

ANA PAULA PIRES MARQUES

ACÚMULO E FITOTOXIDADE DO FLÚOR EM *Arabidopsis thaliana* (BRASSICACEAE)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, para 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

Marques, Ana Paula, 1990-
M357a Acúmulo e fitotoxicidade do flúor em *Arabidopsis thaliana*
2016 (Brassicaceae) / Ana Paula Marques. – Viçosa, MG, 2016.
xii, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Fisiologia vegetal. 3. Análise foliar. 4. Estresse oxidativo. 5. Efeito do flúor. 6. Microscopia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.64

ANA PAULA PIRES MARQUES

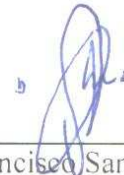
ACÚMULO E FITOTOXIDADE DO FLÚOR EM *Arabidopsis thaliana* (BRASSICACEAE)

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

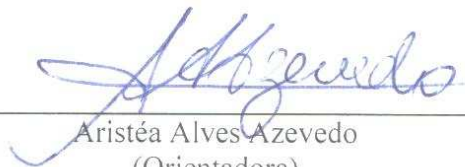
APROVADA: 1º de março de 2016.



Luzimar Campos da Silva



Bruno Francisco Sant'Anna dos
Santos



Aristéa Alves Azevedo
(Orientadora)

À minha amada família,
meus pais Moacir e Maria Emília e irmão Huguinho
pelas palavras de incentivo, amor incondicional e confiança.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, pelo amor, dedicação e apoio. Ao meu velho companheiro pai, Moacir, que me ensinou valores importantes, como dignidade, respeito e honestidade. À minha mãe, Maria Emília, pela cumplicidade e pelas palavras de apoio. Ao meu irmão, Hugo, que se fez presente nos momentos mais complicados, me protegendo e cuidando de mim. À minha irmã Wá e ao meu sobrinho Heitor, por me fazerem mais feliz.

À universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao programa de Pós-Graduação em Botânica. À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos e à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Aos companheiros de laboratório, por terem me acolhido de braços abertos, em especial ao Carlos, Katiúscia, Luana e à minha estagiária Dani, que tanto me ajudaram na realização desse trabalho. À minha orientadora gatona, Aristéa Alves Azevedo, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo carinho. Não poderia ter concluído essa etapa da minha vida sem a contribuição de vocês.

Aos meus queridos amigos, Raphael, Fran, Jéssica e Lorena, que estiveram ao meu lado durante esses dois anos, me apoiando, aconselhando e ajudando com as aplicações do flúor e as coletas. À Eliza pelo auxílio com as análises de quantificação de flúor. À minha coorientadora e amiga, Alice Pita Barbosa, que me ensinou muito e que tanto contribuiu para a minha formação profissional. Obrigada por me confiar esse trabalho incrível!

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, ao Departamento de Física, em especial o Prof. René, pelo suporte dado para a realização da microscopia eletrônica de varredura. Ao departamento de química, em especial ao Prof. Efraim, que realizou as leituras do flúor nas amostras.

Ao Programa de Fisiologia Vegetal, em nome dos Prof. Fábio Murilo da Matta, Prof. Adriano Nunes Nesi e Prof. Wagner Luiz Araújo por permitirem a utilização dos equipamentos e dos laboratórios coordenados pelos mesmos.

Aos meus colegas de disciplinas, por todos momentos compartilhados de alegrias, provas, saídas de campo e apresentação de trabalhos.

A Deus, meu paizinho do céu, pelas bênçãos alcançadas, proteção, saúde e por me amar incondicionalmente! Deus está presente ao meu lado em todos os momentos, abrindo as portas nessa longa caminhada pela vida. Obrigada por se fazer vencedor na minha vida!

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha conquista, Obrigada!

BIOGRAFIA

Ana Paula Pires Marques, filha de Moacir Eugênio Fadini Marques e Maria Emília Pires, nasceu em Belo Horizonte, MG, em 03 de outubro de 1990.

Ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros em fevereiro de 2010, e concluiu o curso de bacharelado em Ciências Biológicas em dezembro de 2013.

Em março de 2014, iniciou o mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, com ênfase em Anatomia Vegetal, concluindo o curso com a defesa da dissertação intitulada “Respostas morfoanatômicas e fisiológicas da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ao estresse causado pelo flúor” em março de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESE	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1: Alterações morfoanatômicas das folhas da espécie modelo Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) induzidas pela hiperacumulação de flúor	7
RESUMO	7
ABSTRACT	8
Introdução	9
Material e métodos	10
Condições de cultivo e delineamento experimental.....	10
Determinação do teor de F	11
Caracterização visual e análise de crescimento.....	11
Análise micromorfológica.....	12
Caracterização em microscopia de luz.....	12
Análises micromorfolométricas	13
Resultados	13
Acúmulo de F na parte aérea	13
Injúrias foliares visíveis e análise de crescimento	13
Danos nas superfícies foliares – micromorfologia.....	14
Alterações anatômicas na lâmina foliar – microscopia de luz.....	15
Discussão	17
Referências bibliográficas	21
Legenda das figuras	26
Figuras	29
CAPÍTULO 2: Tolerância de Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) ao flúor: Aspectos fisiológicos.....	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
Introdução	41
Material e métodos	42
Condições de cultivo e delineamento experimental.....	42
Determinação do teor de F e nutrientes	43
Avaliação do estresse oxidativo.....	43
Compostos fenólicos solúveis (CFS)	44
Teor relativo de água nas folhas(TRA).....	44
Quantificação de açúcares	45
Trocas gasosas	45
Pigmentos fotossintéticos.....	45
Estatística.....	46
Resultados	46
Teor de F e de nutrientes	46
Estresse oxidativo e defesa antioxidante	46
Quantificação de açúcares	47
Teor relativo de água.....	47

Trocas gasosas.....	47
Pigmentos fotossintéticos.....	48
Discussão	49
Referências bibliográficas	54
Tabelas	59
Legenda das figuras	60
Figuras	61
CONCLUSÕES GERAIS	64

RESUMO

MARQUES, Ana Paula Pires. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2016. **Acúmulo e fitotoxicidade do flúor em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)**. Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Coorientadores: Alice Pita Barbosa e Adriano Nunes Nesi.

O flúor (F), elemento mais eletronegativo da tabela periódica, é liberado para atmosfera por diversas atividades industriais, sendo facilmente absorvido pelas plantas através das folhas. A sua fácil absorção e alta reatividade com biomoléculas torna o F um dos poluentes atmosféricos mais fitotóxicos, pois gera danos oxidativos e altera o desenvolvimento celular. Embora existam muitas informações sobre os efeitos do F na fisiologia e estrutura das plantas, ainda é necessário compreender melhor os mecanismos de tolerância desenvolvidas pelas plantas em resposta ao estresse, e isso se torna mais fácil em uma espécie modelo. Além disso, conhecer os efeitos do F sobre uma espécie modelo de ensaios moleculares é extremamente importante para que análises posteriores de transcriptoma, proteoma e metaboloma sejam realizadas afim de elucidar os mecanismos de ação do poluente. *Arabidopsis thaliana* é uma planta modelo muito utilizada em trabalhos moleculares e ecotoxicológicos e, apesar das inúmeras vantagens de se trabalhar com essa espécie, são raros os estudos sobre os efeitos do F na mesma. Desta forma, objetivou-se compreender os efeitos do F em *A. thaliana*, e os mecanismos de defesa dessa espécie envolvidos no combate à fitotoxidez causada por este elemento. Para isso, plantas de *A. thaliana* foram submetidas à nevoeiros com 0, 20, 40 e 80 mg F L⁻¹ por dez dias consecutivos, aplicando-se 15 mL de solução duas vezes ao dia. Ao término do experimento foram feitas coletas para a determinação do teor de F, e para avaliações das alterações morfoanatômicas, micromorfológicas, e fisiológicas. *A. thaliana* acumulou altíssimas concentrações de F nas folhas, mesmo nas plantas expostas a 20 mg F L⁻¹, as quais não desenvolveram sintomas visuais de fitotoxidez, o que a caracteriza como espécie hiperacumuladora e tolerante. Nos tratamentos com 40 e 80 mg F L⁻¹, necroses foliares iniciaram com 96 e 48 h, respectivamente, após a primeira aplicação dos nevoeiros, ocorrendo como pequenas manchas acinzentadas distribuídos pela lâmina foliar, incluindo margem e ápices. Foi observada redução na produção de biomassa e murcha foliar em função do aumento de F nos nevoeiros. Os danos na superfície das folhas foram caracterizados pelo aspecto plasmolisado das células, erosão das ceras epicuticulares, deformações das cristas estomáticas e da base dos tricomas, além

da ruptura da parede periclinal externa das células epidérmicas. Estruturalmente, foram observadas deformações nas nervuras medianas das folhas, redução do tamanho dos feixes vasculares, e estreitamento da lâmina foliar nas regiões onde as células do parênquima lacunoso colapsaram. Entretanto, nos locais com ocorrência de hipertrofia celular e aumento do número de células no mesófilo houve um aumento da espessura. A face abaxial da folha foi mais afetada pelo F do que a adaxial, sendo observadas reentrâncias, redução do tamanho das células e ruptura da epiderme nessa face, enquanto que a epiderme da face adaxial se manteve intacta. Foi verificado aumento significativo na área dos elementos de vasos na nervura mediana em folhas expostas ao poluente mas sem injúria aparente. O F aumentou os níveis de aldeído malônico, indicando a ocorrência de estresse oxidativo, o qual contribuiu para a redução da assimilação interna de carbono (A), pigmentos fotossintetizantes (por degradação) e respiração (R_d). Além disso, o F elevou a concentração interna de carbono (C_i) e redução da condutância estomática (g_s), ocasionada pela obliteração dos ostíolos por fragmentos de ceras epicuticulares, e perda da turgidez pelas células-guarda. Esses resultados sugerem aparentes limitações bioquímicas à fotossíntese, com possíveis reduções da atividade de enzimas do ciclo de Calvin, tais como a RuBisCO. *A. thaliana* demonstrou elevada tolerância ao F, já que a menor concentração utilizada neste trabalho (correspondente ao dobro da detectada em regiões poluídas) não promoveu danos severos e ainda resultou no elevado acúmulo do poluente nos tecidos. *A. thaliana* é uma espécie promissora em estudos sobre os mecanismos moleculares de combate ao estresse oxidativo causado pelo F.

ABSTRACT

MARQUES, Ana Paula Pires. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Phytotoxicity and accumulation of fluoride in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae).** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-advisers: Alice Pita Barbosa and Adriano Nunes Nesi.

The fluorine (F), most electronegative element of the periodic table, is released to atmosphere from various industrial activities, being easily absorbed by the plants through the leaves. Its easy absorption and high reactivity with biomolecules makes the F one of the most phytotoxic air pollutants because it generates oxidative damage and changes the cellular development. Although there are a lot of information about the effects of F in physiology and structure of plants, it is still necessary to better understand the mechanisms of tolerance developed by plants in response to stress, and it becomes easier in a kind model. Also, knowing the effects of F on a kind model of molecular assays is extremely important for further analysis of transcriptome, proteome and metabolome are carried out in order to elucidate the mechanisms of action pollutant. *Arabidopsis thaliana* is a model plant widely used in molecular and ecotoxicological studies and, despite the many advantages of working with this kind are few studies on the effects of F in it. Thus, this study aimed to understand the effects of F in *A. thaliana*, and the defense mechanisms of this kind involved in combating toxicity symptoms caused by this element. Thus, plants of *A. thaliana* were submitted to fog with 0, 20, 40 and 80 mg F L⁻¹ for ten consecutive days, applying 15 ml of solution twice daily. At the end of experiment were made collections for determining the F content, and evaluations of morphoanatomic, Micromorphological, and physiological. *A. thaliana* accumulated extremely high fluoride concentrations in leaves, even in plants exposed to 20 mg F L⁻¹, which did not develop visible symptoms of phytotoxicity, which characterized as tolerant hyperaccumulator species. In the treatments with 40 and 80 mg F L⁻¹, foliar necrosis started with 96 and 48 h, respectively, after the first application of fogs, occurring as small gray spots distributed by leaf blade, including margin and apexes. There was a reduction in biomass production and leaf wilt due to the increase of F in the fogs. Damage to the leaf surface were characterized by the appearance of cells plasmolisado, erosion of the waxes, deformations of stomatal crests and the base of trichomes, beyond the rupture of the outer wall paraclinal of epidermal cells. Structurally, the median veins of the leaves deformations were observed, reducing the size of vascular bundles, and narrowing of the leaf blade in

the regions where the cells of the spongy parenchyma collapsed. However, in areas with occurrence of cellular hypertrophy and an increase in the number of mesophyll cells was increased thickness. The abaxial side of the leaf was more affected by the adaxial F, recesses being observed, reduction of cell size and epidermis break this surface, while the adaxial epidermal remained intact. significant increase was seen in the area of vessel elements in the midrib in leaves exposed to the pollutant but no apparent injury. F increased malondialdehyde levels, indicating the occurrence of oxidative stress, which contributed to the reduction of carbon internal assimilation (A), photosynthetic pigments (degradation) and respiration (Rd). Furthermore, the F increased internal concentration of carbon (C) and reduced stomatal conductance (gs) caused by obstruction of ostia fragments by epicuticular waxes, and loss of turgor the guard cells. These results suggest apparent biochemical limitations to photosynthesis, possible reduction of the enzyme activity of the Calvin cycle, such as RuBisCO. *A. thaliana* showed high tolerance to F, since the lower concentrations used in this study (corresponding to double the detected in polluted areas) did not cause severe damage and even resulted in increased accumulation of pollutant tissue. *A. thaliana* is a promising species in studies of the molecular mechanisms of combating oxidative stress caused by F.

INTRODUÇÃO GERAL

A poluição do ar, decorrente da expansão urbana e industrial, gera impactos à saúde animal e à vegetação (Khavaninzadeh et al. 2014). A região sudeste brasileira possui algumas cidades com intensa atividade siderúrgica, as quais emitem uma grande quantidade de poluentes para a atmosfera (Klumpp et al. 1995; Mackowiak et al. 2003), dentre eles o flúor (F). Sua emissão ocorre, principalmente, na forma de ácido fluorídrico (HF), através da siderurgia de alumínio (Weinstein e Davison 2003) a produção de fertilizantes fosfatados (Loganathan et al. 2004), e a fabricação de vidros e cerâmicas (Cape et al. 2003).

O F é o elemento mais eletronegativo da tabela periódica e, por isso, altamente reativo com biomoléculas, alterando atividades de enzimas do metabolismo basal. Além disso, é facilmente absorvido pelas plantas, o que o torna um dos poluentes atmosféricos mais fitotóxicos (Ruan et al. 2003). A folha é a principal via de absorção e acúmulo do F gasoso ou em solução, sendo, portanto, o órgão mais afetado por este poluente (Li et al. 2011; Baunthiyal et al. 2014). O F penetra nas folhas através dos estômatos (Pulyaevskaya et al. 2011), cutícula e tricomas, sendo conduzido na forma iônica via simplasto através de canais de ânions (Zhang et al. 2016).

Uma vez no citoplasma, o F interage com membranas e biomoléculas, promovendo o estresse oxidativo, a inativação de proteínas e mutações no DNA (Kamaluddin e Zwiazek 2003; Li et al. 2011). Essa interação altera vários processos fisiológicos e bioquímicos vitais, como a fotossíntese e a respiração, o transporte de água e a produção de compostos de defesa (Kamaluddin e Zwiazek 2003; Baunthiyal et al. 2014; Ram et al. 2014). Além disso, o estresse oxidativo gerado pelo F pode afetar a estrutura das células e tecidos, desencadeando a morte celular, que resulta no surgimento e desenvolvimento de sintomas visuais (Li et al. 2011).

No interior das folhas, os íons de F são conduzidos pelo xilema, através da corrente transpiratória, principalmente para as margens e o ápice, onde se acumulam. Essas regiões geralmente são as primeiras a apresentarem injúrias visíveis, como clorose e necrose (Pulyaevskaya et al. 2011; Sant'Anna-Santos et al. 2012; Baunthiyal et al. 2014). Outros sintomas visuais, como a deformação das folhas e a redução do crescimento das plantas, foram relatados em espécies expostas a esse poluente (Ram et al. 2014). Além disso, alguns autores já observaram redução no sistema radicular, que levou a diminuição no

teor de vários nutrientes, como o Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, N, P, K e Mo (Elloumi et al. 2005; Panda 2015).

O aparecimento e a severidade das injúrias depende do tempo de exposição ao F, da sua concentração na atmosfera e das características morfoanatômicas/fisiológicas da espécie estudada (Weinstein e Davison 2003; Baunthiyal et al. 2014; Sant'Anna-Santos et al. 2014), as quais conferem maior ou menor tolerância ao poluente. Estudos realizados no Brasil demonstraram as vantagens do uso de plantas bioindicadoras em ambientes com alto teor de F atmosférico (Silva et al. 2000; Cape et al. 2003; Fornasiero 2003; Sant'Anna-Santos et al. 2010; Sant'Anna-Santos et al. 2014), bem como a importância do conhecimento sobre o acúmulo deste elemento em espécies utilizadas na alimentação humana (Campos et al. 2010; Sant'Anna-Santos e Azevedo 2010). Apesar da grande quantidade de informações sobre os efeitos do F em diversas espécies vegetais, ainda não foram esclarecidos os mecanismos de tolerância/susceptibilidade das espécies ao poluente. As informações geradas pelos estudos morfoanatômicos e fisiológicos podem subsidiar trabalhos de fitorremediação e de biologia molecular que identifiquem genes/transcritos envolvidos no combate ao F em espécies tolerantes. Além disso, a identificação de espécies sensíveis e a seleção de caracteres indicativos da presença do F constitui uma importante informação para trabalhos de bioindicação. Nesse contexto, o uso de uma espécie modelo facilita o estudo e a compreensão das estratégias desenvolvidas pelas plantas em resposta ao F.

Arabidopsis thaliana (Brassicaceae), espécie originária de regiões da Europa, Ásia e América do Norte (Hoffmann 2002), é uma planta modelo em trabalhos de biologia molecular, genética, bioquímica e fisiologia vegetal (Krizek et al. 2003; Lee et al. 2005), por apresentar vantagens, como pequeno porte, ciclo de vida curto e genoma reduzido e completamente sequenciado. O pequeno tamanho dessa espécie possibilita o seu cultivo em espaços reduzidos de laboratório, permitindo obter um grande número de plantas em um ambiente restrito. O ciclo de vida completo de *A. thaliana* é de aproximadamente 40 dias, durante o qual há a produção autogâmica de uma grande quantidade de sementes (Meinke 1998). Além disso, cerca de 85 % do seu genoma é constituído por genes codificantes, o que facilita a compreensão mais rápida das funções codificadas por cada gene (Bevan e Walsh 2005; Lee et al. 2005).

A. thaliana já foi empregada em diversos estudos ecotoxicológicos (Krizek et al. 2003; Drazkiewicz et al. 2004; Guo et al. 2008; Besson-Bard et al. 2009) e as suas respostas a vários outros poluentes atmosféricos, como dióxido de carbono (Easlon et al. 2015), dióxido de enxofre (Van der Kooij et al. 1997; Kubo 1999) e óxido nítrico (Shi et al. 2012) já foram bem caracterizadas. Alguns autores já investigaram os efeitos do F sobre parâmetros fisiológicos de células de *A. thaliana* cultivadas in vitro (Pulyaevskaya et al. 2011), bem como seu efeito no transporte de água pelo seu sistema radicular, quando associado ao cloreto de sódio (Lee e Zwiazek 2015).

Apesar de todas as vantagens de utilizar uma espécie modelo em estudos de poluição ambiental, a fim de compreender os mecanismos controladores das respostas aos poluentes, praticamente nada se conhece sobre os efeitos do F nos diversos aspectos fisiológicos e anatômicos de *A. thaliana*. Além disso, não é conhecido se essa espécie é tolerante ou sensível ao poluente e isso é fundamental para a realização de estudos posteriores com *A. thaliana*.

OBJETIVOS

- Determinar o potencial acumulador de F das plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar a fitotoxicidade causada pelo F em *A. thaliana*.
- Avaliar as respostas morfoanatômicas e fisiológicas de *A. thaliana* ao F.

