

EFEITOS DO SILÍCIO NA ENERGÉTICA E RESPOSTAS A
ESTRESSES EM ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L., Merrill) VIA
MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS

JANIÉLIO GONÇALVES DA ROCHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2017

EFEITOS DO SILÍCIO NA ENERGÉTICA E RESPOSTAS A
ESTRESSES EM ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L., Merrill) VIA
MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS

JANIÉLIO GONÇALVES DA ROCHA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

055/2017

R672 Rocha, Janiélio Gonçalves da.

Efeitos do silício na energética e respostas a estresses em abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merrill) via modulação das bombas de prótons / Janiélio Gonçalves da Rocha – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

69 f. : il.

Bibliografia: f. 59 - 66.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

1. Silicato. 2. Estresse Hídrico. 3. Fotossíntese. 4. Bombas de H⁺. 5. Hipóxia. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.774

EFEITOS DO SILÍCIO NA ENERGÉTICA E RESPOSTAS A
ESTRESSES EM ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L., Merrill) VIA
MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS.

JANIÉLIO GONÇALVES DA ROCHA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 03 de maio de 2017

Comissão Examinadora

Antônio Jesus Dorighetto Cogo (D.Sc. Biociências e Biotecnologia) – UENF

Evenilton Pessoa Costa (D.Sc. Biociências e Biotecnologia) – UENF

Willian Pereira (D.Sc. Ciência do Solo) – UFRRJ

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, força e sabedoria para chegar até aqui;

Agradeço aos meus pais, José Benedito Gonçalves e Maria de Fátima Gonçalves da Rocha, por todos os sacrifícios que fizeram para que eu realizasse os meus sonhos, aos meus irmãos Janilson, Josan e Jaídson pela confiança e o apoio que eles me deram;

À Camila, que esteve ao meu lado durante esse período, me dando carinho, conselhos e ajuda sempre que precisei;

Ao Prof. Arnaldo Rocha Façanha, por ter me acolhido sob a sua orientação durante este período de doutorado, por acreditar no meu trabalho, pelos ensinamentos e acima de tudo a amizade que tem com os seus orientandos e com a pesquisa;

Ao Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho, pela parceria e conversas sugestivas durante o período de desenvolvimento do trabalho;

Ao Prof. Alessandro Coutinho Ramos, pela amizade e assessoria na condução dos experimentos;

Aos estudantes e amigos de graduação e pós-graduação do laboratório, que aqui prefiro omitir os nomes para evitar a injustiça de esquecer algum. Agradeço de coração pelo companheirismo, ajuda na condução dos experimentos, conselhos, brincadeiras, enfim, pela amizade e o carinho de todos;

À UENF, pelo acolhimento destes quatro anos que passei aqui;

Ao curso de Pós-graduação em Produção Vegetal;

À CAPES e a FAPERJ pela bolsa concedida e apoio financeiro;
A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Abacaxizeiro	4
2.2. O Silício	6
2.3. Silício na planta	7
2.4. Bombas transportadoras de H ⁺	11
3. TRABALHOS	13
3.1. EFEITOS DO SILÍCIO NA FOTOSSÍNTESE E SISTEMA PRIMÁRIO DO TRANSPORTE H ⁺ DE ABACAXIZEIRO (<i>Ananas comosus</i> L., MERRILL)	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	17
Condições do crescimento das plantas	17
Parâmetros fotossintéticos	18
Obtenção da fração mitocondrial e microssomal	18
Atividade das H ⁺ -ATPases	19
Monitoramento do gradiente de prótons	19
Parâmetros Biométricos e Biomassa	19
Quantificação do Si	19
RESULTADOS	20
Efeito do silício na biomassa	20
Parâmetros fotossintéticos	21
Atividades hidrolíticas	23
Análise multivariada	25
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

3.2. MODULAÇÃO DO SISTEMA DE TRANSPORTE PROTÔNICO EM <i>Ananas comosus</i> COMO RESPOSTA À HIPÓXIA E A SUPLEMENTAÇÃO COM SILÍCIO	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
Condições do crescimento das plantas	40
Determinação dos fluxos de H ⁺ radicular, utilizando o sistema de eletrodos vibráteis íons-seletivos (SIET)	40
Aclimatização das mudas de abacaxi em sistema hidropônico	42
Obtenção da fração mitocondrial e microssomal.....	42
Atividade das H ⁺ -ATPases	43
Monitoramento do gradiente de prótons.....	43
RESULTADOS.....	44
Atividades das bombas protônicas	44
Gradiente de H ⁺	46
Acoplamento das bombas protônicas.....	48
Dinâmica do fluxo de H ⁺	49
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
6. APÊNDICE.....	67

RESUMO

ROCHA, Janiélio Gonçalves da, D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2017. EFEITOS DO SILÍCIO NA ENERGÉTICA E RESPOSTAS A ESTRESSES EM ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L., Merrill) VIA MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE PRÓTONS. Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha; Co-orientador: Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho.

Neste trabalho foi proposto o uso de silício (si) para atenuar os efeitos de estresses inerentes à fase de aclimatização, principalmente seu efeito sobre a deficiência hídrica e anóxia nas folhas e sistema radicular das plantas de abacaxi. As principais bombas protônicas da célula vegetal foram analisadas como marcadores bioquímicos da ação do silício no desenvolvimento das mudas. O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merrill) é uma frutífera que apresenta características peculiares que diferem fisiologicamente da maioria das culturas de cultivo comercial. Dependendo das condições ambientais em que se encontra, pode apresentar um mecanismo fotossintético do tipo C₃ ou CAM. Tal transição pode afetar o desenvolvimento das plântulas micropropagadas, por usualmente serem expostas a diferentes tipos de estresses durante a fase de aclimatação. Neste trabalho de tese, foram realizados dois estudos com plantas de abacaxi em duas condições de estresses de ocorrência comum durante a aclimatização. No primeiro estudo foi avaliado o potencial da suplementação foliar com Si em prover resistência ao estresse hídrico. Plantas tratadas com Si e irrigadas tiveram maior crescimento da parte aérea, mas com menor incremento no número de folhas,

apresentando correlação negativa contrastante com a condição controle que teve estímulo em ambos os parâmetros de crescimento. Entre todos os parâmetros fotossintéticos analisados, a eficiência no uso da água foi o que teve maior efeito para as plantas sob estresse hídrico e adubadas com Si. A suspensão da irrigação induziu a menores taxas na atividade hidrolítica das bombas de prótons, porém as bombas vacuolares elevaram sua eficiência funcional, apresentando um maior acoplamento transporte/hidrólise nestas condições. O tratamento com Si inibiu as atividades das principais bombas eletrogênicas, seguindo uma dinâmica que sugere uma atenuação das ativações induzidas pelo estresse hídrico. Os resultados sugerem que a adubação foliar com Si induz a maior eficiência na utilização da água em plântulas de abacaxi, podendo assim vir a constituir um fator positivo para a aclimatização das mudas, principalmente em condições de déficit hídrico. No segundo estudo, realizaram-se análises do potencial das principais bombas eletrogênicas celulares como marcadores bioquímicos da ação do Si em condições de hipóxia. A dinâmica do fluxo de prótons foi detectada eletrofisiologicamente para estimar a participação da H⁺-ATPase tipo P no transporte de silício em tecidos vivos radiculares do abacaxizeiro. Oscilações transientes do íon H⁺ detectados via sistema SIET (*Scanning Ion-Selective Electrode Technique*), revelaram uma inversão dos influxos de íons H⁺ registrados no controle, para efluxos na presença do Si. O uso do inibidor de ATPases tipo P, ortovanadato de sódio, inibiu reversivelmente tanto o influxo quanto o efluxo de H⁺. Em plântulas submetidas a anóxia, o silício equilibrou a distribuição de energia entre raiz e parte aérea e reduziu a eficiência das bombas eletrogênicas P-ATPase e V-ATPase no sistema radicular, independente das condições submetidas. Tal qual observado no estresse hídrico, o Si também teve efeito antagonista sobre a ativação da H⁺-PPase induzida em condições de anóxia. A atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática e o fluxo de H⁺ encontrado na raiz foram compatíveis com o funcionamento de transportadores eletrogênicos do tipo H⁺/Si, ativos nas membranas das células radiculares. Os resultados evidenciaram o envolvimento do silício na modulação das bombas eletrogênicas, para mitigar os efeitos deletérios sobre a energia das membranas celulares do abacaxi, como resposta à anóxia. Assim, pode induzir a ativação de bombas H⁺ do tipo P-ATPase e inibir transportadores secundários na zona de alongamento desta planta.

ABSTRACT

ROCHA, Janiélío Gonçalves da., D.Sc. State University of North Fluminense Darcy Ribeiro, May 2017. EFFECTS OF SILICON ON ENERGY AND RESPONSES TO STRESSES IN ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L., Merrill) VIA MODULATION OF PROSTATE PUMPS. Advisor: Prof. Arnaldo Rocha Façanha; Co-advisor: Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho.

In this work, the use of silicon (Si) was proposed to attenuate the effects of stresses inherent to the acclimatization phase, mainly its effect on water deficiency and anoxia in the root system of pineapple plants. The main proton pumps of the plant cell were analyzed as biochemical markers of the action of Si in the development of the seedlings. Pineapple (*Ananas comosus* L., Merrill) is a fruit that has peculiar characteristics that differ physiologically from most commercial crops. Depending on the environmental conditions in which it is, it may present a photosynthetic mechanism of type C₃ or CAM. The latter can affect the development of micropropagated seedlings, because they are in conditions of different abiotic and/or biotic stresses during the acclimation phase. In this sense, two experiments were carried out with pineapple plants. In the first work, foliar supplementation with Si in the plants was evaluated as a technique to potentiate the use of water to resistance to water stress. Plants treated with Si and irrigated had higher shoot growth, but with less increase in leaf numbers, the negative correction contrasts with the control condition, which presented a positive correlation. Among all the photosynthetic parameters analyzed, the water use efficiency was the one that had the greatest increase for plants under water stress

and fertilized with Si. The suspension of irrigation induced lower rates in the hydrolytic activity of the proton pumps, but the vacuolar pumps increased their functional efficiency, presenting a greater hydrolysis/transport coupling in these conditions. The treatment with Si had no deleterious effect on the activity of the main electrogenic pumps, showing only a tendency to attenuate the changes caused by water stress. The results suggest that the foliar fertilization with Si induces the greater efficiency in the use of water in pineapple seedlings, and may be a positive factor for the acclimatization of the seedlings, especially in conditions of water deficit. In the second work an analysis of the main cellular electrogenic pumps as biochemical markers of the action of Si under conditions of anoxia was carried out and the participation of H⁺-ATPase type P in the transport of Si in live pineapple root tissue was evaluated electrophysiologically. To determine the proton flux dynamics, the SIET (*Scanning Ion-Selective Electrode Technique*) system was used. Transient H⁺ ion oscillations detected by SIET revealed positive voltages (μV) in the presence of Si. Sodium orthovanadate, a P-type ATPase inhibitor, reversibly inhibited H⁺ efflux. Seedlings subjected to anoxic conditions, silicon balanced the energy distribution between root and shoot. However, it reduced the efficiency of the P-ATPase and V-ATPase electrogenic pumps in the root system, regardless of the submitted conditions. It is also seen that Si applied under stress conditions had a remedial effect on H⁺-PPase hydrolysis. The relationship between the hydrolytic activity of P-ATPase and the efflux found in the root, leads to energy-driven transporters, located in the plasma membranes of the root cells. The results evidenced the involvement of silicon in the modulation of the electrogenic pumps, to mitigate the deleterious effects on the energy of the pineapple cell membranes, as one of the responses to anoxia. Thus, it can induce the activation of H⁺ pumps of the P-ATPase type and inhibit secondary transporters in the zone of elongation of this plant.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do abacaxizeiro vem apresentando ótimo desempenho econômico no cenário nacional e internacional, com o Brasil figurando entre os maiores produtores mundiais desta fruta (FAO, 2014). Todavia, em face da demanda interna e da competitividade internacional, torna-se necessário o desenvolvimento de práticas culturais que promovam incrementos constantes na produtividade e rendimentos.

O abacaxi é cultivado há muitas décadas na maioria dos estados brasileiros, principalmente em pequenas propriedades onde se emprega mão-de-obra familiar (Cunha et al., 1999; Matos & Reinhardt, 2009). No contexto social e econômico, a abacaxicultura absorve mão-de-obra pouco qualificada, que vem colaborando na fixação das famílias no campo e gerando emprego e renda nos setores rural e urbano (Crestani et al., 2010). Os métodos de propagação utilizados ainda são majoritariamente bem precários, havendo coletas de material vegetal direto do campo para a produção de mudas, com alto risco de obter filhotes e rebentões pós-colheita, contaminados com doenças ou pragas (Bartholomew et al., 2002; Reinhardt & Cunha, 2006).

A produção agrícola constitui uma atividade econômica de altos riscos devido a intempéries diversas englobando vários estresses. Apesar de fisiologicamente tolerante, o abacaxizeiro apresenta períodos mais susceptíveis à déficits hídricos, tanto nos estádios do crescimento vegetativo, quanto no reprodutivo, comprometendo a produtividade, peso médio e a qualidade comercial

dos frutos (Neild & Boshell, 1976; Almeida et al., 2002; de Azevedo et al., 2007; Carr, 2012).

O abacaxizeiro também é descrito como muito sensível a anóxia, por isto boas condições de aeração e de drenagem do solo são exigências básicas para evitar perdas de produtividade (Souza & Reinhardt, 2009). Com a falta de oxigênio no sistema radicular, ocorre redução das taxas de respiração celular e produção aeróbica de ATP, o qual passa a ser produzido basicamente via glicólise e fermentação (Sousa & Sodek, 2002; Gibbs & Greenway, 2003; Taiz & Zeiger, 2013).

Plântulas micropropagadas apresentam problemas de estresse hídrico após serem transferidas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, requerendo um período de aclimação para as condições de cultivo em campo (Braga et al., 2011; Moreira et al., 2006; Asmar et al., 2013). De fato, uma planta aparentemente perfeita *in vitro* pode apresentar deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, induzindo a rápida perda de água (Barboza et al., 2006). Em alguns casos, os estômatos não são funcionais ou respondem de forma ineficiente, a cera epicuticular é delgada ou não existe (Braga et al., 2011; Asmar et al., 2013). Segundo estes mesmos autores, a dificuldade de transição do mecanismo heterotrófico para autotrófico destas plantas, em virtude de alterações fisiológicas e energéticas, requer uma investigação mais aprofundada e integrativa, para aprimorar o processo de aclimatização tornando-o economicamente viável e mais eficiente.

Apesar do Si não ser, em geral, considerado um dos elementos essenciais para as plantas, já que podem cumprir seus ciclos vitais sem sua presença, práticas culturais com este elemento estão sendo cada vez mais utilizadas para aumentar o grau de resistência delas (Arnon & Stout, 1939; Epstein, 1999; Liang et al., 2015). Outros estudos tratam o Si na agricultura como um elemento “quase essencial” devido aos resultados promissores no desenvolvimento de resistência a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos, principalmente em monocotiledôneas (Ma et al., 2001; Liang et al., 2007, 2015; Cooke & Leishman, 2011; Van Bockhaven et al., 2013).

Mesmo em condições de cultivo ideais, efeitos benéficos do Si sobre o crescimento de muitas espécies de plantas têm sido relatados em arroz (Mauad et al., 2003; Pereira et al., 2004; Camargo et al., 2007); cana-de-açúcar (Savant et

al., 1999; Datnoff et al., 2001; Tubana et al., 2016), milho (Rohanipoor et al., 2013), batata (Pulz et al., 2008), dentre outras.

O Si é absorvido na forma de H_4SiO_4 (ácido monossilícico) e se acumula nos tecidos das plantas. Em gramíneas foram identificados genes específicos na absorção do Si (*Ls1* e *Ls2*), que codifica transportadores específicos no sistema radicular, integrando um sistema de absorção de Si que apresenta componentes de transporte ativo e passivo nessas plantas (Ma & Yamaji, 2008).

A hipótese que fundamentou esta tese é que a adubação com SiO_2 modula o metabolismo energético e/ou a sinalização iônica em plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L., Merrill), interferindo na atividade das bombas de prótons (H^+ -ATPases tipo P, V e F; e H^+ -PPases). E um estudo integrado envolvendo análises bioquímicas, biofísicas e fisiológicas, foi empreendido para prover um maior entendimento do efeito Si sobre estas bombas de prótons, visando elucidar mecanismos adaptativos que uma vez acionados nas plantas de abacaxi pela adubação por Si, levariam a um maior controle no desenvolvimento das mudas.

Durante a fase de aclimatização de plântulas micropropagadas, além do uso de mudas de boa procedência, sadias e vigorosas, técnicas agronômicas inovadoras têm sido testadas. Neste contexto, a suplementação com Si emerge como uma estratégia para atenuar os efeitos de estresses inerentes a fase de aclimatização, principalmente seu efeito sobre a deficiência hídrica e anóxia no sistema radicular das plantas de abacaxi, focalizando aspectos do metabolismo energético e sinalização iônica, com o propósito de sustentabilidade e ganhos socioeconômicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Abacaxizeiro

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merrill) pertence à família das Bromeliaceae do gênero *Ananas*, que compreende espécies cultivadas, bem como espécies silvestres (Collins, 1960). É considerada uma planta herbácea, monocotiledônea e bem adaptada a climas tropicais tendo como centro de origem os países da América do Sul, provavelmente o Brasil, por abrigar a maior variabilidade genética dentro da espécie (Neild & Boshell, 1976; Bartholomew et al., 2002).

A formação de frutos do abacaxizeiro se dá a partir da gema terminal, enquanto as gemas axilares do caule formam as mudas que vão gerar as novas plantas (Hepton, 2002). A planta é composta de caule curto e grosso, onde crescem folhas em forma de calha, estreitas e rígidas, e no qual também se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, geralmente limitado à profundidade de 0 a 30 cm da superfície do solo. (Bartholomew et al., 2002; Souza & Reinhardt, 2009). Além disso, as mudas para a propagação da fruteira se desenvolvem a partir de gemas axilares localizadas no caule (rebentões) e no pedúnculo (filhotes), que representam o material mais utilizado em plantios de abacaxi (Hepton, 2002). A propagação também pode ser obtida a partir do seccionamento do caule e por micropropagação, neste caso, sob condições assépticas de laboratório e em meio de cultura (Cunha et al., 1999; Smith et al., 2002; Mhatre, 2007).

As plantações com esta frutífera encontram-se praticamente em todas as regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das fruteiras tropicais mais produzidas no mundo, ficando atrás somente da banana e dos citros (Rohrbach et al., 2002). Segundo dados da FAO (2014), as maiores produções concentraram-se na Tailândia, Costa Rica, Brasil, Filipinas, Indonésia, Índia, Nigéria e China. No Brasil, quase todas as regiões produzem abacaxi, principalmente as regiões Nordeste e Sudeste, sendo que o Pará, Paraíba, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro são os maiores produtores nacionais (IBGE, 2016).

No Brasil e no mundo, a produção comercial é baseada nas variedades Singapore Spanish, Queen, Española Roja, Pérola e Smooth Cayenne (Crestani et al., 2010). Entre estas variedades de abacaxi, as mais cultivadas no Brasil são: Smooth Cayenne e Pérola. (Reinhardt et al., 2001). Por outro lado, tanto a 'Smooth Cayenne' quanto a 'Pérola', são suscetíveis à fusariose (*Fusarium subglutinans* sp. *ananas*), principal moléstia da cultura do abacaxi no Brasil. Sendo responsável por 30 a 80% de perdas dos frutos e 15 a 20% de mudas (Reinhardt et al., 2000; Crestani et al., 2010). No entanto, outras cultivares como 'Perolera', 'Primavera', 'Roxo de Tefé', 'Imperial', 'Alto Turi', 'IAC Fantástico' e 'Vitória' vêm sendo cultivadas no Brasil, apresentando resistência à fusariose (Aquiye et al., 2010; Ventura et al., 2010).

O abacaxizeiro é uma planta de clima tropical, com crescimento ótimo e melhor qualidade de frutos na faixa de temperatura de 22 a 32°C, com amplitude térmica diária de 8 a 14°C. A planta é seriamente prejudicada por geadas, mas suporta períodos com baixa temperatura, porém superiores a 0°C (Souza & Reinhardt, 2009). De acordo com esses mesmos autores, esta planta é exigente em luz, com insolação anual ótima de 2.500 a 3.000 horas, ou seja, 7 a 8 horas de brilho solar por dia. A umidade relativa do ar ideal média anual é de 70% ou superior (Bartholomew et al., 2002; Crestani et al., 2010; Souza & Reinhardt, 2009).

