húmico (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA), 20 µM do inibidor de efluxo de AIA (TIBA), 20 µM do inibidor da sinalização de AIA (PCIB), 200 µM do doador de óxido nítrico (SNP) e 200 µM do bloqueador do efeito do óxido nítrico (PTIO) sobre a atividade da ATP da H⁺-ATPase de MP. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio padrão (n=12 em cada experimento). As barras marcadas pelo asterisco (*) denotam diferença significativa em relação ao controle pelo teste Dunnett (P<0,05).

A atividade de bombeamento de H^+ da H^+ -ATPase de membrana plasmática sensível a Na_3VO_4 foi avaliada por medida da taxa de decréscimo de fluorescência da sonda ACMA. A velocidade inicial (V_0) do bombeamento de H^+ dependente de ATP não foi inibida por TIBA, enquanto o PCIB inibiu em cerca de 50%. Foi observado um efeito semelhante na formação do gradiente de prótons, calculado pela extensão total da queda de fluorescência do ACMA (ΔF). Entretanto, o inibidor da ação do ON inibiu em aproximadamente 90% a V_0 e apenas 20% o ΔF . A V_0 do transporte de H^+ dependente de ATP de plântulas tratadas com AIA e SNP foi cerca de 2,5 vezes maior do que nas plântulas controle, enquanto o AH aumentou essa característica em 3 vezes (Fig. 4). O ΔF foi também cerca de 3 vezes maior nos tratamentos AH e AIA, enquanto o SNP foi cerca de 2,5 vezes maior em comparação ao controle. Mesmo na presença de TIBA, tanto as plantas tratadas com AIA quanto com AH mantiveram a estimulação da V_0 e ΔF pelo menos duas vezes acima do controle. Por outro lado, o PCIB diminuiu fortemente os efeitos da auxina sobre essas características. Mesmo na presença de PCIB os efeitos do AH sobre V_0 e ΔF mantiveram-se pelo menos 60% maior do que o controle. Os dados apresentados revelaram adicionalmente um bom acoplamento entre a atividade de hidrólise de ATP e o transporte de H^+ em resposta ao AH, AIA e SNP. A V_0 foi bastante reduzida pelo inibidor da ação do ON (PTIO) mesmo na presença de SNP, enquanto o ΔF manteve-se no nível do controle. Os inibidores de auxina reduziram o acoplamento da bomba de H^+ , mas o PTIO afetou essa característica de maneira mais efetiva.

Utilizando-se do indicador de pH púrpura de bromocresol e da medida do potencial de H^+ do meio contendo RLs, observou-se a acidificação sensível a vanadato promovida por AIA, AH e SNP, revelando que a extrusão de H^+ foi devido a ativação da H^+ -ATPase (Figura 7).

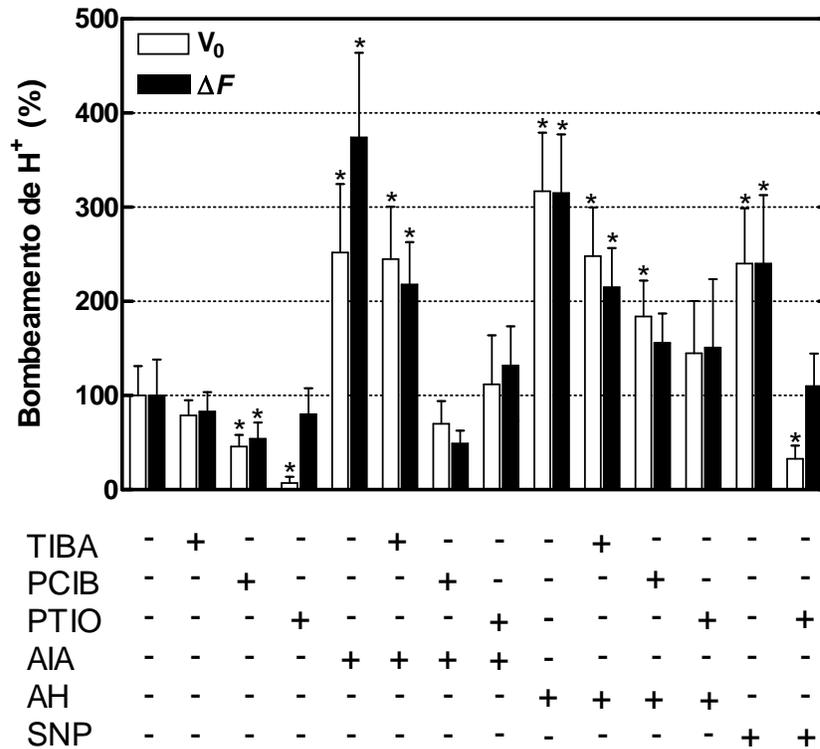


Figura 4. Transporte de H^+ da H^+ -ATPase de membrana plasmática (MP). Efeito de 20 mg C L^{-1} de ácido húmico (AH), $0,1 \text{ nM}$ de ácido-3-indol acético (AIA), $20 \text{ }\mu\text{M}$ do inibidor de efluxo de AIA (TIBA), $20 \text{ }\mu\text{M}$ do inibidor da sinalização de AIA (PCIB), $200 \text{ }\mu\text{M}$ do doador de óxido nítrico (SNP) e $200 \text{ }\mu\text{M}$ do bloqueador do efeito do óxido nítrico (PTIO) sobre a velocidade inicial (V_0) e o transporte total (ΔF) do gradiente de H^+ formado através da MP monitorado pela queda da fluorescência da sonda ACMA. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio padrão ($n=12$ em cada experimento). As barras marcadas pelo asterisco (*) denotam diferença significativa em relação ao controle pelo teste Dunnett ($P<0,05$).

3.3. AH, AIA e SNP induzem ao acúmulo de ON em tecidos específicos das raízes de milho

O ON foi detectado *in situ* utilizando a sonda fluorescente DAF-2 DA na zona madura da raiz. A fluorescência do ON endógeno foi maior na endoderme e sistema de feixe vascular com aumento de sinal de cerca de 230, 160 e 225% pelos tratamentos com AH, AIA e SNP, respectivamente (Fig. 5). Os tipos celulares com maior fluorescência foram a endoderme, o feixe do protoxilema e a camada do xilema parenquimático margeando o metaxilema e o parênquima medular (Fig. 5). A camada do periciclo, os vasos do metaxilema, o parênquima medular e outros tipos de células pertencentes ao cilindro central também apresentaram sinal de fluorescência, mas aparentemente com menor intensidade (Figs. 5 e 6). A presença de PTIO reduziu a fluorescência endógena do ON em 50%, reduzindo também os sinais resultantes dos tratamentos com AH, AIA e SNP ao nível das plantas sem tratamento. Apesar das diferenças observadas na intensidade do sinal, todos os tratamentos apresentaram um padrão de localização anatômico muito semelhante. Foi possível observar a formação de RLs na região das raízes onde foram realizadas as seções transversais (Fig. 6). Um forte sinal fluorescente polarizado é facilmente observado na base de formação das novas RLs em conjunção com os tipos de célula do tecido vascular ao redor do sítio de emissão das RLs (Fig. 5). Este sinal polarizado juntamente ao observado no cortex externo da raiz principal e da epiderme da RL aparece somente nos cortes transversais de raízes que apresentam RLs visíveis.

Apesar do efeito doador do gás ON pela molécula de SNP já ser bem descrito, este pode também liberar quantidades ainda que pequenas de cianeto e nitrato. Para excluir o possível efeito desses subprodutos, foram utilizados tanto o bloqueador do gás ON (PTIO) como um doador de ON alternativo conhecido como GSNO. O uso do PTIO garante que o efeito isolado do gás seja anulado, restando apenas o efeito dos subprodutos. O GSNO libera ON sem gerar cianeto como subproduto (Fig. 5). Eventuais efeitos colaterais de nitrato gerado como subproduto também deve ser considerado insignificante, uma vez que o processo de oxidação que levaria a geração de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ a partir de SNP é pouco efetivo (Beligni e Lamattina 2000) e, além disso, resultaria numa concentração abaixo daquela considerada necessária para a produção de RLs (1 mM, Zhang e Forde 1998; Zhang

et al. 2007), impossível de ser gerada por 200 μ M de SNP. Dessa forma, esses dados fornecem evidências fortes a favor da hipótese na qual o ON está envolvido nos processos de crescimento radicular, ativação da H⁺-ATPase e fluorescência da sonda DAF induzidos por AH.

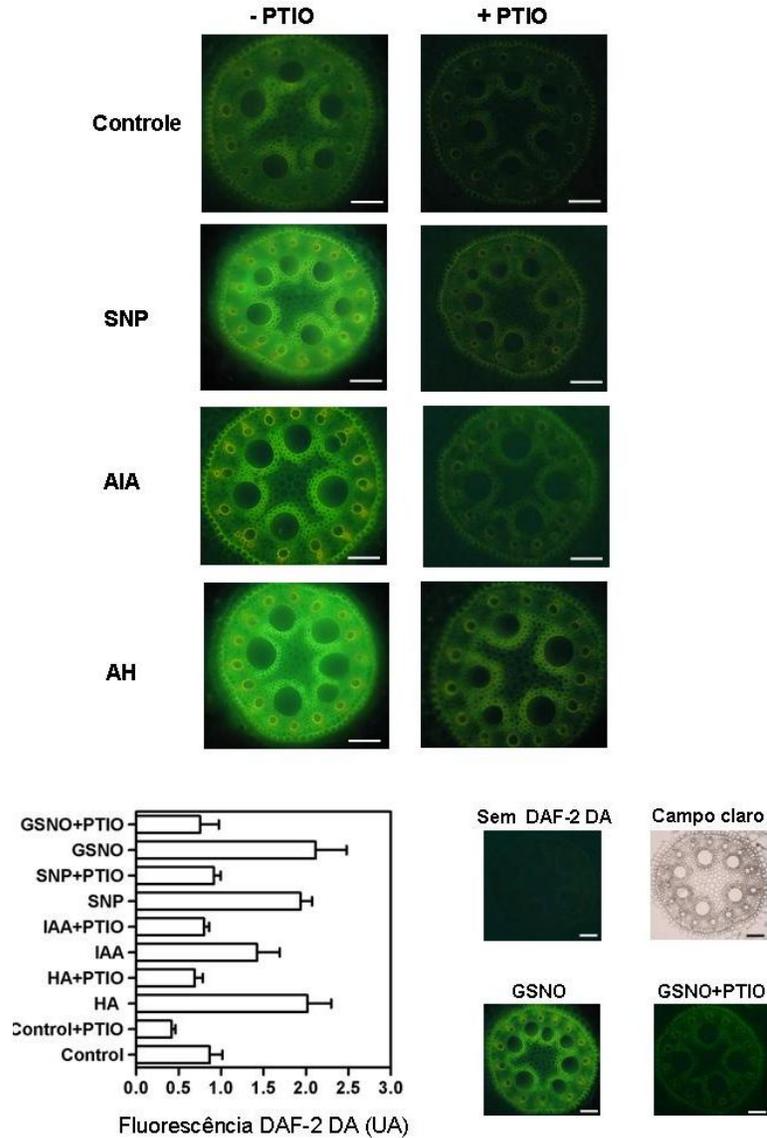


Figura 5. Produção de óxido nítrico (ON) na endoderme e tecido vascular. Efeito de 20 mg C L⁻¹ de ácido húmico (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA), 200 μM do doador de óxido nítrico (SNP) e 200 μM do bloqueador do efeito do óxido nítrico (PTIO) sobre a produção de ON. A especificidade da fluorescência da sonda DAF-2 DA reputada ao ON foi confirmada na presença de um doador alternativo de ON (GSNO). A intensidade de fluorescência das imagens foram estimadas pela intensidade de *pixels* e analisadas com o auxílio do programa ImageJ (NHI). Os dados são apresentados em unidades arbitrárias (UA) de fluorescência, onde as barras representam a médias ± desvio padrão de 4 experimentos independentes ($n=3$ em cada experimento). Barra = 50 μm.

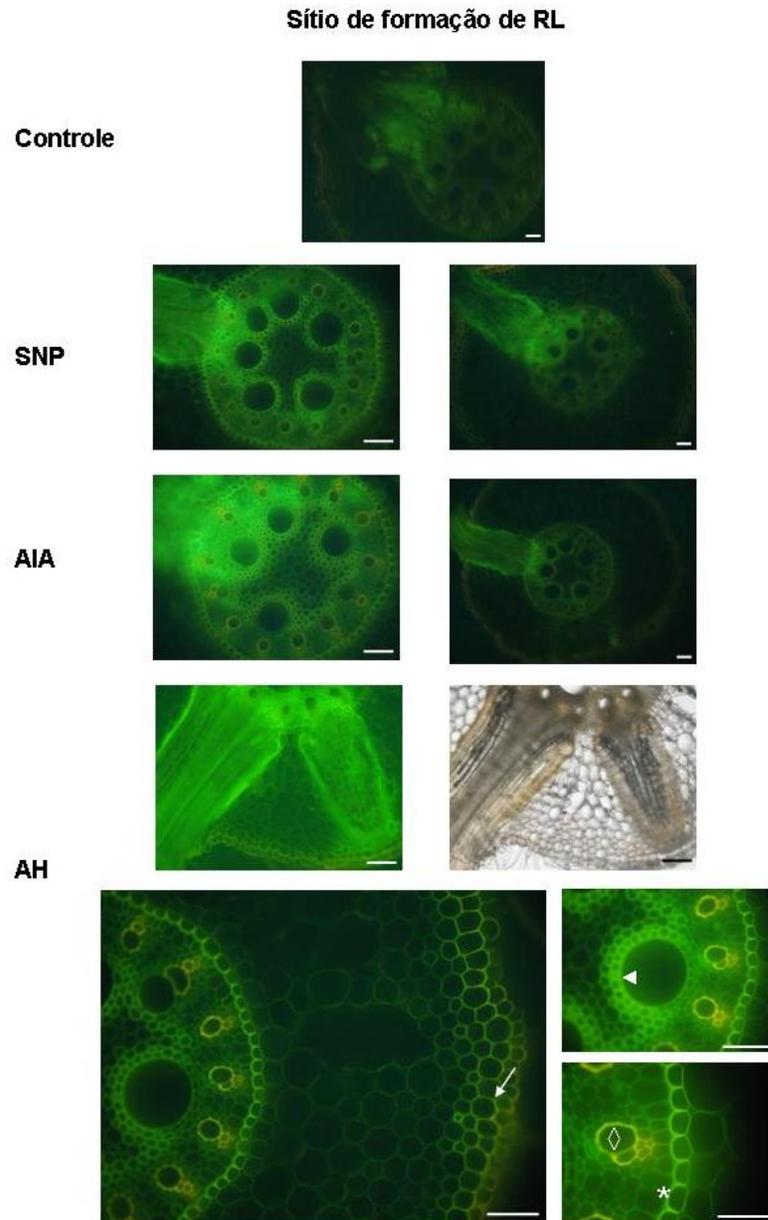


Figura 6. Produção de óxido nítrico (ON) na região de emergência da raiz lateral. Efeito de 20 mg C L⁻¹ de ácido húmico (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA), 200 µM do doador de óxido nítrico (SNP) e 200 µM do bloqueador do efeito do óxido nítrico (PTIO) sobre a produção de ON. A fluorescência de raízes tratadas com AH é apresentada no detalhe. A seta indica a fluorescência de DAF-2 DA relativa a produção de ON nas células parenquimáticas nas camadas externas do córtex e na epiderme; o triângulo indica a a distribuição assimétrica da produção de ON no metaxilema e parênquima medular; o losango indica a produção de ON no protoxilema; o asterisco indica a produção de ON na camada da endoderme. Barra = 50 µm.

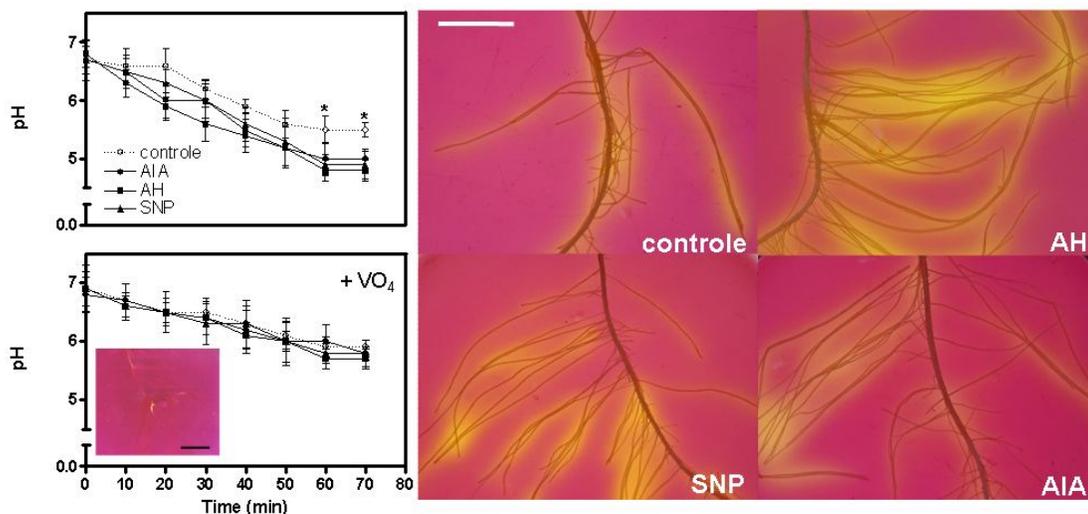


Figura 7. pH da rizosfera. Efeito de 20 mg C L⁻¹ de ácido húmico (AH), 0,1 nM de ácido-3-indol acético (AIA) e 200 μM do doador de óxido nítrico (SNP) sobre a acidificação das raízes laterais (RLs) de milho. Após incubação por 70 min. as raízes foram colocadas em meio contendo o indicador de pH púrpura de bromocresol. A região amarela corresponde a acidificação do pH abaixo de 6,0. O gráfico apresenta o monitoramento do pH em solução foi realizado em ensaio paralelo na presença e ausência de 500 μM de Na₃VO₄. O asterisco (*) indica a diferença significativa em relação ao controle pelo teste Dunnett ($P < 0.05$). Os dados representam a média de 2 experimentos independentes ± desvio padrão ($n=3$ em cada experimento).

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de RLs possui um papel muito importante na habilidade de adaptação e sobrevivência das plantas em condições adversas, sendo o número de RLs e sua disposição no substrato bastante influenciada por fatores externos (Leyser e Fitter 1998). As auxinas são tradicionalmente reconhecidas como um hormônio fundamental na sinalização durante o desenvolvimento de RLs (Casimiro et al. 2003). Desde a década de 1960 tem se observado que solos ricos em matéria orgânica contem auxinas (Whitehead 1963; Albuzio et al. 1989), especialmente o ácido indol-3-acético (AIA), o qual é a forma química mais abundante na natureza. De fato, as moléculas de AIA já foram identificadas na estrutura de algumas frações da matéria orgânica, como as substâncias húmicas, por grupos de pesquisa diferentes, utilizando-se de métodos de detecção variados (e.g., Muscolo et al. 1999; Canellas et al. 2002). Os AHs estudados no presente trabalho já foram caracterizados previamente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (Façanha et al. 2002; Canellas et al. 2002) e apresentaram moléculas de AIA associadas a sua estrutura supramolecular, provavelmente através de interações hidrofóbicas em regiões específicas.

Correa-Aragunde et al. (2004) relataram que o gás ON pode ser induzido por auxina estimulando o desenvolvimento de RLs, levando a hipótese de que existe um sinal dependente de ON após o estímulo daquele fitormônio, como confirmado mais tarde por outros autores (Kolbert et al. 2008a; Flores et al. 2008). No presente trabalho, é demonstrado que a arquitetura radicular pode ser modificada por AIA, AH e SNP de maneira semelhante. Foi observado um aumento no número de RLs e na densidade de raízes, ambos relacionados aparentemente com a ativação da H⁺-ATPase de MP.

Com a finalidade de entender a dependência dos efeitos do AH em relação tanto com a via de sinalização a de transporte de auxina, foram utilizados dois inibidores de auxina com modos de atuação diferente. O ácido p-cloro fenoxil butírico (PCIB) é um inibidor de auxina amplamente utilizado, conhecido por impedir a via de sinalização de auxina pela regulação da estabilidade das proteínas Aux/IAA, alterando a fisiologia das raízes sem afetar o transporte de auxina (Oono et al. 2003). No entanto, o transporte de auxina controla muitos eventos importantes,

incluindo a iniciação de RLs (Reed et al 1998). Portanto, também foi utilizado o ácido 2,3,5-tri-iodo benzóico (TIBA), um conhecido inibidor do efluxo de auxina (Sussman e Goldsmith 1981; Poupart et al. 2005), capaz de prejudicar o tráfego de vesículas que transportam as proteínas PIN1 e a H⁺-ATPase de MP (Geldner et al. 2001).

A regulação da arquitetura radicular é bastante complexa variando tanto em espécies diferentes como dentro da mesma espécie. Os dados apresentados demonstram que os inibidores de auxina reduziram o número de RLs estimuladas por AIA ou AH resultando no decréscimo da densidade de RLs nas plantas controle (Figuras 1 e 2). Estes efeitos inibitórios foram maiores nas plantas tratadas com AIA em comparação as tratadas com AHs. Auxinas em concentração muito baixa (0,1 nM) podem aumentar o CEP da raiz de milho (Zhao et al., 2002), mas mesmo com uma aumento aproximado de 20-30% dessa característica (não significativo estatisticamente) por AIA ou AH, a densidade de RLs manteve-se significativamente maior nas plantas controle. Os estímulos promovidos por AIA e AH sobre as RLs são mais efetivos do que sua modificação sobre o CEP das raízes, levando a uma elevada densidade de raízes. O efeito mais pronunciado sobre a densidade de RLs foi observado devido ao tratamento com PTIO (inibição de quase 4 vezes).