HIPÓTESE

- O F é absorvido pelas folhas e acumulado na parte aérea de *Arabidopsis thaliana* causando danos oxidativos aos tecidos foliares que culminam em alterações metabólicas/fisiológicas e estruturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baunthiyal M, Bhatt A, Ranghar S (2014). Fluorides and its effects on plant metabolism. *International Journal of Agricultural Technology* **10**, 1–27.
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Tacconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**, 1302–1315.
- Bevan M, Walsh S (2005). The *Arabidopsis* genome: A foundation for plant research. *Genome Research* **15**, 1632–1642.
- Campos NV, Azevedo AA, Sant'Anna-Santos BF (2010). Acúmulo e efeitos fitotóxicos do flúor em folhas de boldo-gambá e capim-cidreira utilizadas para chás. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **45**, 646–653.
- Cape JN, Fowler D, Davison A (2003). Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: Recent trends and research needs. *Environment International* **29**, 201–211.
- Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* **17**, 379–387.
- Easlon HM, Carlisle E, McKay JK, Bloom AJ (2015). Does low stomatal conductance or photosynthetic capacity enhance growth at elevated CO₂ in *Arabidopsis thaliana*? *Plant Physiology* **168**, 156–163.
- Elloumi N, Abdallah FB, Mezghani I, Rhouma A, Boukhris M (2005). Effect of fluoride on almond seedlings in culture solution. *Fluoride* **38**, 193–198.
- Fornasiero RB (2003). Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: First field observations. *Plant Science* **165**, 507–513.
- Guo J, Dai X, Xu W, Ma M (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* **72**, 1020–1026.
- Hoffmann MH (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L .). *Journal of Biogeography* **29**, 125–134.
- Kamaluddin M, Zwiazek JJ (2003). Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **117**, 368–375.

- Khavaninzadeh AR, Veroustraete F, Buytaert JAN, Samson R (2014). Leaf injury symptoms of *Tilia* sp. as an indicator of urban habitat quality. *Ecological Indicators* **41**, 58–64.
- Klumpp G, Klumpp A, Domingos M, Guderian R (1995). Hemerocallis as bioindicator of fluoride pollution in tropical countries. *Environmental Monitoring and Assessment* **35**, 27–42.
- Krizek BA, Prost V, Joshi RM, Stoming T, Glenn TC (2003). Developing transgenic *Arabidopsis* plants to be metal-specific bioindicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 175–181.
- Kubo A (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **112**, 279–290.
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 827–836.
- Lee SH, Zwiazek JJ (2015). Regulation of aquaporin-mediated water transport in *Arabidopsis* roots exposed to NaCl. *Plant and Cell Physiology* **56**, 750–758.
- Li C, Zheng Y, Zhou J, Xu J, Ni D (2011). Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine. *Biologia Plantarum* **55**, 563–566.
- Loganathan P, Hedley M, Bretherton M, Rowarth J (2004). Accounting for particle movement when assessing the dissolution of slow release fertilizers in field soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **70**, 77–84.
- Mackowiak C, Grossl P, Bugbee B (2003). Biogeochemistry of fluoride in a plant solution system. *Journal of Environmental Quality* **32**, 2230–2237.
- Meinke DW (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662–682.
- Panda D (2015). Fluoride toxicity stress: Physiological and biochemical consequences on plants. *International Journal Biological – Research Environmental Agricultural Science* **1**, 70-84.
- Pulyaevskaya MA, Varakina NN, Gamburg KZ, Rusaleva TM, Stepanov AV, Voinikov VK, Rikhvanov EG (2011). Sodium fluoride inhibits HSP synthesis in heat-stressed cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**, 589–

596.

- Ram A, Verma P, Gadi BR (2014). Effect of fluoride and salicylic acid on seedling growth and biochemical parameters of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Fluoride* **47**, 49–55.
- Ruan J, Ma L, Shi Y, Han W (2003). Uptake of fluoride by tea plant (*Camellia sinensis* L) and the impact of aluminum. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1342–1348.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Alves TG, Campos NV, Oliva MA, Valente VMM (2014). Effects of emissions from an aluminum smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water, Air, and Soil Pollution* **225**, 1817.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Silva LC, Oliva MA (2012). Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **84**, 689–702.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA (2010). Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. *Acta Botânica Brasilica* **24**, 952–963.
- Sant'Anna-Santos BF, Silva LC, Azevedo AA, Aguiar R (2010). Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 313–321.
- Shi HT, Li RJ, Cai W, Liu W, Wang CL, Lu YT (2012). Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* **53**, 344–357.
- Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2000). Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Revista Brasileira de Botânica* **23**, 385–393.
- Van der Kooij TAW, De Kok LJ, Haneklaus S, Schnug E (1997). Uptake and metabolism of sulphur dioxide by *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **135**, 101–107.
- Weinstein LH, Davison AW (2003). Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. *Environmental Pollution* **125**, 3–11.
- Zhang X-C, Gao H-J, Yang T-Y, Wu H-H, Wang Y-M, Zhang Z-Z, Wan X-C (2016). Anion channel inhibitor NPPB-inhibited fluoride accumulation in tea plant (*Camellia sinensis*) is related to the regulation of Ca^{2+} , CaM and depolarization of plasma membrane potential. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 57.

CAPÍTULO 1

Alterações morfoanatômicas das folhas da espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) induzidas pela hiperacumulação de flúor

RESUMO – O flúor (F) é um dos poluentes atmosféricos mais fitotóxicos, geralmente associado ao aparecimento de lesões macro e microscópicas nas folhas de plantas susceptíveis. A fim de avaliar os efeitos do F na estrutura e micromorfologia de *Arabidopsis thaliana*, o seu acúmulo nas folhas e o grau de tolerância desta espécie ao poluente, as plantas foram expostas à nevoeiros simulados com flúor (0, 20, 40 e 80 mg F L⁻¹), aplicando-se 15 mL de solução duas vezes ao dia, por dez dias consecutivos. Amostras de folhas com e sem sintomas aparentes foram coletadas para análises microscópicas, de crescimento e determinação do teor de F na matéria seca (MS). *A. thaliana* acumulou concentrações elevadas de F nas folhas (entre 1367 e 10300 µg de F g⁻¹ de MS), o que a caracteriza como uma planta hiperacumuladora (teor acumulado ≥ à 1000 µg F g⁻¹ de MS). Plantas expostas a 20 mg F L⁻¹ (concentração considera elevada) não desenvolveram sintomas visuais de fitotoxidez até o fim do experimento, apesar de apresentarem algumas alterações anatômicas, evidenciando relativa tolerância dessa espécie ao poluente. As necroses iniciaram 96 e 48 h após a primeira simulação, nas plantas expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹, respectivamente, principalmente como pequenas manchas acinzentadas distribuídos por toda lâmina foliar. Nestas concentrações, o F induziu a murcha da folhas e promoveu redução do crescimento da parte aérea. A face abaxial da folha foi a mais afetada pelo poluente, sendo observadas alterações anatômicas em todos os tratamentos com F, mesmo na ausência de sintomas visuais (20 mg F L⁻¹), ressaltando a importância da micromorfologia e anatomia no diagnóstico preciso da poluição por F. A superfície das folhas apresentou erosão das ceras, deformação nos estômatos e tricomas e ruptura da epiderme. Estruturalmente, foi observada deformação na nervura mediana, redução do tamanho dos feixes vasculares, aumento na área dos elementos de vaso, hipertrofia celular e maior compactação do mesofilo foliar pelo aumento do número de células. As alterações anatômicas observadas são típicas da fitotoxidez causada pelo F, constituindo-se parâmetros eficientes no diagnóstico de espécies susceptíveis ao poluente.

Palavras-chave: Acúmulo de flúor, necrose, anatomia foliar.

**Morphoanatomic changes of the leaves of the model species *Arabidopsis thaliana*
(Brassicaceae) induced by fluoride hyperaccumulation**

ABSTRACT – Fluorine (F) is one of the most phytotoxic air pollutants, usually associated with the onset of macroscopic and microscopic lesions on the leaves of susceptible plants. In order to evaluate the effect of F on structure and ultrastructure of *Arabidopsis thaliana*, its accumulation in the leaves and the degree of tolerance of this kind the pollutant, the plants were exposed to mist simulated fluoride (0, 20, 40 and 80 mg F L⁻¹), applying 15 ml of solution twice daily for ten consecutive days. Leaf samples with and without apparent symptoms were collected for microscopic analysis, growth and determination of F content in dry matter (DM). *A. thaliana* accumulated elevated concentrations of F in the sheets (between 1367 and 10300 µg F g⁻¹ DM), which characterizes it as a hyperaccumulator plant (aggregate content ≥ 1000 µg F g⁻¹ DM). Plants exposed to 20 mg F L⁻¹ (concentration considered high) did not develop visual symptoms of phytotoxicity to the end of the experiment, despite having some anatomical changes, showing relative tolerance of this species to the pollutant. The necrosis began 96 and 48 h after the first simulation in plants exposed to 40 F and 80 mg L⁻¹, respectively, especially as small gray spots distributed over the entire leaf blade. At these concentrations, the F induced wilting leaves and promoted reduction of shoot growth. The abaxial leaf was the most affected by the pollutant, anatomical changes being observed in all treatments F, even in the absence of visual symptoms (20 mg F L⁻¹), highlighting the importance of its morphology and anatomy in accurate diagnosis of pollution by F. the surface of the leaves showed erosion of waxes, deformation in stomata and trichomes and break the skin. Structurally, deformation was observed in the midrib, reducing the size of the vascular bundles, increase in the area of vessel elements, and cellular hypertrophy greater compression of the leaf mesophyll by increasing the number of cells. The anatomical changes observed are typical of phytotoxicity caused by F, being efficient parameters in the diagnosis of species susceptible to pollution.

Keywords: Fluoride accumulation, necrosis, leaf anatomy.

Introdução

O flúor (F) é o halogênio mais abundante na crosta terrestre (Weinstein e Davison 2003), ocorrendo principalmente na forma de minerais nos solos e de ácido fluorídrico (HF) na atmosfera (Camargo 2003). Esse elemento é emitido para a atmosfera através de erupções vulcânicas, e por diversos processos industriais (Weinstein e Davison 2003; Loganathan et al. 2004). Por não ser um elemento essencial para o crescimento das plantas, concentrações atmosféricas de F acima de 1 mg F L^{-1} são altamente fitotóxicas (Barbier et al. 2010).

A absorção do F atmosférico pelas plantas ocorre, preferencialmente, via estômatos (Pulyaevskaya et al. 2011), cutícula e tricomas (Baunthiyal et al. 2014) das folhas, os quais são drasticamente afetados na presença desse poluente. Injúrias foliares, como cloroses e necroses, assim como, a redução do crescimento das plantas, são os principais sintomas visuais de fitotoxidez induzida pelo F (Pulyaevskaya et al. 2011; Ram et al. 2014). Entretanto, algumas espécies vegetais podem acumular grandes quantidades de F em seus tecidos ($> 1000 \mu\text{g F g}^{-1}$ de MS), o que as caracterizam como hiperacumuladoras, e podem não desenvolver sintomas visuais de fitotoxidez, sendo consideradas tolerantes ao poluente na avaliação deste aspecto por alguns autores (Baunthiyal e Ranghar 2015). Entretanto, mesmo não desenvolvendo injúrias visíveis, as plantas podem apresentar mudanças estruturais nos órgãos expostos ao poluente, tais como sinuosidades e achatamento da parede externa das células epidérmicas e redução da espessura da epiderme e da lâmina foliar (Silva et al. 2000; Sant'Anna-Santos et al. 2012). Outras alterações observadas em folhas sintomáticas, como: deformações nos estômatos, tricomas e nervura mediana; ruptura da epiderme e erosão das ceras epicuticulares; retração do parênquima clorofiliano; hipertrofia celular e acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos foram atribuídas a poluição atmosférica por F (Fornasiero 2001; Silva et al. 2000; Wang et al. 2013; Sant'Anna-Santos et al. 2014). Deste modo, o uso integrado da sintomatologia com análises microscópicas contribui para a elucidação dos mecanismos de fitotoxidez do F e na determinação da tolerância/sensibilidade da espécie (Silva et al. 2000; Fornasiero 2001; Fornasiero 2003; Sant'Anna-Santos et al. 2012; Sant'Anna-Santos et al. 2014).

A captação de F pelas plantas e o seu acúmulo nos tecidos oferecem riscos à saúde humana, uma vez que o mesmo é transferido, através da cadeia alimentar, aos mais altos

níveis tróficos (Valdez-Jimenez et al. 2011). Portanto, o modo de ação deste poluente, nas diferentes espécies vegetais, tem atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores (Ruan et al. 2003; Baunthiyal et al. 2014; Sant'Anna-Santos et al. 2014; Boukhris et al. 2015).

Arabidopsis thaliana, espécie modelo amplamente distribuída pelas regiões temperadas, é uma das plantas mais utilizadas em estudos moleculares, genéticos, bioquímicos e fisiológicos (Krizek et al. 2003; Lee et al. 2005). O uso dessa planta em ensaios ecotoxicológicos vem crescendo nos últimos anos (Drazkiewicz et al. 2004; Guo et al. 2008; Besson-Bard et al. 2009; Shi et al. 2012; Easlon et al. 2015), de modo que, alguns autores já relataram os efeitos da exposição ao F sobre alguns parâmetros fisiológicos de *A. thaliana* (Pulyaevskaya et al. 2011; Yang et al. 2015; Lee e Zwiazek 2015). Porém, o presente trabalho é o primeiro a investigar alterações morfoanatômicas de *A. thaliana* quando expostas ao F. Além disso, é extremamente importante ressaltar que as características morfoanatômicas são responsáveis pela maior ou menor tolerância das plantas aos poluentes atmosféricos (Weinstein e Davison 2003). A estrutura simples e delicada das folhas de *A. thaliana* (Boeger e Poulson 2006) pode torná-la mais susceptível a ação do F atmosférico, promovendo o surgimento de alterações microscópicas e injúrias visuais, o que facilitaria a melhor compreensão dos mecanismos de ação deste poluente em plantas. Além disso, estudos anatômicos podem subsidiar o entendimento de como os processos fisiológicos e bioquímicos são alterados.

Nesse sentido, foram avaliados os efeitos da exposição prolongada (10 dias consecutivos, correspondentes à 25% do ciclo de vida da planta) de *A. thaliana* ao F em nevoeiros simulados, estimando o seu potencial acumulador e o grau de tolerância ao poluente. Para alcançar este objetivo, foi feita uma análise integrada que combina caracterização visual e anatômica, micromorfológica e micromorfométrica. Além disso, foi testada a seguinte hipótese: O F acumulado nas plantas de *A. thaliana* expostas ao poluente induz alterações morfoanatômicas nas folhas desta espécie.

Material e métodos

Condições de cultivo e delineamento experimental

As sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia-0 (Col-0), “wild type” (WT) foram semeadas em vasos de cultivo (5 x 55 mm; 80 ml) contendo substrato

comercial Tropstrato HT®. Após a sementeira, os vasos foram mantidos em câmara fria à 4 °C por quatro dias (estratificação), e, em seguida, foram transferidos para sala de crescimento com temperatura controlada (18 °C), fotoperíodo (16 h), luminosidade (~100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). As plantas usadas no experimento possuíam cerca de 21 dias, e permaneceram nas mesmas condições de cultivo descritas acima até o final do experimento. A adubação foi realizada semanalmente com a solução nutritiva Biofert Universal (NPK 6:4:4 + 10 nutrientes).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos (0, 20, 40 e 80 mg F L⁻¹) e cinco repetições para cada análise (uma planta por vaso). O F foi fornecido na forma de KF (pH 6,0), enquanto o controle recebeu apenas água desionizada (pH 6,0). As aplicações foram realizadas durante dez dias consecutivos na forma de nevoeiro, sendo aplicado 15 mL de solução, duas vezes ao dia, em cada planta, afim formar e manter as gotas d'água/soluções em contato com a superfície da folha por mais tempo. As concentrações de F, o volume aplicado e a duração do experimento foram definidos em testes preliminares, de acordo com relatos anteriores na literatura para outras espécies (Sant'Anna-Santos et al., 2006; 2014), tamanho e ciclo de vida da planta (cerca de 40 dias), respectivamente. Ao término do experimento, amostras foliares da região mediana das rosetas, foram coletadas e destinadas às análises descritas a seguir.

Determinação do teor de F

As folhas foram secas em estufa de ventilação forçada a 70 °C, por 72 h e reduzidas em moinho tipo Willey a partículas com dimensões inferiores a 1 mm. A extração foi realizada a partir de 0,15 g de folhas secas e moídas, utilizando-se ácido sulfúrico (1 N) por 20 min à 50 °C. Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio (1N) e o ajustador de força iônica TISAB (Fialho 1997). A determinação potenciométrica do teor de F na solução resultante foi realizada com eletrodo seletivo de F iônico.

Caracterização visual e análise de crescimento

As plantas foram observadas diariamente durante todo o experimento, e a progressão dos sintomas foi registrada através de fotografias tiradas em dias alternados (câmera digital Cyber-Shot DSC-W310, Sony Corporation, Japão), a partir do início dos

sintomas até o dia seguinte a última aplicação de F, em folhas expandidas e não senescentes.

O efeito do F no crescimento de *A. thaliana* foi mensurado, um dia após ao término das aplicações, pela determinação da biomassa fresca das folhas. Foram coletadas todas as folhas e pesadas em balança de precisão analítica, obtendo-se a massa de matéria fresca (MF).

Análise micromorfológica

Amostras da porção mediana das folhas expandidas foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965), desidratadas em série etílica e secas ao ponto crítico (aparelho Critical Point Dryer, Modelo CPD 030, Balzers, Liechtenstein). Os fragmentos foram cobertos com ouro em metalizador (Sputter Coater modelo FDU010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e as imagens foram registradas em microscópio eletrônico de varredura com câmera digital acoplada (modelo JSM - 6010 LA, Joel, Tokyo, Japão) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Física (DPF) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Caracterização em microscopia de luz

Amostras da porção mediana de folhas em expansão e expandidas, ambas contendo a transição entre uma região visualmente saudável e uma injuriada, foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965), desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes transversais (8 μm de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Illinois, EUA) e corados com azul de Toluidina 0,05 % (pH 4,7) (O'Brien e Mc Mully 1981). As lâminas permanentes foram montadas em Permout e fotografadas em microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (modelo Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Análises micromorfométricas

As análises micromorfométricas foram realizadas em regiões visualmente saudáveis das folhas, não correspondentes a região de transição com necroses. Secções transversais da região mediana foram obtidas e fotografadas como descrito acima. Foram mensuradas a espessura da lâmina foliar e a área dos seis elementos de vaso com maior diâmetro da nervura mediana.

Para cada avaliação, foram usadas cinco repetições por tratamento, seis lâminas por repetição, cinco cortes por lâmina, e seis medições por parâmetro, totalizando 450 medições em cada parâmetro por tratamento. As medições foram realizadas no software Image Pro-Plus, versão 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Estatística

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa Assistat (versão 7.6 beta).

Resultados

Acúmulo de F na parte aérea

O teor de F nas folhas de *A. thaliana* cresceu em função do aumento da concentração deste poluente no nevoeiro (Fig. 1). As plantas expostas a 20, 40 e 80 mg F L⁻¹ apresentaram, respectivamente, concentração cerca de 76,4; 187,5 e 575,6 vezes maiores desse íon em relação ao controle, o qual apresentou aproximadamente 18 µg F g⁻¹ de massa de matéria seca.

Injúrias foliares visíveis e análise de crescimento

No controle, as folhas de *A. thaliana* apresentavam cor uniforme, verde-escuro brilhante, sem injúrias (Fig. 2A). Nas folhas expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹, os sintomas visuais iniciaram 96 e 48 h, respectivamente, após o primeiro nevoeiro com F (Fig. 2B e C). As necroses, as quais apresentaram coloração acinzentada, foram mais severas nas plantas expostas a 80 mg F L⁻¹ (Fig. 2D e E). As folhas da região mediana das rosetas apresentaram menor tamanho em função do aumento da concentração de F nos nevoeiros

(Fig. 2E). Não foram observadas injúrias foliares nas plantas expostas a 20 mg F L⁻¹ até o fim do experimento (Fig. 2D e E).

As injúrias visíveis geralmente surgiram como pequenas necroses pontuais, espalhadas por toda lâmina foliar, que se expandiram, com o passar do tempo de exposição, passando a ocupar áreas maiores da superfície foliar (Fig. 2E; 3C-F). Nas plantas expostas a 80 mg F L⁻¹, as folhas apresentavam, inicialmente, cloroses marginais extensas, que rapidamente progrediram, originando as necroses (Fig. 2B e C). As necroses ocorreram, mais frequentemente, nas margens da porção mediana (Fig. 3D e F), e nos ápices das folhas (Fig. 3C e E), tornando-os quebradiços. Nas áreas necrosadas, as margens se dobraram na direção da face abaxial da folha. Cloroses subjacentes às necroses apicais foram visualizadas apenas nas folhas expostas a 80 mg F L⁻¹ (Fig. 3E).