Do ponto de vista de Carr (2012), uma das principais características do abacaxizeiro é sua adaptação a áreas de baixa pluviosidade. Ela difere da maioria dos outros cultivos comerciais, pois dependendo das condições ambientais em que se encontra, essa planta apresenta o metabolismo do carbono tipo C₃ ou do tipo MAC (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), adaptação fotossintética que facilita a absorção e fixação de dióxido de carbono (CO₂) à noite. Isso melhora a

eficiência no uso da água quando é cultivado sob condições de estresse hídrico. A falta de água atrasa o desenvolvimento da planta e do fruto (Souza & Reinhardt, 2009).

Há pouca informação sobre os efeitos do déficit hídrico no crescimento vegetativo dessa planta, porém, tanto o excesso quanto a baixa disponibilidade de água no solo podem ser prejudiciais. Sob condições de baixa disponibilidade de água no solo, as raízes do abacaxizeiro paralisam seu crescimento e apresentam suberização de sua extremidade. A parte aérea desenvolve sintomas de murcha, caracterizados pela mudança de cor das folhas, que passam de verde à amarelada e por fim avermelhada, perde a turgescência e se apresentam compridas, estreitas e com os bordos enrolados para baixo (Malézieux et al., 2002).

2.2. O Silício

O Si é o segundo elemento mais abundante da litosfera, junto com o oxigênio representa 50-70% da crosta terrestre (Ma & Yamaji, 2008). No entanto, por causa dos cultivos intensos, os solos podem reduzir rapidamente a disponibilidade deste elemento para as plantas (Korndörfer, 2006).

Na crosta terrestre, elementos químicos como O, Si, Al, Fe, Ca, K, Na e Mg, são facilmente encontrados, sendo que os minerais mais comuns contêm Si e oxigênio na estrutura cristalina, constituindo o grupo de minerais denominados silicatos. A unidade fundamental de formação dos silicatos é o tetraedro de silício, com a composição de SiO_4^{4-} , onde o átomo de Si está coordenado a quatro átomos de oxigênio (Meurer, 2010).

No solo, o Si é encontrado sob diferentes formas, podendo ser oriundo da decomposição da matéria orgânica (Si "biogênica") ou da decomposição das estruturas dos minerais silicatados (Si "estrutural") (Korndörfer, 2006). Na solução do solo, encontra-se o Si como ácido silícico ou ácido mono silícico (H_4SiO), a sua concentração pode variar de 0,1 a 0,6 mM, a qual é da ordem de 100 a 1000 vezes maior que a do fosfato (Epstein, 1994, 1999; Ma et al., 2001). Podendo variar a concentração conforme a constituição do solo, solos mais argilosos apresentam maiores quantidades de Si na solução do que os solos arenosos. Neste, a constituição principal é a fração areia, rica em quartzo (SiO_2), estrutura

química de difícil decomposição (Matichenkov & Bochamikova, 2001; Liang et al., 2015).

Nos solos tropicais e subtropicais, geralmente possuem baixos teores de Si disponíveis para as plantas. Os sistemas intensivos e a monocultura contribuem para a deficiência do elemento no solo, o que pode limitar a produção das lavouras (Ma et al., 2001). Os principais drenos de Si incluem a polimerização do ácido silícico, lixiviação, adsorção por óxidos e hidróxidos de Fe e Al e principalmente a absorção pelas plantas (Korndörfer, 2006). Outra perda do Si ocorre por lixiviação, fenômeno este que é conhecido como dessilicatização. Assim, a principal disponibilidade natural de Si para as plantas, nestes solos, são provavelmente os restos culturais (Liang et al., 2015).

A solubilização de Si no solo ocorre por meio dos exsudatos das raízes de plantas que interagem com os minerais do solo (silicatados), disponibilizando assim o elemento para a absorção, principalmente sob a forma de ácido silícico ($\text{Si}(\text{OH})_4$) (Epstein, 1994). A variação no pH do solo, influencia a quantidade de Si disponível para as plantas, sendo a melhor faixa de absorção o pH 4,0 a 6,5. Já acima de 8,5 a sua disponibilidade diminui, isto é, devido à sua conversão em sais de silicato (Jones & Handreck, 1965).

De acordo com Liang et al. (2015), os ânions de silicato podem aumentar o pH do solo, contribuindo na redução da atividade dos elementos tóxicos, precipitando-os em compostos insolúveis ou formando polímeros de baixa disponibilidade para as plantas.

2.3. Silício na planta

O Si é absorvido pelo sistema radicular das plantas através do fluxo de massa, sob a forma de H_4SiO_4 . É depositado principalmente nas paredes das células da epiderme como sílica amorfa hidratada ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), também conhecida como opala biogênica. O Si é um elemento que não causa danos graves as plantas e pode proporcionar vários benefícios (Richmond & Sussman, 2003; Korndörfer, 2006; Guével et al., 2007).

As concentrações de Si em plantas variam de 0,1% a 10% de peso seco, dependendo da espécie (Epstein, 1999; Richmond & Sussman, 2003; Hodson et al., 2005). Com base nestas concentrações, diferentes espécies de plantas são classificadas em 3 grupos: acumuladoras (gramíneas de terrenos úmidos),

intermediários (gramíneas de terrenos secos) e as não acumuladoras (dicotiledôneas) (Richmond & Sussman, 2003; Korndörfer, 2006; Ma & Yamaji, 2008). Segundo Ma & Yamaji (2006), a planta de arroz é uma típica gramínea acumuladora de Si, podendo chegar até 10% do seu peso seco. Este valor pode ser até maior do que os macronutrientes essenciais como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). Entre as espécies de gramíneas, a capacidade das raízes de arroz absorver Si é muito mais elevada do que a de outras espécies de gramíneas, incluindo cevada, milho, centeio, sorgo e trigo (Ma & Yamaji, 2008).

O ácido monossilícico, depois de absorvido pelas plantas é depositado principalmente nas paredes das células da epiderme, estômatos e tricomas ou junto com outros elementos (Epstein, 1999; Richmond & Sussman, 2003; Ma, 2004; Korndörfer, 2006). A distribuição de Si na parte aérea é influenciada por vários fatores dentre eles idade da planta, pois o Si acumula-se nos tecidos mais velhos, já que este elemento não é móvel dentro das plantas; pela transpiração, a deposição de Si junto à cutícula das folhas confere proteção às plantas e ameniza os efeitos de estresses de natureza biótica e abiótica (Epstein, 1999; Ma & Yamaji, 2006).

O Si também confere uma maior rigidez estrutural aos tecidos; reduz o acamamento; ameniza a toxidez de Fe, Mn, Al e Na; diminui a incidência de patógenos e aumenta a proteção contra herbívoros, incluindo os insetos fitófagos (Figura 1) (Epstein, 1999; Ma, 2004; Korndörfer, 2006).

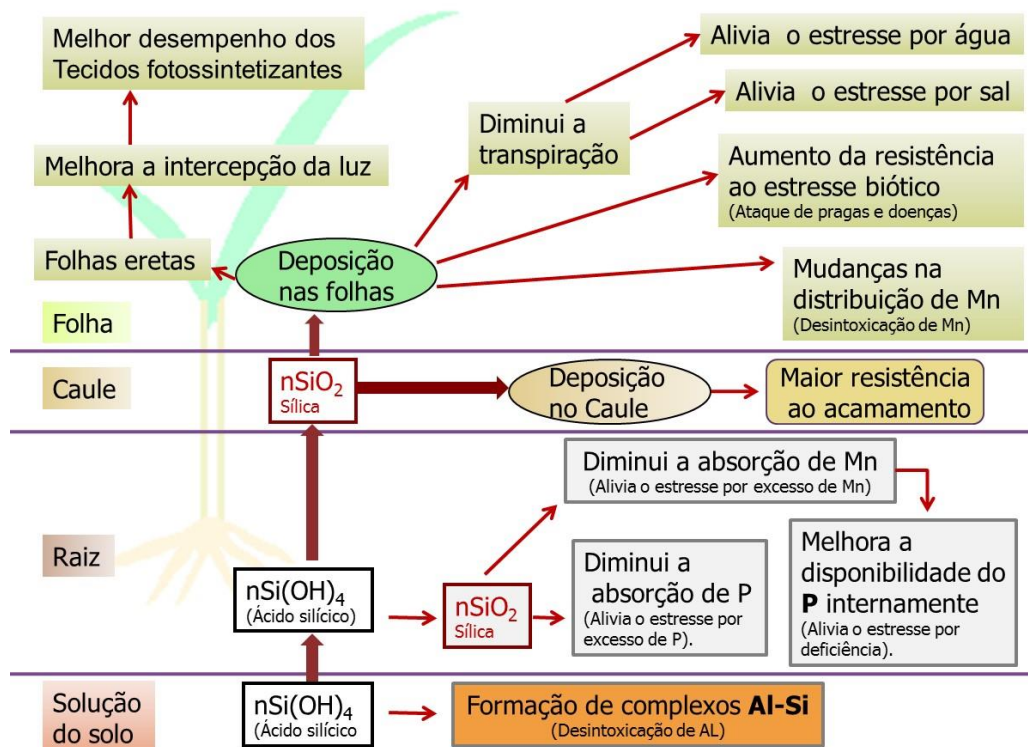


Figura 1: Esquema representativo do ácido mono silícico ($n\text{Si}(\text{OH})_4$) na solução do solo, raiz, caule e folhas de plantas monocotiledôneas (Adaptado de Ma (2004)).

Contudo, em algumas plantas monocotiledôneas foram identificados genes (*Lsi1*, *Lsi2* e *Lsi6*) específicos em sintetizar proteínas de membranas que atuam no mecanismo de absorção do Si (Ma et al., 2006, 2007; Mitani et al., 2009; Ma et al., 2011). Segundo Mitani et al. (2005), a ausência de carga elétrica no transporte desse elemento, da solução do solo para o xilema, envolve transportadores dependentes de energia. Os transportadores *Lsi1* e *Lsi2* foram localizados nas raízes de plantas de arroz, também identificados seus homólogos em cevada e no milho. Estão envolvidos diretamente no transporte de Si, atuando nas membranas plasmáticas da célula da endoderme e exoderme das raízes (Figura 2) (Ma et al., 2006, 2007; Chiba et al., 2009; Mitani et al., 2009). Por outro lado, o transportador *Lsi6* foi identificado com maiores atividades nas células do parênquima do xilema de folhas e nós das plantas de arroz (Yamaji et al., 2008; Ma et al., 2011). Os transportadores *Lsi1* e *Lsi6* pertencem à família aquaporina (Ma & Yamaji, 2006; Chiba et al., 2009), enquanto o *Lsi2* é um transportador impulsionado pelo gradiente de próton. Portanto, o funcionamento dos transportadores *Lsi1* e *Lsi2*,

produz um fluxo eficaz de Si na exoderme e endoderme para sobrepor a barreira de Estrias de Caspari (Ma et al., 2006, 2007; Ma & Yamaji, 2008).

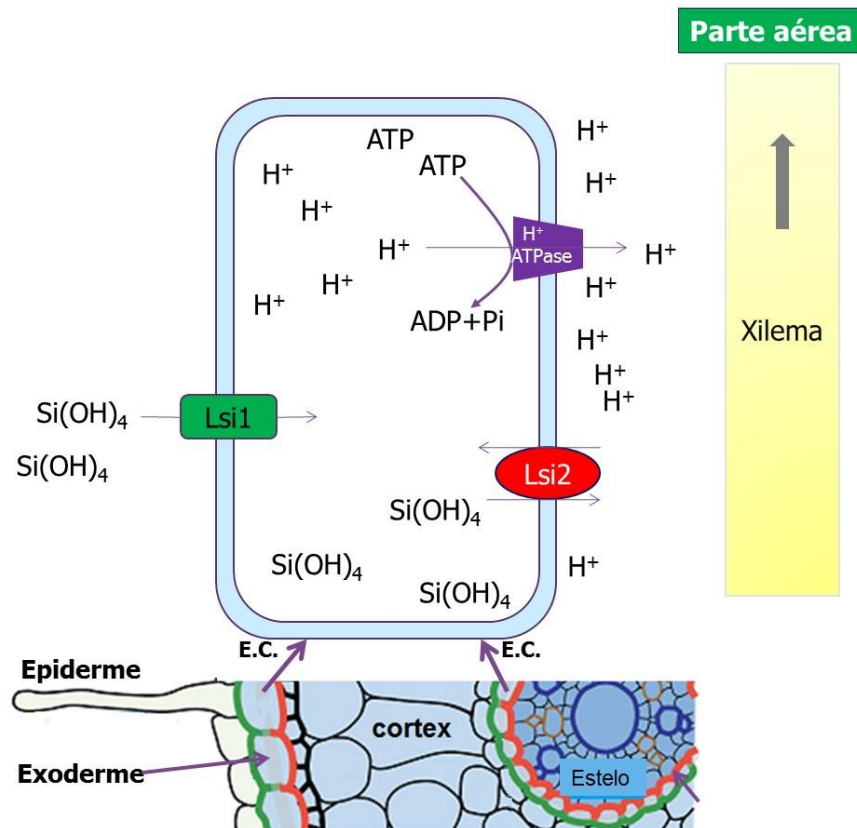


Figura 1: Transporte do ácido mono silícico ($n\text{Si}(\text{OH})_4$) pelos transportadores Lsi1 e Lsi2, localizados em raízes de plantas de arroz, atuando nas membranas plasmáticas da célula da endoderme e exoderme das raízes (E.C. - Estrias de Caspari). (Adaptado de Ma & Yamaji, 2008).

Toda a produção de fitomassa é influenciada por características morfológicas e fisiológicas dos órgãos fotossintetizantes (folhas), e também do consumo dos metabólitos (carboidratos). Com isso, buscar mais informações sobre a fisiologia das plantas de abacaxi se torna de fundamental importância, e uma forma mais apropriada para estudá-la é conhecer os mecanismos de atividade e hidrólise das bombas de prótons. Apesar de vários trabalhos sobre os efeitos positivos do Si para muitas culturas agrônomicas, não há estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares sobre a especificidade deste elemento nos mecanismos de absorção e efeitos causados nas bombas de prótons, em função da nutrição com silício (SiO_2) em plantas de abacaxi.

2.4. Bombas transportadoras de H⁺

As bombas são proteínas integrais de membranas ativadas por energia química (ATP e PPI), que estão localizadas na membrana plasmática (H⁺-ATPase do tipo P), no tonoplasto (H⁺-ATPases do tipo V e as H⁺-PPases) e na mitocôndria (H⁺-ATPases do tipo F) (Futai et al., 2004).

As células vegetais apresentam parede celular externa, rígida e composta de material inerte, e uma membrana interna, constituída por material lipoproteico, que é chamada de Plasmalema ou membrana plasmática (Fernandes & Souza, 2006; Broadley et al., 2012). Durante o processo de absorção dos nutrientes, estes terão que atravessar a parede e a membrana celular em algum momento, isto só é possível através das bombas de prótons localizadas na membrana (Sondergaard et al., 2004).

As H⁺-ATPases tipo P são glicoproteínas transmembrana de aproximadamente 100 kDa com 10 hélices, que utilizam a energia liberada pela hidrólise do ATP para transportar prótons através da membrana, gerando um movimento vetorial de H⁺ em direção ao apoplasto, criando assim, gradientes de pH e potencial elétrico na membrana, o que viabiliza o transporte de íons e moléculas para dentro ou fora da célula através de sistemas de transporte ativo secundário (Taiz & Zeiger, 2013).

Essas bombas eletrogênicas tipo P são fortemente inibidas por ortovanadato (HVO₄²⁻), um íon análogo ao fosfato (HPO₄²⁻) que compete com o fosfato do ATP pelo sítio de fosforilação de um resíduo de aspartato na enzima. Isso ocorre porque o ortovanadato é muito parecido com a estrutura do fosfato no momento da hidrólise (Sze et al., 1999).

As H⁺-PPases estão localizadas na membrana vacuolar (tonoplasto), no Golgi, e na membrana plasmática (Gaxiola et al., 2007). Utiliza o subproduto natural das reações biossintéticas, o pirofosfato (PPI) como fonte de energia, acidifica o interior do lúmen do vacúolo na célula de plantas, gerando gradiente transmembranar (Fuglsang et al., 2011). Nas plantas, são frequentemente encontradas duas isoformas, uma isoforma dependente de potássio e outra que não depende (Serrano et al., 2007; Gaxiola et al., 2007; Paez-valencia et al., 2011).

As V-ATPases formam um complexo de múltiplas subunidades, com massa molecular maior que 700 kDa composta de dois domínios estruturais: o periférico

(V_1), constituído por oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G e H), responsável pela hidrólise do ATP; e o integral (V_0) com seis subunidades (a, c, c', c'', d e e). Juntos são os responsáveis pela translocação de prótons (Kawasaki-Nishi et al., 2003; Gaxiola et al., 2007). As três subunidades (A, B, c) são as mais importantes para o funcionamento da bomba. Segundo Forgac (1998), o complexo V_1 é um hexamero constituído de três cópias de cada uma das subunidades A e B, enquanto as demais subunidades não apresentam cópias. Já o complexo V_0 , contém três subunidades c, c', c'' que são proteolípídeos altamente hidrofóbicos que atravessam a membrana formando o canal de prótons (Inoue et al., 2005).

A V-ATPase é responsável pela acidificação vacuolar, ela usa a energia liberada durante a hidrólise do ATP para bombear próton para o interior do lúmen, criando um gradiente de potencial eletroquímico, e a força próton motriz para uma variedade de eventos de transporte de íons e metabólitos (Jefferies et al., 2008; Yao et al., 2007). A função fisiológica da V-ATPase é afetada com inibidores específicos, como a Bafilomicina A_1 e Concamicina A (Xiao et al., 2008). Estes compostos inibem a atividade da bomba em diferentes organismos na faixa de nanomolar, ligando-se ao domínio V_0 e impedindo o fluxo de prótons através do canal de prótons da enzima (Dietz et al., 2001).

Contudo, a relação entre as V e F-ATPases é evidente tanto na estrutura geral dos complexos como também na sequência de certas subunidades. A microscopia eletrônica de mapas de baixa resolução, combinadas com estruturas atômicas das unidades individuais determinadas por cristalografia de raio-X, mostram que a estrutura geral das duas bombas são muito semelhantes, sugerindo que elas podem compartilhar a semelhança no funcionamento do projeto mecânico (Kawasaki-Nishi et al., 2003; Gaxiola et al., 2007).

As F_1F_0 -ATP sintase que são encontradas nas membranas dos tilacoides nos cloroplastos, membrana interna da mitocôndria e estão presentes também nas membranas de bactérias, é responsável pela síntese de ATP na etapa terminal da fosforilação oxidativa (Inoue et al., 2005; Taiz & Zeiger, 2013). Além disso, funciona em pH ótimo de 8.0 e 9.0, podendo ser inibida pela oligomicina e pela azida (Wieczorek et al., 1999).

3. TRABALHOS

3.1. EFEITOS DO SILÍCIO NA FOTOSÍNTESE E SISTEMA PRIMÁRIO DO TRANSPORTE H⁺ DE ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus* L., MERRILL)

RESUMO

O silício (Si) é um elemento considerado benéfico para várias espécies de plantas, promovendo a resistência a diferentes tipos de estresse. Neste estudo, investigou-se a suplementação de Si em abacaxi (*Ananas comosus* L. Merril) micropropagado, como estratégia para potencializar o uso da água, a resistência a estresses e reduzir o tempo de aclimatização das mudas. As plantas de abacaxi fertilizadas com silício exibiram maior eficiência no uso da água sob estresse hídrico. Os tratamentos de Si não afetaram a atividade das principais bombas eletrogênicas H⁺, mas parece atenuar as mudanças induzidas pelo estresse hídrico. A suspensão da irrigação induziu uma redução significativa da atividade hidrolítica das bombas de prótons, no entanto, a H⁺-ATPase vacuolar aumentou sua eficiência funcional, apresentando um maior acoplamento de hidrólise/transporte nestas condições. Tomados em conjunto, os dados sugerem que a adubação foliar com Si induz uma maior eficiência na utilização de água em mudas de abacaxi e contribui para a aclimatização das mudas, especialmente em condições de déficit hídrico.