A partir dos resultados obtidos sugere-se que as substâncias húmicas podem estimular o desenvolvimento radicular afetando mais de um hormônio vegetal. Uma vez que a atividade biológica do AH foi prejudicada apenas parcialmente por TIBA e/ou PCIB, e o capturador do gás ON (PTIO) foi muito mais efetivo em antagonizar os efeitos produzidos pelo AH, o efeito remanescente observado (parte insensível aos inibidores de auxina) poderia ser intermediado por ON. Como não existem relatos do papel do ON no desenvolvimento de RLs promovidas por substâncias húmicas, nossos resultados poderiam auxiliar na elucidação desse assunto ainda pouco explorado. É importante observar que nem o TIBA ou o PCIB foram capazes de, mesmo aplicados em conjunto, inibir o efeito produzido pelo doador de ON (Figuras 1, 2 e 5). Isto vai ao encontro de resultados semelhantes obtidos em raízes de tomateiro, nas quais mesmo na presença do inibidor de efluxo de auxina, ácido naftil acético, o SNP foi capaz de aumentar o número de RLs (Correa-Aragunde et al. 2004). Os dados apresentados no presente trabalho corroboram e ampliam os dados prévios que postularam o papel essencial da produção de ON durante o desenvolvimento de RLs dependente de auxina (Correa-Aragunde et al. 2004; Kolbert et al. 2008a). Como já demonstrado

anteriormente, a indução de RLs por AIA e AH parecem estar relacionados com uma ativação da H⁺-ATPase no sítio de emergência de RLs (Canellas et al. 2002; Zandonadi et al. 2007). No presente trabalho, é demonstrado que a ativação das bombas de H⁺ poderia estar relacionada também com a produção de ON mediada por AH (Figuras 3, 5 e 7). De fato o primórdio precursor da RL é rico em H⁺-ATPases de MP (Moriau et al., 1999), e a super-expressão da H⁺-PPase leva a um aumento da atividade da H⁺-ATPases de MP e do transporte de auxina, ambos relacionados ao aumento no número de RLs (Li et al., 2005).

A taxa de expansão da raiz principal pode ser tanto estimulada ou inibida respectivamente por concentrações de auxina baixas (na faixa do nM) ou altas (na faixa do µM), concomitante a um decréscimo ou acréscimo do pH (Evans et al. 1980; Moloney et al. 1981). Esta mudança de pH disparada por concentrações muito baixas de auxina tem sido relacionada ao efluxo de H⁺ mediado pela H⁺-ATPase de MP (Wright and Rayle 1983; Gouvêa et al. 1997). Trabalhos clássicos demonstram que as regiões da raiz principal com alta taxa de expansão gera um efluxo de H⁺ mais intenso do que as regiões com a taxa de expansão reduzida, corroborando para a teoria do crescimento ácido (Pilet et al. 1983; Versel and Mayour 1985). É importante notar que todos os dados mencionados anteriormente foram obtidos a partir da raiz principal de plântulas de milho. No presente trabalho observou-se *in vivo* que AIA, AH e SNP podem aumentar a acidificação ao redor das RLs (Figura 7). No entanto, não foi possível comprovar se existe ou não uma acidificação que precede a emissão da RL.

Foram realizadas análises para visualizar a presença de ON nas raízes de milho, utilizando-se da sonda fluorescente DAF-2 DA. A fluorescência atribuída ao ON foi estimulada de maneira semelhante pelo fornecimento de ON exógeno proveniente de diferentes doadores; tanto GSNO quanto SNP (Fig. 6). Utilização do doador de ON livre de subprodutos, tais como cianeto, excluiu a possibilidade da influência de fatores interferentes além do gás ON. Além disso, a fluorescência verde produzida especificamente em resposta ao ON foi reduzida na presença do capturador desse gás, o PTIO. A aplicação de AH, AIA, SNP e GSNO aumentaram a fluorescência em relação ao controle. Os níveis mais elevados de ON foram detectados na epiderme, nas camadas externas do parênquima cortical, nos feixes do protoxilema e nas células do metaxilema parenquimático voltadas para a região medular. É interessante observar que há um perfil de distribuição e abundância da

H⁺-ATPase de MP semelhante ao observado para fluorescência do ON; epiderme, protoxilema, camadas externas do córtex, e parênquima xilemático. O sinal mais marcante foi localizado região do tecido vascular, representando a junção entre a raiz de origem e a raiz nova em formação durante os primeiros estágios de desenvolvimento da RL, coerente com o apresentado por Correa-Aragunde et al. (2004). O AH foi o tratamento mais efetivo na estimulação desse efeito.

Como já mencionado, dentre os numerosos processos celulares controlados pelas auxinas, a acidificação do apoplasto devido ao aumento da atividade e expressão da H⁺-ATPase é um dos mais importantes para o crescimento vegetal (Hager et al. 1991; Frías et al. 1996). O inibidor TIBA pode atrapalhar esse processo, pois impede a acidificação das raízes (Mulkey et al. 1981) e ramos sensíveis ao inibidor da H⁺-ATPase, ortovanadato de sódio (Wright e Rayle 1983). Posteriormente, o efeito inibitório do vanadato na expansão celular de raízes de milho induzida por 1 nM de AIA foi relatado (Gouvêa et al. 1997). De fato, concentrações bastante baixas de auxina são capazes de aumentar o comprimento da RP de plântulas de milho (Zhao et al. 2002; Zandonadi et al. 2007), possivelmente pela ativação das bombas de H⁺ (Zandonadi et al. 2007).

Assumindo que o pH celular pode refletir informações sobre processos em andamento ou que estão por ocorrer (Felle 2001), o potencial de H⁺ poderia atuar como mensageiro em situações onde a mudança de pH é uma pré-condição para determinados processos, tais como seca, movimentos estomáticos, gravitropismo e crescimento de raízes, todos esses relacionados ao ON (García-Mata e Lamattina 2001; Hu et al. 2005; Correa-Aragunde et al. 2004; Kolbert et al. 2008b). A partir desse ponto de vista, a H⁺-ATPase poderia transcender sua função clássica com uma enzima ligada a transdução de energia, assumindo também um papel-chave como transdutora de sinais, mediando interações cruzadas entre AH, AIA, ON e o pH, dentre outros possíveis mensageiros. De fato, essa bomba de H⁺ está envolvida em diferentes respostas fisiológicas e também altamente regulada por vários sinais endógenos e ambientais (Ramos et al. 2008). Especificamente nas células de raiz, a fosforilação da ATPase dependente de Ca⁺² tem sido relacionada com o controle do pH citoplasmático e do apoplasto (Schallern e Sussman, 1988; Lino et al. 1998). Uma vez que os doadores de ON podem induzir a variações no conteúdo de Ca⁺² citosólico (Lamotte et al. 2006), é possível que existam interações entre os sinais disparados por ON, Ca⁺² e o pH, todos associados a uma ativação diferencial da

ATPase, processo que deve ser explorado em estudos subseqüentes. É importante notar que a maioria das enzimas afetadas por ON são reguladas por nitrosilação, incluindo as ATP sintases, sugerindo um papel de regulatório pós-traducional do ON em proteínas alvo (Lindermayr et al. 2005). Erdei e Kolbert (2008) relataram que o DTT, capaz de gerar ambientes redutores, retarda a emergência de RLs e a produção de ON. Esses resultados poderiam ser explicados devido a regulação negativa das bombas de H^+ responsáveis pela acidificação. É possível, portanto, realmente que a ATPase de MP seja alvo da ação do AH mediada por ON (Figs. 3 e 4). Com base na hipótese quimiosmótica do transporte de auxina (Lomax et al. 1985; Li et al. 2005), a extrusão de H^+ induzida por ON poderia assumir um papel fundamental na distribuição de auxina nas raízes. Por outro lado, o aumento da atividade da ATPase devido a aplicação de AH e AIA poderia ser responsável por um mecanismo de produção de ON independente das rotas enzimáticas já descritas, um mecanismo para a produção de ON não enzimático dependente do pH apoplástico. Como complemento, se pode especular que os componentes fenólicos presentes na estrutura dos AH estudados aqui poderiam contribuir para esse processo como descrito previamente para outros tipos de agentes fenólicos (Stöhr e Ullrich, 2002; Bethke et al. 2004).

Até o momento estas parecem ser as primeiras evidências da relação entre a ativação das bombas de H^+ e o desenvolvimento de RLs induzidos por ON. Serão necessários outros estudos a fim de esclarecer se a relação entre o aumento da acidificação e o desenvolvimento de RLs é correlativa ou causal. Os resultados apresentados derivados do uso de inibidores da ação da auxina reforçam evidências anteriores que sugerem que o AH pode atuar como uma fonte de auxina ambiental, e vai além por revelar o aumento da produção de ON durante o desenvolvimento de RLs induzidas por AH. Tomados em conjunto a ativação da ATPase por ON, o mecanismo de crescimento ácido induzido por AH e AIA (Canellas et al. 2002; Zandonadi et al 2007) e a produção de ON dependente da acidificação do apoplasto, é possível postular um mecanismo de amplificação do sinal de AIA e AH pela indução e liberação de ON. Dessa forma, a arquitetura radicular poderia ser regulada dependendo do sinal derivado da matéria orgânica presente no ambiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuzio, A., Nardi, S., Gulli, A. (1989) Plant growth regulator activity of small molecular size humic fractions. *Sci. Tot. Environ.*, 82:671-674.
- Beligni, M.V., Lamattina, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210:215-221.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Biol.*, 59:21-39
- Bethke, P., Badger, M.R., Jones, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16:332-341.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130:1951-1957.
- Canellas, L.P., Teixeira Junior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Médici, L.O., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2008) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annu. Appl. Biol.*, 153:157-166.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.*, 8:165-171.
- Collings, D.A., White, R.G., Overall, R.L. (1992) Ionic current changes associated with the gravity-induced bending response in roots of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, 100:1417-1426.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218:900-905.

- Davies, P.J. (1995) The plant hormones: Their nature, occurrence and functions. *In*: Davies, P.J. (ed) *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp 1-12.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol.*, 81:542-547.
- Dobbss, L.B., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Pino-Nunes, L.E., Rumjanek, V.M., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2007) Changes in root development of Arabidopsis promoted by organic matter from oxisols. *Annu. Appl. Biol.*, 151:199-211.
- Ederli, L., Reale, L., Madeo, L., Ferranti, F., Gehring, C., Fornaciari, M., Romano, B., Pasqualini, S. (2009) NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. *Plant. Physiol. Biochem.*, 47:42-48.
- Elena, A., Diane, L., Eva, B., Marta, F., Roberto, B., Zamarreño, A.M., Garcia-Mina, J.M. (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 47:215-223.
- Erdei, L., Kolbert, Z. (2008) Nitric oxide as a potencial signaling molecule in plants. *Acta Biol. Szeged.*, 52:1-5
- Evans, M.L., Vesper, M.J. (1980) An Improved Method for Detecting Auxin-induced Hydrogen Ion Efflux from Corn Coleoptile Segments. *Plant Physiol.*, 66:561-565.
- Façanha, A.R., Façanha, A., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G. De A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schrispema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropecu. Bras.* 37:1301-1310
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiol.*, 108:241-246.
- Felle, H.H. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.*, 3:577-591
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375.
- Flores, T., Todd, C.D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P.K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M.E., Brownfield, D.M., Mullen, R.T., Lamattina, L., Polacco, J.C. (2008)

- Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.*, 147:1936-1946.
- Frías, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Cullanez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles *Plant Cell*, 8:1533-1544.
- García-Mata, C., Lamattina, L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.*, 126:1196-1204.
- Geldner, N., Friml, J.K., York-Dieter, S., Jürgens, G., Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413:425-428.
- Gouvêa, C.M., Souza, C.P., Magalhaes, C.A.N., Martin, I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.*, 21:183-187.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 116:483-505.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185:527-537.
- Hayes, M.H., Malcolm, R. (2001) Consideration of composition and aspects of the structures of humic substances. *In: Humic substances and chemical contaminants*. Madson: Soil Science Society of America, pp 3-39.
- Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z., Cai, W. (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.*, 137:663-670.
- Ivanchenko, M.G., Coffeen, W.C., Lomax, T.L., Dubrovsky, J.G. (2006) Mutations in the Diageotropica (dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J.*, 46:436-447.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L. (2008a) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J. Plant Physiol.*, 165:967-975.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L. (2008b) Osmotic stress- and indole-3-butyric acid-induced NO generation are partially distinct processes in root growth and development in *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.*, 133:406-416.

- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2006) Mechanisms of nitric-oxide induced increase of free cytosolic Ca^{2+} concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 40:1369-1376.
- Leyser, O., Fitter, A. (1998) Roots are branching out in patches. *Trends Plant Sci.*, 3:203-204.
- Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E. L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H^+ -PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. *Science*, 310:121-125.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 137:921-930.
- Lino, B., Baizabal-Aguirre, V.M., Gonzalez de la Vara, L.E. (1998) The plasma-membrane H^+ -ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta*, 204:352-359.
- Lomax, T.L., Mehlhorn, R.J., Briggs, W.R. (1985) Active auxin uptake by zucchini membrane vesicles: quantitation using ESR volume and ΔpH determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:6541-6545.
- Malamy, J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.*, 28:67-77.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N. (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.*, 2:390-396.
- Moloney, M.M., Elliott, M.C., Cleland, R.E. (1981) Acid-growth effects in maize roots: evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. *Planta*, 152:285-291.
- Moriau, L., Michelet, B., Bogaerts, P., Lambert, L., Michel, A., Oufattole, M., Boutry, M. (1999) Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H^+ -ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.*, 19: 31-4.
- Mulkey, T.J., Kuzmanoff, K.M., Evans, M.L. (1981) The agar-dye method for visualizing acid efflux patterns during tropistic curvatures. *What's New Plant Physiol.*, 12:9-12.

- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31:1303-1311.
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spaccini, R., Piccolo, A. (2007) Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 39:3138-3146.
- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1341-1346.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, 34:1527-1537.
- Oono, Y., Chiharu, O., Rahman, A., Asppuria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A., Uchimiya, H. (2003) p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiol.*, 134:1135-1147.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.*, 129:954-956.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.*, 75:57-133.
- Piccolo, A., Mbagwu, J.S.C. (1999) Role of Hydrophobic Components of Soil Organic Matter in Soil Aggregate Stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:1801-1810.
- Pilet, P.E., Versel, J.M., Mayor, G. (1983) Growth distribution and surface pH patterns along maize roots. *Planta* 158, 398 – 402
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999) Modulation of NO_3^- uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Soil*, 215:155-161.
- Poupart, J., Rashotte, A.M., Muday, G.K., Waddell, C.S. (2005) The RIB1 mutant of *Arabidopsis* has alterations in indole-3-butyric acid transport, hypocotyl elongation, and root architecture *Plant Physiol.*, 139:1460-1471.
- Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 55:803-813.

- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E.B., Baskin, T.I. (2007) Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J.*, 50:514-528.
- Ramos, A.C., Facanha, A.R., Feijó, J.A. (2008) Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 178:177-188.
- Reed, R.C., Brady, S.R., Muday, G.K. (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 118:1369-1378.
- Schallern, G.E., Sussman, M.R. (1988) Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase of higher plants by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta*, 173:509-518.
- Schmidt, W., Santi, S., Pinton, R., Varanini, Z. (2007) Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant Soil*, 300:259-267.
- Schnitzer, M., Skinner, S.I.M. (1982) Organic matter characterization. *In: Method of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Mineralogical Properties* (American Society of Agronomy/Soil Science Society of America Agronomic Monograph), pp. 581–597. ASA/SSSA Publishers, Madison, USA.
- Stöhr, C., Ullrich, W.R. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.*, 53:2293-2303.
- Sussman, M.R., Goldsmith, M.H.M. (1981) The action of specific inhibitors of auxin transport on uptake of auxin and binding of n-1-naphthylphthalamic acid to a membrane site in maize coleoptiles. *Planta*, 152:13-18.
- Versel, J.M., Mayor, G. (1985) Gradients in maize roots: local elongation and pH. *Planta*, 164:96-100.
- Whitehead, D.C. (1963) Some aspects of the influence of organic matter on soil fertility. *Soil Fert.*, 26:217-223.
- Wright, L.Z., Rayle, D.L. (1983) Evidence for a relationship between H⁺ excretion and auxin shoot gravitropism. *Plant Physiol.*, 72:99-104.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.

- Zhang, H., Forde, B.G. (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279:407–409
- Zhao, H., Hertel, R., Ishikawa, H., Evans, M.L. (2002) Species differences in ligand specificity of auxin-controlled elongation and auxin transport: comparing *Zea* and *Vigna*. *Planta*, 216:293-301.
- Zhao, L.Q., Zhang, F., Guo, J.K., Yang, Y.L., Li, B.B., Zhang, L.X. (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol.*, 134:849-857.

CAPÍTULO 2

O PAPEL DAS BOMBAS DE PRÓTONS NA SINALIZAÇÃO VIA ÁCIDOS HÚMICOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO RADICULAR DO TOMATEIRO *NEVER RIPE*

RESUMO

Os fitormônios e os sinais ambientais regulam coordenadamente o desenvolvimento de raízes laterais (RLs), sendo a interação entre auxina e etileno um elemento chave nesse processo. Os ácidos húmicos (AHs), ácido indol acético (AIA) e o gás óxido nítrico (ON) regulam a formação e o crescimento das RLs e a ativação de bombas de H⁺ de maneira coordenada, entretanto o papel do etileno nesse processo ainda não foi explorado. O objetivo deste trabalho foi esclarecer a importância da percepção do etileno no desenvolvimento de RLs induzidas por AIA, SNP e AHs em plântulas de tomateiro. A caracterização das atividades da H⁺-ATPase de MP e da H⁺-PPase de tonoplasto foi realizada no mutante com baixa percepção de etileno *Never ripe (Nr)*. As atividades da H⁺-ATPase de MP e da H⁺-PPase de tonoplasto são menores no mutante *Nr* em relação ao genótipo controle

(WT). As atividades dessas enzimas nas raízes das plantas *Nr* foram mais sensíveis a AIA do que a AHs em relação às plantas WT. O mutante *Nr* possui maior comprimento do eixo principal das raízes e maior número de RLs do que as plantas WT. A pouca percepção do etileno devido à mutação do gene *Nr* incrementou significativamente os efeitos da aplicação exógena de AIA, SNP e AHs sobre as RLs. Os resultados sugerem que etileno, auxina e ON poderiam interagir numa seqüência de eventos que resultam na formação da RL processo no qual as bombas de H⁺ estão envolvidas.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento radicular é de suma importância para a eficiência na absorção de nutrientes e para a exploração e fixação das plantas no ambiente que estas colonizam. O crescimento e o desenvolvimento das raízes são influenciados pelo balanço hormonal das plantas (Swarup et al., 2002) e o fitormônio auxina é um regulador chave para o desenvolvimento de raízes (Blakely et al., 1988; Laskowski et al., 1995), por atuar no estímulo do primórdio formador das raízes laterais (Ivanchenko et al., 2006). O etileno participa decisivamente no controle do desenvolvimento das raízes, interagindo com a auxina em uma seqüência de eventos ainda pouco esclarecida (Ivanchenko et al., 2008).

O efeito do etileno sobre as plantas tem sido classicamente relacionado com a inibição do crescimento. A tríplice resposta de plantas crescidas na ausência de luz é um dos processos mais bem descritos, na qual ocorre engrossamento do hipocótilo, inibição do crescimento do hipocótilo e raiz e curvatura exagerada na região apical (Guzmán e Ecker, 1990). Entretanto, na presença de luz, o etileno é capaz de estimular a expansão do hipocótilo (Smalle et al., 1997). As respostas vegetais ao etileno levaram à construção de um “modelo bifásico” no qual níveis mais elevados desse gás inibem, enquanto níveis mais baixos estimulam o

crescimento (Pierik et al., 2006), quebrando o paradigma da ação somente inibitória deste fitormônio.

Stepanova et al. (2005) propuseram um modelo no qual o etileno estimula a biossíntese de auxina em raízes, por induzir a transcrição de dois genes que codificam subunidades de enzimas relacionadas a produção de triptofano. Como consequência, o etileno aumenta o acúmulo de auxina necessário para alguns efeitos morfológicos do próprio etileno na raiz, como por exemplo, relacionados ao comprimento radicular. Posteriormente esse modelo foi sustentado e estendido por outros trabalhos: o etileno poderia ativar localmente a via de sinalização de auxina por meio da regulação da biossíntese e do transporte desse hormônio (Ruzicka et al., 2007). Além disso, pela regulação positiva da síntese de auxina, o etileno poderia inibir a fase mais rápida da expansão celular das raízes (Swarup et al., 2007). A interação entre auxina e etileno parece resultar na regulação recíproca da biossíntese desses fitormônios, embora possam atuar de maneira independente nos mesmos genes alvos (Stepanova et al., 2007).

Os trabalhos mencionados anteriormente têm foco na expansão da raiz principal e demonstram que tanto o ACC (ácido aminociclopropano) quanto o AIA (ácido indol acético) inibem o seu crescimento. A emissão de pêlos é outro aspecto da morfologia radicular influenciada pela interação auxina-etileno, sendo o etileno um regulador positivo do desenvolvimento de pêlos radiculares (Tanimoto et al., 1995). É curioso observar que, apesar da ligação entre auxina e etileno na alteração da arquitetura e morfologia da raiz, o foco da maioria dos trabalhos volta-se somente para a auxina. Conseqüentemente, existe uma escassez de trabalhos sobre o desenvolvimento radicular influenciado por etileno, principalmente no que diz respeito especificamente às raízes laterais (RLs). O trabalho pioneiro de Clark et al. (1999) demonstrou que o mutante de tomate *Nr* (*Never ripe*), com baixa sensibilidade a etileno, não emite raízes adventícias, embora possua massa radicular maior do que o tomateiro controle. O mutante *Nr* possui a resposta de etileno reduzida devido a mutação negativo-dominante de um importante receptor de etileno (receptor *ETHylene Response3*, ETR3, também chamado de *Nr*) (Lanahan et al., 1994). Segundo estes autores, o mutante *Nr* não responde nem ao etileno gerado endógenamente nem ao fornecido exógenamente. Em tomateiro o etileno é percebido por uma família de 6 receptores de membrana (LeETR-LeETR6) (Zhong et al., 2008).