A visível redução do tamanho das plantas expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹ nos nevoeiros (Fig. 2D) resultou da queda da produção de biomassa, a qual foi 36 e 53 % menor que o observado no controle (Fig. 4).

Danos nas superfícies foliares – micromorfologia

As folhas de *A. thaliana* são pilosas com tricomas tectores pluricelulares ramificados em ambas as faces foliares, anfiestomáticas (estômatos anomocíticos) com maior densidade de estômatos na face abaxial, e constituídas por células epidérmicas de paredes sinuosas (Fig. 5A e B, 6A, 7A e E).

Todos os tratamentos com F provocaram danos micromorfológicos na epiderme da face abaxial e adaxial das folhas (Fig. 5; 6; 7). Apesar das deformações observadas em ambas as faces serem as mesmas, ressalta-se que estas foram mais proeminentes na face abaxial da folha. A epiderme abaxial apresentou reentrâncias profundas e achatamento das células (Fig. 5C), além de rupturas em algumas regiões, expondo as células do mesofilo (Fig. 5D). Na superfície adaxial ocorreu a ruptura da parede periclinal externa das células epidérmicas, permitindo a visualização de seu interior (Fig. 5E). Em ambas as faces da epiderme foram observadas erosão da cera epicuticular e perda de turgor das células, resultando em rugosidades na superfície celular (Fig. 5F).

As células epidérmicas que circundam os tricomas, túrgidas no tratamento controle (Fig. 6A), mostraram aspecto plasmolisado (Fig. 6B) e dobras na parede periclinal externa, além da presença de hifas fúngicas (Fig. 6E). Além disso, foram

observadas concavidades (Fig. 6E) e dobramentos (Fig. 6C) na base dos tricomas, completo colapso das células epidérmicas que circundam o tricoma (Fig. 6D), e perda de turgescência do tricoma colabado (Fig. 6F).

Os danos nos estômatos foram mais acentuados nas maiores concentrações de F nos nevoeiros e mais frequentes na superfície abaxial da folha (Fig. 7F - G). Na face adaxial, o aspecto das ceras epicuticulares foi alterado (Fig. 7C), as cristas estomáticas se tornaram sinuosas e enrugadas (Fig. 7C e D), flácidas e rompidas (Fig. 7E), havendo redução do ostíolo (Fig. 7D) e a sua obliteração pelas ceras erodidas (Fig. 7E). Já na face abaxial, o contorno das cristas estomáticas foi completamente alterado, e os estômatos aprofundados na epiderme, devido à perda de turgescência das células-guarda (plasmólise) e flacidez da crista estomática (Fig. 7F). Ocorreu ainda, o rompimento da crista estomática (Fig. 7G) e o colapso dos estômatos, mantendo-os completamente fechados (Fig. 7H).

Alterações anatômicas na lâmina foliar – microscopia de luz

Ao microscópio de luz, observou-se a cutícula delgada da epiderme unisseriada constituída por células isodiamétricas e tabulares na face adaxial da folha e por apenas células tabulares na face abaxial (Fig. 8A e D, 9A e B). O mesofilo dorsiventral, constituído por uma a duas camadas de células de parênquima paliçádico e três a cinco camadas de células alongadas periclinalmente no parênquima lacunoso, possui feixes vasculares de pequeno porte com poucos elementos de condução (Fig. 8D, 9A). Na nervura mediana, o único feixe vascular é circundado por colênquima e parênquima de preenchimento (Fig. 8A, 9B).

As folhas das plantas de *A. thaliana* expostas ao F apresentaram diversos danos estruturais, inclusive aquelas sem injúrias visuais, do tratamento com 20 mg F L⁻¹. Em todos os tratamentos com F foram observadas alterações no contorno da nervura mediana (Fig. 8B e C), dobras na base dos tricomas e aumento dos espaços no parênquima lacunoso, com aparente redução da quantidade de células (Fig. 8E). Outras modificações também foram observadas, como estreitamento da lâmina foliar em toda a sua extensão ou em algumas porções (Fig. 8F), redução do tamanho das células epidérmicas e sinuosidade da epiderme da face abaxial da folha, em consequência da formação de reentrâncias (Fig. 8G).

Os danos descritos acima foram agravados nas plantas expostas às maiores concentrações de F no nevoeiro (40 e 80 mg F L⁻¹). Células epidérmicas da face abaxial da folha e do parênquima lacunoso colabaram, culminando na formação de uma grande lacuna. Nessas regiões, as células da parênquima paliçádico e da epiderme da face adaxial da folha permanecem intactas (Fig. 8H). Em muitos locais onde ocorreu aumento do número de células, com o parênquima paliçádico e o lacunoso tornando-se mais compactos (Fig. 8I). Outras regiões da lâmina tiveram o padrão de diferenciação do mesofilo modificado, adquirindo aspecto homogêneo ao invés de dorsiventral (Fig. 8J e K).

A ocorrência de hipertrofia celular foi frequente nas folhas dos tratamentos com 40 e 80 mg F L⁻¹. Houve vacuolização das células do mesofilo, que ocasionou aumento extremo de tamanho (Fig. 8J). A transição entre a necrose e o mesofilo saudável é abrupta, sendo constituída por células de tamanho reduzido e isodiamétricas (Fig. 8K).

As folhas em expansão, expostas ao F, apresentaram poucas alterações estruturais, as quais se assemelharam as observadas nas folhas expandidas. O processo de divisão celular foi afetado apenas nos tratamentos com 40 e 80 mg F L⁻¹. O aumento do número de células no mesofilo levaram à maior compactação do parênquima paliçádico e redução dos espaços intercelulares no parênquima lacunoso, conferindo um aspecto homogêneo ao mesofilo (Fig. 9D). A redução do tamanho da nervura mediana e a ocorrência de necroses marginais, com as mesmas características apresentadas anteriormente (Fig. 9C), foram observadas apenas no tratamento com maior concentração de F no nevoeiro (80 mg F L⁻¹). A nervura mediana apresentou aumento no tamanho dos espaços intercelulares na região cortical (Fig. 9C). Não foram observadas modificações nas folhas em expansão expostas a 20 mg F L⁻¹.

Alterações micromorfológicas

Todas concentrações de F tiveram efeito significativo sobre a espessura da lâmina foliar, havendo aumento da espessura da lâmina foliar em aproximadamente 14, 16 e 19 % nas plantas expostas a 20, 40 e 80 mg F L⁻¹, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Fig. 10A). A área dos elementos de vaso das folhas tratadas com 40 e 80 mg F L⁻¹ foram cerca de 30 e 40 %, respectivamente, maior que a do controle (Fig. 10B). As

plantas submetidas ao tratamento com 20 mg F L⁻¹ não apresentaram alterações na área dos elementos de vaso.

Discussão

Este trabalho constitui o primeiro relato acerca da tolerância de *A. thaliana* ao F e a sua hiperacumulação nas folhas, assim como os danos morfoanatômicos induzidos pelo poluente. As plantas expostas ao F acumularam elevadas concentrações do poluente (entre 1367 e 10300 µg de F g⁻¹ MS) em suas folhas. Na maioria das espécies vegetais localizadas em ambientes não poluídos, o teor de F nos tecidos é de, geralmente, entre 1 e 15 µg F g⁻¹ MS (Weinstein e Davison 2003; Franzaring et al. 2007), sendo este teor determinado pela concentração atmosférica do poluente, tempo de exposição e a capacidade de absorção das espécies (Baunthiyal et al. 2014). Espécies hiperacumuladoras de F concentram teores do poluente acima de 1000 µg F g⁻¹ de MS em seus tecidos (Baunthiyal e Ranghar 2015), assim como é descrito para *Camellia sinensis* L. (Theaceae), espécie hiperacumuladora e tolerante ao poluente (Ruan et al. 2003; Baunthiyal e Ranghar 2015; Camarena-Rangel et al. 2015). Assim, os elevados teores de F determinados nas folhas das plantas de *A. thaliana* expostas ao F revelaram o seu potencial hiperacumulador.

Concentrações naturais de F na chuva não ultrapassam 0,1 mg F L⁻¹, porém, em ambientes próximos a fontes poluidoras, essa concentração pode chegar a 10 mg F L⁻¹ (Smith e Hodge 1979). Portanto, as concentrações de F testadas neste estudo estão acima das encontradas em atmosferas poluídas, mesmo 20 mg F L⁻¹, a qual não gerou necroses em *A. thaliana*, até o fim do experimento, mesmo acumulando mais de 1300 µg F L⁻¹. *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae), espécie nativa sensível ao F, quando exposta a 20 mg F L⁻¹ nos nevoeiros durante quatro dias consecutivos desenvolveu necroses foliares 24 h após a primeira aplicação, mesmo acumulando apenas 4 µg F L⁻¹ (Sant'Anna-Santos et al. 2012). A concentração de F acumulada nos tecidos vegetais e a sensibilidade ao poluente variam entre as espécies (Mesquita et al. 2011). Plantas de *Gladiolus* sp. apresentam necroses foliares ao acumularem 75 µg F g⁻¹ MS, enquanto *Lolium multiflorum* podem acumular até 180 µg F g⁻¹ MS sem apresentar sintomas (Mesquita et al. 2011). Deste modo, *A. thaliana* se demonstrou muito mais tolerante ao F que *S. dulcis*, *Gladiolus* sp. e *L. multiflorum*.

Apesar de apresentar tolerância, o incremento de F nos tecidos das plantas de *A. thaliana* expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹ ultrapassou o limiar suportado pela espécie, culminando na redução do tamanho das folhas e a ocorrência de cloroses e necroses foliares. O F é conhecido por afetar a expansão da folha, reduzindo o seu tamanho (Baunthiyal et al. 2014), assim como foi observado em *A. thaliana* que apresentou folhas com tamanho visivelmente reduzido. Na maioria das espécies, os sintomas da toxidez pelo F são descritos como cloroses e necroses no ápice e margem das folhas (Fornasiero 2001). Geralmente, as injúrias se iniciam como cloroses, que se entendem em direção à nervura mediana e base foliares, progredindo posteriormente para necroses (Weinstein e Davison 2003; Mesquita et al. 2011). Diferente desse padrão, em *A. thaliana* as injúrias geralmente surgiram como pequenas necroses acinzentadas espalhadas por toda a lâmina foliar, o que pode ser atribuído às elevadas concentrações de F utilizadas no experimento. Necroses e cloroses estão relacionadas à redução de pigmentos fotossintetizantes nas folhas, decorrente da degradação ou inibição da biossíntese pelo F (Fornasiero 2003; Oliva et al. 2005).

O F pode também afetar o crescimento das plantas, diminuindo o comprimento da raiz e da parte aérea e a produção de biomassa desses órgãos, como foi observado em plantas de *Coffea arabica* e *Amygdalis communi* expostas ao poluente (Elloumi et al. 2005; Mesquita et al. 2011). No presente estudo, foi observada redução de biomassa fresca da parte aérea das plantas de *A. thaliana* expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹. Yang et al. (2015) em um estudo anterior havia relatado que o F reduz o comprimento da raiz e a produção de biomassa fresca da raiz e parte aérea em plantas de *A. thaliana*. Portanto, a redução do crescimento das plantas desta espécie é uma resposta comum ao estresse induzido por F, tanto em nevoeiros quanto em meio de cultivo.

A descrição da superfície da folha de *A. thaliana*, assim como da sua anatomia, realizadas no presente trabalho estão de acordo com as observações anteriores feitas por Boeger e Poulson (2006). As folhas das plantas expostas ao F apresentaram deformações micromorfológicas e anatômicas em ambas as faces foliares, sendo a face abaxial mais afetada, diferente ao que normalmente acontece em plantas submetidas a chuva com F. Geralmente, a face adaxial das folhas possui mais alterações, com os sintomas iniciando preferencialmente nessa face, devido ao contato direto com o poluente (Pita-Barbosa et al. 2009). As folhas de *A. thaliana* se dispõem rente ao substrato, com a face abaxial

permanecendo continuamente em contato direto com os íons de F advindos de um filme de água formado após aplicação do nevoeiro na superfície do substrato, o que explica o fato desta face ser a mais danificada pelo poluente. Além disso, a ocorrência de lesões mais acentuadas nessa face pode estar relacionada à sua maior densidade de estômatos, que seria porta de entrada do poluente (Campos et al. 2010; Sant'Anna-Santos et al. 2014).

Alterações na superfície das folhas semelhantes às descritas neste trabalho já foram observadas tanto em espécies herbáceas, como *Brachiaria* sp., *Plectranthus neochilus* e *C. citratus*, quanto em espécie arbóreas, como *S. dulcis* e *C. arabica*, mesmo na ausência de sintomas visuais de fitotoxidez (Silva et al. 2000; Sant'Anna-Santos et al. 2006; Pita-Barbosa et al. 2009; Campos et al. 2010; Sant'Anna-Santos et al. 2012; Wang et al. 2013; Sant'Anna-Santos et al. 2014). Os danos micromorfológicos na lâmina de *A. thaliana* estão, provavelmente, associados às alterações na cutícula e ceras epicuticulares, assim como foi observado em *S. dulcis* quando exposta ao F (Sant'Anna-Santos et al. 2012). Assim, a erosão das ceras epicuticulares em *A. thaliana* facilitou a penetração do poluente e infestação por hifas fúngicas, provavelmente, pelo maior umedecimento da superfície da folha na ausência destes compostos hidrofóbicos (Pita-Barbosa et al. 2009; Sant'Anna-Santos et al. 2014).

Modificações no relevo da superfície foliar, como as rugosidades observadas no presente trabalho, são comumente relatadas como efeito da poluição por F em outras espécies vegetais (Pita-Barbosa et al. 2009; Campos et al. 2010; Sant'Anna-Santos et al. 2012) e podem ser atribuída à perda de turgor das células epidérmicas e a ruptura da parede celular (Mesquita et al. 2011). O rompimento tanto da parede celular quanto das próprias células epidérmicas das folhas de *A. thaliana* expõem os tecidos vegetais mais internos aos efeitos diretos do F, agravando ainda mais a ação do poluente, assim como foi observado em *S. dulcis* por Sant'Anna-Santos et al. (2014). Em *C. arabica*, foi demonstrado que a degeneração da parede celular conduziu à formação de regiões com depressões nas folhas (Mesquita et al. 2011), semelhantes às observadas neste estudo.

Lesões semelhantes às observadas nos tricomas de *A. thaliana* foram descritas para outras espécies herbáceas, como *Brachiaria* sp. e *P. neochilus*, sendo a base dos tricomas identificada como o sítio preferencial de entrada do F em solução na folha (Chaves et al. 2002; Pita-Barbosa et al. 2009; Campos et al. 2010). Diferente do

observado em plantas de *C. arabica*, na qual há o aumento da abertura estomática em função da quebra da crista estomática (Mesquita et al. 2011), em *A. thaliana* foi observada redução do ostíolo e a sua obliteração por fragmentos de ceras epicuticulares, sendo estas alterações também descritas em espécies de hortaliças como *Plectranthus neochilus*, *C. citratus* e *S. dulcis* quando expostas ao F (Pita-Barbosa et al. 2009; Sant'Anna-Santos e Azevedo 2010; Campos et al. 2010).

A análise estrutural das injúrias provocadas pelo F em espécies vegetais têm sido usado em vários estudos para avaliar o verdadeiro dano causado pelo poluente (Chaves et al. 2002; Silva et al. 2005; Pita-Barbosa et al. 2009; Campos et al. 2010; Mesquita et al. 2011; Wang et al. 2013; Sant'Anna-Santos et al. 2014), já que os danos são bastante característicos. Alterações anatômicas induzidas pelo F foram mais pronunciadas nas folhas expandidas de *A. thaliana* que nas folhas em expansão, provavelmente, pelo maior tempo em contato com poluente. O aumento dos espaços intercelulares observado no parênquima lacunoso de folhas expandidas e na nervura de folhas em expansão pode ser associada à interação do F com o Ca, que compõe a lamela média, formando CaF_2 e a desestrutura, tornando o tecido mais frouxo (Abdallah et al. 2006).

As folhas de *A. thaliana* apresentaram regiões com espessura aumentada, a qual foi atribuída à ocorrência de hipertrofia e ao aumento do número de células no mesofilo. Em *Joannesia princeps* foi observada a formação de um tecido de cicatrização (a partir das células do parênquima) nas regiões adjacentes as necroses, em plantas expostas à chuva ácida (Silva et al. 2005). Em *A. thaliana* na região de transição entre a necrose e o mesofilo saudável é constituído por células com aspecto indiferenciado, mas não constitui um tecido de cicatrização típico. Por outro lado, ressalta-se que em outras regiões foi observada redução da espessura da lâmina, o que foi atribuído ao colapso do mesofilo, como também foi observado na espécie sensível *S. dulcis* (Silva et al. 2000; Sant'Anna-Santos e Azevedo 2010).

O contorno da nervura alterada, associado à redução no diâmetro dos feixes vasculares distribuídos pelo mesofilo e o aumento no diâmetro dos elementos de vaso indicam a ação do F na diferenciação dos elementos de condução em plantas de *A. thaliana*, assim como também foi relatado para *Chloris gayana* (Chaves et al. 2002). Em folhas de plantas de *Gladiolus* sp. expostas ao poluente houve colapso das células

condutoras nos feixes vasculares e degeneração do feixe vascular, indicando um depósito de F próximo às terminações do xilema (Mesquita et al. 2011).

Em síntese, os resultados deste estudo revelaram a hiperacumulação de F nos tecidos foliares de *A. thaliana* e a maior tolerância desta espécie ao poluente, quando comparada a outras espécies vegetais já submetidas experimentalmente ao F. As análises microscópicas foram essenciais para a adequada e precisa caracterização dos sintomas induzidos pelo poluente e devem ser utilizadas em associação com a caracterização morfológica. Os sintomas observados em *A. thaliana* em resposta ao F não são específicos dessa espécie, sendo observadas em um grande número de plantas de diferentes famílias e hábitos, demonstrando-se eficientes no diagnóstico correto de poluição por F.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa a primeira autora; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa a última autora; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por auxiliar financeiramente o estudo, ao Renê Chagas da Silva, pela obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura, e ao Efraim Lázaro Reis, por ajudar com a detecção do flúor nas amostras.

Referências bibliográficas

- Abdallah FB, Elloumi N, Mezghani I, Boukhris M, Garrec JP (2006). Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area. *Comptes Rendus Biologies* **329**, 200–207.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **188**, 319–333.
- Baunthiyal M, Bhatt A, Ranghar S (2014). Fluorides and its effects on plant metabolism. *International Journal of Agricultural Technology* **10**, 1–27.
- Baunthiyal M, Ranghar S (2015). Accumulation of fluoride by plants: Potential for phytoremediation. *Clean - Soil, Air, Water* **43**, 127–132.
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Tacconnat L, Renou

- JP, Pugin A, Wendehenne D (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**, 1302–1315.
- Boeger MRT, Poulson M (2006). Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta Botanica Brasilica* **20**, 329–338.
- Boukhris A, Laffont-Schwob I, Mezghani I, Kadri L El, Prudent P, Pricop A, Tatoni T, Chaieb M (2015). Screening biological traits and fluoride contents of native vegetations in arid environments to select efficiently fluoride-tolerant native plant species for in-situ phytoremediation. *Chemosphere* **119**, 217–223.
- Camarena-Rangel N, Velázquez ANR, Santos-Díaz MDS (2015). Fluoride bioaccumulation by hydroponic cultures of camellia (*Camellia japonica* spp.) and sugar cane (*Saccharum officinarum* spp.). *Chemosphere* **136**, 56–62.
- Camargo JA (2003). Fluoride toxicity to aquatic organisms: A review. *Chemosphere* **50**, 251–264.
- Campos NV, Azevedo AA, Sant'Anna-Santos BF (2010). Acúmulo e efeitos fitotóxicos do flúor em folhas de boldo-gambá e capim-cidreira utilizadas para chás. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **45**, 646–653.
- Chaves ALF, Silva EAM, Azevedo AA, Cano MAO, Matsuoka K (2002). Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (colonião) e *Chloris gayana* kunth. (capim-rhodes) - Poaceae. *Acta Botânica Brasilica* **16**, 395–406.
- Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* **17**, 379–387.
- Easlon HM, Carlisle E, McKay JK, Bloom AJ (2015). Does low stomatal conductance or photosynthetic capacity enhance growth at elevated CO₂ in *Arabidopsis thaliana*? *Plant physiology* **168**, 156–163.
- Elloumi N, Abdallah FB, Mezghani I, Rhouma A, Boukhris M (2005). Effect of flouride on almond seedlings in culture solution. *Fluoride* **38**, 193–198.
- Fialho, RC (1997). Acumulação foliar de fluoretos e seu significado ecológico em espécies arbóreas da Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Cubatão (SP), 100.

