

TRANSDUÇÕES DE ENERGIA E DE SINAIS IÔNICOS MEDIADOS
POR REGULADORES DO CRESCIMENTO VEGETAL NA
COMUNICAÇÃO RAIZ-SOLO

LUIS ALFREDO DOS SANTOS PRADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINESE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO DE 2017

TRANSDUÇÕES DE ENERGIA E DE SINAIS IÔNICOS MEDIADOS
POR REGULADORES DO CRESCIMENTO VEGETAL NA
COMUNICAÇÃO RAIZ-SOLO

LUIS ALFREDO DOS SANTOS PRADO

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

Orientador: Prof^o Arnaldo Rocha Façanha
Coorientador: Dr. Evenilton Pessoa Costa

Campos dos Goytacazes – RJ
Novembro de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

P896

Prado, Luis Alfredo dos Santos.

TRANSDUÇÕES DE ENERGIA E DE SINAIS IÔNICOS MEDIADOS POR REGULADORES DO
CRESCIMENTO VEGETAL NA COMUNICAÇÃO RAIZ-SOLO / Luis Alfredo dos Santos
Prado. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

91 f. : il.

Bibliografia: 25 - 31.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.
Orientador: Arnaldo Rocha Facanha.

1. Sinalização iônica. 2. Fitormônios. 3. Auxina. 4. Etileno. 5. Bioenergética. I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

TRANSDUÇÕES DE ENERGIA E DE SINAIS IÔNICOS MEDIADOS
POR REGULADORES DO CRESCIMENTO VEGETAL NA
COMUNICAÇÃO RAIZ-SOLO

LUIS ALFREDO DOS SANTOS PRADO

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

Aprovada em 24 de novembro de 2017.

Comissão Examinadora

Dra. Anna Lvovna Okorkova-Façanha (D.Sc. Química Biológica – LFBM – UENF)

Dra. Mirella Pupo Santos (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas – UFRJ – Macaé)

Dr. Daniel Basílio Zandonadi (D.Sc. Biociências e Biotecnologia – UFRJ – Macaé)

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc. Química Biológica - LBCT – CBB) UENF
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao meu irmão Assis, ao meu sobrinho João e à minha cunhada Márcia por todo o apoio e incentivo nos momentos difíceis ao longo da realização do meu doutoramento;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pelo suporte e pela realização do trabalho;

A CAPES pela concessão da bolsa;

Ao professor Arnaldo pela orientação desde a iniciação científica, por me oferecer a oportunidade de aprender e produzir ciência sempre em excelentes condições, mas também por me ajudar a ver o mundo através dos olhos de um cientista e a manter minha mente sempre em expansão em busca do conhecimento. Muito obrigado professor!

A todos os meus colegas que passaram pelo grupo ARF e pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual ao longo desses anos pela amizade, companheirismo e discussões que tanto me fizeram crescer como ser humano. Obrigado amigos!

Ao professor Carlos Logullo e todos os seus alunos da UEA pelas discussões, sugestões e pelas críticas que contribuíram demais para minha formação como cientista;

Ao meu coorientador Niltinho pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência, pelas conversas, dicas e sugestões da vida acadêmica;

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

***“Open your eyes
Take a deep breath and return to life
Wake up and fight
Fight for the love and the burning
light”***

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRATC	1
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. O microtomateiro mutante (Micro-Tom) como modelo para estudos em fisiologia vegetal	7
2.2 Homeostase iônica e a sinalização por H ⁺ em células vegetais	8
2.2.1 A H ⁺ - ATPase tipo P	10
2.2.2 A H ⁺ - ATPase tipo V	13
2.2.3 A H ⁺ - PPase Vacuolar	16
2.3 Estresses abióticos em plantas.....	17
2.4 A Auxina	18
2.5 O Etileno	19
2.6 Utilização de biofertilizantes na agricultura	22
2.7 Transdução de sinal em plantas	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 1 – O acoplamento funcional da H ⁺ -Pirofosfatase vacuolar é modulado por etileno em resposta ao déficit hídrico.....	34
RESUMO	34
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 Material vegetal.....	39
2.2 Peso de matéria fresca e seca e tamanho das raízes	39
2.3 Isolamento de membranas	39
2.4 Determinação das atividades hidrolíticas das bombas de H ⁺	40
2.5 Monitoramento do gradiente de H ⁺	41
2.6 Obtenção da taxa de acoplamento das bombas de H ⁺	42
3. RESULTADOS.....	42

3.1 As mutações hormonais não alteram parâmetros fitotécnicos.....	42
3.2 O etileno estimula a atividade hidrolítica da H ⁺ -Pirofosfatase vacuolar	46
3.3 O etileno reduz o gradiente eletroquímico de H ⁺ através do tonoplasto	50
3.4 O etileno reduz o acoplamento funcional da H ⁺ -PPase vacuolar.....	52
4. DISCUSSÃO	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 2 - Ativação do sistema primário de transporte de íons como marcador de bioatividade de fertilizantes orgânicos em mutantes hormonais de microtomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-tom).....	58
RESUMO	58
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAIS E MÉTODOS	62
2.1 Material Vegetal	62
2.2 Composição dos bioestimulantes	63
2.3 Atividades das bombas de H ⁺	63
2.4 Fluxos de H ⁺	64
3. RESULTADOS.....	65
3.1 Efeitos dos bioestimulantes sobre a massa seca e comprimento das raízes em MT.....	65
3.2 Efeitos dos bioestimulantes sobre atividade hidrolítica das bombas de H ⁺ ..	67
3.3 Fluxo de H ⁺ rizosférico.....	71
3.4 Análise multivariada.....	72
4. DISCUSSÃO	75
5. REFFERÊNCIAS	78

RESUMO

PRADO, Luís, A. S. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2017. TRANSDUÇÕES DE ENERGIA E DE SINAIS IÔNICOS MEDIADOS POR REGULADORES DO CRESCIMENTO VEGETAL NA COMUNICAÇÃO RAIZ-SOLO. Orientador: Prof^o. Arnaldo Rocha Façanha. Coorientador: Evenilton Pessoa Costa.

O tomateiro é uma das culturas de maior importância na produção e processamento de alimentos e o Brasil é um dos grandes produtores mundiais desta hortaliça. Porém, trata-se de uma das culturas mais susceptíveis a estresses bióticos e abióticos. Portanto, existe grande demanda por conhecimento básico acerca da ação de reguladores do crescimento, tanto exógenos quanto endógenos, visando à geração de recursos biotecnológicos capazes de reduzir os danos sofridos em consequência de estresses e melhorar a produtividade do tomateiro. A cultivar em miniatura *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom (MT) vem sendo utilizada como um modelo com potencial para superar as desvantagens do tomateiro comercial para fins de pesquisa, possibilitando cultivo, tratamentos e análises em condições controladas. O MT além de produzir frutos e sementes em curto espaço de tempo apresenta um genoma de tamanho moderado, características adequadas para pesquisas em nível bioquímico/molecular. As células vegetais possuem bombas de prótons responsáveis pela geração de gradientes eletroquímicos através da membrana plasmática e das endomembranas, capazes de energizar transportadores secundários, atuando diretamente na manutenção da homeostase iônica, essencial para a nutrição e respostas a adversidades ambientais. Reguladores do crescimento vegetal são moléculas bioativas capazes de produzir sinais externos que modulam a fisiologia e o desenvolvimento da planta. Os hormônios vegetais são moléculas sinalizadoras produzidas endógenamente pela planta, cuja mudança na concentração e sensibilidade do tecido alvo influenciam uma gama de processos ligados ao desenvolvimento vegetal, envolvendo interações da planta com fatores

ambientais. O etileno e a auxina são hormônios vegetais com ações pleiotrópicas e papéis diversos, porém bem conhecidos no que tange ao controle do desenvolvimento da planta. Todavia, a participação destes hormônios nas respostas a estresses, bem como a sua comunicação com fertilizantes orgânicos, envolvem interações hormonais mais complexas capazes de coordenar e integrar diversos processos genéticos e fisiológicos. Os transportadores primários de prótons são regulados por hormônios e fertilizantes orgânicos, atuando na sinalização celular, convertendo energia em informação tanto nas respostas adaptativas das plantas a estresses como no crescimento vegetal.

A presente Tese tem como hipótese que bombas de prótons desenvolvam um papel central não só na bioenergética, mas também na sinalização iônica da célula vegetal, atuando sinergicamente como sistemas transdutores de energia e de informação. O objetivo principal deste trabalho foi determinar se existem mecanismos através dos quais os reguladores do crescimento vegetal, sejam endógenos como os fitormônios auxina e etileno, ou exógenos como ácidos húmicos e outros extratos de matéria orgânica, atuam sobre as bombas de prótons modulando o crescimento ou respostas adaptativas a estresses em microtomateiros mutantes.

No capítulo 1, observou-se que a sinalização mediada por etileno regula negativamente o acoplamento da H^+ -pirofosfatase vacuolar em células de raiz de tomateiro, pois a eficiência no bombeamento de prótons por esta enzima através do tonoplasto aumentou aproximadamente 3 vezes em plantas deficientes para a percepção do etileno durante o déficit hídrico, enquanto tal efeito não foi observado para a H^+ -ATPase vacuolar, evidenciando assim a importância do pirofosfato como molécula sinalizadora nas respostas a estresses.

No capítulo 2, observou-se que a sinalização envolvendo o hormônio auxina é fundamental para a ativação dos sistemas de transporte de prótons no crescimento radicular e os fertilizantes orgânicos atuam de forma similar nesse processo, visto que plantas silvestres apresentaram aumento no fluxo de prótons em células radiculares quando tratadas com fertilizantes, porém esse aumento não foi observado em mutantes insensíveis à auxina.

Os resultados obtidos vão ao encontro da hipótese levantada e fornecem novos insights sobre a bioatividade hormonal e sua influência sobre aspectos

energéticos e da sinalização iônica da célula vegetal, bem como sobre as “proton signatures”. Estes dados foram compilados e discutidos com a finalidade de gerar recursos biotecnológicos capazes de otimizar a produção vegetal, visando caracterizar as bombas de prótons como marcadores bioquímicos da bioatividade de reguladores do crescimento e de fenótipos mais adaptados a estresses.

Palavras-chave: Sinalização iônica, fitormônios, auxina, etileno, bioenergética.

ABSTRATC

The tomato is one of the crops of major importance in the production and processing of food and Brazil is one of the world's greatest producers of this vegetable. However, this is one of the most susceptible crops to biotic and abiotic stresses. Therefore, there is a great demand for basic knowledge about the action of growth regulators, both exogenous and endogenous, aiming at the generation of biotechnological resources capable of reducing the damages suffered as a result of stresses and improving tomato productivity. The miniature cultivar *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom (MT) has been used as a model with potential to overcome disadvantages of commercial tomato cultivation for research purposes, allowing cultivation, treatments and analyzes under controlled conditions. In addition to producing fruits and seeds in a short period of time, the MT presents a moderate size genome, suitable characteristics for research at the biochemical / molecular level. Plant cells have proton pumps for the generation of electrochemical gradients across plasma membranes and endomembranes, able of energize secondary transporters, acting in the maintenance of ionic homeostasis, essential for nutrition and responses to environmental adversities. Plant growth regulators are bioactive molecules capable of producing external signals and thus modulate plant physiology. Plant growth regulators are bioactive molecules capable of producing external signals that modulate plant physiology and development. Plant hormones are signaling molecules produced endogenously by the plant whose change in concentration and sensitivity in the target tissue influences a range of processes linked to plant development, involving plant interactions with environmental factors. Ethylene and auxin are plant hormones with pleiotropic actions and diverse roles, but well known in the plant development control. However, the involvement of these hormones in stress responses, as well as their communication with organic fertilizers, involves more complex hormonal interactions capable of coordinating and integrating several genetic and physiological processes. Primary proton transporters are regulated by hormones and organic fertilizers, acting on cell signaling by converting energy into information in both the adaptive responses of plants to stresses and in plant growth.

The present thesis hypothesizes that proton pumps play a central role not only in bioenergetics, but also in the ionic signaling of the plant cell acting synergistically as transducer systems of energy and information. The main objective of this work was to determine if there are mechanisms through which plant growth regulators, whether endogenous, such as auxin and ethylene phytohormones, or exogenous such as humic acids and other organic matter extracts, act on the proton pumps modulating the growth or adaptive responses to stresses in mutant microtomatoes.

In Chapter 1, it was observed that ethylene-mediated signaling negatively regulates the coupling of vacuolar H⁺-pyrophosphatase in tomato root cells, since the efficiency in proton pumping by this enzyme across the tonoplast increased approximately 3-fold in plants deficient in the perception of ethylene during the water deficit, while such effect was not observed for vacuolar H⁺-ATPase, thus evidencing the importance of pyrophosphate as a signaling molecule in stress responses.

In chapter 2, it was observed that the signaling involving the hormone auxin is crucial for the proton transport systems activation in the root growth, and the organic fertilizers act in a similar way in this process, since wild plants presented an increase in the proton flux when treated with fertilizers, but this increase was not observed in mutants insensitive to auxin.

The results obtained are in line with the hypothesis raised and provide new insights on hormonal bioactivity and its influence on energetic aspects and ionic signaling of the plant cell as well as on “proton signatures”. These data were compiled and discussed with the purpose of generating biotechnological resources capable of optimizing plant production, aiming at characterizing the proton pumps as biochemical markers of the bioactivity of growth regulators and of phenotypes more adapted to stress.

Keywords: Ionic signaling, phytohormones, auxin, ethylene, bioenergetics.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das oleráceas mais difundidas, sendo cultivado nas mais diferentes latitudes geográficas do planeta. Em 2011, a produção mundial foi de 159,02 milhões de toneladas, sendo China, Índia e Estados Unidos da América os principais produtores, correspondendo a cerca de 49 % da produção mundial (FAOSTAT, 2013). O Brasil – oitavo produtor mundial – produziu, em 2011, 4,42 milhões de toneladas em área de 69,31 mil ha, com produtividade estimada de 63,85 t/ha (IBGE, 2012; FAOSTAT, 2013). A área ocupada pelo tomate de mesa, neste período, atingiu cerca de 40 mil hectares e produção de 1,9 milhões de toneladas a cada ano. A Região Sudeste respondeu por 41% da produção nacional de tomate de mesa e o Estado de São Paulo, por cerca de 30% desse total. O Brasil é o oitavo produtor mundial de tomate e segundo dados divulgados em 2012 pela FAO, foram produzidas 3.873.985 toneladas do fruto no ano de 2012. Portanto, existe uma grande demanda por conhecimentos básicos que ajudem a desenvolver plantas cada vez mais resistentes à seca. Os mutantes naturais têm sido utilizados como potenciais doadores de genes em programas de melhoramento. A cultivar em miniatura *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom (MT) foi proposta por Meissner et al. (1997) como um modelo genético com potencial para superar as desvantagens do cultivo de tomateiro comercial para fins de pesquisa, por produzirem frutos e sementes em curto espaço de tempo, completando seu ciclo de vida de 70 a 90 dias, e por apresentar um genoma de tamanho moderado com 950 Mb, codificando aproximadamente 35.000 genes. Assim, os genótipos MT têm sido propostos como preferenciais para pesquisas em nível bioquímico/ molecular.

Estresses abióticos representam um grande entrave à produtividade vegetal, e causam considerável prejuízo econômico e ambiental em todo o mundo. Os vegetais podem ser expostos ao estresse hídrico desenvolvido em curto ou longo prazo, como consequência de declínios sazonais na disponibilidade hídrica dos solos. No decorrer do dia, o incremento na demanda evaporativa da atmosfera afeta o ganho de carbono até nas plantas irrigadas, portanto, o tempo, a intensidade e a duração da deficiência hídrica são essenciais para determinar os efeitos desse estresse. Abertura estomática, assimilação de

CO₂, síntese de proteínas e acúmulo de solutos, são alguns dos diversos processos bioquímicos e fisiológicos alterados em resposta à diminuição do potencial hídrico foliar. A extensão em que cada processo é afetado depende da intensidade e da duração do estresse, bem como da capacidade genética das espécies em produzir nesses ambientes (Chaves, 1991).

Os usos de modelos genéticos com mutações hormonais e das técnicas de biologia molecular, somados aos experimentos clássicos de aplicação de hormônios, têm produzido uma série de resultados que ajudam a compreender o mecanismo de ação das diferentes classes hormonais. Para cada hormônio que possui uma via de transdução de sinal conhecida, modulações específicas da transcrição gênica têm sido associadas a respostas específicas no desenvolvimento vegetal (Woodward e Bartel, 2005). O etileno possui um importante papel nas mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante a maturação de frutos (Bartz & Brecht, 2003), e recentemente este fitormônio vem se destacando por ser considerado um componente central na adaptação de plantas a baixos níveis de oxigênio (Puciariello, 2012).

Os sistemas de transporte, presentes nas membranas biológicas, podem ser classificados em sistemas primários e secundários. Os sistemas primários são constituídos pelas bombas eletrogênicas. Estes são responsáveis pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico gerado ao transportar íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se para isso compostos ricos em energia (ATP ou P_{Pi}). Já os sistemas secundários, constituídos pelas proteínas canais e as carreadoras ou transportadoras, são capazes de transportar substratos através da membrana, sem envolver quebra de ligações covalentes. Este processo depende do desequilíbrio de cargas, gerado na membrana, pelos sistemas primários (Logan et al., 1997). Os principais sistemas de transporte de prótons que operam nas células vegetais são as H⁺-ATPases do tipo P localizadas na membrana plasmática, H⁺-ATPases do tipo V e as H⁺-PPases, ambas localizadas no tonoplasto. A H⁺-ATPase presente na membrana plasmática das plantas desempenha a função de transportar íons e moléculas por meio de transporte ativo, através de gradiente de pH e potencial elétrico, tendo seu papel fisiológico associado a nutrição e expansão celular. Esta enzima utiliza ATP como substrato para bombear prótons através da membrana plasmática para

o apoplasto. Sendo constituída por uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 100 kDa, pode formar dímeros ou mesmo hexâmeros (Ottman, 2007). O monômero tem 10 domínios transmembranares e uma alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP (Sze et al., 1999). As H⁺-ATPases do tipo P formam um gradiente de pH e um potencial elétrico através da membrana. Com isso, exercem funções tais como, a acidificação da parede celular, induzindo a plasticidade da mesma e possibilitando a expansão celular. Também são essenciais na remoção de H⁺ do citoplasma. Praticamente todos os hormônios de plantas interagem com a bomba de prótons de membrana plasmática. As V-ATPases (V₁V₀ H⁺-ATPase) estão presentes em diversas endomembranas de todas as células eucarióticas, tendo sido descritas funcionalmente em membranas vacuolares, do ER, Golgi, membranas lisossomais, membranas endossomais, membranas de grânulos secretórios (Samarão et al., 2009). H⁺-PPases são bombas de prótons encontradas em células vegetais, de algas e na bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum* (Rea et al., 1992), e também foram descritas em protistas (Scott et al., 1998). Esta enzima transportadora possui um papel vital no metabolismo energético, pois utiliza pirofosfato (PP_i) como substrato, o qual é um subproduto natural de várias reações biossintéticas (Buchanan et al., 2000). A hidrólise de PP_i, por pirofosfatases (PPases), favorece estas polimerizações biossintéticas ao diminuir a concentração citoplasmática deste produto. Existem as PPases solúveis, expressas no citoplasma, e as transmembranares são expressas em subcompartimentos celulares, associadas à membranas de bactérias fotossintéticas, à membrana interna mitocondrial (enzima monomérica de 33 kDa) e na membrana vacuolar (tonoplasto) (Jiang et al., 1997). O ATP é a molécula principal para armazenamento e transferência de energia bioquímica em todos os organismos vivos, do mais simples ao mais complexo. No entanto, em quase 200 reações bioquímicas conhecidas, a hidrólise de ATP libera pirofosfato (PP_i), que se torna um inibidor metabólico em altas concentrações nas células e deve ser hidrolisado imediatamente para facilitar a biossíntese de várias macromoléculas (Heinonen, 2001), fato que evidencia a importância das PPases na manutenção da homeostase iônica das células.