Palavras-chave: Silicatos, bombas de H⁺, bromeliácea, estresse hídrico

ABSTRACT

Silicon (Si) is an element considered beneficial to several plant species, promoting resistance to different types of stress. In this study, we investigated Si supplementation in micro propagated pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill), as a strategy to enhance water stress resistance and reduce the time of seedlings acclimatization. Silicon fertilized pineapple plants exhibited a huge improvement in their water use efficiency under water stress. The Si treatments did not effected the activity of the main electrogenic H⁺ pumps, but seems to attenuate the changes induced by water stress. Suspension of irrigation also induced a significant reduction of the hydrolytic activity of the proton pumps, however, the vacuolar H⁺-ATPase increased their functional efficiency, presenting a higher hydrolysis/transport coupling under these conditions. Taken together the data suggest that the foliar fertilization with Si induces a greater efficiency in the use of water in pineapple seedlings, and contributes to the acclimatization of the seedlings, especially in conditions of water deficit.

Keywords: Silicates, ion pumps, bromeliacea, hydric stress

INTRODUÇÃO

O abacaxi é a terceira fruta tropical mais importante na produção mundial, logo após banana e citrinos (Bartholomew et al., 2002), sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais da fruta (FAO, 2014). Porém, a produtividade nacional é considerada baixa e o país tem pequena cooperação no mercado de exportação (Reinhardt et al., 2002).

O processamento do abacaxi em produtos de exportação tornou a fruta bem conhecida em todo o mundo. No entanto, aproximadamente 70% do fruto produzido no mundo é consumido como fruta fresca no país de origem (Rohrbach et al., 2002).

No Brasil, a variedade Pérola lidera o mercado, responsável por cerca de 80% da produção brasileira, devido ao seu sabor exótico (Matos & Reinhardt,

2009). Porém, a susceptibilidade à doença fusariose, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme*, tem ocasionado perdas na cultura brasileira de aproximadamente de 30 a 40% dos frutos e prejuízo de até 20% das mudas (Ventura et al., 2009).

O surgimento de genótipos de abacaxizeiro 'BRS Imperial' (Cabral & Matos, 2009) e 'BRS Vitória' (Ventura et al., 2009) resistentes à fusariose, por si só não garante almejar sucesso comercial para a abacaxicultura. É fundamental a utilização de técnicas adequadas de propagação e manejo das plantas durante o processo de climatização, com a finalidade de proporcionar qualidade e ganhos econômicos ao produtor.

Os métodos de propagação utilizados ainda são, em sua grande maioria, os tradicionais (Bartholomew et al., 2002). Implantar o pomar com material obtido a partir de propágulos pós-colheita, em geral, ocasionam problemas como desuniformidade de tamanho, florescimento, número de filhotes e rebentos limitados, e redução da qualidade fitossanitária (Cunha et al., 1999; Reinhardt et al., 2000). Esses problemas podem ser reduzidos quando a muda é *produzida in vitro*, a partir das gemas axilares e/ou meristemáticas (Be & Debergh, 2006).

O abacaxizeiro apresenta características muito peculiares, adapta-se a diversas condições ambientais e oferece oportunidades e desafios para os produtores que o cultiva com finalidade comercial (Sanchez & Matos, 2013). A sua adaptação a condições de deficiência hídrica decorre de respostas fisiológicas e características morfológicas, tais como: a capacidade de reduzir as perdas de água por transpiração, cutícula espessa, baixa densidade estomática e folhas na forma de canaletas para coletar água (Cunha et al., 1999).

A característica de alternar a fixação fotossintética do tipo C3 para MAC (Metabolismo Ácido das Crassuláceas) favorece o seu crescimento em condições ecológicas que são desfavoráveis para a maioria das plantas cultivadas, embora possa resultar numa baixa produtividade (Almeida & Souza, 2011). De acordo com Osmond (1978) o metabolismo MAC pode ser dividido em quatro fases: Fase I abertura estomática noturna, com a captura, fixação e armazenamento do CO₂ como ácido málico nos compartimentos vacuolares. A fase III, o período diurno que os estômatos estão quase todos fechados, com a remobilização do CO₂ e sua assimilação. Nas fases II e IV, os estômatos fecham de forma progressiva no início da manhã, com início do processo de descarboxilação do malato e sua

abertura no final da tarde, quando as reservas de malato já estão quase esgotadas. Fatores ambientais e endógenos podem contribuir para a extensão da fase (II e IV), assim, o CO₂ pode ser capturado e assimilado pela Rubisco (metabolismo C₃), com isso pode ter contribuição na produtividade das plantas (Lüttge, 2008).

Mudas produzidas via cultura de tecidos proporcionam grandes quantidades de plântulas de abacaxi com procedência controlada. No entanto, requerem um período de aclimatização para as condições de cultivo em campo, pois podem apresentar problemas de estresse hídrico após serem transferidas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (Moreira et al., 2006; Braga et al., 2011; Asmar et al., 2013). Em alguns casos, os estômatos não são funcionais ou respondem de forma ineficiente, a cera epicuticular é delgada ou não existe (Barboza et al., 2006; Braga et al., 2011; Asmar et al., 2013). Na direção de superar as dificuldades de transição do mecanismo heterotrófico para autotrófico destas plantas, investigações mais aprofundadas e integrativas do metabolismo energético são necessárias para aprimorar o processo de adaptação, tornando-o economicamente viável e mais eficiente.

Apesar do Si não ser considerado elemento essencial (Arnon & Stout, 1939; Epstein, 1999), o seu uso na agricultura tem proporcionado resultados promissores no desenvolvimento de resistência a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (Ma et al., 2001; Ma & Yamaji, 2008). Efeitos benéficos do Si têm sido relatados, mesmo em condições de cultivo ideais em espécies, como em arroz (Mauad et al., 2003; Pereira et al., 2004; Camargo et al., 2007), cana-de-açúcar (Savant et al., 1999; Camargo et al., 2013), batata (Pulz et al., 2008), banana (Asmar et al., 2013), dentre outras.

O uso de materiais silicatados como fertilizantes teve início no Japão no início de 1950 e sua utilização tem se expandido desde então, chegando nos dias atuais a diferentes partes do mundo, como na Coreia do Sul, Taiwan, Tailândia, Estados Unidos (EUA), Brasil, Austrália e África do Sul (Meyer & Keeping, 2001; Guntzer et al., 2012). No Brasil, o Si foi incluído na lista de micronutrientes como fertilizante a partir do decreto lei nº 4.954 que regulamenta a lei 6.894, aprovado em 2004, que dispõe sobre a produção e comercialização de fertilizantes (BRASIL, 2004).

No presente estudo, investigou-se o potencial da suplementação com Si por aspersão foliar em plantas de abacaxi 'Vitória' micropropagado, como estratégia para potencializar o uso da água, a resistência ao estresse hídrico e processo de aclimatização, visando contribuir para a sustentabilidade da produção de abacaxi.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições do crescimento das plantas

O experimento foi realizado sob condições ambientais controladas no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), com regime de luz 12h/12h (luz/escuro), com luminosidade de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 50% e temperatura 28/24°C (diurna/noturna). Foram utilizadas Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar "Vitória" provenientes de cultura de tecidos adquiridas no Laboratório de Biotecnologia BIOMUDAS, localizado em Venda Nova do Imigrante-ES. Com a finalidade de limpar e homogeneizar as raízes. Todo o sistema radicular das plântulas foi removido e transplantadas duas plântulas para cada vaso com 500 ml de substrato comercial, onde ocorreu a regeneração do sistema radicular. Todas as plantas foram adubadas nos dois primeiros meses com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) a 1/2 força iônica (FI).

A irrigação foi com água deionizada uma vez ao dia, diretamente no substrato até atingir a saturação em torno de 150 ml. Após o período de adaptação, 120 dias, foram feitas duas aplicações via foliar da solução de Hoagland & Arnon (1950) a 1/5 força iônica (FI) com ou sem Si (1,5 mM), no período de 30 dias. Após 15 dias da última aplicação, seguiram-se os tratamentos com restrição hídrica (Tabela 1). As soluções foram calibradas para o pH 5,7 com HCl ou NaOH.

Tabela 1: Esquema de condução do experimento com plantas de abacaxi “Vitória”, em função da aplicação via foliar de silício e restrição hídrica em condições controladas.

Transplântio	1ª Apl.	2ª Apl.	Água	
Substrato comercial (Basaplant®)	0,0 mM SiO ₂	0,0 mM SiO ₂	+	Parâmetros Biométricos;
	1,5 mM SiO ₂	1,5 mM SiO ₂	-	Parâmetros Fotossintéticos;
			+	Extração vesicular mitocondrial e microssomal.
			-	
120 dias	15 dias	15 dias	28 dias	Medições e coleta

Parâmetros fotossintéticos

Aos 28 dias após a restrição hídrica, as plantas apresentaram sinais visuais de estresse. Neste momento, foram mensuradas as taxas de fotossíntese (A), condutância estomática (Gs), transpiração (E), Carbono interno (Ci), relação entre as concentrações interna e externa de CO₂, (Ci /Ca) e Déficit de Pressão de Vapor entre a folha e o ar (DVP folha-ar KPa), sendo para isso, utilizado LI-6400XT *Portable Photosynthesis System* (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Tais avaliações foram feitas as 09:00, 16:00 e 21:00 h. A medição foi feita na parte central da folha D e utilizou-se luz artificial por meio de LED`s vermelhos a uma intensidade de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir dos dados de trocas gasosas foi determinada a relação da eficiência intrínseca no uso da água ((WUE (A/Gs)) e a eficiência instantânea no uso da água ((WUE (A/E)).

Obtenção da fração mitocondrial e microssomal

Foram coletadas 3 g de folhas da parte basal pouco clorofilada para evitar artefatos nas técnicas colorimétricas, e as frações mitocondriais e microssomas foram separadas por centrifugação diferencial essencialmente como descrito por Façanha & de Meis (1998), com menores modificações. As amostras foram maceradas e homogeneizadas em meio tamponado, composto por 250 mM L⁻¹ de sacarose, Glicerol (10%), 2 mM de DTT, 5 mM EDTA, PVP-40 (0,4%), 100 mM KCl, BSA (0,3%), 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina, 50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), na relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2. O homogenato foi filtrado e submetido à primeira centrifugação a 1500 xg por 15 minutos, para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido à nova centrifugação, 10.000 xg por 15 minutos. O pellet, fração mitocondrial, foi

ressuspenso em 2,5 mL de solução tampão HEPES-NAOH (pH 7,5) com: Glicerol a 10%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM. O sobrenadante desta última centrifugação foi ultracentrifugado a 100.000 xg, por 30 minutos. Obtendo-se o pellet relacionado à fração microsomal, este foi ressuspenso em 2,5 ml de solução tampão HEPES-KOH (pH 7,5) com: Glicerol a 10%, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina, e 5 mM EDTA. A dosagem de proteína das frações foram determinadas pelo método descrito por Bradford (1976).

Atividade das H⁺-ATPases

As atividades ATPásicas foram determinadas por reação colorimétrica para quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a hidrólise de ATP, conforme descrito por Fiske & Subbarow (1925). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2000) à 750 nm.

Monitoramento do gradiente de prótons

O transporte de prótons foi estimado como descrito por Michelis & Spanswick (1986), com modificações de Façanha & de Meis (1998), mediante o monitoramento da taxa de decréscimo da fluorescência/minuto da sonda metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada à 415 nm e a emissão a 485 nm no fuorímetro (Shimadzu UV-200).

Parâmetros Biométricos e Biomassa

O número de folhas foi obtido em contagem direta das folhas na planta. As avaliações biométricas das plantas foram realizadas utilizando régua graduada. As medições de altura foram realizadas da base da planta até o ponto mais alto das folhas. Para análise da massa fresca total e da massa seca total, foram utilizadas plantas do mesmo tratamento, mas que não sofreram fragmentação, sendo que também foi feito o uso de balanças de precisão e estufa de circulação forçada de ar.

Quantificação do Si

A determinação do Si nas plantas de abacaxi foi feita colorimetricamente, segundo o método descrito por Elliott & Snyder (1991).

A concentração de 1,5 mM de Si utilizada neste experimento foi determinada com base em resultados dos parâmetros cinéticos de absorção de ácido silícico (K_m de 0,15-0,35 mM e a V_{max} 1,5-1,6 mM) encontrados em trabalhos anteriores, em diferentes culturas (Tamai & Ma, 2003; Mitani. & Ma, 2005; Ma & Yamji, 2006; Nikolic et al., 2007). O elemento Si foi adicionado como K_2SiO_3 à solução nutritiva e o K excedente introduzido pelo uso do silicato de potássio foi subtraído do KNO_3 , e o nitrato foi suplementado com ácido nítrico diluído.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar para Windows versão 5.3 (Ferreira, 2011) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey (5%) (Pimentel-Gomes, 2000) ou pelo erro padrão. A correlação e a análise de componentes principais (PCA) foram realizadas por meio do programa XLSTAT/Excel® 2014.5.03.

RESULTADOS

Efeito do silício na biomassa

A fertilização foliar silicatada não alterou a biomassa vegetal, porém o déficit hídrico a que as plantas foram submetidas promoveu cerca de 40% de redução na biomassa (Tabela 2). Plantas tratadas com Si e irrigadas tiveram maior crescimento da parte aérea, mas com um menor lançamento de folhas, apresentando uma correlação negativa (-0,4752) entre estes parâmetros, contrastando com a condição controle que apresentou correlação positiva (0,7793) entre o incremento no número de folhas totais e o crescimento da parte aérea. Ao serem submetidas ao estresse hídrico, plantas tratadas ou não com silício mantiveram valores similares de crescimento da biomassa.

A concentração total de Si da parte aérea foi quantificada a partir da matéria seca da biomassa total, e a maior quantidade deste elemento foi encontrada nas folhas de plantas suplementadas e irrigadas (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito do silício sobre a biomassa. Números de folhas (**NF**); comprimento da parte aérea (**CPA**); massa fresca da parte aérea (**MFA**); massa seca da parte aérea (**MSA**); Total de Si acumulado nas folhas **Si (g kg⁻¹)**, em plantas de abacaxizeiro “Vitória”, em função da aplicação via foliar de silício e restrição hídrica em condições controladas.

		NF	CPA (cm)	MFA (g⁻¹)	MSA (g⁻¹)	Si (g kg⁻¹)
- Si	+IRR	19.33 a	22.36 ab	38.87 a	3.56 ab	4.01b
+Si	+IRR	16.66 ab	24.86 a	43.60 a	3.96 a	6.26a
- Si	-IRR	14.66 b	21.26 ab	23.03 b	3.16 b	3.63b
+Si	-IRR	15.66 ab	19.83 b	23.23 b	3.24 b	4.55b
CV%		11.53	7.13	10.09	7.67	8.58

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em 5%.

Parâmetros fotossintéticos

As trocas gasosas foram registradas por meio de um sistema (analisador de trocas gasosas por infravermelho) IRGA, com três medições em horários distintos as 9,16 e 22h (Figura 1). Com DVP folha-ar de $1,4 \pm 0,2$ KPa, o único fator limitante foi a água, o período vespertino teve as maiores taxas A, Gs e E.

A taxa de fotossíntese medida nas plantas de abacaxi quantifica valores negativos no período da manhã para os tratamentos hidratados, elevando a taxa fotossintética no período da tarde estabilizado à noite (Figura 1A). A Razão A/Ci/Ca (Figura1C), indica o maior potencial fotossintético nas plantas sob estresse hídrico e tratadas com silício, no período das 16h.

A relação das concentrações intercelular (Ci) e atmosférico (Ca) de CO₂ (Figura 1B) foi maior no período matutino para as plantas com estresse hídrico, apresentaram maior relação na quantidade de carbono do que as plantas irrigadas. No período noturno todas as plantas apresentaram baixa relação de Ci/Ca.

Os tratamentos com Si foliar tiveram efeitos inibitórios na E no período vespertino e matutino, tanto em plantas com ou sem irrigação. Entretanto, no período noturno sob estresse hídrico, aumentaram mais de sete vezes a taxa de transpiração quando comparadas ao período da tarde (Figura1D).

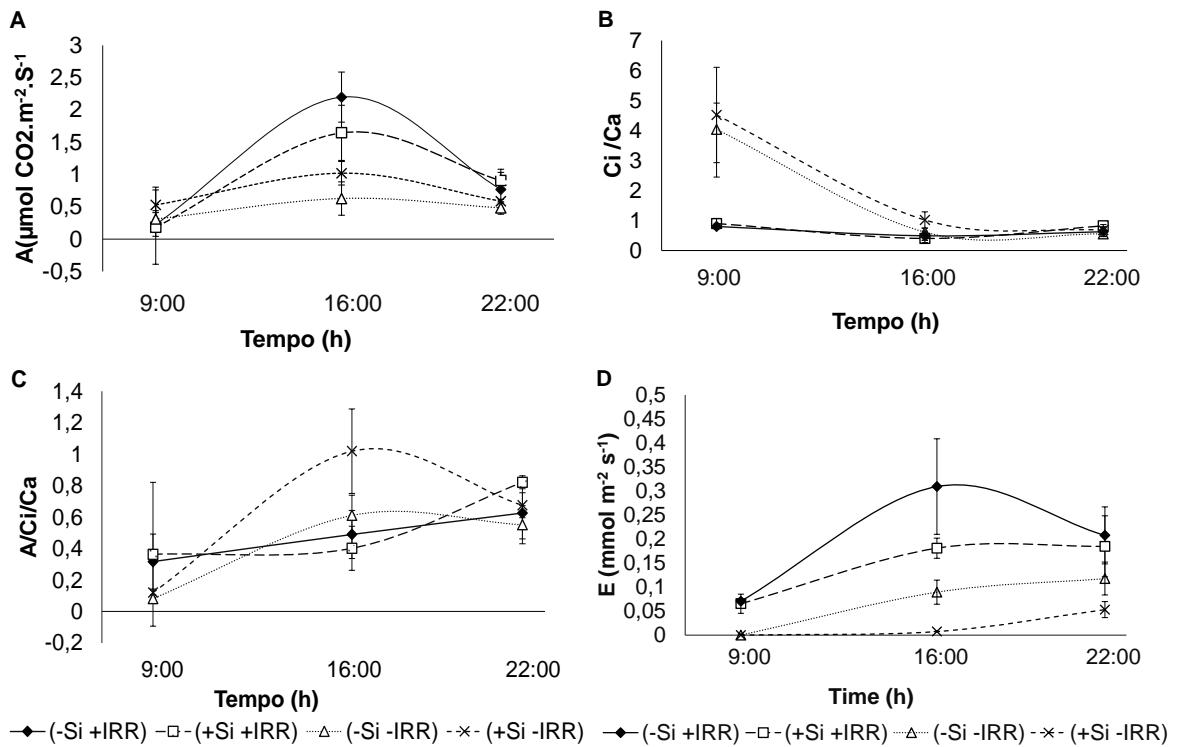


Figura 1. Fotossíntese (A), Relação concentração de CO_2 interna e externa (B); Potencial fotossintético (C); Transpiração D, em função dos horários, manhã, tarde e noite (9,16 e 22h), em mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado, com aplicação de silício via foliar e submetido ao estresse causado por falta de água no substrato em condições controladas. Barras representa erro padrão da média (n=3)

Em tratamentos de estresse hídrico sem Si, houve redução de 71% da capacidade fotossintética, enquanto as plantas sob as mesmas condições tratadas com Si apresentaram redução de 54%, quando comparadas ao controle (Figura 2A). Esses últimos diferem do controle com redução da condutância e transpiração estomática, com porcentagens próximas de 98%. A suplementação com Si durante o estresse hídrico influenciou no aumento das taxas da WUE (intrínseco e instantâneo) em ordem de grandeza maior do que 13 e 14 vezes, respectivamente, das plantas suplementadas com/sem Si, mas sem estresse (Figura 2E e 2F). As plantas tratadas com Si e irrigadas apresentam capacidade fotossintética aproximadamente 25% menor em relação ao controle, durante o período da tarde, mas não diferiram significativamente (Figura 2A).