- Fornasiero RB (2001). Phytotoxic effects of fluorides. *Plant Science* **161**, 979–985.
- Fornasiero RB (2003). Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: First field observations. *Plant Science* **165**, 507–513.
- Franzaring J, Klumpp A, Fangmeier A (2007). Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. *Atmospheric Environment* **41**, 4828–4840.
- Guo J, Dai X, Xu W, Ma M (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* **72**, 1020–1026.
- Karnovsky MJ (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137–138.
- Krizek BA, Prost V, Joshi RM, Stoming T, Glenn TC (2003). Developing transgenic *Arabidopsis* plants to be metal-specific bioindicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 175–181.
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 827–836.
- Lee SH, Zwiazek JJ (2015). Regulation of aquaporin-mediated water transport in *Arabidopsis* roots exposed to NaCl. *Plant and Cell Physiology* **56**, 750–758.
- Li C, Zheng Y, Zhou J, Xu J, Ni D (2011). Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine. *Biologia Plantarum* **55**, 563–566.
- Loganathan P, Hedley M, Bretherton M, Rowarth J (2004). Accounting for particle movement when assessing the dissolution of slow release fertilizers in field soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **70**, 77–84.
- Mesquita GL, Tanaka FAO, Cantarella H, Mattos D (2011). Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plant growth. *Water, Air, and Soil Pollution* **219**, 143–156.
- O'Brien PP, McCully ME (1981). *The study of plants structure principles and selected methods*. Melbourne, Australia: Termarcarphi Pty. Ltda., 45.
- Oliva MA, Figueiredo GDE, Nees S, Stapf N (2005). Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **1**, 389–397.

- Pita-barbosa A, Sant'Anna-Santos BFS, Silva KLF, Azevedo AA, Rocha DI (2009). Efeitos fitotóxicos do fluoreto na morfoanatomia foliar de *Brachiaria brizantha* (Hochst . ex A . Rich .) Stapf e *Brachiaria decumbens* Stapf (Poaceae). *Acta Botânica Brasilica* **23**, 1027–1033.
- Pulyaevskaya MA, Varakina NN, Gamburg KZ, Rusaleva TM, Stepanov AV, Voinikov VK, Rikhvanov EG (2011). Sodium fluoride inhibits HSP synthesis in heat-stressed cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**, 589–596.
- Ram A, Verma P, Gadi BR (2014). Effect of fluoride and salicylic acid on seedling growth and biochemical parameters of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Fluoride* **47**, 49–55.
- Ruan J, Ma L, Shi Y, Han W (2003). Uptake of fluoride by tea plant (*Camellia sinensis* L) and the impact of aluminum. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1342–1348.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Alves TG, Campos NV, Oliva MA, Valente VMM (2014). Effects of emissions from an aluminum smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water, Air, and Soil Pollution* **225**, 1817.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Silva LC, Oliva MA (2012). Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **84**, 689–702.
- Sant'Anna-Santos BF, Silva LC, Azevedo AA, Aguiar R (2006). Effects of simulated acid rain on leaf anatomy and micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 313–321.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA (2010). Toxicidade e acúmulo de flúor em hortaliças nas adjacências de uma fábrica de alumínio. *Acta Botânica Brasilica* **24**, 952–963.
- Shi HT, Li RJ, Cai W, Liu W, Wang CL, Lu YT (2012). Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* **53**, 344–357.
- Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2000). Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Revista Brasileira de Botânica* **23**, 385–393.
- Silva LC, Azevedo AA, Silva EAM, Oliva MA (2005). Effects of simulated acid rain on

- the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Australian Journal of Botany* **53**, 789–796.
- Smith FA, Hodge HC, Dinman BD (1979). Airborne fluorides and man: Part II. Critical Reviews in Environmental Control **9**, 1–25.
- Valdez-Jiménez L, Fregozo CS, Beltrán MLM, Coronado OG, Vega MIP (2011). Effects of the fluoride on the central nervous system. *Neurología* **26**, 5–8.
- Wang LX, Tang JH, Xiao B, Yang YJ, Liu J (2013). Variation of photosynthesis, fatty acid composition, ATPase and acid phosphatase activities, and anatomical structure of two tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) cultivars in response to fluoride. *The Scientific World Journal* **2013**, 1-9.
- Weinstein LH, Davison AW (2003). Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. *Environmental Pollution* **125**, 3–11.
- Yang X, Ye C, Liu Y, Zhao F-J (2015). Accumulation and phytotoxicity of perfluorooctanoic acid in the model plant species *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* **206**, 560–566.

Legendas das figuras

Figura 1. Teor de flúor ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) nas folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes desse poluente em nevoeiro simulado, durante dez dias consecutivos. Barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 2. Sintomas de fitotoxicidade observados nas plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a nevoeiros simulados com flúor ($20, 40$ e 80 mg F L^{-1}) durante dez dias consecutivos. A – tratamento controle (sem flúor). B – Necrose marginal na base da folha (40 mg F L^{-1}), 96 h após o início dos nevoeiros. C – Necroses marginais na região apical e basal da folha (80 mg F L^{-1}), 48 h após o primeiro nevoeiro. D – Redução do tamanho das plantas após dez dias de exposição (esquerda => direita: $0, 20, 40$ e 80 mg F L^{-1} , respectivamente). E – Redução no tamanho das folhas após dez dias de exposição (esquerda => direita: $0, 20, 40$ e 80 mg F L^{-1} , respectivamente).

Figura 3. Necroses apicais e marginais observadas nas folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a nevoeiros com F por dez dias. A e B – Ápice (A) e margem (B) no controle. C – Pequenas necroses apicais (40 mg F L^{-1}). D – Necrose na margem (40 mg F L^{-1}). E – Ápice da folha necrosado, associada a clorose (seta) (80 mg F L^{-1}). F – Entensa necrose marginal (80 mg F L^{-1}).

Figura 4. Massa de matéria fresca das folhas das plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a nevoeiros com flúor ($0, 20, 40$ e 80 mg F L^{-1}), por dez dias consecutivos. Barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 5. Efeitos do flúor na superfície abaxial (C-D) e adaxial (E-F) das folhas das plantas de *A. thaliana* (micrografias eletrônicas de varredura). A e B – Tratamento controle: células túrgidas na face adaxial (A) e abaxial (B). C – Fenda na epiderme (=>) e paredes externas das células achatadas (20 mg F L^{-1}). D – Ruptura da epiderme expondo as células do mesofilo (=>) (20 mg F L^{-1}). E - Ruptura da parede periclinal externa das células epidérmicas, expondo-as ao poluente (=>) (40 mg F L^{-1}). F – Erosão da cera epicuticular e alteração do relevo celular (80 mg F L^{-1}). Sc – sem cera; Cc – com cera.

Figura 6. Alterações na base dos tricomas de *Arabidopsis thaliana* induzidos pelo flúor. (A-D) – Superfície adaxial da folha. (E e F) – Superfície abaxial das folhas. A – Tratamento controle: células túrgidas. B – achatamento da parede periclinal externa das células (\Rightarrow) (20 mg F L⁻¹). C – Dobras na base do tricomas (\Rightarrow) (40 mg F L⁻¹). D – Células epidérmicas da base dos tricomas colabadas (80 mg F L⁻¹). E – Dobras na parede externa das células (\Rightarrow), concavidade na base dos tricomas, e hifas fúngicas (20 mg F L⁻¹). F – Perda de turgescência do tricoma e erosão da cera epicuticular (80 mg F L⁻¹). Hf – hifa fúngica; Ce – cera epicuticular.

Figura 7. Deformações nos estômatos de *Arabidopsis thaliana* induzidos pelo flúor (micrografias eletrônicas de varredura). (A, C-E) – Face adaxial das folhas; (B, F-H) – Face abaxial das folhas. A e B – Tratamento controle. C – Sinuosidade da crista estomática e aspecto das ceras epicuticulares alterado (\Rightarrow) (20 mg F L⁻¹). D – redução do ostíolo e rugosidade da crista estomática (40 mg F L⁻¹). E – Crista estomática flácida e rompida e ostíolo obliterado por fragmentos de cera (\Rightarrow) (80 mg F L⁻¹). F – Sinuosidade da crista estomática (\Rightarrow), e aspecto plasmolisado das células guardas (20 mg F L⁻¹). G – Crista estomática rompida (\Rightarrow) (40 mg F L⁻¹). H – Colapso do estômato e crista estomática enrugada (\Rightarrow) (80 mg F L⁻¹). Ce – cera epicuticular; Cs – crista estomática.

Figura 8. Efeito do flúor (20, 40 e 80 mg F L⁻¹) na estrutura de folhas expandidas de *Arabidopsis thaliana*. A - Nervura mediana no controle. B e C – Contorno da nervura alterado (\Rightarrow) em 20 e 80 mg F L⁻¹, respectivamente. D – Mesofilo no controle. E – Dobra na base do tricoma (►) e aumento dos espaços no parênquima lacunoso (\Rightarrow) (20 mg F L⁻¹). F – Estreitamento da lâmina foliar (\Rightarrow) (80 mg F L⁻¹). G – Reentrâncias na epiderme (\Rightarrow) (20 mg F L⁻¹). H – Grande lacuna (\Rightarrow) no mesofilo (40 mg F L⁻¹). I – Compactação do mesofilo pelo aumento do número de células (40 mg F L⁻¹). J – Hipertrofia celular, e desorganização do mesofilo (\Rightarrow) (80 mg F L⁻¹). K – Região de transição (\Rightarrow) entre a necrose e mesofilo não alterado. Eb – epiderme abaxial; Ed – Epiderme adaxial; Es – estômato; Fv – feixe vascular; Ht – hipertrofia; Mc – mesofilo compacto; Ne – necrose; Nm – nervura mediana; Pl – parênquima lacunoso; Pp – parênquima paliçádico; Tr – tricoma.

Figura 9. Alterações anatômicas nas folhas em expansão das plantas de *A. thaliana* expostas ao flúor em nevoeiros, por dez dias. A e B – Controle. A – Nervura mediana. B – Lâmina foliar entre nervuras. C – Espaços intercelulares de tamanho anormal na nervura mediana (\Rightarrow) e necrose na lâmina foliar (80 mg F L^{-1}). D – Mesofilo mais compacto e alteração no padrão de diferenciação com aumento do número de células (40 mg F L^{-1}). Eb – epiderme abaxial; Ed – Epiderme adaxial; Es – estômato; Fv – feixe vascular; Ne – necrose; nervura mediana; Pl – parênquima lacunoso; Pp – parênquima paliçádico.

Figura 10. Parâmetros estruturais da lâmina foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a diferentes concentrações de flúor (0, 20, 40 e 80 mg F L^{-1}). A – Espessura da lâmina foliar (μm). B – Área dos seis elementos de vasos de maior diâmetro no feixe vascular da nervura mediana (μm^2). As barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).

Figuras

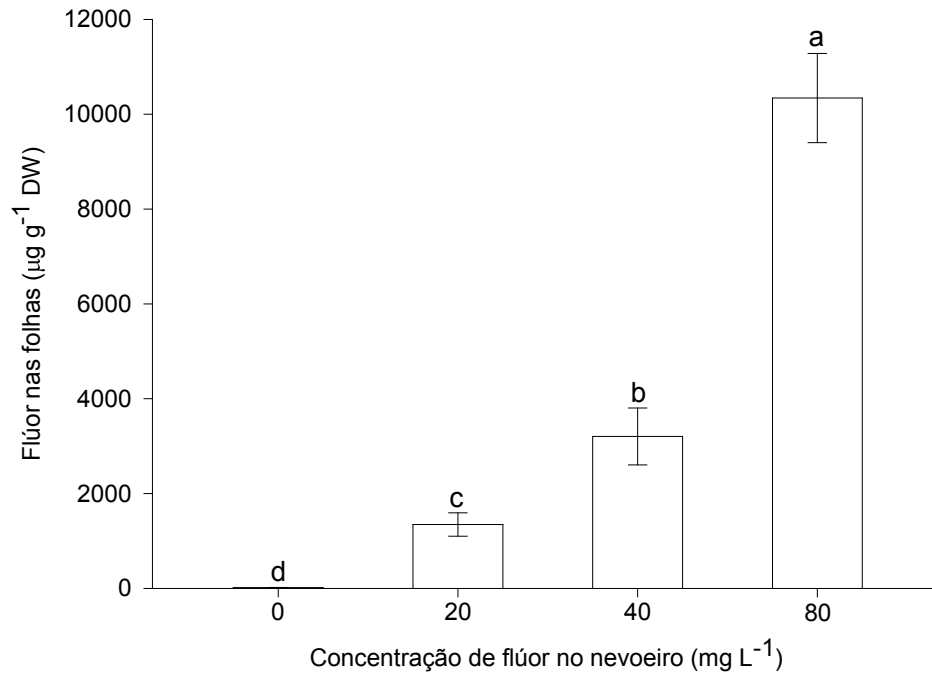


Figura 1.



Figura 2.

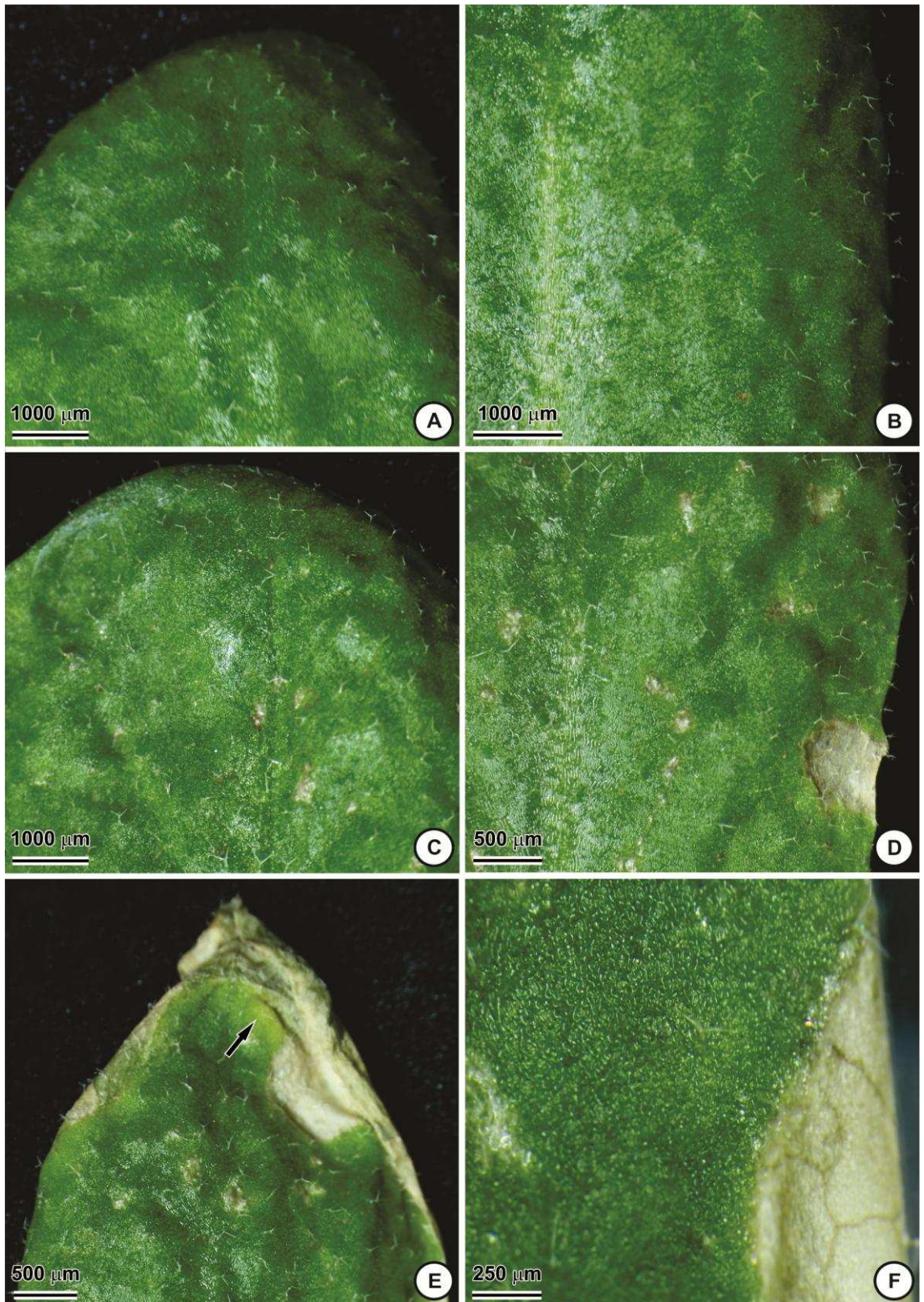


Figura 3.

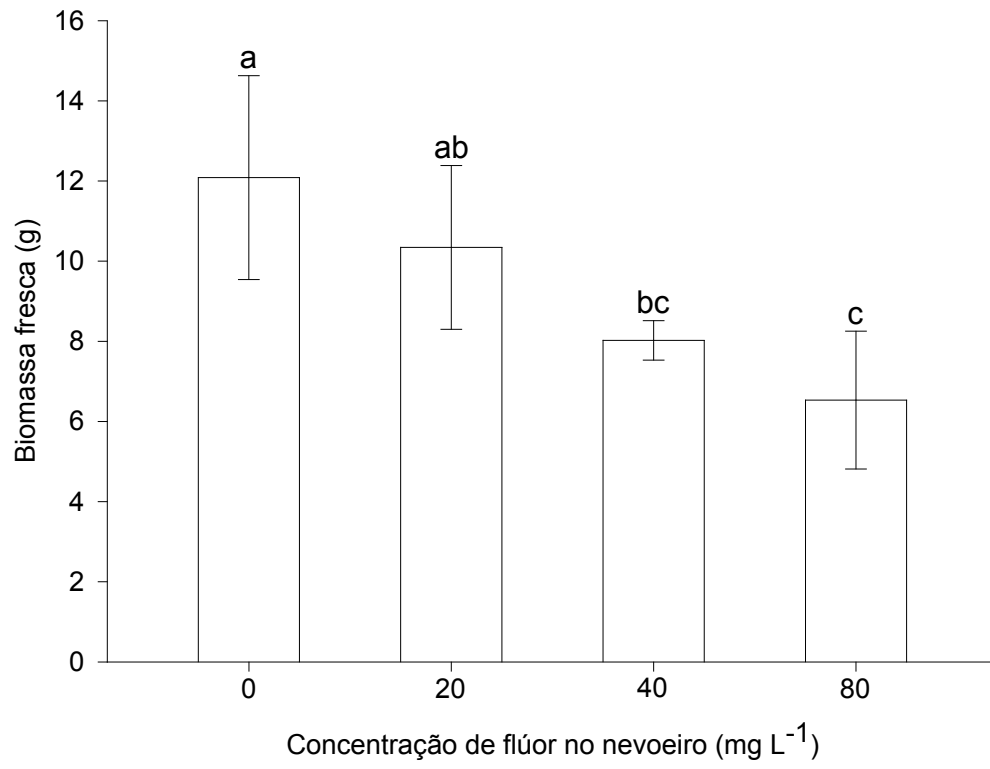


Figura 4.