A caracterização de um grande número de genes induzidos pelos estresses e diversas rotas envolvidas com a indução destes genes vem sendo elucidada

através da análise do DNA, mutantes e padrões de expressão gênica envolvendo o déficit hídrico. A integração de informações mostra-se de grande importância para o entendimento da sinalização pertinente as respostas das células vegetais aos estresses ambientais.

Um dos grandes desafios atualmente na fisiologia e biologia molecular de plantas é o entendimento da atuação conjunta de diferentes hormônios e da maneira como balanço hormonal influencia no crescimento e nas respostas adaptativas das plantas a estresses bióticos e abióticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O microtomateiro mutante (Micro-Tom) como modelo para estudos em fisiologia vegetal

O tomateiro é uma espécie cultivada de grande importância econômica, e, conseqüentemente, com grande demanda por conhecimentos básicos envolvendo a sua ecofisiologia. É uma planta perene, de porte arbustivo, cultivada como cultura de ciclo anual podendo se desenvolver de forma rasteira, semiereta ou ereta. (Alvarenga, 2004). O tomate é uma planta suscetível a diversas doenças, sendo necessário o emprego de diversos agroquímicos para seu controle (Derkesen et al, 2001).

Essa cultura é um excelente modelo para estudar processos biológicos devido a sua diversidade de metabólitos secundários (Tanksley, 1993) e tecidos que facilitam a análise bioquímica, além do próprio padrão morfogênético diferente de *Arabidopsis*, que coloca o tomateiro como um modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (Pratt et al 1997). O tomateiro possui um genoma relativamente pequeno ($7,1 \times 10^8$ pb), mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (Rick & Yoder, 1988; Tanksley et al., 1992). Além disso, foram identificados novos papéis para outros reguladores de crescimento como poliaminas, ácido salicílico, ácido jasmônico e brassinosteroides no desenvolvimento e amadurecimento do fruto (Srivastava e Handa, 2005). Apesar de extensos estudos sobre os efeitos dos hormônios no crescimento e desenvolvimento das plantas, seu modo de ação no nível molecular ainda está longe de ser compreendido, pois cada vez mais surgem novas peças para integrar esse quebra-cabeça da sinalização hormonal, onde somente nos últimos anos, surgiram alguns componentes moleculares envolvidos no controle hormonal durante o desenvolvimento do tomateiro (Osorio et al., 2013).

As principais limitações para utilização intensiva de tomateiro como modelo em abordagens genéticas e fisiológicas são seu tamanho e duração do ciclo de vida, os quais, embora sejam relativamente pequenos, estão em desvantagem quando comparados a *Arabidopsis*, a qual é o modelo mais usado em pesquisas com plantas. Desse modo, a cultivar em miniatura de tomateiro, proposta por Meissner et. al. (1997) como modelo genético, produz frutos e semente viáveis

em vasos de apenas 50-100 ml de substrato, completando seu ciclo de vida em 70-90 dias. Com essas características, a chamada cultivar Micro-Tom (MT) pode crescer em laboratório nas mesmas condições mínimas que *Arabidopsis*.

Mutantes de tomateiro vêm sendo ser utilizados como eficiente ferramenta em estudos acerca da fisiologia vegetal, bioquímica e genética. Entre as várias mutações já descritas em tomateiro, aparecem mutantes que apresentam alterações no metabolismo ou na sensibilidade a hormônios do tipo auxina (Kelly & Bradford, 1986; Hicks et al., 1989), ácido abscísico (Taylor et al., 2000; Burbidge., 1999) giberelinas (Koornneef et al.,1990; Bensen & Zeevaart, 1990), etileno (Fujino et al.,1988; Wilkinson et al., 1995 e brassinoesteroides (Bishop et al.,1999; Koka et al., 2000). Além disso, a sequência completa do genoma do tomateiro já foi descrita (The Tomato Genome Consortium, 2012, Shikata et AL 2016) e recursos genéticos e bancos de dados estão disponíveis para esta espécie, como o Projeto Nacional BioResource Tomato (<http://tomato.nbrp.jp/indexEn.html>; Shikata et al., 2016) e a Rede Sol Genomics (<https://solgenomics.net>).

2.2 Homeostase iônica e a sinalização por H⁺ em células vegetais

O movimento de íons através das membranas biológicas (membrana plasmática e endomembranas de diferentes organelas celulares) é um processo altamente seletivo e fundamental na manutenção da energia celular (Harold, 1986). A absorção e translocação de cátions são necessárias para que as plantas completem seu ciclo de vida, desempenhando papéis essenciais na nutrição, crescimento, desenvolvimento e transdução de sinal. Há um grande número de transportadores de íons que se localizam na membrana plasmática e nas endomembranas (Yin, 2013). Este processo é desempenhado por complexos proteicos localizados nas membranas, que constituem os sistemas de transporte transmembranares, distribuídos em proteínas canais, proteínas carreadoras (ou transportadoras) ou, ainda, como bombas eletrogênicas. Em resposta à ação destas moléculas, alguns compostos são acumulados na célula a concentrações

bem mais elevadas que as encontradas no ambiente externo, enquanto outros são totalmente excluídos (Taiz e Zeiger, 1998).

Os sistemas de transporte, presentes nas membranas biológicas, podem ser classificados em sistemas primários e secundários. Os sistemas primários são constituídos pelas bombas eletrogênicas. Estes são responsáveis pelo estabelecimento de um gradiente eletroquímico gerado ao transportar íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se para isso compostos ricos em energia. Já os sistemas secundários, constituídos pelas proteínas canais e as carreadoras ou transportadoras, são capazes de transportar substratos (ATP ou PPI) através da membrana, sem envolver quebra de ligações covalentes. Este processo depende do desequilíbrio de cargas, gerado na membrana, pelos sistemas primários (Logan et al., 1997).

As proteínas canais, enquanto no estado “aberto”, comportam-se como poros seletivos através dos quais é permitida a passagem de substratos específicos sem que ocorram alterações morfológicas na proteína. Várias classes de proteínas canais têm sido descritas nos sistemas vegetais, incluindo as específicas para K^+ , Ca^{++} e ânions. Nestas, o gradiente elétrico determinará a direção e extensão do fluxo passivo de íons (Sze et al., 1999). Outras proteínas transportadoras sofrem um ciclo de alterações conformacionais, que acompanham o percurso da molécula ou íon através das mesmas (Logan et al., 1997).

O transporte mediado pelas proteínas canais e carreadores “uniporters”, ocorre a favor do gradiente eletroquímico. Por outro lado, o transporte mediado pelos co-transportadores - “simporters” e “antiporters” - consegue mover seus substratos tanto a favor como contra um gradiente de potencial elétrico, acoplando esse transporte ao de outro substrato que se movimenta a favor do gradiente, respectivamente. Esses sistemas transportam os principais nutrientes essenciais ao funcionamento da célula vegetal e são dependentes da energia provida pelo gradiente eletroquímico de H^+ gerado por bombas de prótons presentes nas membranas das células vegetais (Façanha e de Meis, 1998).

As adenosinas 5`- trifosfatases translocadoras de íons H^+ (H^+ -ATPases) são enzimas transportadoras responsáveis pelo fluxo primário de prótons através das membranas celulares. Essas enzimas pertencentes à classe das bombas de

prótons são responsáveis pela interconversão de energia química, elétrica e/ou luminosa nas células de todos os organismos vivos. Nas células vegetais, as H⁺-ATPases acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de prótons através das membranas, gerando uma diferença de potencial eletroquímico, requerido para o transporte secundário, o qual é completamente dependente da força motriz de prótons (FPM). A quantificação da FPM pode ser usada para estimar a energia livre contida no potencial de prótons. Este potencial é criado, através da membrana, por um bombeamento de prótons executado pelas H⁺-ATPases e H⁺-PPases (Sanders e Bethke, 2000).

2.2.1 A H⁺-ATPase tipo P

A H⁺-ATPase presente na membrana plasmática da célula vegetal é uma bomba eletrogênica que exporta íons H⁺ do citosol para o meio extracelular, promovendo um processo de conversão de energia química, proveniente da hidrólise do seu substrato ATP, em energia na forma de força próton-motriz, capaz de energizar a membrana e ativar assim transportadores secundários. Desta forma, esta enzima gera um gradiente químico de H⁺ (ΔpH ; ácido na face exterior) e estabelece também um gradiente elétrico (potencial de membrana; negativo na face interna). Como quase todas as outras proteínas transportadoras na membrana plasmática da célula vegetal são energizadas por este gradiente eletroquímico combinado de prótons, existe uma já antiga hipótese na fisiologia vegetal de que a H⁺ - ATPase tipo P é uma usina para o crescimento das plantas (revisado em Palmgren, 2001; Arango et al., 2003; Sondergaard et al., 2004, Duby e Boutry, 2009). No entanto, embora a bioquímica da bomba seja conhecida com grande detalhe e sua estrutura tenha sido determinada (revisada em Morth et al., 2011), fortes evidências de seu papel no crescimento das plantas permaneceram escassas até recentemente, quando fortes ligações entre a regulação pós-traducional da enzima e as funções fisiológicas essenciais das plantas surgiram (Falhof, 2016).

A P-ATPase é formada por uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 100 kDa podendo formar dímeros. O monômero tem 10 domínios

transmembranares e uma alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP (Sze et al., 1999).

As ATPases tipo P são divididas em 5 grupos, baseando-se na seletividade dos íons que transportam. As P₁-ATPases estão envolvidas no transporte de metais pesados como Cd²⁺, Cu²⁺ e Hg²⁺; as P₂-ATPases transportam vários cátions monovalentes e bivalentes incluindo, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺; as P₃-ATPases transportam H⁺; e as P₄-ATPases foram identificadas em leveduras e provavelmente transportam aminofosfolipídios (Catty et al., 1997). A ATPase Cta4, necessária para o controle da morfologia celular e da dinâmica dos microtúbulos em *Saccharomyces pombe* e a ATPase Cód1p/Spf1p de *Saccharomyces cerevisiae*, que estão localizadas no retículo endoplasmático, são classificadas como sendo as do tipo P₅-ATPases (Catty et al., 1997; Cronin et al., 2002; Okorokova-Façanha et al., 2002).

O ciclo catalítico das H⁺-ATPases tipo P é modulado pela concentração de substrato (ATP), pH e temperatura (Sze et al., 1999). As H⁺-ATPases também podem ser ativadas ou desativadas em resposta à luz, fitormônios como etileno (Azevedo, 2008), ataque de patógenos, dentre outros estímulos endógenos e ambientais (Dietz et al., 2001). Este tipo de regulação é mediado principalmente por um domínio autoinibitório presente na região C-terminal da cadeia polipeptídica, que age como uma válvula regulando a atividade da bomba de prótons (Taiz & Zeiger, 1998). As ATPases de membrana plasmática são inibidas por ortovanadato (H₂VO₄⁻), que compete com o fosfato no sítio de fosforilação da proteína (Sze et al., 1999) e por complexos de fluoreto de alumínio segundo o mesmo mecanismo (Façanha & de Meis, 1995).

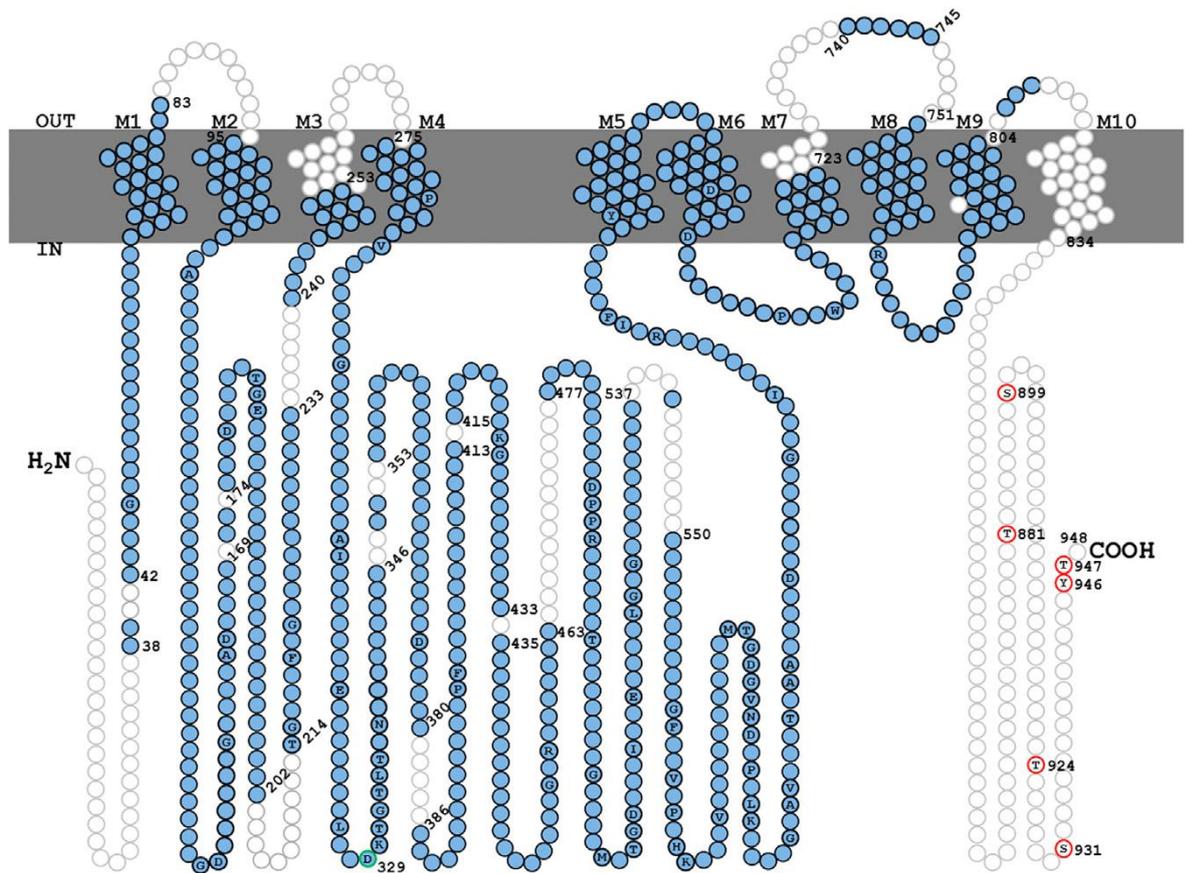


Figura 1: Modelo estrutural da H⁺-ATPase do tipo P.

Fonte: Adaptado de Palmgren 2016.

2.2.2 A H⁺-ATPase tipo V

As ATPases tipo V (V₁V₀ H⁺-ATPase) são bombas eletrogênicas que acidificam tanto o lúmen quanto o microambiente externo de organelas em endomembranas de todas as células eucarióticas (membranas vacuolares, membranas lisossomais, membranas endossomais, membranas de grânulos secretórios e membranas plasmáticas de células animais específicas). Mais de 30 anos se passaram desde a descoberta da enzima em membranas vacuolares de leveduras, onde foi determinado que a sua presença é essencial para a manutenção da homeostase das células; de fato, a enzima foi considerada como tendo uma função “housekeeping”. (Sun-Wada, 2015). Atualmente, as V-ATPases vêm tendo seu papel na transdução de sinal investigado. Dados recentes indicam sua participação chave em cascatas de sinalização, relacionadas com a proliferação/diferenciação celular em resposta a estímulos extracelulares, dentre elas a sinalização via TOR (Zoncu, 2011). As V-ATPases são enzimas compostas por dois domínios (V1 e V0) e múltiplas subunidades e operam por um mecanismo de rotação. O domínio V1 é um complexo periférico de 650 kDa localizado no lado citoplasmático da membrana e realiza a hidrólise de ATP. O domínio V0 é um complexo de 260 kDa embebido na membrana, responsável por translocar prótons do citoplasma para o lúmen ou espaço extracelular. V1 é composto por 8 subunidades diferentes (A, B, C, , E, F, G e H) enquanto V0 é formado por 6 subunidades (a, d, e, c, c1 e c2). (Forgac, 2007)

A configuração básica da porção periférica consiste em três cópias da subunidade catalítica A, onde se situa os sítios de ligação de ATP (Nelson e Taiz, 1989), intercaladas por três cópias da subunidade B, subunidade não-catalítica de ligação do substrato (Ratajczak, 2000). As subunidades A e B apresentam semelhanças estruturais com as subunidades β e α, respectivamente, da ATPase do tilacoide e da membrana mitocondrial. As subunidades D e G participam no acoplamento da hidrólise de ATP e no transporte de H⁺ (Ratajczak, 2000) enquanto as subunidades F e E parecem estar envolvidas na conexão dos setores V₀ e V₁, mantendo a estabilidade estrutural da enzima (Tomashek et al., 1997). A subunidade C é um peptídeo altamente hidrofóbico, contendo quatro

domínios expandidos na membrana (Ratajczak, 2000) e parece estar envolvida diretamente na translocação de H^+ .

As V-ATPases são estimuladas por ânions (por exemplo, cloreto) podendo ser inibidas por bafilomicina A - um inibidor específico e potente de ATPase tipo V, que previne a formação do ΔpH vacuolar (Bowman et al., 1986) – e por nitrato (Bowman e Bowman, 1986; Pedersen e Carafoli, 1987). As V-ATPases também são insensíveis a ortovanadato, oligomicina e fluoroaluminatos, que inibem as atividades da F-ATPase (Bowman, 1983; Bowman e Bowman, 1986; Perzov et al., 2001). O ADP também pode ser inibidor dessa enzima por competição com o ATP pelo sítio catalítico da mesma. As ATPases tipo V possuem capacidade de hidrolisar diferentes nucleotídeos tais como, GTP e ITP e em menor extensão UTP e CTP (Kakinuma et al., 1981).

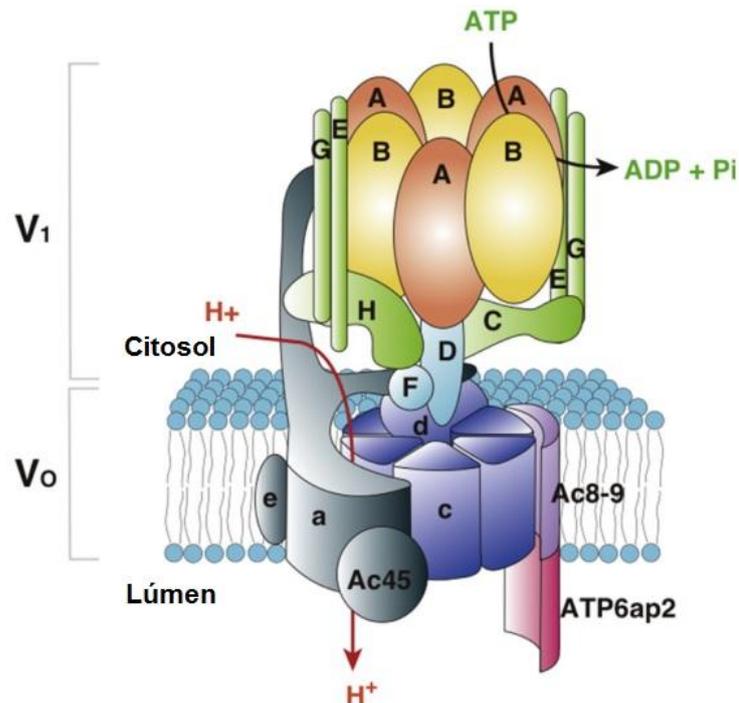


Figura 2: Estrutura da V-ATPase. O complexo V-ATPase é composto por um domínio periférico (V1) responsável pela hidrólise de ATP e um domínio integral (V0) envolvido na translocação de prótons em toda a membrana. O núcleo do domínio V1 é composto por um arranjo hexamérico de subunidades A e B alternadas que participam da ligação ao ATP e hidrólise. O domínio V0 inclui um anel de subunidades proteolípídicas (c, c' e c'') adjacentes às subunidades a e e. Os domínios V1 e V0 estão conectados por um túnel central composto de subunidades D e F de V1 e subunidades de V0, bem como de múltiplos "stalks"

periféricos compostos por subunidades C, E, G, H e o domínio N-terminal da subunidade a. Em mamíferos, A V-ATPase contém proteínas acessórias Ac45 e proteína Atp6ap2 de comprimento total, ambas essenciais para a função enzimática. Adaptado de Sun-Wada et al 2015.