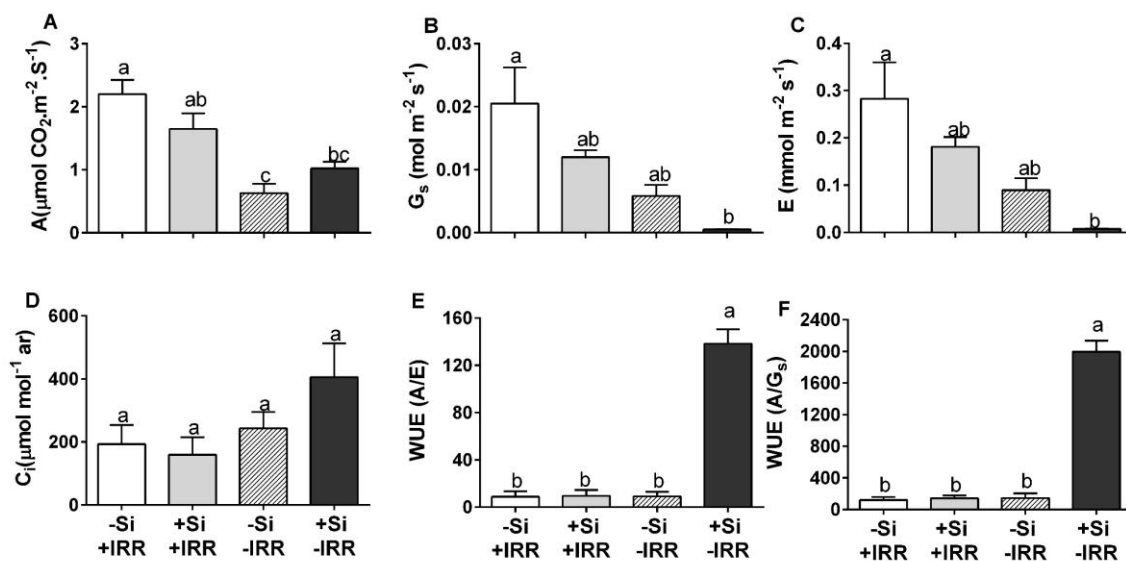


Figura 2. Fotossíntese (A), condutância estomática (B), transpiração (C), carbono interno (D), eficiência intrínseca no uso da água (E) e a eficiência instantânea no uso da água (F), no período da tarde nas mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado, em função da aplicação de Si via foliar e submetido ao estresse causado por falta de água no substrato em condições controladas. Barras representam erro padrão (n=3). Letras distintas entre tratamentos indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Atividades hidrolíticas

O estudo do metabolismo energético com foco nos sistemas primários de transdução de energia foi aferido por meio de medidas de atividade das bombas protônicas das células foliares do abacaxizeiro na fase vegetativa, avaliando suas respostas à escassez de água e ao Si. O estresse hídrico reduziu mais de 70% a hidrólise de ATP da V-ATPase, independente do tratamento aplicado com/sem Si (Figura 3C). As bombas de H⁺ que usam o pirofosfato (PPi) como fonte de energia, não apresentaram a característica dependência por potássio (dados não mostrados), comumente encontrada nas pirofosfatases vacuolares de outras espécies vegetais (Fuglsang et al., 2011). Porém, a V-PPase independente de K apresentou redução de aproximadamente 40%, nos tratamentos sob estresse hídrico, comparados ao tratamento com Si em condições de hidratação. O Si induziu efeitos atenuadores sobre a atividade das F-ATPases (Figura 3A), pois elevou a taxa de hidrólise à 12% em relação ao tratamento nas mesmas condições de estresse. Também foram vistos efeitos moderadores nas bombas P-ATPases no tratamento com Si sob condições de estresse hídrico, com elevação

de 30% das taxas hidrolíticas quando comparado às plantas nestas mesmas condições de desidratação (Figure 3B).

Também foi estimado o transporte de prótons, pelo decréscimo da fluorescência da sonda ACMA sensível às diferenças de pH nas membranas isoladas. A velocidade inicial de transporte de H⁺ (ΔpH (V_0)) nas plantas sob estresse hídrico e sem Si apresentaram maior redução para P-ATPase (65%) e V-ATPases (50%), quando comparado ao controle (Tabela 2). A magnitude do gradiente de H⁺ gerado, representado através da diferença de fluorescência máxima ($\Delta F_{\text{máx}}$) gerada pelas bombas eletrogênicas, teve redução de mais de 40% nos tratamentos sob estresse hídrico para F-ATPases e P-ATPases, em comparação ao controle (Tabela 2).

Para monitorar a eficiência das bombas eletrogênicas, foi determinada a taxa de acoplamento, ou seja, razão entre a velocidade inicial do transporte de H⁺ (V_0) e a de hidrólise de ATP. Ao aumentar o transporte de H⁺, sem ocorrer incrementos proporcionais na hidrólise do substrato, eleva-se o acoplamento das bombas e, conseqüentemente, maior será a eficiência do sistema energizador das membranas celulares. Observa-se que as bombas de H⁺ de membrana vacuolar V-ATPase e V-PPase estão mais acopladas 58% e 35%, respectivamente, em plantas sob estresse hídrico sem Si, quando comparadas ao controle enquanto a suplementação com Si parece antagonizar tal efeito de acoplamento induzido pelo estresse (Figura 3G e 3H).

Tabela 2: Velocidade inicial de transporte de H⁺ (V_0) e variação da fluorescência máxima ($\Delta F_{\text{máx}}$) das bombas F-ATPase, P-ATPase, V-ATPase, V-PPase, nas mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado em função da aplicação de Si via foliar e submetido ao estresse causado por falta de água no substrato em condições controladas.

Trat	$V_0 F$	$V_0 P$	$V_0 V$	$V_0 PP_i$	$F_{\text{Máx}} F$	$F_{\text{Máx}} P$	$F_{\text{Máx}} V$	$F_{\text{Máx}} PP_i$
-Si/+IR	7,10a	7,88a	13,94a	18,75a	13,28ab	29,13a	13,32a	77,87a
+Si/+IR	8,95a	5,32ab	14,08a	16,52a	15,75a	26,56ab	12,69a	81,08a
-Si/-IR	5,75a	2,76b	6,86b	18,96a	7,88b	18,38b	6,08b	79,56a
+Si/-IR	6,28a	3,06ab	8,12ab	13,72a	8,15b	17,66b	6,87ab	73,48a
CV (%)	23,75	24,48	12,08	16,66	24,44	17,56	15,55	25,44

Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em 5%.

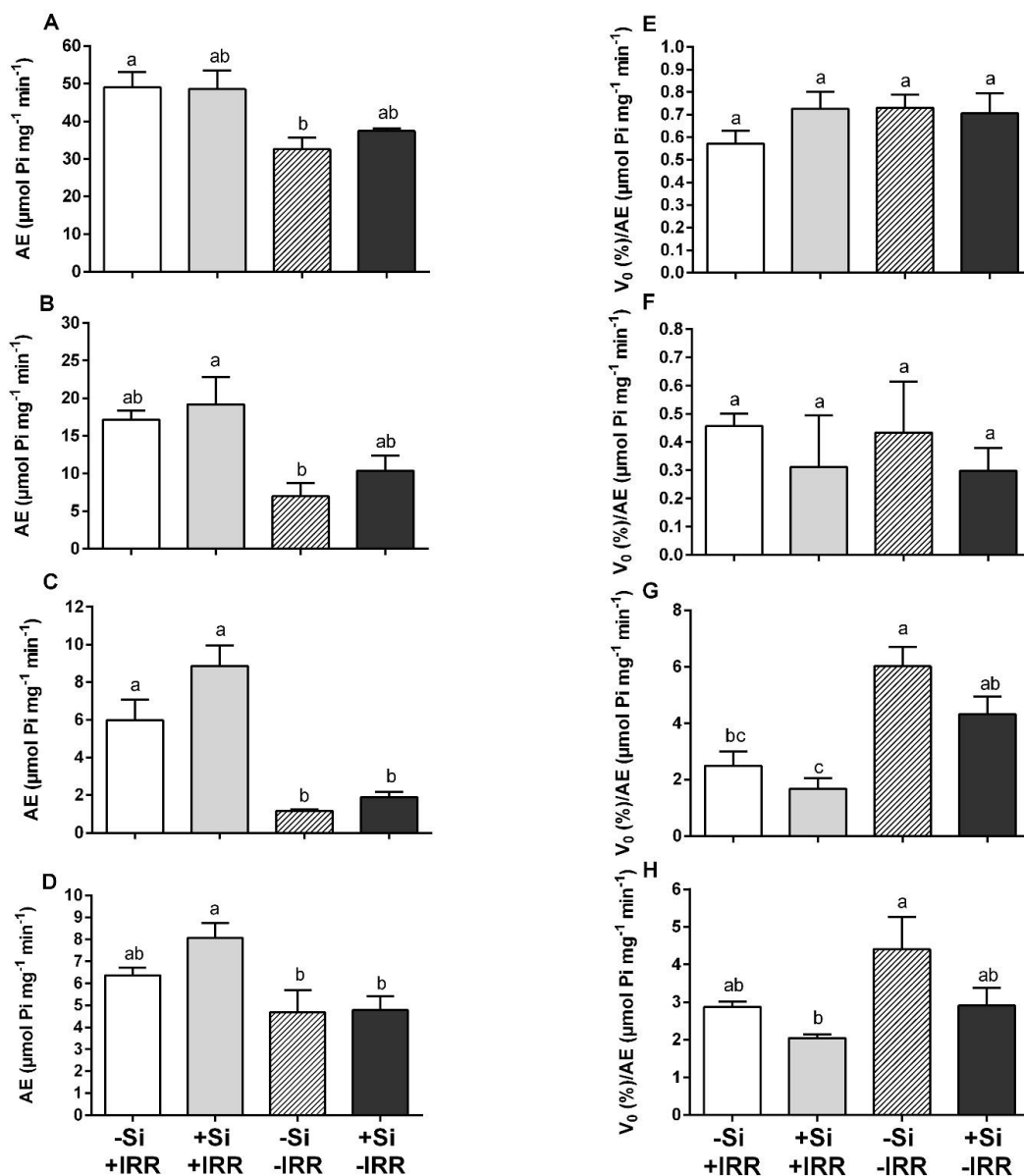


Figura 3: Atividade de hidrólise da F-ATPase (A), P-ATPase (B), V-ATPase (C), V-PPase (D). Acoplamento das bombas F-ATPase (E), P-ATPase (F), V-ATPase (G), V-PPase (H), nas mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado, em função da aplicação de Si via foliar e submetido ao estresse causado por falta de água no substrato em condições controladas. Barras representam erro padrão (n=3). Letras distintas entre tratamentos indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Análise multivariada

A análise de componentes principais explicou 86,67 % da variabilidade total nas duas primeiras componentes distribuídas no gráfico (Figura 4). O tratamento com Si em plantas bem hidratadas influenciou de forma positiva a atividade

hidrolítica das bombas de H^+ , a velocidade inicial de transporte de H^+ da V e F-ATPase, em conjunto com os parâmetros de crescimento MF, MS, NF e A. As plantas sem aplicação de Si e bem hidratadas apresentaram maior relação para as taxas de E e gs, assim como na velocidade inicial no transporte de H^+ para a P-ATPase e PPI-ATPase. As plantas não tratadas com Si e desidratada por falta de irrigação tiveram variação negativa para o eixo 1. As bombas eletrogênicas PPI e V-ATPase apresentaram os maiores acoplamentos nesta situação de estresse, sem a suplementação com Si. No tratamento em condições de estresse hídrico e suplementado com Si, apresentou relação negativa com as maiores proporções de A/E, A/gs, Ci, Ci/Ca.

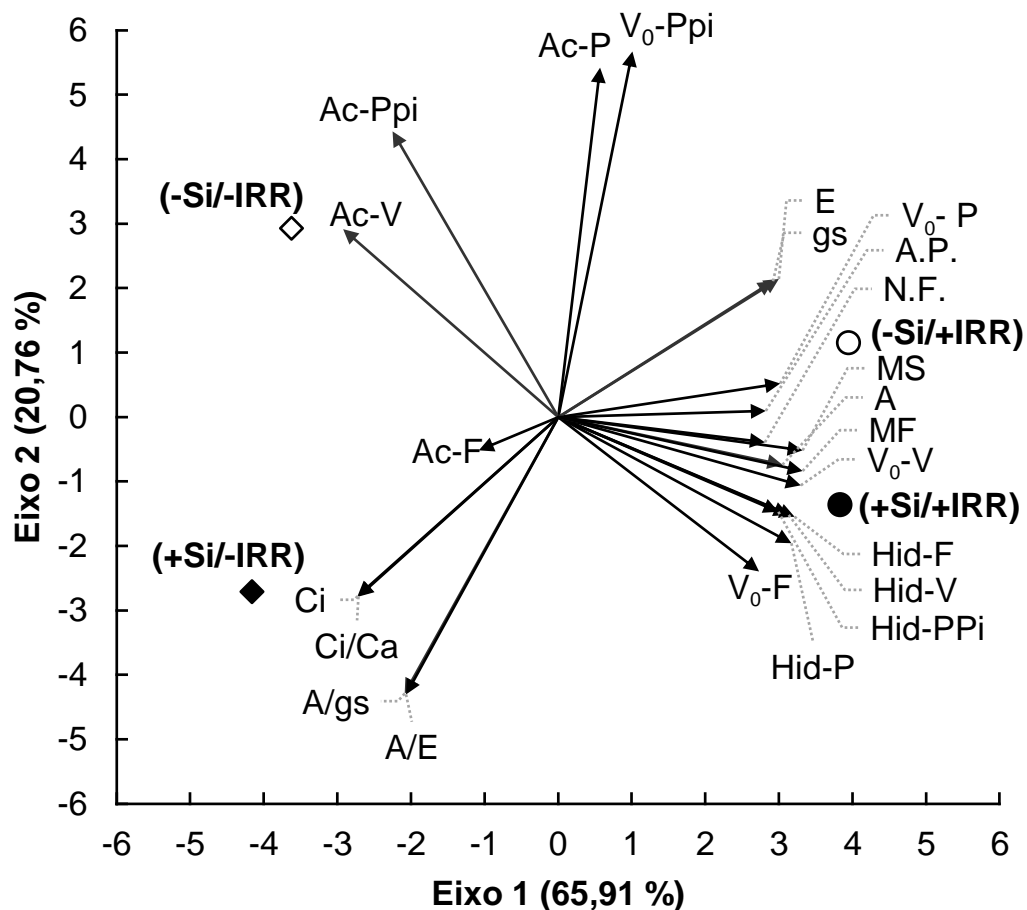


Figura 4: Análise da Componente Principal (PCA) de parâmetros fotossintéticos, Massa Fresca (MF), Massa Seca (MS), Número de Folhas (NF), Altura da planta (AP), Atividade hidrolítica (Hid), Velocidade inicial (V_0) e Acoplamento (Ac). Nas mudas de abacaxi "Vitória" micropropagado, em função da aplicação de silício via foliar e submetido ao estresse causado por falta de água no substrato em condições controladas.

DISCUSSÃO

O Si tem sido relatado por aumentar a biomassa e a resistência a vários estresses em plantas, particularmente as gramíneas de importância agrícola (Broadley et al., 2012), sendo considerado benéfico para algumas das culturas mais importantes, tais como: arroz, milho, trigo, sorgo, cevada, cana-de-açúcar e tomate (Ahmed et al., 2011; Ashraf et al., 2010; Gong et al., 2005; Hattori et al., 2005; Romero-Aranda et al., 2006). Por outro lado, pouca atenção tem sido direcionada aos potenciais efeitos do Si em frutas tropicais. Neste trabalho, explorou-se esta temática, estudando mudas de abacaxizeiro em estágio de aclimatização. Os resultados apresentados mostram aumento da taxa fotossintética nas plantas sob estresse hídrico (Figura 2A), em paralelo com uma modulação das principais bombas protônicas (Figura 3A), de cuja atividade depende o balanço produção/consumo de ATP. Tais efeitos podem estar associados à proteção do aparato bioenergético proporcionado pela adição do Si nas folhas. Segundo Song et al. (2014), a adição de Si pode proteger os pigmentos fotossintéticos e também minorar os danos à ultraestrutura dos cloroplastos causados, por exemplo, pelo excesso de radiação luminosa e o acúmulo de radicais livres.

Os parâmetros fotossintéticos incluindo a taxa fotossintética, a transpiração e a condutância estomática atingiram os maiores valores no período vespertino, sendo que os maiores níveis de concentrações intercelular e atmosférica de CO₂ ocorreram no período matutino. As taxas de assimilação de CO₂ podem ser maiores no período diurno do que no noturno, porém, variando com as condições de cultivo (Figura 1B e 1 D). Plantas em condições CAM, possuem um mecanismo de controle do fechamento estomático progressivo no início da manhã, quando inicia o processo de descarboxilação do malato e a sua abertura ocorre no final da tarde, quando, geralmente, as reservas de malato já estão esgotadas (Lüttge, 2008; Carr, 2012).

No período vespertino, o potencial fotossintético das plantas sob estresse é favorecido pelo Si (Figura 1C), o que pode estar diretamente relacionado com o fechamento estomático e maior acúmulo de Ci (Taiz & Zeiger, 2013). Assim, as

plantas proporcionam melhor aproveitamento da água com menor perda por evapotranspiração (figura 2E e 2F).

A funcionalidade dos estômatos em plantas sob estresse hídrico é fundamental para determinar a sua sobrevivência. A transpiração das folhas ocorre através dos estômatos e parte através da cutícula (Ma, 2004). Porém o abacaxizeiro está associado a características anatômicas que minimizam a perda de água, pois as cutículas são espessas, as células da epiderme e do mesófilo foliar têm grandes vacúolos e os estômatos têm aberturas pequenas (Braga et al., 2011). Curiosamente, a deposição do Si ocorre com maior frequência nas regiões onde a água é perdida em grande quantidade, ou seja, seguindo o mesmo sentido do fluxo de água, na epiderme foliar junto às células-guarda dos estômatos e outras células epidérmicas (Korndörfer, 2006). Tem sido sugerido que tais acúmulos de sílica nos tecidos e órgãos de transpiração promovem a redução na perda de água por limitar mecanicamente a abertura dos estômatos, reduzindo o estresse causado pela indisponibilidade de água no solo para planta (Ma & Yamaji, 2006).

O mecanismo de abertura estomática também depende da atividade de bombas eletrogênicas de íons H^+ , que geram as forças próton-motrizas através da plasmalema e do tonoplasto, energizando o acúmulo vacuolar e o transporte bidirecional de vários compostos, íons e metabólitos, controlando a homeostase iônica e o turgor das células guarda (Taiz & Zeiger, 2013). A Gs e E das plantas de abacaxi sob estresse hídrico (Figure 2B e 2C) exigiram maior acoplamento das bombas vacuolares (Figura 3G e 3H), quando comparadas às plantas com irrigação. Isto mostra o aumento de eficiência especificamente das H^+ -ATPases vacuolares em resposta ao estresse hídrico. A entrada de água nas células é regulada pelo trânsito de íons e produtos metabólicos para dentro do vacúolo que geram a pressão osmótica vacuolar, a qual depende do bombeamento eletrogênico de prótons. O Si pode estar envolvido na modulação das bombas protônicas, atuando para amenizar efeitos deletérios sobre a energética da membrana vacuolar do abacaxizeiro como resposta à falta de água. A sinalização iônica fornece respostas do estresse hídrico nesta planta, assim essas proteínas vacuolares podem ser utilizadas como marcadores bioquímicos de respostas adaptativas ao estresse hídrico (Venâncio et al., 2014).

A aclimatização do abacaxizeiro é um processo lento, no qual as mudas micropropagadas podem ficar de seis a oito meses em casa de vegetação e o seu desenvolvimento pode ser favorecido pelo uso de substratos propícios ao crescimento de mudas (Escalona et al., 1999; Bartholomew et al., 2002). A utilização do substrato comercial neste trabalho estabelece proximidades ao produtor de mudas, que climatiza as plântulas em sua propriedade antes de levá-las para o campo. A presença de Si nas mudas de abacaxizeiro que não receberam adubação foliar silicatada pode ser devido ao substrato utilizado, pois o Si é o segundo elemento mais encontrado na natureza (Ma et al., 2001).