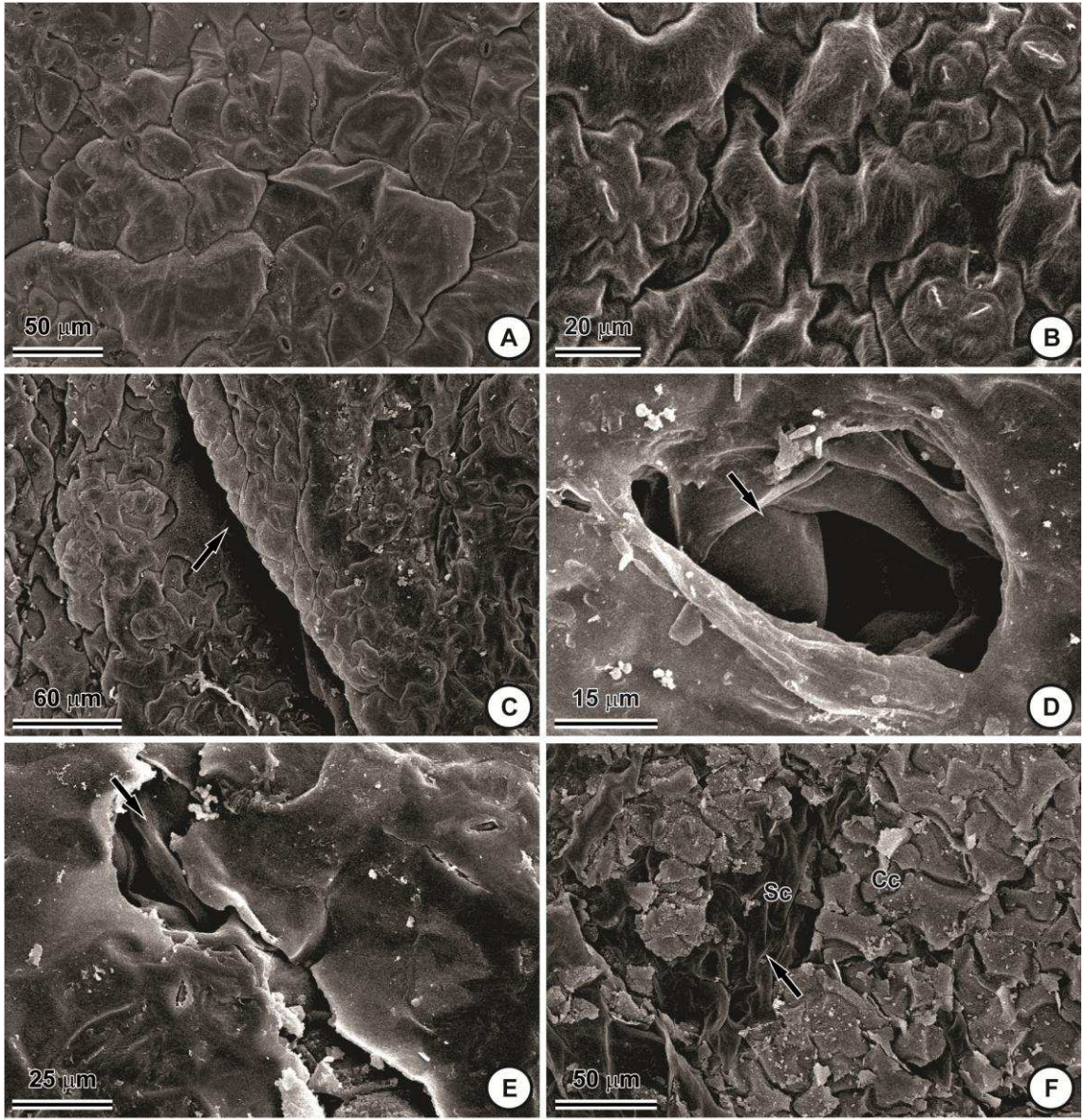


Figura 5.

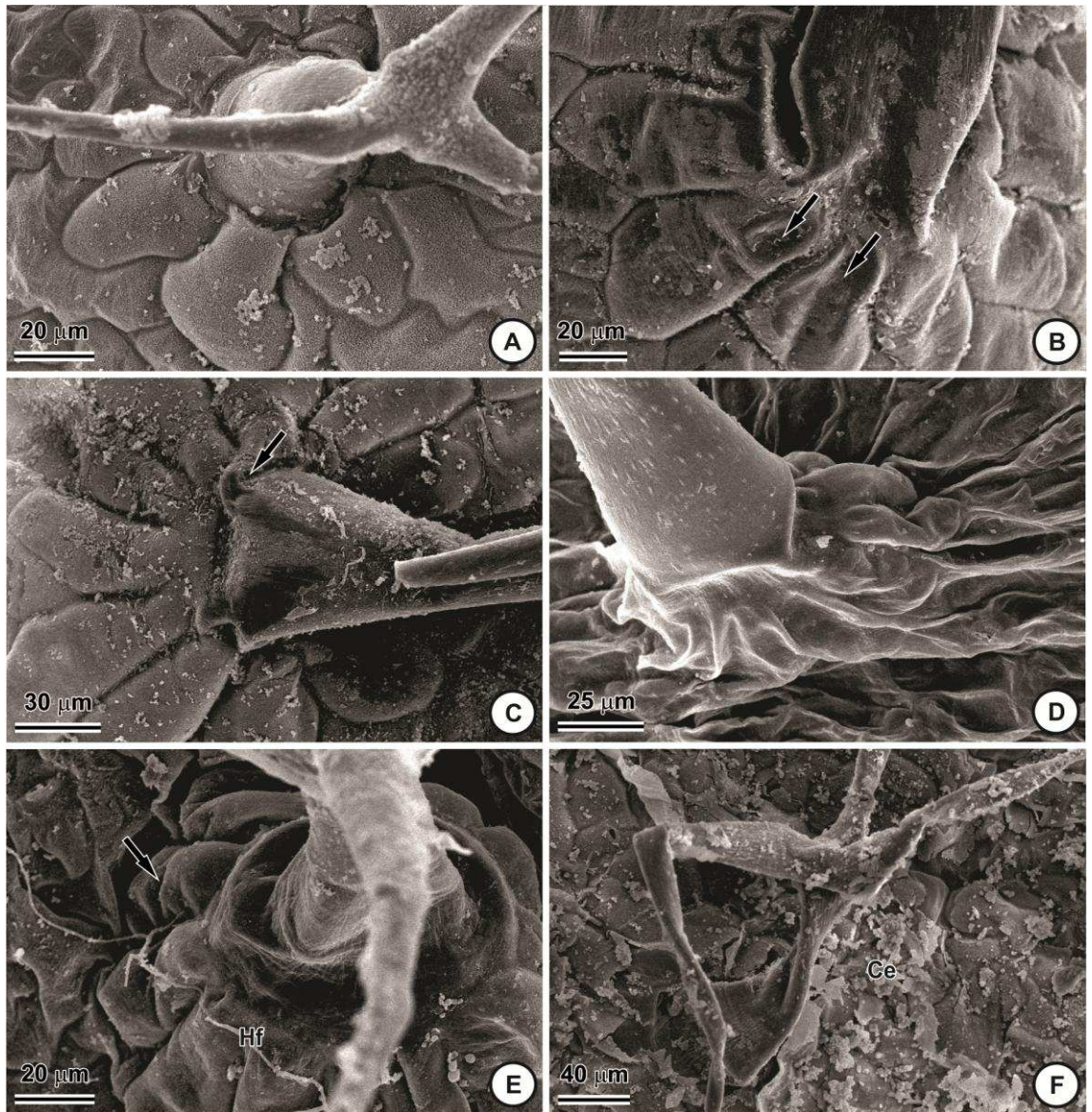


Figura 6.

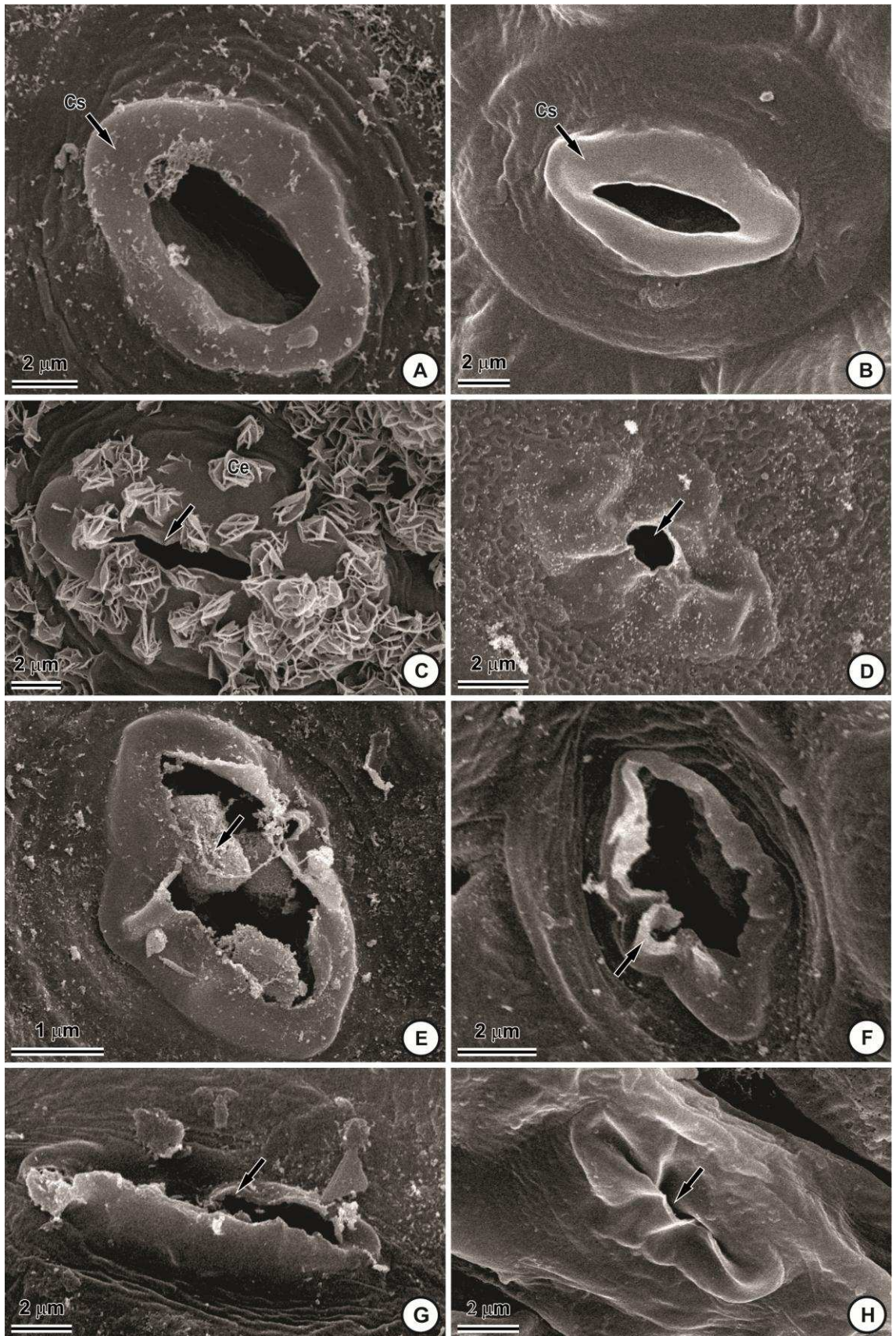


Figura 7.

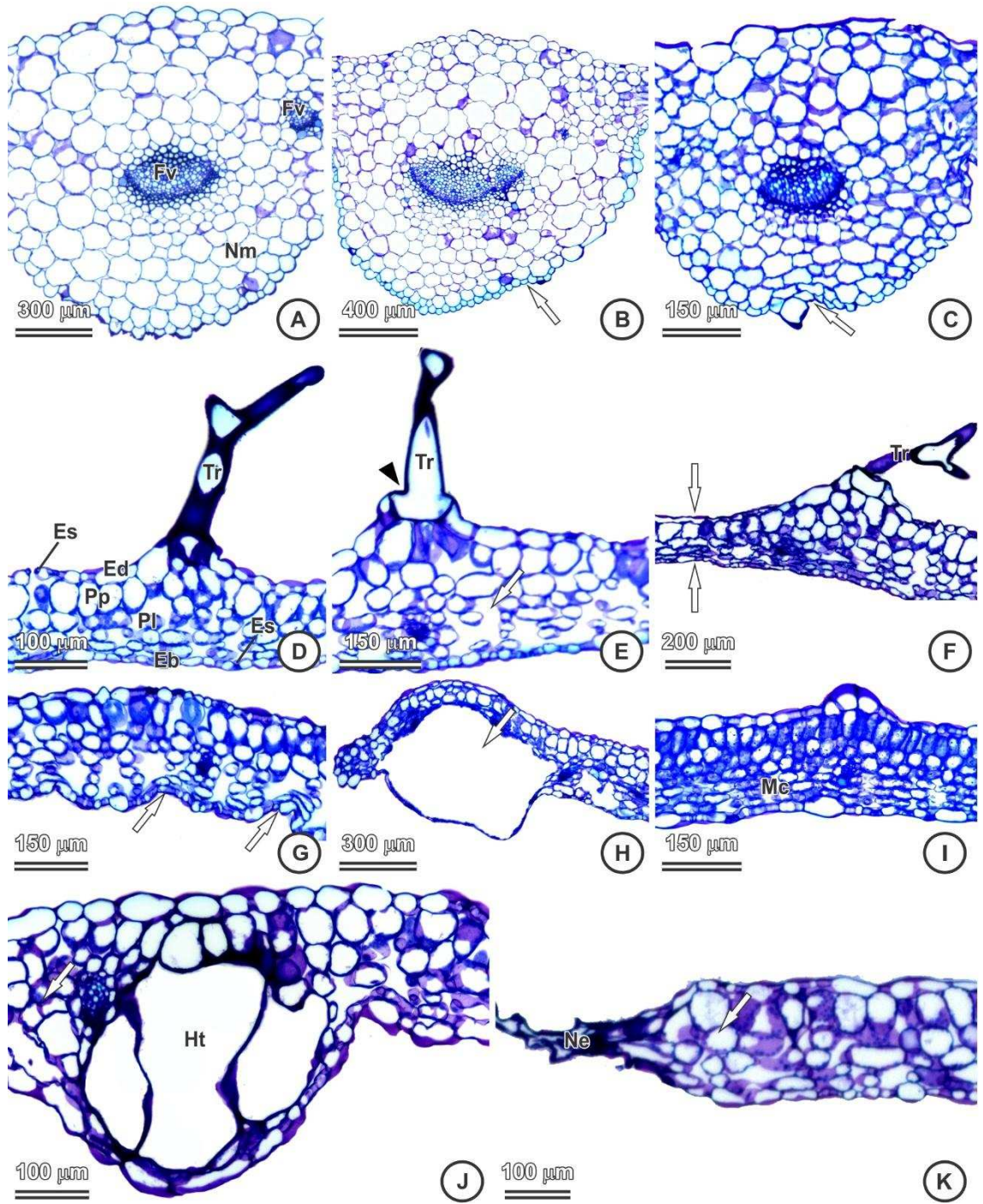


Figura 8.

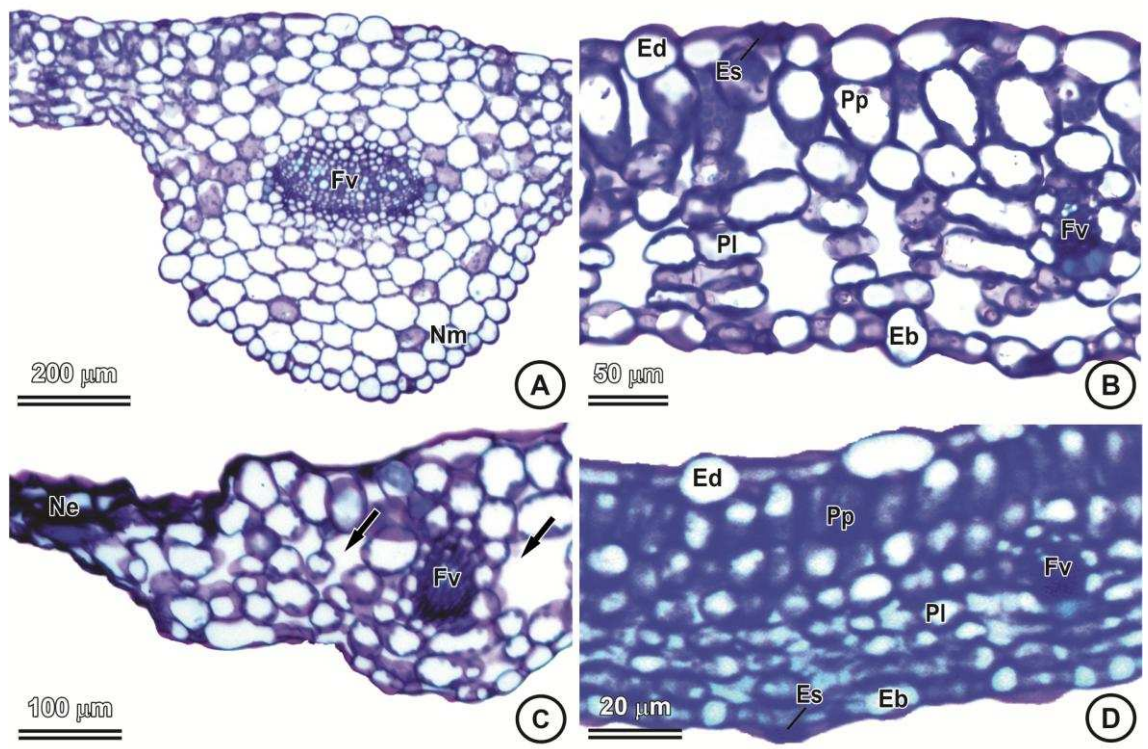


Figura 9.

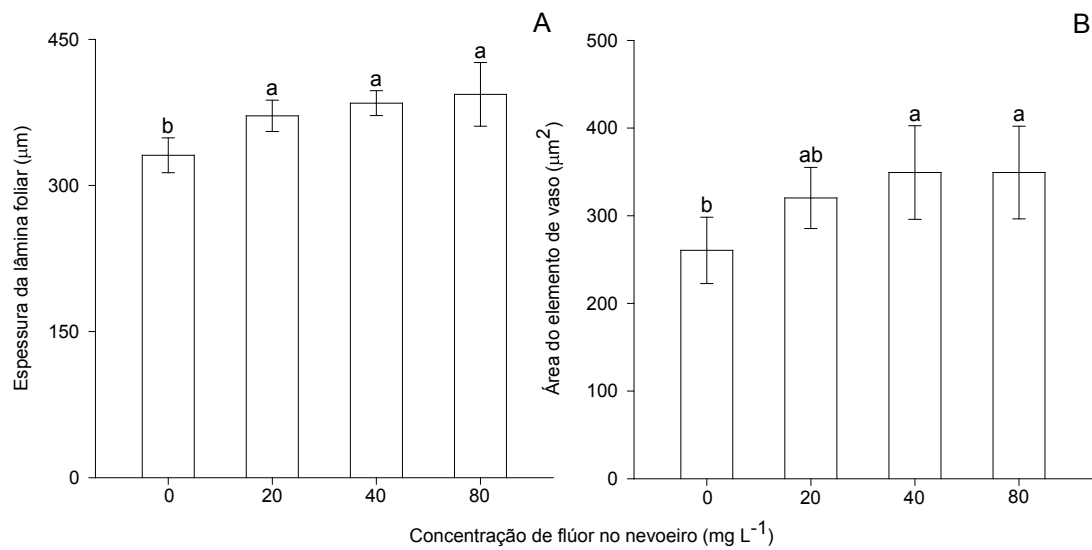


Figura 10.

CAPÍTULO 2

Tolerância de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ao flúor: Aspectos fisiológicos

RESUMO - O objetivo deste estudo foi investigar os danos induzidos pelo flúor (F) em aspectos fisiológicos de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram expostas a nevoeiros simulados contendo 0, 20, 40, e 80 mg F L⁻¹, aplicados duas vezes ao dia, por dez dias consecutivos. Ao término do experimento foram determinados o teor de F, nutrientes, aldeído malônico (MDA), compostos fenólicos solúveis (CFS), açúcares, pigmentos fotossintéticos, eletrólitos extravasados, teor relativo de água nas folhas (TRA) e avaliados aspectos das trocas gasosas. O tratamento com F aumentou os níveis de MDA, indicando a ocorrência de estresse oxidativo, o qual foi atribuído à redução da assimilação interna de carbono (A), pigmentos fotossintetizantes (por degradação) e respiração (R_d). Além disso, foi observada elevação da concentração interna de carbono (C_i) e redução da condutância estomática (g_s). Esses resultados sugerem a ocorrência de limitações bioquímicas à fotossíntese. *A. thaliana* demonstrou tolerância ao F, já que a menor concentração utilizada neste trabalho (correspondente ao dobro da detectada em regiões poluídas) não promoveu danos severos e ainda resultou no elevado acúmulo do poluente nos tecidos, revelando-se, portanto, uma espécie promissora para estudos de mecanismos moleculares envolvidos nas respostas à poluição por F.