2.2.3 A H⁺ - PPase Vacuolar

A H⁺.PPase está distribuída em vegetais superiores, algas e na bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum* (Rea et al., 1992), e também foi descrita em protistas (Scott et al., 1998). Esta enzima tem um papel vital no metabolismo energético, pois o pirofosfato (PP_i) é um composto de alta energia, é gerado por vários processos metabólicos, sendo um subproduto de várias reações incluindo a biossíntese de macromoléculas (Buchanan et al., 2000, Fukuda, 2016). A hidrólise de PP_i, por pirofosfatases (PPases), favorece estas polimerizações biossintéticas ao diminuir a concentração citoplasmática deste produto. Existem várias enzimas com atividade pirofosfatásica, as mais comuns são enzimas solúveis livres no citoplasma, mas também existem PPases transmembranares que acoplam a hidrólise de PP_i ao transporte ativo de íons em subcompartimentos celulares, dentre estas as associadas a membranas de bactérias fotossintéticas, à membrana interna mitocondrial (enzima monomérica de 33 kDa) e na membrana vacuolar (tonoplasto) (Jiang et al, 1997).

A H⁺.PPase de tonoplasto, que é uma enzima transportadora de prótons, é composta por um polipeptídeo de cerca de 73 kDa e possui aproximadamente 770 resíduos de aminoácidos (Maeshima, 1990; Sato et al., 1991). O pH ótimo desta enzima varia de 7,0 a 8,0 e tem como substrato o pirofosfato (Maeshima, 2000). Esta enzima também está envolvida na acidificação do vacúolo (Baltscheffsky et al, 1999).

Estudos clássicos indicam que a pirofosfatase vacuolar desempenha um papel fundamental na adaptação das plantas a estresses, bem como na energização vacuolar em estágios iniciais do desenvolvimento. Esta enzima não possui inibidores específicos, mas é sensível a altas concentrações de vanadato e fluoreto (Maeshima e Yoshida, 1989) e a baixas concentrações de pirofosfato inorgânico (Zhen et al., 1994). A H⁺.PPase possui 13 domínios transmembranares e seu sítio catalítico localiza-se em uma alça citoplasmática, que apresenta dez resíduos de aminoácidos carregados negativamente (Takasu et al., 1997). Estes aminoácidos facilitam sua ligação ao complexo Mg₂-PP_i (Takasu et al., 1997). A característica mais intrigante da H⁺.PPase é seu elevado requerimento por cátions

monovalentes como K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Na^+ , Li^+ (Rea et al., 1992), fenômeno para o qual ainda não se descobriu o racional fisiológico.

A superexpressão de H^+ -PPase melhora o crescimento em várias espécies de plantas e os mutantes defeituosos para esta enzima em *Arabidopsis thaliana* apresentam defeitos de desenvolvimento pós-germinativos. A superexpressão da H^+ -PPase melhora o crescimento da planta por aumentar o número de células como consequência direta da atividade hidrolítica da enzima. (Asaoka, 2016).

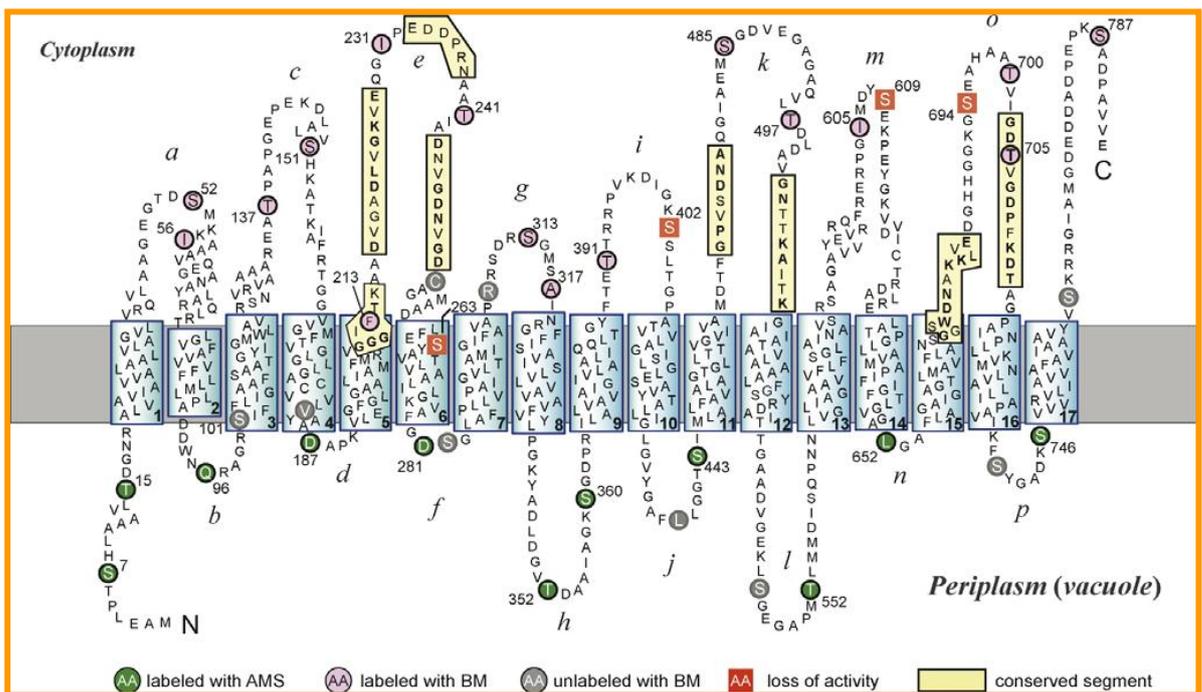


Figura 3 : Modelo estrutural da H^+ -PPase vacuolar. Adaptado de Maeshima ET AL , 2000.

2.3 Estresses abióticos em plantas

As plantas vivem em ambientes em constante mudança que geralmente são desfavoráveis ou estressantes para seu crescimento e desenvolvimento. Condições ambientais adversas incluem estresse biótico, como infecção por patógenos e ataques de herbívoros, e estresse abiótico, como seca, calor, frio, deficiência de nutrientes e excesso de sal ou metais tóxicos como o alumínio, arseniato e cádmio no solo. Os estresses por seca, alta salinidade e temperatura são fatores ambientais importantes que afetam a distribuição geográfica das

plantas na natureza, limitam a produtividade da planta na agricultura e ameaçam a segurança alimentar. Os efeitos adversos desses estresses abióticos são exacerbados pela mudança climática, fator que vem aumentando nos últimos anos (Fedoroff et al., 2010). Como as plantas detectam sinais de estresse e se adaptam a ambientes adversos são questões fundamentais dentro da biologia e da produção vegetal. Além disso, melhorar a resistência ao estresse das plantas é fundamental para a produtividade agrícola e também para a sustentabilidade ambiental, porque as culturas com fraca resistência ao estresse consomem muita água e fertilizantes e, portanto, sobrecarregam o meio ambiente. (Zhu, 2016). A deficiência hídrica é um dos grandes estresses abióticos que podem afetar todos os níveis de organização vegetal, podendo representar uma séria ameaça à produtividade das plantas em todo o mundo. Para Chaves (1991), a extensão dos efeitos da deficiência hídrica nas espécies vegetais depende da sua intensidade e da duração da capacidade genética das plantas em responder às mudanças do ambiente.

Em resposta a tal estresse, as plantas recorrem a várias estratégias para sua sobrevivência, a maioria é precedida por funções biológicas relacionadas à tolerância do estresse ambiental. O ajustamento osmótico é um importante mecanismo de tolerância à seca, pela manutenção do turgor celular e processos associados, como, por exemplo, a fotossíntese. O acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular (aminoácidos, betaínas e açúcares) e íons inorgânicos (potássio, cloro e sódio) possui relação direta com o ajuste osmótico ocorrido em plantas submetidas a diferentes estresses ambientais, inclusive à deficiência hídrica. As plantas submetidas a essa deficiência utilizam um mecanismo alternativo de acúmulo de íons para ajustar seu potencial osmótico, economizando energia, a qual é disponibilizada para crescimento em condições menos favoráveis (Patakas et al., 2002).

2.4 A Auxina

O fitormônio hoje conhecido como auxina foi descrito inicialmente por Went e isolado por Thimann, que determinou a estrutura da primeira auxina descoberta, o ácido indol-acético (AIA). Outros compostos endógenos produzidos pelas

plantas que foram descobertos posteriormente foram classificados como auxinas (Simon, Petrusek, 2011).

. A síntese da principal auxina endógena, o AIA, ocorre nos locais de crescimento ativo como meristemas e folhas jovens e movimenta-se de forma basípeta polarmente através do parênquima que envolve os feixes vasculares. Os níveis de auxina produzida pela gema apical influenciam diretamente o desenvolvimento de gemas axiais na planta. Auxinas atuam sobre diversos processos fisiológicos na planta como: formação do fruto (Dorcey ET AL 2009), abscisão de órgãos (Basu et AL 2013), respostas trópicas a luz e gravidade (Muday, 2001) e desenvolvimento radicular (Overvoorde ET AL 2010). Entretanto, os efeitos das auxinas nem sempre seguem uma rota linear onde a auxina age sozinha, mas muitas vezes rotas complexas devido a interações com outros fitormônios que participam do mesmo processo (Sauer ET AL 2013). As auxinas podem atuar de forma lenta ativando ou inibindo a expressão de genes, como no caso da percepção de auxina pela proteína TIR1 que quando se liga a auxina encaminha os repressores do complexo Aux/AIA para reciclagem proteica (Dharmasiri ET al2005), potencializando a transcrição de genes específicos de resposta a auxinas (ARF). (Riechmann ET AL 2000).

A atuação rápida das auxinas envolve a proteína Auxin Binding Protein (ABP1), cujo papel ainda carece de mais estudos para ser elucidado completamente. Experimentos eletrofisiológicos realizados com protoplastos anticorpos anti-ABP1 sugerem que ABP1 interage com a membrana plasmática e as células respondem mais rapidamente as auxinas em relação às respostas inerentes à expressão gênica (Dahlke et al 2010).

2.5 O Etileno

O etileno é o hormônio vegetal mais estudado. É um hormônio gasoso com uma infinidade de efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento da planta, incluindo germinação de sementes, crescimento, resistência a patógenos, amadurecimento de frutos, abscisão de órgãos e senescência (Schaller, 2012). Normalmente é reconhecido ativador e promotor do processo de amadurecimento em frutos climatéricos, apesar de possuir também seu papel no amadurecimento de frutos não-climatéricos (Bapat et al., 2010; Barry and Giovannoni, 2007;

Chervin et al., 2004; Katz et al., 2004). Em plantas superiores, o etileno é sintetizado através do ciclo Yang baseado em metionina e 1-aminociclopropanol-ácido carboxílico (ACC). As enzimas limitantes de taxa são ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO), cuja regulação depende de sinais ambientais e endógenos.

È um hormônio gasoso, produzido em todas as partes dos vegetais superiores. A taxa de produção de etileno depende do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento deste. A emissão deste fitormônio é aumentada durante a abscisão foliar e a senescência da flor, bem como, durante o amadurecimento dos frutos. O etileno tem sua expressão aumentada por ataque de patógenos, e por danos de origem física ou química (Abeles et al., 1992).

É um fitormônio que modula diversos processos metabólicos envolvidos no amadurecimento de frutos, coordenando a expressão gênica que envolve o aumento da taxa respiratória, a degradação de clorofila e a síntese de carotenoides na casca do fruto, a interconversão de açúcares, o aumento na atividade de enzimas que degradam a parede celular e até mesmo a produção autocatalítica de etileno (Gray et al., 1992).

A principal via para biossíntese de etileno tem como precursor central o aminoácido metionina, o qual é convertido a S-adenosil metionina (SAM); este por sua vez é convertido a ácido aminociclopropano carboxílico (ACC), que foi convertido a etileno. As principais enzimas moduladoras desta rota são a SAM-sintetase, ACC-sintase (ACCS) e ACC-oxidase (ACCO). (Bleecker e Kende, 2000).

O etileno é um dos principais hormônios que regulam vários processos do desenvolvimento vegetal, atuando de forma determinante no amadurecimento e senescência de frutos, na germinação, na senescência de flores e folhas, na abscisão foliar, na morte celular programada, e nas respostas a estresses diversos (Johnson e Ecker, 1998). A “tríplice resposta” de plântulas estioladas é um processo bem descrito, relacionado ao etileno, caracterizado por inibição do hipocótilo e expansão das células da raiz, engrossamento radial do hipocótilo, e curvatura exagerada da região apical (Guo e Ecker, 2003). Recentemente, o Etileno vem sendo visto como um hormônio que participa também na sinalização responsiva a estresses oxidativos causados pela falta de oxigênio em plantas

(Puciarello, 2012), porém muito de sua participação nesses processos não foi elucidada até então.

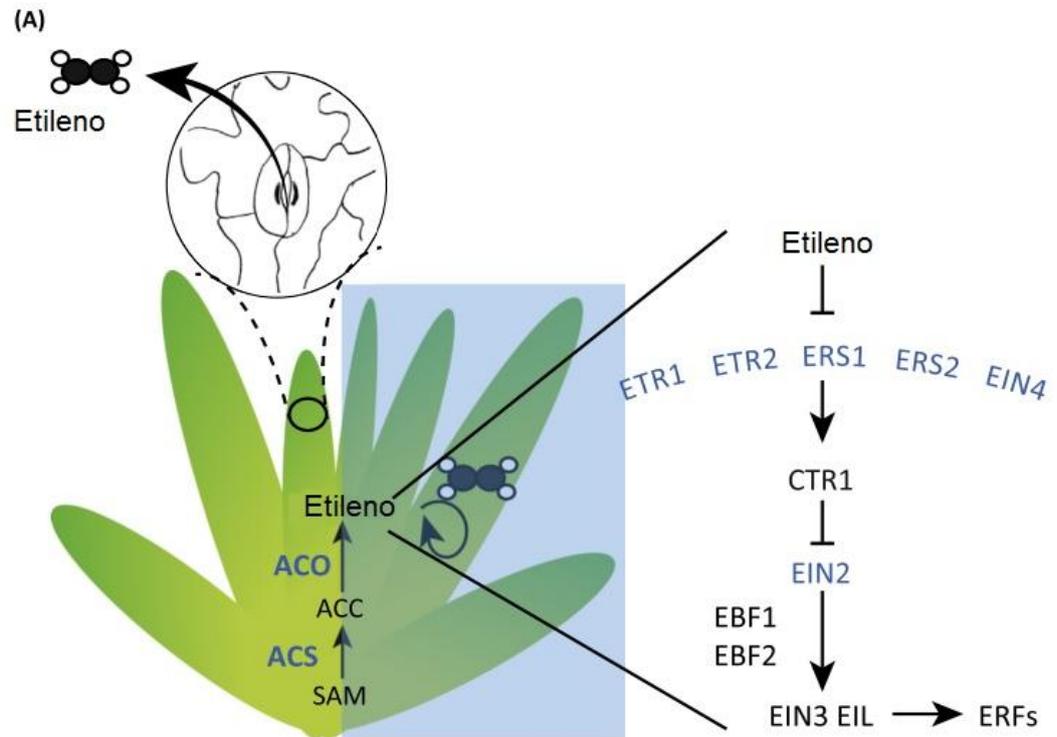


Figura 6: Biossíntese do etileno. As plantas sintetizam etileno da S-adenosilmetionina (SAM) usando duas enzimas que sintetizam (ACC sintase, ACS) e subsequentemente oxidam (ACC oxidase, ACO) 1-aminociclopropano-ácido carboxílico (ACC). O gás de etileno pode difundir livremente para a atmosfera através de estômatos, a menos que a submersão total (metade direita da planta) evite essa difusão levando a uma acumulação considerável. O etileno é detectado através de um conjunto de receptores de etileno (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4) que transmitem o sinal através de uma série de intermediários para a família ERF de fatores de transcrição.

Adaptado de Voeseneck, 2015.

2.6 Utilização de biofertilizantes na agricultura

Os bioestimulantes vegetais, ou biofertilizantes, são produtos obtidos da degradação residual de compostos orgânicos presentes no solo e têm efeitos positivos não apenas sobre o crescimento e a nutrição das plantas, mas também sobre a tolerância ao estresse abiótico e biótico.

Alguns autores acreditam que os ácidos húmicos são fisiologicamente os componentes mais importantes dos bioestimulantes naturais, devido aos seus grupos funcionais oxigenados (CO_2H_2 , OH fenóis e $\text{C}=\text{O}$) que interagem com íons metálicos aumentando a absorção de nutrientes na rizosfera (Schiavon et al., 2010; Berbara & García 2014). De acordo com numerosos estudos, diferentes bioestimulantes que contêm aminoácidos, ácidos húmicos e fúlvicos, mesmo em uma pequena quantidade, aumentam os componentes de rendimento quantitativo, como o conjunto de frutas, peso médio, comprimento e diâmetro, e o número de frutos por planta (Karakurt et al 2009, El-Nemr et al., 2012, Befrozfar et al. 2013). Embora a maioria dos bioestimulantes de plantas sejam adicionados à rizósfera para facilitar a absorção de nutrientes, muitos deles também têm efeitos protetores contra o estresse ambiental, como o déficit de água, a salinização do solo e a exposição a temperaturas de crescimento subótimas.

Uma vez que uma boa compreensão desses mecanismos for alcançada, poderá avançar para a próxima geração de bioestimulantes, onde sinergias e mecanismos complementares podem ser funcionalmente projetados (van Oosten 2017).

2.7 Transdução de sinal em plantas

A transdução de sinais consiste na transmissão de um sinal externo para o interior da célula visando uma adaptação ao seu ambiente. Este ramo da ciência é amplamente estudado, uma vez que todos os fenômenos biológicos envolvem uma sinalização ou pelo menos são afetados por ela. Os componentes dos processos de transdução de sinais presentes na maioria das células são: molécula sinalizadora; receptores de membrana; enzimas e/ou proteínas associadas aos receptores; componentes de amplificação de sinal; sinalizadores internos ou mensageiros secundários; componentes de propagação do sinal,

como, por exemplo, cascatas de fosforilação intracelular e componentes-alvo sujeitos a regulação induzida pelo sinal externo. Uma das formas mais estudadas de transdução de sinal é aquela que desencadeia reações em cascata de fosforilações proteicas. Estas reações são altamente reguladas e culminam com a ativação e/ou inativação de enzimas, bem como a modulação de fatores alterando assim a expressão gênica da célula, e conseqüentemente, o seu comportamento. (Alberts et. AL, 1999).

Em organismos multicelulares, a maior parte das vias de sinalização é usada para comunicação entre as células. Os mensageiros extracelulares iniciam as vias de transdução de sinal modificando o metabolismo, a proliferação e o desenvolvimento em células-alvo. A transdução do sinal consiste na transmissão, de forma direta ou indireta, deste para o sítio de ação dentro da célula. O processo inicia-se após o reconhecimento eliciador-receptor e envolve alterações na fosforilação de proteínas e mensageiros secundários.

O processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais para perceber e responder aos estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos apresenta certa analogia com o dos animais, embora possua características estruturais e funcionais peculiares, e pode ser dividido em três etapas básicas: 1) a percepção do sinal, ou reconhecimento, realizada por receptores celulares específicos ou inespecíficos que reconhecem um determinado sinal; 2) a transdução do sinal, que consiste na transmissão do mesmo para seu sítio de ação dentro da célula, podendo ser feita de forma direta ou indireta (via mensageiros secundários, alterações na fosforilação de proteínas e através de proteínas-G; e 3) a tradução do sinal, que consiste na conversão do sinal em respostas celulares específicas (Côté et al., 1995), como, por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) e de certas enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas.