A altura das plantas e o número de folhas/planta podem ser utilizados para determinar o momento de transplântio para o campo (Cunha et al., 1999; Reinhardt et al., 2000). Neste estudo, a adubação foliar com Si favoreceu o crescimento das plântulas (Tabela 2). Segundo Broadley et al. (2012) a interação do Si com constituintes como a pectinas e polifenóis podem aumentar a elasticidade da parede celular ajudando no crescimento da planta. Porém, a limitação induzida no número de folhas não pode ser explicada pelo mesmo mecanismo e sugere uma ação endógena do Si, mais do que somente em constituintes da parede celular.

Os resultados da variabilidade total dos dados analisados por PCA teve explicação de 65,91 % no eixo 1 e 20,76% no eixo 2 (Figura 4). Observa-se no quadrante inferior direito do gráfico a correlação positiva entre as hidrólises das bombas de H^+ e o tratamento com Si em plantas hidratadas. O elemento potencializa efeitos eletroquímicos nas membranas celulares enquanto o uso do Si nas plantas sob estresse hídrico, no quadrante inferior à esquerda do gráfico, tem maior potencial para a eficiência no uso da água. A separação entre os tratamentos hidratados e os sob estresse hídrico em cada quadrante, determina a necessidade da irrigação para as plantas nesta fase de desenvolvimento, assim como o uso do silício para amenizar os efeitos degenerativos nas membranas celulares e manter o potencial eletroquímico.

CONCLUSÃO

A adubação silicatada foliar mostrou ter clara correlação com as hidrólises de substratos das bombas de prótons, velocidade inicial do transporte de H^+ de V e F-ATPases, massa fresca, massa seca e a fotossíntese das plantas. As plantas tenderam a reduzir a taxa transpiratória e condutância estomática. Os resultados mostram evidências do envolvimento do Si na modulação das bombas protônicas como uma resposta adaptativa da energética das membranas celulares do abacaxizeiro, principalmente as P-ATPase e V-ATPases, em resposta ao estresse hídrico.

O efeito mais marcante foi observado na potencialização dos parâmetros fotossintéticos relacionados à eficiência no uso da água. Mas tal efeito, já observado em outras culturas, dado as correlações supracitadas, não pode ser imputado sobre ao acúmulo do Si nos órgãos transpiratórios. A modulação das bombas indica influência nos mecanismos de controle da turgescência celular que controlam, entre outras funções, a abertura e fechamento estomático.

A suplementação com Si também contribuiu no crescimento das plantas não estressadas, o que aponta para uma redução do tempo de aclimatização de mudas em casas de vegetação.

Os resultados sugerem a existência de um mecanismo pelo qual o Si atua elevando a eficiência da utilização da água durante condições de estresse hídrico, e provê os primeiros *insights* para a elucidação de tal mecanismo que pelas evidências geradas, requer investigações mais aprofundadas da bioenergética na integração entre os sistemas fonte fotossintéticos e mitocondriais com os drenos, representados principalmente pelas fosfohidrolases das membranas plasmática e vacuolar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M., Qadeer, U., Aslam, M.A. (2011). Silicon application and drought tolerance mechanism of sorghum with. *African Journal of Agricultural Research*, (6) 594–607.
- Almeida, O.A., Souza, L.F. da S. (2011). Irrigação e fertirrigação na cultura do abacaxi. In: De Sousa, W. A. Marouelli, E. F. Coelho, J. M. Pinto, e M. A. Coelho Filho (eds). *Irrigação e fertirrigação em fruteiras e hortaliças-Embrapa Mandioca e Fruticultura: Embrapa Informação Tecnológica-Brasília, DF*, p. 339–368.
- Arnon, D.I., Stout, P.R. (1939). The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, 14 371–375.
- Ashraf, M., Ahmad, R., Bhatti, A.S., Afzal, M., Sarwar, A., Maqsood, M.A., Kanwal, S. (2010). Amelioration of Salt Stress in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by Supplying Potassium and Silicon in Hydroponics. *Pedosphere*, 20, 153–162.
- Asmar, S.A., Castro, E.M., Pasqual, M., Pereira, F.J., Soares, J.D.R. (2013). Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. *Scientia Horticulturae*, 161, 328–332.
- Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, e L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 41, 185–194.
- Bartholomew, D.P., Paull R.E., Rohrbach, K.G. (2002). *The Pineapple Botany, Production and Uses*. University of Hawaii at Manoa Honolulu USA: CABI Publishing.
- Be, L. V, Debergh, P.C. (2006). Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). *South African Journal of Botany*, 72, 191–194.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Braga, F.T., Pasqual, M., Castro, E.M. De, Rafael, G.C., Favero, A.C., Cainã, T., Valente, T. (2011). Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro

influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 35, 863–868.

BRASIL DECRETO Nº 2954 (2004). Aprova o regulamento da lei nº 6894 de 16 de janeiro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências.

Broadley, M., Brown P., Cakmak, I., Ma, J.F., Rengel, Z., Zhao, F. (2012). Beneficial Elements. In: Marchner P. (eds.) *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, p. 249–270. London: Academic Press.

Cabral, J.R.S., Matos A.P. (2009). Imperial, a new pineapple cultivar resistant to fusariosis. *Acta Horticulturae*, 822, 47–50.

Camargo, M.S. De, Pereira, H.S., Korndörfer, G.H., Queiroz, A.A., Borges, C. (2007). Soil reaction and absorption of silicon by rice. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 64, 176–180.

Camargo, M.S. De, Rocha, G., Korndörfer, G.H. (2013). Silicate fertilization of tropical soils: silicon availability and recovery index of sugarcane. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 37, 1267–1275.

Carr, M.K. V (2012). The water relations and irrigation requirements of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*): a Review. , 1–14.

Cunha, G.A.P. da, Cabral, J.R.S., Souza, L.F. da S. (1999). *O Abacaxizeiro: Cultivo, Agroindústria e Economia*. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.

Elliott, C.L., Snyder, G.H. (1991). Autoclave-Induced Digestion for the Colorimetric Determination of Silicon in Rice Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1118–1119.

Epstein, E. (1999). Emanuel Epstein. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 641–664.

Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González J.L., Desjardins Y., Borroto C.G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743–748.

- Façanha, A.R., Meis, L. De (1998). Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*, 116, 1487–1495.
- FAO.FAOstat (2014). Agricultural statistics database. Home: World agricultural Information Center.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 6, p.1039-1042.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of biological chemistry*, 66, 375–400.
- Fuglsang, A.T., Paez-Valencia, J., Gaxiola, R.A. (2011). Plant Proton Pumps: Regulatory Circuits Involving H⁺-ATPase and H⁺-PPase. In: M. Geisler, K. Venema (eds.) *Signaling and Communication in Plants: Transporters and Pumps in Plant Signaling*, Berlin, Heidelberg: Springer, p. 39–64.
- Gong, H., Zhu X., Chen, K. (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169, 313–321.
- Guntzer, F., Keller, C., Meunier, J. D. (2012). Benefits of plant silicon for crops: A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 32, 201–213.
- Hattori, T., Inanaga, S., Araki H., An, P., Morita, S., Luxova, M., Lux, A. (2005). Application of silicon enhanced drought tolerance in Sorghum bicolor. *Physiologia Plantarum*, 123, 459–466.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull*, 347, 1–32.
- Korndörfer, G.H. (2006). Os Elementos Benéficos. In: M. S. Fernandes (ed.). *Nutrição mineral de plantas*, Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 598–638.
- Lüttge, U. (2008). *Physiological Ecology of Tropical Plants* 2nd ed. Berlin: Springer, p 458.
- Ma, J.F. (2004). Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50, 11–18.
- Ma, J.F., Miyake Y., Takahashi E. (2001). Silicon as a beneficial element for crop plants. In: L. E. Datnoff, G. H. Snyder, e G. H. Korndorfer. *Silicon in agriculture-Studies in plant science*, Amsterdam, p. 17–55.

- Ma, J.F., Yamaji N. (2008). Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 3049–3057.
- Ma, J.F., Yamaji N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, 11, 392–397.
- Matos, A.P. De, Reinhardt, D.H. (2009). Pineapple in Brazil: Characteristics , Research and Perspectives. *Embrapa Cassava & Tropical Fruit*, 25–36.
- Mauad, M., Alexandre, C., Crusciol, C., Filho, H.G., Corrêa, J.C. (2003). Nitrogen and silicon fertilization of upland rice. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 60, 761–765.
- Meyer, J.H., Keeping, M.G. (2001). Past, present and future research of the role of silicon for sugarcane in southern Africa. *In: L. E. Datnoff, G. H. Snyder, e G. H. Korndorfer Silicon in agriculture - Studies in plant*, p. 257–275.
- Michelis, M.I.D.E., Spanswick, R.M. (1986). H⁺-Pumping driven by the vanadate-sensitive atpase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology*, 81, 542–547.
- Mitani, N. & Ma, J.F. (2005). Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1255–1261.
- Moreira, M.A., Carvalho, J.G. de, Pasqual, M., Fráguas, C.B., Silva, A.B. da (2006). Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 30, 875–879.
- Nikolic, M., Nikolic, N., Liang, Y., Kirkby, E.A., Römheld, V. (2007). Germanium-68 as an adequate tracer for silicon transport in plants. Characterization of silicon uptake in different crop species. *Plant physiology*, 143, 495–503.
- Osmond, C.B. (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual review of plant physiology*, 29, 379–414.
- Pereira, H.S., Korndörfer, G.H., Vidal, A.D.A. (2004). Silicon sources for rice crop. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61, 522–528.
- Pimentel-Gomes, F. (2000). *Curso de estatística experimental 14^a*. Piracicaba – SP: Editora da Universidade de São Paulo: 477p.
- Pulz, A.L., Crusciol C.A.C., Lemos, L.B., Soratto, R.P. (2008). Influência de silicato e calcário na nutrição, produtividade e qualidade da batata sob deficiência hídrica. *R. Bras. Ci. Solo*, 32, 1651–1659.

- Reinhardt, D.H., Cabral, J.R.S., Souza, L.F. da S., Sanches, N.F., Matos, A.P. de (2002). Pérola and Smooth Cayenne pineapple cultivars in the state of Bahia, Brazil: growth, flowering, pests, diseases, yield and fruit quality aspects. *Acta Horticulturae*, 57, 581–588.
- Reinhardt, D.H., Souza, L.F. da S., Cabral, J.R.S. (2000). *ABACAXI Produção Aspectos Técnicos 1ª Edição*. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.
- Rohrbach, K.G., Leal, F., D'Eeckenbrugge, G.C. (2002). History, distribution and production world. In: D. P. Bartholomew, R. E. Paull, e K. G. Rohrbach (eds) *The Pineapple Botany, Production and Uses*, University of Hawaii at Manoa Honolulu USA: CABI Publishing, p. 1–12.
- Romero-aranda, M.R., Oliva, J., Cuartero, J. (2006). Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *Journal of Plant Physiology* 163, 163, 847–855.
- Sanches, N.F., Matos, A.P. de (2013). *Coleção 500 perguntas, 500 respostas-abacaxi 2ª edição*. Brasília, DF: Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- Savant, N.K., Korndörfer, G.H., Datnoff, L.E., Snyder, G.H. (1999). Silicon nutrition and sugarcane production : A Review 1. *J. Plant. Nutr.*, 22.
- Song, A., Li, P., Fan, F., Li, Z., Liang, Y. (2014). The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high-zinc stress. *Plos One*, 9, 1–21.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013). *Fisiologia vegetal 5ª Ed*. Porto Alegre: Artmed, p. 918
- Tamai, K. & Ma, J.F. (2003) Characterization of silicon uptake by rice roots. *New Phytologist*, 431–436.
- Venâncio, J.B., Catunda, M.G., Ogliari, J., Rima, J.A.H., Okorokova-Facanha, A.L., Okorokov, L.A., Facanha, A.R. (2014). A vacuolar H⁺-pyrophosphatase differential activation and energy coupling integrate the responses of weeds and crops to drought stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 1987–1992.
- Ventura, J.A., Costa, H., Cabral, J.R.S., Matos, A.P. (2009). “Vitória”: New pineapple cultivar resistant to fusariosis. *Acta Horticulturae*, 822, 51–56.

3.2. MODULAÇÃO DO SISTEMA DE TRANSPORTE PROTÔNICO EM *Ananas comosus* COMO RESPOSTA À HIPÓXIA E A SUPLEMENTAÇÃO COM SILÍCIO

RESUMO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merrill) é uma planta monocotiledônea, herbácea e perene. O sistema radicular é frágil e o excesso de água pode acarretar diminuição na produção por falta de aeração, podendo ocorrer mudanças em todo o metabolismo energético. O transporte de nutrientes e outros elementos benéficos como o Silício (Si) é feito através de transportadores específicos que usualmente exigem força próton-motriz. Este trabalho tem como objetivo analisar o potencial das principais bombas protônicas das células como marcadores bioquímicos da ação do Si em condições de anóxia, estimando eletrofisiologicamente a participação da H⁺-ATPase tipo P no transporte de H⁺ acoplado ao de Si em tecidos vivos radiculares do abacaxizeiro do cultivar "Vitória". Foram conduzidos experimentos em condições controladas em câmara de crescimento na presença ou ausência de Si (1,5 mM SiO₂) em condições normóxia ou anóxia. Foi determinada a dinâmica do fluxo de prótons, utilizando o sistema SIET (*Scanning Ion-Selective Electrode Tecchique*). Oscilações transientes do íon H⁺ detectadas pelo SIET revelaram uma inversão completa do fluxo de H⁺ nas células radiculares, de influxo na ausência para efluxo na presença do Si. O ortovanadato, inibidor de ATPases do tipo P, inibiu reversivelmente tanto o influxo quanto o efluxo de H⁺. Plântulas submetidas a

condições de anóxia durante três dias em solução hidropônica foram submetidas ao fracionamento celular para isolamento de vesículas microssomais e mitocondriais da base foliar e das raízes por centrifugação diferencial. A atividade ATPásica e o transporte de H^+ foram mensurados colorimétrica e fluorimetricamente, respectivamente. Tratamentos com o Si reduziu a eficiência das bombas eletrogênicas P-ATPase e V-ATPase foliar. A ativação das bombas de H^+ do tipo P-ATPases radiculares aumentaram 78% e 66% nos tratamentos com Si com/sem aeração, respectivamente. Os resultados evidenciam o envolvimento do Si na modulação das bombas eletrogênicas, para amenizar os efeitos deletérios sobre a energética das membranas celulares do abacaxizeiro como uma das respostas à hipóxia. Assim, pode induzir a ativação de bombas H^+ do tipo P-ATPases e/ou inibir transportadores secundários na zona de alongamento desta cultivar 'Vitória'.

Palavras-chave: P-ATPase, *Ananas comosus*, 'Vitória', Hidrólise, bombas

ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus* L., Merrill) is a monocotyledonous, herbaceous and perennial plant. The root system is brittle and excess water can lead to decreased efficiency due to lack of aeration and changes in electrogenic pumps can occur and affect the entire energy metabolism. The transport of nutrients such as silicon is done through specific conveyors, which requires proton-motive force. This work aims to analyze the main proton pumps of the cells as biochemical markers of the action of silicon under conditions of anoxia and to estimate electrophysiologically the participation of the H^+ -ATPase type P in the transport of silicon in root tissues of the pineapple of the cultivar "Vitória". Experiments were conducted under controlled conditions in growth chamber in the presence or absence of Si (1.5 mM SiO_2). The dynamics of the proton flux were determined using the SIET (Scanning Ion-Selective Electrode Technique) system. Transient H^+ ion oscillations detected by SIET revealed positive voltages (μV) in the presence of Si. Sodium orthovanadate, an inhibitor of P-type ATPases,

reversibly inhibited H⁺ efflux. The second seedlings were submitted to anoxic conditions for three days in hydroponic solution. The microsomal and mitochondrial vesicles were isolated from the leaf base and roots by differential centrifugation. ATPase activity and H⁺ transport were measured colorimetrically and fluorimetrically respectively. However, treatments with silicon reduced the efficiency of the P-ATPase and V-ATPase foliar electrogenic pumps. However, it may have caused a remedial effect on H⁺-PPase root. Activation of H⁺ pumps of the P-ATPase type, increased by 78% and 66% in Si treatments with/without aeration respectively. The results evidenced the involvement of silicon in the modulation of electrogenic pumps to reduce the deleterious effects on energy of pineapple cell membranes as one of the responses to anoxia. Thus, it can induce the activation of H⁺ pumps of the P-ATPases type and/or inhibit secondary transporters, in the elongation zone of this cultivar 'Vitoria'.

Key words: P-ATPase, Ananas comosus, 'Vitoria', hydrolysis, pumps

INTRODUÇÃO

A deficiência de oxigênio no sistema radicular pode ocorrer com frequência na natureza, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento da maioria das plantas em algum momento durante o seu ciclo de vida (Kennedy et al., 1992; Jackson et al., 1982). No campo, as raízes podem estar sujeitas à deficiência de oxigênio por eventos naturais, como solos adensados, chuvas intensas e inundações, ou ainda em decorrência de atividades agrícolas, como irrigações excessivas, solos compactados ou mal drenados (Kennedy et al., 1992).

A disponibilidade de oxigênio para as plantas, seja em condições naturais ou experimentais, pode variar desde níveis normais (normóxia) à deficiência (hipóxia) e até a ausência total de oxigênio (anóxia) (Drew, 1997; Kennedy et al., 1992). A normóxia prevalece durante o tempo que a oferta de oxigênio não limita a fosforilação oxidativa. O sistema radicular passa por hipóxia, quando o metabolismo celular é alterado e limita a produção de ATP pelas mitocôndrias e absorção de minerais pelas raízes, enquanto que na anóxia a produção

mitocondrial de ATP é insignificante em comparação com a gerada pela glicólise e fermentação (Perata et al., 2011; Liao & Lin, 2001; Sousa & Sodek, 2002; Felle, 2005).

O abacaxizeiro é uma cultura de elevada importância para milhares de produtores rurais em todos os estados brasileiros e ocupa posição de destaque na produção mundial (IBGE, 2016; FAOstat, 2014). Apesar de ser pouco exigente ao tipo de solo ou substrato utilizado para o plantio, é necessário que este tenha boa drenagem e aeração, pois o sistema radicular é frágil e o excesso de água pode acarretar diminuição do desenvolvimento estrutural e/ou funcional das raízes, por falta de aeração, com consequente perda de produtividade, além de perdas na qualidade do fruto (Cunha et al., 2005; Souza & Reinhardt, 2009).

As melhorias no manejo e tecnologias de produção buscam aumentar a produtividade nas culturas de importâncias agrônômicas. Diversos trabalhos evidenciam os benefícios do fornecimento de Si a plantas sob condição de estresse bióticos e abióticos (Epstein, 1999; Richmond & Sussman, 2003; Ashraf et al., 2010; Hasanuzzaman et al., 2013).

O Si é absorvido na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4), através de transportadores localizados na exoderme e endoderme das raízes (Mitani & Ma, 2005; Ma et al., 2006, 2007; Mitani et al., 2009). Os genes, responsáveis por codificar transportadores de Si Ls1 e Ls2 foram identificados em plantas de arroz, trigo e cevada, contribuindo para o fato de que existe um processo passivo aliado ao processo ativo na absorção de Si (Ma & Yamaji, 2008). Após absorvido pelas raízes, o Si se move apoplasticamente por fluxo transpiracional no xilema da raiz para a parte aérea, onde é polimerizado na parede celular dos tecidos fotossintéticos na forma de sílica amorfa (Ma & Yamaji, 2006).

A maioria dos tecidos das plantas tolera a anóxia por curtos períodos de tempo antes de ocorrerem danos irreversíveis, que pode induzir uma crise de energia nas células vegetais e levar à morte celular (Kennedy et al., 1992; Perata et al., 2011; Koizumi et al., 2011). Considerando que a aplicação do Si tem amenizado diversos tipos de estresses em plantas de importância agrônômica e o modo de absorção deste elemento ainda não é compreendido para plantas de abacaxi. Este trabalho tem como objetivo analisar as principais bombas protônicas das células como marcadores bioquímicos da ação do Si em condições de anóxia e estimar eletrofisiologicamente a participação da H^+

ATPase tipo P no transporte de silício em tecidos vivos radiculares do abacaxizeiro do cultivar “Vitória”.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições do crescimento das plantas

Os experimentos foram conduzidos em condições controladas na câmara de crescimento no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes-RJ. As condições ambientais para cultivo foram: fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de $400\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28/24°C (diurna/noturna). Foram utilizadas plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar “Vitória” provenientes de cultura de tecidos adquiridas no Laboratório de Biotecnologia BIOMUDAS, localizado em Venda Nova do Imigrante-ES.