Palavras-chave: Hiperacumulação, estresse oxidativo, danos fotoquímicos.

Tolerance of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) fluoride: Physiological aspects

ABSTRACT - The objective of this study was to investigate the damage induced by fluoride (F) in physiological aspects of *Arabidopsis thaliana*. Plants were exposed to simulated fog containing 0, 20, 40, and 80 mg F L⁻¹ applied twice daily for ten consecutive days. At the end of experiment it was determined the F content, nutrients, malondialdehyde (MDA), soluble phenolics (SPC), sugars, photosynthetic pigments, extravasated electrolytes, relative water content in leaves (RWC) and evaluated aspects of gas exchange. Treatment with F increased MDA levels, indicating the occurrence of oxidative stress, which was attributed to the reduction in internal carbon assimilation (A) photosynthetic pigments (for degradation) and respiration (Rd). Moreover, it was observed increase in carbon internal concentration (C) and reduced stomatal conductance (gs). These results suggest the occurrence of biochemical limitations to photosynthesis. *A. thaliana* showed tolerance to F, since the lower concentrations used in this study (corresponding to double the detected in polluted areas) did not cause severe damage and even resulted in increased accumulation of pollutant tissues, revealing therefore a promising species for studies of molecular mechanisms involved in responses to pollution by F.

Keywords: Hyperaccumulation, oxidative stress, photochemical damage.

Introdução

O flúor (F) é um halogênio não essencial altamente tóxico para a maioria das plantas e animais (Barbier et al. 2010). A forma inorgânica desse elemento é a predominante no ambiente, existindo como minerais (fluorapatita, fluorita e criolita) nos solos e como ácido fluorídrico na atmosfera (Camargo 2003). O F é emitido para a atmosfera em diversos processos industriais, como na produção de fertilizantes fosfatados (Loganathan et al. 2001), alumínio, vidro e cerâmica (Cape et al. 2003). A principal via de entrada do F atmosférico nas plantas é a folha, sendo, portanto, o órgão mais afetado pelo poluente (Weinstein e Davison 2003; Li et al. 2011). O F penetra nas folhas através dos estômatos (Pulyaevskaya et al. 2011), cutícula e tricomas, sendo conduzido pelo mesofilo foliar através de canais de ânions presentes nas membranas plasmáticas (Zhang et al. 2016).

No interior das folhas, o F pode interagir com membranas, proteínas e ácidos nucleicos, afetando a atividade de enzimas do metabolismo central e induzindo o estresse oxidativo (Li et al. 2011). Este efeito é associado com reduções nas taxas fotossintéticas, além do aumento da produção de compostos de defesa, como compostos fenólicos, e da taxa respiratória (Ram et al. 2014). Sabe-se que o F altera a disponibilidade de alguns nutrientes, pois inibe o crescimento das raízes, reduzindo a absorção dos minerais (Elloumi et al. 2005; Barbier et al. 2010; Panda 2015). Como consequência, o crescimento e o acúmulo de biomassa são prejudicados (Mori et al. 2015) e sintomas visuais, como cloroses e necroses foliares, podem ocorrer em espécies susceptíveis (Fornasiero 2003; Sant'Anna-Santos et al. 2014).

As cloroses surgem em função da degradação das clorofilas, que acompanha o acúmulo de F nos cloroplastos, indicando um decréscimo da capacidade metabólica desta organela, enquanto as necroses evidenciam a completa desintegração estrutural, derivada do processo de morte celular programada (Miller 1993). Os mecanismos de ação do F em espécies sensíveis têm sido extensivamente estudados (Elloumi et al. 2005; Pulyaevskaya et al. 2011; Sant'Anna-Santos et al. 2012; Sant'Anna-Santos et al. 2014). Entretanto, o atual conhecimento sobre como as plantas toleram esse poluente ainda é limitado (Zhang et al. 2016).

Dentre as espécies vegetais mais estudadas atualmente destaca-se a planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), por apresentar uma série de vantagens, como

pequeno porte, ciclo de vida curto, genoma reduzido e completamente sequenciado (Krizek et al. 2003; Lee et al. 2005). *A. thaliana* tem sido amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos (Drazkiewicz et al. 2004; Guo et al. 2008; Besson-Bard et al. 2009) e as respostas dessa espécie a vários outros poluentes atmosféricos, como os dióxidos de carbono (Easlon et al. 2015) e de enxofre (Van der Kooij et al. 1997; Kubo 1999), bem como o óxido nítrico (Shi et al. 2012), já foram bem caracterizadas. Com relação aos efeitos do F sobre essa espécie, alguns autores avaliaram parâmetros fisiológicos de células de *A. thaliana* cultivadas in vitro (Pulyaevskaya et al. 2011), bem como seu efeito no transporte de água pelo sistema radicular, quando associado ao cloreto de sódio (Lee e Zwiazek 2015). Já foi relatado também que o F na forma de ácido perfluoro-octanóico (PFOA) é mais citotóxico à *A. thaliana* que o fluoreto de sódio (NaF) (Yang et al. 2015). Apesar da existência desses trabalhos, informações sobre as consequências do excesso de F sobre as funções fisiológicas de *A. thaliana* ainda são bastantes preliminares e escassas.

Neste estudo, testamos a hipótese de que o acúmulo de F nos tecidos foliares de *A. thaliana* induz a ocorrência de estresse oxidativo, o qual altera o metabolismo dessa espécie, causando danos fotoquímicos e bioquímicos que reduzem processos fisiológicos vitais. Os danos fotoquímicos e bioquímicos foram determinados através de abordagens integradas, que combinam análises de estresse oxidativo e defesa antioxidante, estado nutricional e de hidratação das plantas, medidas de trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos.

Material e métodos

Condições de cultivo e delineamento experimental

As sementes de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia-0 (Col-0), “wild type” (WT) foram semeadas em vasos de cultivo (5 x 55 mm; 80 ml) contendo substrato comercial Tropstrato HT®. Após a semeadura, os vasos foram mantidos em câmara fria à $\mu^{\circ}\text{C}$ por quatro dias (estratificação), e, em seguida, foram transferidos para sala de crescimento com temperatura controlada (18 °C), fotoperíodo (16 h), luminosidade ($\sim 100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). As plantas usadas no experimento possuíam cerca de 21 dias, e permaneceram nas mesmas condições de cultivo descritas acima até o final do

experimento. A adubação foi realizada semanalmente com a solução nutritiva Biofert Universal (NPK 6:4:4 + 10 nutrientes).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos (0, 20, 40 e 80 mg F L⁻¹) e cinco repetições (uma planta por vaso). O F foi fornecido na forma de KF (pH 6,0), enquanto o controle recebeu apenas água desionizada (pH 6,0). As aplicações foram realizadas durante dez dias consecutivos na forma de nevoeiro, sendo aplicado 15 mL de solução, duas vezes ao dia, em cada planta. As concentrações de F, o volume aplicado e a duração do experimento foram definidos em testes preliminares, de acordo com relatos anteriores na literatura, tamanho e ciclo de vida da planta, respectivamente. Ao término do experimento, amostras foliares da região mediana das rosetas, foram coletadas e destinadas às análises descritas a seguir.

Determinação do teor de F e nutrientes

As folhas foram secas em estufa de ventilação forçada à 70 °C, por 72 h e reduzidas em moinho tipo Willey a partículas com dimensões inferiores a 1 mm. A extração foi realizada a partir de 0,15 g de folhas secas e moídas, utilizando-se ácido sulfúrico (1 N) por 20 min à 50 °C. Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio (1N) e o ajustador de força iônica TISAB (Fialho 1997). A determinação potenciométrica do teor de F na solução resultante foi realizada com eletrodo seletivo de F iônico (Thermo Scientific Fluoride Ions Selective Electrode, Massachusetts, EUA).

Os micronutrientes (Fe, Mn, Zn e Cu) e macronutrientes (P, K, Ca e Mg) foram determinados nas raízes e folhas, segundo Tedesco et al. (1995). As amostras secas e trituradas foram pré-digeridas em solução nitroperclórica (ácido nítrico e ácido perclórico 3:1 v/v) à temperatura ambiente por 12 h, e digeridas à 200 °C em bloco digestor. O extratos obtidos foram lidos em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES).

Avaliação do estresse oxidativo

O extravasamento de eletrólitos foi determinado através da condutividade elétrica da água Milli-Q (5 mL), na qual seis discos foliares de 1 cm de diâmetro foram incubados por 12 h à temperatura ambiente. A condutividade elétrica inicial da água (C₁) foi aferida e, em seguida a condutividade final (C₂) foi obtida após o aquecimento das amostras em

banho-maria à 95 °C por 30 min. O extravasamento de eletrólitos (EE) foi determinado através da equação: $EE (\%) = (C1/C2) \times 100$, onde os resultados são expressos como porcentagem do total de condutividade (Szalai et al. 1996).

A concentração de aldeído malônico (MDA) foi determinada através do método do ácido tiobarbitúrico (TBA), segundo o protocolo adaptado de Hodges et al. (1999). Cerca de 0,1 g de folhas maceradas em N_2 liq foram homogeneizadas em solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % + triton 1 %. Os extratos foram centrifugados (10.000 x g, 15 min, 4 °C.) e a solução de TBA 0,5 % + TCA 20 % foi adicionada ao sobrenadantes. As amostras permaneceram em banho-maria por 30 min a 95 °C e as reações foram paralisadas por imersão em gelo (15 min). A concentração de MDA foi determinada em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Device) a 440, 532 e 600 nm (Du e Bramlage 1992).

Compostos fenólicos solúveis (CFS)

Os compostos fenólicos foram extraídos de 0,1 g de folhas usando MCA (metanol: clorofórmio: água, 6: 2,5: 1,5 v/v), segundo Sánchez-Viveros et al. (2011). Os teores de CFS nos extratos foram determinados pela reação com Folin-Ciocalteu (1N) e carbonato de sódio 20 %. As reações ocorreram durante 30 min sob agitação em termomixer à 300 g e as leituras foram realizadas a 765 nm em espectrofotômetro. A curva padrão de referência foi estabelecida com ácido tânico (0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Teor relativo de água nas folhas (TRA)

O teor relativo de água foi mensurado em seis discos foliares de 1 cm de diâmetro retirados de duas folhas completamente expandidas e não senescentes por repetição (n=5). Os discos foram pesados imediatamente após a excisão, registrando-se a massa de matéria fresca (MF). Determinou-se a massa de matéria túrgida (MT) após 24 h de embebição dos discos em água destilada (no escuro à 17 °C). As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada à 70 °C por 48 h, obtendo-se a massa de matéria seca (MS). O TRA foi calculado segundo a fórmula desenvolvida por González-Vilar (2001), na qual $TRA = (MF - MS) / (MT - MS) \times 100$.

Quantificação de açúcares

A concentração de glicose, frutose e sacarose presente nas raízes e folhas de *A. thaliana* foi determinada pelo método de Fernie (2011). Primeiramente, adicionou-se etanol 98 % à uma massa seca de 0,02 g e 0,015 g de folhas e raízes, respectivamente. As amostras foram aquecidas (80 °C por 20 min) e agitadas (500 x g) em termomixer durante a extração. Após agitação, centrifugou-se o extrato (16200 x g) e o sobrenadante recolhido em microtubos para posterior quantificação. Posteriormente, esses passos foram repetidos com álcool 80 e 60 %. Os extratos obtidos nas três etapas foram recolhidos e misturados, e adicionados a um mix constituído por ATP, NADP e G6PDH preparados em solução tampão HEPES 0,1 M. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 340 nm em espectrofotômetro após adição sequencial das enzimas hexocinase, fosfoglicose isomerase (PGI), e β -frutoseidase.

Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas [taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i) e respiração (R_d)] foram obtidos com analisador portátil de gás a infravermelho [modelo Li-6400XT (LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com câmara de fluorescência integrada (modelo LI-6400-40, Lincoln, NE, USA)]. As medições foram realizadas em folhas completamente expandidas, a cada três dias (3, 6 e 10 dias após o início do nevoeiro simulado), sob irradiância de 700 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, concentração atmosf\u00e9rica de CO₂ de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e temperatura de 25 °C.

Pigmentos fotossint\u00e9ticos

Para a determina\u00e7\u00e3o dos teores de caroten\u00f3ides (Crt), clorofila a (Chl_a), clorofila b (Chl_b) e clorofilas totais (Chl_{a+b}) foram utilizados dois discos foliares de 0,6 cm de di\u00e2metro por repeti\u00e7\u00e3o. Os discos foram pesados, homogeneizados com carbonato de c\u00e1lcio, e os pigmentos foram extra\u00eddos com acetona 80 % (v/v) (Lichthenthaler 1987, adaptado). As concentra\u00e7\u00f5es de Crt, Chl_a, Chl_b e Chl_{a+b} foram determinadas em espectrofot\u00f4metro a 470, 646 e 663 nm. Todo o processo de extra\u00e7\u00e3o foi realizado com pouca luz para evitar a degrada\u00e7\u00e3o das clorofilas nas amostras.

Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa Assistat (versão 7.6 beta) e SAS (versão 9.1).

Resultados

Teor de F e de nutrientes

O teor de F nas folhas de *A. thaliana* cresceu em função do aumento da concentração do poluente no nevoeiro. As plantas expostas a 20, 40 e 80 mg F L⁻¹ apresentaram, respectivamente, uma concentração cerca de 76,4; 187,5 e 575,6 vezes maior desse íon em relação ao tratamento controle (Fig. 1), o qual apresentou aproximadamente 18 µg F g⁻¹ de massa de matéria seca.

O F afetou mais o teor nutricional da raiz que o da parte aérea das plantas expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹ nos nevoeiros simulados. Os teores de nutrientes quantificados na raiz e folhas das plantas tratadas com 20 mg F L⁻¹ não diferiram em relação ao controle. As concentrações de Ca nas raízes não foram afetadas pelo F, porém na parte aérea das plantas expostas a 80 mg F L⁻¹ houve redução em 27 % no teor deste nutriente em relação ao controle (Tab. 1).

Nas raízes das plantas tratadas com 40 e 80 mg F L⁻¹, as concentrações de K, P e S diminuíram em aproximadamente 49, 33 e 44 %, respectivamente, enquanto houve um aumento de 17 % no teor de K na parte aérea das plantas expostas a 80 mg F L⁻¹. Os nutrientes Mg, Cu e Fe apresentaram redução aproximada de 41, 33 e 44 %, respectivamente, nas raízes das plantas tratadas com 80 mg F L⁻¹. As concentrações de Zn e Mn tanto na parte aérea quanto na raiz não foram alteradas pelo F (Tab. 1).

Estresse oxidativo e defesa antioxidante

As duas maiores concentrações de F resultaram no aumento significativo do extravasamento de eletrólitos e do acúmulo de MDA nas plantas. O percentual de eletrólitos extravasados nas plantas tratadas com 40 e 80 mg F L⁻¹ foi 230 % e 281 % maior que o controle, respectivamente, enquanto o de MDA foi 67 e 79 %. A ocorrência de estresse oxidativo não foi observado nas plantas expostas a 20 mg F L⁻¹ (Fig. 2A e B).

Apesar da ocorrência de estresse oxidativo nas plantas tratadas com 40 e 80 mg F L⁻¹, os teores de CFS não diferiram entre os tratamentos (Fig. 2C).

Quantificação de açúcares

Os efeitos do F sobre o conteúdo de açúcares nas plantas de *A. thaliana* são mostrados na Fig. 3. Os teores de glicose e frutose foram afetados apenas nas plantas expostas a 80 mg F L⁻¹. Nas folhas, o conteúdo de glicose foi 70 % menor que o controle (Fig. 3A), enquanto o de frutose aumentou em 107 % (Fig. 3B). Nas raízes, a concentração de glicose se manteve constante, não diferindo entre os tratamentos (Fig. 3A), porém a frutose foi reduzida em 64 % em comparação ao controle (Fig. 3B). A sacarose não foi detectada nas amostras analisadas.

Teor relativo de água

O F reduziu o TRA das folhas de *A. thaliana*, evidenciando a ocorrência de déficit hídrico nas plantas expostas ao poluente. As plantas submetidas à 20 mg F L⁻¹ demonstraram um decréscimo aproximado de 11 % no TRA em relação ao controle. Nos demais tratamentos com F apresentaram TRA cerca de 14 % menores que o controle. O TRA não apresentou diferença entre os tratamentos com F nos nevoeiros (Fig. 4).

Trocas gasosas

Já na primeira avaliação as plantas tratadas com 80 mg F L⁻¹ apresentaram redução de 53 % nos valores de A, em relação ao controle. Não houve variação dos valores de A no tratamento com 80 mg F L⁻¹, ao longo do período de avaliação (Fig. 5A). As plantas tratadas com 20 e 40 mg F L⁻¹, após 10 dias de exposição, apresentaram redução aproximada de 35 % nos valores de A em relação ao controle (Fig. 5A). Os valores de A nos tratamentos com 20 e 40 mg F L⁻¹ apresentaram redução de 22 e 36 %, respectivamente, da segunda para a terceira avaliação (redução dentro do tratamento ao longo do período de avaliação) (Fig. 5A).

Os valores de g_s acompanharam a queda em A em plantas expostas a 80 mg F L⁻¹ no nevoeiro, mostrando valores 26 % menores que o controle, na primeira avaliação (Fig. 5B). Os valores de g_s neste tratamento se mantiveram constantes ao longo do período de avaliação (Fig. 5B). O tratamento com 40 mg F L⁻¹ apresentou redução de 19 e 36% em

relação ao controle, na segunda e terceira avaliação, respectivamente (Fig. 5B). Após dez dias de exposição ao F, as plantas tratadas com 20 mg F L⁻¹ apresentam uma redução significativa de g_s (20%) em relação ao controle. Apesar dessa redução, os valores de g_s determinados em 20 mg F L⁻¹ não variaram ao longo do tempo de avaliação (Fig. 5B). Ainda na terceira avaliação, plantas expostas a 80 mg F L⁻¹ apresentaram valores de g_s 24 e 39 % menores em relação aos tratamentos com 20 e 40 mg F L⁻¹, respectivamente (Fig. 6B).

As plantas expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹ apresentaram os valores de C_i aumentados ao longo do tempo (variação dentro do tratamento em diferentes avaliações), com o aumento ocorrendo da segunda para a terceira avaliação no tratamento com 40 mg F L⁻¹ e da primeira para a segunda avaliação no tratamento com 80 mg F L⁻¹. Entretanto, apenas as plantas expostas a 80 mg F L⁻¹ diferiram do controle, apresentando um aumento aproximado de 16 % em relação ao controle, tanto na segunda quanto na terceira avaliação (Fig. 5C).

Em geral, todos os tratamentos apresentaram aumento em R_d ao longo do tempo de avaliação. Porém, esse incremento foi diferente entre os tratamentos, sendo mais acentuado quanto menor a dose de F presente nos nevoeiros (Fig. 5D). Desta maneira, enquanto o tratamento controle apresentou um aumento de 136 % na respiração da primeira para a terceira avaliação, os tratamentos com 20, 40 e 80 mg F L⁻¹ aumentaram apenas 101, 74 e 56 %, respectivamente, no mesmo intervalo de tempo. Na última avaliação, os valores de R_d diferiram apenas entre 80 mg F L⁻¹ e o controle, havendo uma redução de 26 %.

Pigmentos fotossintéticos

O F reduziu gradualmente o teor de Chl_a nas folhas de *A. thaliana*, de modo que os tratamentos de 20, 40 e 80 mg F L⁻¹ apresentaram 34, 41 e 48 %, respectivamente, menos Chl_a que o controle (Fig. 6A). Os teores de Chl_b e Chl_{a+b} diminuiram cerca de 20 e 22 %, respectivamente, nas maiores concentrações de F (40 e 80 mg F L⁻¹), em relação ao controle (Fig. 6B e C). Em 20 e 40 mg F L⁻¹, as concentrações de carotenoides permaneceram estatisticamente constantes (Fig. 6D), enquanto 80 mg F L⁻¹ apresentou uma queda de 29 % no teor desse pigmento em relação ao controle.

Discussão

Este trabalho é o primeiro relato dos mecanismos fisiológicos de *A. thaliana* envolvidos na sua tolerância ao F. O estresse oxidativo induzido pela hiperacumulação de F na espécie gerou danos fotoquímicos e possivelmente bioquímicos nas plantas expostas a 40 e 80 mg F L⁻¹, o que revela a elevada tolerância da mesma ao poluente, visto que estas são concentrações quatro e oito vezes maiores, respectivamente, às observadas em regiões poluídas com F. O teor de F nas folhas de espécies hiperacumuladoras ultrapassa 1000 µg F g⁻¹ (Ruan et al. 2003; Baunthiyal e Ranghar 2015). *A. thaliana* acumulou mais de 1300 µg F g⁻¹ MS em suas folhas quando expostas a 20 mg F L⁻¹ sem apresentar sintomas visuais de fitotoxidez (Capítulo 1).