Cronologicamente, a transdução de sinais para respostas de defesa em plantas pode assim ser resumida, após o reconhecimento do(s) eliciador(es) pelo(s) receptor(es): abertura de canais de íons; acidificação do citoplasma; ativação de quinases no citoplasma; ativação do complexo NADPH-oxidase; produção de espécies ativas de oxigênio; ativação de outros mensageiros secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno); ativação de fatores de

transcrição; transcrição de genes de defesa (proteínas-PR, enzimas de fitoalexinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular); resistência local (reação de hipersensibilidade) e, subsequentemente, 'imunidade' sistêmica (resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida) (Grant & Lamb, 2006).

O pH ácido gerado pela V-ATPase é importante para uma ampla gama de processos celulares, bem como processos independentes de acidificação, como secreção e fusão de membranas. Além dessas funções de manutenção "housekeeping", estudos recentes indicam que a V-ATPase atua diretamente na regulação e na função das vias de sinalização Wnt, Notch e mTOR. Estas vias de sinalização, em conjunto, regulam a proliferação/ diferenciação celular, respondendo a estímulos extracelulares (Sun-Wada, 2015).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles, F.B.; Morgon, P.W. ; Saltveit Jr., M.E. (1992) Fruit ripening, abscission, and postharvest disorders. *In: Abeles, F.B.; Morgon, P.W.; Saltveit Jr., M.E. (eds.) Ethylene in Plant Biology*. 2nd edn. San diego, Academic Press, p. 414

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. (1999) Cell signaling. *In Molecular Biology of the Cell*. 15:721-785.

Arango, M., Ge´ vaudant, F., Oufattole, M., and Boutry, M. (2003). The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 216:355–365.

Alvarenga, M.A.R; Teixeira, A.S; Chalfun, N.M.J; Produção em campo, em casa de vegetação e hidroponia. Lavras: UFLA, 2004. 400p.

Asaoka M, Segami S, Ferjani A and Maeshima M (2016) Contribution of PPI-Hydrolyzing Function of Vacuolar H –Pyrophosphatase in Vegetative Growth of Arabidopsis: Evidenced by Expression of Uncoupling Mutated Enzymes. *Front. Plant Sci*. 7:415. doi: 10.3389/fpls.2016.00415

Azevedo, I.G.; Oliveira, J.G.; Silva, M.G.; Pereira, T.; Corrêa, S.F.; Vargas, H.; Façanha, A.R. (2008) P-Type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* v. 48, p. 242-247.

Bapat, V.A., Trivedi, P.K., Ghosh, A., Sane, V.A., Ganapathi, T.R., Nath, P., 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnol. Adv.* 28, 94–107.

Bartz, J. A.; Brecht, J. A. (2003) Postharvest physiology and pathology of vegetables. New York: Marcel Dekker, 733.

Barry, C.S., Giovannoni, J.J., 2007. Ethylene and fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26, 143–159.

Basu, M.M., González-Carranza, Z.H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A.A., Roberts, J.A., 2013. The manipulation of auxin in the abscission zone cells of Arabidopsis flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiol.* 162, 96–106.

Befrozfar MR, Habibi D, Asgharzadeh A, Sadeghi-Shoae M, Tookallo MR. 2013. Vermicompost, plant growth promoting bacteria and humic acid can affect the growth and essence of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Ann Biol Res.* 4:8–12.

Bensen, R. J.; Zeevaart J. A. D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2* and *gib-3* tomato plants. *Journal of plant growth regulation*, v 9, p. 237-242, 1990.

Berbara RLL, García AC. 2014. Humic substances and plant defense metabolism. In: Ahmad P, Wani MR, editors. *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*, vol. 1. New York: Springer Science+Business Media; p. 297–319.

Bishop, G. J.; Fujioka, S.; Harrison, K.; Jones, J. D. G.; Kamiya, Y.; Noguchi, T.; Nomura, T.; Takatsuto, S.; Yokota, T. The tomato dwarf enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroids biosynthesis. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the U.S.A. Washington*, v. 96, p. 1761-1766, 1999

Bleecker, A. & Kende, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review Plant Physiology*, v. 16, p. 1-18.

Bowman, B.J.; Bowman, E.J. (1986). H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *Journal Membrane Biology*, 94: 83-97.

Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland 640,650.

Burbidge, A.; Grieve, T. M.; Jackson, A.; Thompson, A.; McCarty, D. R.; Taylor, I. B. Characterization of ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp 14*. *The plant journal*, Oxford, v. 17, p. 427-431, 1999

Catty P.; dExaerde A.D.; Goffeau A. (1997) The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases *Febs Letters* 409: 325-332.

Chaves,M.M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1-16.

Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J.P., Latche, A., Lamon, J., Bouzayen, M., 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape a non-climacteric fruit. *Plant Sci.* 167, 1301–1305

Cote, F.; Cheog, J.J.; Alba, R. & Hahn, M.G. 1995. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. *Physiologia Plantarum* 93:401-10

Cronin, S.R.; Rajini, R.; Hampton, R.Y. (2002) Cod 1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *Journal of Cell Biology*, 157: 1017-1028.

Dahlke, R.; Luethen, H.; Steffens, B. Abp1: An auxin receptor for fast responses at the plasma membrane. *psb*, Landes Bioscience Inc., v. 5, n. 1559-2316, p. 1–3, jan. 2010.

Derksen R.C; Miller, S.A; Ozkan, H.E; Fox, R.D. Spray deposition characteristics on tomatoes and disease management as influenced by droplet size, spray volume and air-assistance. St. Joseph: ASAE, 2001 16 p. (ASAE paper, 01-1120).

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M: The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 2005, 435:441-445.

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* 363: 1969-1980.

Dorcey, E., Urbez, C., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Perez-Amador, M.A., 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in Arabidopsis. *Plant J.* 58, 318–332.

Duby, G., Poreba, W., Piotrowiak, D., Bobik, K., Derua, R., Waelkens, E., and Boutry, M. (2009). Activation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H⁺-ATPase C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 284:4213–4221

El-Nemr, M.A; El-Desuki, M; El-Bassiony AM, Fawzy ZF. 2012. Response of growth and yield of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) to different foliar applications of humic acid and bio-stimulators. *Aust J Basic Appl Sci.* 6:630–663

Façanha, A. R.; de Meis; L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108: 241.

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.

Falhof J.; Pedersen J.T.; Fuglsang A.T.; and Palmgren M. (2016). Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*. 9: 323-337.

Fedoroff, N.V., Battisti, D.S., Beachy, R.N., Cooper, P.J., Fischhoff, D.A., Hodges, C.N., Knauf, V.C., Lobell, D., Mazur, B.J., Molden, D., et al. (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science* 327, 833–834.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). FAOSTAT Database. Rome, Italy: FAO. Retrieved January 30, 2015 from <http://faostat3.fao.org/home/E>

Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 917–929.

Fujino, D. W.; Nissen, S. J.; Jones, A. D.; Burger, D. W.; Bradford, K. J. Quantification of indole-3-acetic acid in dark-grown seedlings of *diageotropica* and *epinastic* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant physiology*, v. 88, p. 780-784, 1988.

Fukuda M, Segami S, Tomoyama T, Asaoka M, Nakanishi Y, Gunji S, Ferjani A and Maeshima M (2016) Lack of H⁺-pyrophosphatase Prompts Developmental Damage in Arabidopsis Leaves on Ammonia-Free Culture Medium. *Front. Plant Sci.* 7:819. doi: 10.3389/fpls.2016.00819

Grant, M. & Lamb, C. 2006. Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 9:414-20.

Gray, J.; Picton, S.; Shabeer, J.; Schuch, W.; Grierson, D. (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology*, v. 19, n. 1, p 69-87.

Guo H., Ecker J.R. (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115: 667-677

Harold F.M.. 1986. The Vital Force: A Study of Bioenergetics. W.H. Freeman. 577 pp.

Heinonen, J.K. (2001). Biological Role of Inorganic Pyrophosphate. (Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers).

Hicks, G. R., Rayle, D. R., Domax, T. L., the *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. Science, new York, v. 245, p52-54, 1989.

Jackson MB. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. Ann Bot 2008; 101:229-48; PMID:17956854; <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm237>

Jiang, S.S.; Fan, L.L.; Yang, S.J.; Kuo, S.Y.; Pan, R.L. (1997) Purification and characterization of thylakoid membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Spinacia oleracea* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 346: 105-112

Johnson P.R., Ecker J.R. (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. 32: 227-254

Karakurt Y, Unlu H, Unlu H, Padem H. 2009. The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. Acta Agric Scand Sect B. 59:233–237.

Katz, E., Lagunes, P.M., Riov, J., Weiss, D., Goldschmidt, E.E., 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric citrus fruit. *Planta* 219, 243–252

Kakinuma, Y., Ohsumi, Y. e Anraku, Y. (1981). Properties of H⁺ translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 256: 10859-10863.

Kelly, M. O., Bradford, K.J., Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. *Plant Physiology*, v.82, 713-717, 1986.

Koka, C. V.; Cerny, R. E.; Gardner, R. G.; Noguchi, T.; Fujioka, S.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Clouse, S. D. A putative of tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology*, Rockville, v.122 p. 85-98, 2000

Koorneef, M.; Bosma, T. D. G.; Hanhart, C. J.; Vanderveen, J. H.; Zeevart, J. A. D. The isolation and characterization of gibberellins-deficient mutants in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. Berlin, v. 80, p. 852-857, 1990.

Logan, H.; Basset, M.; Very, A. A.; Setenac, H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: From black boxes to molecular physiology. *Plant Physiology* 100: 1.

Maeshima, M. (1990) Oligomeric structure of H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. *Biochem. Biophys. Res Commun* 168: 1157.

Marcos, S. K. Desenvolvimento de Tomate de Mesa, com o uso do método QFD (Quality Function Deployment), comercializado em um supermercado. 199p. Tese de Doutorado. Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2001.

Meissner, R. Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalet, G., Ashri, A., Elkind Y., Levy, A. A new model system for tomato genetics. *The Plant journal*, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997

Morth, J.P., Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Andersen, J.P., Vilsen, B., Palmgren, M.G., and Nissen, P. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 12:60–70.

Muday, G.K., 2001. Auxins and tropism. *J. Plant Growth Regul.* 20, 226-243

Nelson, N.; Taiz, L.; (1989) The evolution of H⁺-ATPase. *Trends Biochemistry Science*, 14: 113.

korokova-Façanha, A.L.; Appelgran, H.; Tabish, M.; Okorokov, L.; Ekwall, K. (2002) The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology* 157: 1029-1039.

Osorio S, Scossa F, Fernie AR. 2013. Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science* 4, 198

Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., et al. (2007). Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol. Cell.* 25:427–440.

Overvoorde, P., Fukaki, H., Beeckman, T., 2010. Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001537.

Palmgren, M.G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:817–845.

Patakas, A., Nikolaou, N., Zioziou, E., Radoglou, K., Noitsakis, B. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science*, 163: 361-367.

Pedersen, P.L.; Carafoli, E. (1987). Íon motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-150.

Perzov, N.; Padler-Karavani, V.; Nelson, N.(2001) Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Letters* 504: 223-228.

Pucciariello C, Parlanti S, Banti V, Novi G, Perata P. Reactive oxygen species-driven transcription in Arabidopsis under oxygen deprivation. *Plant Physiol* 2012; In press; PMID:22415514; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.191122>

Pratt, L. H., Cordonnier-Pratt, M.M; Kelmenson, P. M.; Lazaranova, G.I., Kubota, T., Alba, R.M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Plant, cell and environment*, London, v. 20, p. 672-677, 1997

Overvoorde, P., Fukaki, H., Beeckman, T., 2010. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2, a001537.

Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 : 17-36.

Rea, P.A.; Kim, Y.; Sarafin, V.; Poole, R. J.; Davies, J. M.; Sanders, D. (1992) Vacuolar H⁺ translocating pyrophosphatases: A new category of íon translocase. *Trends Biochemistry Science.* 14: 348.

Rea, P.A.; Poole, R.; 1993. Vacuolar H⁺- translocating pyrophosphatase; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol.*, 44: 157-180.

Rick, C. M., Yoder, J. I., Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. *Annual review of genetics*, Palo Alto, v. 22, p. 281-300, 1988

Riechmann, J. L. et al. Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, v. 290, n. 5499, p. 2105–2110, 2000.

Samarão S.S., Teodoro C.E.S., Silva F.E., Ribeiro C.C., Granato T.M., Bernardes N.R., Retamal C.A., Facanha A.R., Okorokova-Facanha A.L., Okorokov

L.A. V H⁺-ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes, *BBA - Biomembranes* (2008), doi:10.1016/j.bbamem.2008.11.006

Sanders, D.; Bethke, P. (2000) Membrane transport. In: Biochemistry & molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists. ASPP.* Rockville p 110-158.

Sauer, M., Robert, S., Kleine-Vehn, J., 2013. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* 64, 2565–2577.

Schaller, G.E. (2012) Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biol.* <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7007-10-9>

Schiavon M, Pizzeghello D, Muscolo A, Vaccoro S, Francioso O, Nardi S. 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J Chem Ecol.* 36:662– 669.

Scott, D.A.; De Souza, W.; Benchimol, M.; Zhong, L.; Lu, H.G.; Moreno, S.N.J.; Docampo, R. (1998) Presence of a plant-like proton pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22151-22158.

Shikata, M., K. Hoshikawa, T. Ariizumi, N. Fukuda, Y. Yamazaki and H. Ezura. 2016. TOMATOMA update: Phenotypic and metabolite information in the micro-tom mutant resource. *Plant Cell Physiol.* 57: e11

Simon, S.; Petrasek, J. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, v. 180, n. 3, p. 454 – 460, 2011. ISSN 0168-9452.

Sondergaard, T.E., Schulz, A., and Palmgren, M.G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol.* 136:2475–2482.

Srivastava A, Handa A. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 67–82.

Sun-Wada,G,H; Wada, Y; Role of vacuolar-type proton ATPase in signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847 (2015) 1166–1172

Sze, H. 1985. H⁺-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annual Review Plant Physiology*, v. 36, p. 175-208.

Sze H, Xuhang L, Palmgren MG 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677-689.

Taiz, L.; Zeiger, E. (1998) In.: *Plant Physiology. 2nd ed.*, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 559.

Tanksley, S. Linkage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*)(2N=24). In: O'Brien, J. (Ed.) Genetic maps: locus maps of complex genomes. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1993. p. 639-660.

Taylor, I. B.; Burbidge, A.; Thompson, A. J. Control of abscisic acid synthesis. *Journal of experimental botany*, Oxford, v 51, p. 1563-1574, 2000.

The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641.

Tomashek, J. J.; Grahan, L.A.; Hutchins, U. M.; Stevens, T. H.; Klionsky, D. J. (1997) V₁-stuated stalk subunits of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 26787.

Van Oosten, J, M; Pepe, O; The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants *MichaelChem. Biol. Technol. Agric.* (2017) 4:5 DOI 10.1186/s40538-017-0089-5

Woodward AW, Bartel B. 2005. The *Arabidopsis* peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular Biology of the Cell* 16: 573–583.

Wilkinson, J. Q.; Lanahan, M. B.; Yen, H. C.; Giovannoni, J. J.; klee, H. J.; An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *never-ripe*. *Science*, New York, v. 270, p. 1807-1089, 1995.

Yin, W; Ye, C; Yang, X; Xia, X. Comparative analysis of cation/proton antiporter superfamily in plants. *Gene* 521 (2013) 245–251 Contents

Zhu, J. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167, October 6, 2016

Zoncu, R; Bar-Peled, L; Efeyan A; Wang, S; Sancak Y; Sabatini D.M; mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H-ATPase, *Science* 334 (2011) 678–683.

CAPÍTULO 1 – O acoplamento funcional da H⁺-Pirofosfatase vacuolar é modulado por etileno em resposta ao déficit hídrico

Luís Alfredo dos Santos Prado^a Arnoldo Rocha Façanha^a

^aUniversidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Bioscience and Biotechnology Center, Campos dos Gotacazes, RJ – Brazil

RESUMO

A disponibilidade hídrica é um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo o déficit hídrico responsável por grandes perdas na produção vegetal em todo o planeta. A baixa disponibilidade hídrica interfere diretamente nas funções normais da célula, alterando parâmetros fisiológicos e morfológicos da planta. Durante a seca, é fundamental que a célula vegetal mantenha o potencial hídrico e o turgor celular, bem como a homeostase iônica, que são controlados parcialmente pelos sistemas primários de transporte de energia. Tais sistemas conhecidos como bombas de prótons, utilizam um substrato energético (ATP ou PPI) para transportar íons H⁺ através das membranas celulares. Na membrana plasmática existe a P-ATPase dependente de ATP. No tonoplasto coexistem duas bombas de prótons: a V-ATPase (dependente de ATP) e a V-PPase (dependente de PPI). A cultivar em miniatura *Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom (MT) vem sendo proposta como modelo preferencial em pesquisas com plantas, pois apresenta algumas vantagens sobre o modelo mais utilizado *Arabidopsis thaliana*. No presente trabalho, microtomateiros mutantes (etileno – e etileno +) foram submetidos ao déficit hídrico e reirrigação. Foi feita avaliação do tamanho das raízes, peso de massa seca e massa fresca e, colorimetricamente, a atividade das bombas de prótons de tecidos radiculares foi obtida. Os genótipos não apresentaram diferenças significativas entre si nos parâmetros tamanho de raízes e volume de massa

fresca/seca. As bombas dependentes de ATP apresentaram significativa redução de suas atividades quando as plantas foram submetidas à seca e após a reirrigação em todos os genótipos. A V-PPase apresentou atividade 2,5 vezes maior no genótipo Epi em relação aos demais na condição controle e na reirrigação. A F-ATPase apresentou aumento de atividade na seca e na reirrigação, com exceção do genótipo Nr nos dois casos. Os resultados apresentados sugerem que existe participação do etileno no funcionamento da V-PPase e da F-ATPase nas respostas adaptativas das plantas.

Palavras-chave: Estresse hídrico, bombas de prótons, homeostase iônica

ABSTRACT

The water availability is a limiting factor for the growth and development of plants, and the water deficit is responsible for major losses in crop production around the world. Low water supply directly affects the normal functions of the cell, changing physiological and morphological parameters of the plant. During the dry season, it is essential that the plant cell keep the water potential and cell turgor as well as the ionic homeostasis, which are partially controlled by the primary energy transmission systems. Such systems known as proton pumps, use an energy substrate (ATP or PPI) to transport H⁺ ions across cell membranes. In the plasma membrane exists P-ATPase ATP-dependent. In tonoplasto coexist two proton pumps: V-ATPase (ATP dependent) and V-PPase (PPI dependent). The cultivar miniature *Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom (MT) has been proposed as the preferred model in plant research, because it has some advantages over the most used model *Arabidopsis thaliana*. In this study, mutant microtomato plants (ethylene - and ethylene +) were subjected to water deficit and rewatering. It was evaluated the size of the roots, dry weight and fresh weight and, colorimetrically, the proton pumps activity of root tissue were obtained. The genotypes were not significantly different from each other in size roots parameters and fresh/dry weight volume. ATP-dependent pumps showed a significant reduction of its activities when plants were subjected to water deficit and after rewatering in all genotypes. The V-PPase showed activity 2.5 times higher in Epi genotype compared to others in the control condition and rewatering. The F-ATPase showed increased activity in the dry and rewatering, except the Nr genotype in both cases. The results suggest that there is involvement of ethylene in the operation of V-PPase and F-ATPase in adaptive responses of plants.

Keywords: Water stress, proton pumps, ion homeostasis.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, como organismos sésseis, estão constantemente sob pressão do ambiente e desenvolveram evolutivamente diversas maneiras de resistir e responder a tal pressão, de modo que tornasse viável seu crescimento e reprodução. Mecanismos de resposta a estresses bióticos e abióticos, bem como os de crescimento da planta, são coordenados pela ação conjunta dos fitormônios que regulam todas as cascatas de sinalização, afetam parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares. A seca é um dos estresses abióticos mais importantes e é responsável por danos mecânicos às raízes, baixa disponibilidade de nutrientes e alta salinidade do solo (Hameed et al., 2013). Uma das abordagens econômicas para reduzir o efeito do estresse por seca é desenvolver culturas resistentes à seca (Lakew et al., 2011). No entanto, esse progresso é gravemente prejudicado pela escassez de recursos de germoplasma e pela complexidade de características fisiológicas e genéticas. Assim, a compreensão dos mecanismos das plantas em resposta ao estresse por seca e a identificação de recursos genéticos com altos níveis de tolerância à seca são muito cruciais, visando à geração de recursos biotecnológicos capazes de suprir essa necessidade.