Assim, foram conduzidos dois trabalhos experimentais com silício: o primeiro para determinar a dinâmica do fluxo de prótons e o segundo as plântulas foram submetidas a condições de anóxia em solução hidropônica.

Determinação dos fluxos de H⁺ radicular, utilizando o sistema de eletrodos vibráteis íons-seletivos (SIET)

Para quantificar o fluxo extracelular de prótons, foi utilizado o sistema SIET de eletrodos vibráteis íons-seletivos, que consiste de uma microsonda vibrátil seletiva ao próton, capaz de medir pequenas correntes elétricas extremamente pequenas que fluem através de um meio líquido condutor (Feijó et al., 1999; Zonia et al., 2002; Ramos et al., 2009). Fazendo-se uso de células vivas em tecidos radiculares das plântulas de abacaxi pouco desenvolvidas, ou seja, as raízes maduras foram extirpadas e regeneradas em água deionizada até o comprimento de 2 a 3 cm, isto foi utilizado para evitar ruídos captados pela microsonda no momento da leitura. Logo depois receberam a solução nutritiva de Hoagland a $\frac{1}{5}$

da força iônica (Hoagland & Arnon, 1950) durante 72 h na presença ou ausência de Si (1,5 mM (SiO₂)).

O eletrodo foi produzido a partir de micro capilares de boro-silicato, com diâmetro exterior de 1,5 mm e 1,12 mm de diâmetro interior (www.sutter.com), utilizando o aparelho *Puller Flaming Brown*, Sutter P-98 (*Sutter Instruments*, Novato, CA). Os microelétrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um *becker* de vidro (1L) e secos em estufa à 250° C por 3 horas. Logo depois, realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina (C₅H₁₅NSi, Fluka 41716), ainda na estufa por 20 minutos foram deixados para secar por mais 3 horas, na mesma temperatura. Após a vaporização com silano (C₅H₁₅NSi), os microelétrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (KCl), correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, a ponta foi preenchida, com 20 a 25 µm do coquetel seletivo, contendo o ionóforo respectivo ao H⁺ (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido na extremidade basal do microelétrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (*World Precision Instruments*, Inc.). Um eletrodo de referência, composto de uma ponte de KCl 3M líquido, fechada na extremidade com um polímero semipermeável (*World Precision Instruments*) foi inserido no meio de banho da amostra. Os sinais foram medidos pelo amplificador (www.applicableelectronics.com), a vibração e o posicionamento do eletrodo foram obtidos através de motores posicionais (*stepper-motors*), os quais permitem o movimento tridimensional. O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no *software* ASET (*Science Wares [East Falmouth, MA] – www.sciencewares.com*). A calibração dos eletrodos foi por medição do potencial (mV) registrado em três soluções tampão de fosfato de potássio com o pH conhecido: 5,0, 6,0 e 7,0 dado que as concentrações abrangem as condições dos meios utilizados.

A coleta dos dados da microssonda vibrátil seletiva foi realizada pelo *software* ASET, o qual forneceu a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto [x, y, z] do espaço, por meio da lei de Fick ($J = D (dc/dx)$). O coeficiente de difusão (D) é um valor tabelado para cada íon (de acordo com *Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.*). A diferença espacial (dx) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em

que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo (15 μm). A diferença de concentração (dc) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e da equação previamente determinada para o ionóforo durante o processo de calibração. Durante as análises das raízes do abacaxizeiro, o pH do meio foi mantido em $5,70 \pm 0,1$. Neste trabalho experimental foram utilizadas três repetições e dois tratamentos.

Aclimatização das mudas de abacaxi em sistema hidropônico

Para melhor adaptação das plantas e homogeneização das raízes, todo o sistema radicular maduro foi extirpado. Logo, foram colocadas 2 plântulas em pote de 500ml com água deionizada, ligados a uma bomba de ar acionada por um *timer* analógico programado para o período de 15 minutos a cada hora.

Aos 15 dias todas as plântulas já estavam com novas raízes e receberam a solução nutritiva de Hoagland a $\frac{1}{2}$ força iônica (Hoagland & Arnon, 1950). Esta foi preparada com água deionizada contendo as seguintes quantidades e respectivas fontes na composição: 0,25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,98 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,49 mM KNO_3 , 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM KH_2PO_4 , 20 μM Fe-EDTA, 5,0 μM MnSO_4 , 0,38 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, e 23 μM H_3BO_3 . O pH da solução foi ajustado para 5,6-5,8 com HCl ou NaOH.

Aos 60 dias de cultivo em solução nutritiva, as plântulas receberam os tratamentos com 1,5 mM Si ou sem Si durante 30 dias. As soluções nutritivas foram renovadas a cada três dias. Para indução de anóxia, o sistema de aeração foi desligado durante 72 horas (três dias).

Neste trabalho foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 4x4 (quatro tratamentos com quatro repetições utilizando a cultivar 'Vitória').

Obtenção da fração mitocondrial e microssomal

No final do experimento, foram separados e coletados os tecidos mais jovens das folhas (a parte basal) e das raízes (as pontas) e por centrifugação diferenciada foram isoladas as frações mitocondriais e microssomias, como descrito por Façanha & de Meis (1998), com modificações. As amostras de tecidos frescos de folhas e raízes (5g) foram maceradas e homogeneizadas em

meio tamponado composto por 250 mM de sacarose, Glicerol (10%), 2 mM de DTT, 5 mM EDTA, PVP-40 (0,4%), 100 mM KCl, BSA (0,3%), 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina, 50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), na relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2. O homogenato foi filtrado e submetido à primeira centrifugação a 1500 xg por 15 minutos para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido à nova centrifugação, 10.000 xg por 15 minutos. O precipitado (*Pellet*), fração mitocondrial, foi ressuspensão em 2,5 ml de solução tampão HEPES-KOH (pH 7,5) com: Glicerol a 10%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM. Enquanto o sobrenadante desta última centrifugação foi ultracentrifugado a 100.000 xg, por 30 minutos. Obtendo-se o pellet relacionado à fração microsomal, este foi ressuspensão em 2,5 ml de solução tampão HEPES-KOH (pH 7,5) com: Glicerol a 10%, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina, e 5 mM EDTA. A dosagem de proteína das frações foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

Atividade das H⁺-ATPases

As atividades ATPásicas e pirofosfatásicas foram determinadas por colorimetria de fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a hidrólise de ATP ou PPI (Fiske & Subbarow, 1925). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2000) à 750 nm.

Monitoramento do gradiente de prótons

O transporte de prótons foi estimado como descrito por Michelis & Spanswick (1986), com modificações de Facanha & de Meis (1998), mediante o monitoramento da taxa de decréscimo da fluorescência/minuto da sonda metacromática ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina), excitada sob um feixe de luz em comprimento de onda 415 nm e a emissão captada 485 nm no fluorímetro.

A dose de 1,5 mM de Si utilizada foi determinada com base em resultados dos parâmetros cinéticos de absorção de ácido silícico, encontrados em trabalhos anteriores (Tamai & Ma, 2003; Mitani & Ma, 2005; Ma & Yamji, 2006; Nikolic et al., 2007). A constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0,15-0,35 mM, e a Velocidade máxima (V_{max}) 1,5 - 1,6 mM, para diferentes culturas. O elemento Si foi adicionado

como K_2SiO_3 à solução nutritiva. Sendo que o K excedente introduzido por silicato de potássio foi subtraído do KNO_3 , e o nitrato foi suplementado com ácido nítrico diluído.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa Sisvar para Windows versão 5.3 ou pelo erro padrão (Pimentel-Gomes, 2000; Ferreira, 2011).

RESULTADOS

As plantas submetidas a condições de hipóxia e normóxia não apresentaram diferenças significativas em termos dos parâmetros de crescimento, massa fresca e quantidade de folhas emitidas, com ou sem silício na composição da solução nutritiva, nas condições de cultivo hidropônico testadas (Figura 1).

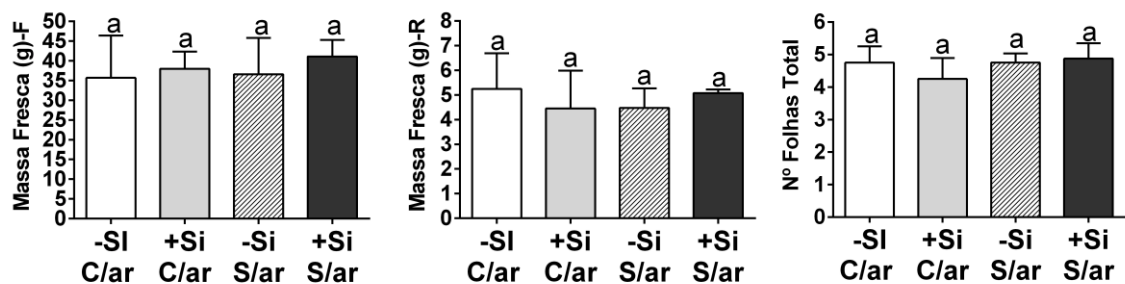


Figura 1- (A) Massa fresca da parte aérea; (B) Massa fresca das raízes; (C) Número total de folhas lançadas, em mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado, cultivado em solução nutritiva com/sem Si e submetido ao estresse causado por falta de aeração durante 72 horas. Barras representam desvio padrão (\pm SD). Letras distintas entre tratamentos indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Atividades das bombas protônicas

Plântulas de abacaxi tratadas com Si e submetidas ao estresse foram avaliadas a partir das vesículas isoladas nos tecidos celulares das folhas e raízes com a finalidade de conhecer o potencial energético das bombas protônicas. Os

tecidos foliares tiveram baixa atividade de hidrólise de ATP para as bombas do tipo P e V em boas condições de aeração e tratadas com Si, enquanto as H⁺-PPases, sem apresentar a característica de dependência do potássio na sua atividade, apresentou maiores taxas para nos tratamentos com aeração com/sem silício, mostrando-se pouco ativas na falta de oxigenação da solução nutritiva. As bombas mitocondriais (F-ATPases) apresentam respostas inibitórias nos tratamentos sob ausência de oxigenação, no entanto, a presença de Si aumentou significativamente a atividade de F-ATPase nestas condições. (Figura 2).

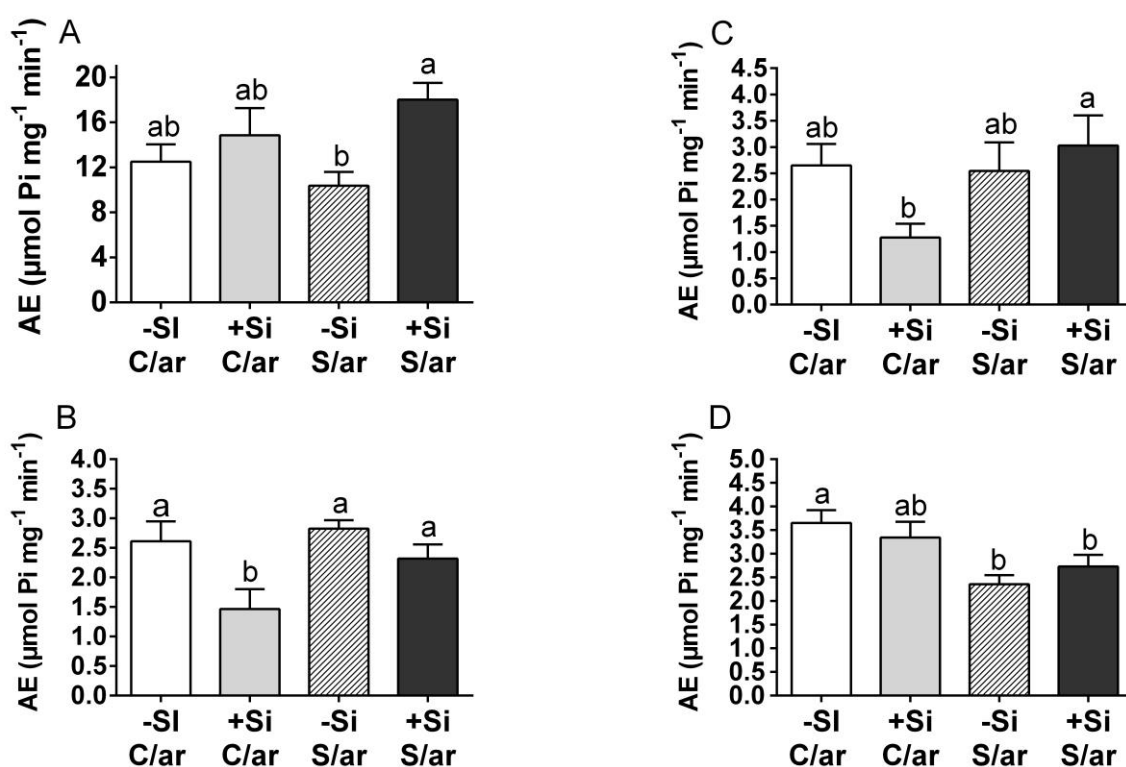


Figura 2: Atividade de hidrólise de ATP da F-ATPase (A), P-ATPase (B), V-ATPase (C), V-PPase (D), em vesículas isoladas de bainhas foliares nas mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado, cultivado em sistema hidropônico com/sem Si e submetidas ao estresse por 72 horas sem aeração. Barras representam erro padrão (n=4). Letras distintas entre tratamentos indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

A presença do Si na solução hidropônica ativou as bombas da membrana plasmática e do tonoplasto nos tecidos radiculares. A P-ATPase apresentou aumento de 78% e 66% da atividade de hidrólise de ATP nos tratamentos com e

sem aeração, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 3B). As V-ATPase aumentaram 80% e 75% nos tratamentos com e sem aeração, respectivamente, a mais do que o controle (Figura 3C). As bombas tipo V-PPase aumentaram com a presença do Si, mas também com ausência de oxigenação na solução nutritiva, porém, o Si sob condições de estresse induziu efeitos amenizadores nestas bombas (Figura 3D). As F-ATPases não diferiram entre os tratamentos aplicados (Figura 3A).

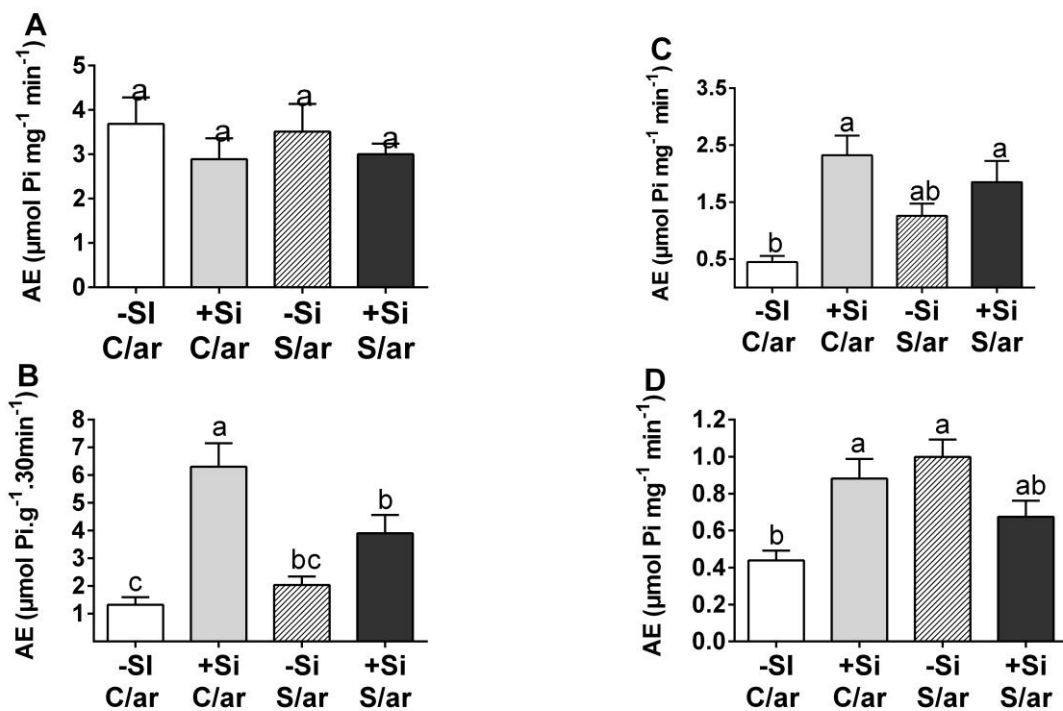


Figura 3: Atividade de hidrólise de ATP da F-ATPase (A), P-ATPase (B), V-ATPase (C), V-PPase (D), em vesículas isoladas de raízes de mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado, cultivado em sistema hidropônico com/sem silício e submetidas ao estresse por 72 horas sem aeração. Barras representam desvio padrão (\pm SD). Letras distintas entre tratamentos indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Gradiente de H^+

Foram mensurados os transportes de H^+ da F-ATPase, P-ATPase e da V-ATPase. Nas folhas, foi observado que a velocidade inicial (V_0) da F-ATPase foi estimulada pela falta de oxigenação na solução nutritiva, atingindo o dobro do transporte detectado no tratamento em aeração. Ativação esta que

também pode ser verificada pelo aumento na magnitude total do gradiente de H^+ ($\Delta F_{\text{máx}}$) entre controle e plantas não aeradas (Figura 4A e 5A). O uso do Si reduziu a V_0 da P-ATPase em 49% e 51% nos tratamentos em normoxia e anóxia, respectivamente, em relação ao controle (Figura 4B). Para a V-ATPase, nas condições de estresse não houve alterações para V_0 e $\Delta F_{\text{máx}}$ junto aos tratamentos com Si (Figura 4C e 5C).

No sistema radicular, o transporte de prótons da F-ATPase na ausência de oxigenação foi reduzido em 57% no tratamento sem Si e em 34% com Si em relação ao controle aerado (Figura 4D). A P-ATPase das células radiculares apresentou a maior V_0 no tratamento com Si em condições de normoxia, porém, em condições de hipóxia houve inibição desta bomba na presença Si (Figura 4E). A falta de oxigenação causou aumento da V_0 e $F_{\text{máx}}$ na V-ATPase radicular em comparação ao controle, sendo que o uso do Si somente atenuou este efeito estimulatório (Figura 4F e 5F).

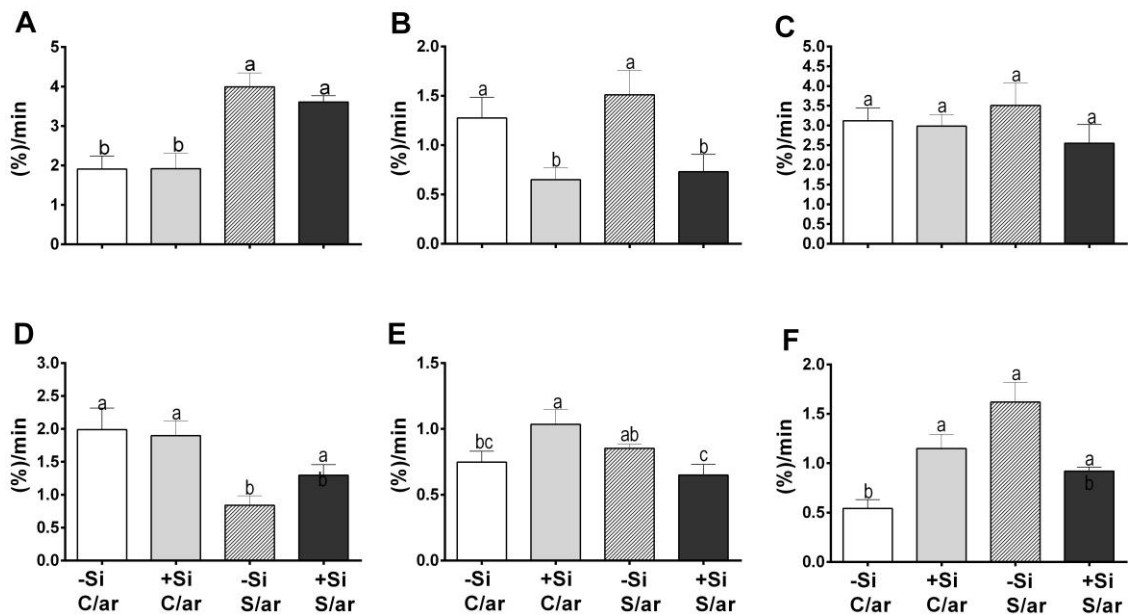


Figura 4: Velocidade inicial de transporte de H^+ (V_0) nas bainhas foliares: mediadas pela F-ATPase (A), P-ATPase (B), V-ATPase (C); e nas raízes: mediadas pela F-ATPase (D), P-ATPase (E), V-ATPase (F). As análises foram feitas em vesículas extraídas de plantas de abacaxi, cultivadas em sistema hidropônico com/sem Si, submetidos por 72 horas a ausência de aeração.

