



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MARIANA COSTA DIAS

**EFEITO DO GÁS SULFÍDRICO NA FORMAÇÃO DE
TRICOMAS E NA RESPOSTA DAS VARIEDADES DE
SOLANUM LYCOPERSICUM MICRO-TOM E MT-GET À
INJÚRIA MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Fisiologia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



MARIANA COSTA DIAS

**EFEITO DO GÁS SULFÍDRICO NA FORMAÇÃO DE
TRICOMAS E NA RESPOSTA DAS VARIEDADES DE
SOLANUM LYCOPERSICUM MICRO-TOM E MT-GET À
INJÚRIA MECÂNICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Biologia Vegetal.**

Área de Concentração Fisiologia Vegetal

**Orientador: Prof. Dr. Luzia Valentina Modolo
Universidade Federal de Minas Gerais**

BELO HORIZONTE – MG

2016

043 Dias, Mariana Costa.
Efeito do gás sulfídrico na formação de tricomas e na resposta das variedades de solanum lycopersicum micro-tom e MT-GET à injúria mecânica [manuscrito] / Mariana Costa Dias. - 2016.
33 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luzia Valentina Modolo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Botânica.

1. Tomate - Teses. 2. Plantas - Desenvolvimento - Teses. 3. Estresse mecânico. 4. Sulfeto de hidrogênio - Teses. 5. Potencial hidrogeniônico. 6. Biologia vegetal - Teses. I. Modolo, Luzia Valentina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. III. Título.

CDU: 581

*Dissertação defendida e aprovada, em 25 de fevereiro de
2016, pela banca examinadora constituída pelos
professores:*


Dra. Luzia Valentina Modolo (UFMG)


Dra. Maria Rita Scotti Muzzi (UFMG)


Dr. Elder Antônio Sousa e Paiva (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luzia Valentina Modolo, pela oportunidade oferecida, orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Agradeço as meninas do GEBioPlan pela paciência, preocupação, competência, por dividirem comigo suas expectativas, seu conhecimento e por tornarem o dia-a-dia no laboratório mais leve e fazer dele um ótimo lugar para se trabalhar. Agradeço, em especial, à Cris e à Fe, as “gênicas” da minha vida no laboratório, pela ajuda em tudo, pelos valiosos e muitos conselhos, por estarem sempre presentes, pela tranquilidade que elas transmitem. Por serem as meninas mais doces que eu já conheci, literalmente.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal e à Socorro, pela ajuda no laboratório, pelas conversas e momentos de descontração. À Selminha, pelo carinho com as pessoas e dedicação e zelo pelo departamento.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Anatomia Vegetal e à professora Alessandra Giani por disponibilizarem o uso do laboratório, equipamentos e reagentes, por serem sempre solícitos.

Ao professor Lázaro Peres, pela colaboração e pelo fornecimento das sementes utilizadas nesse trabalho.

Aos amigos da Biologia por estarem sempre presentes e fazerem dessa jornada mais fácil e divertida. Principalmente Thomaz e Scarpelli, por serem esses dois grandes amigos lindos, que sempre se preocupam e pela ajuda nas horas de desespero.

Aos amigos do LGB, por compreenderem a minha escolha de mudar de área e me apoiarem sempre, por se disponibilizarem a ajudar, mesmo não sabendo nada do assunto e pela amizade. Em especial, ao Repolês, porque com ele sei que posso contar sempre, a qualquer hora do dia ou da noite (desculpe por isso... rs)! Muito, muito obrigada mesmo!

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Aos amigos do Eixo, por todo o apoio, conforto, amizade e alegria que me proporcionam.

Ao Rogério, pelo apoio, dedicação, compreensão, amor e amizade. Por estar ao meu lado sempre!

À minha família, principalmente à minha mãe, pelo carinho e amor incondicional, por me aguentar e me entender. Sem você nada disso seria possível. Muito obrigada. Amo você!