As plantas hiperacumuladoras estabilizam o F nas paredes das células através de complexos formados com o cálcio (Ca), evitando a sua entrada no simplasto. Portanto, a maior ou menor tolerância de uma espécie ao F está também relacionada ao maior teor de Ca nos tecidos vegetais (Baunthiyal et al. 2014; Boukhris et al. 2014). As plantas de *A. thaliana* expostas a 20 e 40 mg F L⁻¹ não diferiram do controle quanto a concentração de Ca presente em suas raízes e partes aéreas. Já foi demonstrado que concentrações citosólicas de Ca aumentadas estão geralmente associadas a ocorrência de estresse abiótico nas plantas (Albrecht et al. 2003). Portanto, a estabilização do F pelo Ca reativo tem sido sugerida como um dos primeiros mecanismos envolvidos na desintoxicação do F em espécies tolerantes (Ruan et al. 2003; Baunthiyal et al. 2014), e possivelmente, está atuando em *A. thaliana*.

No nosso estudo, foi observado que o poluente teve maior efeito sobre a absorção de nutrientes do que no transporte destes para a parte aérea das plantas de *A. thaliana*. A absorção de P, S e K foi reduzida desde a concentração de 40 mg F L⁻¹, enquanto Mg, Cu e Fe diminuíram apenas no tratamento com 80 mg F L⁻¹. O F interfere indiretamente na absorção de P, S e K através da inibição de ATPases nas células da raiz (Murphy e Coll 1992; Baunthiyal et al. 2014), e diretamente nos teores de Mg, Cu e Fe, tornando-os indisponíveis por meio da formação de complexos com baixa solubilidade (Panda 2015). Desta forma, a interferência indireta do poluente na absorção de nutrientes é mais susceptível de ocorrer nesta espécie que a direta. Entretanto, foi observado acúmulo de K na parte aérea das plantas expostas a 80 mg F L⁻¹ nos nevoeiros, o que pode indicar um importante papel desempenhado pelo elemento nas respostas fisiológicas de *A. thaliana*

ao F. O K atua na regulação da pressão osmótica na planta, impulsionando o fluxo da seiva a partir das raízes para a parte aérea (Lebaudy et al. 2007).

As concentrações de Zn e Mn tanto na raiz quanto na parte aérea das plantas não foram influenciadas pelo F, assim como foi observado em *C. sinensis* quando submetida a 30 mg F Kg⁻¹ por 30 dias (Ruan et al. 2003). Injúrias crônicas causadas pelo poluente em espécies sensíveis são associadas a redução no teor foliar de Mn, Zn, Mg e Fe (Panda 2015), porém essa relação não foi observada no presente estudo. Apesar de Mg e Fe serem importantes para a biossíntese de clorofilas, as cloroses observadas nas folhas das plantas de *A. thaliana* expostas 80 mg F L⁻¹ (Cap. 1) não podem ser atribuídas aos teores destes nutrientes, uma vez que não diferiram do controle. No geral, diferente do observado na espécie sensível *Amygdalus communis* (Rosaceae), cujo o estado nutricional das folhas foi mais afetado que o das raízes (Elloumi et al. 2005), o estresse oxidativo induzido pelo F alterou mais o teor de nutrientes da raiz que o da parte aérea em *A. thaliana*, provavelmente pela degradação/inativação das proteínas transportadoras de membranas (Panda 2015).

Estresses abióticos são frequentemente relacionados à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que promovem a peroxidação dos fosfolipídios das membranas, produzindo MDA, e afetando a sua integridade funcional (Gunes et al. 2007). No interior das células, as ROS causam danos as macromoléculas celulares e aumentam o teor de íons no citosol, que são detectados pelo método de condutividade elétrica (Li et al. 2011). As maiores concentrações de F nos nevoeiros (40 e 80 mg de F⁻ L⁻¹) geraram danos oxidativos em *A. thaliana*, evidenciados pelo aumento no teor de MDA e eletrólitos extravasados, não sendo detectados níveis consideráveis destes parâmetros no tratamento com a menor concentração do elemento. Um estudo recente demonstrou que o acúmulo de F na forma de ácido perfluoro-octanóico (PFOA) em *A. thaliana* pode causar estresse oxidativo, enquanto a sua forma inorgânica (NaF) não teve efeito sobre o conteúdo de MDA produzido. Nossos resultados revelam a tolerância desta espécie ao poluente, já que a concentração de 20 mg F L⁻¹, considerada elevadíssima por ser o dobro da encontrada nas chuvas em atmosferas poluídas (Smith et al. 1979), não ocasionou estresse oxidativo em plantas de *A. thaliana*.

O estresse oxidativo desencadeado por 40 e 80 mg F L⁻¹ não promoveu o aumento da produção de compostos fenólicos solúveis (CFS) nas plantas de *A. thaliana*, ao

contrário do que já foi observado em outras espécies. Compostos antioxidantes, como os fenólicos, desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa das plantas sob estresse oxidativo (Ram et al. 2014). A produção de CFS é uma resposta comum a maioria das espécies vegetais sob estresse induzido pelo F (Mesquita et al. 2011; Sant'Anna-Santos et al. 2014). Porém, constatamos que em *A. thaliana*, esses metabólitos secundários não compõem os mecanismos de defesa antioxidante em resposta ao F. O estresse causado por ozônio, dióxido de enxofre e dióxido de cobre elevam a atividade de peroxidases nas plantas de *A. thaliana*, mostrando que essa é uma resposta comum a diferentes poluentes atmosféricos nesta espécie (Kubo 1999; Drazkiewicz et al. 2004) e provavelmente, podem atuar na defesa antioxidante de *A. thaliana* ao F.

Geralmente, enzimas antioxidantes agem em conjunto com compostos não enzimáticos, como prolinas e açúcares, na eliminação sinérgica de radicais livres, protegendo as membranas celulares de danos oxidativos (Mascher et al. 2002; Tasgín et al. 2003). Plantas de *A. thaliana* expostas a 80 mg F L⁻¹ acumularam altos níveis de frutose na parte aérea sem que ocorresse aumento nos teores de glicose. Possivelmente, a via da sacarose sintase (SUSY) foi privilegiada em plantas de *A. thaliana* por converter sacarose em frutose com economia de uma molécula de ATP (Huber e Huber 1996). Desta maneira, as plantas aumentam a quantidade de açúcares redutores, como a frutose, de maneira energeticamente mais favorável, e os usam no combate ao estresse gerado pelo poluente. Já foi demonstrado um aumento no teor de açúcares redutores concomitante à diminuição da concentração de sacarose na parte aérea das plantas expostas ao F (Gadi et al. 2012; Baunthiyal et al. 2014; Ram et al. 2014) e que em espécies sensíveis a síntese destes carboidratos é inibida pelo poluente (Elloumi et al. 2005), sugerindo que a frutose pode estar atuando na atenuação dos danos oxidativos promovidos pelo F em *A. thaliana*. A redução do teor de glicose e frutose na raiz das plantas tratadas com 80 mg F L⁻¹ pode estar relacionada com efeito inibitório do poluente no transporte de carboidratos das folhas até as raízes, assim como já foi observado com o amido (Sant'Anna-Santos et al. 2014). Em *A. thaliana* foi descrita a redução do diâmetro dos feixes vasculares distribuídos pela lâmina foliar (CAP. 1), que pode ser indicativo de redução no transporte de fotoassimilados da parte aérea para a raiz.

Além do estresse oxidativo, o F pode levar à ocorrência de déficit hídrico pela inibição da aquisição de água pelas raízes ou do seu transporte pela planta (Ram et al.

2014), tal como foi observado nas plantas de *A. thaliana* expostas a todas as concentrações do poluente. Os açúcares juntamente com o K, atuam como osmólitos por auxiliarem na redução do potencial hídrico das raízes ou das folhas durante o déficit hídrico, aumentando a absorção de água pelas plantas ou reduzindo a sua perda pelas folhas (Kamaluddin e Zwiazek 2003; Lebaudy et al. 2007; Ram et al. 2014). Assim, o aumento de K e frutose na parte aérea das plantas pode indicar uma estratégia de regulação osmótica nesta espécie.

O déficit hídrico induzido pelo F pode promover, ainda, a perda de turgor nas células-guarda dos estômatos, ocasionando a redução do tamanho do ostíolo e conseqüentemente, a diminuição da condutância estomática (Weinstein e Davison 2003), como verificado no Capítulo 1. Além disso, a obliteração dos ostíolos por ceras epicuticulares erodidas e o colapamento das células guarda observadas nas folhas de *A. thaliana* expostas ao poluente (Cap. 1) também impõem restrições difusionais à entrada de CO₂ (Elloumi et al. 2015).

O estresse oxidativo proporcionou a redução da concentração dos pigmentos fotossintéticos nas folhas de *A. thaliana*. Assim, tanto limitações difusivas quanto fotoquímicas promoveram o decréscimo da taxa fotossintética nas plantas desta espécie. A diminuição da fotossíntese é correlacionada com a diminuição da abertura estomática, capacidade de interceptação de luz e de fixação de CO₂, culminando na redução do crescimento das plantas (Morales et al. 2002; Mesquita et al. 2011). Foi observado um gradiente de sensibilidade ao F pelos pigmentos fotossintéticos (Chl_a > Chl_b > Carotenoides), indicando que a Chl_a possa ser o principal pigmento envolvido na redução da fotossíntese. Este mesmo gradiente já foi relatado para plantas de *Citrullus lanatus* sob estresse induzido pelo poluente (Ram et al. 2014).

O F pode ativar enzimas que degradem Chl_a e Chl_b, ou ainda inibir a biossíntese dessas moléculas e, por conseqüência, reduzir a fotossíntese (Li et al. 2011). Entretanto, já foi demonstrado que reduções nas taxas fotossintéticas podem ocorrer sem que haja degradação ou limitação na produção dos pigmentos (Kamaluddin e Zwiazek 2003). Neste contexto, restrições à difusão de CO₂ pela redução da condutância estomática podem estar atuando (Weinstein e Davison 2003). Danos ocasionados aos estômatos, como a redução da turgescência das células-guarda e subsidiárias, observados em plantas

de *A. thaliana* (Cap. 1) podem modificar as taxas fotossintéticas, assim como foi observado anteriormente em outras espécies (Baunthiyal et al. 2014).

Apesar do F ter causado limitações difusivas em *A. thaliana*, a concentração interna de CO₂ cresceu nas folhas das plantas tratadas com 80 mg F L⁻¹. Este aumento, associado à inibição da fotossíntese, é atribuído a possíveis danos gerados à enzima Ribulose 1,5 Bisfosfato Carboxilase Oxigenase (RuBisCo), prejudicando a fixação de CO₂. Fluoretos geralmente atuam inativando a atividade de enzimas envolvidas na fotossíntese, como a RuBisCo e a ATPase sintase (Baunthiyal et al. 2014; Panda 2015). A inibição da atividade de ATPases na mitocôndria promove menores taxas respiratórias mediadas pelo baixo consumo de oxigênio (Miller 1993). O aumento da respiração celular das plantas de *A. thaliana*, em decorrência do início do florescimento (dados não mostrados), foi maior no controle em relação aos tratamentos com F. Desta maneira, no último dia de avaliação, a respiração das plantas foi tanto maior quanto menor a concentração do poluente nos tratamentos, demonstrando o seu efeito inibitório nesta espécie. Por serem sensíveis aos íons de F, as enzimas da via glicolítica e do ciclo de Krebs são inibidas pela reação entre o poluente e aminoácidos funcionais em seus sítios ativos (Barbier et al. 2010). Portanto, já é conhecido o efeito inibidor do poluente na respiração celular e consequente diminuição da produção de ATP (Baunthiyal et al. 2014).

De forma geral, todos esses processos fisiológicos foram alterados pelo estresse oxidativo decorrente da hiperacumulação do F nas folhas das plantas de *A. thaliana* expostas ao poluente. Os danos fotoquímicos e bioquímicos foram maiores e ocorreram mais rapidamente quanto maior a concentração de F nos nevoeiros. Mesmo acumulando altas concentrações desse elemento tóxico em seus tecidos, plantas de *A. thaliana* submetidas ao tratamento com 20 mg F L⁻¹ não apresentaram grandes alterações fisiológicas, revelando a grande tolerância desta espécie ao F. No presente estudo, a tolerância observada pode estar relacionada à estabilização do F pelo Ca das paredes celulares e pelo aumento na concentração de K, frutose e, provavelmente, da atividade enzimas antioxidantes nas folhas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa a primeira autora; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa a última autora; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por auxiliar financeiramente o estudo, e ao Efraim Lázaro Reis, por ajudar com a detecção do flúor nas amostras.

Referências bibliográficas

- Albrecht V, Weigl S, Blazevic D, D'Angelo C, Batistic O, Kolukisaoglu Ü, Bock R, Schulz B, Harter K, Kudla J (2003). The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stress. *The Plant Journal* **36**, 457–470.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **188**, 319–333.
- Baunthiyal M, Bhatt A, Ranghar S (2014). Fluorides and its effects on plant metabolism. *International Journal of Agricultural Technology* **10**, 1–27.
- Baunthiyal M, Ranghar S (2015). Accumulation of fluoride by plants: Potential for phytoremediation. *Clean - Soil, Air, Water* **43**, 127–132.
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* **149**, 1302–1315.
- Boukhris A, Laffont-Schwob I, Rabier J, Salducci MD, El Kadri L, Tonetto A, Tatoni T, Chaieb M (2014). Changes in mesophyll element distribution and phytometabolite contents involved in fluoride tolerance of the arid gypsum-tolerant plant species *Atractylis serratuloides* Sieber ex Cass. (Asteraceae). *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 7918–7929.
- Camargo JA (2003). Fluoride toxicity to aquatic organisms: A review. *Chemosphere* **50**, 251–264.
- Cape JN, Fowler D, Davison A (2003). Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: Recent trends and research needs. *Environment International* **29**, 201–211.

- Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* **17**, 379–387.
- Du ZY, Bramlage WJ (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **40**, 1566-1570.
- Easlon HM, Carlisle E, McKay JK, Bloom AJ (2015). Does low stomatal conductance or photosynthetic capacity enhance growth at elevated CO₂ in *Arabidopsis thaliana*? *Plant physiology* **168**, 156–163.
- Elloumi N, Abdallah FB, Mezghani I, Rhouma A, Boukhris M (2005). Effect of fluoride on almond seedlings in culture solution. *Fluoride* **38**, 193–198.
- Elloumi N, Zouari M, Chaari L, Rouina BB, Abdallah FB, Kallel M (2015). Morphological and physiological changes induced in *Olea europaea* and *Prunus dulcis* exposed to air fluoride pollution. *Brazilian Journal of Botany* **38**, 99–106.
- 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.
- Fialho, RC (1997). Acumulação foliar de fluoretos e seu significado ecológico em espécies arbóreas da Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Cubatão (SP), 100.
- Fornasiero RB (2003). Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: First field observations. *Plant Science* **165**, 507–513.
- González L, González-Vilar M (2001). Determination of relative water content. **In:** Reigosa Roger MJ, *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publishers, 207-212.
- Gadi BR, Pooja V, Ram A (2012). Influence of NaF on seed germination, membrane stability and some biochemicals content in *Vigna* seedlings. *Journal of Chemical , Biological and Physical Sciences* **2**, 1371–1378.
- Gunes A, Inal A, Bagci EG, Coban S, Sahin O (2007). Silicon increases boron tolerance and reduces oxidative damage of wheat grown in soil with excess boron. *Biologia Plantarum* **51**, 571–574.
- Guo J, Dai X, Xu W, Ma M (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis*

- thaliana. *Chemosphere* **72**, 1020–1026.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Plant* **207**, 604–611.
- Huber SC, Huber JL (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 431–444.
- Kamaluddin M, Zwiazek JJ (2003). Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **117**, 368–375.
- Krizek BA, Prost V, Joshi RM, Stoming T, Glenn TC (2003). Developing transgenic *Arabidopsis* plants to be metal-specific bioindicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 175–181.
- Kubo A (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **112**, 279–290.
- Lebaudy A, Véry AA, Sentenac H (2007). K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Letters* **581**, 2357–2366.
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**, 827–836.
- Lee SH, Zwiazek JJ (2015). Regulation of aquaporin-mediated water transport in *Arabidopsis* roots exposed to NaCl. *Plant and Cell Physiology* **56**, 750–758.
- Li C, Zheng Y, Zhou J, Xu J, Ni D (2011). Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine. *Biologia Plantarum* **55**, 563–566.
- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **In**: Colowick SP, *Methods in enzymology*. San diego. Academic Press **148**, 350–382.
- Loganathan P, Hedley MJ, Wallace GC, Roberts AHC (2001). Fluoride accumulation in pasture forages and soils following long-term applications of phosphorus fertilisers. *Environmental Pollution* **115**, 275–282.
- Mascher R, Lippmann B, Holzinger S, Bergmann H (2002). Arsenate toxicity: Effects on

- oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* **163**, 961–969.
- Mesquita GL, Tanaka FAO, Cantarella H, Mattos D (2011). Atmospheric absorption of fluoride by cultivated species. Leaf structural changes and plant growth. *Water, Air, and Soil Pollution* **219**, 143–156.
- Miller GW (1993). The effect of fluoride on higher plants with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. *Fluoride* **26**, 3-22.
- Moraes RM, Klumpp A, Furlan CM, Klumpp G, Domingos M, Rinaldi MCS, Modesto IF (2002). Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. *Environment International* **28**, 367–374.
- Mori J, Saebo A, Hanslin HM, Teani A, Ferrini F, Fini A, Burchi G (2015). Deposition of traffic-related air pollutants on leaves of six evergreen shrub species during a mediterranean summer season. *Urban Forestry and Urban Greening* **14**, 264–273.
- Murphy AJ, Coll RJ (1992). Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 5229–5235.
- Panda D (2015). Fluoride toxicity stress: Physiological and biochemical consequences on plants. *International Journal Biological – Research Environmental Agricultural Science* **1**, 70-84.
- Pulyaevskaya MA, Varakina NN, Gamburg KZ, Rusaleva TM, Stepanov AV, Voinikov VK, Rikhvanov EG (2011). Sodium fluoride inhibits HSP synthesis in heat-stressed cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**, 589–596.
- Ram A, Verma P, Gadi BR (2014). Effect of fluoride and salicylic acid on seedling growth and biochemical parameters of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Fluoride* **47**, 49–55.
- Ruan J, Ma L, Shi Y, Han W (2003). Uptake of fluoride by tea plant (*Camellia sinensis* L) and the impact of aluminum. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1342–1348.
- Sánchez-Viveros G, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (2011). Short-term effects of arsenate-induced toxicity on growth, chlorophyll and carotenoid contents and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. *Water, Air and Soil Pollution*

217, 455-462.

- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Alves TG, Campos NV, Oliva MA, Valente VMM (2014). Effects of emissions from an aluminum smelter in a tree tropical species sensitive to fluoride. *Water, Air, and Soil Pollution* **225**, 1817.
- Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Silva LC, Oliva MA (2012). Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **84**, 689–702.
- Shi HT, Li RJ, Cai W, Liu W, Wang CL, Lu YT (2012). Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* **53**, 344–357.
- Smith FA, Hodge HC, Dinman BD (1979). Airborne fluorides and man: Part II. Critical Reviews in Environmental Control **9**, 1–25.
- Szalai G, Janda T, Paldi E, Szigeti Z (1996). Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *Plant Cell Physiology* **148**: 378-383.
- Tasgín E, Atıcı Ö, Nalbantoğlu B (2003). Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation* **41**, 231–236.
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995). Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS **5**, 174.
- Van der Kooij TAW, De Kok LJ, Haneklaus S, Schnug E (1997). Uptake and metabolism of sulphur dioxide by *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **135**, 101–107.
- Weinstein LH, Davison AW (2003). Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. *Environmental Pollution* **125**, 3–11.
- Yang X, Ye C, Liu Y, Zhao F-J (2015). Accumulation and phytotoxicity of perfluorooctanoic acid in the model plant species *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* **206**, 560–566.
- Zhang X-C, Gao H-J, Yang T-Y, Wu H-H, Wang Y-M, Zhang Z-Z, Wan X-C (2016). Anion channel inhibitor NPPB-inhibited fluoride accumulation in tea plant (*Camellia sinensis*) is related to the regulation of Ca^{2+} , CaM and depolarization of plasma membrane potential. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 57.