O papel da H^+ -ATPase de membrana nos eventos de abertura estomática já foi bem descrito na literatura. Durante a abertura estomática, a hiperpolarização da membrana facilita a entrada de íons K^+ nas células guarda. A hiperpolarização é conduzida pela atividade das H^+ -ATPases localizadas na membrana plasmática (Assmann 1985, Shimazaki, 1986). O gradiente eletroquímico assim gerado age como uma força motriz para vários outros fluxos de íons / solutos. A ativação irreversível da H^+ -ATPase pela fusicocina leva à incapacidade de estímulos para fechar e resulta no murchamento da folha, enfatizando a importância das H^+ -ATPases na regulação do movimento estomático. Nas células guarda, a atividade H^+ -ATPase é regulada por ABA, auxina, Ca^{2+} e luz azul (Shimazaki, 2016).

O vacúolo das células vegetais possui diversas formas, tamanhos, conteúdo, dinâmica funcional e desempenha papéis centrais no crescimento das plantas, desenvolvimento e respostas ao estresse (Paris, 1996, Martinoia, 2007). Na membrana vacuolar coexistem duas bombas de H^+ , a V-ATPase e a Pirofosfatase vacuolar, que possuem papel central na homeostase iônica da

célula vegetal e sua atuação direta nas respostas a estresses abióticos como a salinidade, por exemplo, é bem descrita. Para lidar com a entrada maciça de Na^+ que pode ocorrer em um ambiente salino, mecanismos de transporte de extrusão de Na^+ para fora da célula podem ser cruciais no controle da relação K^+ / Na^+ do citoplasma. Os principais transportadores envolvidos no efluente de Na^+ do citoplasma são SOS1, que extrudem Na^+ para o apoplasto e NHX1 que compartimentaliza Na^+ no vacúolo (Apse 1999, Shi 2000). À medida que a extrusão ocorre contra o gradiente eletroquímico, esses transportadores devem ser energizados pelas bombas de H^+ , o que resulta, então, na sua importância central (Pons, 2012, Undurraga et al 2012). Para a seca e o estresse salino, é necessário distinguir os sinais de estresse primário dos sinais secundários causados por pouca água ou muito sal. O sinal primário causado pela seca é o estresse hiperosmótico, que muitas vezes é referido simplesmente como estresse osmótico porque uma condição hiposmótica tipicamente não é um problema significativo para as células vegetais (Zhu, 2016).

O etileno está entre os principais hormônios estudados em plantas e já foram descritas suas participações em vários processos fisiológicos, bem como maturação de frutos e tríplice resposta. Voeseneck et al (2015) propõem que a capacidade de sintetizar etileno foi seletivamente perdida na evolução quando os ancestrais de plantas totalmente aquáticas perderam seu modo de vida terrestre.

A fim de obter mais informações acerca da modulação bioenergética das plantas em resposta a capacidade de sintetizar o fitormônio etileno, utilizou neste trabalho mutantes *Nr* e *Epi* submetidos ao déficit hídrico e à reirrigação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

No presente trabalho foram utilizados 3 genótipos de microtomateiros: Selvagem (WT) como controle, *Never-Ripe* (Nr) que é insensível ao etileno e *Epinaste* (Epi) que produz alta quantidade de etileno. As sementes foram cedidas gentilmente pelo professor Lazaro Pérez – Esalq-USP. As sementes foram germinadas em substrato Basaplant® em copos plásticos de 500 ml em câmara controlada sob as condições de 23° C, fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, suplementado com solução de Hoagland ½ força. As plantas foram irrigadas a cada 2 dias até o 36º dia de germinação. Plantas com 36 dias tiveram irrigação suspensa por 10 dias e foram posteriormente reirrigadas, totalizando 3 tratamentos: Controle (condições normais de irrigação), Déficit (irrigação suspensa por 10 dias) e Reirrigado (24h após a reirrigação).

2.2 Peso de matéria fresca e seca e tamanho das raízes

Na avaliação de massa fresca e seca, 3,0 g de raízes frescas foram secas em estufa, a 45°C, por 96 horas, com seis repetições. Na condução do teste pesou-se em balança analítica, embalagens de papel vazias, nas quais foram adicionadas raízes frescas de microtomateiros e novamente procedeu-se a pesagem do material que foi levado à estufa, determinando assim os valores de massa seca. As raízes foram medidas usando régua graduada.

2.3 Isolamento de membranas

As vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática foram isoladas de folhas e raízes através de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas alterações.

As amostras coletadas dos diferentes tratamentos foram homogeneizadas em meio de extração tamponado gelado, usando graal e pistilo. O tampão de

extração é composto de 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (p/v), 100 mM de KCl, 5 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e 100mM de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano]-HCl, pH 8,0.

As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso, foram adicionados, 5 mM de DTT (ditiotretol), 0,5% de PVPP (polivinilploipirrolidona), 0,3% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (p/v), 2 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil), 1mM de Benzamidina, 2% de ácido ascórbico, tendo uma relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2. Os procedimentos foram executados à temperatura de 4° C, e o pH do tampão de extração foi monitorado e mantido na faixa de 7,5-8,0.

O homogenato resultante foi submetido à centrifugação a 1500 x g, durante quinze minutos para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 8.000 x g, por quinze minutos para remoção da fração mitocondrial. Em seguida o sobrenadante coletado foi centrifugado a 100.000 x g, por trinta minutos. O precipitado dessa centrifugação foi ressuspenso em meio de ressusensão contendo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,6), glicerol em 10 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM.

A fração microsomal, obtida por fracionamento celular de tecidos vegetais, é constituída principalmente por vesículas de membranas oriundas da plasmalema e do tonoplasto, e as principais enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise de ATP são as H⁺-ATPases do tipo P e V presentes nestas membranas (Sze, 1985). Em membranas microsomais, observa-se a hidrólise de pirofosfato (PP_i), a qual é catalisada por uma pirofosfatase translocadora de prótons (H⁺-PPase), que atua em paralelo com a V-ATPase presente no tonoplasto (Rea et al., 1992).

A concentração de proteínas nas vesículas foi determinada aplicando-se o método de Bradford (1986).

2.4 Determinação das atividades hidrolíticas das bombas de H⁺

As atividades foram determinadas colorimetricamente, segundo o método descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da

proteína e finalizada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado para uma concentração final de 10% (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL da mistura contendo molibdato de amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + ácido ascórbico 1 % (100:1) e, após 15 minutos, efetuada a leitura em 750nm em leitor Quant (Biotec, USA). Nessa reação, o fosfato é incorporado em um complexo fósforo-molibdênio e reduzido pelo ácido ascórbico formando coloração azul. A composição do meio de reação: 50 mM de Hepes-Tris pH 6,5, 5 mM de MgSO₄, 100 mM de KCl, 0,2 mM de Na₂MoO₄, 2 mM de ATP e 0,03 mg.ml⁻¹ de proteína. Foi utilizado também inibidor específico para a PPase, inibidor (0,2 mM). Também foi avaliada a atividade da enzima na presença de diferentes concentrações de ABA *in vitro* (0,1; 0,3; 0,5 e 1uM). A atividade hidrolítica da H⁺-PPase foi medida com ou sem inibidor, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída à enzima.

2.5 Monitoramento do gradiente de H⁺

O gradiente de prótons foi medido como descrito por De Michelis e Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha e de Meis (1998), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro.

O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então, a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional foi composto de 10 mM de Tris pH 6,5 ou 7,0, KCl 100 mM, ACMA 1,3 μM , MgSO₄ 1 ou 3 mM e ATP 3 mM ou PPI 0,4mM e 50 μg de proteína. O gradiente foi dissipado com NH₄Cl 1,5 mM.

2.6 Obtenção da taxa de acoplamento das bombas de H⁺

A taxa de acoplamento é obtida pela razão entre a velocidade inicial do transporte de H⁺ e a hidrólise do ATP ou PPI. Tal fator indica a proporção de substrato requerido por íon transportado, provendo uma inferência indireta da eficiência com a qual as respectivas bombas executam a transferência de energia liberada na hidrólise do substrato, do sítio catalítico para o domínio de transporte de H⁺.

3. RESULTADOS

3.1 As mutações hormonais não alteram parâmetros fitotécnicos

A fim de observar se as alterações hormonais causariam diferenças em parâmetros fitotécnicos como peso da massa seca ou crescimento radicular, plantas dos 3 genótipos foram submetidas a secagem em estufa, pesagem e medição do sistema radicular, antes de qualquer tratamento. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros analisados. (tabelas 1 e 2).



Fig. 1 – Microtomateiros mutantes com 10 dias de germinação em câmara controlada.



Figura 2. Comprimento das raízes com 45 dias após a germinação.

Tratamento	Massa seca (g)
WT	0,89 ± 0,07
Nr	0,87 ± 0,09
Epi	0,85 ± 0,09
WT S	0,43 ± 0,03
Nr S	0,45 ± 0,04
Epi S	0,45 ± 0,07
WT R	0,44 ± 0,09
Nr R	0,46 ± 0,06
Epi R	0,48 ± 0,05

Tabela 1 – Valores de massa seca de raízes após secagem em estufa. Valores representam médias ± desvio padrão de 6 experimentos independentes.

Tratamento	Tamanho de raiz (cm)
WT	21±0,9
Nr	18±0,8
Epi	19±0,7
WT S	24±0,08
Nr S	22±0,04
Epi S	24±0,06
WT R	24±0,01
Nr R	23±0,09
Epi R	24±0,04

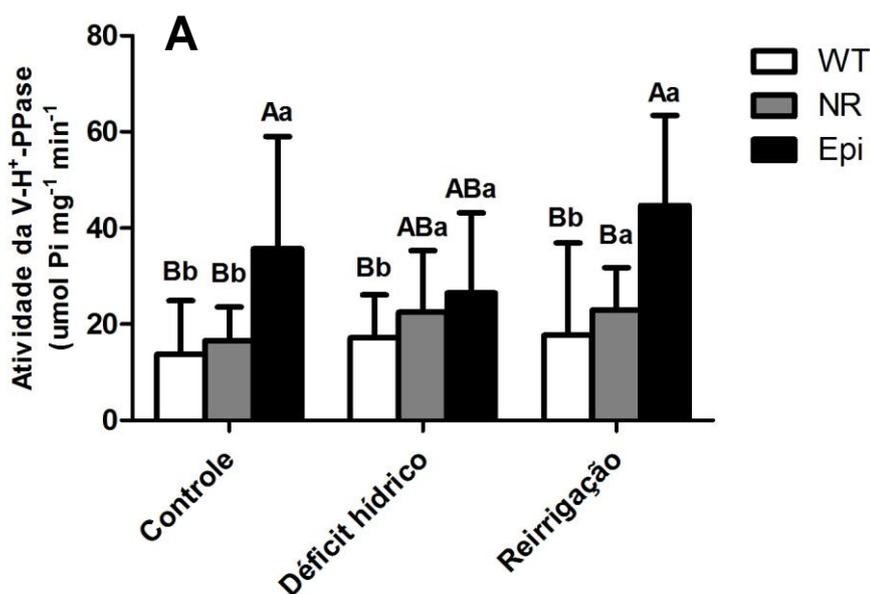
Tabela 2 – Tamanho das raízes nos diferentes tratamentos. Valores representam médias ± desvio padrão de 6 experimentos independentes.

3.2 O etileno estimula a atividade hidrolítica da H⁺-Pirofosfatase vacuolar

Como observado na figura 3A, o mutante defeutivo para o etileno NR apresenta níveis de atividade da V-PPase igual ao do genótipo WT, porém plantas com superprodução de etileno mostraram atividades pirofosfatásicas 2 vezes maiores em condições normais de irrigação. Durante o déficit hídrico houve redução no genótipo Epi e após a reirrigação a pirofosfatase atingiu níveis mais elevados de atividade.

Para a V-ATPase não foi possível relacionar diretamente seus padrões de atividade com uma regulação direta por etileno, pois o mutante defeutivo apresentou maior atividade que o controle selvagem e o genótipo que superproduz etileno apresentou atividades ainda mais elevadas. Durante o tratamento com déficit hídrico, todas as atividades decresceram, mostrando sutil recuperação após a reirrigação.

A P-ATPase, nas condições normais de irrigação, teve aumento de atividade no genótipo defeutivo para o etileno e uma inibição no superprodutor deste hormônio. Durante o déficit, todos os genótipos apresentaram decréscimo nas atividades, mas ainda assim o mutante NR manteve atividades P-ATPásicas acima dos demais. Após a reirrigação não se observou diferenças significativas até 24h após a rehidratação.



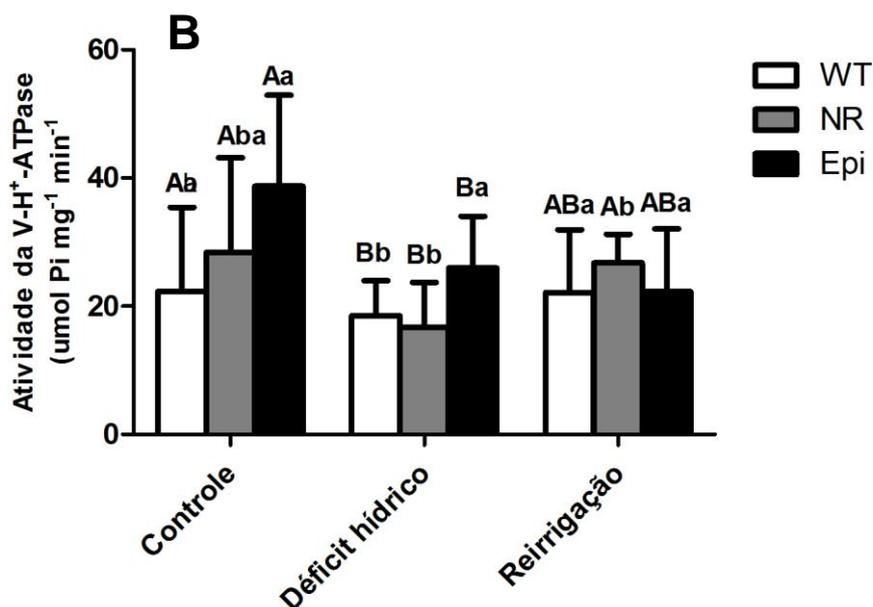


Figura 3 – Atividade hidrolítica das bombas de H⁺ presentes no tonoplasto de tecidos radiculares nas condições controle (1), déficit hídrico (2) e 24h após a reirrigação (3). H⁺-PPase (A) e V-ATPase (B). Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

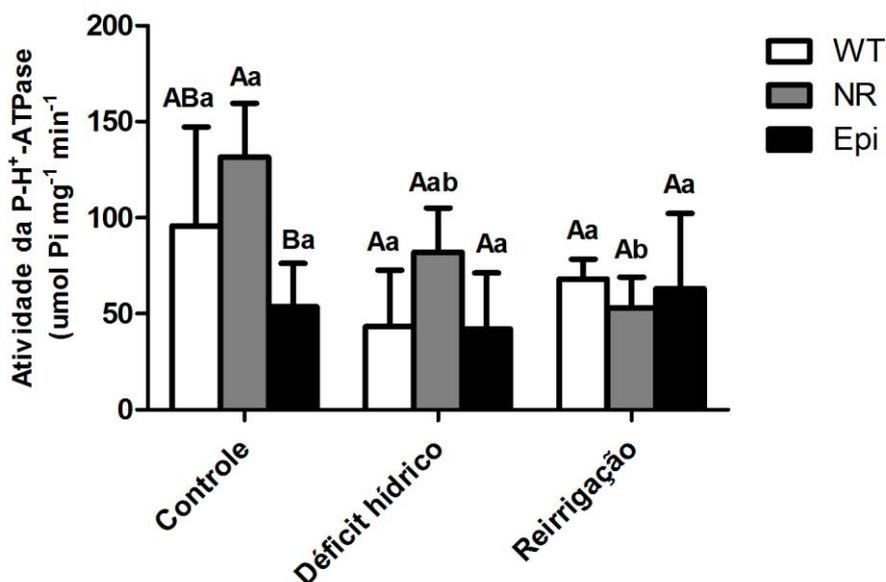


Figura 4 – Atividade hidrolítica da bomba de H⁺ de membrana plasmática de tecidos radiculares nas condições controle (1), déficit hídrico (2) e 24h após a reirrigação (3). Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

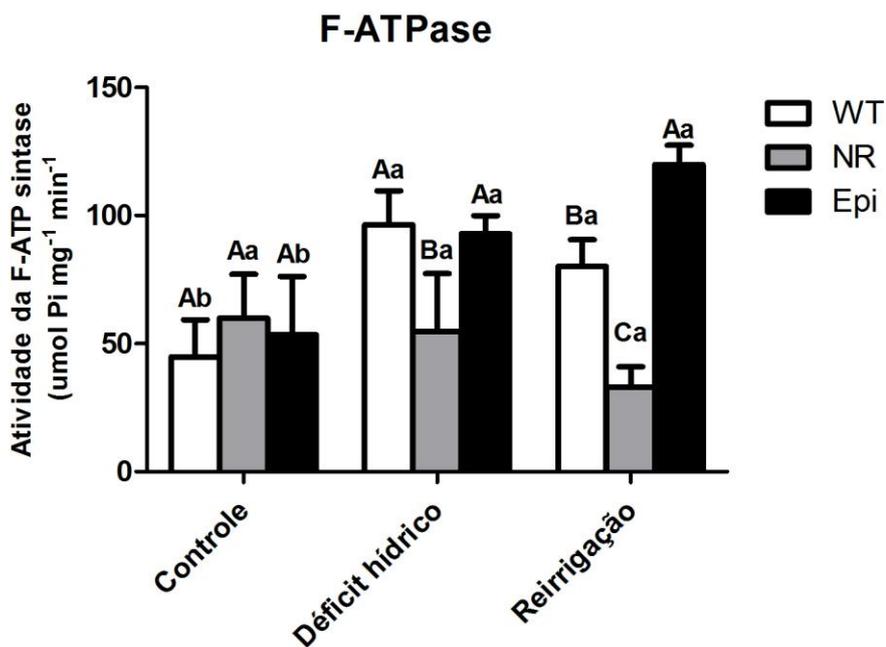
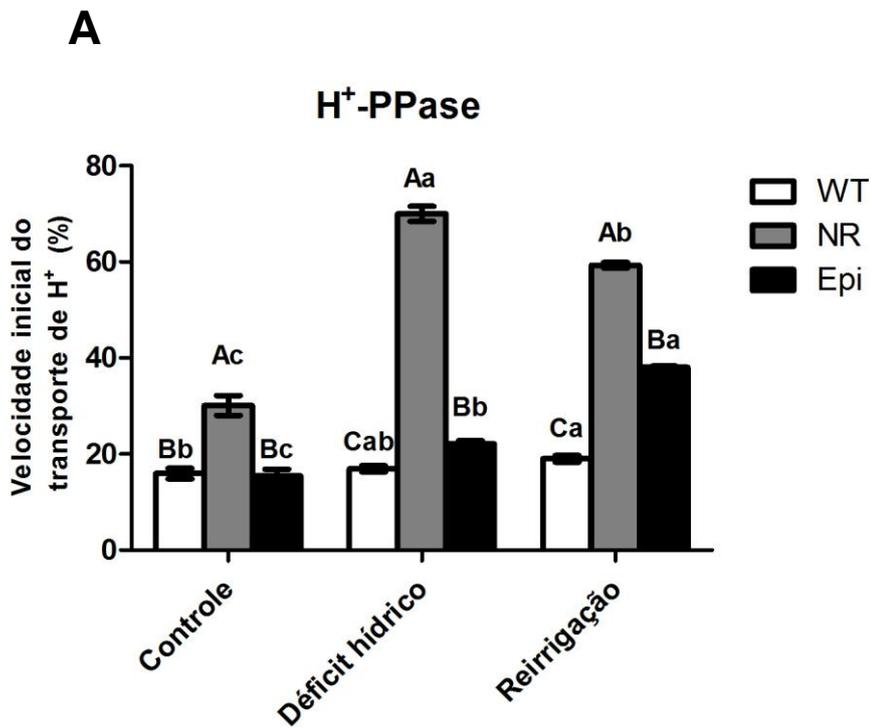


Figura 5 – Atividade hidrolítica da bomba de H⁺ mitocondrial de tecidos radiculares nas condições controle (1), déficit hídrico (2) e 24h após a reirrigação (3). Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

3.3 O etileno reduz o gradiente eletroquímico de H⁺ através do tonoplasto

Plantas deficientes na sensibilidade ao etileno apresentam gradientes de H⁺ gerados pela pirofosfatase até 3 vezes maiores em relação aos demais genótipos analisados, WT e Epi, em todos os tratamentos, sendo os maiores estímulos verificados no tratamento com déficit hídrico (Figura 5A). Contrariamente, a V-ATPase apresentou grande redução no gradiente sob condições de estresse hídrico (Figura 5B).



