

RICARDO PIRES RIBEIRO

**AÇÃO DO pH DO SOLO NO METABOLISMO DO ETILENO ASSOCIADA A
EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE *Stylosanthes***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R484a
2016
Ribeiro, Ricardo Pires, 1991-
Ação do pH do solo no metabolismo do etileno associada a
emergência de plântulas de *Stylosanthes* / Ricardo Pires Ribeiro.
– Viçosa, MG, 2016.
v, 46f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.32-39.

1. *Stylosanthes humilis*. 2. *Stylosanthes guianensis*. 3.
Solos ácidos. 4. Etileno - Metabolismo. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 583.74

RICARDO PIRES RIBEIRO

**AÇÃO DO pH DO SOLO NO METABOLISMO DO ETILENO ASSOCIADA A
EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS DE *Stylosanthes***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal para a
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

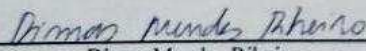
APROVADA: 21 de JULHO DE 2016



Agustin Zsögon



Flávio Barcellos Cardoso



Dimas Mendes Ribeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos proporcionadas a mim.

Aos meus pais, Elisson José Ribeiro e Luzelene Pires de Deus Ribeiro, pelo carinho, incentivo e dedicação.

A minha irmã, demais familiares e amigos, pelo apoio nas horas difíceis.

Ao Prof. Dimas Mendes Ribeiro, pelos conhecimentos compartilhados.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo e à Universidade Federal de Viçosa, que proporcionou os meios para a realização do curso de mestrado.

A todos que colaboraram

Meus agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1 Material vegetal e condição de cultivo	4
2.2 Condução dos experimentos	4
2.3 Efeito do pH na emergência das plântulas	5
2.4 Quantificação do etileno	6
2.5 Quantificação do ACC	6
2.6 Atividade da oxidase do ACC	7
2.7 Quantificação de metabólitos	8
2.8 Perfil metabólico	10
2.9 Experimento em solo	10
2.10 Características anatômicas	12
2.11 Análise estatística	12
3 RESULTADOS	13
4 DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÕES	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
MATERIAL SUPLEMENTAR	40

RESUMO

RIBEIRO, Ricardo Pires, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2016. **Ação do pH do solo no metabolismo do etileno associada a emergência de plântulas de *Stylosanthes***. Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

A emergência das plântulas de *S. humilis* foi aumentada em resposta a redução do pH do meio de incubação, o qual, manteve uma estreita relação com a alta produção de etileno pelas plântulas. Ademais, solução-tampão de pH 4,0 estimulou significativamente a atividade da oxidase do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACO) bem como os níveis do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) livre e total tanto na radícula e no hipocótilo das plântulas. Juntos esses resultados sugerem que a emergência das plântulas tenha ocorrido via produção do regulador gasoso. A emergência das plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* foi também aumentada em solos de baixos pH(s). O estímulo ao estabelecimento das plântulas relacionou-se com a produção de etileno. A elevação do pH do solo de 3,9 para 6,4, promovida por CaCO_3 , reduziu significativamente a emergência das plântulas bem como a produção de etileno. Esses resultados sugerem que o baixo pH do solo desempenha um papel ecológico fundamental na distribuição das espécies de *Stylosanthes*. Interessantemente, os níveis dos ácidos orgânicos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico foi significativamente aumentado nas raízes das plântulas sob tratamento com CaCO_3 . Ademais, um maior nível glicose, frutose e sacarose ocorreu na raiz das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 (pH 6,4). Assim, as altas concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos das plântulas mantidas em solo tratado com CaCO_3 sinalizou para um aumento no alongamento da radícula e do hipocótilo, mas reduziu a emergência das plântulas. Neste contexto, os elevados níveis de carbono podem estar associados com uma grave perturbação ecológica, devido à redução no estabelecimento das plântulas de *Stylosanthes*.

ABSTRACT

RIBEIRO, Ricardo Pires, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Action of soil pH on ethylene metabolism associated with seedlings emergence of *Stylosanthes*.** Adviser: Dimas Mendes Ribeiro.

The seedling emergence of *S. humilis* was increased in response to reduction of the pH of incubation medium, which maintained a close relationship with the high production of ethylene by seedlings. Furthermore, buffer solution of pH 4.0 significantly stimulated the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) as well as the levels of free 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and total ACC both radicle and hypocotyl of seedlings. Together these results suggest that seedling emergence occurred via production of the gas regulator. The seedling emergence of *S. humilis* and *S. guianensis* was also increased in low pH(s) soils. The stimulus to establishment of seedlings was related to the production of ethylene. The increased soil pH of 3.9 to 6.4, promoted by CaCO_3 significantly reduced seedling emergence and ethylene production. These results suggest that low soil pH plays a key ecological role on distribution of *Stylosanthes* species. Interestingly, the levels of organic acids intermediate of tricarboxylic acid cycle was significantly increased in roots of seedlings under treatment with CaCO_3 . Moreover, a higher level of glucose, fructose and sucrose occurred in the roots of seedlings grown in soil treated with CaCO_3 (pH 6.4). Thus, high concentrations of carbohydrates and organic acids of seedlings kept in soil treated with CaCO_3 signaled an increase in elongation of the radicle and hypocotyl, but reduced seedling emergence. In this context, high carbon levels may be associated with a serious ecological disturbance due to a reduction in the establishment of *Stylosantes* seedlings.

1 INTRODUÇÃO

Os solos podem atuar como agentes de seleção natural, influenciando a adaptação local dentro das espécies de plantas (Sambatti e Rice 2006, Pregitzer et al 2010, Smith et al 2012). Por exemplo, as populações de plantas podem tornar-se localmente adaptadas a propriedades extremas do solo, tais como elevados níveis de metais pesados e a baixa disponibilidade de nutrientes (Ellis e Weis 2006, John et al 2007, Viani et al 2011). Em geral, os solos das regiões tropicais são de baixa fertilidade, bem como bastante ácidos (Kricher 2011). Neste contexto, os baixos pH(s) dos solos poderiam desempenhar um papel ecológico natural na distribuição de espécies vegetais. *Stylosanthes*, um gênero de leguminosa forrageira tropical, é conhecido por apresentar boa persistência e produtividade em solos de baixa fertilidade (Costa 2006, Sun et al 2014). *S. humilis* e *S. guianensis* se destacam como importantes espécies na formação de pastagens (Mott e McKeon 1979), apresentando ampla distribuição nas regiões central e nordeste do Brasil. O estado de Minas Gerais constitui um dos centros de dispersão do gênero (Lovato et al 1994), desenvolvendo-se em áreas com diferentes tipos de solo, incluindo os extremamente ácidos (Williams et al 1984, Du et al 2009). Em condições acídicas, as estratégias de crescimento das plântulas podem contribuir significativamente para sua sobrevivência, pois estas constituem uma das formas de suas populações serem mantidas em condição natural. Assim, a questão central é: quais os mecanismos que determinam a adaptação das plântulas de *Stylosanthes* às condições acidas?

O etileno parece ser um fator essencial para o sucesso da emergência das plântulas contra a impedância mecânica do solo (Zhong et al 2014). Shi et al (2016) demonstraram que CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) e o etileno foram necessários para as plântulas responderem aos efeitos do escuro e ao estresse mecânico

imposto pelo solo. Além disso, o etileno pode também controlar a penetração das raízes no solo pela interação com a via de sinalização das auxinas (Santisree et al 2011). Em conjunto, estes resultados mostram uma flexibilidade excepcional do etileno na modulação da emergência das plântulas em solo. Em alguns sistemas biológicos, fatores de estresse tais como solução ácida e metais pesados podem induzir a biossíntese de etileno (Ribeiro et al 2011, Keunen et al 2016). Soluções de baixo(s) pH(s) têm-se mostrado eficazes em promover a germinação das sementes de *Stylosanthes*, via indução da biossíntese de etileno (Pelacani et al 2005 a, b). Ademais, *Stylosanthes* ocorre em solos ácidos (pH 3,5-4,5) do Brasil onde, populações naturais mostram ampla tolerância ao estresse durante a germinação das sementes e o crescimento das plântulas (ver Figura S1, Material Suplementar). Assim, seria importante investigar-se, também, se os solos de baixos pH(s) desempenhariam um papel ecológico na distribuição de espécies de *Stylosanthes*.

A disponibilidade de nutrientes do solo é um fator chave na determinação da distribuição de algumas espécies de plantas em regiões tropicais (John et al 2007, Lehmann et al 2011). Além disso, o pH do solo governa muitas relações químicas planta-solo, em particular a disponibilidade de micronutrientes e de íons tóxicos, devido à sua influência sobre a solubilidade (Brady e Weill 2002). Em recentes anos, alguns estudos têm sugerido que o pH do solo desempenha um papel importante na modulação da composição florística em regiões tropicais (Holste et al 2011, Offord et al 2014). O gênero *Stylosanthes* consiste de 48 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais da América, África e Sudeste Asiático (Costa 2006, Santos-Garcia et al 2012). O gênero tem dois centros de diversidade, sendo o mais importante localizado no Brasil, incluindo 45% de todas as espécies de *Stylosanthes* que se desenvolvem naturalmente em áreas com solos ácidos (Costa 2006, Sun et al 2014). O estado de Minas Gerais constitui um dos centros

de dispersão do gênero (Lovato et al 1994), desenvolvendo-se em áreas com diferentes tipos de solo, incluindo os extremamente ácidos (Williams et al 1984, Du et al 2009). Neste contexto, os solos de baixo pH(s) poderiam atuar como um agente de seleção natural, promovendo adaptação local em plantas *Stylosanthes*. Uma característica comum de fatores de estresse incluindo soluções de baixo pH (Pelacani et al 2005) é estimular a biossíntese do etileno, molécula chave para a germinação das sementes de *Stylosanthes* (Silva et al 2014). Assim, a capacidade das sementes de *Stylosanthes* para sintetizar etileno em condições de estresse poderia desempenhar um papel importante no estabelecimento da população de espécies *Stylosanthes* em solos ácidos. O etileno, também, é conhecido por promover alterações morfológicas no sistema radicular de plântulas exposta a impedância mecânica do solo, o que aumenta a capacidade das raízes de penetrar nas camadas compactadas do solo (Sarquis et al 1991, Okamoto et al 2008). Entretanto, pouco é conhecido sobre a inter-relação entre a biossíntese de etileno e o crescimento da radícula e do hipocótilo para sustentar o estabelecimento das plântulas em condições ácidas dos solos tropicais.

Neste trabalho, sementes de *Stylosanthes* foram utilizadas para investigar-se as ações integrativas entre a acidificação do meio de germinação e o etileno no controle do crescimento das plântulas. Propôs-se ainda investigar se os baixos pH(s) do solo desempenham um papel ecológico natural na distribuição do *Stylosanthes*, examinando-se suas inter-relações com a rota de biossíntese do etileno. Os resultados indicam que o etileno atua como um integrador central, a partir do qual as atividades celulares da raiz e do hipocótilo são coordenadas em função do pH do ambiente em que uma plântula se encontra. Estas respostas são discutidas em termos do potencial envolvimento do nível de etileno como um sinal específico que integra as condições do pH do solo e a emergência das plântulas de *Stylosanthes*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condição de cultivo

Plantas de *S. humilis* H.B.K. e *S. guianensis* (Aubl.) cv. Mineirão foram cultivadas em casa de vegetação em Viçosa (20° 45'S, 42° 15'W), Minas Gerais, em vasos plásticos com capacidade de 3,5 l. O substrato dos vasos foi composto de duas partes de solo, tipo latossolo vermelho-amarelo, uma parte de areia e uma parte de esterco bovino curtido, e recebeu adubação de cobertura de 10 g vaso⁻¹ de N-P-K (20-5-20), parcelada em duas aplicações, durante o ciclo de vida da planta. A irrigação foi feita diariamente de forma a manter-se a umidade do solo próxima à capacidade de campo. Em razão de as espécies comportarem-se como planta de dia-curto (Cameron e 'tMannetje 1977), nos meses do ano com dias mais longos (dezembro a março), as plantas foram cobertas com um pano preto, reduzindo-se o período luminoso para 8 h diárias, para promoção da floração. Os frutos produzidos foram colhidos periodicamente e armazenados em sacos de papel, em condições de laboratório (25-30 °C).

2.2 Condução dos experimentos

Para a realização dos ensaios, os frutos foram previamente debulhados, por fricção entre duas superfícies emborrachadas e, em seguida as sementes foram escarificadas por leve fricção entre duas lixas d'água n° 150. Após escarificação, as sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5 % (v/v), por 10 min, e lavadas exaustivamente em água destilada (Burin et al 1987). Em seguida, as sementes foram enxugadas com papel absorvente e transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo, ao fundo, 50 ml de areia (0,5-1,0 mm) ou solo. As amostras de areia foram previamente tratadas com ácido clorídrico concentrado, por 24 h, e lavadas

exaustivamente em água destilada. Após secagem em estufa a 70 °C, por 72 h, tanto as amostras de areia e de solo foram esterilizadas em autoclave.

Os frascos Erlenmeyer, com 100 sementes receberam 20 ml de soluções-teste McIlvaine. Em seguida, os frascos foram vedados com seladores de borracha e transferidos para câmara de crescimento (Forma Scientific Inc., Ohio, USA) com um ciclo dia/noite de 12/12 h, a 30/25 °C, e intensidade de luz de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3 Efeito do pH na emergência das plântulas

Para avaliar-se se as condições de baixos pH(s) controlam o crescimento das plântulas pelo estímulo à biossíntese de etileno, sementes foram expostas à solução-tampão de McIlvaine, à concentração de 10 mM, em pH(s) 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, contendo também aminoetoxivinilglicina (AVG, 1 μM), inibidor da atividade da sintase do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACS) (Wen 2015). O etileno produzido pelas sementes, assim como a germinação foram analisados 24 h após o início da incubação das sementes nas soluções de McIlvaine. Ademais, a emergência das plântulas e os níveis de etileno foram quantificados após 4 dias de incubação. Como o número total de sementes adicionadas nos frascos foi 100, a porcentagem de plântulas emergidas do solo foi representada pelo número de plântulas verdes, em que a radícula penetrou com sucesso no solo e, o hipocótilo alongou acima do solo. A associação causal entre a inibição da emergência das plântulas e a inibição da biossíntese de etileno foi examinada tratando-se as sementes com solução de AVG (1 μM) em pH 7,0. Após 3 h de embebição em AVG, etileno, às concentrações de 0,001, 0,01, 0,1 e 1,0 μM , foi injetado na atmosfera dos frascos selados. A atmosfera dos frascos foi homogeneizada utilizando-se de uma seringa de 3,0 ml, provida de agulha longa.