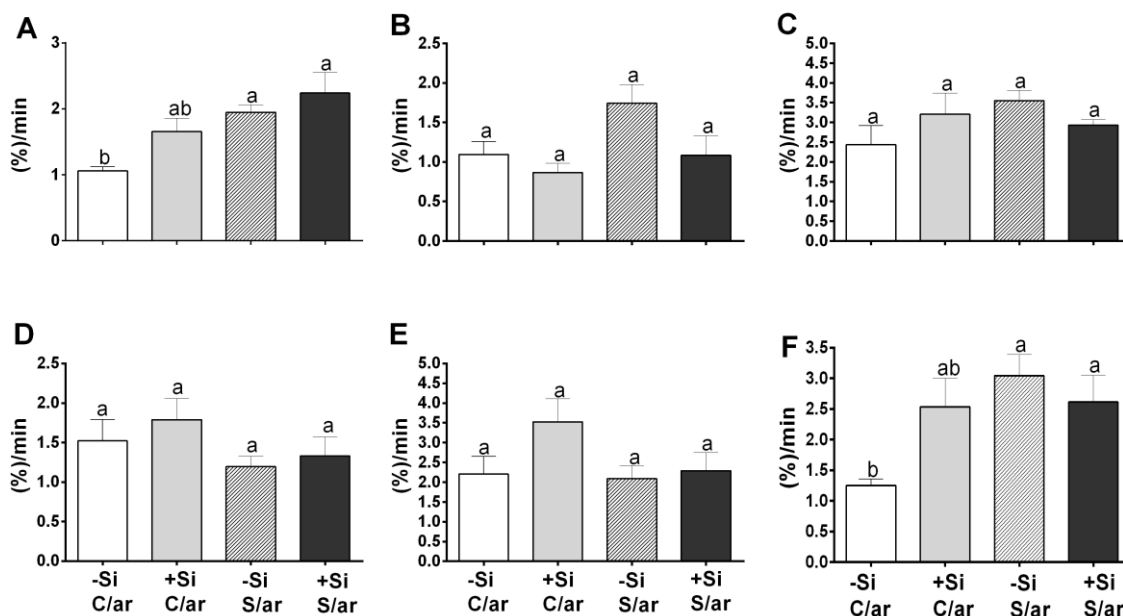


Figura 5: Variação da fluorescência máxima do transporte de H⁺ ($\Delta F_{\text{máx}}$) em microsomas de bainhas foliares: mediadas pela F-ATPase (A), P-ATPase (B), V-ATPase (C); e nas raízes: mediadas pela F-ATPase (D), P-ATPase (E), V-ATPase (F). As análises foram feitas usando a sonda ACMA sensível a ΔpH em vesículas membranares extraídas de plantas de abacaxi cultivadas em sistema hidropônico com/sem Si, submetidos por 72 horas sem aeração.

Acoplamento das bombas protônicas

A razão entre velocidade inicial do transporte de H⁺ (V_0) e a hidrólise de ATP permite determinar a eficiência das bombas eletrogênicas. Nos tecidos foliares, as bombas tipo V apresentaram maior acoplamento no tratamento com Si e aeradas, quando comparadas com o mesmo tratamento sem aeração (Figura 6C). As bombas tipo P não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Figura 6B). Nas atividades da H⁺-PPase não foi detectado transporte de H⁺ para nenhum tratamento nestas condições de cultivo (Dados não mostrados). Já as F-ATPase, em condições normais de aeração e sem silício, apresentam um menor acoplamento quando comparadas com plantas sem aeração (Figura 6B).

O índice de acoplamento das bombas de H⁺ do sistema radicular mostra comportamento semelhante entre as bombas de H⁺ da membrana plasmática e de vacúolo, ambas mais acopladas nos tratamentos sem Si, aeradas ou não aeradas (Figura 6E e 6F). Nas bombas mitocondriais da raiz, ocorre maior acoplamento para os tratamentos sob deficiência de oxigenação, porém as plantas sem Si apresentaram a menor eficiência entre os tratamentos (Figura 6D).

A relação da eficiência das bombas, em raízes e folhas, permite determinar a distribuição funcional e energética das proteínas. A correlação entre F-ATPase foliar e radicular mostra valores positivos para as plantas cultivadas na presença de Si e submetidas à deficiência de oxigenação ($r=0,7991$), os demais tratamentos apresentaram valores fortes e moderados, mas negativos ((-Si/C/ar $r=-0,8502$); (+Si/C/ar $r=-0,9699$), (-Si/S/ar $r=-0,6698$)).

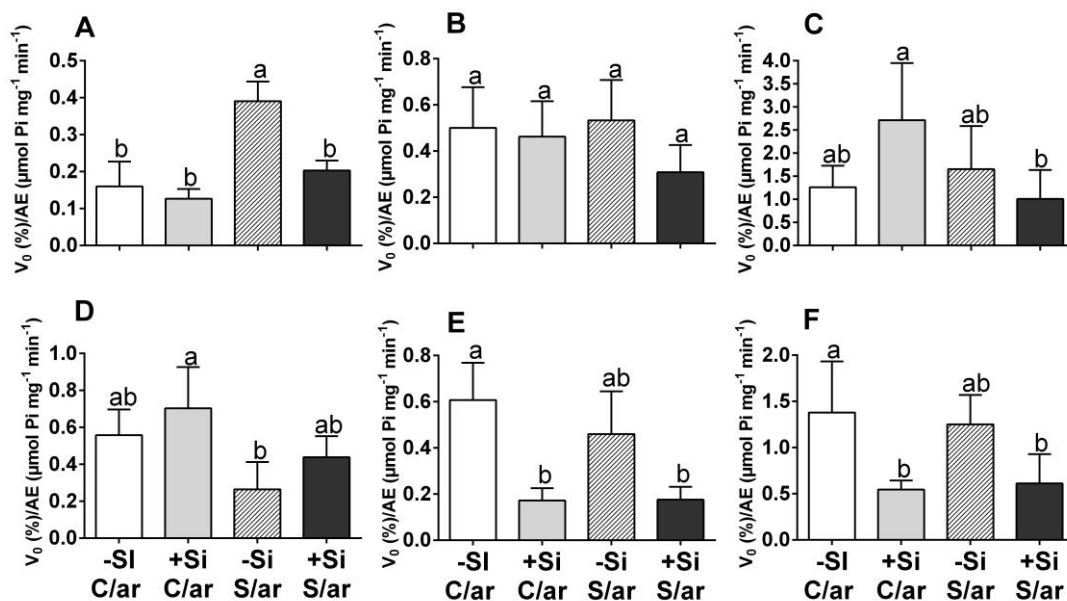


Figura 6. Acoplamento das bombas de H^+ em microsomas de bainhas foliares: F-ATPase (A), P-ATPase (B), V-ATPase (C); e nas raízes: F-ATPase (D), P-ATPase (E), V-ATPase (F), em mudas de abacaxi “Vitória” micropropagado cultivado em aplicação com/sem Si e submetido ao estresse causado por falta de aeração durante 72 horas. Barras representam desvio padrão (\pm SD). Letras distintas entre tratamentos indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Dinâmica do fluxo de H^+

Para estimar a eletrofisiologia da participação da H^+ -ATPase tipo P no transporte de silício em tecidos vivos radiculares das plântulas de abacaxizeiro “Vitória”, foram analisados os fluxos de prótons utilizando o sistema SIET (*Scanning Ion-Selective Electrode Technique*). Oscilações transientes do íon H^+ , detectadas pelo SIET, revelaram efluxos na presença do Si e influxos na ausência deste. O ortovanadato de sódio, inibidor de ATPases do tipo P, inibiu reversivelmente ambos, tanto os influxos quanto os efluxos de H^+ (Figura 7). O pH da rizosfera não foi alterado pela adição de silício na solução.

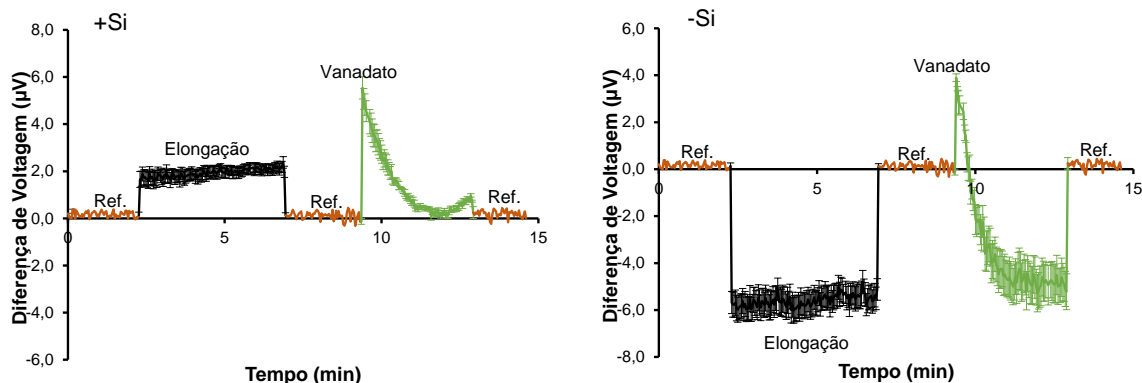


Figura 7- Diferença de voltagem (μV) medido por uma microsonda vibrátil seletiva a H^+ , na zona de alongamento de raiz de plântula de abacaxi microproagado, cultivado por 72 h em solução nutritiva com $\frac{1}{5}$ da força iônica (Hoagland & Arnon, 1950) sem ou com 1,5 mM Si por 72 h.

DISCUSSÃO

A massa fresca da folha e raiz e o número de folhas lançadas não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que não houve sério comprometimento do desenvolvimento da planta, a qual é uma bromeliácea de crescimento lento. Todavia, ainda que a hipóxia induzida não tenha provocado danos perceptíveis no crescimento das plântulas, efeitos no metabolismo energético foram claramente evidenciados por meio das análises *in vitro* e *in vivo* de atividades das principais bombas protônicas de suas células radiculares e foliares.

Os resultados mostram que quando o cultivo é feito na ausência de Si e submetido a condições de hipóxia, a F-ATPase é mais eficiente na parte aérea do que no sistema radicular (Figura 5A e 5D). O sistema de aeração mantém altos níveis de oxigênio próximo das raízes, com isto, pode ser armazenado gases em grandes espaços intercelulares corticais, para suprir às mitocôndrias (Taiz & Zeiger, 2013). As plantas podem desenvolver aerênquima como resposta à escassez de oxigênio, que funcionam como um reservatório de gás (Aliscioni, 2000; Barboza et al., 2006). A inibição induzida por hipóxia da fosforilação oxidativa mitocondrial, resulta em uma crise energética que interfere na produção de ATP, necessária para os processos celulares (Gibbs & Greenway, 2003). À

medida que o gás se desloca da superfície da raiz para as células no centro, não há oxigenação suficiente para a respiração celular, assim ocorre a redução na produção de ATP, podendo levar a morte celular (Taiz & Zeiger, 2013). Assim, a presença do Si na solução nutritiva em condições de anóxia proporcionou maior distribuição energética na planta, visto através do acoplamento das bombas, ou seja, o Si pode ter amenizado efeitos deletérios celulares no sistema radicular e reduziu a exigência energética no metabolismo radicular e aumentou a eficiência da F-ATPase foliar (Figura 6A e 6D).

O desacoplamento da P-ATPase no sistema radicular, nos tratamentos com Si c/sem aeração, sugere que este elemento aplicado na solução nutritiva de forma contínua, pode afetar o desempenho da bomba e diminuir a eficiência funcional desta bomba (Figura 6E). Porém, tal efeito parece ser tecido específico, visto que a eficiência dessa enzima não é alterada na parte aérea para nenhum dos tratamentos (Figura 6B). A extrusão de prótons na membrana plasmática está relacionada com o uso direto de energia metabólica para o transporte de íons e solutos através da membrana (Neumann & Römheld, 2012; Fernandes & Souza, 2006). Segundo Ming et al. (2012), o Si pode conferir estabilidade à estrutura da plasmalema e reduzir a perda de sólidos solúveis, e a ação deste elemento sobre a P-ATPase pode ser parte integrante de seu mecanismo de ação.

As H⁺-ATPases são responsáveis pelo controle do fluxo de H⁺ através das membranas, acoplados a absorção de nutrientes e outros metabólitos. As vesículas microssomais isoladas das raízes do abacaxizeiro, suplementados com Si, apresentaram altas taxas de atividade hidrolítica da P-ATPase (Figura 3). Esses resultados podem ser complementados com os dados do fluxo de H⁺ medido próximo à superfície das células nas raízes (Figura 7). O efluxo ativo de prótons detectado é mediado pela P-H⁺-ATPase, por sua sensibilidade ao ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) inibidor das ATPases do tipo P (Wach & Graber, 1991). Segundo Portillo (2000), o bombeamento de H⁺ para fora das células com a hidrólise de ATP, energiza os transportadores e favorece a absorção de nutrientes. A relação entre a atividade hidrolítica da P-ATPase e o efluxo, permite afirmar a presença de transportadores de Si acoplados ao contratransporte de H⁺, localizados nas membranas plasmáticas das células radiculares de abacaxizeiro, assim como os encontrados em arroz (Ma et al., 2007), trigo e cevada (Mitani et al., 2009).

As bombas eletrogênicas encontradas na membrana vacuolar, também geram força próton-motriz no tonoplasto, pela qual energizam-se os movimentos de íons e solutos através desta membrana via mecanismos de transporte (Taiz & Zeiger, 2013). A resposta metabólica desta proteína foi diferente entre parte aérea e raiz, com relação ao Si aplicado na solução nutritiva. Na presença deste elemento na solução em contato direto com a raiz, em condições de normóxia, causou desacoplamento das bombas, enquanto as folhas não foram afetadas. Entretanto, a falta de aeração induziu efeitos parecidos nas duas partes analisadas. Uma hipótese primária previu que a rápida deposição de silício no sistema radicular poderia contribuir para aumentar a resistência e a rigidez das paredes celulares, e com isso, reduzir o extravasamento de sólidos solúveis para fora da célula (Ma & Yamji, 2006; Isa et al., 2010).

As menores taxas da atividade hidrolítica na H^+ -PPase potássio independente observadas nas folhas foram nos tratamentos com estresse de anóxia (Figura 2C) e a ausência de transporte de H^+ dependente de PP_i e podem estar associadas ao aumento da atividade da V-ATPase nestas mesmas condições, a qual estaria suprindo a ineficiência da H^+ -PPase. Em condições de normóxia com Si houve redução da atividade da V-ATPase. Esta relação entre as duas bombas pode ser devido à localização em que elas se encontram, ou seja, são duas bombas vacuolares. A enzima H^+ -PPase utiliza um substrato de baixo custo para a célula, o pirofosfato inorgânico (PP_i), que pode ativar o metabolismo vegetal em condições de estresse energético quando os níveis de ATP citossólico estão exauridos (Stitt, 1998).

No sistema radicular as H^+ -PPase tiveram menor taxa de hidrólise no controle do que os demais tratamentos, o estresse por hipóxia e a adição de Si na solução nutritiva (Figura 3C). Isto contrasta com o aumento da atividade desta bomba, característico das respostas a estresses causados pela falta de oxigênio (Hernández-Domíguez et al., 2012; Park et al., 2005; Darley et al., 1995).

As enzimas H^+ -PPases presentes no vacúolo tem sido descrita como dependentes de íons K^+ para se obter uma plena ativação (Davies et al., 1992; Obermeyer et al., 1996). Porém, neste trabalho com plantas de abacaxi do cultivar Vitória, não foi possível detectar o componente dependente de K^+ nesta bomba em membranas isoladas de nenhuma das partes analisadas da planta. Sato et al. (1994) estudaram a H^+ -PPase incorporada em proteolipossomos, e descartaram

uma associação direta desta bomba com o transporte de K^+ . A falta de sensibilidade ao K^+ parece ser uma característica das V-PPases de abacaxizeiro, pelo menos quando mantido nestas condições de cultivo hidropônico.

CONCLUSÃO

O Si na solução nutritiva proporcionou um melhor balanço energético na planta, em condições de hipóxia, ao inibir as bombas eletrogênicas P-ATPase e V-ATPase do sistema radicular e aumentar a eficiência da F-ATPase foliar.

O Si exerce efeitos estimulatórios na hidrólise de pirofosfato mediado pelas H^+ -PPases do sistema radicular. Porém, tal atividade parece estar relacionada à liberação de P_i e não para a geração de gradiente eletroquímico, o qual não pode ser detectado nos microssomas de plantas cultivadas hidroponicamente.

As evidências eletrofisiológicas obtidas com o microelétrodo vibrátil SIET foram compatíveis com a presença de transportadores de Si, acoplados ao contratransporte de íons H^+ , e aparentemente regulados de forma coordenada com as bombas de H^+ do tipo P-ATPases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliscioni, S.S. (2000). Anatomía ecológica de algunas especies del género *Paspalum*. *Darwiniana*, 38, 187–207.
- Ashraf, M., Ahmad, R., Bhatti, A.S., Afzal, M., Sarwar, A., Maqsood, M.A., Kanwal, S. (2010). Amelioration of Salt Stress in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by Supplying Potassium and. *Pedosphere*, 20, 153–162.
- Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, e L.A.C. (2006). Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesq. agropec. bras*, 41, 185–194.

- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Cunha, G.A.P. da, Reinhardt, D.H., Matos, A.P. de, Souza, L.F. da S., Sanches, N.F., Cabral, J.R.S., Almeida, O.Á. de (2005). Recomendações Técnicas para o Cultivo do Abacaxizeiro. *Circular Técnico-Embrapa: Cruz das Almas, BA*, 73, 1–11.
- Darley, C.P., Davies, J.M., Sanders, D. (1995). Chill-Induced Changes in the Activity and Abundance of the Vacuolar Proton-Pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls. *Plant Physiology*, 109, 659–665.
- Davies, J.M., Poole, R.J., Rea, P. a, Sanders, D. (1992). Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 11701–5.
- Drew, M.M.C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 223–250.
- Epstein, E. (1999). Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 641–64.
- Façanha, A.R., de Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in Tonoplast Vesicles from Maize Coleoptiles and Seeds. *Plant Physiology*, 116, 1487–1495.
- FAO.FAOSTAT (2014). Agricultural statistics database. Home: World agricultural Information Center.
- Feijó, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growthdependent acidic tip. *The Journal of Cell Biology*, 144, 483-496.
- Felle, H.H. (2005). pH regulation in anoxic plants. *Annals of Botany*, 96, 519–532.
- Fernandes, M.S., Souza, S.R. (2006). Absorção de nutrientes, *In* M. S. Fernandes (ed.) *Nutrição mineral de plantas*, Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.115-152.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*,6, p.1039-1042.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of biological chemistry*, 66, 375–400.

- Gibbs, J., Greenway, H. (2003). Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*, 30, 1–47.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants (2013). In: K Vahdati, C Leslie, (eds.). *Abiotic stress – plant responses and applications in agriculture*. INTECH, Rijeka, Croatia, 169–205.
- Hernández-Domínguez, E.E., Valencia-Turcotte, L.G., Rodríguez-Sotres, R. (2012). Changes in expression of soluble inorganic pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under phosphate starvation. *Plant Science*, 187, 39–48.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull*, 347, 1–32.
- IBGE (2016). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>. Acesso em 05/02/2017.
- Isa, M., Bai, S., Yokoyama, T., Ma, J.F., Ishibashi, Y., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M. (2010). Silicon enhances growth independent of silica deposition in a low-silica rice mutant, *Isi1*. *Plant and Soil*, 331, 361–375.
- Jackson, M.B., Herman, B., Goodenough, A. (1982). An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant, Cell & Environment*, 5, 163–172.
- Kennedy, R.A., Rumpho, M.E., Fox, T.C. (1992). Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.*, 100, 1–6.
- Koizumi, Y., Hara Y., Yazaki, Y., Sakano, K., Ishizawa, K. (2011). Involvement of plasma membrane H⁺-ATPase in anoxic elongation of stems in pondweed (*Potamogeton distinctus*) turions. *New Phytologist*, 190, 421–430.
- Liao, C.T., Lin, C.H. (2001). Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences*, 25, 148–157.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature*, 440, 688–91.