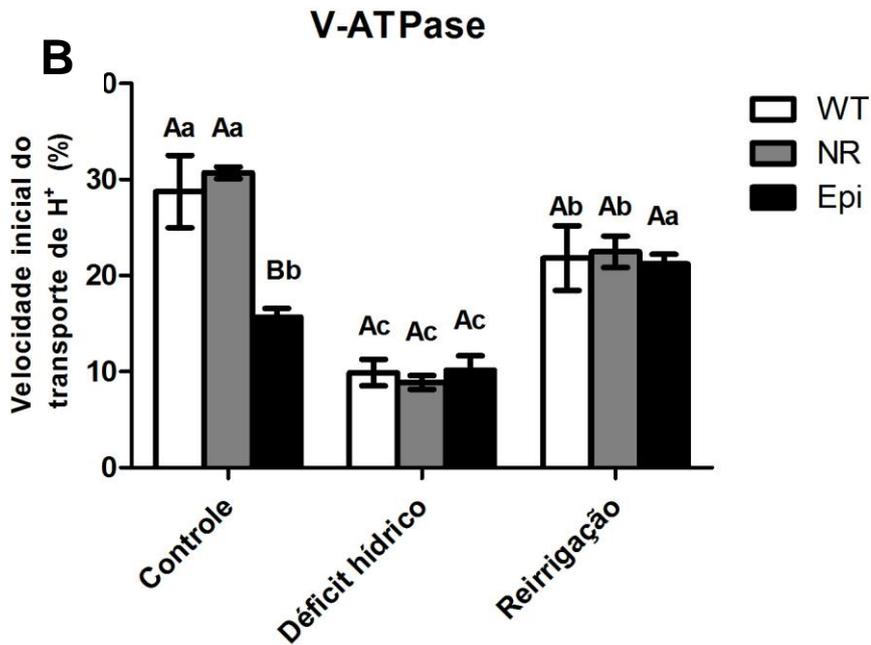


Figura 5 - Velocidade inicial do transporte de prótons das bombas vacuolares H⁺-PPase (A) e V-ATPase (B), sob condições controle (1), estresse hídrico (2) e 24h após a reirrigação (3). Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

3.4 O etileno reduz o acoplamento funcional da H⁺-PPase vacuolar

O mutante deficiente na percepção de etileno, durante o déficit, apresentou uma taxa de acoplamento da V-PPase 3 vezes maior em relação ao genótipo selvagem. Para a V-ATPase, o acoplamento foi reduzido no déficit e brevemente recuperado na reirrigação. (Tabela 5)

Tratamento	H ⁺ -PPase	V-ATPase
WT	1,11	1,15
Nr	1,73	1,07
Epi	0,41	0,38
WT S	0,96	0,51
Nr S	3,16	0,53
Epi S	0,84	0,35
WT R	1,04	0,88
Nr R	2,60	0,83
Epi R	0,84	0,69

Tabela 5 – Valores de acoplamento das bombas de H⁺ vacuolares nas condições controle, seca e reirrigação.

4. DISCUSSÃO

Para crescer e se desenvolver em ambientes desfavoráveis, os organismos precisam ajustar tanto sua homeostase celular como sua bioenergética, a fim de responder positivamente as pressões impostas pelo ambiente. Dentro deste

contexto, as bombas de prótons, como transdutores primários de energia têm sido evidenciadas como eficientes sinalizadores, transformando energia em informação e fazendo com que a célula adapte-se a diversos tipos de estresse. Os mecanismos de resposta a estresses nas plantas parecem exigir a interação entre redes interconectadas de moléculas sinalizadoras e respostas celulares. Grande atenção vem sendo dada ao etileno, que pode ser considerado um "hormônio do estresse" envolvido em múltiplas respostas moleculares e fisiológicas de plantas e que regula vários mecanismos de crescimento e defesa celular (Schellingen et al., 2014). No entanto, ainda permanece incompleta a descrição dos mecanismos envolvidos na regulação via etileno das respostas da planta ao estresse hídrico e seus efeitos subsequentes na sensibilidade ou tolerância a este e outros estresses abióticos. Um maior entendimento destes mecanismos de regulação tem sido potencializado com o uso de mutantes hormonais específicos, o que também tem contribuído para o desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas para viabilizar a produção vegetal em condições de estresse. Estudos já têm demonstrado, por exemplo, que os mutantes insensíveis ao etileno são menos sensíveis às condições de estresse por metais pesados (Gratão et al., 2012).

Nossos dados demonstram que as mutações hormonais utilizadas neste estudo não afetaram significativamente o crescimento das plantas em relação ao controle selvagem. Tal resultado provê mais evidências sobre o potencial de uso científico-tecnológico destes mutantes hormonais, os quais têm demonstrado ser uma eficiente ferramenta para elucidar a participação de hormônios em processos bioquímicos e fisiológicos em plantas.

A H^+ -ATPase de membrana plasmática tem sido relacionada a uma miríade de fenômenos adaptativos a estresses abióticos. Em resposta a baixas temperaturas, por exemplo, sua atividade é bastante reduzida nos primeiros estágios do estresse, porém a enzima apresenta uma recuperação nas atividades após períodos mais longos (Musi, 2016).

Estudos anteriores do grupo já haviam demonstrado uma inibição da atividade hidrolítica H^+ -ATPase de membrana plasmática em frutos de microtomateiro em resposta ao aumento dos níveis de etileno (Prado, 2011). Neste trabalho, foi possível observar tal efeito inibitório também nas raízes, visto

que o mutante defectivo para etileno apresentou atividade mais alta em relação ao controle selvagem e o mutante que superproduz etileno apresentou valores de hidrólise aproximadamente 55% menores.

Não foram encontradas diferenças estatísticas nos valores de atividade da V-ATPase tanto para os diferentes tratamentos como entre os genótipos, sugerindo que esta bomba apresenta uma expressão funcional mais estável, sendo bem menos responsiva tanto ao estresse quanto às mutações hormonais estudadas.

A pirofosfatase vacuolar vem sendo proposta como um marcador bioquímico para o estresse hídrico, tendo em vista que os níveis de ATP decaem durante este e outros estresses que afetam a bioenergética vegetal, e o pirofosfato fica disponível em abundância no citosol, pois é originado de diversas rotas de biossíntese das principais macromoléculas. Trabalhos anteriores do grupo mostram que ocorre um aumento nos níveis de transcritos de RNA referentes à pirofosfatase vacuolar em resposta ao déficit hídrico em plantas do genótipo selvagem e na mesma proporção em mutantes defectivos para a biossíntese de ácido abscísico (*Notabilis*) (Prado, 2013). Tais resultados indicam que a pirofosfatase é regulada em nível pós-transcricional através de uma via não-dependente de ácido abscísico, que é o hormônio mais estudado e relacionado com as respostas a estresses em plantas. Este resultado vai ao encontro da hipótese desta enzima representar um eficiente marcador bioquímico para estresses abióticos em plantas.

Os dados aqui apresentados sugerem uma possível inibição da pirofosfatase vacuolar pelo etileno, indicando que esse hormônio pode exercer também papel fundamental na regulação bioenergética das respostas adaptativas das plantas aos estresses abióticos. Mais dados acerca das respostas adaptativas relacionadas à energética celular em função do balanço hormonal, envolvendo o etileno durante o déficit hídrico são necessários.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apse M.P.; Aharon G.S; Snedden W.A.; Blumwald E; Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis, *Science* 285 (1999) 1256-1258

Assmann, S.M., Simoncini, L. and Schroeder, J.I. (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba* L. *Nature* 318, 285–287.

Bradford M.H. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

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.

Fiske C.F. e Subbarow Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375.

Giannini J.L., Briskin D.P. 1987. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*, 84: 613.

Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Tezotto, T., Piotto, F.A., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A., 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 56, 79–96. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.04.009>.

Hameed, A., Goher, M., Iqbal, N., 2013. Drought induced programmed cell death and associated changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in wheat leaves. *Biol. Plant.* 57, 370–374.

Lakew, B., Eglinton, J., Henry, R.J., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., 2011. The potential contribution of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) germplasm to drought tolerance of cultivated barley (*H. vulgare* ssp. *vulgare*). *Field Crop Res.* 120, 161–168.

Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J Exp Bot* 2007; 58:83-102.

Musi, C.; Camoni, L; Visconti, S; Aducci, P. Cold stress affects H_p-ATPase and phospholipase D activity in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 108 (2016) 328-336

Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 1996; 85:563-72

Prado, L.A.S.; Atividade e expressão gênica das bombas de prótons do fruto do microtomateiro mutante (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). 2011. Monografia (Licenciatura em Biologia) – Universidade estadual do norte fluminense Darcy Ribeiro

Prado, L.A.S.; Modulação da pirofosfatase vacuolar (V-PPase) por ácido abscísico em plantas submetidas ao déficit hídrico. 2013. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Ratajczak, R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 : 17-36.

Rea, P.A.; Kim, Y.; Sarafin, V.; Poole, R. J.; Davies, J. M.; Sanders, D. (1992) Vacuolar H⁺ translocating pyrophosphatases: A new category of ion translocase. *Trends Biochemistry Science*. 14: 348.

Rea, P.A.; Poole, R.; 1993. Vacuolar H⁺- translocating pyrophosphatase; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol.*, 44: 157-180.

Schellingen, K., Van Der Straeten, D., Vandenbussche, F., Prinsen, E., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2014. Cadmium-induced ethylene production and responses in Arabidopsis thaliana rely on ACS2 and ACS6 gene expression. *BMC Plant Biol.* 14, 214. doi:<http://dx.doi.org/10.1186/s12870-014-0214-6>.

Shi H., Ishitani, M; Kim, C;. Zhu J.-K, The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 6896e6901.

Shimazaki, K., Iino, M. and Zeiger, E. (1986) Blue light dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319, 324–326.

Sze, H. 1985. H⁺-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annual Review Plant Physiology*, v. 36, p. 175-208.

Sze H, Xuhang L, Palmgren MG 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11:677-689.

Undurraga, S.F; Santos, M.P; Paez-Valencia J; Yang, H; Hepler, P.k; Façanha A.R; Hirschi, K.D; Gaxiola R.A. Arabidopsis sodium dependent and independent phenotypes triggered by H⁺-PPase up-regulation are SOS1 dependent. *Plant Science* 183 (2012) 96–105

Voesenek, L.A.C.J; Pierik, ;R and Sasidharan R; Plant life without ethylene. *Trends in Plant Science*, December 2015, Vol. 20, No. 12

Zhu, J-K; Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167, October 6, 2016 ^a 2016 Elsevier Inc.

CAPÍTULO 2 - Ativação do sistema primário de transporte de íons como marcador de bioatividade de fertilizantes orgânicos em mutantes hormonais de microtomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom)

Luís Alfredo dos Santos Prado^a, Daniel Basilio Zandonadi^{b,*}, Janiélio Gonçalves da Rocha^a, Sávio Bastos de Souza^a, Arnaldo Rocha Façanha^{a,*}

^aUniversidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Bioscience and Biotechnology Center, Campos dos Gotacazes, RJ – Brazil

^bUniversidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ – Brazil

*Correspondent authors: danielzandonadi@gmail.com & arnaldo.facanha@gmail.com

RESUMO

As substâncias húmicas são bioestimulantes naturais dotados de propriedades hormonais que atuam no crescimento das raízes e no desenvolvimento da planta, através da ativação dos sistemas primários de transporte de íons das células vegetais (bombas de H⁺ dos tipos P e V). Neste trabalho, o potencial de três tipos de bioestimulantes (HA - ácidos húmicos, LIQ - licor de aminoácidos e TEA – extrato aquoso de húmus), como reguladores de crescimento foi avaliado em três genótipos de microtomateiro (WT - tipo selvagem, DGT – defeutivo para auxina e Nr - insensível ao etileno) e analisados em função de suas bioatividades na biomassa vegetal em correlação com as ativações das bombas H⁺. Atividades hidrolíticas das bombas de H⁺ de raízes foram medidas *in vitro* em membranas microssomais isoladas por fracionamento celular, bem como *in vivo* medindo fluxos de íons H⁺ em células vivas, usando microeletrodos de íons seletivos vibratórios 3D (SIET). Os ácidos húmicos estimularam as atividades das bombas H⁺ de forma mais eficaz, enquanto o fertilizante LIQ foi menos efetivo e TEA exibiu uma bioatividade intermediária. Em mutantes *Never Ripe*, defeituosos na percepção de etileno, HA e TEA estimulados 4 e 6 vezes a V-PPase, respectivamente. Os ácidos húmicos inibiram os influxos de H⁺ observados na condição de controle para todos os genótipos analisados. Os resultados sugerem que a bioatividade de fertilizantes orgânicos distintos pode ser avaliada por seus

efeitos nos sistemas primários de transporte H^+ , para os quais os padrões de ativação estão sendo úteis marcadores bioquímicos do potencial agrônomo de novos bioestimulantes de plantas.

Palavras-chave: Bioestimulantes, ácidos húmicos, crescimento vegetal

1. INTRODUÇÃO

Espera-se que a demanda global de alimentos aumente 2 a 5 vezes até 2030, e para lidar com isso, existe uma crescente contaminação ambiental por fertilizantes sintéticos em nível global (Clair e Lynch, 2010). Portanto, são necessárias inovações tecnológicas e ecológicas urgentes para o desenvolvimento de uma nova geração de bioestimulantes orgânicos (Tilman et al., 2011). Já se sabe que a adubação mineral bem aplicada mantém e melhora a fertilidade do solo, aumentando o potencial de produção de culturas e o valor nutricional dos produtos agrícolas (Voisin, 1965).

Os bioestimulantes vegetais são substâncias derivadas de matéria orgânica dotadas de capacidade de modificar diferentes processos fisiológicos, melhorando o crescimento, a nutrição, a fotossíntese e as respostas ao estresse. No entanto, devido à natureza altamente diversificada dos produtos comercializados como bioestimulantes, sua validação como ferramentas amigáveis ao meio ambiente para reduzir fertilizantes inorgânicos minerais e sintéticos, sem consequências negativas sobre o potencial de produção e a qualidade da produção tem sido bastante controversa (Koleška et al., 2017) . Assim, a pesquisa sobre a bioatividade dos bioestimulantes tem sido cada vez mais desenvolvida estudando diversos produtos derivados de diferentes fontes de matéria orgânica, determinando concentrações ótimas para aumentar o crescimento e o estado metabólico das plantas (Tkalec et al., 2010; Bulgari et al., 2015). Muitos desses produtos são compostos por substâncias húmicas (HS), constituintes naturais da matéria orgânica do solo, decorrentes da decomposição de resíduos vegetais, animais e microbianos. De acordo com o seu peso molecular e solubilidade, o HS é categorizado em: huminas, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos (Koleška et al., 2017). A produção e comercialização de uma infinidade de bioestimulantes distintos visando minimizar ou até mesmo substituir os fertilizantes inorgânicos sintéticos tornou-se uma tendência global na produção agrícola (Vernieri et al., 2006). A aplicação de bioestimulantes deverá atingir US \$ 2,241 bilhões até 2018 e ter uma taxa de crescimento anual de 12,5% entre 2013 e 2018, de acordo com (Calvo et al., 2014). Apesar disso, uma miríade de bioestimulantes de plantas tem sido cada vez mais desenvolvida como alternativas ecologicamente sustentáveis aos fertilizantes químicos, melhorando a

nutrição e a resistência das plantas a vários estresses, mas sem uma validação científica em termos de bioatividade e sustentabilidade da produção (Zandonadi et al., 2016) .

O tomate é uma das culturas mais importantes na indústria de produção e processamento de alimentos em todo o mundo. Em 2014, a produção mundial de tomate foi de cerca de 170,8 milhões de toneladas, das quais mais de 30% foram produzidos na China. O Brasil ocupa o oitavo lugar na lista dos maiores produtores de tomates, com 63 mil hectares cultivados e uma produção de 3,5 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Os germoplasmas mutantes de microtomateiro (MT) têm sido cada vez mais utilizados como ferramentas importantes para pesquisas básicas sobre fisiologia vegetal, bioquímica e biologia molecular, devido às suas características bastante favoráveis: tamanho reduzido, permitindo o seu cultivo em ambientes controlados, ciclo de vida curto, relativamente compacto Genoma (950 mb), amplo levantamento de germoplasma e protocolos de transformação altamente eficientes (Carvalho et al., 2011).

Fitormônios, substâncias húmicas e outros bioestimulantes dotados de atividades hormonais induzem ativações na bomba de H^+ da membrana plasmática e vacuolares, modulando o gradiente eletroquímico H^+ através das membranas celulares da planta, provocando maiores taxas de crescimento radicular (por exemplo, Canellas et al., 2002; Facanha et al., 2002; Zandonadi et al., 2007). Essas enzimas de transporte de H^+ transmembranar desempenham um papel central na homeostase iônica e bioenergética vegetal (Facanha e de Meis, 1998; Falhof et al., 2016) e são essenciais para respostas adaptativas das células da planta aos estresses ambientais (Venancio et al . 2014). Definiu-se há anos a ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática, como evento chave do "Mecanismo de Crescimento Ácido", regulando a acidificação do apoplasto, plastificação da parede celular e crescimento polarizado (Rayle e Cleland, 1992). Embora polêmico durante décadas, este mecanismo foi recentemente reforçado com achados que revelaram uma nova classe de genes induzidos por IAA (SAUR) que promovem o crescimento da alongação celular e desempenham um papel fundamental na ativação da P-ATPase (Gray et al., 2017). Anteriormente, descobriu que o mesmo mecanismo poderia ser ativado por moléculas

semelhantes a auxinas apresentadas em ácidos húmicos (Canellas et al., 2002; Facanha et al., 2002; Zandonadi et al., 2007 e 2010).

Auxinas e etileno são amplamente descritos como interagindo na sinalização de processos fisiológicos chave, incluindo crescimento de raízes, maturação de frutos e várias respostas a estresses bióticos e abióticos. Os mutantes com síntese diferencial ou percepção destes hormônios provaram ser úteis para avaliar as respostas de plantas hormonais em várias condições fisiológicas e de estresse (Carvalho et al., 2011). Neste trabalho, foram avaliadas possíveis correlações entre a regulação das atividades das bombas H⁺ por três biofertilizantes orgânicos e suas capacidades para melhorar o crescimento e a produção da planta de forma sustentável em três genótipos MT: o tipo selvagem (WT), um defeutivo para auxina (DGT) e outro insensível ao etileno (*Never Ripe* Nr).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

No presente trabalho foram utilizados 3 genótipos de microtomateiros: Selvagem, (WT) como controle, (DGT) defeutivo para auxina e *Never-Ripe* (Nr) que é insensível ao etileno. As sementes foram cedidas gentilmente pelo professor Lazaro Pérez – Esalq-USP. As sementes foram germinadas em substrato Basaplant® em copos plásticos de 500 ml em câmara controlada sob as condições 23° C, fotoperíodo de 16hluz/8h escuro, suplementado com solução de Hoagland ½ força. Para os experimentos *in vitro*, as plantas foram cultivadas durante 40 dias com ou sem os três bioestimulantes testados e posteriormente foi feito isolamento das membranas das raízes. Para medições de fluxos de H⁺ *in vivo*, as sementes foram germinadas em placas de Petri embebidas em meio de MS ½ e, após 4 dias de germinação, cada bioestimulante foi aplicado à solução 30 minutos antes da aquisição dos dados. A massa seca das plantas foi avaliada pesando 3,0 g de raízes frescas e secou-a a 45 °C por 96 h (n = 6). O comprimento total da raiz foi determinado usando uma régua graduada (n = 6).