2.4 Quantificação do etileno

O etileno acumulado na atmosfera dos frascos Erlenmeyer foi quantificado seguindo-se a técnica descrita por Silva et al (2014). A atmosfera dos frascos foi homogeneizada utilizando-se de uma seringa de 3,0 ml, provida de agulha longa, e retirou-se uma amostra de 1,0 ml daquela atmosfera, utilizando-se de seringas ultra-fine (agulhas 29 G 1/2"). As amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, serie II (USA), equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o nitrogênio em fluxo de 30 ml min⁻¹; os fluxos do hidrogênio e do ar sintético foram mantidos em 30 e 320 ml min⁻¹, respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram mantidas a 60, 110 e 150 °C, respectivamente. A determinação do etileno foi feita comparando-se as áreas das amostras obtidas no Software Peak-2 Simple com áreas de picos de uma mistura padrão de etileno de concentração conhecida.

2.5 Quantificação do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC)

Os níveis de ACC nas plântulas foram determinados seguindo-se a técnica descrita por Bulens et al (2011). As sementes foram semeadas em areia embebida em solução-tampão McIlvaine pH 4,0 e 7,0 ou em solo com pH 3,9 e 6,4. Após 4 dias, a radícula e o hipocótilo das plântulas emergidas do solo foram lavadas com água desionizada, enxugadas com papel absorvente, pesadas e imersas em nitrogênio líquido e, então, estocadas em freezer a -80°C.

Para os ensaios, as amostras foram extraídas por maceração em almofariz com pistilo em 10 ml de etanol (80%), acrescentando-se também polivinil-polipirrolidona (PVP 5% m/v). O extrato foi centrifugado a 12000 g, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante

foi evaporado até *secura*, em evaporador rotativo, à temperatura de 45°C. O resíduo foi suspenso em 4,0 ml de água destilada (extrato original), tomando-se a metade para quantificar-se o ACC livre.

Uma alíquota de 0,5 ml do extrato foi adicionada em um tubo de ensaio, juntamente com 0,1 ml de cloreto de mercúrio (5,0 µmol), completando-se o volume da reação para 0,8 ml, com água destilada. O tubo de ensaio foi vedado com selador de látex e mantido em banho de gelo. Uma alíquota de 0,2 ml de uma mistura resfriada de NaOCl (5%) e NaOH saturado (v/v 2:1) foi injetada no tubo, com auxílio de uma seringa. O tubo foi imediatamente agitado em um misturador tipo vórtex, por 5 s, e incubado em banho de gelo por 2,5 min. Após nova agitação por 5 s, uma amostra gasosa de 1,0 ml da atmosfera do tubo de ensaio foi recolhida, com uma seringa, e o etileno produzido foi analisado por cromatografia gasosa.

A metade remanescente do extrato original foi utilizada para determinar-se o ACC total (ACC livre + ACC conjugado), após hidrólise ácida com HCl (2 N), a 100°C, por 3 h. Em seguida, o extrato foi neutralizado com NaOH saturado e evaporado a 45°C, até *secura*. O resíduo foi ressuspenso em 2,0 ml de água destilada. A quantificação do ACC total seguiu os mesmos procedimentos para quantificação do ACC livre (Concepcion et al 1979).

2.6 Atividade da oxidase do ACC

No estudo da atividade *in vitro* da oxidase do ACC, amostras da radícula e do hipocótilo foram imersas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80 ° C, até análise. A atividade *in vitro* da oxidase do ACC foi determinada segundo a técnica descrita por Bulens et al (2011), com algumas alterações. As amostras foram maceradas em almofariz com pistilo resfriado e todo o procedimento foi conduzido sob banho de gelo. As amostras

foram extraídas com 6,0 ml do meio de extração, constituído de Tris-HCl 100 mM em pH 7,0; glicerol 10 % (v / v); ditioneitol (DTT) 1 mM; ascorbato de sódio 30 mM; Triton X-100 0,1 % (v / v); e PVPP 5 % (m / v). O homogenado foi centrifugado a 28000 g, por 20 min, a 4 °C, e 2 ml do sobrenadante (extrato enzimático) foi aplicado em uma coluna PD-10 (Pharmacia), contendo Sephadex G-25, previamente equilibrado com o meio de reação (sem ACC), para a dessalinização. Descartaram-se os primeiros 0,5 ml, recolhendo-se 4,0 ml seguintes do eluato contendo a enzima para análise.

A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma alíquota de 0,2 ml do extrato dessalinizado, em tubo de ensaio de 6 ml selado, incubado por 2 h, a 32 °C, em um volume de reação de 1,8 ml, constituído de Tris-HCl 100 mM, pH 7,0; glicerol 10 % (v/v); ascorbato de sódio 30 mM; FeSO₄ 50 µM; NaHCO₃ 30 mM; DTT 1,0 mM; e ACC 1,0 mM. Decorrido o tempo de reação (1 h), uma amostra de 1,0 ml do gás da atmosfera interna do tubo foi analisada para quantificação do etileno, como descrito anteriormente.

2.7 Quantificação de metabólitos

Para investigar-se como os baixos pH(s) coordenam o metabolismo primário das plântulas, os níveis de glicose, frutose, sacarose, amido, malato, fumarato, nitrato, e proteínas, foram determinados na radícula bem como no hipocótilo de plântulas crescendo em substratos com diferentes pH(s). Os metabólitos foram extraídos em etanol como descrito por Fernie et al (2001). Na fração solúvel em etanol os níveis de sacarose, glicose e frutose foram determinados como descrito por Fernie et al (2001). Para a determinação de amido, o precipitado da extração etanólica foi solubilizado por aquecimento a 95 °C em 0,1 M NaOH. Em seguida, 70 µl de solução de ácido acético (1 M) foram adicionados às amostras, e o conteúdo de amido foi determinado como equivalentes de glicose (Gibon et al 2004).

A quantificação de nitrato foi feita como descrito por Mori (2000). A reação enzimática iniciou-se com a adição de uma alíquota de 5 µl do extrato etanólico em um volume de reação de 150 µl, constituído de tampão fosfato de potássio, 0,1 mM (pH 7,5); NADPH 0,25 mM; e nitrato redutase 0,005 U. Depois de 30 min de incubação à temperatura ambiente, 20 µl de fenazina matanosulfato (5 mM) foram adicionados à reação e as micro-placas foram incubadas, por mais 10 min no escuro. Em seguida, adicionou à reação 30 µl de sulfamilamida (2 % m/v) dissolvida em H₃PO₄ (2 mM) e 30 µl de N-(1-naftil)-etilenodiamino dihidroclorito (0,04 % m/v). O nitrato foi quantificado em leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA), a 570 nm.

Malato e fumarato foram quantificados como descrito por Nunes-Nesi et al (2007). A reação enzimática foi iniciada com a adição de 50 µl do extrato a um volume de reação de 200 µl constituído de Tricina/KOH 100 mM (pH 9,0); fenazina etanossulfato 0,12 mM; NAD⁺ 3 mM e Triton X 100 0,5 % (v/v). A quantificação do malato e fumarato foi conduzida em micro-placas, em leitor de ELISA (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA), a 570 nm, após a adição de 1 U de malato desidrogenase (para a determinação de malato) até a estabilização da absorbância e pela adição de 1 U fumarase (para a determinação do fumarato).

Utilizou-se a técnica de Bradford (1976), com algumas modificações (Ramagli e Rodriguez 1985), para determinação dos teores de proteínas nos extratos. Uma série de solução de albumina soro-bovina (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração que serviu como padrão para quantificação das proteínas. A quantificação das proteínas foi conduzida em leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA), a 590 nm.

2.8 Perfil metabólico

Para determinação do perfil metabólico foram utilizados os procedimentos descritos por Lisec et al (2006). Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas foram colocadas em tubos de 2 ml de capacidade e extraída em 750 µl de metanol contendo 30 µl de ribitol (0,2 mg/ml). Após agitação vigorosa em vórtex por 10 s, as amostras foram incubadas a 70 °C sob agitação (1000 g), por 15 min. Decorrido esse tempo, as amostras passaram por centrifugação a 14000 g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante (500 µl) foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 750 µl de clorofórmio. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex durante 10 s seguindo-se de uma nova centrifugação a 4000 g, por 15 min, a 4 °C. A camada superior (fase polar) foi recolhida em alíquotas de 100 µl e adicionada em um novo tubo. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo e armazenadas à -80 °C. Para a derivatização, adicionou-se 40 µl do reagente de metoxiaminação a cada amostra e agitou-se a 1000 g, por 2 h, a 37°C. Após esse tempo, foi adicionado 70 µl de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) às amostras, do qual foram submetidas à agitação 1000 g, por 30 min, a 37°C. As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS).

Os cromatogramas e os espectros de massa gerados foram analisados utilizando o software TAGFINDER (Luedemann et al 2008), e a identificação e a anotação dos dados apresentados foram realizadas como descrito por Fernie et al (2011).

2.9 Experimento em solo

Para determinar se o pH do solo pode atuar como um fator de pressão seletiva na população natural, causando adaptação em plantas de *Stylosanthes*, sementes de *S.*

humilis e *S. guianensis* foram semeadas em potes plásticos de 1 l contendo solo com pH variando de 3,5 a 6,6. As amostras dos solos foram coletadas a uma profundidade de 0-20 cm em 10 localidades do Brasil: Solo1 8° 76' S, 63° 90' W; Solo2 14° 17' S, 50° 00' W; Solo3 7° 62' S, 72° 67' W; Solo4 3° 21' S, 52° 21' W; Solo5 1° 63' N, 52° 27' W; Solo6 20° 75' S, 42° 87' W; Solo7 22° 57' S, 44° 96' W; Solo8 20° 99' S, 57° 28' W; Solo9 11° 30' S, 41° 85' W e Solo10 6° 12' S, 36° 81' W. Aproximadamente 60 kg de amostras compostas dos solos foram coletadas em cada localidade em uma área de 10 m². Os solos foram secos em casa de vegetação, e peneirados em peneira com malha de 0,5-1,0 mm. As amostras dos solos foram analisadas no Laboratório de Solos do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Os tipos de solos e suas análises químicas estão descritos na Tabela S1. Em cada vaso, 100 sementes foram semeadas à uma profundidade de 1 cm. Observações preliminares mostraram que a germinação foi a mesma nas profundidades de 0 a 3 cm, porque a luz não influencia a germinação das sementes de *Stylosanthes*. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e, antes de semear as sementes, os vasos foram imersos em água, seguido da drenagem durante 24 h antes da pesagem para determinar a capacidade de campo. Durante o curso do experimento, os vasos foram pesados e adicionou-se água diariamente, para manter o solo a 80% da capacidade de campo. As plântulas emergidas do solo foram registradas e removidas dos vasos, semanalmente, por um período de 30 dias.

A associação causal entre a indução da produção de etileno provocada pelo baixo pH do solo e a emergência das plântulas foi examinada incubando-se as sementes em frascos Erlenmeyer contendo solos com diferentes pH(s) (ver Tabela S1, Material Suplementar). A emergência das plântulas no solo e a produção de etileno foi avaliada após 4 dias de incubação. Em amostras de solos sem as sementes não foi detectada a produção de etileno.

2.10 Características anatômicas

Seções medianas da radícula de plântulas de *Stylosanthes* foram fixadas em FAA₅₀, por 48 h e estocadas em etanol 70 % (Johansen 1940). Em seguida, o material vegetal foi incluído em metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA) com 5µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien et al 1964). As imagens da análise estrutural foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision. O diâmetro da radícula das plântulas controle e das plântulas tratadas com carbonato de cálcio foram avaliados. Nestas análises foram efetuadas medições em 10 campos distintos de cada amostra por meio do software Image-Pro[®] Plus (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA).

2.11 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi inteiramente casualizado. Nos experimentos sobre o crescimento das plântulas e quantificação do etileno, a unidade experimental foi constituída de frascos Erlenmeyer de 125 ml, com 100 sementes, com 6 repetições por tratamento. Para quantificação dos níveis de metabólitos, ACC e atividade enzimática in vitro as unidades experimentais foram compostas de amostras de extrato de 150 plântulas (radícula e hipocótilo) com 6 repetições por tratamento. A unidade experimental, dos experimentos sobre o crescimento das plântulas em casa de vegetação foi composta por 10 repetições, constituída de 100 sementes cada. As diferenças de médias entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey ou pelo

teste de t em nível de 5 % de significância. Todas as comparações entre médias foram realizadas com Software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 11.0.