SUMÁRIO

RESUMO.....	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. Introdução	1
1.1. Tricomas	1
1.2. Gás sulfídrico	2
1.3. <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	3
1.3.1. <i>Galapagos enhanced trichomes (Get)</i>	4
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. Materiais e Métodos	5
3.1. Material vegetal	5
3.2. Tratamentos.....	6
3.3. Injúria mecânica.....	6
3.4. Densidade e número de tricomas	7
3.5. Determinação do acúmulo de biomassa.....	7
3.6. Quantificação de ácido salicílico	7
3.7. Quantificação de H ₂ S endógeno	8
3.8. Quantificação de H ₂ O ₂ endógeno.....	8
3.9. Atividade de enzimas antioxidantes.....	8
3.10. Análises estatísticas	9
4. Resultados.....	9
4.1. Efeito do H ₂ S no desenvolvimento de tomateiros e na formação de tricomas	9
4.2. Quantificação de H ₂ S	15
4.3. Quantificação de H ₂ O ₂ e avaliação da atividade das enzimas antioxidantes.....	16
5. Discussão	19
6. Conclusão	25
7. Referências Bibliográficas.....	26

RESUMO

Os tricomas, estruturas responsáveis pela produção de uma variedade de metabólitos secundários, têm sido implicados na resposta antiherbivoria em vegetais. O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é uma molécula gasosa que emergiu recentemente como importante sinalizador em vários processos do desenvolvimento e nas respostas de plantas a estresses. Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito de um doador de H_2S (Na_2S) e o pH de sua solução na formação de tricomas em plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT) e o híbrido *Get*. Plantas com o primeiro par de folhas expandidas foram aspergidas com Na_2S a 0, 50, 100 ou 200 μM (pH 11,0) por um período de 15 dias. Paralelamente, estresse mecânico foi promovido nas folhas que foram aspergidas com H_2S a 100 μM (pH 6,4). O crescimento das plantas e o número de folhas produzidas não foram afetados pelo H_2S exógeno. O número de tricomas na face adaxial de folhas novas tratadas com Na_2S (pH 11,0) foi 30% menor que aquele de folhas novas de plantas controle, independentemente do genótipo estudado. Contudo, o uso de Na_2S (pH 6,4) promoveu um acréscimo de 80 e 48% no número de tricomas da face adaxial de folhas de MT e de *Get*, respectivamente. Esse tratamento também estimulou o aumento da proporção de tricomas glandulares em ambos os genótipos. Sabe-se que o dano mecânico pode provocar estresse oxidativo, bem como induzir a formação de tricomas em folhas novas. Contudo esse dano não afetou o número de tricomas e nem o conteúdo de H_2O_2 em folhas novas após 21 dias de tratamento. O Na_2S (pH 6,4) restabeleceu a atividade superóxido dismutase de plantas de MT danificadas aos níveis encontrados nas plantas controle. A aplicação da solução de pH 11,0 pode ter alterado o pH das folhas dos tomateiros e essa alteração pode ter culminado na inibição e/ou atraso da formação de tricomas em folhas novas. Dessa forma, o pH da solução de doador de H_2S é crucial para observar os efeitos reais desse gás na planta. O gás sulfídrico sinaliza processos celulares que podem desencadear a indução da formação de tricomas em folhas jovens de tomateiros.