2.2 Composição dos bioestimulantes

Neste trabalho, testamos três bioestimulantes de diferentes origens: Ácidos húmicos (HA) isolados do composto de minhoca; Húmus extraído aquoso (TEA), que é um extrato de húmus de minhoca diluído em uma proporção 1:10 de húmus / água; e o licor de aminoácidos (LIQ - 0,889% de alanina, 0,145% de arginina, 1,484% de ácido aspártico, 2,533% de ácido glutâmico, 0,155% de glicina, 0,111% de isoleucina, 0,205% de leucina, 0,144% de lisina, 0,109% de fenilalanina, 0,137% de serina, 0,144 % De treonina, 0,175% de triptofano, 0,086% de tirosina, 0,220% de valina).

2.3 Atividades das bombas de H⁺

As vesículas de tonoplasto e de membrana plasmática foram isoladas de raízes através de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas alterações.

As amostras coletadas dos diferentes tratamentos foram homogeneizadas em meio de extração tamponado gelado, usando graal e pistilo. O tampão de extração é composto de 250 mM de sacarose, 10% de glicerol (p/v), 100 mM de KCl, 5 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e 100mM de tampão Tris [tris-(hidroximetil) aminometano]-HCl, pH 8,0.

O homogenato resultante foi submetido à centrifugação a 1500 x g, durante quinze minutos para remoção de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 8.000 x g, por quinze minutos para remoção da fração mitocondrial. Em seguida o sobrenadante coletado foi centrifugado a 100.000 x g, por trinta minutos. O precipitado dessa centrifugação foi ressuspenso em meio de ressusensão contendo tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,6), glicerol 10 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM, e EDTA 5 mM.

A fração microssomal, obtida por fracionamento celular de tecidos vegetais, é constituída principalmente por vesículas de membranas oriundas da plasmalema e do tonoplasto, e as principais enzimas responsáveis pela catálise

da hidrólise de ATP são as H⁺-ATPases do tipo P e V presentes nestas membranas (Sze, 1985).

As soluções-estoque utilizadas na preparação foram mantidas em geladeira. Imediatamente antes do uso, foram adicionados, 5 mM de DTT (ditiotreitól), 0,5% de PVPP (polivinilpírolidona), 0,3% de BSA (Albumina Sérica Bovina) (p/v), 2 mM de PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil), 1mM de Benzamidina, 2% de ácido ascórbico, tendo uma relação peso do tecido/volume de tampão de 1:2. Os procedimentos foram executados à temperatura de 4^o C, e o pH do tampão de extração foi monitorado e mantido na faixa de 7,5-8,0.

2.4 Fluxos de H⁺

O fluxo extracelular de prótons foi medido ao redor das raízes de microtomateiros usando uma microssonda vibrátil seletiva ao próton (Kühtreiber e Jaffe, 1990; Kochian et al., 1992; Feijó ET al., 1999; Vissenberg et al., 2001). Eletrodos foram produzidos de microcapilares de borossilicato 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). Posteriormente, os microeletrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1 L) e secos em estufa a 250^o C por 3 horas. Após este período, realizou-se a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina (C₅H₁₅NSi, Fluka 41716), ainda na estufa por 20 minutos e deixados para secar por mais 3 horas, na mesma temperatura. Após a vaporização com silano (C₅H₁₅NSi), os microeletrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (100 mM para Cl⁻; 15 mM KCl e 40 mM KH₂PO₄ para o H⁺), correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, foram preenchidos na ponta, com uma coluna de 20 a 25 hm 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 microeletrodo, 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. Sinais foram

medidos pelo amplificador (www.applicableelectronics.com), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo obtidos através de motores posicionais (stepper-motors), os quais permitem um 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 realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon em estudo, com concentração conhecida: 0,1 mM, 1 mM e 10 mM; dado que as concentrações abrangem as condições dos meios utilizados.

A coleta dos dados da microsonda vibrátil seletiva, realizada pelo software ASET, fornece 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 (10 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.

Os fluxos de íons H⁺ foram registrados na zona de alongamento da raiz de cada genótipo MT. A aquisição de dados foi interrompida e as plantas incubadas em diferentes substâncias de regulação do crescimento durante 30 min, e então, os fluxos de H⁺ foram medidos durante 10 minutos no mesmo ponto pré-selecionado da zona de alongamento das raízes. As mudanças químicas de fundo foram medidas de 300 a 500 µM longe da superfície da raiz e subtraídas dos valores obtidos nas medições das células da raiz.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos dos bioestimulantes sobre a massa seca e comprimento das raízes em MT

Para avaliar a resposta do crescimento da planta aos três tratamentos de bioestimulantes, o conteúdo de massa seca e o comprimento da raiz foram

analisados nos três genótipos de MT (Tabela I). Os três bioestimulantes induziram aumentos na biomassa da raiz em comparação com as plantas de WT cultivadas em meio de controle. Em contraste, as plantas DGT, defeituosas na sinalização de auxina, foram muito menos afetadas, enquanto ocorreu alguma estimulação no caso do mutante Nr insensível ao etileno, mas bastante inferior ao das plantas WT.

	WT	DGT	NR
Tratamentos	Massa seca (g)		
Controle	1,15 ± 0,07Ab	1,09 ± 0,04Aa	1,16 ± 0,05Aa
ÁH	1,40 ± 0,09Aa	1,11 ± 0,07Ba	1,32 ± 0,05ABa
TEA	1,44 ± 0,09Aab	1,03 ± 0,09Ba	1,28 ± 0,09ABa
Liquor	1,40 ± 0,03ab	1,12 ± 0,06Aa	1,24 ± 0,07Aa

Tabela I. Massa seca de germoplasmas MT. Os valores são médias ± SE das medidas realizadas em plantas derivadas de seis experimentos independentes. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os três tratamentos também aumentaram o comprimento da raiz no genótipo WT, um efeito que não foi observado no genótipo DGT. Por outro lado, para as plantas de NR, sem insensibilidade ao etileno, apenas o TEA foi incapaz de estimular o comprimento da raiz.

	WT	DGT	NR
Tratamentos	Comprimento total das raízes (cm)		
Controle	15,27 ± 0,04Ab	14,63 ± 0,07Aa	15,46 ± 0,04Aa
AH	17,38 ± 0,04Aab	14,44 ± 0,05Aa	17,51 ± 0,02Aa
TEA	19,34 ± 0,06Aa	15,35 ± 0,06Ba	15,87 ± 0,03Ba
Liquor	18,21 ± 0,03Aab	15,47 ± 0,01Ba	17,41 ± 0,06Aba

Tabela II. Comprimento da raiz dos germoplasmas MT. Os valores são médias ± SE das medidas realizadas em plantas derivadas de seis experimentos independentes. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Efeitos dos bioestimulantes sobre atividade hidrolítica das bombas de H⁺

Os efeitos dos biofertilizantes (Ácidos úmidos - HA, Água extraída aquosa - TEA e Aminoácido - LIQ) sobre as atividades hidrolíticas das bombas H⁺ também foram analisados nos três genótipos MT (WT - tipo selvagem, DGT - insensível à auxina e Nr - insensível a etileno). As plantas de cinco dias de idade foram cultivadas em meio de MS 0,5 M e, em seguida, os fertilizantes foram adicionados 30 min antes das leituras. No genótipo WT, a adição de ácidos húmicos aumentou a atividade de H⁺-ATPase de tipo P em 67% em comparação com o controle, enquanto os outros tratamentos apenas afetaram ligeiramente essa atividade (≤ 20%). Nas plantas DGT, observou-se uma diminuição significativa do efeito HA na atividade da P-ATPase (~ 19%). Plantas insensíveis ao etileno (Nr), exibiram uma

atividade de P-ATPase semelhante ao WT, que estava aumentando apenas 30% pelo HA e bastante reduzida sobre os outros tratamentos.

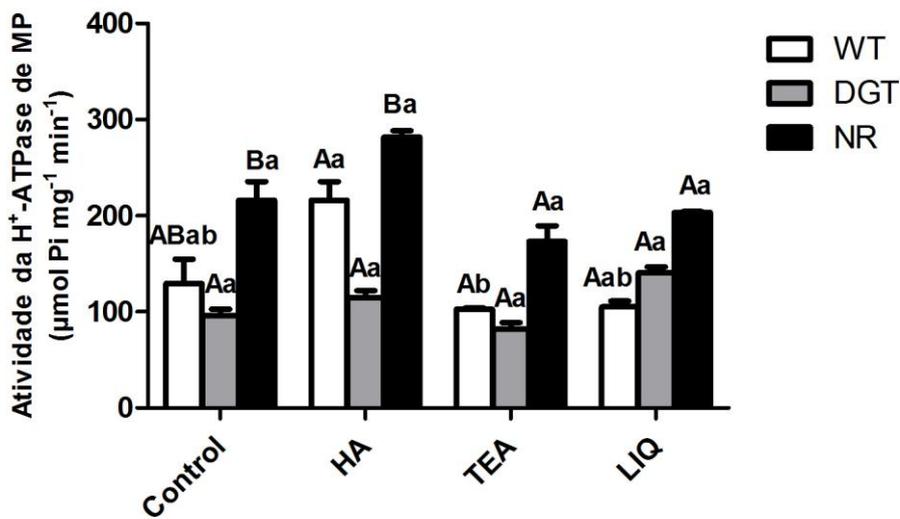


Figura 1. Efeitos dos bioestimulantes sobre a atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática. Controle; Ácidos húmicos (HA); Húmus extraído aquoso (TEA) e licor de aminoácido (LIQ). A reacção foi iniciada pela adição de ATP 1 mM a pH 7,0 e parou após 30 min. A 25 ° por adição de 5% de TCA. Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

A V-ATPase não apresentou alterações significativas em resposta aos três biofertilizantes analisados para o genótipo WT. No caso do mutante Nr, verificou-se algum aumento relevante como função de HA e TEA (37% e 43%), respectivamente, enquanto ocorreu uma ligeira diminuição nas plantas DGT nos mesmos tratamentos (Figura 2).

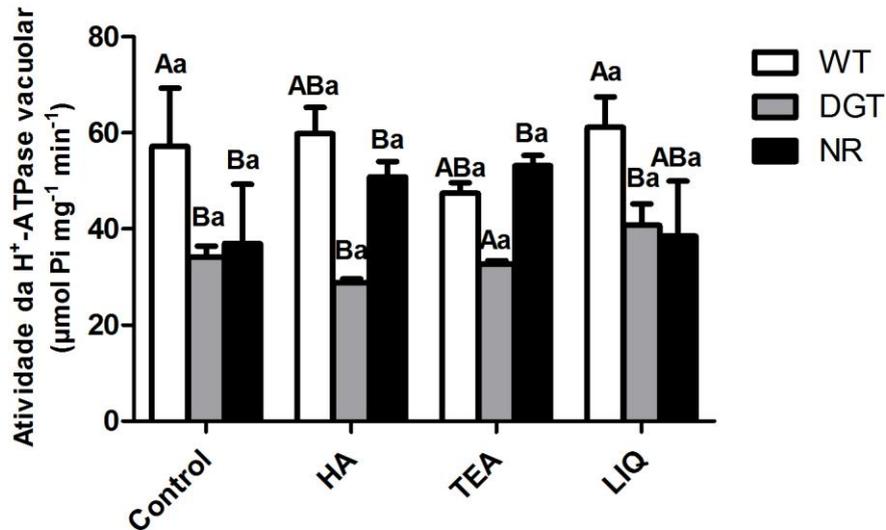


Figura 2. Efeitos dos bioestimulantes na atividade da H⁺-ATPase vacuolar. Controle; Ácidos húmicos (HA); Húmus extraído aquoso (TEA) e licor de aminoácido (LIQ). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM a pH 7,0 e parou após 30 min. A 25 ° por adição de 5% de TCA. Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Para a V-PPase, todos os biofertilizantes causaram redução de atividade no genótipo de tipo selvagem (HA 18%, TEA 59% e LIQ 46%). No genótipo insensível às auxinas, embora observe uma redução no tratamento com HA, um aumento ocorreu em função dos outros tratamentos com TEA e LIQ, 34% e 72%, respectivamente. No genótipo insensível ao etileno, observaram-se os aumentos mais significativos na atividade hidrolítica, sendo 400% para HA e 540% para

TEA. O LIQ reduziu suas atividades em 22%.

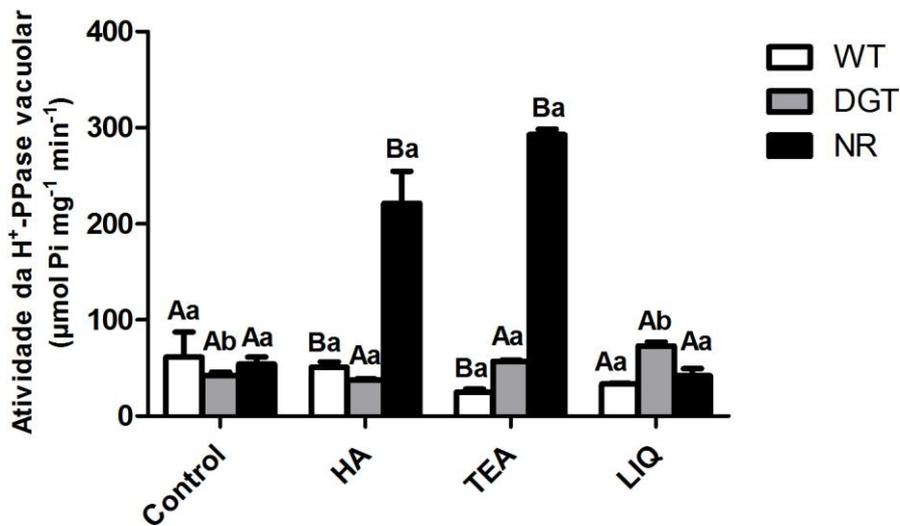


Figura 3. Efeitos dos bioestimulantes na atividade da H⁺ PPase. Controle; Ácidos húmicos (HA); Húmus extraído aquoso (TEA) e licor de aminoácido (LIQ). A reação foi iniciada pela adição de PPI 1 mM a pH 7,0 e parou após 30 min. A 25 ° por adição de 5% de TCA. Letras maiúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento. Letras minúsculas no topo das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos para um mesmo genótipo. Ambos de acordo com o teste de Tukey (P < 0.05). Valores representam médias com desvio padrão de 3 experimentos independentes.

3.3 Fluxo de H⁺ rizosférico

As raízes MT monitoradas no meio de controle mostram um influxo H⁺ para os 3 genótipos analisados. No genótipo do tipo selvagem, HA converte o influxo H⁺ no efluxo, mas essa reversão não ocorre no genótipo DGT insensível à auxina. Uma reversão de fluxo de H⁺ semelhante também ocorre em raízes NR, embora em menor grau. As plantas tratadas com TEA exibiram também um efluxo de H⁺ e, como observado para HA, o tratamento com TEA não alterou o influxo no genótipo DGT e para o genótipo insensível ao etileno. Os tratamentos de licor (cocktail de aminoácidos) afetaram os fluxos de H⁺ rizosféricos de forma muito similar ao TEA. O influxo inicial foi revertido em WT, mas não na DGT. O efluxo H⁺ em NR foi altamente estimulado pelo tratamento também.

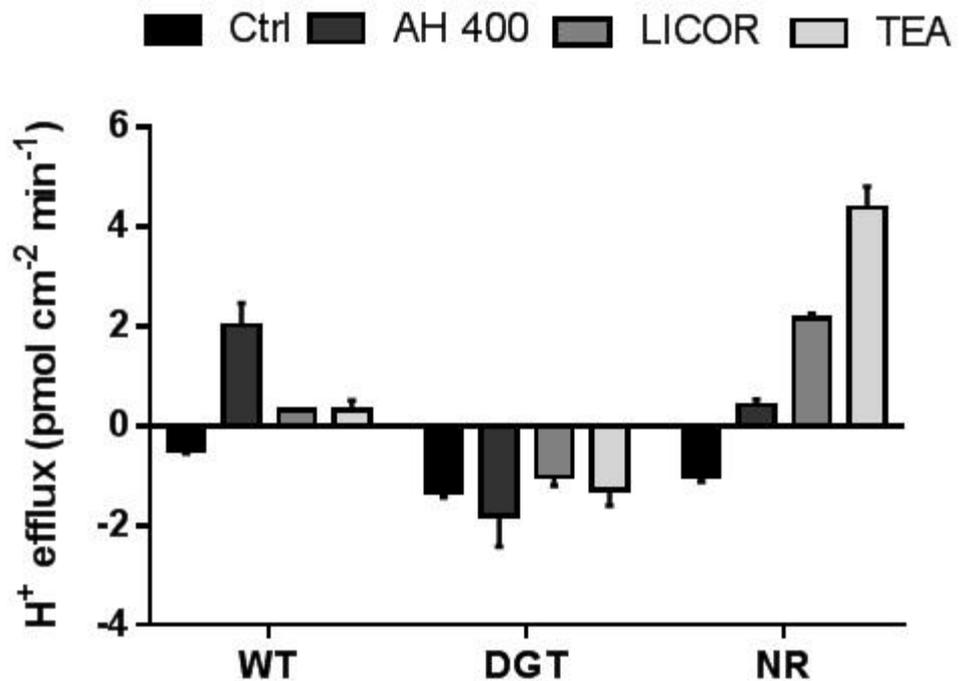


Figura 4. Efeitos dos bioestimulantes no fluxo H⁺ das raízes da MT. Valores médios de efluxos de H⁺ em três genótipos diferentes de MT. Roots germinou e cresceu em meio MS (½ força). As medições foram realizadas 30 minutos após a

adição do bioestimulante respectivo ao meio. As barras representam o desvio padrão médio em um intervalo de confiança de 95%.

3.4 Análise multivariada

A análise multivariada demonstrou que, nas plantas WT e NR tratadas com ácido húmico, o crescimento da raiz, a atividade da ATPase do tipo P e o efluxo H^+ estão altamente correlacionados (Fig. 5A e 7A), mas esses parâmetros não apresentam correlação com o ácido húmico no mutante DGT (Fig. 6 A, C). O licor de aminoácidos não apresentou correlação entre os parâmetros analisados em WT e NR, mas uma alta correlação entre esses parâmetros na DGT (Fig. 6B). Os tratamentos de TEA não apresentaram correlação relevante entre nenhum dos parâmetros nos diferentes genótipos.