3 RESULTADOS

A emergência das plântulas de *S. humilis* aumentou em resposta a redução do pH do meio de crescimento, o qual, manteve uma estreita relação com o aumento da produção de etileno pelas plântulas (Figuras 1A, B; barras brancas). O efeito máximo induzido pela solução ácida ocorreu em pH 4,0 sendo a emergência e a produção de etileno das plântulas aumentada em 47 e 52 %, respectivamente, em relação ao controle (pH 7,0). Para examinar o grau de envolvimento do etileno na emergência das plântulas, adicionou-se AVG, um inibidor da biossíntese do etileno, ao meio de crescimento. A produção de etileno pelas plântulas em solução de baixo pH foi quase completamente inibida por AVG (Figura 1B, barras cinzas). Ademais, a AVG inibiu significativamente a emergência das plântulas estimuladas por solução de baixo pH (Figura 1A, barras cinzas). Na figura 1C, observa-se, claramente, que o baixo pH do meio promoveu um aumento significativo na emergência das plântulas, quando comparado com o controle (pH 7,0). Uma imagem completamente diferente para o crescimento surgiu quando as plântulas de *S. humilis* foram cultivadas em pH 4,0 em conjunto com AVG (Figura 1C). Importante, os efeitos inibitórios da AVG na emergência das plântulas foram revertidos pela aplicação de etileno em concentrações tão baixas como 0,001 μM (Figura S1, Material Suplementar). Sob concentrações de etileno maiores que 0,1 μM não mais se observou qualquer incremento significativo na emergência das plântulas tratadas com AVG. Estes resultados sugerem a participação do etileno na emergência das plântulas de *S. humilis*. Interessantemente, a viabilidade das sementes não foi afetada pelas soluções-teste

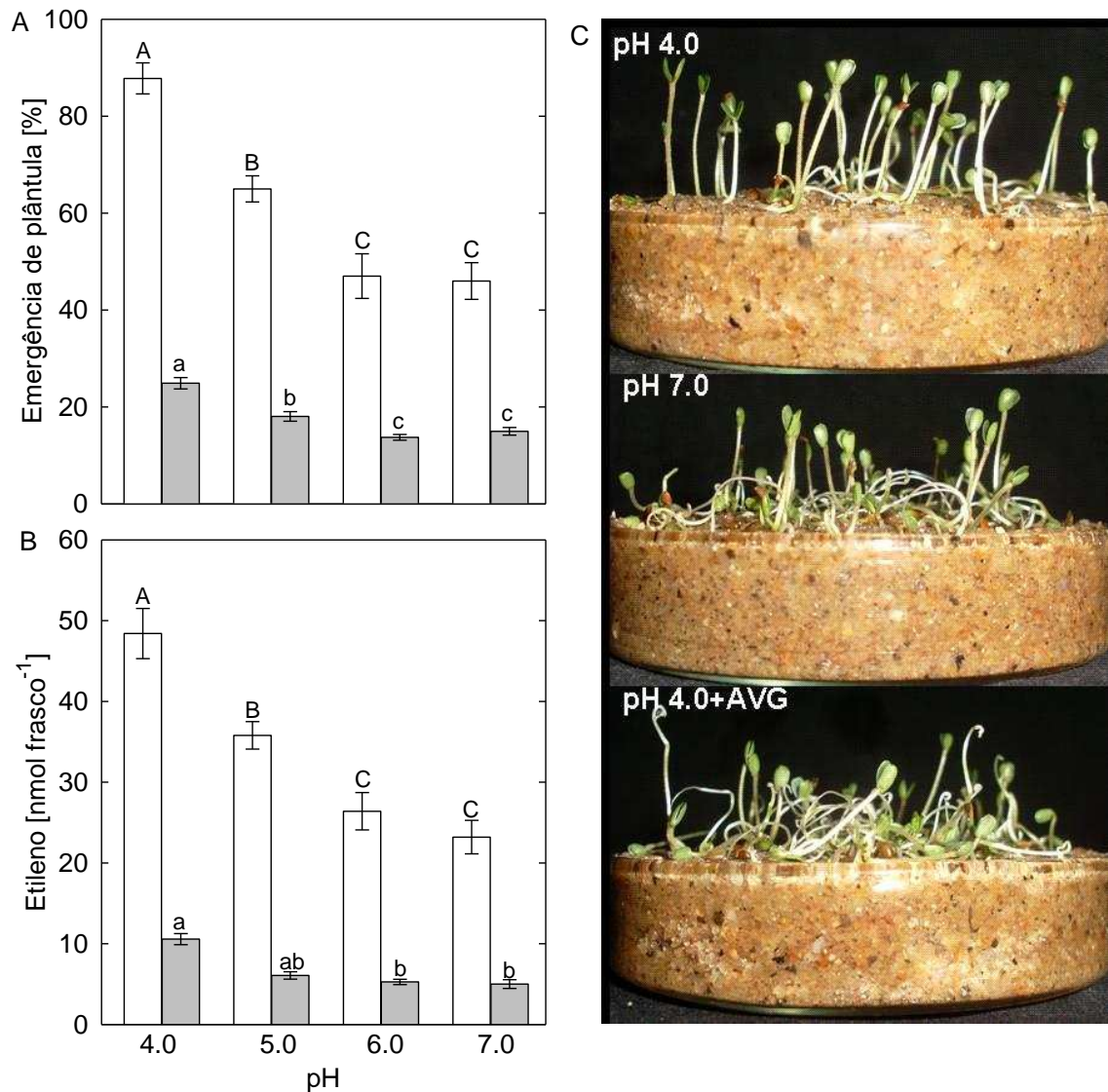


Figura 1. A produção de etileno está associada com a emergência das plântulas promovida por solução de baixo pH. Emergência das plântulas incubadas apenas em solução tampão McIlvaine em diferentes pH(s) (barras brancas), ou em conjunto com AVG (barras cinzas) (A). Produção de etileno das plântulas incubadas apenas em solução tampão McIlvaine em diferentes pH(s) (barras brancas), ou em conjunto com AVG (barras cinzas) (B). Alterações fenotípicas de plântulas de *S. humilis* promovidas pelo tratamento com solução-tampão McIlvaive pH 4,0 (C) e 7,0 (D) bem como por AVG solubilizado em pH 4,0 (E). Médias seguidas de mesma letra minúscula ou maiúscula não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

(Figura S2A, barras pontilhadas e hachuradas, Material Suplementar). O pH ácido do meio de germinação fez também aumentar a produção de etileno em relação às sementes mantidas em solução de pH 7,0, 24 h após incubação (Figura S3B, barras pontilhadas). Além disso, visto que a germinação de sementes de *S. humilis* é dependente dos níveis de etileno (Ribeiro e Barros 2006), a produção de etileno foi reduzida por AVG, à concentração de 1 μ M, porém sem afetar a germinação das sementes (Figuras S3A, B), uma vez que se faz necessário concentração maiores para que a AVG iniba completamente os níveis de etileno (Ribeiro e Barros 2004, 2006). Estes resultados indicam que as sementes de *S. humilis* produzem muito mais etileno do que realmente precisam para completar o processo de germinação.

Como solução de baixo pH estimula a emergência das plântulas de *S. humilis* possivelmente via produção de etileno, plântulas foram expostas a condição ácida (pH 4,0) para a quantificação dos níveis de ACC bem como para quantificação da atividade da oxidase do ACC. A redução no crescimento da raiz e do hipocótilo das plântulas de *S. humilis* por solução de pH 4,0 foi acompanhada por aumento nos níveis de ACC livre e total, em relação ao controle (pH 7,0), ao final de 4 dias de incubação (Figuras 2A-C). Consistente com esses resultados, o baixo pH estimulou significativamente a atividade da oxidase do ACC tanto na radícula como no hipocótilo das plântulas, em relação ao controle (pH 7,0) (Figura 2D).

O crescimento e desenvolvimento das plantas é conhecido por ser altamente dependente da disponibilidade carbono (Wiese et al 2007, Pantin et al 2011). Assim os efeitos do baixo pH no metabolismo primário das plantas de *S. humilis* foram investigados acompanhando-se os níveis de metabólitos na raiz e no hipocótilo de plântulas crescendo em areia embebida com solução tampão McIlvaine pH 4,0 e 7,0 (controle). Os níveis de aminoácidos totais foram reduzidos no hipocótilo das plântulas cultivadas sob regime de

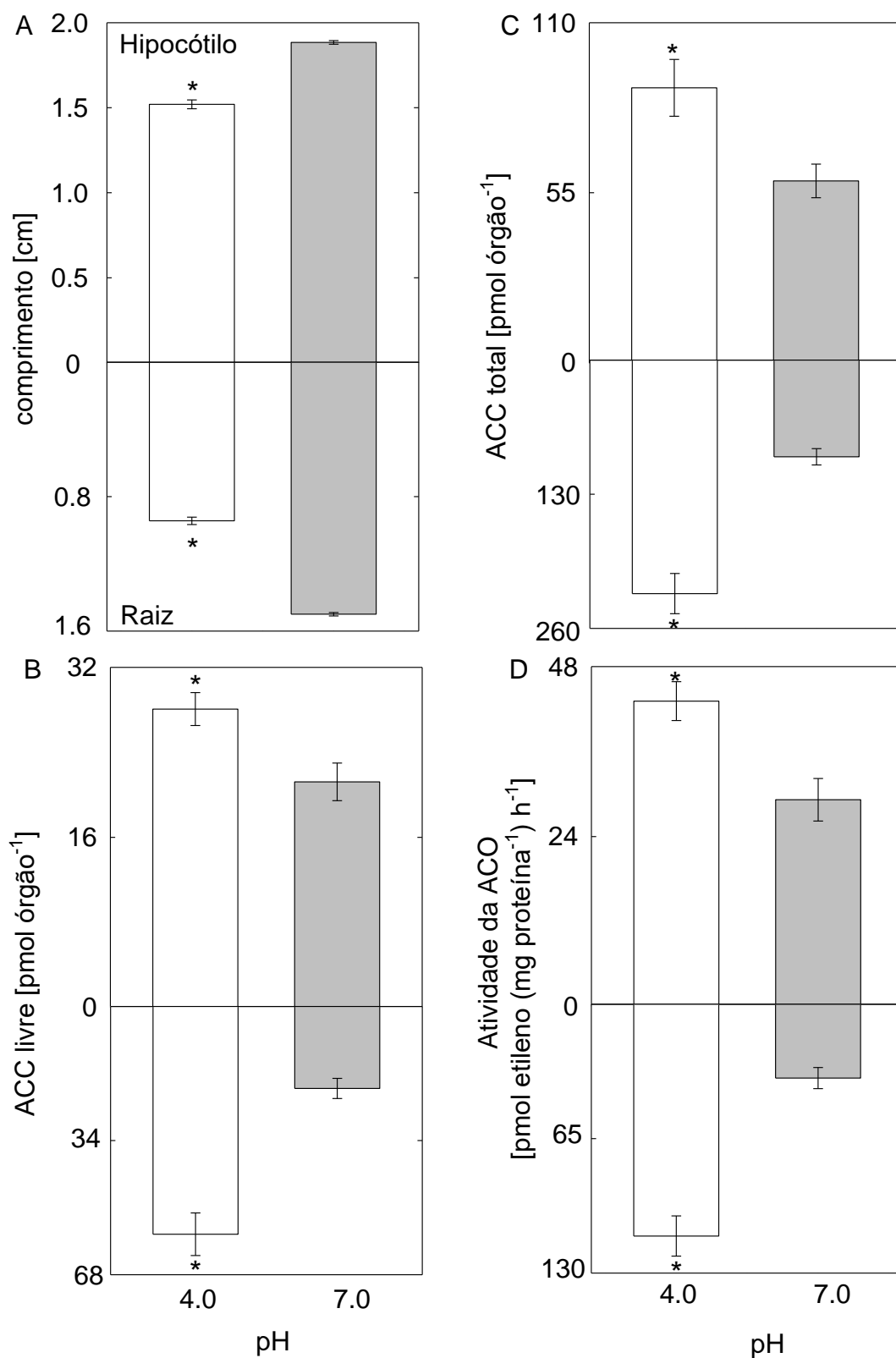


Figura 2. Efeito do baixo pH no crescimento das plântulas (A), nos níveis de ACC livre (B) e total (C) bem como na atividade da oxidase do ACC (D). Os asteriscos indicam que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre o pH 4,0 e o respectivo controle (pH 7,0). Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

baixo pH, mas a solução ácida levou a um aumento dos níveis de nitrato e de proteína no hipocótilo (Figuras 3A-C). Além disso, não houve alterações nos níveis de aminoácidos totais, nitrato e proteína nas raízes das plântulas crescidas em areia suplementadas com solução tampão pH 4,0. Os níveis de amido permaneceram estáveis nos tecidos da raiz e do hipocótilo das plântulas cultivadas em pH 4,0, em comparação com as plântulas do controle que crescem sob pH 7,0 (Figura 3D). A análise de ácidos orgânicos revelou reduções nos níveis de malato tanto em raiz e hipocótilo das plântulas crescidas sob condição ácida (Figura 3E). Além disso, os níveis de fumarato foram reduzidos por solução de baixo pH nas raízes, sem alterações nos tecidos do hipocótilo, em comparação com os seus respectivos controles (pH 7,0) (Figura 3F). Apesar da redução nos níveis de sacarose e glicose na radícula das plântulas tratadas com pH 4,0, não houve alteração nos níveis daqueles açúcares no hipocótilo (Figuras 3G, H). Os resultados, também, mostram uma diminuição nos níveis de frutose tanto na radícula e no hipocótilo de plântulas cultivadas em solução tampão pH 4,0, em comparação com o controle (Figura 3I).