Recentemente, foram publicados dois trabalhos importantes que revelam detalhes da participação do etileno no desenvolvimento de RLs (Ivanchenko et al., 2008; Negi et al., 2008): A inibição da formação de RLs pelo etileno é dependente da proteína AUX1, responsável pelo influxo de auxina (Negi et al., 2008). Por outro lado, o etileno induz à iniciação de RLs próxima a ponta da raiz principal em crescimento enquanto aumenta a expansão de RLs em regiões mais maduras da raiz (Ivanchenko et al., 2008).

Apesar da já intrincada sucessão de eventos relacionados ao desenvolvimento de RLs, mais um fator aparece como sinal fundamental durante a iniciação de raízes, o gás óxido nítrico (ON). O ON está envolvido na cascata de sinalização de auxina durante a emissão de raízes adventícias (Pagnussat et al., 2002) e RLs (Correa-Aragunde et al., 2004). Aparentemente, existe um aumento transitório da produção de ON induzido por auxina que precede a emissão da RL. Em tomate, o ON é produzido nas células do periciclo, as quais irão dar origem a RL, comprovando que este gás é essencial durante os estágios iniciais do desenvolvimento das RLs (Correa-Aragunde et al., 2004). A relação entre ON e auxina foi reforçada pela observação de que, assim como a auxina (revisado por Casimiro et al., 2003), o ON promove a iniciação de RLs pela expressão de genes que regulam o ciclo celular (Correa-Aragunde et al., 2006).

As H⁺-ATPases do tipo P estão envolvidas em muitos processos essenciais à ontogenia vegetal (Palmgren et al., 2001; Gaxiola et al., 2007; Duby e Boutry, 2009). O balanço hormonal capaz de controlar as bombas de H⁺ também pode regular o desenvolvimento de RLs (Gaxiola et al., 2007). A H⁺-ATPase é uma enzima chave no estabelecimento do gradiente eletroquímico responsável pela energização da membrana, utilizado para os processos de transporte iônico e de solutos, sendo importante para absorção de nutrientes e carregamento do xilema e floema (Revisado por Duby e Boutry, 2009). O papel fisiológico desta enzima é fundamental durante a expansão (Frias et al., 1996) e controle do pH celular (Hager et al., 1991), ambos regulados por auxina. A região de intensa divisão celular que resulta na emissão da RL possui uma elevada quantidade desta H⁺-ATPase (Moriau et al., 1999). Embora a relação entre a iniciação de raízes e a atividade da H⁺-ATPase esteja sendo estudada (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007), a participação do etileno e do ON nesse processo continua inexplorada. Por meio da utilização de ativadores e inibidores da atividade da H⁺-ATPase, Kelly e Bradford (1990)

sugeriram que esta enzima seria importante na produção de etileno em hipocótilo de tomateiro. Outra possível evidência da relação do etileno com a H⁺-ATPase, demonstrou o aumento do nível de RNAm da isoforma CsHA1 em tecido radicular de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) crescidas sem Fe²⁺ (Lucena et al., 2006). Não existem relatos da relação do ON e H⁺-ATPase em raízes, entretanto, a ação estimulatória deste gás sobre a atividade e expressão da H⁺-ATPase foi verificada em calos de *Phragmites communis* (Zhao et al., 2004) e *Populus euphratica* (Zhang et al., 2007).

As respostas das plantas aos sinais endógenos e ambientais resultam no crescimento e desenvolvimento vegetal (Swarup et al., 2002). Para iniciar o desenvolvimento de RLs as plantas necessitam responder a uma intrincada sinalização hormonal (Malamy, 2005), a qual pode afetar a ativação das bombas de H⁺ de MP e de tonoplasto (Gaxiola et al., 2007; Zandonadi et al., 2007). Substâncias húmicas naturalmente presentes na matéria orgânica dos solos também são capazes de estimular os sistemas primários de transporte de H⁺ (Pinton et al., 1999; Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Elena et al., 2009). Os ácidos húmicos (AHs) fazem parte das substâncias húmicas reconhecidamente dotadas de características hormonais (Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004), regulando a atividade (Canellas et al., 2002; Elena et al., 2009) e os níveis de RNAm das H⁺-ATPases de MP (isoformas CsHA1 e CsHA2) (Elena et al., 2009) em raízes de diferentes espécies. Os AHs parecem ser capazes de regular como as plantas integram as informações diretamente do ambiente, alterando o desenvolvimento radicular de forma a proporcionar a adaptação ao solo.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a possível relação entre auxina, etileno e ON na regulação das bombas de H⁺ durante o desenvolvimento de RLs estimuladas por AHs. Os dados obtidos serão discutidos em função de uma possível seqüência de eventos que representa a via pela qual etileno, auxina e ON interagem para induzir e modular o desenvolvimento de RLs com mediação da ativação sincrônica das bombas de H⁺.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração de ácidos húmicos

Os ácidos húmicos (AH) de vermicomposto foram isolados de acordo com o procedimento preconizado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (Schnitzer e Skinner, 1982). Resumidamente, foi utilizado NaOH 0,5 mol L⁻¹ como solvente na razão vermicomposto:solvente de 1:10 (m:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos AH foi realizada com o abaixamento do pH da solução até 1-1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A redissolução e precipitação foi repetida três vezes. Em seguida, adicionou-se 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl [5 mL HCl (12 mol L⁻¹) + 5 mL HF (48%) L⁻¹]. Após uma centrifugação (5000 g) por 15 minutos, os AH foram lavados seguidamente com água até teste negativo com AgNO₃. Foi realizada a diálise contra água desionizada usando uma membrana 12-14 KDa (Thomas Scientific Inc.). As amostras dializadas foram liofilizadas e caracterizadas quimicamente.

2.2. Material vegetal

Mutantes de tomate podem ser utilizados com sucesso como modelos genéticos nas respostas alteradas a diferentes hormônios (Lanahan et al., 1994). No presente trabalho foi utilizado o tomateiro mutante *Never ripe (Nr)* (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig), pouco sensível ao etileno (Lanahan et al., 1994; Wilkinson et al., 1995), como modelo para o estudo e seu parental genético sem mutação (denominado WT). A confirmação da ausência parcial de sensibilidade das plantas *Nr* utilizadas no presente trabalho foi realizada mediante aplicação do precursor de etileno ACC (0,16 μmol L⁻¹). Enquanto as plantas WT apresentaram resposta típica ao etileno, enquanto as plantas *Nr* não apresentaram resposta inibitória ao etileno.

2.3. Tratamentos das plantas

Foram realizados experimentos prévios para avaliar os efeitos equivalentes de diferentes doses de auxinas (ácido-3-indol acético, AIA) (0, 10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-5} mol L⁻¹), ácidos húmicos (AHs) (0, 5, 20 e 50 mg C L⁻¹) e o doador de ON nitroprussiato de sódio (SNP) (0, 5, 200 e 500 μ mol L⁻¹) sobre o número de raízes laterais (RLs). Devido aos efeitos equivalentes observados sobre o crescimento da raiz, adotou-se as concentrações de 10^{-8} mol L⁻¹ de AIA, 20 mg C L⁻¹ de AH e 200 μ mol L⁻¹ de SNP para os experimentos seguintes.

A caracterização do efeito dos AHs, AIA e SNP sobre a arquitetura (medidas do comprimento do eixo principal da raiz e do número de RLs) e morfologia radicular (primórdios das RLs) das plantas WT e *Nr* foram realizadas na presença de inibidores da ação da auxina (PCIB) e do gás ON (PTIO) após 5 dias de tratamento. As plântulas de tomates com radículas medindo 1 cm foram selecionadas e mantidas por 5 dias sobre papel de filtro umedecido com 10 ml de cada tratamento em caixas de germinação (tipo "Gerbox") em câmara (tipo "BOD") a 25 °C e fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro. Os tratamentos estão listados no quadro a seguir:

Quadro 1. Tratamentos utilizados nos experimentos de avaliação da mudança da arquitetura radicular de plântulas de tomate WT e *Nr* crescidas por 5 dias.

Tratamento*	Descrição
controle	CaCl ₂ 2 mM
PCIB	ácido p-cloro fenoxil isobutírico 40 µM
PTIO	2-phenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazol-1-oxil-3-oxide 200 µM
AIA	ácido-3-indol acético 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ (0,01 µM)
AIA+PCIB	ácido-3-indol acético 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ + ácido p-cloro fenoxil isobutírico 40 µM
AIA+PTIO	ácido-3-indol acético 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ + 2-phenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazol-1-oxil-3-oxide 200 µM
SNP	Nitroprussiato de sódio 200 µM
SNP+PCIB	Nitroprussiato de sódio 200 µM + ácido p-cloro fenoxil isobutírico 40 µM
SNP+PTIO	Nitroprussiato de sódio 200 µM +2-phenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazol-1-oxil-3-oxide 200 µM
AH	Ácido húmico 20 mg C L ⁻¹
AH+PTIO	Ácido húmico 20 mg C L ⁻¹ + 2-phenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazol-1-oxil-3-oxide 200 µM

*Todos os tratamentos foram suplementados com CaCl₂ 2 mM.

Com a finalidade de compreender a forma pela qual a sensibilidade ao etileno afeta a resposta de AHs e AIA sobre os sistemas primários de transporte de H⁺, as plantas de tomateiro foram caracterizadas sob diferentes concentrações de AHs isolados de vermicomposto (0, 5, 20 e 50 mg C L⁻¹) e AIA (0, 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ e 10⁻⁵ mol L⁻¹).

2.4. Análises estatísticas

Para a avaliação do efeito dos tratamentos em relação ao controle os dados foram submetidos à análise de variância e foram comparados com auxílio do teste Dunnett de comparação múltipla de médias ($P < 0,05$) em cada genótipo separadamente. Para a avaliação da diferença entre os genótipos, os dados foram submetidos à análise de variância e os contrastes comparados pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$)

2.5. Avaliação do número de primórdios formadores de RLs

As raízes de plântulas de tomateiro foram coletadas, e analisadas individualmente ($n=10$). O sistema radicular foi coletado e lavado com água e clareado em solução de KOH 0,5 % durante 20 minutos em banho a 75°C. Após este clareamento, as amostras de raízes foram lavadas novamente e mantidas no escuro por pelo menos 14h imersas em solução corante de hematoxilina férrica para marcação dos sítios de mitose. Posteriormente, as raízes foram enxaguadas com água e clareadas com ácido láctico 80% durante 30 a 90 segundos em banho a 75 °C. As raízes inteiras foram transferidas individualmente para placas de petri com água destilada e observadas sob a lupa estereoscópica para avaliar o número de sítios de mitose. Esses sítios aparecem como pontos escuros contra um fundo da cor do tecido da raiz. O estoque de solução de hematoxilina contém 1g de hematoxilina, 0,5g de sulfato férrico de amônio e 50 ml de ácido acético a 45%. A tintura estoque (40 vezes concentrada) foi mantida em ambiente protegido da luz em temperatura ambiente.

2.6. Número de RLs e CEP

As raízes de plântulas tomateiro foram coletadas, escaneadas e analisadas individualmente ($n=30$) com auxílio do programa de análises de imagens ImageJ (Rasband, 2009). Foram contados o número de RLs e medidos o comprimento do eixo principal (CEP) da raiz.

2.7. Purificação das vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática

As vesículas de tonoplasto e de MP foram isoladas de raízes das plantas tratadas utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e de Meis, 1998). Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250 mM de sacarose, 10 % de glicerol (m:v), 0,5 % de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,2 % de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). A manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como as centrifugações, tiveram a temperatura controlada a fim de que não excedesse 4°C. Além disso, o pH do tampão de extração também foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação numa centrífuga Himac CP (HITACHI) a 1500xg durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10000xg por 15 minutos numa ultracentrífuga Himac CP 85b (HITACHI) utilizando o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. Estas organelas foram separadas e descartadas a fim de não interferirem nos experimentos futuros. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a 100000xg por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em 1 mL de solução tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6, EGTA 1 mM e) para imediata aplicação sobre o gradiente de sacarose.

A purificação das vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática foi realizada conforme procedimento utilizado por Façanha e De Meis (1998) com algumas modificações. Foi aplicado 1 mL da suspensão contendo a fração microssomal sobre um gradiente descontínuo bifásico de sacarose (cada camada com volume de 1,5 mL) nas concentrações de 25/45 % (m/m), contendo ainda: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. O gradiente foi

submetido a uma centrifugação de 100.000 g num rotor SW40 (Himac), durante 90 minutos (ultracentrifuga himac CP 85b). Após a centrifugação, duas bandas são visíveis: uma entre as camadas 25 e 45% e outra no topo da camada 25%, correspondendo a vesículas contendo MP e tonoplasto, respectivamente. Essas vesículas foram coletadas e utilizadas imediatamente ou congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -70°C antes do uso. A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

2.8. Determinação da atividade H⁺-ATPase de Membrana Plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10 % (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1 % (100:1) e após 15 minutos foi feita à leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nesta reação o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Composição do meio de reação: 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína. Cerca de 70-90% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄), um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 35 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo P.

2.9.1. Determinação da atividade da H⁺-PPase

A atividade da da H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto foi determinada pela medida da liberação de Pi, segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloro acético (TCA gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). A atividade enzimática representa a atividade hidrolítica de PPI

dependente de K^+ (V-PPase tipo 1) e foi obtida na presença e ausência de 100 mM de KCl. A atividade foi dependente de KCl em pelo menos 60%. O meio de reação conteve 10 mM de Mops-Tris (pH 7,0) 100 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$ e 50 μg de proteína. A atividade da H^+ -PPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi medida por diferença entre a ausência e presença de KCl.

2.9.2. Expressão relativa de RNAm

2.9.2.1. Extração de RNA total

Foram macerados 100-200 mg de tecido radicular fresco com auxílio de almofariz e pistilo, na presença de N_2 líquido. O macerado foi transferido para tubos de microcentrífuga (1,5 mL) novos e livres de RNase. Ao material foi adicionado 1 mL do reagente TRIZOL (Life Technologies). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000xg por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado a este 500 μL de clorofórmio sendo o tudo levado a agitação por 2 min à temperatura ambiente. Logo após, foi realizado outra centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 8 °C, sendo o sobrenadante transferindo para outro tubo, ao qual foi adicionado 500 μL de isopropanol. O material foi misturado por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12000xg por 10 min a 4°C, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Um ml de etanol 75% foi adicionado sobre o sedimento resultante A amostra foi novamente centrifugada, 7500xg por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco a 37°C por aproximadamente 10 minutos, sendo posteriormente ressuspensão com 50 μL de água-DEPC. Uma alíquota (1 μL) de cada amostra de RNA total foi submetida à eletroforese em gel de agarose-DEPC 1% para quantificação, fotodocumentação e confirmação da qualidade. A integridade do RNA foi confirmada tanto através de eletroforese como por densidade ótica (DO). A relação DO_{260}/OD_{280} nm ficou acima de 1,9. Foi utilizado 1-2 μg de RNA para o próximo passo. O material restante foi armazenado em freezer -70 °C até o momento de uso posterior. Foram extraídos RNA de dois experimentos independentes.

2.9.2.2. Transcrição Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizados 1-2 µg de RNA total para produção de cDNAs. A síntese foi realizada com o kit *High capacity cDNA Reverse transcription* (Applied Biosystems, USA). Uma PCR com gradiente de temperatura (49, 52, 55, 58, e 61°C) foi realizada a fim de confirmar a especificidade dos *primers* e a temperatura de *melting* real. A eletroforese em gel de agarose 2,0% com tampão TAE para a confirmação dos produtos de PCR com os *primers* específicos foi realizada. Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa *Primer3* e suas características avaliadas no programa *Oligocheck* e após análise rigorosa foram sintetizados pela *IDT Technology*. A confirmação da especificidade dos *primers* foi obtida em gel de alta resolução, onde obteve-se produtos de PCR único nas diferentes temperaturas testadas e com tamanho esperado. A especificidade foi confirmada também através da curva de *melting* realizada posteriormente no *LightCycler*. As informações das sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela a seguir.

Tabela 1. Informações das seqüências de *primers* utilizados nos experimentos.

Definição da seqüência	Número de acesso <i>GenBank</i>	Tamanho produto (pb)	Nome do <i>primer</i>	Seqüência do <i>primer</i>
<i>L. esculentum</i> P-ATPase (LHA4) gene, mRNA sequence	U72148	148	LHA4	<i>Forward</i> 5'-TGGATTGCTACCCCTCTTTG-3' <i>Reverse</i> 5'-TATTCCCATTCCAAGCCTAC-3'
<i>S. lycopersicum</i> cDNA clone Tubulin alpha chain, mRNA sequence	BG791276	99	TUB	<i>Forward</i> 5'-ACTGGAGCTGGAAAGCATGT-3' <i>Reverse</i> 5'-GTGAAAGAGCTGCCGGTAAG-3'

2.9.2.3. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para validação estatística dos experimentos foram realizados dois ensaios independentes no termociclador *LightCycler* 1.5 (Roche) com RNAm extraídos de experimentos independentes. Os cDNAs de cada experimento foram utilizados em triplicata para cada condição avaliada. O meio para o PCR foi preparado como descrito a seguir (concentrações finais): 2.4 μ l de $MgCl_2$ (4 μ M), 0,6 μ l do *primer* direto (0,6 μ M), 0,6 μ l do *primer* reverso (0,6 μ M), 2 μ l do componente *LightCycler–Fast Start DNA Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals) e 13 μ L de água ultra-pura. Os 19 μ L do meio foram adicionados ao capilar de vidro e adicionado 1 μ L de cDNA. Para a curva de diluição de cDNA utilizou-se as concentrações: 0,1, 1, 10 e 100 ng de cDNA molde da condição controle (Figura 8). Todo o procedimento foi realizado dentro de fluxo laminar. Após a adição dos reagentes os capilares foram fechados e centrifugados cuidadosamente. O protocolo utilizado para o experimento constituiu-se de 4 etapas: (1) programa de desnaturação (10 min a 95°C); (2) programa de amplificação e quantificação repetido 41 vezes (10 seg. a a 95°C; 5 seg. a 59°C – para ambos os genes TUB e LHA4; 5 seg. a 72°C com modo de aquisição de fluorescência único); (3) programa de curva de *melting* (65-95°C com taxa de aquecimento de 0,1°C por seg. com aquisição de fluorescência contínua) e; (4) programa de resfriamento para baixa a temperatura para 40°C. Os CPs (*crossing points*) foram obtidos e utilizados nos cálculos posteriores. Os CPs são definidos como ponto no qual a fluorescência alcança níveis significativamente maiores do que a fluorescência não específica.

As expressões relativas do RNA mensageiro (RNAm) dos genes de interesse LHA4 (*Lycopersicum esculentum* H⁺-ATPase isoforma 4 de membrana plasmática) e do controle endógeno TUB (TUBulina) (Tabela 1) foram comparadas utilizando-se um teste não paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*®) como descrito por Pfaffl et al. (2002). A fórmula utilizada para o cálculo da expressão relativa é a seguinte:

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (MÉDIA \text{ controle} - MÉDIA \text{ amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (MÉDIA \text{ controle} - MÉDIA \text{ amostra})}}$$

A equação apresenta o modelo matemático utilizado pra o cálculo da razão de expressão relativa no RT-qPCR. A razão **R** de um gene alvo numa determinada condição (amostra ou tratamento) é apresentada versus a condição controle em comparação ao gene de referência (ref). **E_{alvo}** é a eficiência do RT-qPCR dos transcritos do gene alvo. **E_{ref}** é a eficiência do RT-qPCR dos transcritos do gene referência. **ΔCP_{alvo}** é a diferença entre o CP dos transcritos do gene alvo na condição controle e da condição amostra ou tratamento. **ΔCP_{ref}** é a diferença entre o CP dos transcritos do gene referência na condição controle e da condição amostra ou tratamento.

3. RESULTADOS

3.1. A atividade da H⁺-ATPase de MP em plantas WT e *Nr* é alterada por diferentes concentrações de auxina

A Figura 1 apresenta a atividade hidrolítica de ATP da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) em relação a diferentes doses de auxina (ácido-3-indol acético, AIA) em raízes de tomateiros WT ou *Nr*. A atividade da H⁺-ATPase do tipo P foi cerca de 50% maior nas plantas (WT) sob tratamento com a menor dose de auxina (10^{-10} mol L⁻¹) e não alterou-se na dose intermediária (10^{-8} mol L⁻¹) e na dose mais elevada (10^{-5} mol L⁻¹). Para a faixa de concentração estudada, quanto menor a concentração de auxina maior foi a atividade da H⁺-ATPase de MP.

Em plantas WT a H⁺-ATPase de MP foi estimulada em cerca de 390, 220 e 100%, respectivamente, para a intermediária, menor e maior dose de AIA (Figura 1). Considerando-se o contraste entre os genótipos WT e *Nr*, a atividade controle da ATPase de MP do *Nr* é cerca de três vezes menor que as plantas WT nas condições controle e cerca de uma vez e meia menor nas doses 10^{-10} e 10^{-5} mol L⁻¹ de AIA. No entanto, a dose 10^{-8} mol L⁻¹ de AIA estimulou relativamente mais as plantas *Nr* (~25 %). Proporcionalmente, as plantas que não percebem o etileno são mais responsivas à presença de AIA do que as plantas controle no que se refere a ativação da enzima, respondendo três vezes mais na dose mais efetiva de AIA (10^{-8} mol L⁻¹) quando comparado a melhor dose das plantas controle (10^{-10} mol L⁻¹).