- Ma J.F., Yamaji N. (2008) Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 3049–3057.
- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., Yano, M. (2007). An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 448, 209–12.
- Ma, J.F., Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, 11, 392–397.
- Michelis, M.I.D.E., Spanswick, R.M. (1986). H⁺-Pumping driven by the vanadate-sensitive atpase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology*, 81, 542–547.
- Ming, D.F., Pei Z.F., Naeem, M.S., Gong, H.J., Zhou, W.J. (2012). Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stress in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198, 14–26.
- Mitani, N. & Ma, J.F. (2005). Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1255–1261.
- Mitani, N., Chiba, Y., Yamaji, N., Ma, J.F. (2009). Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *The Plant cell*, 21, 2133–42.
- Neumann, G., Römheld, V. (2012). Rhizosphere Chemistry in Relation to Plant Nutrition. In: Marchner P (ed.). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, p. 347–368. London: Academic Press.
- Nikolic, M., Nikolic, N., Liang, Y., Kirkby, E.A., Römheld, V. (2007). Germanium-68 as an adequate tracer for silicon transport in plants. Characterization of silicon uptake in different crop species. *Plant physiology*, 143, 495–503.
- Obermeyer, G., Sommer, A., Bentrup, F.W. (1996). Potassium and voltage dependence of the inorganic pyrophosphatase of intact vacuoles from *Chenopodium rubrum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1284, 203–212.
- Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. (2005). Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 18830–18835.

- Perata, P., Armstrong, W., Voeselek, L.A.C.J. (2011). Plants and flooding stress. *New Phytologist*, 190, 269–273.
- Pimentel-Gomes, F. (2000). *Curso de estatística experimental 14^a*. Piracicaba – SP: Editora da Universidade de São Paulo: 477p.
- Portillo, F. (2000). Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1469, 31–42.
- Ramos, A.C., Lima, P.T., Dias, P.N., Kasuya, M.C.M., Feijó, J.A. (2009). A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytologist*, 1, 1-15.
- Richmond, K. & Sussman, m. (2003). Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 268–272.
- Sato, M.H., Kasahara, M., Ishii, N., Homareda, H., Matsui, H., Yoshida, M. (1994). Purified vacuolar inorganic pyrophosphatase consisting of a 75-kDa polypeptide can pump H⁺ into reconstituted proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 6725–6728.
- Sousa, C.A.F. de, Sodek, L. (2002). The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *J. Plant Physiol. Braz*, 14, 83–94.
- Souza, L.F. da S., Reinhardt, D.H. (2009). Abacaxizeiro, *In: L. A. Crisóstomo, A. Naumov (Orgs) Adubando para Alta Produtividade e Qualidade Fruteiras Tropicais do Brasil*, Fortaleza-CE:Embrapa Agroindústria Tropical: International Potash Institute. p. 182–200.
- Stitt, M. (1998). Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Botanica Acta*, 111, 167–175.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013). *Fisiologia vegetal* 5^a Ed. Porto Alegre: Artmed.
- Tamai, K. & Ma, J.F. (2003). Characterization of silicon uptake by rice roots. *New Phytologist*, 431–436.
- Wach, A., Graber, P. (1991). The plasma membrane H⁺-ATPase from yeast. *Eur. J Biochem*, 201, 91–97.
- Zonia, L. Cordeiro, S., Tupý, J., Feijó, J.A. (2002). Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3, 4, 5, 6-tetrakisphosphate. *The Plant Cell Online*, 14, 2233-2249.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de Si para atenuar os efeitos de estresses inerentes à fase de aclimatização, principalmente seu efeito sobre a deficiência hídrica e anóxia nas plantas de abacaxi. As principais bombas protônicas da célula vegetal foram analisadas como marcadores bioquímicos da ação do Si no desenvolvimento das mudas.

Nas condições de estresse hídrico, plantas tratadas com Si apresentaram maior eficiência no uso da água. As plantas hidratadas e suplementadas com Si tiveram maior crescimento da parte aérea, mas com o menor número de folhas, o que favorece uma climatização mais precoce em relação às plantas não tratadas.

As oscilações transientes do íon H^+ detectadas com o microelétrodo vibrátil SIET foram coerentes com a presença de transportadores específicos no sistema radicular, acoplado ao contratransporte de íons H^+ , com fortes evidências da participação da bomba H^+ -ATPase tipo P.

Em solução nutritiva, o uso contínuo de Si reduziu a eficiência das bombas eletrogênicas P-ATPase e V-ATPase no sistema radicular, independente das condições de estresse submetidas.

Concluiu-se que o envolvimento do Si na modulação das bombas eletrogênicas exerce influência sobre a energética das membranas celulares do abacaxizeiro sob estresse e melhora as condições fotossintéticas, potencializando principalmente o uso da água.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, O.A., De Souza, L.F.S. da, Reinhardt, H. do, Caldas, R.C. (2002) Influência da irrigação no ciclo do abacaxizeiro cv. Pérola em área de tabuleiro costeiro da bahia. *Revesta Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24, 431–435.
- Aquije, de F.V.G.M., Zorzal, P.B., Buss, D.S., Ventura, J.A., Fernandes, P.M.B., Fernandes, A.A.R. (2010) Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Reports*, 29, 1109–1117.
- Arnon, D.I., Stout, P.R. (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*, 14, 371–375.
- Asmar, S.A., Castro, E.M., Pasqual, M., Pereira, F.J., Soares, J.D.R. (2013) Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. *Scientia Horticulturae*, 161, 328–332.
- de Azevedo, P. V., de Souza, C.B., da Silva, B.B., da Silva, V.P.R. (2007) Water requirements of pineapple crop grown in a tropical environment, Brazil. *Agricultural Water Management*, 88, 201–208.
- Barboza, S.B.S.C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, e L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa agropecuária. Brasileira*, 41, 185–194.

- Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G. (2002) *The Pineapple Botany, Production and Uses*. University of Hawaii at Manoa Honolulu USA: CABI Publishing.
- Van Bockhaven, J., Vleesschauwer, D. De, Hofte, M. (2013) Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1281–1293.
- Braga, F.T., Pasqual, M., Castro, E.M. De, Rafael, G.C., Favero, A.C., Cainã, T., Valente, T. (2011) Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 35, 863–868.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Ma, J.F., Rengel, Z., Zhao, F. (2012) Beneficial Elements, In *Marchner P. (ed.): Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, p. 249–270. London: Academic Press.
- Camargo, M.S. De, Pereira, H.S., Korndörfer, G.H., Queiroz, A.A., Borges, C. (2007) Soil reaction and absorption of silicon by rice. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 64, 176–180.
- Carr, M.K. V (2012) The water relations and irrigation requirements of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*): a Review., 1–14.
- Chiba, Y., Mitani, N., Yamaji, N., Ma, J.F. (2009) HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. *The Plant Journal*, 810–818.
- Collins, J.L. (1960) *The pineapple : botany, cultivation and utilization*. New York: Interscience.
- Cooke, J., Leishman, M.R. (2011) Is plant ecology more siliceous than we realise? *Trends in Plant Science*, 16, 61–68.
- Crestani, M., Barbieri, R.L., Oliveira, A.C. De (2010) Das Américas para o mundo - origem , domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural*, 40, 1473–1483.
- Cunha, G.A.P. da, Cabral, J.R.S., Souza, L.F. da S. (1999) *O Abacaxizeiro: Cultivo, Agroindústria e Economia*. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.
- Datnoff, L.E., Snyder, G.H., Korndorfer, G.H. (2001) *Silicon in Agriculture. Studies in plant Science* 1ª edition. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens A.N., Golldack D. (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1969–1980.
- Epstein, E. (1999) Emanuel Epstein. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 641–664.
- Epstein, E. (1994) Review The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 11–17.
- FAO.FAOstat (2014) Agricultural statistics database. Home: World agricultural Information Center.
- Fernandes, M.S., Souza, S.R. (2006) Absorção de nutrientes, *In* M. S. Fernandes (ed.) *Nutrição mineral de plantas*, Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.115-152.
- Forgac, M. (1998) Structure , function and regulation of the vacuolar (H⁺) - ATPases. , 440, 258–263.
- Fuglsang, A.T., Paez-Valencia J., Gaxiola R.A. (2011) Plant Proton Pumps: Regulatory Circuits Involving H⁺-ATPase and H⁺-PPase, *In*: M. Geisler e K. Venema (eds.) *Signaling and communication in plants: transporters and pumps in plant signaling*. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 39–64
- Futai, M., Wada, Y., Kaplan, J.H. (2004) *Handbook of ATPases. Biochemistry, Cell Biology, Pathophysiology*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Gaxiola, R. a, Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS letters*, 581, 2204–14.
- Gibbs, J., Greenway, H. (2003) Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I . Growth , survival and anaerobic catabolism. Review : *Functional Plant Biology*, 30, 1–47.
- Guével, M.-H., Menzies, J.G., Bélanger, R.R. (2007) Effect of root and foliar applications of soluble silicon on powdery mildew control and growth of wheat plants. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 429–436.
- Hepton, A. (2002) Cultural System. *In*: D. P. Bartholomew, R. E. Paull, e K. G. Rohrbach (eds.). *The Pineapple Botany, Production and Uses*. University of Hawaii at Manoa Honolulu USA: CABI Publishing., p. 109–142.

- Hodson, M.J., White, P.J., Mead, A., Broadley, M.R. (2005) Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of botany*, 96, 1027–46.
- IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>. Acesso em 05/02/2017.
- Inoue, T., Wang, Y., Jefferies, K., Qi J., Hinton, A., Forgac, M. (2005) Structure and regulation of the V-ATPases. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 37, 393–8.
- Jefferies, K.C., Cipriano, D.J., Forgac, M. (2008) Function , structure and regulation of the vacuolar H⁺-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 33–42.
- Jones, L.H.P., Handreck, K.A. (1965) Studies of silica in the oat plant. *Plant and Soil*, 23, 79–96.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., Forgac, M. (2003) Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS letters*, 545, 76–85.
- Korndörfer, G.H. (2006) Os Elementos Benéficos, In M. S. Fernandes (ed.) *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 598–638.
- Liang, Ny., Nikolic, M., Bélanger, R., Haijun, G., Song, A. (2015) *Silicon in Agriculture. From Theory to Practice*. Dordrecht: Dordrecht: Springer, p. 235.
- Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y.-G., Christie, P. (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 147, 422–8.
- Ma, J.F. (2004) Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50, 11–18.
- Ma, J.F., Miyake, Y., Takahashi, E. (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants, in: L. E. Datnoff, G. H. Snyder, e G. H. Korndorfer (eds.) *Silicon in agriculture*. Amsterdam: Studies in plant science, p. 17–55.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano M. (2006) A silicon transporter in rice. *Nature*, 440, 688–91.
- Ma, J.F., Yamaji, N. (2008) Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 3049–3057.

- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani-Ueno, N. (2011) Transport of silicon from roots to panicles in plants. *Proceedings of the Japan Academy*, 87, 377–385.
- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., Yano, M. (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, 448, 209–12.
- Ma, J.F., Yamaji, N. (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, 11, 392–397.
- Malézieux, E., Côte, F., Bartholomew, D.P. (2002) Crop environment, plant growth and physiology. In: D. P. Bartholomew, R. E. Paull, e K. G (eds.). *The Pineapple, Botany, Production and Uses*. Rohrbach. University of Hawaii at Manoa Honolulu USA: CABI Publishing , p. 69–107.
- Matichenkov, V. V., Bochamikova, E.A. (2001) The relationship between silicon and soil physical and chemical properties, In: L. E. Datnoff, G. H. Snyder, e G. H. Korndorfer (eds.) *Silicon in Agriculture. Studies in plant Science*. Amsterdam: Elsevier Science B.V, p. 209–219.
- Matos, A.P. De, Reinhardt, D.H. (2009) Pineapple in Brazil: Characteristics , Research and Perspectives. *Embrapa Cassava & Tropical Fruit*, 25–36.
- Mauad, M., Alexandre, C., Crusciol, C., Filho, H.G., Corrêa, J.C. (2003) Nitrogen and silicon fertilization of upland rice. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 60, 761–765.
- Meurer, E.J. (2010) *Fundamentos de Química do Solo*. Porto Alegre: Evangraf LTDA, p. 264.
- Mhatre, M. (2007) Micropropagation of pineapple, *Ananas comosus*, In: S. M. Jain, H. Häggman (eds.). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, The Netherlands. Springer. p. 499.
- Mitani, N., Chiba, Y., Yamaji, N., Ma, J.F. (2009) Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *The Plant cell*, 21, 2133–42.
- Mitani, N., Ma, J.F., Iwashita, T. (2005) Identification of the silicon form in xylem sap of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant & cell physiology*, 46, 279–83.
- Moreira, M.A., Carvalho, J.G. de, Pasqual, M., Fráguas, C.B., Silva, A.B. da (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 30, 875–879.

- Neild, R.E., Boshell, F. (1976) An agroclimatic procedure and survey of the pineapple production potential of Colombia. *Agricultural Meteorology*, 17, 81–92.
- Paez-valencia, J., Patron-soberano, A., Rodriguez-leviz, A., Sanchez-lares, J., Sanchez-gomez C., Valencia-mayoral P., Diaz-rosas G., Gaxiola R. (2011) Plant Science Plasma membrane localization of the type I H⁺-PPase AVP1 in sieve element – companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 181, 23–30.
- Pereira, H.S., Korndörfer, G.H., Vidal, A.D.A. (2004) Silicon sources for rice crop. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61, 522–528.
- Pulz, A.L., Crusciol, C.A.C., Lemos, L.B., Soratto, R.P. (2008) Influência de silicato e calcário na nutrição, produtividade e qualidade da batata sob deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Ciência do. Solo*, 32, 1651–1659.
- Reinhardt, D.H., Renato, J., Cabral, S., Francisco, L., Sanches, N.F. (2001) Pérola and Smooth Cayenne pineapple cultivars in the state of Bahia , Brazil: growth, flowering, pests, diseases, yield and fruit quality aspects. *Fruits*, 57, 43–53.
- Reinhardt, D.H., Souza, L.F. da S., Cabral, J.R.S. (2000) *ABACAXI Produção Aspectos Técnicos* 1ª Edição. Org Embrapa Mandioca e Fruticultura. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.
- Reinhardt, D.H.R.C., Cunha, G.A.P. da (2006) *Propagação do Abacaxizeiro/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* 2ª edição. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Richmond, K.E., Sussman, M. (2003) Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 268–272.
- Rohanipoor, A., Norouzi, M., Moezzi, A., Hassibi, P. (2013) Effect of Silicon on Some Physiological Properties of Maize (*Zea mays*) under Salt Stress. 7, 71–79.
- Rohrbach, G.K., Leal, F., D'Eeckenbrugge, G.C. (2002) History, Distribution and World Production, *In: D. P. Bartholomew, R. E. Paull, e K. G. Rohrbach (ed.) The Pineapple, Botany, Production and Uses*. University of Hawaii at Manoa Honolulu USA: CABI Publishing, p. 1–12.
- Savant, N.K., Korndörfer, G.H., Datnoff, L.E., Snyder, G.H. (1999) Silicon Nutrition and Sugarcane Production : A Review 1. *J. Plant. Nutr.*, 22.

- Serrano, A., Pérez-Castiñeira, J.R., Baltscheffsky, M., Baltscheffsky, H. (2007) H⁺-PPases: yesterday, today and tomorrow. *IUBMB life*, 59, 76–83.
- Smith, M.K., Ko, H.-L., Hamill, S.D., Sanewski, G.M., Graham, M.W. (2002) Biotechnology, *In: D. P. Bartholomew, R. E. Paull, e K. G. Rohrbach (eds.) The Pineapple, Botany, Production and Uses*. University of Hawaii at Manoa Honolulu USA, p. 57–68.
- Sondergaard, T.E., Schulz, A., Palmgren, M.G. (2004) Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136, 2475–2482.
- Sousa, C.A.F. de, Sodek, L. (2002) The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *J. Plant Physiol. Braz. J. Plant Physiol*, 14, 83–94.
- Souza, L.F. da S., Reinhardt, D.H. (2009) Abacaxizeiro, *In: L. A. Crisóstomo, A. Naumov (Orgs) Adubando para Alta Produtividade e Qualidade Fruteiras Tropicais do Brasil*, Fortaleza-CE:Embrapa Agroindústria Tropical: International Potash Institute. p. 182–200.
- Sze, H., Li X., Palmgren, M.G. (1999) Energization of Plant Cell Membranes by H⁺-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. *The Plant cell*, 11, 677–689.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013) *Fisiologia vegetal* 5^a Ed. Porto Alegre: Artmed.
- Tubana, B.S., Babu, T., Datnoff, L.E. (2016) A Review of Silicon in Soils and Plants and Its Role in US Agriculture: History and Future Perspectives. *Soil Science*, 181, 1.
- Ventura, J.A., Costa, H., Caetano, L.C.S. (2010) Abacaxi “Vitória”: Uma cultivar resistente à fusariose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31, 1–2.
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J., Harvey, W.R. (1999) Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 21, 637–48.
- Xiao, Y., Xiang, L., Shao, J. (2008) Vacuolar H⁺-ATPase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 2002–2006.
- Yamaji, N., Mitatni, N., Ma, J.F. (2008) A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *The Plant cell*, 20, 1381–9.

Yao, G., Feng, H., Cai, Y., Qi, W., Kong, K. (2007) Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H⁺-ATPase in osteoclasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 357, 821–7.

6. APÊNDICE

Fotos dos experimentos em condições controladas.



Figura 1A – Experimento com plantas de abacaxi “Vitória”, em função da aplicação via foliar de silício e restrição hídrica.



Figura 2A – Experimento com plantas de abacaxi “Vitória” micropropagado, cultivado em solução nutritiva com/sem Si e submetido ao estresse causado por falta de aeração durante 72 horas



Figura 3A – Sistema radicular das plantas de abacaxi “Vitória” micropropagado, cultivado em solução nutritiva com/sem Si e submetido ao estresse causado por falta de aeração durante 72 horas

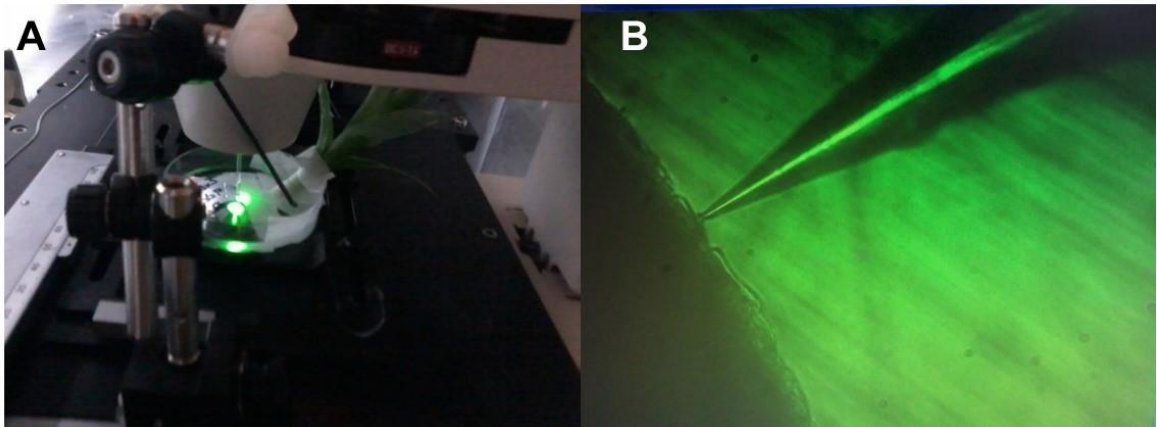


Figura 4A – **A)** Plântula de abacaxi no SIET, **B)** Microsonda vibrátil seletiva a H^+ na zona de alongamento da raiz de abacaxizeiro, cultivado por 72 h em solução nutritiva com $\frac{1}{5}$ da força iônica (Hoagland & Arnon, 1950) sem/com 1,5 mM Si por 72 h.