Para caracterizar o comportamento da emergência das plântulas em condições de solos ácidos, sementes de *S. humilis* e *S. guianensis* foram semeadas em solos com pH variando entre 3,5 e 6,6. A emergência e a produção de etileno das plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* foi aumentada significativamente com a diminuição do pH do solo (Figuras 4A-D). O efeito máximo promovido pelo meio ácido na emergência e na produção de etileno ocorreu em solo com pH 4,5. Nesse pH, a emergência das plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* foi de 78 % e 90 %, respectivamente. Ademais, a emergência das plântulas e a produção de etileno não sofreu alterações significativas em solo com pH entre 3,5 a 4,2 (Figuras 4A-D). Interessantemente, os resultados das Figuras 4A-D também mostram que a emergência das plântulas e a produção de etileno foi maior em *S. guianensis* do que em *S. humilis*, 4 dias após a incubação das plântulas em solos com pH

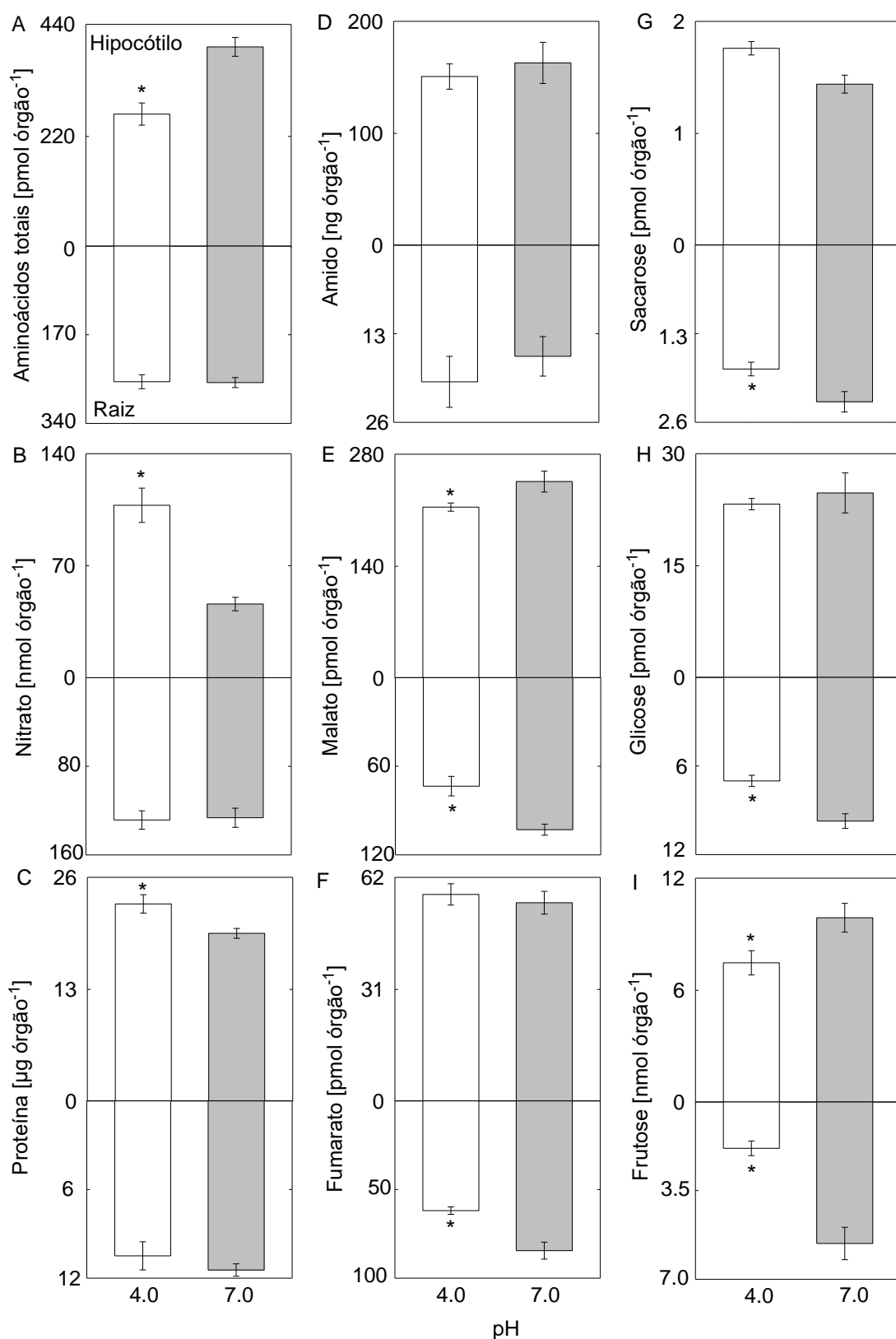


Figura 3. Níveis de aminoácidos totais (A), nitrato (B), proteína (C), amido (D), malato (E), fumarato (F), sacarose (G), glicose (H) e frutose (I) nos tecidos do hipocótilo e da raiz de plântulas de *S. humilis*. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre o pH 4,0 e o respectivo controle (pH 7,0). Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

variando entre 3,5 e 6,6. Como o acúmulo de etileno na atmosfera dos frascos Erlenmeyer selado aumenta a sua própria biossíntese em sementes e plântulas de *Stylosanthes* (Silva et al 2014), a emergência das plântulas foi, também, determinada em vasos plásticos mantidos em casa de vegetação. Resultados semelhantes de emergência das plântulas foram obtidos com o mesmo material vegetal em condições de ensaio em casa de vegetação (Figuras 4E, F). Portanto, os resultados sugerem que a emergência das plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* dependeu dos níveis endógenos de etileno das plântulas e, não do etileno acumulado na atmosfera dos frascos Erlenmeyer selado.

Para uma análise mais completa da ação do baixo pH do solo na inter-relação entre a emergência das plântulas e a produção de etileno, carbonato de cálcio (CaCO_3) foi usado para elevar o pH do solo de 3,9 a 6,4. Com a adição de CaCO_3 , verificou-se que a emergência das plântulas foi 50 % menor do que as mantidas em solo com pH 3,9 (- CaCO_3) (Figura 5A). A inibição na emergência das plântulas de *S. humilis* por CaCO_3 foi acompanhada por redução de 46 % na biossíntese de etileno (Figura 5B). Ademais, a aplicação de CaCO_3 influenciou o crescimento das plântulas, resultando em aumento significativo no crescimento da raiz (37 %) e do hipocótilo (22 %) durante todo o intervalo sob estudo (Figura 5C). A elevação do pH do solo por CaCO_3 , também, reduziu significativamente os níveis de ACC livre e total nos tecidos do hipocótilo e da radícula das plântulas de *S. humilis* (Figuras 5D, E). Considerando-se os efeitos do etileno nas raízes das plântulas, observou-se uma redução na penetração das raízes no solo com o aumento do pH promovido pela adição de CaCO_3 , em comparação com solo com pH 3,9 (Figuras 6A, B). Além disso, inibição na produção de etileno relacionou-se com a redução do diâmetro das raízes promovida pelo aumento do pH do solo por CaCO_3 (Figuras 6C, D). Neste contexto, o pH ácido do meio de cultivo fez aumentar o diâmetro das raízes das

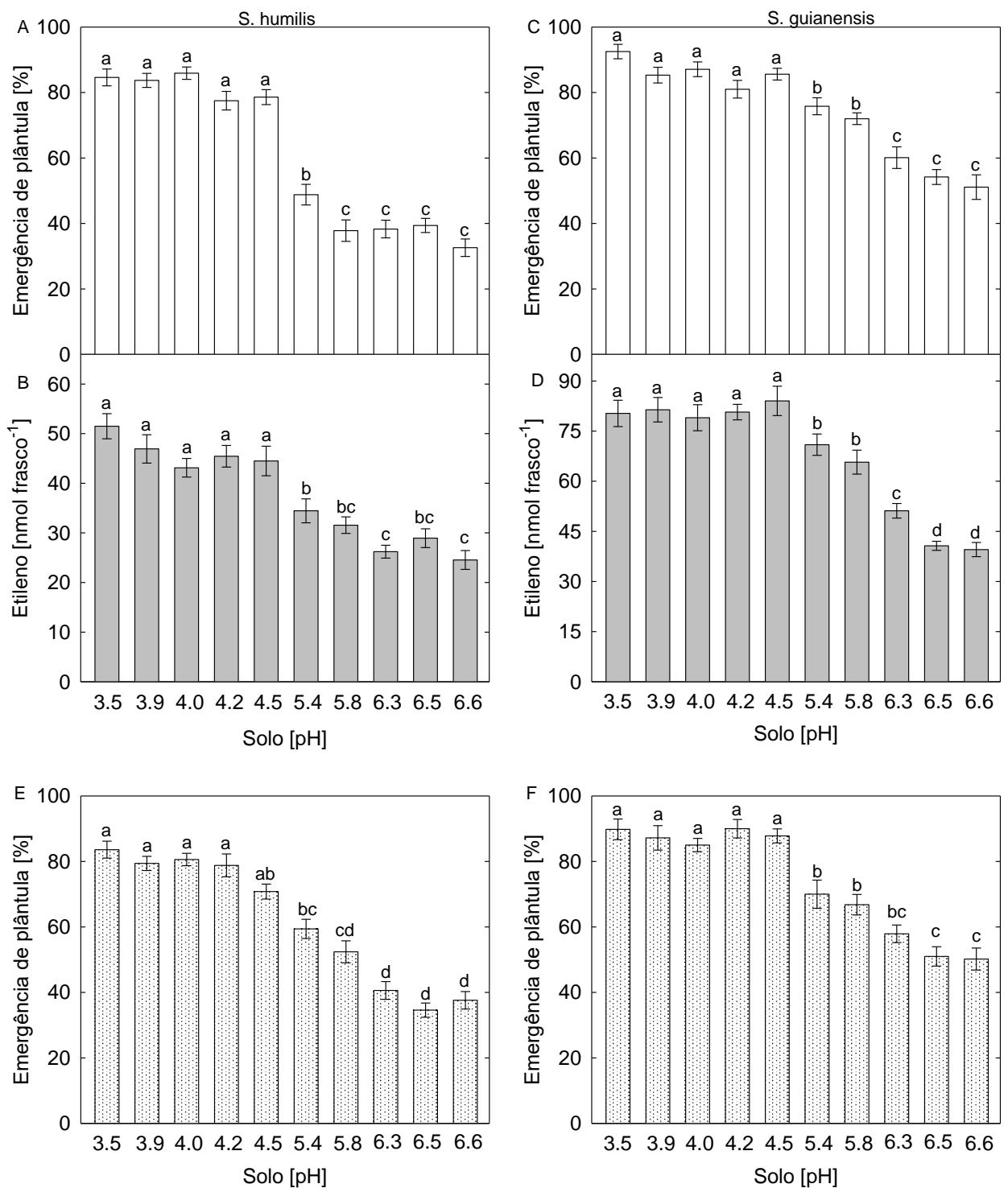


Figura 4. Emergência e produção de etileno em plântulas de *Stylosanthes* cultivadas em solos com diferentes pH(s). Emergência e produção de etileno por plântulas de *S. humilis* (A-B) e *S. guianensis* (C-D). Efeitos do pH(s) do solo na emergência de plântulas de *S. humilis* (E) e *S. guianensis* (F) crescidas em ambiente aberto em condições de casa de vegetação. Valores seguidos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5 % pelo teste de Tukey. Para os experimentos em frascos Erlenmeyer os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média. Para os experimentos em casa de vegetação os dados são médias de três experimentos independentes com dez repetições cada \pm erros da média.

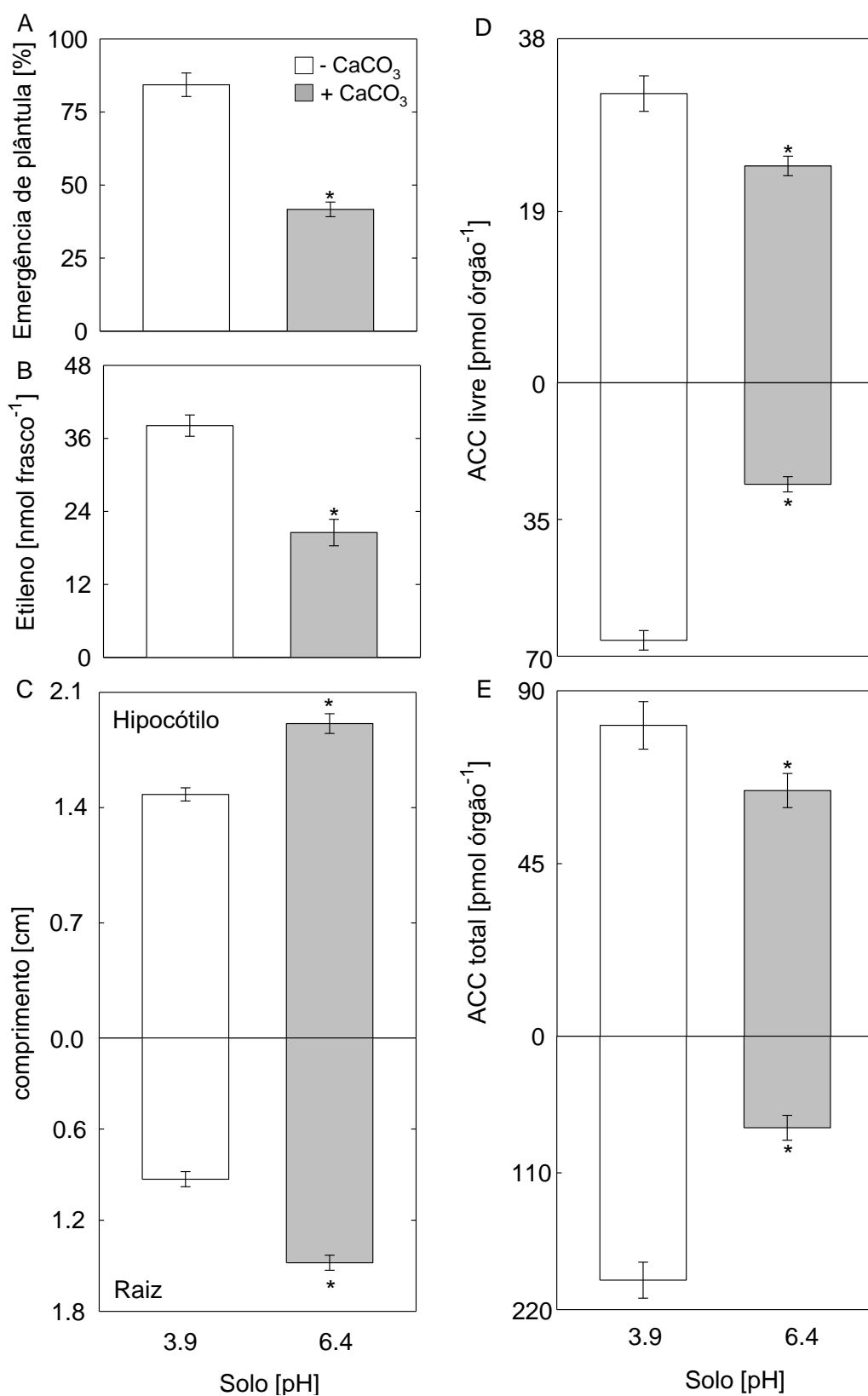


Figura 5. A redução na biossíntese de etileno promovida pelo aumento do pH do solo por CaCO_3 afeta o crescimento e a emergência das plântulas. Emergência das plântulas (A). Biossíntese de etileno (B). Comprimento do hipocótilo e da raiz (C). Níveis de ACC livre (D). Níveis de ACC total (E). Os asteriscos indicam que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre o pH 4,0 e o respectivo controle (pH 7,0). Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

plantas em 24 % em relação às raízes das plântulas mantidas em solo de pH 6,4 (+CaCO₃) (Figura 6E).