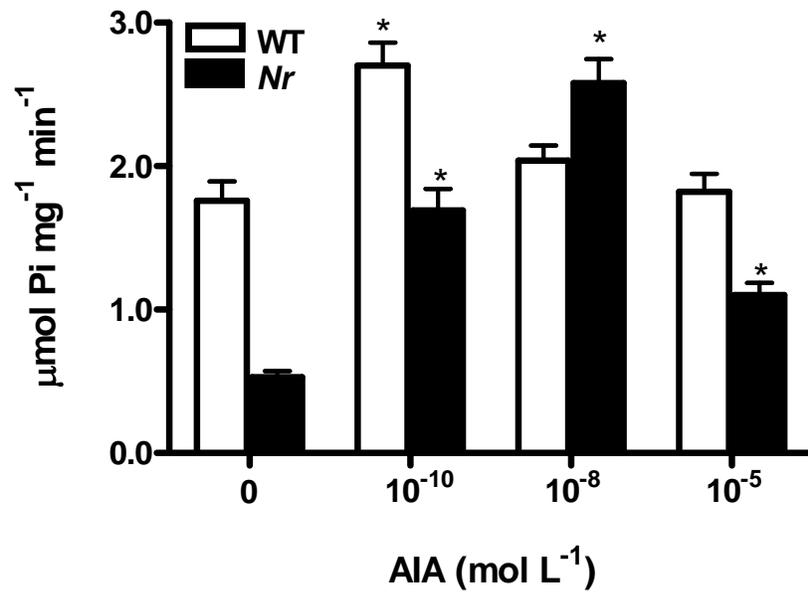


Figura 1. Atividade hidrolítica de ATP da H^+ -ATPase de membrana plasmática em vesículas isoladas de raízes em relação a diferentes doses de auxina (ácido-3-indol acético, AIA) em dois genótipos de tomateiro: *Never ripe* (*Nr*) e seu parental (WT) usado como controle. As barras representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Os asteriscos (*) denotam diferença significativa em relação controle segundo o teste Dunnett ($P < 0,05$).

3.2. A atividade da H⁺-ATPase de MP em plantas WT e *Nr* é alterada por diferentes concentrações de AH

A Figura 2 apresenta a atividade hidrolítica de ATP da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) em relação a diferentes doses de AH (0, 5, 20 e 50 mg C L⁻¹). A atividade da H⁺-ATPase do tipo P nas plantas WT foi maior conforme o aumento da dose de AH. Os estímulos em relação ao controle foram de 90 e 100 %, nas doses 20 e 50 mg C L⁻¹, respectivamente.

Os estímulos da plantas *Nr* em relação ao controle foram cerca de 60 e 50% nas concentrações 5 e 20 mg C L⁻¹. A comparação entre os dois genótipos revelou o aumento da ativação da enzima nas plantas WT na maior dose e o aumento da ativação nas plantas *Nr* na menor dose. Observando-se a diferença entre WT e *Nr*, a maior parte da ativação da H⁺-ATPase de MP não dependeria do AIA presente no AH e sim de um outro fator que depende do sistema de percepção de etileno.

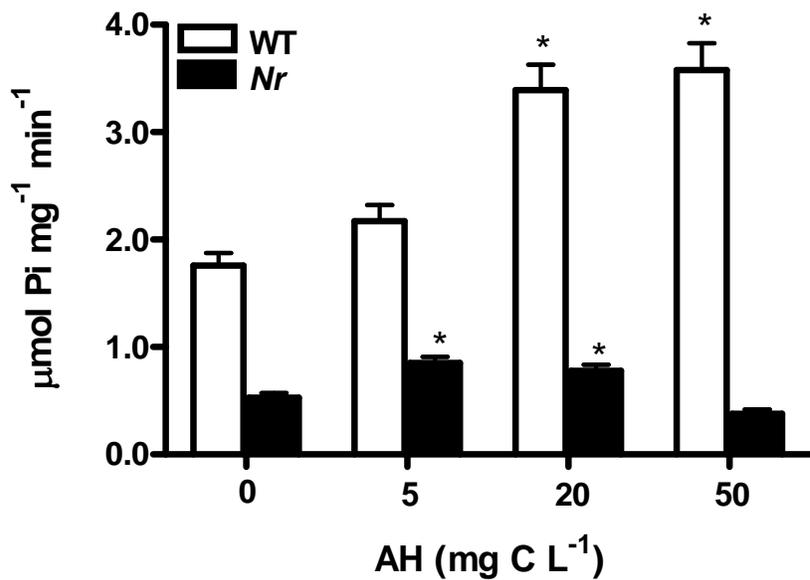


Figura 2. Atividade hidrolítica de ATP da H⁺-ATPase de membrana plasmática em vesículas isoladas de raízes em relação a diferentes doses ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (AH) em dois genótipos de tomateiro: *Never ripe* (*Nr*) e seu parental (WT) usado como controle. As barras representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão. Os asteriscos (*) denotam diferença significativa em relação controle segundo o teste Dunnett ($P < 0,05$).

3.3. A Atividade da H⁺-PPase de tonoplasto em plantas WT e *Nr* é alterada por diferentes de concentrações de auxina

A Figura 3 apresenta a atividade hidrolítica de PPI da H⁺-PPase de tonoplasto (V-PPase) em relação a diferentes doses de auxina (ácido-3-indol acético, AIA). Nas plantas WT a V-PPase foi estimulada em de cerca de 60 e 70% nas concentrações 10⁻¹⁰ e 10⁻⁸ mol L⁻¹ de AIA.

Nas plantas *Nr*, os tratamentos com AIA resultaram em estímulos de cerca de 300, 1100 e 700 % nas doses 10⁻¹⁰, 10⁻⁸ e 10⁻⁵ mol L⁻¹, respectivamente. Quando a atividade da enzima é comparada entre os genótipos, observa-se uma atividade da V-PPase aproximadamente 6 vezes maior nas plantas WT em relação as plantas *Nr* em condições controle e 2,5 vezes maior na dose 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ de AIA, sugerindo que a mutação promove forte inibição da H⁺-PPase, a qual é antagonizada por concentrações de AIA entre 10⁻⁸ e 10⁻⁵ mol L⁻¹

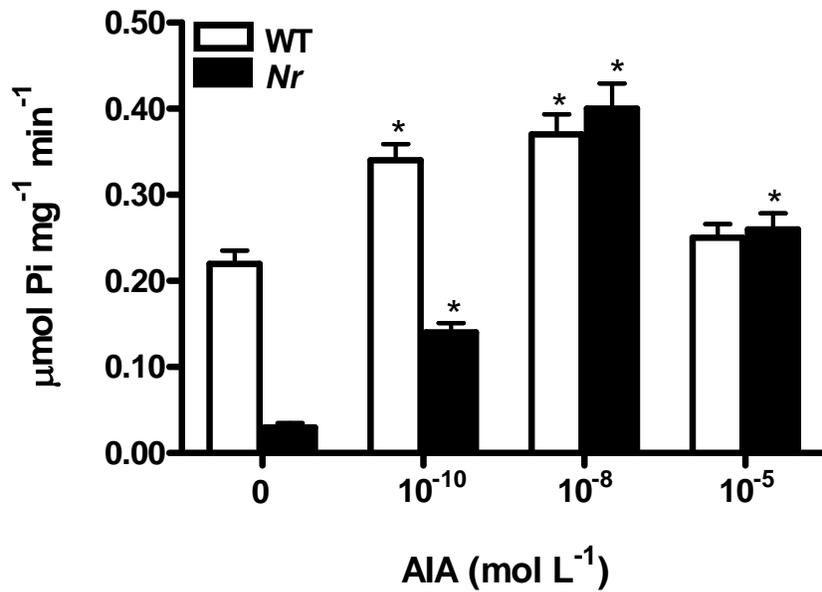


Figura 3. Atividade hidrolítica de pirofostato de sódio inorgânico (PPI) da H⁺-PPase do tonoplasto dependente de K⁺ isoladas de vesículas de raízes em relação a diferentes doses de auxina (ácido-3-indol acético, AIA) em dois genótipos de tomateiro: *Never ripe* (*Nr*) e seu parental (*WT*) usado como controle. As barras representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão. Os asteriscos (*) denotam diferença significativa em relação controle segundo o teste Dunnett ($P < 0,05$).

3.4. A Atividade da H⁺-PPase de tonoplasto em plantas WT e *Nr* é alterada por diferentes de concentrações de AH

A Figura 4 apresenta a atividade hidrolítica de PPI da H⁺-PPase de tonoplasto em relação a diferentes doses de AH (0, 5, 20 e 50 mg C L⁻¹). O aumento na atividade em relação ao controle nas plantas WT foi de 260, 100 e 390 % nas concentrações de 0, 5, 20 e 50 mg C L⁻¹ de AH respectivamente.

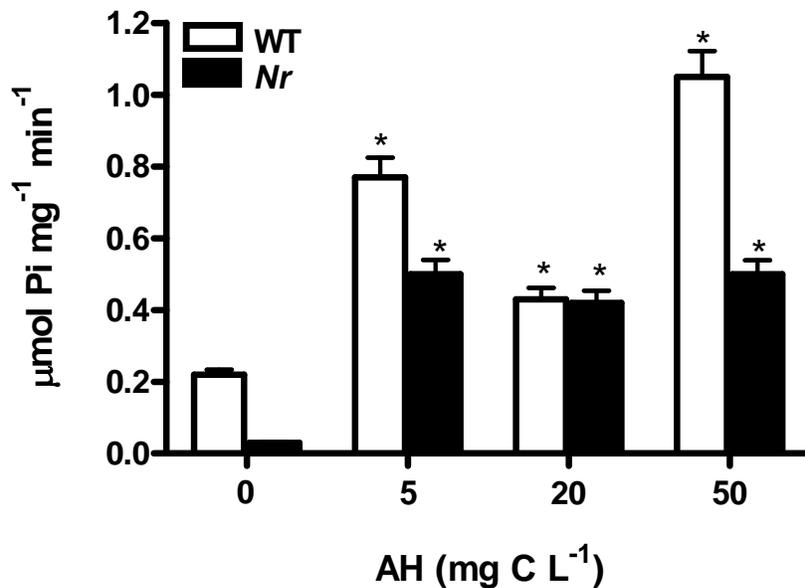


Figura 4. Atividade hidrolítica de PPI da H⁺-PPase dependente de K⁺ de tonoplasto isoladas de vesículas de raízes em relação a diferentes doses de auxina (ácido-3-indol acético, AIA) em dois genótipos de tomateiro: *Never ripe* (*Nr*) e seu parental (*wt*) usado como controle. As barras representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão. Os asteriscos (*) denotam diferença significativa em relação controle segundo o teste Dunnett ($P < 0,05$).

3.5. A aplicação de AIA, SNP, AH e de inibidores da ação da auxina e ON altera o desenvolvimento radicular de plantas do tomateiro WT e *Nr*

O comprimento do eixo principal (CEP) da raiz, o número de raízes laterais (RL) e os primórdios formadores de RLs foram avaliados nas plantas de tomateiro mutante defectivo na percepção de etileno (*Nr*) e no seu parental genético sem mutação utilizado como controle (WT) (Figuras 5 e 6). O CEP da raiz das plantas WT foram estimuladas em 20 % e 35 % por AIA e AH, respectivamente (Figura 5). O efeito estimulatório do AIA não foi reduzido por PCIB (AIA+PCIB), mas a aplicação em conjunto ao PTIO (AIA+PTIO) inibiu em 20 % o CEP. O estímulo provocado pelo AH também foi reduzido pela aplicação de PTIO. O doador de ON (SNP) não alterou significativamente o CEP da raiz, mas em conjunto ao PCIB ou PTIO estimulou em cerca de 20 % essa característica.

O número de RLs foi alterado tanto por PCIB quanto por PTIO resultando numa inibição de pelo menos 40% nas plantas WT (Figura 5). A suplementação de AIA na presença de PCIB ou PTIO manteve o número de RLs igual ao controle. Na presença de AIA, SNP ou AH houve um aumento de cerca de 100, 40 ou 100 % no número de RLs, respectivamente. O efeito do SNP foi reduzido em 50% pelo PTIO, enquanto que o efeito do AH foi reduzido em mais de 80% por PTIO. O número de primórdios precursores de RLs foi aumentado em torno de 40% por AIA, SNP ou AH em plantas WT. Embora a aplicação de PCIB ou PTIO isoladamente tenha inibido a iniciação das RLs, na presença de AIA (AIA+PCIB e AIA+PTIO) ou SNP (SNP+PCIB e SNP+PTIO) a iniciação de raízes permaneceu no nível do controle (Figura 5). A aplicação conjunta de AH+PTIO também não alterou a iniciação de RLs em plantas WT.

No mutante na percepção de etileno (*Nr*) não houve estímulo do CEP da raiz por nenhum tratamento (Figura 6). A aplicação de PTIO mesmo na presença de AIA, SNP ou AH resultou em inibição do CEP da raiz de pelo menos 25%. O uso de PCIB reduziu em 10% o CEP da raiz e somente a presença de AIA foi capaz de reverter a inibição causada por PCIB.

A aplicação de AIA, SNP ou AH gerou um estímulo sobre as RLs das plantas *Nr* de cerca de 110, 30 e 170%, respectivamente (Figura 6). Na presença de PCIB ou PTIO as plantas *Nr* produziram cerca de 60 ou 20% menos RLs,

respectivamente. Devido à presença de PTIO, houve uma redução de 60 e 75% no estímulo observado para os tratamentos SNP e AH, respectivamente. O PCIB foi capaz de reduzir o efeito do SNP ao nível do controle, mas na presença de auxina o número de RLs permaneceu maior do que o controle. O número de primórdios precursores de RLs foi aumentado em torno de 50% por SNP e 65% por AH nas plantas *Nr* (Figura 6). O PCIB reduziu em 50% a formação dos primórdios de RLs no mutante *Nr*.

O CEP das raízes das plantas *Nr* foi maior do que a das plantas WT em todas as condições testadas, com exceção do tratamento SNP+PTIO. O CEP das raízes das plantas controle ou tratadas com PCIB, PTIO, AIA, AIA+PCIB, AIA+PTIO, SNP, SNP+PCIB, SNP+PTIO, AH e AH+PTIO foram 80, 60, 50, 40, 40, 30, 70, 20, 20 e 40% maiores no genótipo *Nr*. As plantas *Nr* apresentaram 20% mais RLs do que as plantas WT. Na presença de AIA ou SNP essa diferença manteve-se. O número de RLs foi maior em 20, 80, 130 e 30% no genótipo *Nr* nos tratamentos controle, PTIO, AIA+PCIB e AH. Nos tratamentos AIA+PTIO, SNP+PTIO e AH+PTIO, o número de RLs foi 20, 30 e 40% menor no genótipo *Nr*. Os primórdios formadores de RLs também foram afetados pelos genótipos, com exceção dos tratamentos AIA+PCIB e SNP+PCIB. Os tratamentos PCIB e AIA reduziram a formação de primórdios de RLs em 20% no genótipo *Nr* em relação ao WT. Nos tratamentos controle, SNP e AH houve um aumento de 20, 30 e 40%, respectivamente, na formação de primórdios na plantas *Nr* em relação a WT. Mesmo na presença de PTIO, a formação destes primórdios foi pelo menos 40% maior nas plantas *Nr*.

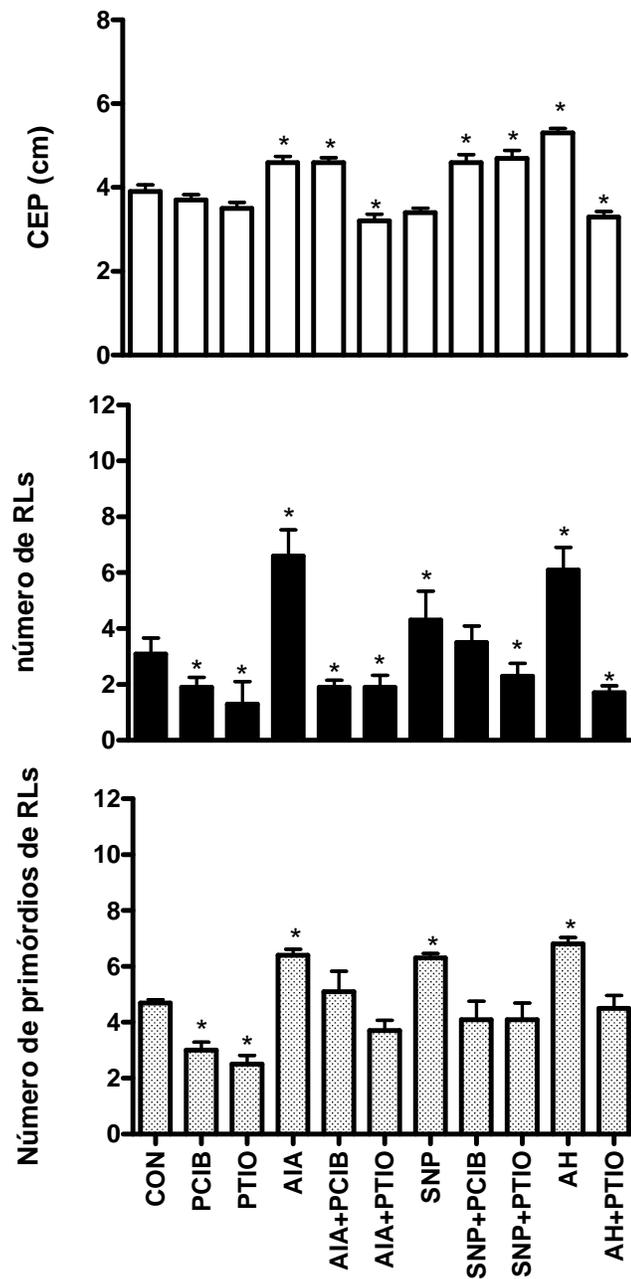


Figura 5. Comprimento do eixo principal (CEP) de raízes, número de raízes laterais (RLs) e número de primórdios formadores de RLs de plantas de tomateiro WT. As plântulas foram tratadas por 5 dias a 25 °C. As barras representam a média \pm desvio padrão de experimento representativo ($n=30$). Os asteriscos (*) denotam diferença significativa em relação controle segundo o teste Dunnett ($P<0,05$).

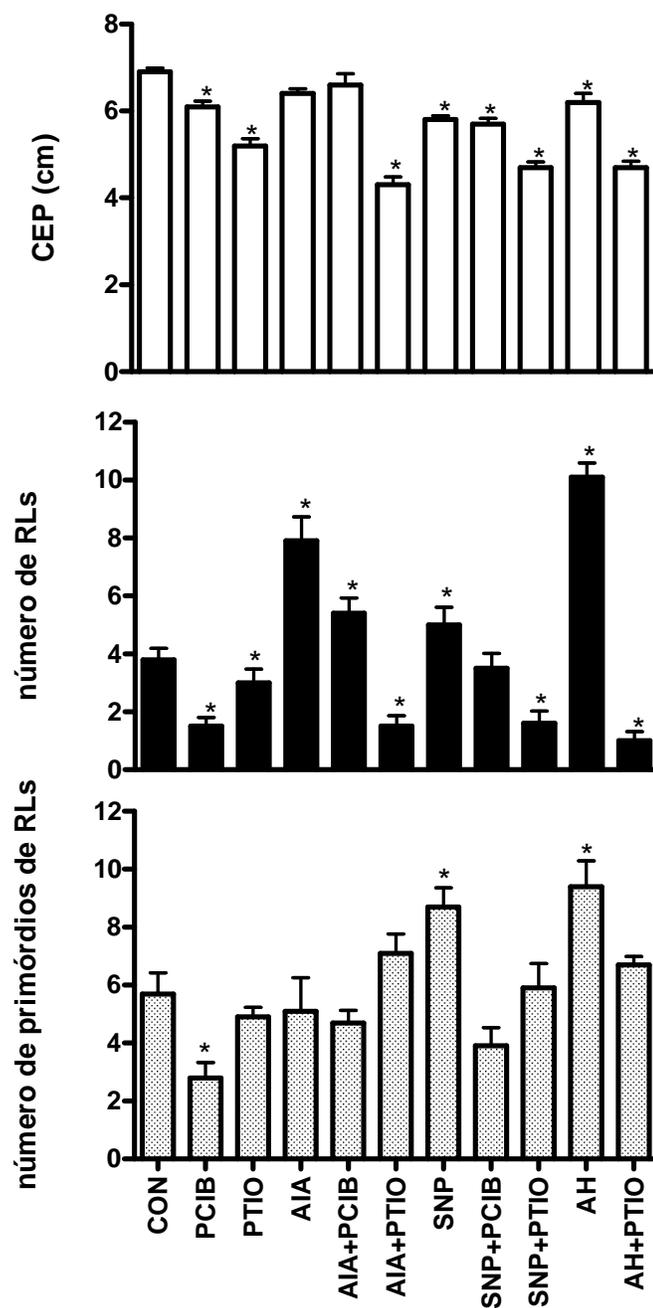


Figura 6. Comprimento do eixo principal (CEP) de raízes, número de raízes laterais (RLs) e número de primórdios formadores de RLs de plantas de tomateiro *Nr*. As plântulas foram tratadas por 5 dias a 25 °C. As barras representam a média \pm desvio padrão de experimento representativo ($n=30$). Os asteriscos (*) denotam diferença significativa em relação controle segundo o teste Dunnett ($P<0,05$).

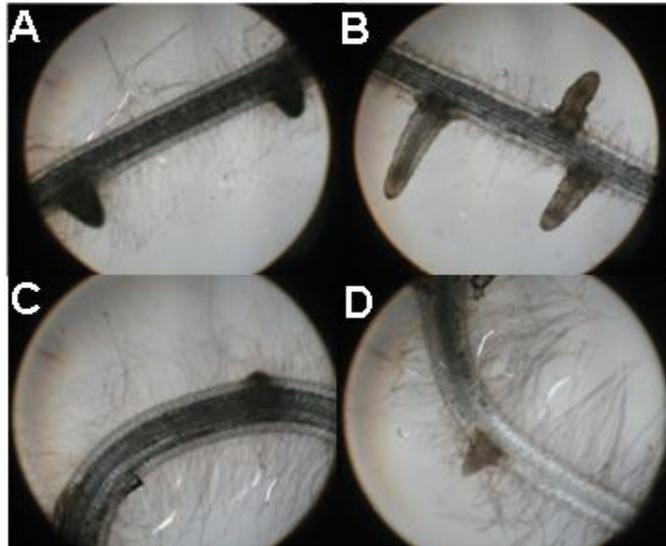


Figura 7. Iniciação de raízes laterais (RLs). As plântulas de tomateiro WT foram tratadas por 5 dias a 25 °C na presença ou não (A) de AH (B), PTIO (C) e AH+PTIO (D) e visualizadas no microscópio. Aumento de 10X.