Tabelas

Tabela 1. Teores de macro e micronutrientes determinados na raiz e folha de *Arabidopsis thaliana*, após dez dias de exposição ao flúor nos nevoeiros (0, 20, 40 e 80 mg F L⁻¹).

Nutrientes Macro/Micro (dag/kg) / (mg/kg)	Flúor no nevoeiro (mg L ⁻¹)							
	0		20		40		80	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha
P	0,52 ± 0,09 a	0,89 ± 0,03 a	0,47 ± 0,04 ab	0,89 ± 0,05 a	0,37 ± 0,06 bc	0,87 ± 0,03 a	0,35 ± 0,05 c	0,85 ± 0,05 a
K	1,37 ± 0,31 a	3,77 ± 0,22 b	1,36 ± 0,21 a	3,94 ± 0,18 b	0,70 ± 0,20 b	3,94 ± 0,23 b	0,74 ± 0,17 b	4,40 ± 0,15 a
Ca	0,68 ± 0,04 a	2,44 ± 0,17 a	0,76 ± 0,21 a	2,32 ± 0,11 a	0,83 ± 0,07 a	2,17 ± 0,18 a	0,74 ± 0,02 a	1,77 ± 0,26 b
Mg	0,32 ± 0,12 a	0,71 ± 0,13 a	0,30 ± 0,06 ab	0,67 ± 0,03 a	0,24 ± 0,04 ab	0,61 ± 0,13 a	0,19 ± 0,05 b	0,77 ± 0,17 a
S	0,70 ± 0,13 a	1,25 ± 0,32 a	0,57 ± 0,03 a	1,04 ± 0,17 a	0,39 ± 0,05 b	1,06 ± 0,13 a	0,42 ± 0,04 b	1,02 ± 0,08 a
Cu	33,00 ± 3,98 a	11,55 ± 1,19 a	35,29 ± 7,81 a	10,66 ± 0,70 ab	27,88 ± 6,16 ab	10,17 ± 0,66 ab	22,18 ± 2,53 b	9,76 ± 1,05 b
Fe	4491 ± 718 a	145,6 ± 15,2 a	2889 ± 110 ab	150,7 ± 19,3 a	3763 ± 116 ab	161,1 ± 56,2 a	2517 ± 682 b	177,9 ± 62,4 a
Zn	227,4 ± 47,1 a	96,52 ± 9,48 a	186,1 ± 45,9 a	82,61 ± 15,4 a	170,7 ± 20,1 a	79,61 ± 10,2 a	184,7 ± 37,8 a	87,27 ± 12,1 a
Mn	114,3 ± 35,6 a	83,90 ± 23,6 a	101,1 ± 35,4 a	146,3 ± 117 a	107,4 ± 11,9 a	84,22 ± 32,7 a	129,9 ± 83,3 a	63,86 ± 20,5 a

Médias seguidas por letras diferentes na horizontal indicam diferença significativa entre os tratamentos (Tukey 5 %). Cada valor representa a média de cinco repetições.

Legendas das figuras

Figura 1. Teor de flúor ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS) nas folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a concentrações crescentes desse poluente em nevoeiro simulado, durante dez dias consecutivos. A barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).

Figura 2. Estresse oxidativo e resposta antioxidante em plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas, por dez dias, ao flúor (0, 20, 40 e 80 mg F L^{-1}) nos nevoeiros. A- Percentual de eletrólitos extravasados. B – Conteúdo de aldeído malônico. C – Teor de compostos fenólicos solúveis. A barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).

Figura 3. Açúcares quantificados nas folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* expostas ao flúor (0, 20, 40 e 80 mg F L^{-1}) em nevoeiros, por dez dias consecutivos. A – Glicose. B – Frutose. A barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).

Figura 4. Percentual de água nos tecidos foliares de *Arabidopsis thaliana*, após dez dias de exposição ao flúor (0, 20, 40 e 80 mg F L^{-1}). A barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).

Figura 5. Parâmetros fotossintéticos avaliados em folhas de *Arabidopsis thaliana* exposta ao flúor em nevoeiros simulados (0, 20, 40 e 80 mg F L^{-1}) por três, seis e dez dias consecutivos. A – Assimilação líquida de CO_2 (A). B – Condutância estomática (g_s). C – Concentração interna de CO_2 (C_i). D – Respiração noturna (R_d). A barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$); letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de avaliação, enquanto letras minúsculas denotam diferença significativa entre os diferentes tempos de avaliações dentro do mesmo tratamento (Tukey 5 %).

Figura 6. Teor de pigmentos fotossintetizantes nas folhas de *Arabidopsis thaliana* expostas a nevoeiros com flúor (0, 20, 40 e 80 mg F L^{-1}). A – Clorofila a. B – Clorofila b. C – Clorofila totais. D – Carotenoides. A barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 5$), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).

Figuras

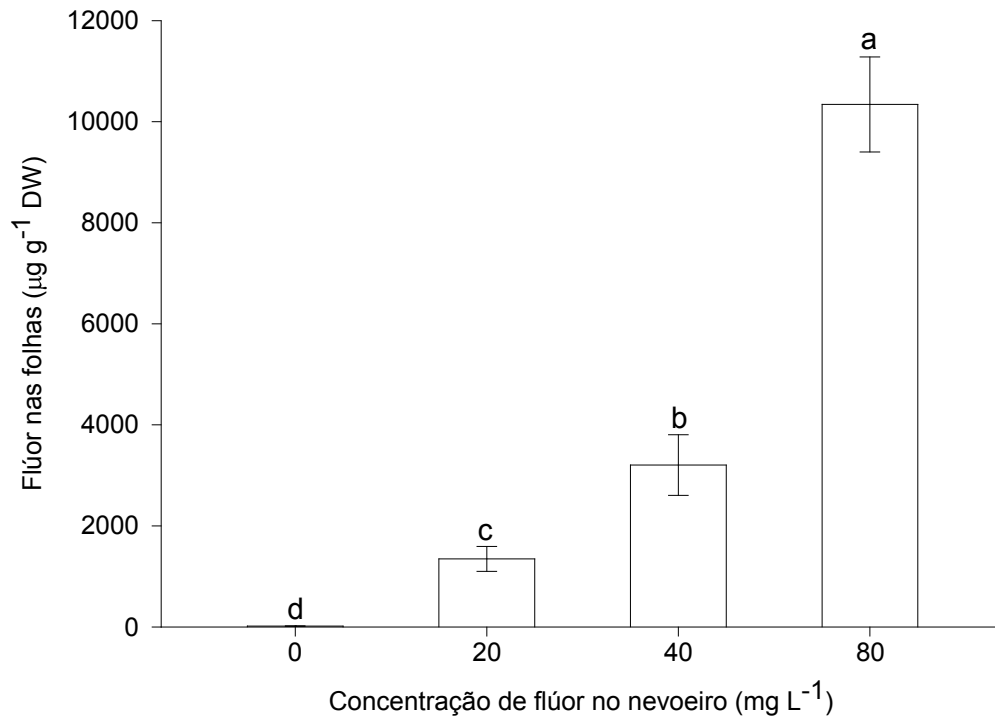


Figura 1.

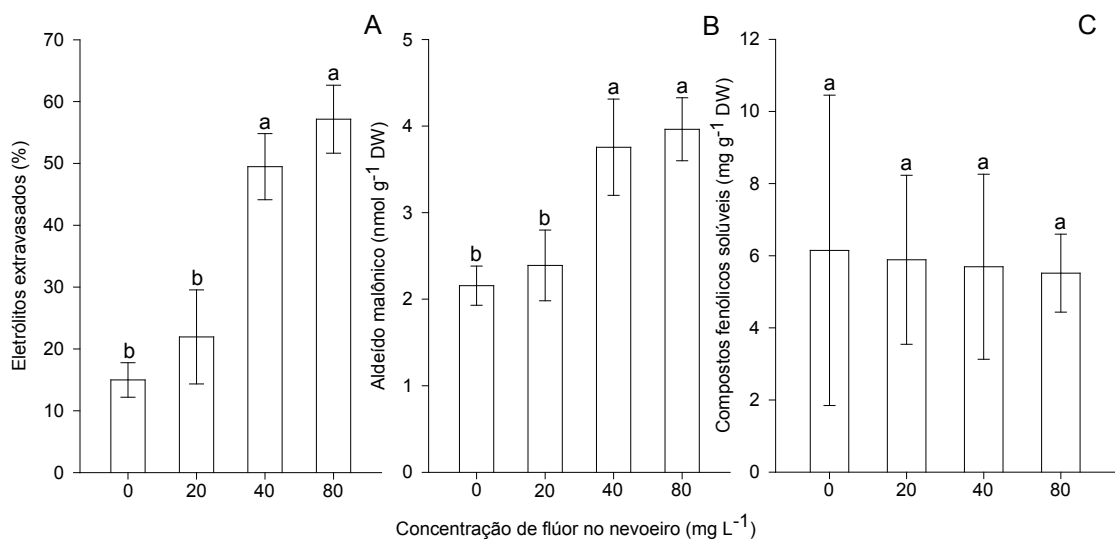


Figura 2.

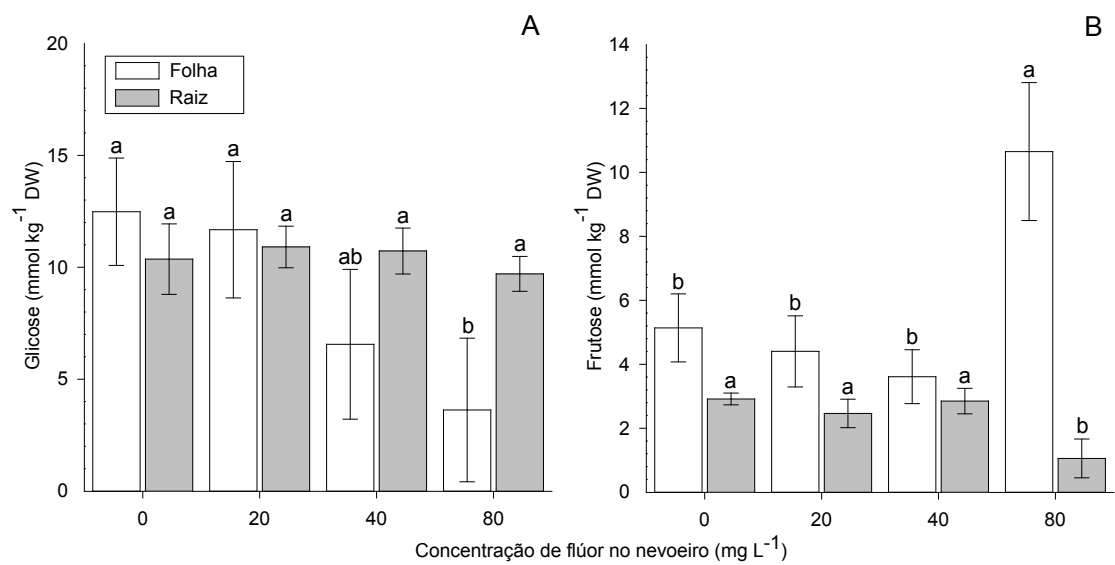


Figura 3.

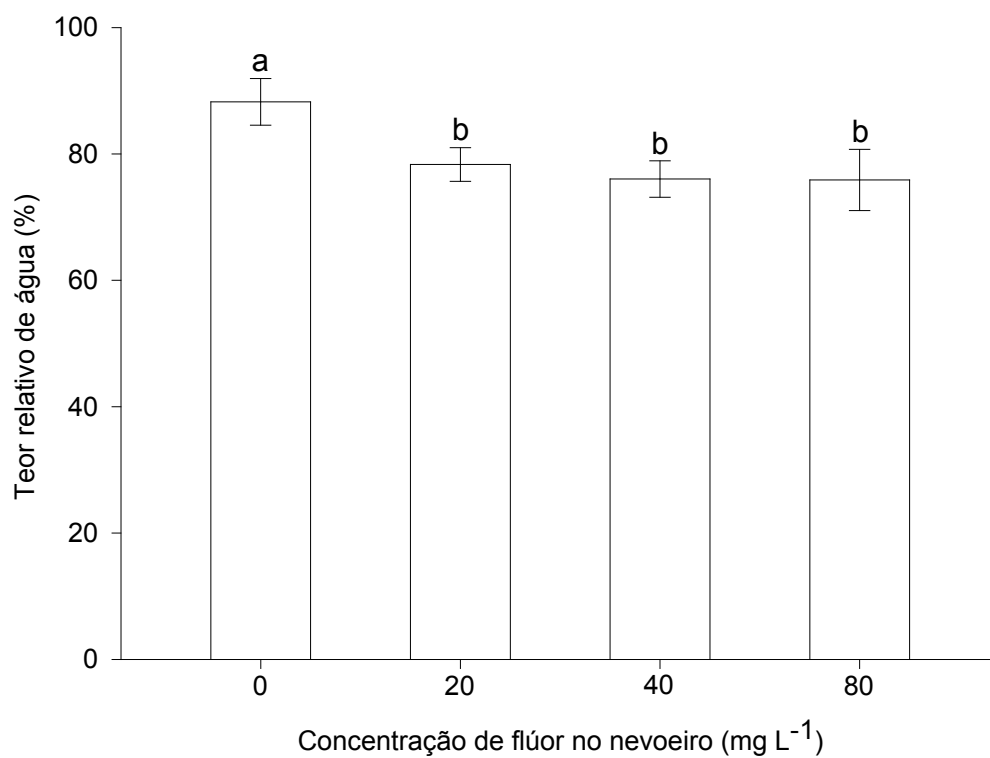


Figura 4.

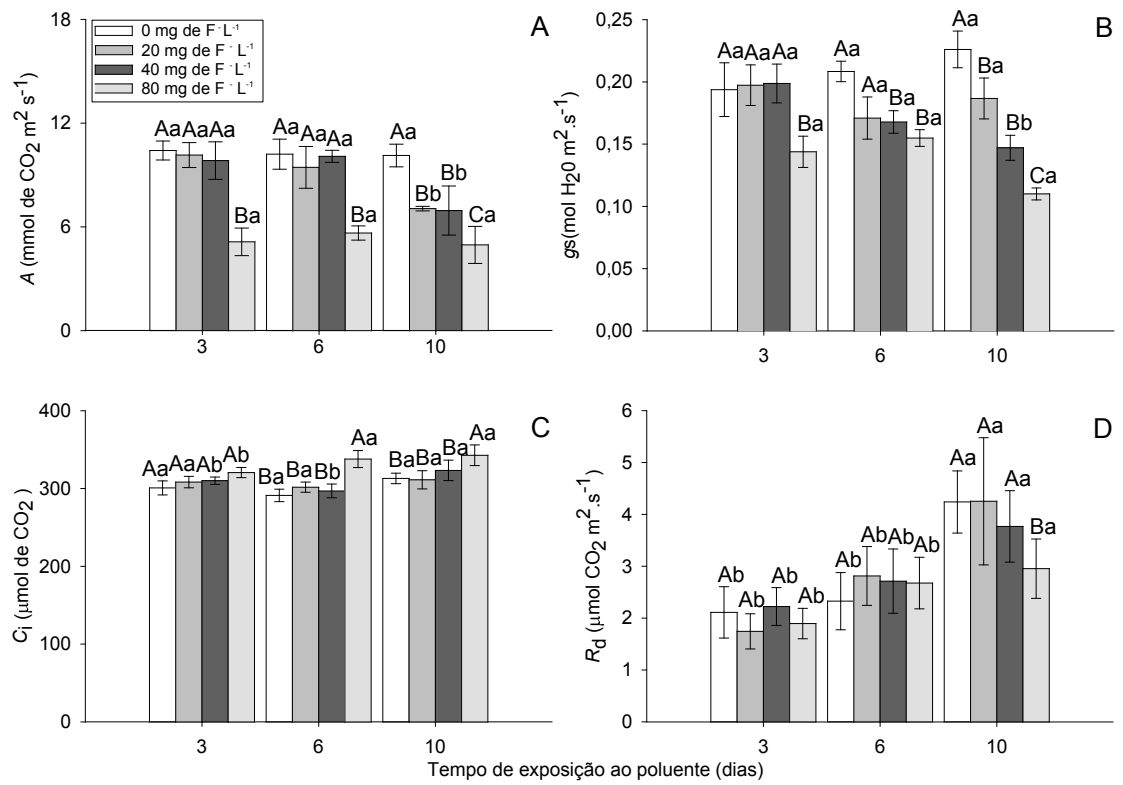


Figura 5.

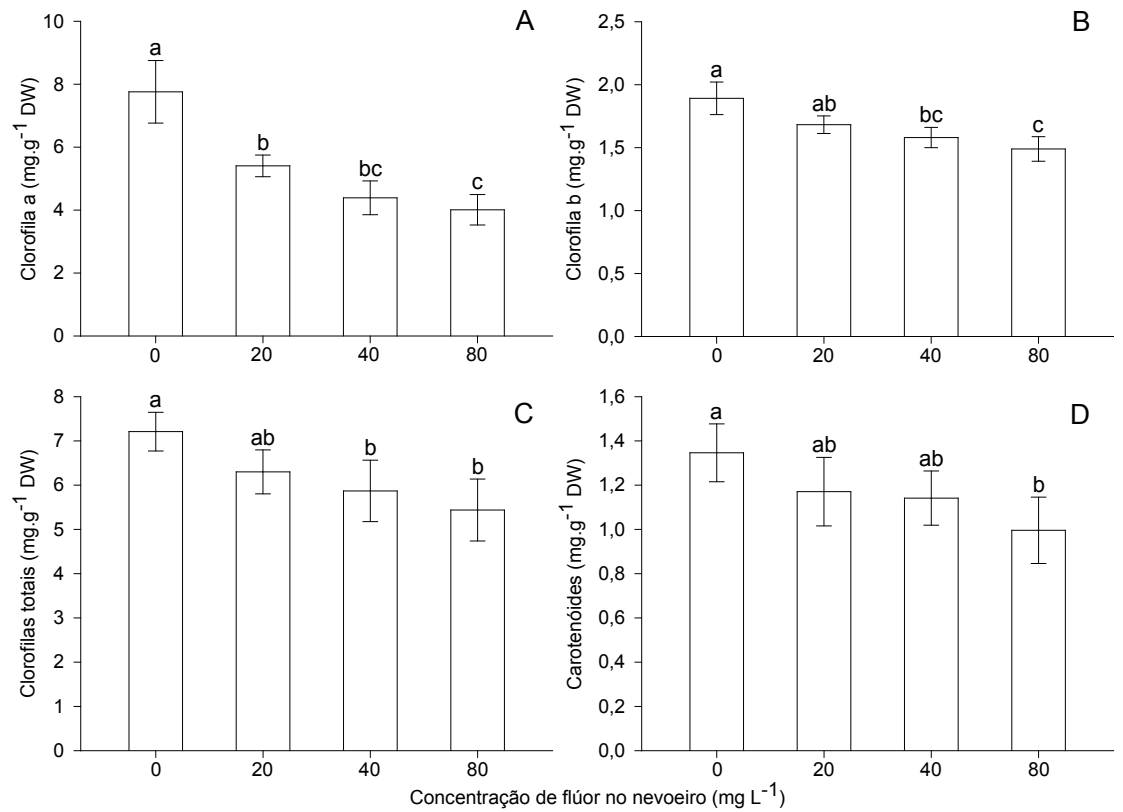


Figura 6.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, constatou-se a hiperacumulação de F nas folhas de *A. thaliana* e a relativa tolerância desta espécie ao poluente. Os danos microscópicos foram observados em folhas com e sem necroses, sendo estes semelhantes aos observados em muitas outras espécies, constituindo-se excelentes indicadores para a poluição por F. O estresse oxidativo gerado pelas as mais elevadas concentrações de F alteraram os processos fisiológicos avaliados, indicando a ocorrência de danos fotoquímicos e bioquímicos nas plantas. As plantas submetidas a 20 mg F L⁻¹ acumularam altas concentrações do poluente, mas não apresentaram grandes alterações anatômicas e fisiológicas, corroborando a tolerância desta espécie ao F. Os resultados revelam o potencial emprego desta espécie em trabalhos posteriores de engenharia genética para a seleção de genes de tolerância ao poluente, gerando informações que possam ser utilizadas na bioindicação e fitorremediação da poluição causada por F.