Uma análise detalhada do perfil metabólico do hipocótilo e das raízes das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃, mostrou que o metabolismo primário das plântulas foi regulado pela alteração do pH do meio de cultivo. Os níveis de sacarose, ornitina e dos ácidos orgânicos (citrato, aconitato, isocitrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato e malato) intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) foram significativamente aumentados nas raízes das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃, enquanto se mantiveram estável no hipocótilo das plântulas mantidas em solo de pH 3,9 (-CaCO₃) (Figura 7). Os níveis de glicose e frutose aumentaram nos tecidos da radícula e do hipocótilo das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃, em relação as plântulas sob pH 3,9. Em adição, o solo tratado com CaCO₃ teve reduzidos os níveis de triptofano tanto na radícula e no hipocótilo das plântulas (Figura 7). Os níveis de alanina reduziram nas raízes das plântulas sob tratamento com CaCO₃, mas permaneceram estáveis no hipocótilo das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃, em relação as plântulas sob pH 3,9 (-CaCO₃). Claramente, houve um aumento significativo nos níveis de putrescina e espermidina no hipocótilo das plântulas mantidas em solo tratado com CaCO₃, em comparação com solo de pH 3,9 (Figura 7). Interessantemente, o aumento do pH do solo promovido pelo tratamento com CaCO₃ reduziu os níveis de espermidina das raízes das plântulas. Ademais, os níveis de mio-inositol, manose, glicose-6-P, frutose-6-P, glicina, cisteína, serina, 3-P-glicerato, glicerato, piruvato, tirosina, fenilalanina, valina, lisina, asparagina, aspartato, metionina, treonina, oxaloacetato, arginina, glutamato, glutamina, GABA e prolina tanto na radícula e no hipocótilo das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃ foram semelhantes aos observados nas plântulas mantidas em solo de pH 3,9 (Figura 7).

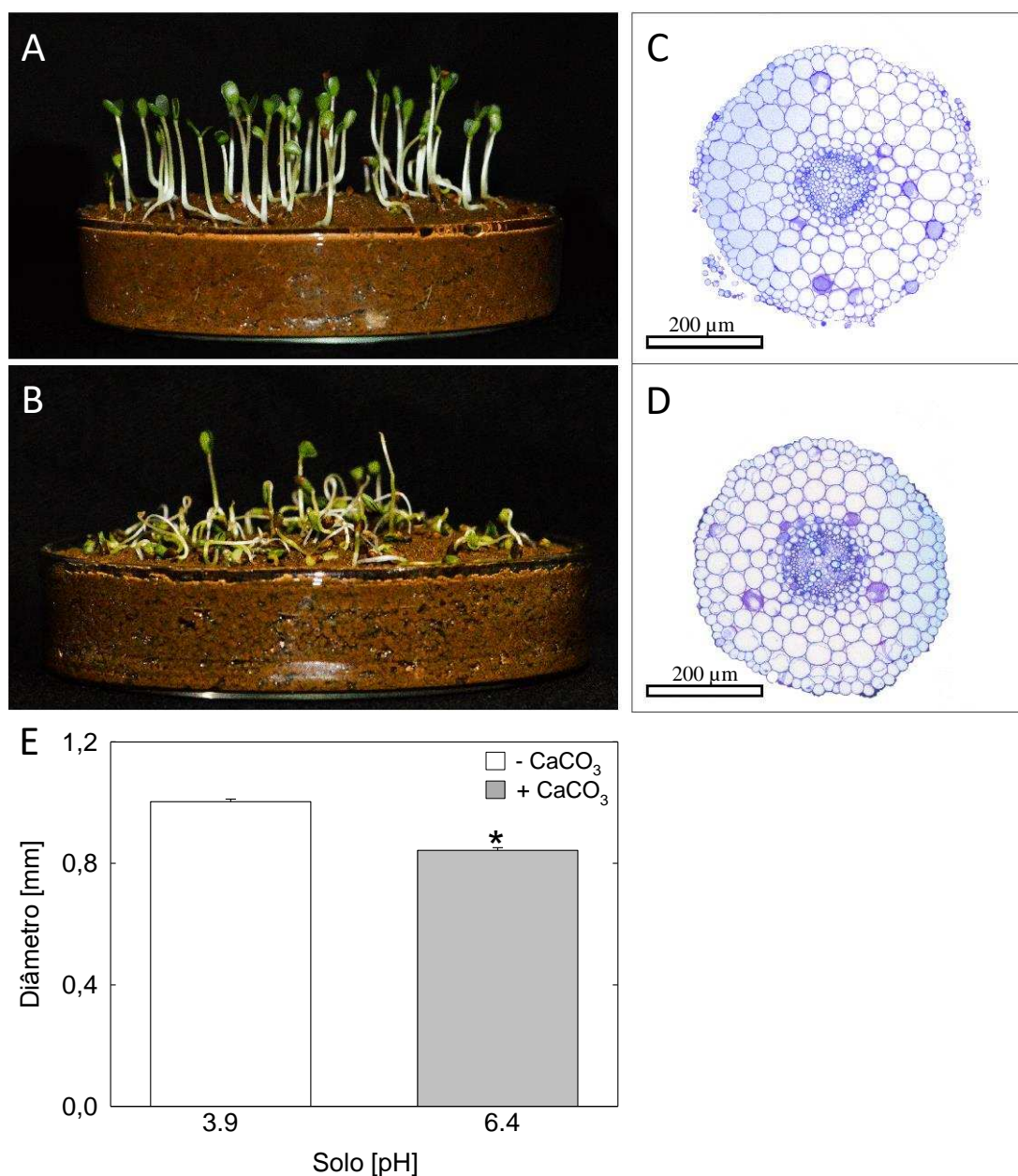


Figura 6. Alterações morfológicas de plântulas de *S. humilis* provocadas pelo aumento do pH do solo por CaCO₃. Fenótipo das plântulas cultivadas em solo de pH 3,9 (-CaCO₃) (A). Fenótipo das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃ (B). Característica da raiz das plântulas cultivadas em solo de pH 3,9 (-CaCO₃) (C). Característica da raiz das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃ (D). Diâmetro das raízes das plântulas cultivadas em solo de pH 3,9 (-CaCO₃) e solo tratado com CaCO₃ (E). Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos, controles, em nível de 5% pelo teste de t. Médias de seis repetições \pm erro da média.

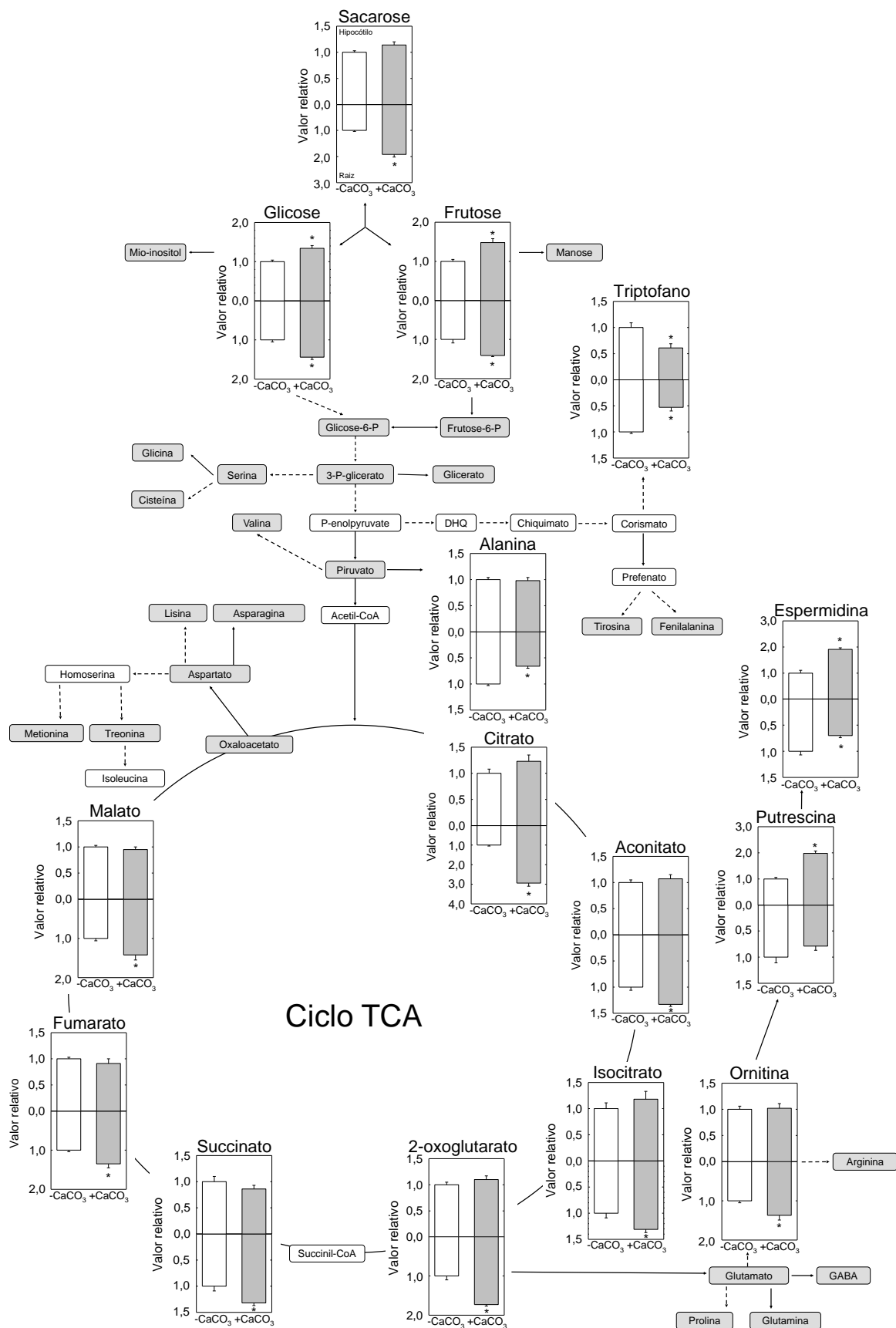


Figura 7. Alterações nos níveis de metabólitos nos tecidos da raiz e do hipocótilo em plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 (pH 6,4), em relação as plântulas mantidas em solo de pH 3,9 (- CaCO_3). Uma lista completa de todos os metabólitos medidos no GC-MS foi apresentada na Tabela S1, Material Suplementar. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos, controles, em nível de 5% pelo teste de t. Médias de seis repetições \pm erro da média.

4 DISCUSSÃO

A emergência das plântulas de *Stylosanthes* foi aumentada em resposta a redução do pH do meio de incubação (Figura 1). A AVG, inibidor da biossíntese do etileno, foi eficiente em inibir a emergência das plântulas promovida por soluções de baixos pH(s) (Figura 1). Ademais, a produção de etileno das plântulas estimulada pela condição ácida foi fortemente inibida por AVG. Consistente com esses resultados, solução tampão de baixo pH aumentou os níveis de ACC livre e total bem como a atividade da oxidase do ACC em hipocótilos e raízes das plântulas *S. humilis* (Figura 2). O aumento dos níveis de ACC e da atividade da oxidase do ACC promoveu redução no comprimento do hipocótilo e da radícula das plântulas cultivadas em condição de baixo pH. Apesar de o baixo pH inibir o crescimento do hipocótilo e da raiz promovida, possivelmente, pelo aumento na biossíntese de etileno, a emergência das plântulas foi aumentada durante o intervalo de estudo. Além disso, os efeitos inibitórios da AVG na emergência das plântulas foram revertidos pela aplicação de etileno (Figura S2). Juntos, esses resultados sugerem que o baixo pH aumentou o estabelecimento das plântulas por estimular a biossíntese de etileno. O fato do etileno induzir a emergência das plântulas foi um fato esperado, já que resultados preliminares foram relatados por Santisree et al (2011) em plântulas de tomate. No entanto, o envolvimento específico do pH baixo era desconhecido, e um papel ecológico do baixo pH ainda não tinha sido estabelecido. Esse fato é especialmente importante considerando que populações naturais de *Stylosanthes* ocorrem em solos ácidos de biomas como Cerrado e Caatinga (Figura S1, Costa 2006). Neste contexto, a ação do baixo pH na indução da biossíntese de etileno poderia desempenhar um papel ecológico fundamental na distribuição das espécies de *Stylosanthes*. Apesar de o etileno ter sido, por muito tempo, reconhecido como um inibidor de crescimento (Wen 2015),

sabe-se que esse hormônio gasoso também pode ser um indutor do crescimento e desenvolvimento das plantas (Pierik et al 2006). Além disso, nos últimos anos, alguns trabalhos têm mostrado que a ativação da cascata de sinalização do etileno é necessária para a tolerância a estresse abiótico (Achard et al 2006, Cao et al 2007, Zhang et al 2016). Dessa forma, é bastante provável que o etileno atue como um sinal necessário para o estabelecimento e a sobrevivência das plântulas de *Stylosanthes* sob condição de baixo pH. Assim, o modo de ação da condição ácida no metabolismo do etileno e no metabolismo do carbono durante a emergência das plântulas foi investigado mais detalhadamente.