3.6. A atividade da H⁺-ATPase de MP e nível de transcritos do gene *LHA4* em plantas WT são induzidas por SNP

No presente trabalho foi avaliada a abundância relativa do RNAm do gene *LHA4* de tomate (H⁺-ATPase de membrana plasmática isoforma 4) (quadro 2). A expressão relativa baseou-se na relação de expressão entre o gene alvo (*LHA4*) e o gene de referência tubulina (*TUB*) conforme equação apresentada em Material e Métodos. Essa abordagem é adequada para maior parte das finalidades de investigação de mudanças fisiológicas prováveis no nível de expressão gênica (Pfaffl et al., 2002) via RT-qPCR. Deve-se ressaltar, entretanto, que a utilização de mais de um gene de referência seria uma abordagem mais segura.

O tratamento com SNP elevou em 3 vezes a atividade da H⁺-ATPase de MP e em 4 vezes o nível de transcritos para o gene *LHA4*, o qual codifica para a isoforma 4 da H⁺-ATPase de MP em tomate.

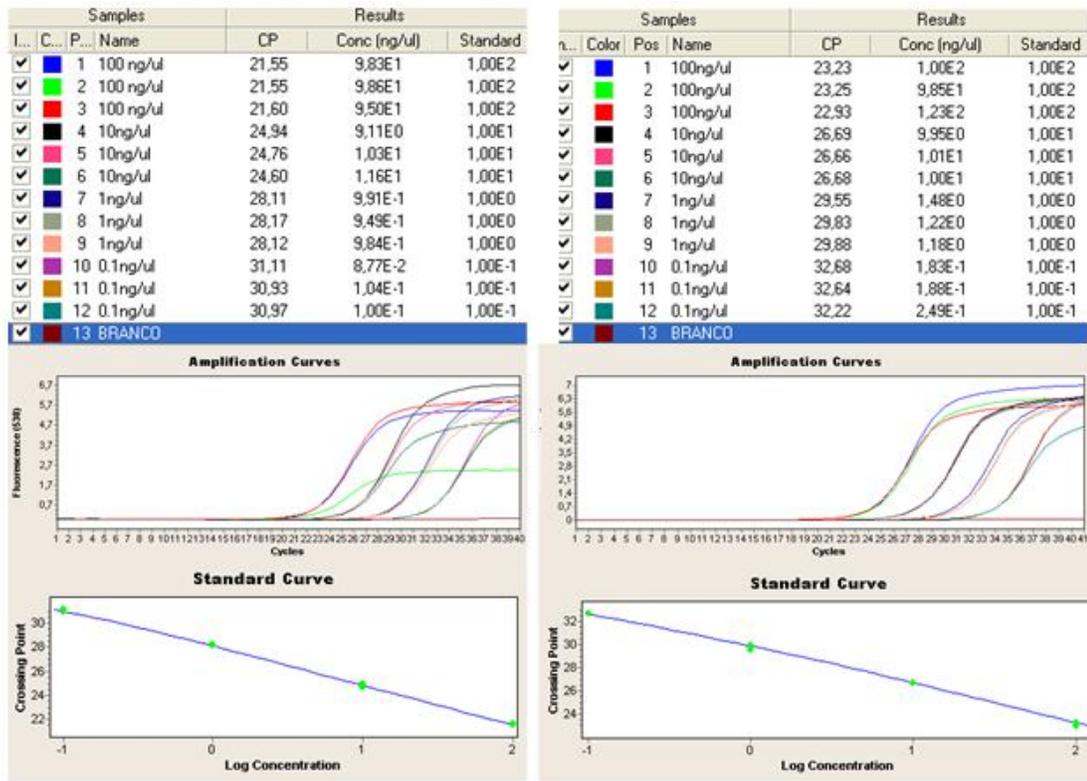


Figura 8. Curva padrão de cDNA para o gene referência tubulina (*TUB*) e para o gene alvo da H^+ -ATPase de MP (isoforma *LHA4*). O erro foi de 0,004 e a eficiência curva padrão foi de 2,01 no caso de *TUB*. O erro foi de 0,003 e a eficiência da curva padrão foi de 1,95 no caso de *LHA4*.

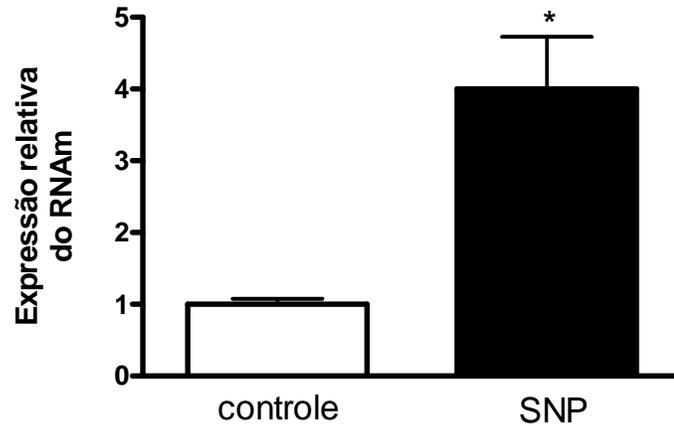


Figura 9. Expressão relativa de RNAm em plantas WT via RT-qPCR. As plantas foram expostas aos tratamentos controle e 200 μ M de SNP por 24h. A razão de expressão foi calculada com base no nível de expressão do gene alvo da H^+ -ATPase de MP estudado (isoforma *LHA4*). Os níveis de RNAm foram normalizados em relação ao gene controle (Tubulina). Para os experimentos de expressão de RNAm o erro foi calculado pelo programa REST® e o asterisco (*) denota diferença significativa.

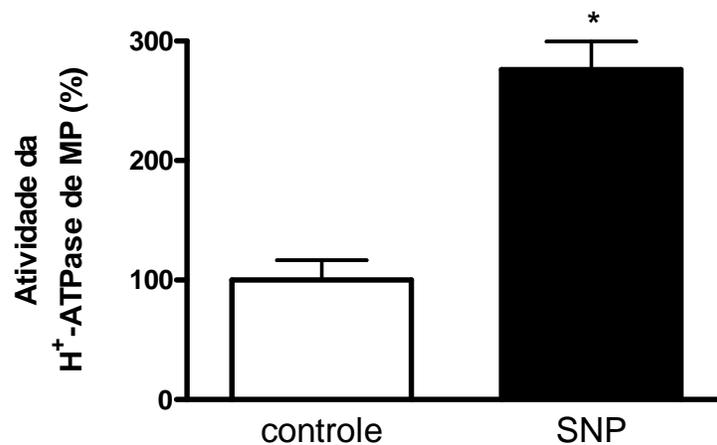


Figura 10. Atividade da H^+ -ATPase de MP. As plantas foram expostas aos tratamentos controle e 200 μ M de SNP por 24h. O asterisco (*) denota diferença significativa entre as médias pelo teste t (* $P < 0,01$).

4. DISCUSSÃO

A auxina e o etileno participam no controle do desenvolvimento das raízes interagindo numa seqüência de eventos não esclarecida totalmente (Ivanchenko et al., 2008). No presente trabalho foi possível observar que as plantas WT e *Nr* responderam de formas distintas aos tratamentos com AIA ou AH no que tange a atividade das bombas de H⁺ (Figuras 1 e 2). A atividade da H⁺-ATPase de MP nas plantas *Nr* apresentou-se mais responsiva as doses de auxina quando comparadas às plantas WT (Figura 1). O etileno regula positivamente a biossíntese de auxina inibindo a expansão de células de raiz (Swarup et al., 2007). A atividade da H⁺-ATPase de MP é classicamente relacionada à expansão celular induzida por auxina (Hager, 2003) e foi sugerida como importante na produção de etileno em tomateiro (Kelly e Bradford, 1990). A percepção reduzida deste gás pela planta *Nr* tornou possível que doses maiores de AIA estimulassem a H⁺-ATPase da MP diferente do observado para as plantas WT.

O mecanismo de ação dos AH opera em parte pela via de sinalização de auxina (Dobbss et al., 2007; Trevisan et al., 2009). No presente trabalho observou-se que enquanto a menor concentração de AH não alterou a ativação da ATPase nas plantas WT, a mesma concentração estimulou significativamente a enzima no mutante *Nr* (Figura 2). Por outro lado, a maior dose de AH não alterou a atividade no mutante *Nr* e aumentou em pelo menos duas vezes a atividade em plantas WT. É possível sugerir que os AHs não fornecem somente AIA (Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Trevisan et al., 2009) para as plantas, mas também alguma(s) molécula(s) que depende(m) da percepção do etileno.

A atividade controle da H⁺-ATPase de MP em raízes de plantas WT é bem superior ao encontrado em plantas *Nr*. A mutação que reduz a percepção de etileno afeta a atividade da ATPase sugerindo que o sistema de percepção de etileno está relacionado com a atividade desta enzima. Entretanto, a atividade da H⁺-ATPase de MP das plantas *Nr* retorna a níveis comparáveis ao WT com a aplicação exógena de auxina. O AIA e a fusicoccina, micotoxina reconhecida por ativar a H⁺-ATPase de MP, estimulam a expansão de hipocótilo em tomateiro e a produção de etileno pelo aumento de seu precursor ACC (Kelly e Bradford, 1990). Os efeitos produzidos pelo AIA e pela fusicoccina foram inibidos por vanadato (inibidor da H⁺-ATPase de MP) sem afetar a concentração de ACC. A estimulação da H⁺-ATPase de MP não seria

necessária para a indução da ACC sintase por AIA e fusicoccina. Entretanto, a produção de etileno foi dependente da atividade da H⁺-ATPase de MP a qual deve participar de algum passo regulatório da produção de etileno ainda não esclarecido. O último passo da síntese de etileno é a conversão de ACC para etileno, etapa dependente da atividade da enzima ACC oxidase (Kende, 1993). Mizutani et al. (1995) verificaram que o CO₂ estimula a atividade da ACC oxidase tanto diretamente, como reduzindo o pH, o qual em contrapartida estimula a atividade da enzima. A H⁺-ATPase poderia atuar como uma enzima amplificadora dos sinais gasosos da planta, como sugerido para o ON (capítulo 1). No caso das plantas *Nr*, a mutação do receptor poderia impedir que ocorresse esta suposta ação amplificadora, evitando a cascata de eventos ativação da ATPase → alteração do pH → ativação da ACC oxidase → produção de etileno.

A percepção do etileno pelos receptores depende da presença de íons Cu²⁺ (Rodriguez *et al.*, 1999). Foi sugerido que a proteína RAN1 (uma provável de ATPase do tipo P transportadora de Cu²⁺) poderia estar envolvida na sensibilidade ao etileno (Woeste e Kieber, 2000). Por outro lado, o transportador de Cu²⁺ de MP (COPT1) expresso naturalmente na região de emissão de RLs, não teria influência sobre a resposta vegetal ao etileno (Sancenón *et al.*, 2004). No caso da emissão de RLs, a regulação da homeostase de Cu²⁺ seria fundamental, embora independente da sensibilidade ao etileno. É possível sugerir que a H⁺-ATPase de MP tenha um papel importante na homeostase de Cu²⁺ durante a emissão de RLs em plantas WT e *Nr*.

A regulação do nível de transcritos para a ACC oxidase é bastante complexa e seu estímulo ou inibição envolve a interação entre auxina e etileno (Chae et al., 2000). Segundo estes autores, a inibição da atividade de proteínas fosfatases suprimiu o aumento do nível de transcritos da isoforma OS-ACO2 da ACC oxidase induzida por auxina, sugerindo que a defosforilação da enzima é importante neste processo. A recuperação da atividade controle da H⁺-ATPase no mutante *Nr* pela aplicação exógena de auxina poderia ter relação com a atividade da ACC oxidase induzida por auxina.

É importante notar que a ativação da V-PPase aumentou de forma semelhante ao observado para a H⁺-ATPase de MP em resposta aos tratamentos (Figuras 1 e 3). O aumento da expressão da V-PPase em *Arabidopsis* (isoforma AVP1) também altera a quantidade e a atividade da ATPases de MP

correlacionando-se com a acidificação do apoplasto e com o aumentando da eficiência de transporte de AIA (Li et al., 2005). Na concentração de 10^{-8} mol L⁻¹ de AIA a atividade da H⁺-PPase em plantas WT e *Nr* foram aumentadas em relação ao controle e mantiveram-se em níveis quantitativos equivalentes. Entretanto, a magnitude de ativação das plantas *Nr* em relação ao controle sem AIA foi 10 vezes maior, enquanto as plantas WT tiveram um aumento de apenas uma vez. Isto poderia indicar que, na ausência da percepção de etileno, a H⁺-PPase seria recrutada, inclusive para a MP, para auxiliar mais efetivamente o transporte da auxina exógena. O mesmo poderia ocorrer para moléculas semelhantes ao AIA possivelmente liberadas da estrutura do AH (Canellas et al., 2002; Muscolo et al., 2007). A atividade controle desta enzima, semelhante a H⁺-ATPase, se apresentou inferior nas plantas *Nr*. Uma vez que as plantas *Nr* percebem menos o etileno do que as plantas WT, é provável que a biossíntese de auxina endógena nas raízes deste mutante seja menor e, portanto uma menor atividade controle das bombas de H⁺ seja observada. Além disso, pode haver uma regulação da atividade da enzima ACC oxidase devido a variação do pH celular, como sugerido para H⁺-ATPase de MP.

O estudo do papel do etileno na formação de RLs tem recebido relativamente pouca atenção da literatura. De fato, o primeiro relato da mudança da arquitetura ou morfologia radicular em plântulas de tomateiros *Nr* foi realizado (Negi et al., 2009) em paralelo a produção desta Tese. No presente trabalho demonstrou-se que o padrão de crescimento radicular pode ser afetado positivamente pela perda de sensibilidade ao etileno (Figura 6). As plantas *Nr* possuem relativamente maior CEP das raízes e maior número de RLs e de primórdios formadores de RLs (Figuras 5 e 6). Tais resultados foram confirmados por Negi et al. (2009), que relataram ainda que apesar do transporte basípeto e acrópeto de AIA ser reduzido no mutante *Nr*, o nível de AIA livre nas raízes é maior neste mutante. Diversos componentes relacionados ao transporte e sinalização da auxina também influenciam as respostas da planta ao etileno, indicando uma interação entre esses dois fitormônios (Stepanova et al., 2005). O nível de transcritos do fator de transcrição de resposta a etileno (ERF6) é aumentado em mais de 100 % em raízes de *Arabidopsis* tratadas com 10 μ M de AIA (Laskowski et al., 2006). Em doses altas (100 μ M), o precursor de etileno ACC ativa a biossíntese de auxina e facilita sua redistribuição nos tecidos inibindo a expansão na raiz (Swarup et al., 2007; Ruzicka et al., 2007). Por outro lado, o precursor de etileno é capaz de estimular o número de RLs e primórdios em

doses baixas (0,02 μ M) (Ivanchenko et al. 2008). Os resultados apresentados neste trabalho estão em consonância com os dados obtidos por Ivanchenko et al. (2008), uma vez que as plantas *Nr* são capazes de produzir maior iniciação e emissão de RLs em comparação às plantas WT como confirmado recentemente por Negi *et al.*, (2009). Estes autores concluíram que o etileno possui um efeito negativo sobre a emissão de RL de tomate. Entretanto, afirmar que “o efeito do etileno é negativo” não parece totalmente adequado, já que o efeito positivo de concentrações relativamente baixas de etileno sobre o desenvolvimento de RLs já foi demonstrado (Ivanchenko et al. 2008).

A aplicação exógena de AIA, SNP e AH é capaz de aumentar o número de raízes laterais (RLs) em plântulas de milho e ativar a H⁺-ATPase da MP (capítulo 1). No capítulo 1 foi descrito um mecanismo no qual os efeitos do AIA e do AH seriam dependentes da produção de ON relacionada com a acidificação durante a emissão das RLs. No presente estudo observou-se, além da ativação da atividade da H⁺-ATPase por SNP, um aumento no nível de transcritos da isoforma *LHA4* de tomate em raízes de plantas WT (Figuras 9 e 10). Esta isoforma possui elevada abundância de transcritos na raiz e no hipocótilo de tomateiro, tendo seu nível elevado em 3 vezes durante a expansão celular (Mito et al., 1996). Além disso, a região de similaridade entre a seqüência de *LHA4* e a de *PMA4* de *Nicotiana plumbaginifolia* possui 92% de identidade. Esta isoforma de tabaco é expressa fortemente no primórdio precursor da RL (Moriau et al., 1999). A aplicação de SNP induziu a proliferação de primórdios e aumentou o número de RLs (Figura 5). É possível sugerir que o ON está relacionado com a regulação da H⁺-ATPase tanto em nível de transcrição como de atividade e que tal regulação deve estar envolvida com a sinalização e/ou energização do desenvolvimento de RLs.

A aplicação de AIA, SNP ou AHs foi capaz de aumentar o número de RLs tanto nas plantas WT quanto nas plantas *Nr* (Figuras 5 e 6). Observou-se uma redução em relação ao controle quando o AIA exógeno foi aplicado em conjunto com o PCIB em plantas WT. Em doses baixas o etileno aumenta a biossíntese de auxina a qual promove a iniciação da RL por um mecanismo primário de resposta a auxina que envolve proteínas Aux/IAA e ARF (Ivanchenko et al. 2008). O PCIB é conhecido por inibir a via de sinalização de auxina pela regulação da estabilidade das proteínas Aux/IAA, resultando em menor iniciação de RLs (Oono et al. 2003). Realmente observou-se redução na iniciação e emissão das RLs na presença de PCIB tanto em

plantas WT quanto em plantas *Nr* (Figuras 5 e 6). O mesmo não ocorreu quando as plantas estavam na presença do doador de ON, o qual manteve o número de RLs semelhante ao controle. Embora tenha sido demonstrado que o SNP poderia estimular o desenvolvimento de RLs independentemente do transporte de AIA (Correa-Aragunde et al., 2004), não se conhecia os efeitos do ON em plantas tratadas com o inibidor PCIB. Foi demonstrado que o efeito estimulatório de AHs sobre as RLs é mais inibido por PTIO do que por PCIB (capítulo 1). De fato, a aplicação de PTIO pode anular o efeito estimulatório dos AHs sobre as RLs nos dois genótipos, sendo mais drástico nas plantas *Nr* (figuras 5 e 6). A atividade da V-PPase é fundamental para o desenvolvimento radicular como previamente demonstrado por Yang et al. (2007) e confirmado no capítulo 3 da presente Tese. Observou-se no presente capítulo que, para as plantas *Nr*, a ativação desta enzima é mais importante do que a ativação da H⁺-ATPase de MP para o desenvolvimento de RLs induzidas por AH.

Assim como o descrito para o gás ON, o gás etileno é capaz de influenciar iniciação de RLs a partir das células do periciclo (Ivanchenko et al., 2008). Segundo estes autores, o etileno também alterou a expansão das RLs e a frequência de iniciação de RLs, eventos anteriormente descritos em plântulas de milho tratadas com AHs (Canellas et al., 2002) e AIA (Zandonadi *et al.*, 2007; Trevisan et al., 2009). No presente estudo, a mutação em *Nr* resultou em plantas com maior número de sítios de iniciação e emissão de RLs. O etileno é capaz de estimular a via de sinalização de auxina, durante e a formação do primórdio no estágio I de emissão de RLs, como demonstrado pelo elemento de resposta *DR5::GUS* (Ivanchenko et al., 2008) de maneira consistente ao maior transporte de auxina demonstrado por Negi et al. (2008). Os AHs também podem alterar positivamente a expressão de *DR5::GUS*, de maneira associada a um aumento de eventos de iniciação de RLs no estágio I de formação do primórdio (Trevisan et al., 2009) como demonstrado para etileno previamente (Ivanchenko et al., 2008). A região de emissão de RLs estimuladas por AHs possui elevada produção de ON associada a uma ativação da H⁺-ATPase de MP (capítulo 1). Embora no presente estágio do estudo não tenha sido possível comparar a ativação das bombas entre os genótipos na presença de ON, observou-se que o mesmo pode ativar a atividade, o transporte de H⁺ e o nível de RNAm da H⁺-ATPase nas plantas WT (Figuras 9 e 10).

Apesar da caracterização das vias de sinalização do etileno e da auxina ter avançando enormemente nos últimos anos, a interação entre os dois hormônios ainda é motivo de controvérsia principalmente no que diz respeito a ordem dos mesmos numa possível seqüência de eventos durante o desenvolvimento de RLs. Os resultados obtidos no presente Capítulo sugerem que a interação entre os fitormônios auxina e etileno durante o desenvolvimento radicular envolve ainda a influência de outros sinais químicos, tais como o ON e o fluxo de H^+ . A interação destes fatores na relação auxina/etileno ainda não é clara, entretanto, é possível sugerir que a ação da auxina, do ON e dos AHs sobre o desenvolvimento de RLs não é prejudicada pela percepção ao etileno causada pela mutação no gene *Nr*.

Com base nos efeitos da mutação de *Nr*, é possível propor um modelo no qual a V-PPase pode assumir a modulação do processo de desenvolvimento radicular via sinalização exógena por AH ou AIA, enquanto a H^+ -ATPase de MP poderia participar sob a ação de AIA, mas não de AH. Todavia, precisa ser testada a possível localização da V-PPase na MP e como este fato poderia alterar o gradiente de H^+ .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blakely, L.M., Blakely, R.M., Colowit, P.M., Elliott, D.S. (1988) Experimental studies on lateral root formation in radish seedling roots II. Analysis of the dose-response to exogenous auxin. *Plant Physiol*, 87:414–419.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H^+ -ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130:1951-1957.

- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.*, 8:165–171.
- Chae, H.S., Cho, Y.G., Park, M.Y., Lee, M.C., Eun, M.Y., Kang, B.G., Kim, W.T. (2000) Hormonal cross-talk between auxin and ethylene differentially regulates the expression of two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, 41: 354-362.
- Clark, D.G., Gubrium, E.K., Barrett, J.E., Nell, T.A. and Klee, H.J. (1999) Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol.*, 121, 53–60.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C., Lamattina, L. (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J. Exp. Bot.*, 57: 581–588.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218:900-905.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corns roots. *Plant Physiol.*, 81:542-547.
- Dobbss, L.B., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Pino-Nunes, L.E., Rumjanek, V.M., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2007) Changes in root development of Arabidopsis promoted by organic matter from oxisols. *Annu. Appl. Biol.*, 151:199-211.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch.* 457:645–655.
- Elena, A., Diane, L., Eva, B., Marta, F., Roberto, B., Zamarreño, A.M., Garcia-Mina, J.M. (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 47 215–223.
- Façanha, A.R., de Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.*, 116:1487–1495.
- Fiske, C.F., Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375.