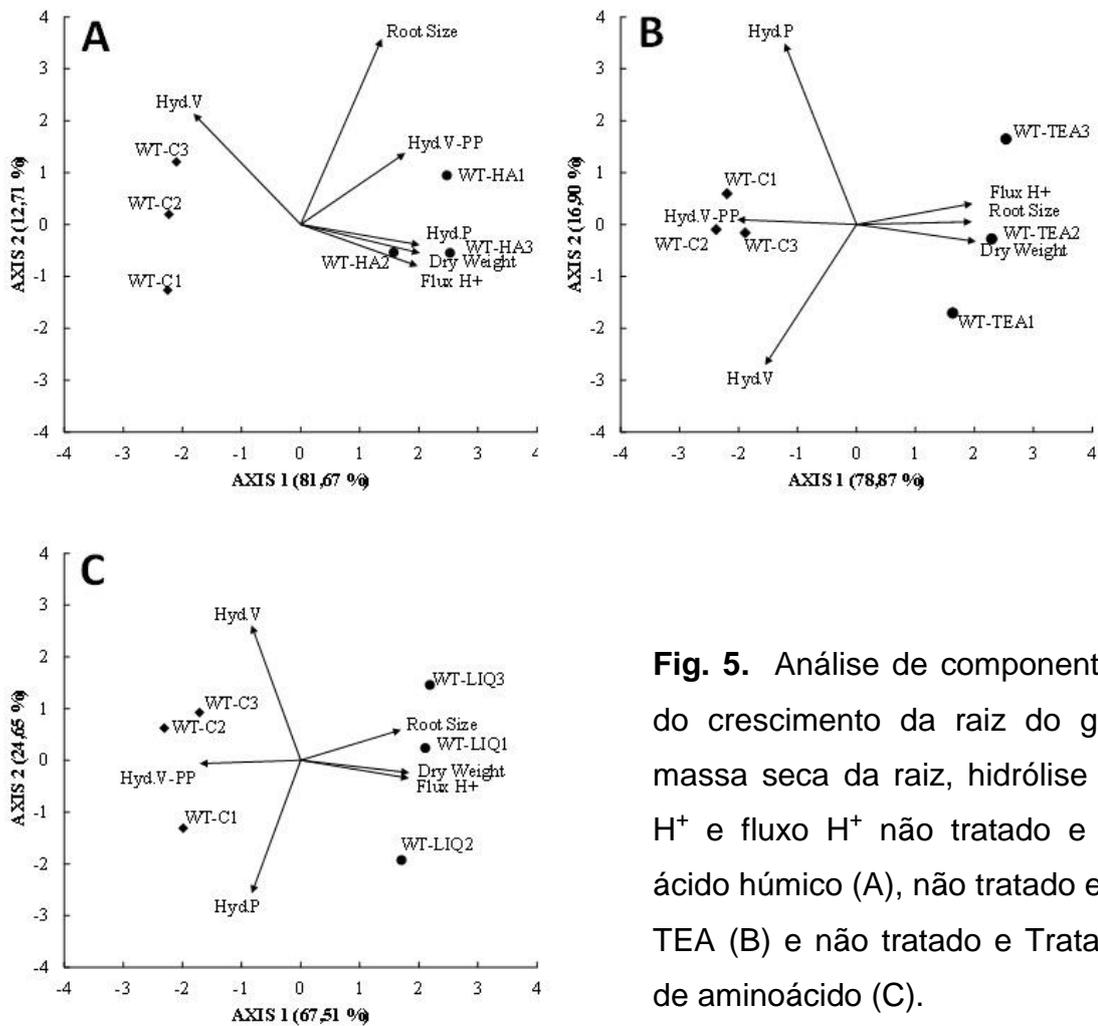


Fig. 5. Análise de componentes principais do crescimento da raiz do genótipo WT, massa seca da raiz, hidrólise das bombas H^+ e fluxo H^+ não tratado e tratado com ácido húmico (A), não tratado e tratado com TEA (B) e não tratado e Tratado com licor de aminoácido (C).

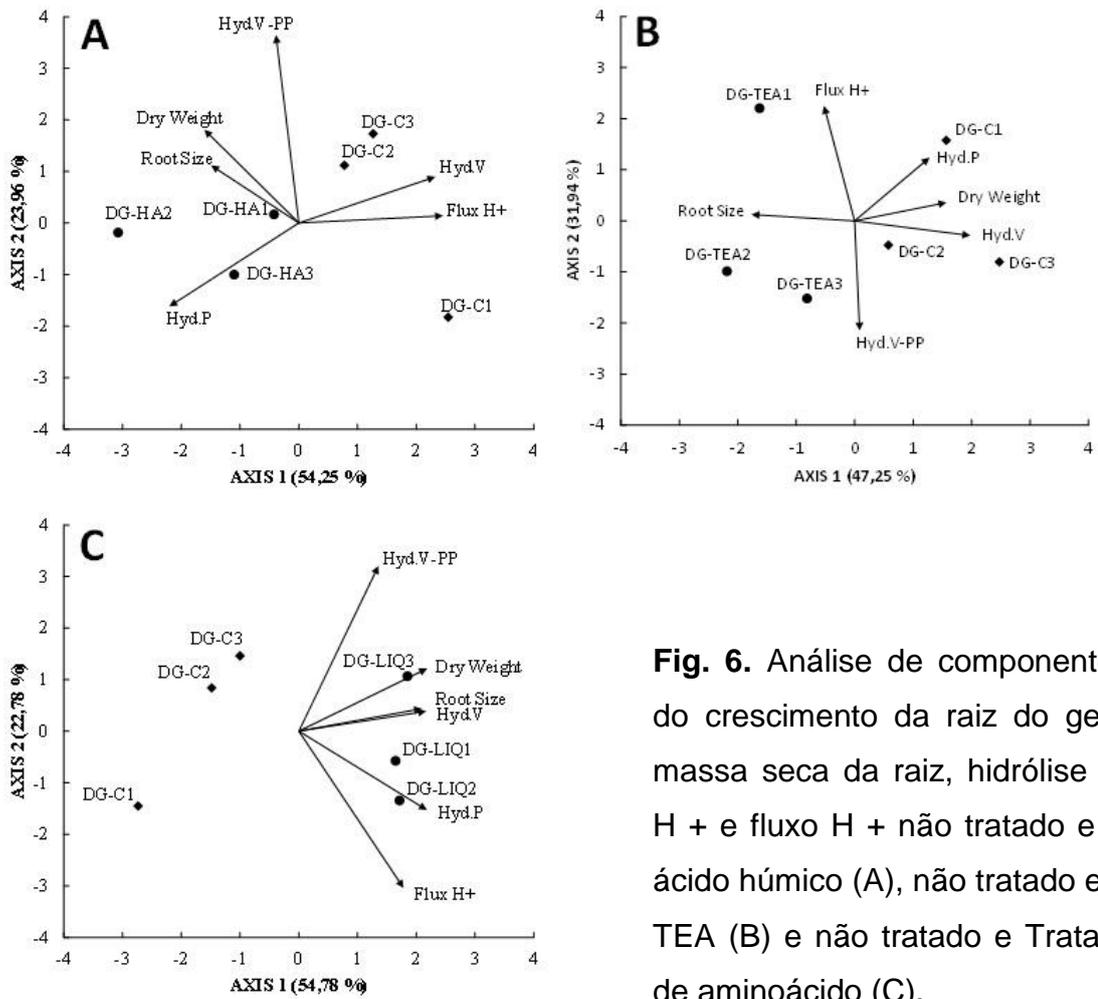


Fig. 6. Análise de componentes principais do crescimento da raiz do genótipo DGT, massa seca da raiz, hidrólise das bombas H + e fluxo H + não tratado e tratado com ácido húmico (A), não tratado e tratado com TEA (B) e não tratado e Tratado com licor de aminoácido (C).

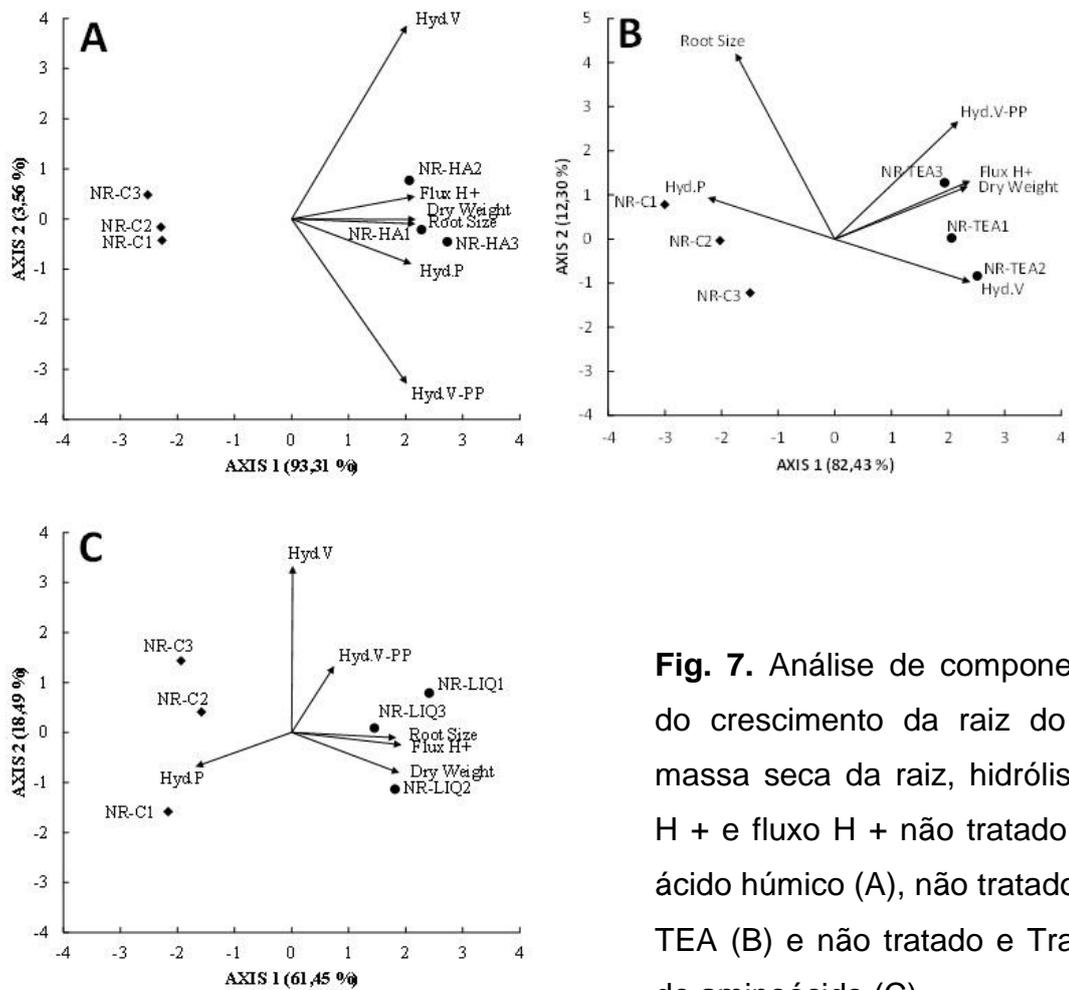


Fig. 7. Análise de componentes principais do crescimento da raiz do genótipo NR, massa seca da raiz, hidrólise das bombas H + e fluxo H + não tratado e tratado com ácido húmico (A), não tratado e tratado com TEA (B) e não tratado e Tratado com licor de aminoácido (C).

4. DISCUSSÃO

A análise da dinâmica de acidificação da rizosfera tem sido postulada como uma forma efetiva de caracterizar a bioatividade de diversos bioestimulantes no crescimento e desenvolvimento das raízes (Zandonadi et al., 2016). Neste trabalho, esta abordagem foi explorada através do estudo da eficácia de três bioestimulantes, utilizando a atividade das bombas H^+ e os fluxos H^+ da membrana celular como potenciais marcadores de bioatividade. O ácido auxina indole-3-acético (IAA) revelou-se que induziu a ativação da H^+ -ATPase de membrana plasmática, como um evento chave do mecanismo de crescimento ácido, responsável pela acidificação do apoplasto, plastificação da parede celular e crescimento polarizado (Rayle e Cleland, 1992).

As Tabelas 1 e 2 mostram que os três bioestimulantes testados provaram ser capazes de aumentar a massa seca e o comprimento da raiz nas plantas de MT, mas não no genótipo de auxina e insensível DGT. O mesmo efeito foi observado no parâmetro total, devido ao papel principal da sinalização de auxina, deixando clara a importância do desenvolvimento da raiz da planta. Os ácidos húmicos aumentaram o crescimento radicular das mudas de milho (*Zea mays* L.) em conjunto com uma marcada proliferação de locais de emergência de raízes laterais. Eles também estimulam a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática, aparentemente associada à capacidade de promover a expressão desta enzima (Canellas et al., 2002). De acordo com isso, no genótipo de auxina com defeito DGT, os ácidos húmicos apenas modificaram a atividade P-ATPase apenas em comparação com a ativação clara observada em WT (Figura 1). Por outro lado, as plantas insensíveis ao etileno apresentaram perfil semelhante ao controle. Além disso, observou-se que a interrupção da sinalização de auxina (mutação DGT) também causa insensibilidade ao ácido húmico, o que está em linha com a ação semelhante à auxina das substâncias húmicas em bombas H^+ , observadas anteriormente por (Canellas et al., 2002 Façanha et al., 2002). O licor de aminoácidos (LIQ) mostrou potencial de ativação da P-ATPase no genótipo DGT, sugerindo que na composição química deste composto pode haver algum ativador desta enzima, sinalização de auxina independente. Para a atividade de V-ATPase, nenhuma alteração significativa foi observada causada pelos

biofertilizantes, nem no genótipo WT nem nos hormônios mutantes defeituosos (Figura 2). Por outro lado, o V-PPase foi altamente sensível aos biofertilizantes, o que reduziu a atividade desta enzima no genótipo selvagem. Curiosamente, o TEA e o LIQ estimularam a atividade da pirofosfatase nos microssomas da DGT, bem como nos genótipos Nr, mas no último, o efeito estimulador de ambos os fertilizantes foi muito maior (Figura 3). Parece provável que, de certa forma, o etileno possa suprimir o efeito desses biofertilizantes na atividade V-PPase. A bioatividade destas substâncias na regulação das bombas vacuolares H^+ está de acordo com a sensibilidade hormonal dessas enzimas observadas por Fukuda et al. (2006), que observaram que uma auxina sintética (2,4-D) aumenta a expressão de um gene da H^+ -PPase vacuolar (HVP1) e as atividades de translocação de prótons por H^+ -PPase e H^+ -ATPase em vesículas de tonoplasto em cevada. Esses efeitos hormonais também estão em consonância com a noção de que subsídios húmicos e auxinas podem conduzir uma ativação concertada das bombas de íons na plasmalema e no tonoplasto para uma coordenação do turgor vacuolar com a plastificação da parede celular durante o crescimento das células vegetais (Zandonadi et al., 2007). Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com a noção de que SH's podem indiretamente aumentar a importação de nutrientes através da estimulação de H^+ -ATPases de membrana plasmática (Jindo et al., 2012), que convertem a energia livre liberada pela hidrólise de ATP em um potencial eletroquímico transmembranar (Figura 4).

A análise estatística demonstra uma forte correlação entre o crescimento radicular, a hidrólise de ATPase de tipo P, a exsudação de H^+ e a sinalização de auxina em plantas de MT, uma vez que os efeitos do ácido húmico observados sobre esses parâmetros nos genótipos de WT e NR não foram observados na região auxiliar do Genótipo DGT (Fig. 5 A, C). Curiosamente, o tratamento do licor está positivamente correlacionado com esses parâmetros precisamente no genótipo DGT (Fig. 5B). A presença de triptofano na composição do licor pode ter desencadeado o passo de transaminação na desossíntese de auxina e, portanto, ignorando a mutação defeituosa de auxina no genótipo DGT. Novas investigações sobre os efeitos do licor são necessárias devido à sua composição complexa,

afinal, é uma mistura de aminoácidos que podem participar em várias cascatas de sinalização.

Em conjunto, esses dados sugerem que a bioatividade desses biofertilizantes no crescimento das raízes está intimamente relacionada à ativação diferencial das bombas de H^+ das membranas celulares. Estes dados, juntamente com os estudos anteriores (por exemplo, Facanha et al., 2002; Zandonadi et al., 2016), forneceram provas acumuladas para a relação entre os padrões de ativação das bombas de H^+ e o potencial agronômico de fertilizantes orgânicos bioativos.

5. REFFERÊNCIAS

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 243-254.

Bulgari R, Cocetta G, Trivellini A, Vernieri P, Ferrante A. 2015. Biostimulants and crop responses: a review. *Biol Agric Hortic*. 31:1–17.

Canellas et al. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, December 2002, vol. 130, pp. 1951-1957.

Calvo P.; Nelson L.; Kloepper J.W. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*. 383:3–41

Carvalho et al. 2011. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*. 7: 18

Clair, S.B.; Lynch, J.P.; 2010. The opening of Pandora's Box: climate change impactson soil fertility and crop nutrition in developing countries. *Plant Soil*. 335:101-115.

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.

Façanha, A.R.; Façanha, A.L.O.; Olivares, F.L.; Guridi, F.; Santos, G.D.A.; Velloso, A.C.X.; Rumjanek, V.M.; Brasil, F.; Schripsema, J.; Braz-Filho, R.; Oliveira, M.A.; Canellas, L.P. 2002. Humic acids bioactivity: effects on root

development and on the plasma membrane proton pump. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37: 1301-1310.

Falhof J.; Pedersen J.T.; Fuglsang A.T.; and Palmgren M. (2016). Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*. 9: 323-337.

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 growth dependent acidic tip. *Journal of Cell Biology*. 144: 483-496.

Fiske C.F.; Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*. 66: 375.

Fukuda A.; Tanaka Y. 2006. Effects of ABA, auxin, and gibberellin on the expression of genes for vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 351-358

Gray W.M.; Spartz A.K.; Lor V.S.; Ren H.; Olszewski N.E.; Miller N.D.; Wu G.; Spalding E.P.; Constitutive Expression of Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA19 (SAUR19) in Tomato Confers Auxin-Independent Hypocotyl Elongation. *Plant Physiology*, February 2017, Vol. 173, pp. 1453–1462.

Giannini J.L.; Briskin D.P. 1987. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*. 84: 613

Jindo K.; Martim S.A.; Navarro E.C.; Pérez-Alfocea F.; Hernandez T.; Garcia C.; Aguiar N.O.; Canellas L.P.; 2012. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*. 353:209–220

Kochian L.V.; Shaff J.E.; Kühnreiber WM, Jaffe LF (1992) Use of an extracellular, ion selective vibrating microelectrodes system for the quantification of K⁺, H⁺ and Ca²⁺ fluxes in maize suspension cells. *Planta* 188: 601-610.

Koleška I.; Hasanagić D.; Todorović V.; Murtić S.; Klokić I.; Parađiković N.; Kukavica B. (2017) Biostimulant prevents yield loss and reduces oxidative damage in tomato plants grown on reduced NPK nutrition. *Journal of Plant Interactions*, 12:1, 209-218, DOI: 10.1080/17429145.2017.1319503

Kühnreiber W.M.; Jaffe L.F.; (1990) Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *Journal of Cell Biology* 110: 1565-1573.

Rayle D.L.; Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.

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* 181: 448-462. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02344.x

Ramos A.C.; Façanha A.R.; Feijó J.A. 2008. Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178: 177-188. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02344.x

Rea P.A.; Kim Y.; Sarafian V.; Poole R.J.; Davies J.M.; Sanders D. 1992. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends in Biochemical Sciences* 17:353.

Sze, H. 1985. H⁺-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annual Review Plant Physiology*, v. 36, p. 175-208.

Tilman, D.; Balzer, C.; Hill, J.; Belfort, B.L. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S A. 108,20260–20264.

Tkalec M, Vinković T, Baličević R, Parađiković N. 2010. Influence of biostimulants on growth and development of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Agric Serb.* 29:83–88

Vernieri P.; Borghesi E.; Tognoni F.; Serra G.; Ferrante A.; Piagessi A. 2006. Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floating system. *Acta Hortic.* 718:477–484.

Voisin A. (1965) Fertilizer application: Soil, plant, animal. London: Crosby Lockwood.

Vissenberg K.; Feijó J.A.; Weisenseel M.H.; Verbelen J.P. (2001) Polar fluxes during the induction of elongation in *Nicotiana tabacum* cells. *Journal of Experimental Botany* 52: 2161-2167.

Zandonadi, D.B.; Canellas, L.P.; Façanha A.R. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺-pumps activation. *Planta* 225:1583-1595.

Zandonadi, D. B; Santos, M. P.; Caixeta, L. S.; Marinho, E. B.; Peres, L. E. P.; Façanha, A. R. (2016) Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Scientia Agricola.* v.73, n.1, p.24-28,