O crescimento e desenvolvimento das plantas é conhecido por ser altamente dependente da disponibilidade carbono (Pantin et al 2011, Yang et al 2016). Interessantemente, o menor nível de glicose, frutose e sacarose ocorreu na radícula de plântulas cultivadas sob pH 4,0, em comparação com as plântulas mantidas em solução tampão pH 7,0 (controle) (Figura 3). Entretanto, no hipocótilo das plântulas cultivadas em pH 4,0, os níveis de sacarose e glicose foram semelhantes ao hipocótilo das plântulas do controle, mas os níveis de frutose reduziram (Figura 3). Os níveis de amido no hipocótilo e nas raízes permaneceram estáveis tanto em plântulas sob pH 4,0 e 7,0. Portanto, os resultados sugerem que a biossíntese de carboidratos em plântulas de *S. humilis* dependeu dos níveis endógenos de etileno das plantas. Em *Arabidopsis*, malato e fumarato funcionam como fonte de fotoassimilados para o crescimento (Chia et al 2000, Pracharoenwattana et al 2010, Zell et al 2010). O baixo pH do meio de incubação reduziu os níveis de malato e fumarato nas raízes das plântulas (Figura 3). Assim, a redução nas concentrações de ácidos orgânicos e de carboidratos nas raízes das plântulas cultivadas em ambiente ácido (pH 4,0) pode sinalizar para uma inibição da taxa de crescimento da radícula. Os níveis de nitrato, aminoácidos totais e proteína permaneceram estáveis nas

raízes (Figura 3). Por outro lado, os níveis de nitrato aumentaram no hipocótilo enquanto os níveis de aminoácidos foram reduzidos em hipocótilo de plantas cultivadas em meio ácido (pH 4,0), quando comparado com o controle (pH 7,0). No entanto, o fato de que os níveis de proteínas totais se acumularem significativamente em hipocótilos de plântulas sob pH 4,0, poderia contribuir para as taxas reduzidas de crescimento observadas; desde que a assimilação do nitrogênio inorgânico em aminoácidos e a subsequente conversão metabólica dos aminoácidos para proteína são processos energeticamente dispendiosos (Hachiya et al 2007).

As plântulas de algumas espécies do gênero *Phalaris* apresentaram reduções no crescimento da radícula sob condição de solos ácidos, mas o estabelecimento das plântulas foi aumentado (Culvenor et al 2008). A relação entre redução do crescimento da radícula e aumento na emergência foi também observada em plântulas de *S. humilis* quando cultivadas em areia embebida com solução-tampão de baixo pH (Figuras 1 e 2). Nesse contexto, dadas as semelhanças observadas no crescimento da radícula e no estabelecimento em meio ácido das plântulas de *Phalaris* e *Stylosanthes*, seria importante investigar-se, também, se os solos ácidos desempenham um papel ecológico na distribuição de espécies de *Stylosanthes*. A emergência das plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* foi aumentada com a diminuição do pH dos solos (Figura 4). O efeito máximo promovido pelo meio ácido na emergência das plântulas ocorreu em solos com pH(s) entre 3,5 a 4,5. O estímulo ao estabelecimento das plântulas relacionou-se com a produção de etileno, sugerindo que a rota de biossíntese do etileno foi ativada pela condição ácida do meio. Interessantemente, resultados semelhantes de emergência das plântulas foram obtidos com o mesmo material em condições de ensaio em casa de vegetação (Figura 4). Juntos, esses resultados indicam que o estabelecimento das plântulas foi devido a um efeito do etileno produzido pelas plântulas e não do acúmulo de etileno na atmosfera dos

frascos Erlenmeyer selado que aumenta a sua própria biossíntese (Barros e Ribeiro 2006). Como a biossíntese de etileno em sementes de *S. guianensis* é maior do que em sementes de *S. humilis* (Silva et al 2014), é bastante provável que a elevada produção de etileno possa ter incrementado o estabelecimento das plântulas de *S. guianensis* cultivadas em solo com diferentes pH(s), em relação ao *S. humilis*. Interessantemente, *S. guianensis* é a espécie de *Stylosanthes* de maior distribuição geográfica e extensa variedade genética, ocorrendo em áreas com diferentes tipos de solo, incluindo-se solos extremamente ácidos (Williams et al 1984, Vieira et al 1993, Santos-Garcia et al 2012). Assim, esses dados fornecem evidência de que as sementes de *S. guianensis* são mais adaptadas às condições ácidas, em razão de sua maior capacidade de produzir etileno.

A acidez do solo é acarretada principalmente pelo acúmulo dos íons H^+ e Al^{3+} (Thapa 2015, Shavrukov e Yoshihiko 2015), de modo que, comumente o estresse por baixo pH e toxicidade por alumínio ocorrem concomitantemente (Bian et al 2013, 2015). Desde que a concentração de Al^{3+} aumenta na solução do solo com a redução do pH (Thapa 2015), o potencial envolvimento do íon alumínio na emergência e na produção de etileno foi avaliado. O sal de alumínio não afetou a emergência e a produção de etileno em nível de 5 e 50 μM no pH 4,0 (Figura S3, Material Suplementar). Quando se utilizou solução de $AlCl_3$ em pH 4,0, os resultados de estabelecimento e produção de etileno das plântulas deveram-se mais a um efeito do pH do que do próprio íon Al^{3+} . Portanto, pode-se inferir sobre um efeito próprio dos íons H^+ em 4,0 no controle do estabelecimento das plântulas, uma vez que, a emergência e a produção de etileno das plântulas expostas ao alumínio foram semelhantes a promovida por solução-tampão de pH 4,0 pura. Assim, para examinar o grau do envolvimento do baixo pH do solo na emergência das plântulas induzida pelo etileno, $CaCO_3$ foi usado para elevar o pH do solo de 3,9 a 6,4.

Sob pH 6,4 houve redução significativa na emergência das plântulas (Figuras 5 e 6). A inibição na emergência das plântulas seguiu o mesmo comportamento da biossíntese de etileno pelas plântulas. Ademais, o tratamento do solo com CaCO_3 promoveu aumento no alongamento da radícula e do hipocótilo bem como redução nos níveis de ACC livre e total em relação as plântulas cultivadas em solo de pH 3,9. Esses resultados sugerem que a rota de biossíntese de etileno foi inibida, pelo menos em parte, pela elevação do pH do solo. Apesar do aumento no alongamento da radícula das plantas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 , houve redução no diâmetro da raiz daquelas plântulas. Esse resultado pode ser explicado pela redução na taxa de produção de etileno em pH mais alcalino (Wen et al 2015). As auxinas têm, também, sido estabelecidas como moléculas-chave na sinalização em plantas, controlando processos tais como dominância apical, embriogênese e, crescimento e desenvolvimento de raízes (Strader e Zhao 20016). Embora as plantas tenham múltiplas rotas de biossíntese do ácido indol-3-acético (AIA) (Cook et al 2016), a rota de conversão do triptofano a AIA parece estar diretamente ativa em plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 . Assim, a redução observada no nível de triptofano poderia contribuir para explicar o aumento do crescimento da raiz e do hipocótilo das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 (Figura 7). No entanto, o fato do alongamento da raiz ter sido aumentado em plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 , poderia ter contribuído para a redução na emergência das plântulas; desde que a coação entre os níveis de auxina e etileno é requerido para a penetração das raízes no solo (Santisree et al 2011). A biossíntese de etileno é, também, conhecida por ser estimulada pela impedância mecânica do solo durante a emergência das plântulas (Zhong et al 2014). Entretanto, o baixo pH do solo estimulou a biossíntese de etileno e a emergência das plântulas independente da impedância do solo (Figura 5, Figura 6, Tabela S1, Material Suplementar). Juntos esses dados sugerem que os solos de baixo pH(s)

desempenham um papel ecológico fundamental na distribuição das espécies de *Stylosanthes*.

Plantas crescendo em solos alcalinos, onde o cálcio é abundante, muitas vezes, reduzem o excesso de cálcio celular combinando-o com ácidos orgânicos (Bush 1995, López-Bucio et al 2000, Sindelar et al 2015). Isto é crucial para a sobrevivência das plântulas nestas condições de solo, porque os elevados níveis de cálcio podem interferir em processos celulares essenciais, tais como a sinalização dependente de cálcio, o metabolismo de fosfato e na dinâmica do citoesqueleto (Choi et al 2016). Interessantemente, os níveis dos ácidos orgânicos intermediários do ciclo do TCA foram significativamente aumentados nas raízes das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 , mas permaneceram estáveis no hipocótilo das plântulas sob tratamento com CaCO_3 , em relação as plântulas mantidas sob pH 3,9 (- CaCO_3). Ademais, o maior nível de glicose, frutose e sacarose ocorreu na raiz e no hipocótilo das plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO_3 (pH 6,4). Assim, as altas concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos das plântulas mantidas em solo tratado com CaCO_3 podem sinalizar para um aumento da taxa de crescimento. De fato, a elevação do pH do solo com CaCO_3 induziu um aumento no alongamento da radícula e do hipocótilo, mas reduziu a emergência das plântulas. Neste contexto, os elevados níveis de carbono podem estar associados a alterações ecológicas, devido à redução no estabelecimento das plântulas de *Stylosanthes*.

5 CONCLUSÃO

O baixo pH do meio de incubação aumentou o estabelecimento das plântulas de *Stylosanthes* por estimular a biossíntese de etileno. Ademais, a emergência das plântulas de *S. humilis* e *S. guianensis* foi aumentada com a diminuição do pH dos solos. O estímulo ao estabelecimento das plântulas relacionou-se com a produção de etileno. O fato do baixo pH do solo induzir a emergência das plântulas é especialmente importante considerando que populações naturais de *Stylosanthes* ocorrem em solos ácidos de biomas como Cerrado e Caatinga. Assim, o baixo pH do solo parece desempenhar um papel ecológico fundamental na pressão seletiva na distribuição das espécies de *Stylosanthes*. No futuro, uma análise mais detalhada da interação entre etileno e auxina e, também, com outras moléculas reguladoras levará a descoberta dos mecanismos precisos que regem o processo de penetração das raízes em solos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
- Barros RS, Ribeiro DM (2006). Enhancement of ethylene production by dormant seeds of *Stylosanthes humilis* induced to germinate in closed environments. *Tropical Grasslands* 40(4): 237-243.
- Bian M, Jin X, Broughton S, Zhang XQ, Zhou G, Zhou M, Zhang G, Sun D, Li C (2015). A new allele of acid soil tolerance gene from a malting barley variety. *BMC Genet* 16(1): 92.
- Bian M, Zhou M, Sun D, Li C (2013). Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. *The Crop Journal* 1(2): 91-104.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Brady N, Weil R (2002). *The nature and properties of soil*, Pearson Education. Inc., New Jersey 13 edition: 823p.
- Bulens I, Van de Poel B, Hertog ML, De Proft MP, Geeraerd AH, Nicolai BM (2011). Protocol: an updated integrated methodology for analysis of metabolites and enzyme activities of ethylene biosynthesis. *Plant Methods* 7: 17.
- Burin M, Barros RS, Rena AB (1987). Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* HBK. *Turrialba (IICA)* 3: 281-285.
- Bush DS (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1): 95-122.

- Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY, Zhang JS (2007). Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology* 143: 707-719.
- Cameron D, Mannetje L't, L't Mannetje (1977). Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. *Animal Production Science* 17(86): 417-424.
- Chia DW, Yoder TJ, Reiter WD, Gibson SI (2000). Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta* 211(5): 743-751.
- Choi WG, Hilleary R, Swanson SJ, Kim SH, Gilroy S (2016). Rapid, Long-Distance Electrical and Calcium Signaling in Plants. *Annual review of plant biology* 67: 287-307.
- Concepcion M, Lizada C, Yang SF (1979). A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Analytical biochemistry* 100(1): 140-145.
- Cook SD, Nichols DS, Smith J, Chourey PS, McAdam EL, Quittenden L, Ross JJ (2016). Auxin biosynthesis: Are the indole-3-acetic acid and phenylacetic acid biosynthesis pathways mirror images?. *Plant physiology* 171(2): 1230-1241.
- Costa N (2006) Revisão do gênero *Stylosanthes*. PhD Thesis, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Culvenor RA (2008). *Advanced A T. Plant Varieties Journal* 21: 190–194.
- Du Y-M, Tian J, Liao H, Bai C-J, Yan X-L, Liu G-D (2009). Aluminium tolerance and high phosphorus efficiency helps *Stylosanthes* better adapt to low-P acid soils. *Annals of botany* 103(8): 1239-1247.
- Ellis AG, Weis AE (2006). Coexistence and differentiation of 'flowering stones': the role of local adaptation to soil microenvironment. *Journal of Ecology* 94(2): 322-335.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001). Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases

- triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212(2): 250-263.
- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V (2011). Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* 23: 2477-2482.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004). A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell* 16(12): 3304-3325.
- Hachiya T, Treashima I, Nochuchi K (2007). Increase in respiratory cost at high temperature is attributed to high protein turnover cost in *Petunia x hybrida* petals. *Plant Cell & Environment* 30(10): 1269-1283.
- Holste EK, Kobe RK, Vriesendorp CF (2011). Seedling growth responses to soil resources in the understory of a wet tropical forest. *Ecology* 92(9): 1828-1838.
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book. 528p.
- John R, Dalling JW, Harms KE, Yavitt JB, Stallard RF, Mirabello M, Hubbell SP, Valencia R, Navarrete H, Vallejo M (2007). Soil nutrients influence spatial distributions of tropical tree species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(3): 864-869.
- Keunen E, Schellingen K, Vangronsveld J, Cuypers A (2016). Ethylene and metal stress: small molecule, big impact. *Frontiers in Plant Science* 7: 23.
- Kricher JC (2011). *Tropical ecology*. Princeton University Press.
- Lehmann CE, Archibald SA, Hoffmann WA, Bond WJ (2011). Deciphering the distribution of the savanna biome. *New Phytologist* 191(1): 197-209.

- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols* 1(1): 387-396.
- Lopez-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramirez-Rodriguez V, Herrera-Estrella L (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science* 160(1): 1-13.
- Lovato M, Lemos PMFJ (1994). Germination in *Stylosanthes humilis* populations in the presence of NaCl. *Australian Journal of Botany* 42(6): 717-723.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008). TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24: 732-737.
- Mori H (2000). Direct Determination of Nitrate Using Nitrate Reductase in a Flow System. *Journal of Health Science* 46(5): 385-388.
- Mott J, McKeon G (1979). Effect of heat treatments in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. *Seed Science and Technology* 7(1): 15-25.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50(6): 1093-1106.
- O'brien TP, Feder N, McCully ME (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2), 368-373.
- Offord CA, Meagher PF, Zimmer HC (2014). Growing up or growing out? How soil pH and light affect seedling growth of a relictual rainforest tree. *AoB plants* 6: plu011.
- Okamoto T, Tsurumi S, Shibasaki K, Obana Y, Takaji H, Oono Y, Rahman A (2008). Genetic dissection of hormonal responses in the roots of *Arabidopsis* grown under continuous mechanical impedance. *Plant physiology* 146(4): 1651-1662.

- Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dauzat M, Muller B (2011). Control of leaf expansion: a developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiology* 156(2), 803-815.
- Pelacani CR, Ribeiro DM, Barros RS, Frigeri RB (2005a). Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as affected by organic acids. *Seed Science and Technology* 33: 105-113.
- Pelacani CR, Barros RS, Ribeiro DM, Frigeri RB (2005b). Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with low pH solutions. *Acta Physiologiae Plantarum* 27(3): 387-394.
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voesenek LACJ (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci* 11:176–183.
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM (2010). *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal* 62(5): 785-795.
- Pregitzer CC, Bailey JK, Hart SC, Schweitzer JA (2010). Soils as agents of selection: feedbacks between plants and soils alter seedling survival and performance. *Evolutionary Ecology* 24(5): 1045-1059.
- Ramagli LS, Rodriguez LV (1985). Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6(11): 559-563.
- Ribeiro DM, Mapeli AM, Antunes WC, Barros RS (2011). A dual role of selenium in the growth control of seedlings of *Stylosanthes humilis*. *Agricultural Sciences* 2(02): 78-85.

- Sambatti J, Rice KJ (2006). Local adaptation, patterns of selection, and gene flow in the Californian serpentine sunflower (*Helianthus exilis*). *Evolution* 60(4): 696-710.
- Santisree P, Nongmaithem S, Vasuki H, Sreelakshmi Y, Ivanchenko MG, Sharma R (2011). Tomato root penetration in soil requires a coaction between ethylene and auxin signaling. *Plant Physiology* 156(3): 1424-1438.
- Santos-Garcia MO, Toledo-Silva GD, Sasaki RP, Ferreira TH, Resende RMS, Chiari L, Karia CT, Carvalho MA, Faleiro FG, Zucchi MI (2012). Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. *Genetics and molecular biology* 35(4): 847-861.
- Sarquis JI, Jordan WR, Morgan PW. (1991). Ethylene evolution from maize (*Zea mays* L.) seedling roots and shoots in response to mechanical impedance. *Plant Physiology* 96(4): 1171-1177.
- Shavrukov Y, Hirai Y (2015). Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 67(1): 15-30.
- Shi H, Liu R, Xue C, Shen X, Wei N, Deng XW, Zhong S (2016). Seedlings Transduce the Depth and Mechanical Pressure of Covering Soil Using COP1 and Ethylene to Regulate EBF1/EBF2 for Soil Emergence. *Current Biology* 26(2): 139-149.
- Silva PO, Medina EF, Barros RS, Ribeiro DM (2014). Germination of salt-stressed seeds as related to the ethylene biosynthesis ability in three *Stylosanthes* species. *Journal Plant Physiology* 171(1): 14-22.
- Sindelar HR, Brown MT, Boyer TH (2015). Effects of natural organic matter on calcium and phosphorus co-precipitation. *Chemosphere* 138: 218-224.
- Smith DS, Schweitzer JA, Turk P, Bailey JK, Hart SC, Shuster SM, Whitham TG (2012). Soil-mediated local adaptation alters seedling survival and performance. *Plant and Soil* 352(1-2): 243-251.

- Strader LC, Zhao Y (2016). Auxin perception and downstream events. *Current opinion in plant biology* 33: 8-14.
- Sun L, Liang C, Chen Z, Liu P, Tian J, Liu G, Liao H (2014). Superior aluminium (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme, SgME1. *New phytologist* 202(1): 209-219.
- Thapa B (2015). Soil Fertility – causes, effects and management of soil acidity. In: Adhikary B H (Ed.). *A Handbook of Soil Science*. NARC, Khumaltar, Lalitpur. 102p.
- Viani RA, Rodrigues RR, Dawson TE, Oliveira RS (2011). Savanna soil fertility limits growth but not survival of tropical forest tree seedlings. *Plant and soil* 349(1-2): 341-353.
- Vieira MLC, Aguiar-Perecin MD, Martins PS (1993). A Cytotaxonomic Study in Twelve Brazilian Taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. *Cytologia* 58(3): 305-311.
- Wen C-K (2015). *Ethylene in Plants*. Springer Netherlands.
- Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A (2007). Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist* 174(4), 752-761.
- Williams RJ, Reid R, Schultze-Kraft R, Souza-Costa NM, Thomas BD (1984). Natural distribution of *Stylosanthes*. In Statece H M, Edye L A (Eds). *The Biology and Agronomy of Stylosanthes*. Academic Press 73-102.
- Yang D, Seaton DD, Kraemer J, Halliday KJ (2016). Photoreceptor effects on plant biomass, resource allocation, and metabolic state. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 201601309.
- Zhang W, Yang G, Mu D, Li H, Zang D, Xu H, Zou X, Wang Y (2016). An Ethylene-responsive Factor BpERF11 Negatively Modulates Salt and Osmotic Tolerance in *Betula platyphylla*. *Scientific Reports* 6: 23085.

Zell MB, Fahnenstich H, Maier A, Saigo M, Voznesenskaya EV, Edwards GE, Andreo C, Schleifenbaum F, Zell C, Drincovich MF, Maurino VG (2010). Analysis of Arabidopsis with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiology* 152(3): 1251-1262.

Zhong S, Shi H, Xue C, Wei N, Guo H, Deng XW (2014). Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111(11): 3913-3920.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

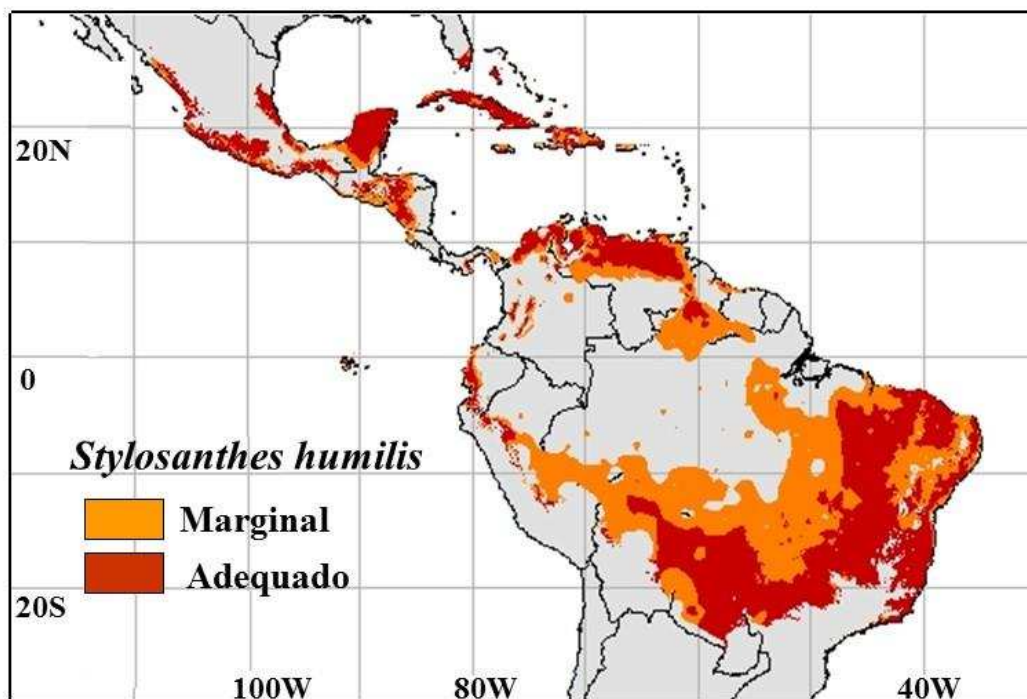
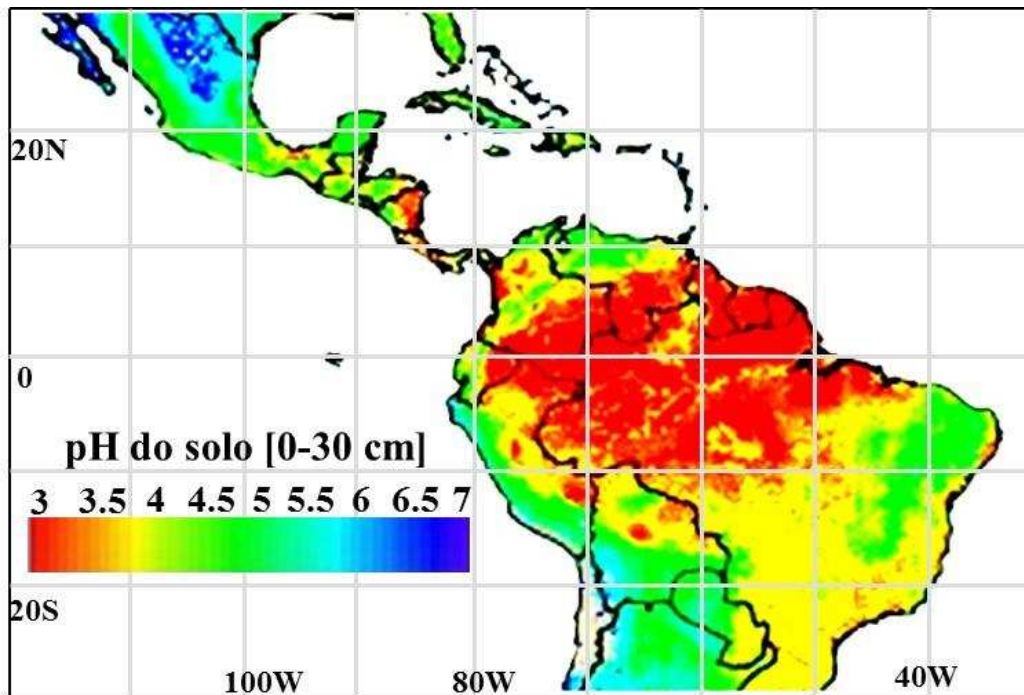


Figura S1. Mapa da variação do pH dos solos e da distribuição marginal e adequada de *S. humilis* na América do Sul e na América Central.

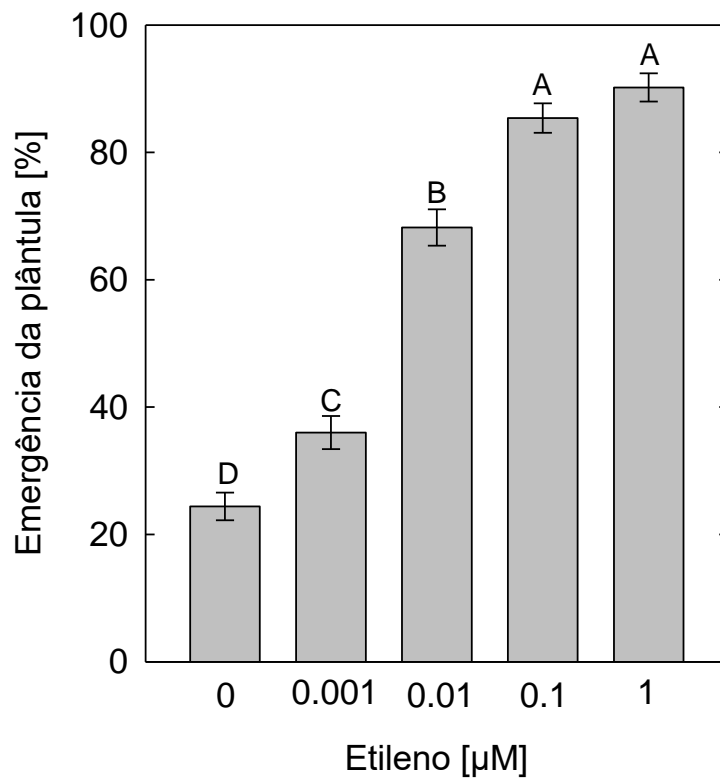


Figura S2. Emergência em resposta à adição de etileno em plântulas de *S. humilis* tratadas com AVG. As sementes permaneceram embebidas em AVG por 3 h; depois, os frascos foram selados e o etileno foi injetado em diversas concentrações. A emergência de plântulas foi quantificada 4 dias após o início da incubação das sementes. Valores seguidos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5 % pelo teste de Tukey. Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