- Frías, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culiánez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8:1533-1544.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett.*, 581:2204-2214.
- Guzmán, P., Ecker, J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2: 513–523.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 116:483-505.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185:527–537.
- Ivanchenko, M.G., Coffeen, W.C., Lomax, T.L., Dubrovsky, J.G. (2006) Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J.*, 46:436–447.
- Ivanchenko, M.G., Muday, G.K., Dubrovsky, J.G. (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 55:335–347.
- Kelly, M.O., Bradford, K.J. (1990) Ethylene synthesis and growth of tomato hypocotyls: Induction by auxin and fusicoccin and inhibition by vanadate. *Journal of Plant Growth Reg.*, 9:43-49.
- Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:283–307.
- Lanahan, M.B. et al. (1994) The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, 6, 521–530
- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., Sussex, I.M. (1995) Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121:3303–3310.
- Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E. L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. *Science*, 310:121-125.
- Lucena, C., Waters, B.M., Romera, F.J., Garcia, M.J., Morales, M., Alcantara, E., Perez-Vicente R. (2006) Ethylene could influence ferric reductase, iron

- transporter, and H⁺-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. *J. Exp. Bot.*, 57: 4145–4154
- Malamy, J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.*, 28:67–77.
- Mizutani, F., Dong, J.G., Yang, S.F. (1995) Effect of pH on CO₂-activated 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity from apple fruit. *Phytochemistry*, 39:751-755.
- Moriau, L., Michelet, B., Bogaerts, P., Lambert, L., Michel, A., Oufattole, M., Boutry, M. (1999) Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.*, 19: 31-4.
- Muscolo, A., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2007) The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. *J. Chem. Ecol.*, 33:115–129.
- Negi, S., Ivanchenko, M.G., Muday, G.K. (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 55:175–187.
- Oono, Y., Chiharu, O., Rahman A., Asppuria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A., Uchimiya, H. (2003) p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiol.*, 134:1135-1147.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.*, 129:954–956.
- Palmgren, M.G., (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 817-845.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR, *Nucleic Acids Res.*, 30:1-10.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J., and Voesenek, L.A. (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.*, 11: 176–183.
- Pinton, R., Cesco, S., Lacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. (1999) Modulation of NO³⁻ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Soil*, 215:155-161.
- Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and

- expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*,55:803-813.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.
- Rodríguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E. and Bleecker, A.B. (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*, 283:996-998.
- Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J. and Benková, E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*, 19, 2197-2212.
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D.J. and Peñarrubia, L. (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J. Biol. Chem.*, 279:15348-15355.
- Smalle, J., Haegman M., Kurepa J., Van Montagu M., Van Der Straeten D. (1997). Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 2756-2761.
- Stepanova, A.N., Hoyt, J.M., Hamilton, A.A., Alonso, J.M. (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17:2230-2242.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., Alonso, J.M. (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 19:2169-2185.
- Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T., and Bennett, M.J. (2002). Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Mol. Biol.*, 49:411-426.
- Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der Straeten, D., Beemster, G.T., Sandberg, G., Bhalerao, R., Ljung, K. and Bennett, M.J. (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell*, 19:2186–2196.
- Tanimoto, M., Roberts, K., and Dolan, L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 8:943–948.
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti S., Nardi S. (2009) Humic substances induce lateral root formation

- and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. *Plant Biol.*, 1-12.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J., Klee, H.J. (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science*, 270:1807–1809.
- Woeste, K.E., Kieber, J.J. (2000) A strong loss-of function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell*, 12, 443–455.
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L., Murphy, A., Gaxiola, R. (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnol. J.*, 5:735–745.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.
- Zhang, F., Wang, Y., Yang, Y., Di, Wang. H, Liu, J. (2007). Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. *Plant Cell Environ.*, 30:775-785.
- Zhao, L.Q., Zhang, F., Guo, J.K., Yang, Y.L., Li, B.B., Zhang, L.X. (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol.*, 134:849-857.
- Zhong, S., Lin, Z., Grierson, D. (2008) Tomato ethylene receptor–CTR interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.*, 59:965–972.

CAPÍTULO 3

MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺ POR ÁCIDOS HÚMICOS E AUXINA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS COM SUPER-EXPRESSÃO DA H⁺-PIROFOSFATASE (AVP1)

RESUMO

As bombas de H⁺ são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e a super-expressão da H⁺-PPase vacuolar (AVP1) aumenta drasticamente o volume das raízes. Os ácidos húmicos (AHs) também são capazes de estimular o crescimento radicular por meio da ativação das bombas de H⁺. O objetivo deste capítulo é apresentar o estudo da ativação das bombas de H⁺ em plantas transgênicas que super expressam o gene AVP1, e o reflexo desta transformação no desenvolvimento radicular e na produção de óxido nítrico (ON). Foram avaliadas as respostas bioquímicas e morfológicas de plantas de arroz transgênicas à auxina, AHs e ON. As plantas AVP1 possuem maior desenvolvimento de RLs, atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática e da H⁺-PPase e maior produção de ON nas

raízes do que as plantas controle (WT). Plantas AVP1 tratadas com inibidores da produção enzimática de ON sustentam a produção deste gás em níveis maiores do que as plantas WT, possivelmente por um mecanismo de produção apoplástica dependente de pH ácido. É possível sugerir que o aumento do desenvolvimento radicular das plantas AVP1 está relacionado à maior produção de ON. Parece existir uma seqüência de eventos desencadeados pela ativação da H⁺-PPase que culmina no desenvolvimento radicular. Os AHs poderiam atuar mantendo a sincronia de ativação das bombas de prótons para o crescimento de raízes utilizando a modificação de pH e o ON como sinais. Tanto a utilização de plantas AVP1, como a aplicação de AHs são poderosas ferramentas biotecnológicas que podem ser aproveitadas como alternativas para o cultivo em solos de baixa fertilidade.

1. INTRODUÇÃO

As plantas reagem às constantes mudanças do ambiente e ao mesmo tempo mantêm condições metabólicas adequadas ao seu desenvolvimento, regulando com precisão a expressão, a atividade e a interação entre as bombas de H⁺ (Gaxiola et al., 2007a). Essas enzimas são os sistemas primários geradores do gradiente eletroquímico de H⁺ através das membranas, sustentando o transporte de íons e moléculas e controlando o pH vacuolar, citosólico e apoplástico (Felle, 2001). Na membrana plasmática (MP) localizam-se H⁺-ATPases do tipo P, as quais acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de H⁺ para fora da célula (do citoplasma para o apoplasto), tendo seu papel fisiológico associado à nutrição e expansão celular (Revisado por Duby e Boutry, 2009). As H⁺-ATPases de MP são monômeros de aproximadamente 100 kDa que podem ainda assumir uma conformação di ou hexamérica (Kanczewska et al., 2005). No vacúolo se encontram duas bombas de H⁺: uma H⁺-ATPase do tipo V e uma H⁺-PPase (Rea e Sanders, 1987; Maeshima, 2000). As V-ATPases são enzimas heteromultiméricas constituídas de um complexo periférico catalítico (V₁) e de um complexo integral transmembrana responsável pela translocação de íons (V₀) (Sze et al., 1992; Huss et al., 2002). As H⁺-PPases são polipeptídeos de aproximadamente 80 kDa que, diferente das ATPases, utilizam

pirofosfato inorgânico (PPI) como substrato para transportar H⁺ para o interior do vacúolo (Maeshima, 2000).

A manipulação da expressão dessas bombas de H⁺ tem proporcionado dados experimentais inequívocos sobre a relevância destes sistemas para a homeostase celular e mecanismos de resistência a estresses. A super-expressão da H⁺-ATPase de MP (isoforma 4 de tabaco, *PMA4*), ativada constitutivamente pela deleção de seu domínio auto-inibitório, resultou em plantas com maior capacidade de acidificar a rizosfera e resistir à salinidade (Gévaudant et al., 2007). A redução da expressão da subunidade C (domínio V₁) da V-ATPase no mutante *det3* de *Arabidopsis* resultou em plantas anãs com expansão celular reduzida (Schumacher et al., 1999). A super-expressão das subunidades c1 e c3 do setor transmembrana (V₀) também foi evidenciada como fundamental para a expansão celular em raízes e tolerância moderada ao estresse salino (Padmanaban et al., 2004).

Plantas transgênicas com a expressão aumentada da H⁺-PPase vacuolar ou de tonoplasto (gene *AVP1*, *Arabidopsis* Vacuolar H⁺-Pirofosfatase) possuem elevada resistência ao estresse salino e hídrico (Gaxiola et al., 2001). Recentemente, foi observado que a super-expressão de *AVP1* em alfafa também aumenta a tolerância de plantas de alfafa a salinidade e a seca (Bao et al., 2009). Em conformidade ao observado por estes autores, a super-expressão do gene *TsVP*, que codifica a H⁺-PPase de *Thellungiella halophila*, planta extremamente tolerante a frio, seca e salinidade, aumentou a resistência de algodoeiro a seca (Lv et al., 2009).

Diferentemente das plantas transformadas com genes das H⁺-ATPases de MP (Gévaudant et al., 2007) e de vacúolo (tipo V) (Schumacher et al., 1999), foi possível observar para as plantas transformadas com o gene *AVP1* um aumento significativo da biomassa radicular (Gaxiola et al., 2001; Li et al., 2005; Yang et al., 2007). Estas plantas também apresentaram maior capacidade de transporte de auxina, aumento no número de raízes laterais (RLs) e maior capacidade de extrusão de H⁺ (Li et al., 2005). Interessante observar que, apesar da expressão ser direcionada especificamente a H⁺-PPase, as plantas *AVP1* também apresentaram maior atividade e expressão da H⁺-ATPase de MP, resultando no decréscimo do pH apoplástico (Li et al., 2005). Foi demonstrado que a super-expressão de *AVP1* em plantas de *Arabidopsis*, tomateiro e arroz favoreceu o crescimento em condições de deficiência de PO₄ (Yang et al., 2007). As plantas transgênicas foram capazes de acumular mais K⁺ e exsudar maiores quantidades de ácidos orgânicos. É evidente a

aplicabilidade da tecnologia da super-expressão do gene AVP1 em diferentes culturas de importância agrícola, melhorando a produtividade em solos ácidos e deficientes em PO₄, reduzindo o uso de fertilizantes não renováveis e a poluição das águas devido ao excesso de aplicação destes fertilizantes (Yang et al., 2007).

O ácido-3-indol acético (AIA) é a auxina mais encontrada na natureza, sendo reconhecida como uma das principais substâncias reguladoras do crescimento vegetal, essencial para o desenvolvimento e crescimento das plantas, assim como para respostas a fatores ambientais (Malamy, 2005). A emissão de novas RLs é um fator de alta relevância para a eficiência da colonização de determinado solo ou ambiente pela planta (Malamy e Benfey, 1997). Mais de cinquenta moléculas já foram descritas possuírem atividade auxínica (Tomic et al., 1998; Bertosa, 2003 e referências citadas), e uma das principais características de uma auxina reside na capacidade de gerar um sinal chave inicial para o desenvolvimento de raízes laterais (RLs) (Casimiro et al., 2003) sendo o número de RLs fortemente influenciado pelo gás óxido nítrico (ON), o qual tem sua síntese ativada nos primórdios precursores das RLs (Correa-Aragunde et al., 2004; Kolbert et al., 2008). O aumento na formação das RLs induzido por auxina é também dependente do ON, estando este, possivelmente posicionado no final da via de sinalização desencadeada pela auxina (Correa-Aragunde et al., 2004). A relação entre a atividade das bombas de H⁺ e o desenvolvimento de RLs estimulada por ON ainda é pouco estudada.

Existem substâncias naturalmente presentes na matéria orgânica do solo capazes de alterar fortemente o padrão de iniciação de RLs (Canellas et al., 2002). Conhecidas como substâncias húmicas (SH), essa fração da matéria orgânica é capaz de ativar enzimas (bombas de H⁺) responsáveis pela energização de transportadores de nutrientes e pela expansão celular (Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Zandonadi et al., 2007; Elena et al., 2009). Os ácidos húmicos (AH), fração relativamente estável das SH, aumentam a atividade e a expressão da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) (Canellas et al., 2002; Elena et al., 2009), bem como a atividade da H⁺-PPase do vacúolo (Zandonadi et al., 2007). Essa enzima parece ser especialmente sensível aos AHs e a uma ampla faixa de concentração de auxina.

No Capítulo I da presente Tese, descreve-se um mecanismo de ação para AH pelo qual estes agregados supramoleculares estimulam a proliferação de RLs por um processo regulatório semelhante ao da auxina, envolvendo um estímulo na

produção de ON e da H⁺-ATPase de MP (capítulo 1). Neste capítulo, foi estudada a ativação das bombas de H⁺ em plantas transgênicas que super expressam o gene AVP1, e o reflexo desta transformação no desenvolvimento radicular e na produção de ON. Visando confirmar e expandir o mecanismo de crescimento ácido induzido por SH e auxinas, foram avaliadas também suas respostas bioquímicas e morfológicas à auxina, AHs e ON.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração de ácidos húmicos

Os ácidos húmicos (AH) de vermicomposto foram isolados de acordo com o procedimento preconizado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (Schnitzer e Skinner, 1982). Resumidamente, foi utilizado NaOH 0,5 mol L⁻¹ como solvente na razão vermicomposto:solvente de 1:10 (m:v) em atmosfera inerte de N₂. A separação dos AH foi realizada com o abaixamento do pH da solução até 1-1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. A redissolução e precipitação foi repetida três vezes. Em seguida, adicionou-se 200 mL de solução aquosa diluída de HF e HCl [5 mL HCl (12 mol L⁻¹) + 5 mL HF (48%) L⁻¹]. Após uma centrifugação (5000 g) por 15 minutos, os AH foram lavados seguidamente com água até teste negativo com AgNO₃. Foi realizada a diálise contra água desionizada usando uma membrana 12-14 KDa (Thomas Scientific Inc.). As amostras dializadas foram liofilizadas e caracterizadas quimicamente.

2.2. Material vegetal

Foram analisadas duas linhas transgênicas de plantas de arroz (*Oryza sativa* var. *japonica* 'Taipei 309'), AVP1-7 e AVP1-10. Cada uma das linhas contém cópias extras do gene 35S-AVP1 inserido numa posição única do cromossomo. O nível de expressão da proteína AVP1 nas membranas isoladas raiz de arroz revelou que as plantas transgênicas expressam maiores quantidades da proteína AVP1 quando

comparadas às plantas controle (WT). As plantas AVP1-7 possuem maior quantidade de proteínas expressas quando comparada as plantas AVP1-10 (comunicação pessoal, Dr. Roberto Gaxiola, *Arizona State University*).

Duas linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (AVP1-1 e AVP-2) também foram utilizadas no presente capítulo. As plantas AVP1-2 possuem maior quantidade de proteínas expressas quando comparada as plantas AVP1-1 (comunicação pessoal, Dr. Roberto Gaxiola, *Arizona State University*).

2.3. Tratamentos das plantas

A caracterização do efeito de 20 mg C L⁻¹ de AHs isolados de vermicomposto e de 10⁻⁹ mol L⁻¹ de AIA sobre a medida do CEP principal da raiz e do número de RLs das plantas WT e AVP foi realizada em plântulas de arroz (*Oryza sativa* var. *japonica* 'Taipei 309'), WT, AVP1-7 e AVP1-10 com radículas medindo cerca de 1 cm. As plântulas foram selecionadas e mantidas por 2 dias sobre papel de filtro umedecido com 10 ml de cada tratamento em caixas de germinação (tipo "Gerbox") em câmara (tipo "BOD") a 25 °C e fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro.

Foi avaliado posteriormente a capacidade de produção de ON na presença ou ausência de 200 µmol L⁻¹ dos inibidores da ON sintase (L-NAME) e nitrato redutase (Na₂WO₄) em arroz. Raízes intactas de plântulas de *Arabidopsis thaliana* AVP1-1 e AVP-2 foram caracterizadas apenas quanto à produção de ON em condição controle (sem tratamentos).

2.4. Análises estatísticas

Para a avaliação do efeito dos tratamentos em relação ao controle os dados foram submetidos à análise de variância e foram comparados com auxílio do teste Dunnett de comparação múltipla de médias ($P < 0,05$) em cada separadamente (transgênico ou controle WT). Para a avaliação da diferença entre as plantas WT e AVP1, os dados foram submetidos à análise de variância e os contrastes comparados pelo teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

2.5. Número de raízes laterais (RLs) e comprimento do eixo principal (CEP)

As raízes de plântulas tomateiro foram coletadas, escaneadas e analisadas individualmente ($n=15$) com auxílio do programa de análises de imagens ImageJ (Rasband, 2009). Foram contados o número de RLs e medidos o comprimento do eixo principal (CEP) da raiz.

2.6. Isolamento da fração microssomal

As vesículas de tonoplasto e de MP foram isoladas de raízes das plantas tratadas utilizando a centrifugação diferencial como descrito por De Michelis e Spanswich (1986), com algumas modificações (Façanha e de Meis, 1995). Resumidamente, 10 g (massa fresca) de raízes foram homogeneizadas usando grau e pistilo em 20 mL de meio de extração gelado contendo 250mM de sacarose, 10 % de glicerol (m:v), 0,5 % de PVP-40 (polivinilpirrolidona-40 KDa), 2 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 0,2 % de BSA (Albumina Sérica Bovina) (m:v) e 0,1 M de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano] -HCl, pH 8,0. As soluções estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso foram adicionados 150 mM de KCl, 2 mM de DTT (ditiotreitól) e 1 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil). A manipulação das raízes até a obtenção do homogenato, bem como as centrifugações, tiveram a temperatura controlada a fim de que não excedesse 4°C. Além disso, o pH do tampão de extração também foi monitorado durante o procedimento, mantendo-se na faixa de 7,5-8,0. Após a maceração, o homogenato resultante foi filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido à centrifugação numa centrífuga Himac CP (HITACHI) a 1500xg durante 15 minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10000xg por 15 minutos numa ultracentrífuga Himac CP 85b (HITACHI) utilizando o rotor P70 para o isolamento das mitocôndrias. Estas organelas foram separadas e descartadas a fim de não interferirem nos experimentos futuros. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação, agora a 100.000 g por 40 minutos. O precipitado dessa nova centrifugação, denominado fração microssomal, foi ressolubilizado em 1 mL de solução tampão (meio de ressuspensão: glicerol 15 % (v:v), DTT 1 mM, PMSF 1

mM, 10 mM de Tris-HCl pH 7,6, EGTA 1 mM). A concentração de proteína total contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

2.7. Determinação da atividade H⁺-ATPase de Membrana Plasmática

A atividade ATPásica foi determinada pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10 % (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1 % (100:1) e após 15 minutos foi feita à leitura em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nesta reação o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul. Composição do meio de reação: 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína. Cerca de 70-90% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medida foi inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄), um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986). Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase foi medida a 35 °C, com ou sem vanadato, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a ATPase do tipo P.

2.8. Determinação da atividade da H⁺-PPase e da V-ATPase

A atividade da da H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto foi determinada pela medida da liberação de Pi, segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloro acético (TCA gelado) para uma concentração final de 10% (v/v). A atividade enzimática representa a atividade hidrolítica de PPI dependente de K⁺ (V-PPase tipo 1) e foi obtida na presença e ausência de 100 mM de KCl. A atividade foi dependente de KCl em pelo menos 60%. Cerca de 80-95 % da atividade da V-ATPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi inibida por 10 nM de Concanamicina, um eficiente inibidore da V-ATPase. O meio de reação conteve 10 mM de Mops-Tris (pH 7,0) 100 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 50 µg de proteína. A

atividade da H⁺-PPase das vesículas medidas a pH 7,0 foi medida por diferença entre a ausência e presença de KCl.

2.9. Localização do ON por microscopia de fluorescência

A localização do ON foi realizada com auxílio da sonda fluorescente DAF-2 DA em microscópio de fluorescência. Foram cortadas seções transversais da região de emissão de RLs de plântulas de arroz AVP1-7 e AVP1-10, ou utilizadas plântulas íntegras de *Arabidopsis thaliana* AVP1-1 e AVP1-2 e colocadas em 10 mM de tampão HEPES-BTP pH 7,5 com 10 µM de DAF-2 DA por 40 min sob agitação no escuro. Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes em tampão e analisados no microscópio (excitação 488 nm, emissão 495-575 nm). As imagens foram obtidas em microscópio ótico de fluorescência (Zeiss Axioplan com camera Canon A640 digital acoplada) e analisadas pelo programa ImageJ. Imagens dos cortes sem DAF foram utilizados como controle. As mesmas características de obtenção de imagem foram mantidas para todos os tratamentos e não houve nenhum tratamento das imagens posteriormente. Pelo menos 5 amostras foram avaliadas para cada tratamento em 4 experimentos independentes.

3. RESULTADOS

3.1. AIA e AH alteram o desenvolvimento das raízes de plantas de arroz transgênicas AVP1-7 e AVP1-10

Foram analisadas duas linhas transgênicas de plantas de arroz (*Oryza sativa* var. *japonica* 'Taipei 309'), AVP1-7 e AVP1-10. Cada uma das linhas contém cópias extras do gene 35S-AVP1 inserido numa posição única do cromossomo. O nível de expressão da proteína AVP1 nas membranas isoladas raiz de arroz revelou que as plantas transgênicas expressam maiores quantidades da proteína AVP1

quando comparadas às plantas controle (WT) (comunicação pessoal, Dr. Roberto Gaxiola, *Arizona State University*).