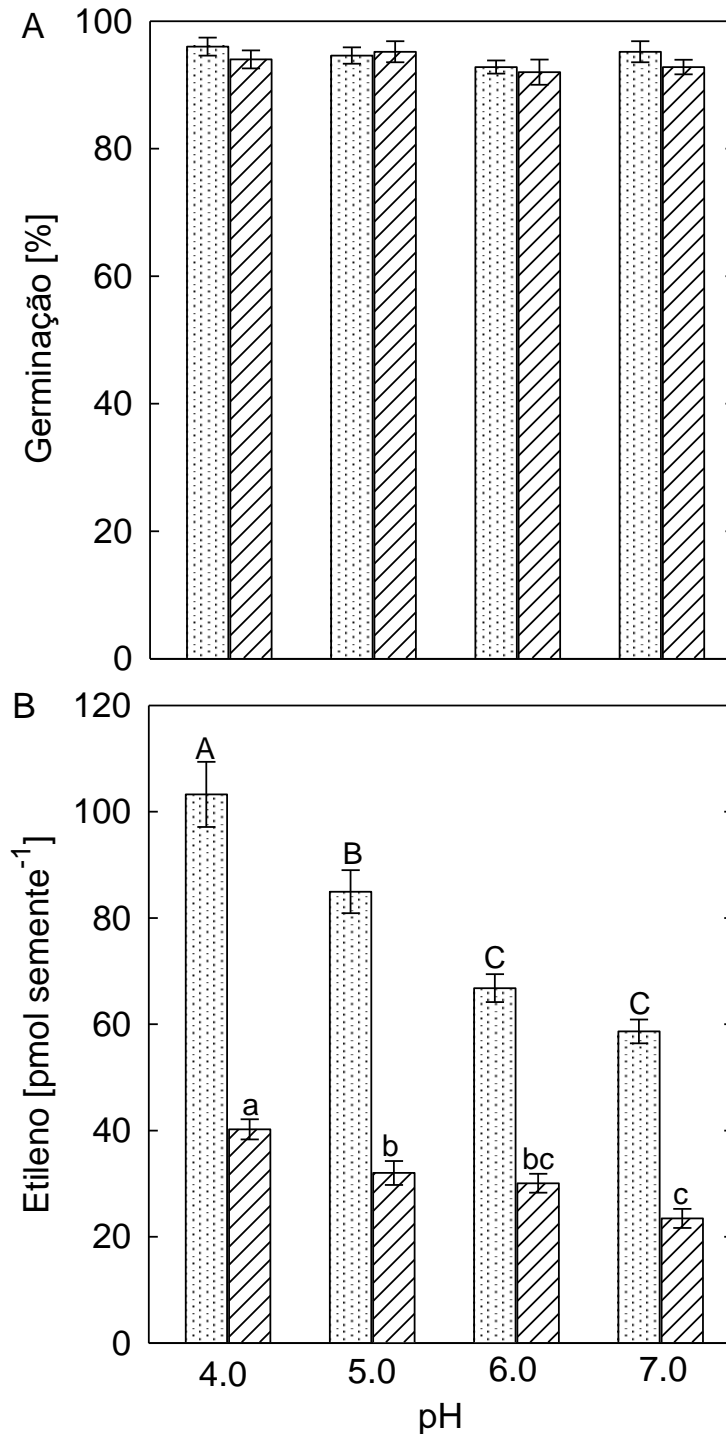


Figura S3. Germinação e produção de etileno por sementes de *S. humilis* incubadas com e sem AVG preparadas em diferentes pH(s) (A e B). (1) Barras brancas, sementes foram incubadas apenas em tampão McIlvaine em diferentes pH(s); (2) Barras cinzas, sementes foram incubadas em solução tampão em diferentes pH(s) e contendo AVG. Médias seguidas de mesma letra minúscula ou maiúscula não diferem entre si, em nível de 5% pelo teste de Tukey. Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

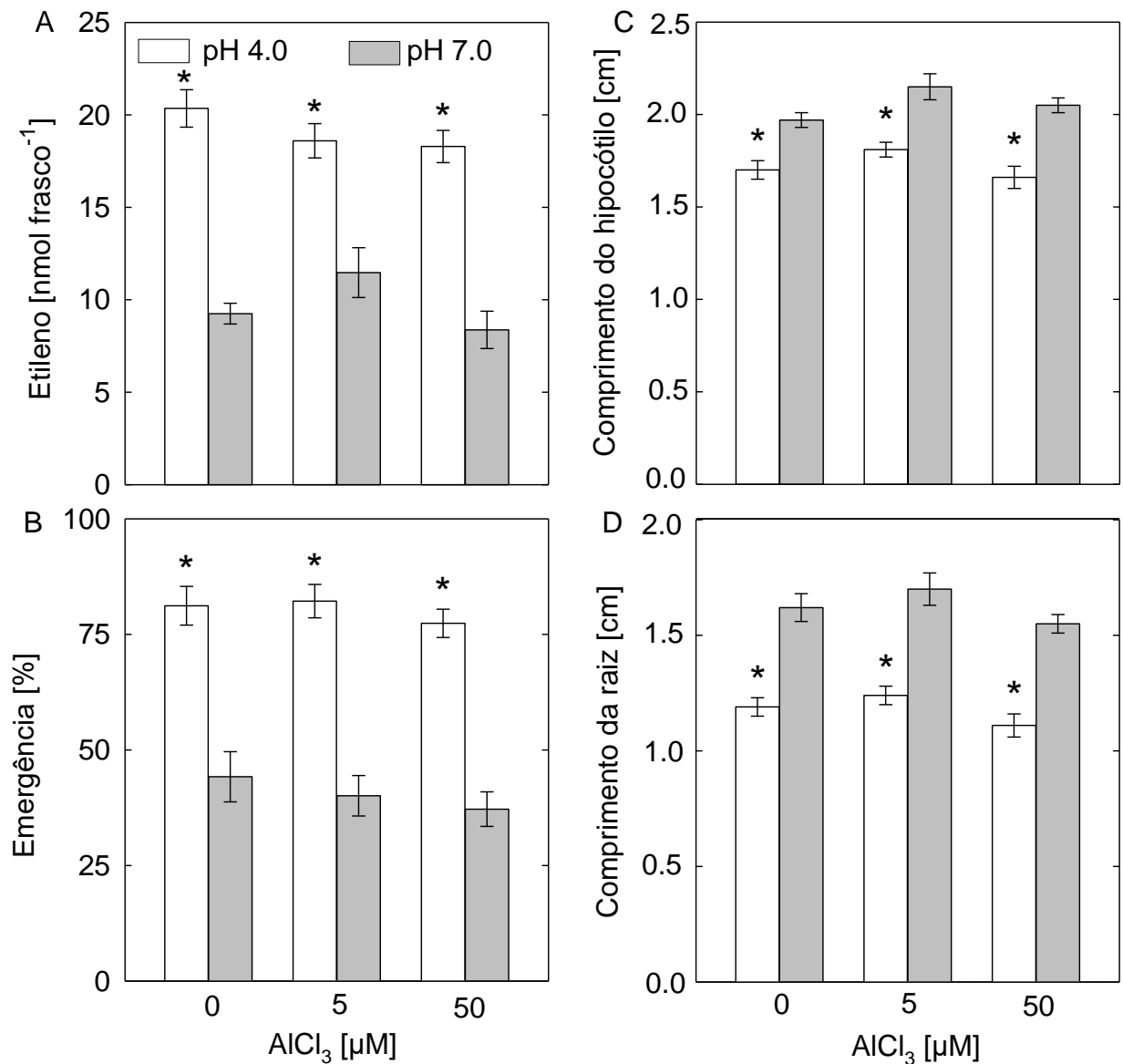


Figura S4. Emergência e produção de etileno por plântulas de *S. humilis* tratadas com diferentes concentrações de cloreto de alumínio (A e B). Desenvolvimento do hipocótilo e da raiz de plântulas de *S. humilis* (C e D). A emergência, produção de etileno e comprimento do hipocótilo e da raiz das plântulas foram analisadas aos 4 dias após o início da incubação. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos, controles, em nível de 5% pelo teste de t. Os dados são médias de três experimentos independentes, com seis repetições cada \pm erro da média.

Tabela S1. Propriedade químicas dos solos utilizados nos experimentos. Os dados são médias de quatro repetições \pm erro da média

Solo	Textura*	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	CEC	m	V
		[H ₂ O]		[mg dm ⁻³]			[cmol _c dm ⁻³]				[%]
1	MA	3.50±0.02	4.71±0.33	13.13±2.86	1.21±0.16	0.02±0.01	6.32±0.46	4.35±0.35	4.53±0.62	69.91±3.74	6.38±1.07
2	FA	3.92±0.03	0.83±0.04	26.34±3.99	0.15±0.01	0.03±0.01	0.69±0.04	3.92±0.51	4.20±0.19	69.47±4.01	6.33±0.52
3	MA	4.05±0.01	1.10±0.09	17.01±0.92	0.15±0.02	0.04±0.01	1.54±0.12	9.78±1.04	9.95±1.02	86.95±6.27	2.25±0.10
4	FAr	4.21±0.04	8.64±0.41	13.29±1.18	0.18±0.02	0.10±0.02	1.96±0.17	10.51±1.08	10.76±1.36	88.11±5.49	2.39±0.34
5	FA	4.50±0.02	1.09±0.06	5.05±0.33	0.04±0.01	0.09±0.01	1.13±0.09	6.43±0.72	6.57±0.89	91.78±7.86	1.46±0.09
6	MA	5.41±0.05	0.61±0.02	3.10±0.41	0.10±0.01	0.23±0.03	0.00±0.00	1.34±0.09	1.41±0.08	0.00±0.00	8.52±0.63
7	FAr	5.83±0.01	11.67±0.58	12.87±2.01	2.42±0.38	0.79±0.05	0.00±0.00	2.39±0.15	6.48±0.73	0.00±0.00	61.97±3.45
8	MA	6.30±0.03	10.04±0.73	32.09±1.79	6.03±0.45	2.31±0.17	0.00±0.00	5.02±0.37	13.35±1.21	0.00±0.00	62.46±2.17
9	FAr	6.52±0.04	27.89±1.35	98.87±9.82	3.22±0.25	1.45±0.09	0.00±0.00	1.87±0.08	6.62±0.35	0.00±0.00	72.78±6.91
10	FA	6,60±0.06	33.31±1.19	93.20±8.17	3.81±0.12	1.57±0.18	0.00±0.00	1.21±0.05	6.73±0.82	0.00±0.00	81.24±9.42

*MA, muito argilosa; F, franca; FAr, areia franca.

Tabela S2. Níveis de metabólitos nos tecidos da radícula e do hipocótilo em plântulas cultivadas em solo tratado com CaCO₃ (pH 6,4), em relação as plântulas mantidas em solo de pH 3,9 (-CaCO₃). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do controle, em nível de 5 % pelo teste t. Os dados são a média de seis repetições cada \pm erro da média.

Metabólito	Hipocótilo		Raiz	
	- CaCO ₃	+ CaCO ₃	- CaCO ₃	+ CaCO ₃
Sacarose	1.00±0.03	1.14±0.06	1.00±0.04	1.92±0.10
Frutose	1.00±0.05	1.48±0.10	1.00±0.09	1.41±0.03
Frutose-6-P	1.00±0.10	1.22±0.08	1.00±0.12	0.87±0.14
Glicose	1.00±0.04	1.34±0.07	1.00±0.05	1.44±0.06
Glicose-6-P	1.00±0.14	1.23±0.09	1.00±0.10	0.84±0.12
Manose	1.00±0.05	1.03±0.08	1.00±0.12	0.90±0.10
3-P-Glicerato	1.00±0.03	0.95±0.05	1.00±0.08	1.02±0.09
Mio-inositol	1.00±0.03	1.07±0.02	1.00±0.04	0.85±0.08
Alanina	1.00±0.04	0.98±0.06	1.00±0.05	0.66±0.04
Arginina	1.00±0.08	0.89±0.15	1.00±0.09	0.93±0.07
Asparagina	1.00±0.02	1.04±0.18	1.00±0.06	1.17±0.09
Aspartato	1.00±0.05	1.05±0.07	1.00±0.04	1.01±0.06
Cisteína	1.00±0.06	1.11±0.09	1.00±0.07	0.89±0.11
GABA	1.00±0.12	0.82±0.07	1.00±0.16	1.05±0.08
Glutamato	1.00±0.07	1.12±0.13	1.00±0.04	1.28±0.14
Glutamina	1.00±0.10	0.92±0.05	1.00±0.09	1.02±0.05
Glicina	1.00±0.04	1.05±0.12	1.00±0.03	1.11±0.09
Lisina	1.00±0.06	0.99±0.11	1.00±0.04	1.02±0.10
Metionina	1.00±0.04	1.12±0.06	1.00±0.03	1.15±0.11
Ornitina	1.00±0.06	1.02±0.09	1.00±0.05	1.37±0.12
Fenilalanina	1.00±0.03	1.04±0.15	1.00±0.08	1.13±0.07
Prolina	1.00±0.07	1.06±0.09	1.00±0.15	0.87±0.11
Serina	1.00±0.12	1.05±0.03	1.00±0.11	1.01±0.08
Treonina	1.00±0.05	1.01±0.07	1.00±0.04	0.89±0.09
Triptofano	1.00±0.09	0.61±0.08	1.00±0.03	0.53±0.07
Tirosina	1.00±0.11	0.88±0.14	1.00±0.06	1.05±0.13
Valina	1.00±0.10	1.01±0.05	1.00±0.07	0.83±0.10
Aconitato	1.00±0.05	1.07±0.08	1.00±0.06	1.33±0.04
Citrato	1.00±0.08	1.23±0.12	1.00±0.05	2.94±0.16
Fumarato	1.00±0.03	0.91±0.09	1.00±0.04	1.35±0.10
Isocitrato	1.00±0.11	1.18±0.15	1.00±0.09	1.31±0.06
Malato	1.00±0.03	0.95±0.05	1.00±0.06	1.42±0.13
2 OG	1.00±0.05	1.10±0.07	1.00±0.10	1.73±0.04
Oxaloacetato	1.00±0.14	1.21±0.12	1.00±0.08	1.06±0.07
Succinato	1.00±0.10	0.86±0.07	1.00±0.09	1.32±0.05
Piruvato	1.00±0.08	0.98±0.05	1.00±0.03	1.07±0.04
Putrescina	1.00±0.06	1.98±0.09	1.00±0.11	0.79±0.08
Espermidina	1.00±0.11	1.91±0.06	1.00±0.07	0.70±0.04