No presente estudo foram analisados os efeitos da aplicação de AHs e AIA sobre o desenvolvimento radicular de plantas AVP e WT, avaliados pela alteração no número de RLs, do CEP e da densidade de raízes (Figuras 1, 2 e 3). O efeito de AIA e AH sobre as plantas WT resultaram num aumento significativo de 150 e 115% no número de RLs, respectivamente ($P < 0,0001$) (Figura 1). O número de RLs das plantas AVP1-7 não foi alterado por esses tratamentos. Por outro lado, o número de RLs aumentou em cerca de 30 e 50% nas plantas AVP1-10 tratadas com AIA ou AH, respectivamente ($P < 0,0001$). Tomando a transgenia como fonte de variação foi possível observar uma diferença significativa no número de RLs de plantas AVP1-7 (160%) e AVP1-10 (60%) ($P < 0,0001$).

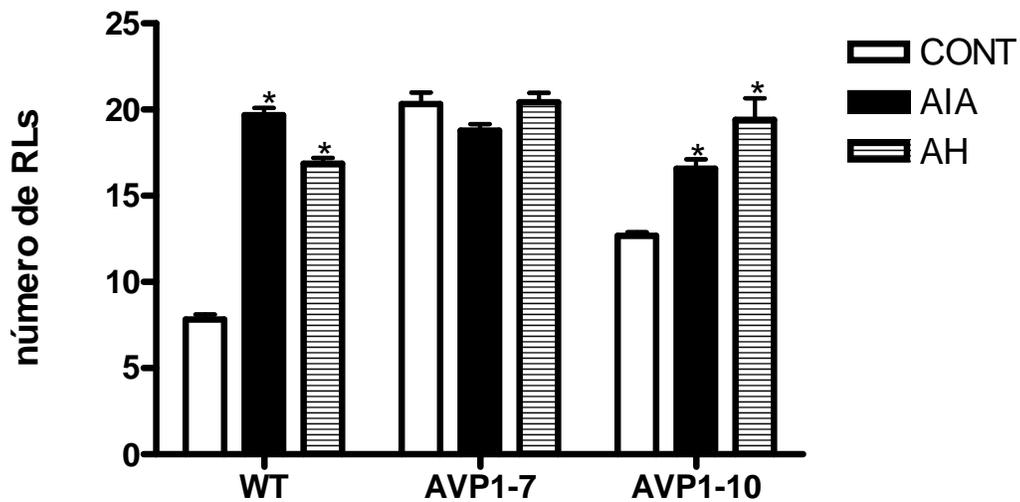


Figura 1. Número de raízes laterais (RLs). Plântulas de arroz controle (WT) e com a super-expressão do gene AVP1 (linhas AVP1-7 e AVP1-10) foram tratadas ou não por 48h com 10 nM de ácido-3-indol-acético (AIA) ou 25 mg de C L⁻¹ de ácidos húmicos (AHs).

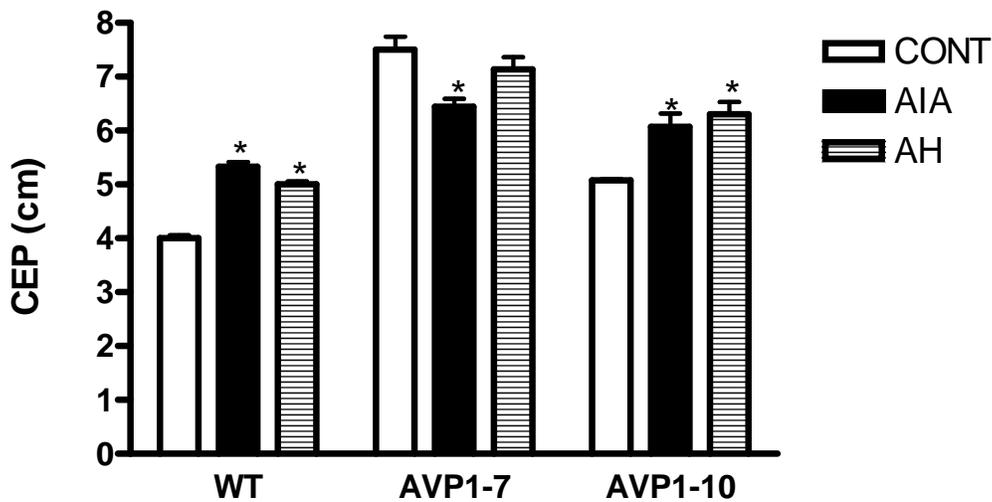


Figura 2. Comprimento do eixo principal (CEP) da raiz. Plântulas de arroz controle (WT) e com a super-expressão do gene AVP1 (linhas AVP1-7 e AVP1-10) foram tratadas ou não por 48h com 10 nM de ácido-3-indol-acético (AIA) ou 25 mg de C L⁻¹ de ácidos húmicos (AHs).

As plantas WT apresentaram um aumento de cerca de 30% no CEP quando crescidas na presença de AIA ou AH ($P < 0,001$) (Figura 2). O CEP nas plantas AVP1-7 foi reduzido em 15% na presença de AIA e não foi modificado pelo AH ($P < 0,001$). Nas plantas AVP1-10 tanto o AIA quanto o AH aumentaram o CEP em torno de 20%. A super-expressão de AVP1 por si aumentou o CEP em cerca de 90% e 30% nas plantas AVP1-7 e AVP1-10, respectivamente. Foi possível observar que o aumento mais pronunciado no número de RLs das plantas WT tratadas com AIA e AH levou a um incremento na densidade de RLs (número de RLs / cm) de cerca de 95 e 70%, respectivamente ($P < 0,001$) (Figura 3). As plantas AVP1-7 não tiveram essa característica alterada pelos tratamentos. Já as plantas AVP1-10 tiveram um aumento de cerca de 20% na densidade de RLs quando tratadas com AIA ou AH.

É possível observar o aspecto das plantas tratadas na Figura 4.

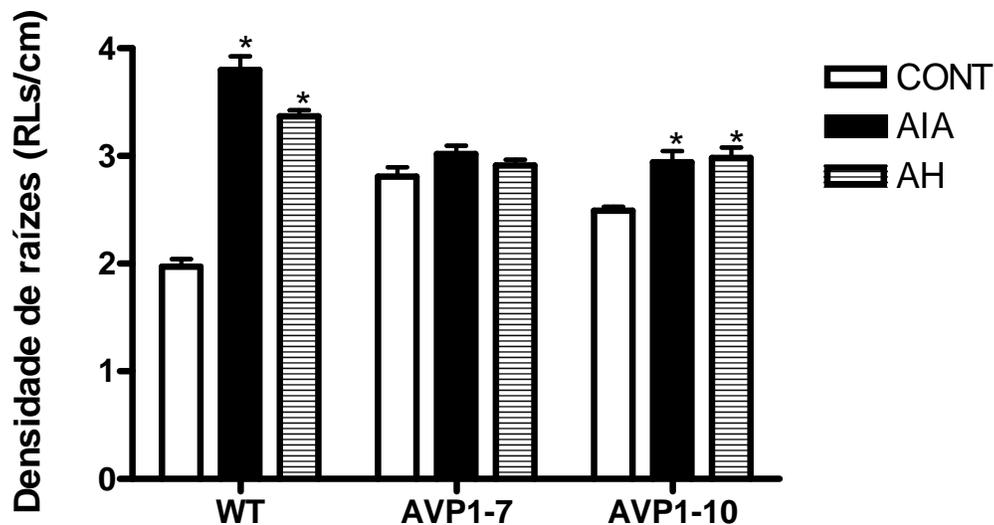


Figura 3. Densidade de raízes laterais (RLs/cm). Plântulas de arroz controle (WT) e com a super-expressão do gene AVP1 (linhas AVP1-7 e AVP1-10) foram tratadas ou não por 48h com 10 nM de ácido-3-indol-acético (AIA) ou 25 mg de C L⁻¹ de ácidos húmicos (AHs).

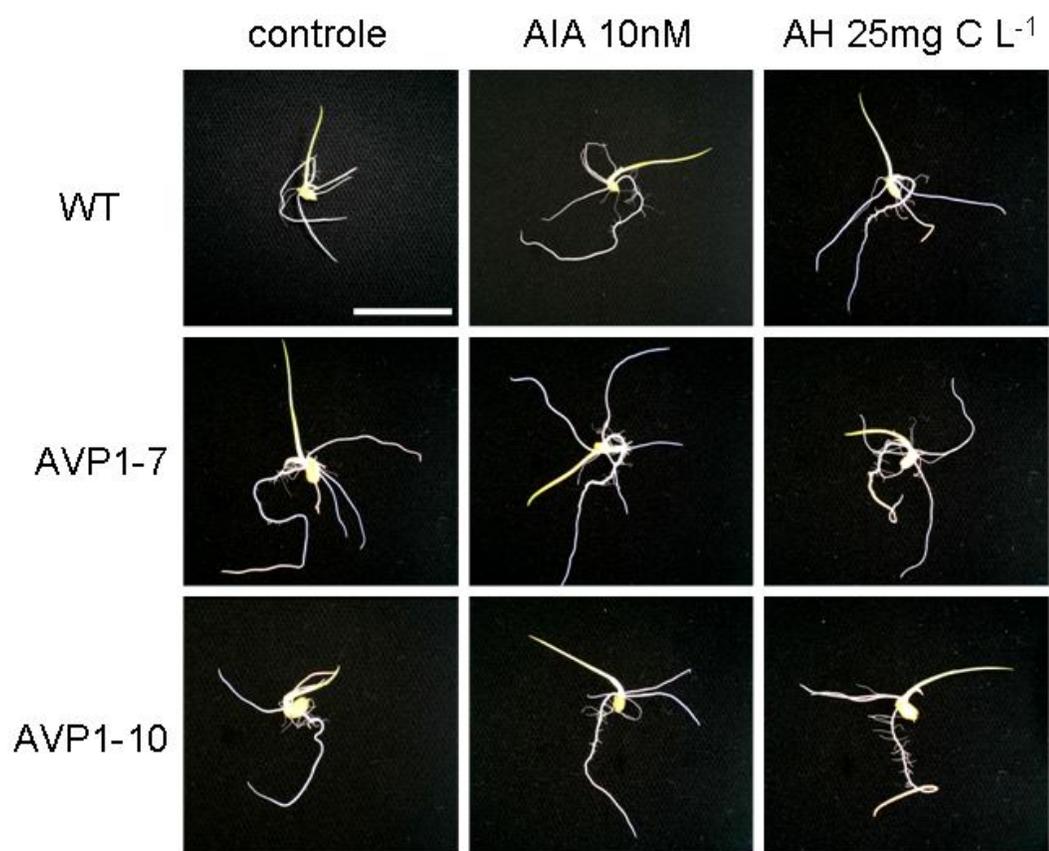


Figura 4. Aspecto visual de plântulas de arroz controle (WT) e com a super-expressão do gene AVP1 (linhas AVP1-7 e AVP1-10) tratadas ou não (controle) por 48h com 10 nM de AIA ou 25 mg de C L⁻¹ de AH. Barra = 10 cm.

3.2. O AH altera a atividade de hidrólise das bombas de H⁺ das plantas de arroz transgênicas AVP1-10

A atividade hidrolítica da H⁺-ATPase da MP é apresentada na Figura 5A. As plantas de arroz transformadas com gene AVP1 possuem uma atividade 50% maior do que as plantas WT. Na presença de AH esse estímulo é de 100%. A ativação da H⁺-PPase é de cerca de 40% nas plantas AVP1, aumentando duas vezes na presença de AH (Figura 5B). A atividade da V-ATPase foi alterada positivamente em 100% pelos AH tanto nas plantas WT quanto nas plantas AVP1, mas a super-expressão desse gene por si não modificou significativamente a atividade da bomba (Figura 5C).

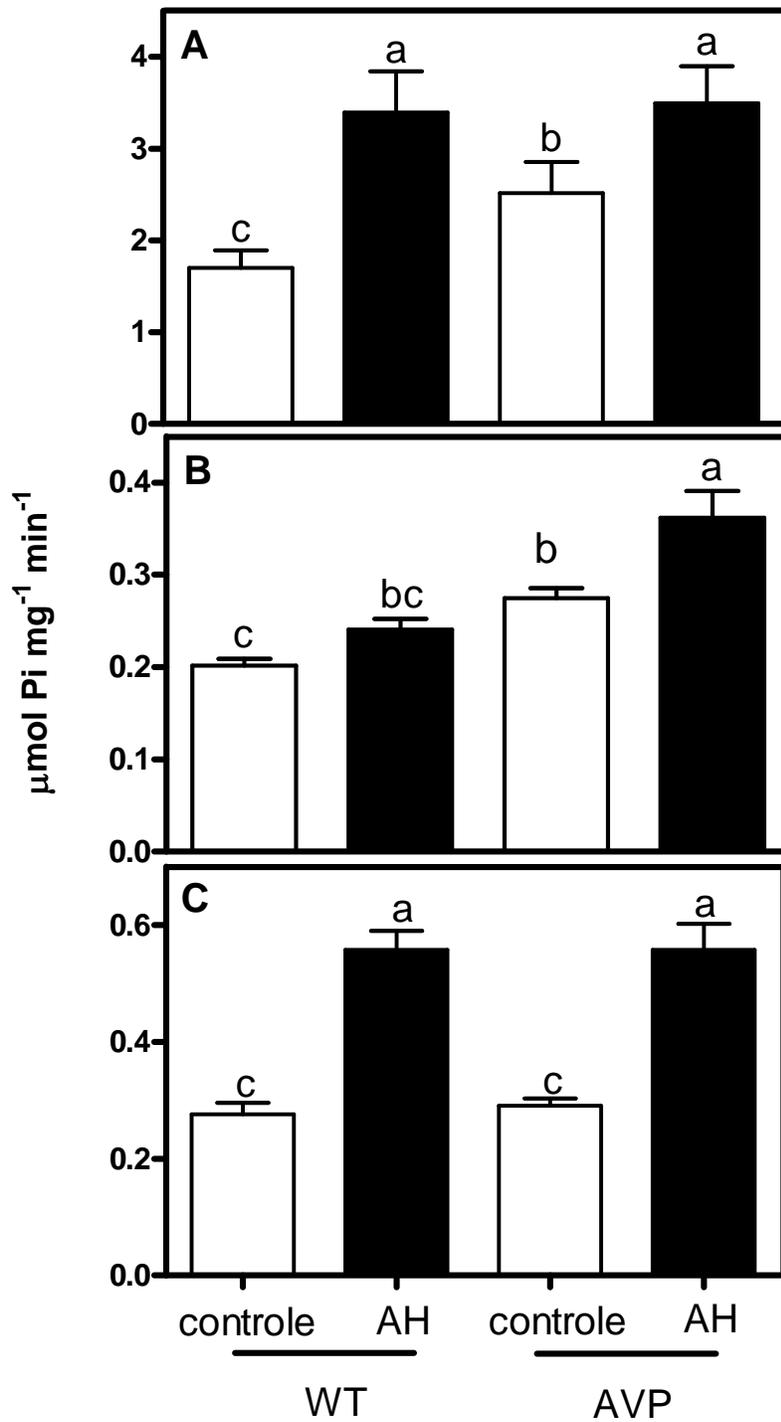


Figura 5. Atividade da H⁺-ATPase de MP (A), da H⁺-PPase do tonoplasto (B) e da V-ATPase (C) em vesículas isoladas de raízes de plantas arroz controle (WT) e transformadas com a super-expressão do gene que codifica a H⁺-PPase (AVP1-7) tratadas ou não com 25mg C L⁻¹ de AH.

3.3. A produção de ON é alterada nas raízes de plantas de arroz transgênicas AVP1-7 e AVP1-10 e em plantas de *Arabidopsis* transgênicas AVP1-1 e AVP1-2

A emissão da fluorescência da sonda sensível a ON DAF-2DA em raízes intactas de *Arabidopsis* transgênicas AVP1-1 e AVP1-2 é cerca de 30% comparada às plantas WT (Figura 6).

As plantas de arroz transgênicas AVP1-7 e AVP1-10 aumentam em cerca de 2 vezes a fluorescência da sonda DAF-2DA em relação as plantas WT, como demonstrado pela nos cortes transversais das raízes (Figura 7). É possível observar que o uso em conjunto dos inibidores da atividade da enzima nitrato redutase (L-NAME) e da enzima ON sintase (Na_2WO_4) reduziram em cerca de 50% a fluorescência relativa a produção de ON. Não houve alteração significativa da fluorescência nas duas linhas de plantas transgênicas na presença desses inibidores.

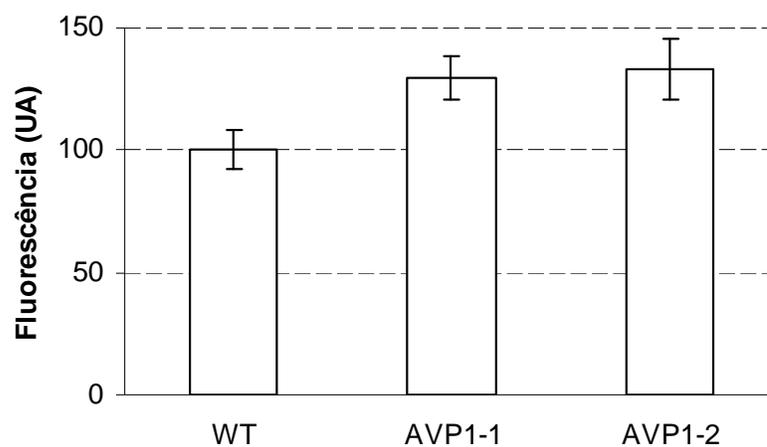
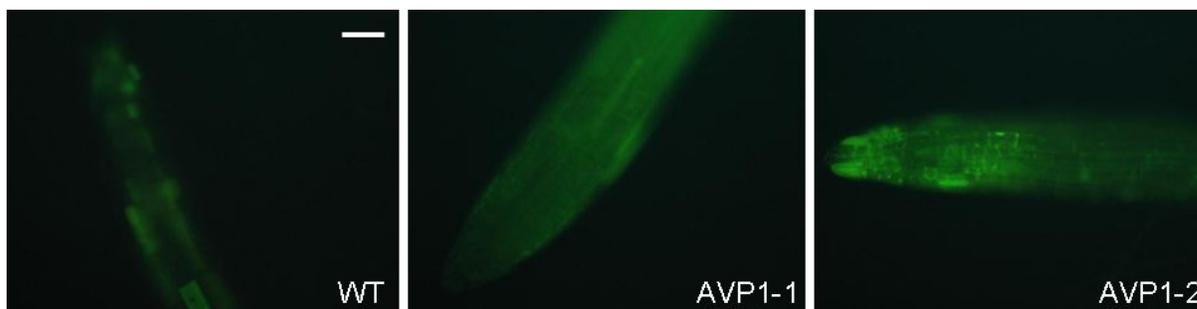


Figura 6. Microscopia de Fluorescência com sonda DAF-2DA na ponta da raiz principal de plântulas de *Arabidopsis thaliana* controle (WT) e com a super-expressão do gene AVP1 (AVP1-1 e AVP1-2). Barra = 1 mm.

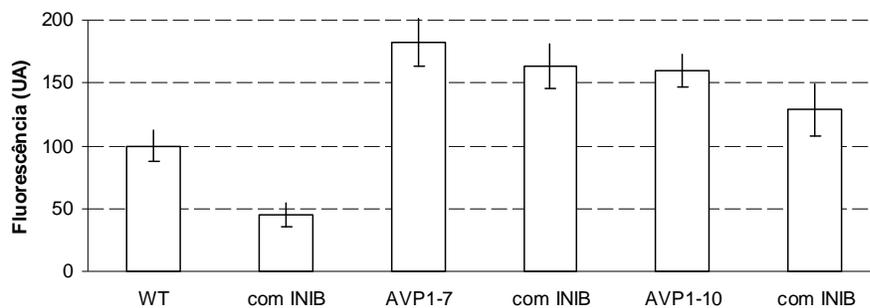
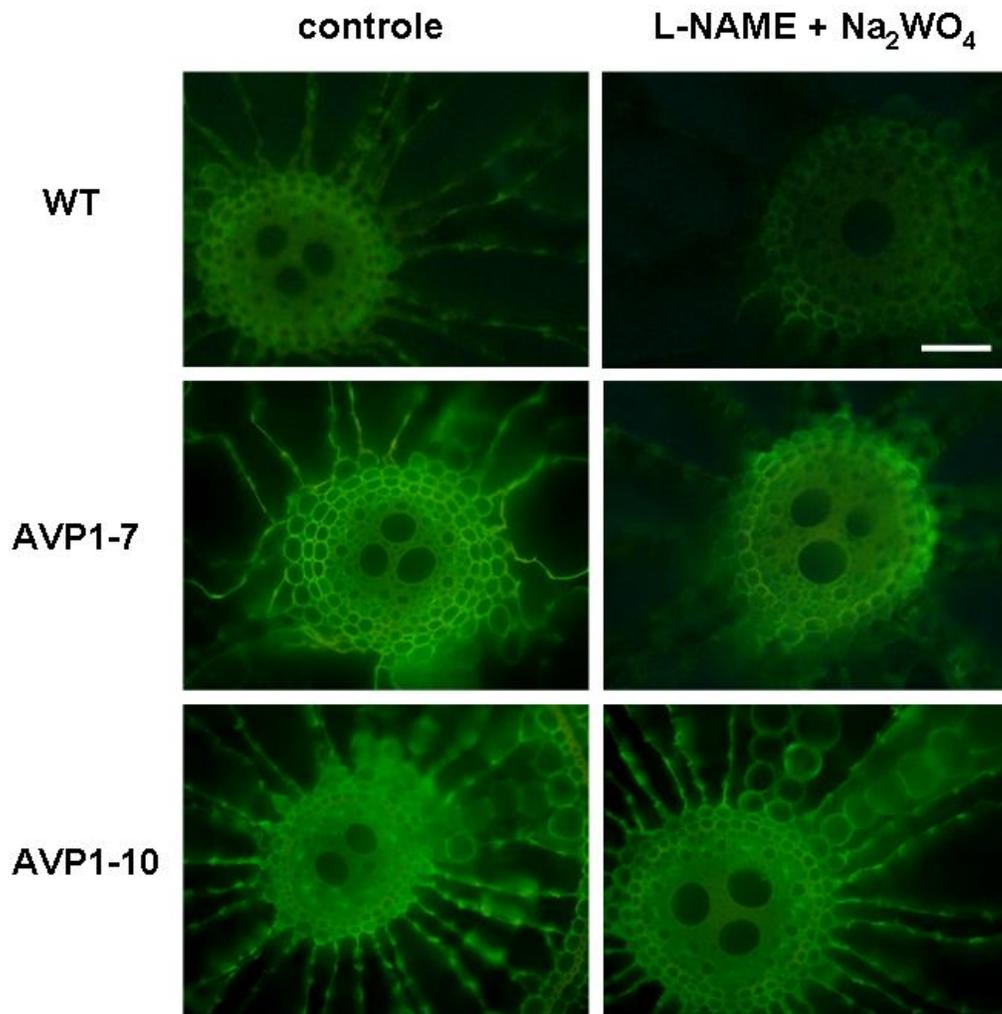


Figura 7. Microscopia de Fluorescência com sonda DAF-2DA de plântulas de arroz controle (WT) e com a super-expressão do gene AVP1 (linhas AVP1-7 e AVP1-10) tratadas ou não por 24h com inibidores da produção de ON (0,2 mM de L-NAME + Na₂WO₄). Barra = 50 μm. O gráfico apresenta a fluorescência relativa emitida pela sonda sensível a ON, DAF-2DA. As barras representam as médias ± desvio padrão (n=5).

4. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços nos estudos do mecanismo de ação das SH sobre o desenvolvimento radicular, somente recentemente empregaram-se plantas mutantes e transgênicas como ferramentas para sua elucidação (Zandonadi et al., 2006; Dobbss et al., 2007; Schmidt et al., 2007; Trevisan et al., 2009). A hipótese de um mecanismo de ação dos AHs semelhante ao da auxina tem sido sustentada pelo uso do mutante *dgt*, que falha na percepção de auxina e na iniciação de RLs (Zandonadi et al., 2006; Dobbss et al., 2007), e pela indução de genes da via de sinalização (*IAA19*), bem como a caracterização de plantas transformadas com elemento sintético de resposta a auxina (DR5) (Trevisan et al., 2009).

No presente trabalho foi testada a hipótese de que o AH e o AIA alteram o desenvolvimento radicular (Figuras 1, 2 e 3) pela ativação da enzima H^+ -PPase (Figura 5B), a qual poderia influenciar a produção de ON (Figura 7). Tanto o AH como o AIA aumentaram significativamente o CEP, o número de RLs e a densidade de raízes em plantas WT (Figuras 1, 2 e 3). As plantas AVP1-7 e AVP1-10 possuem constitutivamente maior número de RLs e CEP (Figuras 1 e 2). As plantas WT tratadas com AIA ou AH apresentaram um fenótipo para RLs semelhante às plantas transgênicas não tratadas. O mesmo não aconteceu para o CEP e densidade, provavelmente devido ao fato do efeito dos AHs e AIA ser mais pronunciado na RL do que no CEP. É importante notar que o CEP das raízes é controlado também por etileno, o qual em concentrações elevadas pode interagir com a auxina na ponta da raiz principal reduzindo seu crescimento (Ivanchenko et al., 2008). É necessária a realização de outros trabalhos para entender a importância do etileno na via de sinalização estimulada por AHs.

O transporte de auxina é fundamental para a formação de RLs (Marchant et al., 2002) e plantas com a super-expressão do gene AVP1 são capazes de transportar maior quantidade deste fitormônio (Li et al., 2005). Foi demonstrado que existe um aumento transitório na produção de ON induzida por auxina associada à emissão de raízes adventícias (Pagnussat et al., 2002) e que o ON é produzido nas células do periciclo, precursoras da emissão da RL (Correa-Aragunde et al., 2004). Os dados apresentados no presente trabalho corroboram para hipótese de que a auxina poderia induzir a produção de ON, uma vez que associa o aumento da

detecção deste gás ao maior número de RLs das plantas transgênicas (Figuras 6 e 7). O presente trabalho vai além, sugerindo um papel fundamental da H⁺-PPase na produção de ON por acidificação do apoplasto (Figura 7) como sugerido previamente para a ação da H⁺-ATPase de MP (capítulo 1). Essa idéia está em consonância com a hipótese da regulação da H⁺-ATPase de MP pelo nível da auxina intracelular, o qual é capaz de estabelecer um sistema de retroalimentação onde a H⁺-PPase poderia regular tanto o nível quanto o alvo de vesículas contendo H⁺-ATPase de MP (Li et al., 2005). É possível observar que, enquanto as plantas WT tem a produção de ON reduzida em cerca de 50% pela presença dos inibidores de produção enzimática deste gás (L-NAME e Na₂WO₄), as plantas AVP permanecem praticamente inalteradas, sugerindo que o aumento da acidificação poderia suprir a ausência da produção enzimática de ON (Figura 7).

Sabe-se que o primórdio precursor da RL possui abundância da H⁺-ATPase de MP (Moriau et al., 1999). Esta é uma enzima chave para o crescimento e desenvolvimento celular, sendo regulada pela auxina em nível transcricional e pós traducional (Revisado por Hager 2003). O AH foi capaz de aumentar a atividade dessa enzima tanto em plantas WT quanto em AVP (Figura 5A). As plantas AVP possuem uma ativação constitutiva da H⁺-ATPase de MP e, embora o AH seja capaz de ativar ainda mais essa enzima, a magnitude de estímulo não ultrapassou o nível de atividade observado nas plantas WT. De acordo com a teoria do crescimento ácido, uma vez acionada pela auxina, a H⁺-ATPase de MP acidifica o apoplasto ativando enzimas relacionadas com a expansão da parede celular (Hager et al., 1991; Rayle e Cleland, 1992). Além disso, o gradiente eletroquímico gerado pelo transporte H⁺ funciona como facilitador da entrada da auxina na célula (Leyser, 2005), e é fundamental para energização de transportadores secundários que auxiliam na absorção de nutrientes importantes (Palmgren, 2001).

O papel da H⁺-PPase na homeostase celular e controle do crescimento vegetal vem sendo revisto e ampliado (Li et al., 2005; Gaxiola et al., 2007). O pensamento tradicional sobre esta enzima tem mudado, já que além da sua participação clássica na acidificação do vacúolo, a H⁺-PPase contribui para a regulação do pH apoplástico e do transporte de auxina, provavelmente pela mediação do tráfego de vesículas contendo a H⁺-ATPase de MP e o transportador de efluxo de auxina, PIN1 (Li et al., 2005). A atividade da H⁺-PPase foi aumentada pelo AH nas plantas WT, mas o estímulo nas plantas AVP foi mais proeminente

(Figura 5B). No caso da V-ATPase, a magnitude de estímulo da atividade pelo AH foi a mesma tanto nas plantas WT quanto nas plantas AVP (Figura 5C), uma vez que não há alteração da expressão e atividade da V-ATPase nas plantas AVP (Li et al., 2005).

O fósforo é um elemento essencial para os processos metabólicos que necessitam de energia em todos os organismos vivos. Por exemplo, a concentração e a homeostase do fosfato (Pi) presente no citoplasma são consideradas fundamentais nas vias de transdução de sinais e regulação de várias enzimas (Poirier e Bucher, 2002). A atividade dos sistemas primários de transporte de H⁺ pode alterar a concentração do Pi citosólico (Palma *et al.*, 2000). Plantas crescidas em condições de baixo Pi apresentam maior atividade e expressão da H⁺-ATPase de MP e aumento transitório do nível de AIA endógeno (Shen *et al.*, 2006). A aplicação de auxina exógena em plantas deficientes em Pi ativa a H⁺-ATPase e a absorção de Pi. Recentemente foi demonstrado que a disponibilidade de Pi pode interferir no desenvolvimento de RLs mediado pela sinalização de auxina (Pérez-Torres *et al.*, 2008). Estes autores demonstraram que a modulação da sensibilidade à auxina por Pi é dependente do receptor de auxina TIR1 e do fator de transcrição ARF19. Foi proposto um modelo no qual a sensibilidade à auxina é reforçada em plantas privadas de Pi por um aumento da expressão de TIR1, que acelera a degradação de proteínas AUX/IAA, liberando assim os fatores de transcrição ARF que ativam/reprimem genes envolvidos na formação e emergência da RL. É provável que a elevada atividade da H⁺-PPase do vacúolo contribua para uma regulação da concentração citoplasmática de Pi em plantas transgênicas ou tratadas com AH (Figura 5). Desta forma é possível estabelecer um modelo no qual a H⁺-PPase regula tanto a sensibilidade à auxina quanto o nível de Pi citoplasmático resultando na formação maior número de RLs (Figuras 1, 4 e 5).

A regulação hormonal das bombas de H⁺ do vacúolo ainda é pouco estudada. Em sua revisão sobre os transportadores vacuolares, Maeshima et al. (1996) sugeriram que seria possível que os fitormônios regulassem as bombas de H⁺ do vacúolo. Na mesma época foi demonstrado que muitos fitormônios, incluindo auxinas em concentração muito baixa (10^{-10} mol L⁻¹), estimulam as atividades de hidrólise das bombas de H⁺ do tonoplasto isoladas de vesículas de raízes de beterraba (Ozolina et al., 1996; Salyaev et al., 1999). Além disso, também foi relatado que SH poderiam estimular a atividade da H⁺-ATPase vacuolar de raízes de

aveia (Pinton et al., 1992). A ação orquestrada das bombas vacuolares e da MP pode, sob influência do AIA e do AH, levar à expansão celular e à alteração da arquitetura radicular (Figuras 1,2 e 3) conforme demonstrado previamente (Zandonadi et al., 2007).

Recentemente, foi demonstrado que plantas de arroz AVP1 se desenvolvem muito bem em condições de baixo de PO_4^- , produzindo maior biomassa radicular, elevada acidificação da rizosfera e exudação de ácidos orgânicos (e.g., ácido cítrico) (Yang et al., 2007). É interessante observar que plantas de milho tratadas com AHs possuem um aumento no efluxo de ácido cítrico associado a ativação da H^+ -ATPase de MP (Canellas et al., 2008).

Os sistemas primários de transporte H^+ são fundamentais para a regulação do pH do vacúolo, do citoplasma e do apoplasto celular (Felle, 2001). A partir dos dados apresentados é possível sugerir uma seqüência de eventos desencadeados pela ativação da H^+ -PPase que culminem no desenvolvimento radicular. Desse modo, os AHs poderiam atuar mantendo a sincronia de ativação das bombas de prótons para o crescimento de raízes (Zandonadi et al., 2007) utilizando a modificação de pH e o ON como sinais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bao, A., Wang, A., Wu, G., Xi, J., Zhang, J., Wang, C. (2009) Plant Overexpression of the Arabidopsis H⁺-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci.*, 176:232–240.
- Bertosa, B., Kojic´-Prodic, B., Wade, R.C., Ramek, M., Piperaki, S., Tsantili-Kakoulidou, A., Tomic, S. (2003) A new approach to predict the biological activity of molecules based on similarity of their interaction Wolds and the log p and log d values: application to auxins. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 43:1532–1541.
- Canellas, L.P., Teixeira Junior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Médici, L.O., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2008) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annu. Appl. Biol.*, 153:157-166
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002a) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.*, 130:1951-1957.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant. Sci.*, 8:165-171.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218:900-905.
- Dobbss, L.B., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Pino-Nunes, L.E., Rumjanek, V.M., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2007) Changes in root development of Arabidopsis promoted by organic matter from oxisols. *Annu. Appl. Biol.*, 151:199-211.
- Duby, G., Boutry, M. (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch.*, 457:645–655.
- Elena, A., Diane, L., Eva, B., Marta, F., Roberto, B., Zamarreño, A.M., Garcia-Mina, J.M. (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 47 215–223.
- Felle, H.H. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.*, 3:577-591

- Gaxiola, R.A., Li J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., Fink, G.R. (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:11444-11449.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS lett.*, 581:2204-2214.
- Gévaudant, F., Duby, G., Stedingk, E.V., Zhao, R., Morsomme, P., Boutry, M. (2007) Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiol.*, 144: 1763–177.
- Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 116:483-505
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185:527-537.
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gabel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K., Wieczore, H. (2002) Concanamycin A, the Specific Inhibitor of V-ATPases, Binds to the Vo Subunit c. *J. Biol. Chem.*, 277:40544-40548.
- Ivanchenko, M.G., Muday, G.K., Dubrovsky, J.G. (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 55:335–347.
- Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J.L., Boutry, M. (2005) Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:11675–11680.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L., (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J Plant Physiol.*, 165:967-975.
- Leyser, O. (2005) Auxin Distribution and Plant Pattern Formation: How Many Angels Can Dance on the Point of PIN? *Cell*, 121:819–822.
- Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Khodakovskaya, M., Richards, E. L., Krizek, B., Murphy, A.S., Gilroy, S., Gaxiola, R. (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. *Science*, 310:121-125.

- Lv, S., Lian, L., Tao, P., Li, Z., Zhang, K., Zhang, J. (2009) Overexpression of *Thellungiella halophila* H⁺-PPase (TsVP) in cotton enhances drought stress resistance of plants. *Planta*, 229:899–910.
- Maeshima, M., Nakanishi, Y., Matsuura-Endo, C., Tanaka, Y. (1996) Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *J. Plant Res.*, 109:119-125.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465:37-51.
- Malamy, J.E., Benfey, P.N. (1997) Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.*, 2:390-396.
- Malamy, J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.*, 28:67–77.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P.J., Bennett, M., Sandberg, G (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell*, 14:589–597.
- Moriau, L., Michelet, B., Bogaerts, P., Lambert, L., Michel, A., Oufattole, M., Boutry, M. (1999) Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.*, 19: 31-4.
- Ozolina, N.V., Pradedova, E.V., Salyaev, R.K. (1996) Phytohormone effects on hydrolytic activity of phosphohydrolases in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplasts. *Plant Growth Regul.*, 19:189–191.
- Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y., Sze, H. (2004) Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol.*, 134:1514–1526.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.*, 129:954-956.
- Palma, D.A., Blumwald, E., Plaxton, W.C. (2000) Upregulation of vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. *FEBS Lett.*, 486:155-158.
- Palmgren, M.G., (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52:817-845.

- Pérez-Torres, C.A., López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., and Herrera-Estrella, L. (2008) Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell*, 20: 3258–3272.
- Pinton R., Varanini Z., Vizzoto G., Maggioni A. (1992) Soil humic substances affect transport-properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. *Plant Soil*, 142:203–210.
- Poirier, Y., Bucher, M. (2002) Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1–35.
- Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 55:803-813.
- Rayle, D.L., Cleland, R. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99:1271–1274.
- Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiol. Plant.*, 71:131-141.
- Salyaev, R.K., Ozolina, N.V., Pradedova, E.V. (1999) Effects of exogenous phytohormones and kinetin on the hydrolytic activity of proton pumps in the tonoplast of red beet at different stages of plant development. *Russ. J. Plant Physiol.*, 46:1–4.
- Schmidt, W., Santi, S., Pinton, R., Varanini, Z. (2007) Water-extractable humic substances alter root development and epidermal cell pattern in *Arabidopsis*. *Plant Soil*, 300:259-267.
- Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., Chory J. (1999) The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev.*, 13:3259–3270.
- Shen, H., Chen, J., Wang, Z., Yang, C., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Yan, X. (2006) Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.*, 57(6):1353-62.
- Sze, H., Ward, J. M., Lai, S., Perera, I. (1992) Vacuolar-type H⁺ -translocating ATPases in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. *J. Exp. Biol.*, 172:132-135.

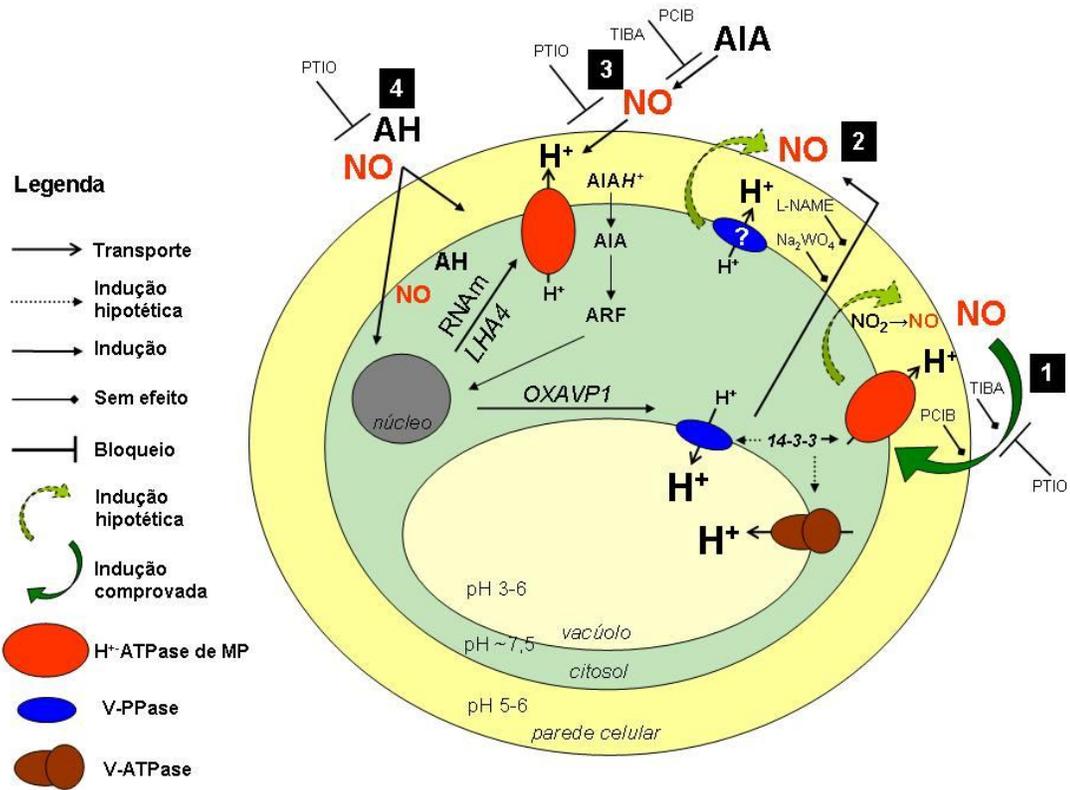
- Tomic, S., Gabdoulline, R.R., Kojic´-Prodic B., Wade, R.C. (1998) Classification of auxin plant hormones by interaction property similarity indices. *J. Comp. Mol. Design.*, 12:63–79.
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2009) Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. *Plant Biol.*, 1-12.
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L., Murphy, A., Gaxiola, R. (2007) Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant Biotechnol. J.*, 5:735–745.
- Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.
- Zandonadi, D.B. (2006) *Bioatividade de substâncias húmicas: promoção do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de H⁺*. Tese (Mestrado em Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – Rj, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Uenf, 175p.

6. CONCLUSÕES

As evidências experimentais obtidas permitiram estabelecer uma relação funcional entre a ativação das bombas de H^+ , a indução via sinalização auxínica da síntese localizada de ON e o desenvolvimento de RLs. No modelo proposto, AH derivados de diversos tipos de matéria orgânica atuam como fontes ambientais de auxina induzindo a produção de ON nos sítios de emissão de RL. O ON por sua vez ativaria as bombas de H^+ das células adjacentes, desencadeando o mecanismo de crescimento ácido responsável pela proliferação e alongação celular associados à formação das RLs. O modelo também sugere que a acidificação apoplástica desencadeada pela ativação das bombas de H^+ por AH / AIA / ON poderia induzir a produção de mais ON, representando uma via de amplificação de sinal onde um sinal inicial de ON induziria a liberação de mais ON. Postulamos que esta cascata de sinalização (*NO-induce/ NO-release*) seria parte do mecanismo de transdução de sinais de AIA e AH responsável pelo controle da morfologia radicular via indução de formação de RLs em raízes de milho. As evidências experimentais apresentadas nesta Tese que sustentam o modelo proposto são as seguintes:

- 1 – A indução por ON de aumento do nível de transcritos para o gene *LHA4* H^+ -ATPase de MP bem como a atividade desta enzima em raízes de tomateiro;
- 2 – A participação do ON e do fluxo de H^+ nos processos inerentes a interação entre os fitormônios auxina e etileno durante o desenvolvimento radicular de tomateiro;
- 3 – O tomateiro mutante pouco sensível a etileno (*Nr*) possui maior desenvolvimento radicular, e os dados sugerem que a ação da auxina, do ON e dos AHs sobre o desenvolvimento de RLs não é prejudicada pela percepção ao etileno causada pela mutação no gene *Nr*.
- 4 – Plântulas transgênicas de *Arabidopsis* ou de arroz com a expressão aumentada da V-PPase (gene *AVP1*) produzem maior número de RLs e apresentam maior produção de ON. A super-expressão da V-PPase confirma a influência desta enzima sobre a formação de RLs, que poderia ocorrer via modulação do transporte de auxina e/ou dos níveis de Pi citoplasmático, como exposto na discussão da Tese.

APÊNDICE A



Modelo proposto. Esquema apresentando um modelo de regulação das bombas de H⁺ via cascata de sinalização desencadeada por ácidos húmicos (AH) e indol acético (AIA) mediada por óxido nítrico (ON). A seta verde escuro aponta a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (MP) por ON a qual é insensível a presença de inibidores da via de sinalização (PCIB) e transporte de auxina (TIBA). A seta verde claro pontilhada indica que a H⁺-ATPase de MP, uma vez ativada, acidifica o apoplasto e induz a produção de ON pela via dependente de pH (1). A seta verde claro tracejada mostra como a ativação da H⁺-PPase vacuolar (V-PPase) via super-expressão (*OXAVP1*) pode levar a produção de ON, mesmo na presença de inibidores da produção enzimática de ON (L-NAME e Na₂WO₄), sugerindo a possível inserção da V-PPase na MP (2). A ativação H⁺-ATPase de MP por auxina mediada por ON, geraria o gradiente eletroquímico que favorece a entrada de moléculas de AIA protonadas ativando fatores de transcrição, ARF (3). A ativação H⁺-ATPase de MP por AH bloqueada pelo inibidor do ON (PTIO), indicando a participação do ON na ativação pré- e/ou pós-transcricional desta enzima (4). Uma possível regulação orquestrada das H⁺-ATPases de MP, V-ATPases e V-PPases, coordenadas por proteínas 14-3-3, está indicada pelas setas pretas pontilhadas.

APÊNDICE B

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)