ABSTRACT

Trichomes are structures responsible for the production of a variety of secondary metabolites that are implicated in plant response to herbivory. Hydrogen sulfide (H₂S) is a gas that has emerged as a signaling molecule during plant growth and development and in response to stress. This work focused on the investigation of the effect of an H₂S donor (Na₂S) under two pH conditions on the trichome formation in *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (MT) and the hybrid *Get*. Plants bearing the first fully expanded leaf pair were sprayed with Na₂S at 0, 50, 100 or 200 μM (pH 11.0) for 15 days. In another experiment, mechanical stress was imposed in plant leaves followed by treatment with 100 μM Na₂S (pH 6.4). Plant growth and leaf production were not affected by the treatments. The number of trichomes on the adaxial face of young leaves treated with Na₂S (pH 11.0) was 30% lower than that of young leaves of control plants, regardless of the genotype. However, the use of Na₂S (pH 6.4) promoted trichome formation on adaxial face of MT and *Get* young leaves by 80% and 48%, respectively. This treatment also stimulated the increment of glandular trichome proportion in both genotypes. Mechanical damage is known to cause oxidative stress and induce trichome formation in new leaves. However, this damage neither affected the number of trichomes nor the H₂O₂ content in young leaves after 21 days of treatment. The treatment with Na₂S (pH 6.4) reestablished the activity of superoxide dismutase to control levels in MT injured plants. Application of Na₂S at pH 11.0 may have changed the pH of the leaves and this alteration may have culminated in the inhibition and/or delay of trichomes formation in young leaves. Thus, the pH of H₂S donor solution was found to be pivotal for the actual effects of this signaling molecule in plants. The H₂S signals cellular processes that, in turn, may trigger the induction of trichome formation in young leaves of tomato plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de tricomas em folhas de tomateiros Micro-Tom e <i>Get</i>	10
Figura 2. Efeito da aplicação de H ₂ S em diferentes concentrações na altura e no número de folhas de MT e <i>Get</i>	111
Figura 3. Efeito do Na ₂ S (pH 11) no número de tricomas em tomateiros Micro-Tom e <i>Get</i>	11
Figura 4. Efeito da aplicação de H ₂ S no conteúdo endógeno de ácido salicílico.	12
Figura 5. Efeito da aplicação de Na ₂ S (pH 6,4) em plantas de Micro-Tom e <i>Get</i> sob injúria mecânica quanto à formação de tricomas.	13
Figura 6. Efeito da aplicação de Na ₂ S (pH 6,4) no conteúdo de ácido salicílico em tomateiros Micro-Tom e <i>Get</i>	14
Figura 7. Conteúdo endógeno de ácido salicílico em folhas de tomateiros Micro-Tom e <i>Get</i>	15
Figura 8. Efeito da aplicação de solução de Na ₂ S e dano mecânico no conteúdo endógeno de H ₂ S.	16
Figura 9. Efeito da aplicação de Na ₂ S no conteúdo de H ₂ O ₂ em plantas danificadas.	17
Figura 10. Conteúdo endógeno de H ₂ O ₂ em tomateiros MT e <i>Get</i>	18
Figura 11. Efeito da aplicação de solução de Na ₂ S e dano mecânico na atividade das enzimas antioxidantes.	19
Figura 12. Dependência do pH na distribuição de H ₂ S a 25 e 37 °C. Adaptado de Hughes et al. 2009.	20

LISTA DE ABREVIATURAS

APX: Ascorbato peroxidase

AS: Ácido salicílico

CAT: Catalase

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

Get: Galapagos enhanced trichomes

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂S: Sulfeto de hidrogênio / Gás sulfídrico

Mb: Megabases

MT: Micro-Tom

N₂: Nitrogênio molecular

Na₂S: Sulfeto de sódio

NBT: Azul de nitro-tetrazólio

nm: Nanômetro

NPK: Formulação à base de nitrogênio, fósforo e potássio

pH: Potencial hidrogeniônico

pKa: Constante de ionização de um ácido

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SOD: Superóxido dismutase

1. Introdução

1.1. Tricomas

Os tricomas são protuberâncias de células epidérmicas, amplamente distribuídas no reino vegetal. Podem ser uni ou multicelulares e variam consideravelmente em forma, tamanho e densidade (Schillmiller et al., 2008; Kang et al., 2009). O critério mais utilizado para classificá-los é a presença ou não de atividade secretora. Os tricomas glandulares são aqueles que possuem a capacidade de sintetizar, armazenar e secretar metabólitos biologicamente ativos especializados (Kang et al., 2009; McDowell et al., 2011). Os tricomas não glandulares são desprovidos de atividade secretora e não produzem substâncias. Atuam, principalmente, como uma barreira física da planta que previne a perda de água, protege o organismo contra altas temperaturas e ataque de herbívoros e patógenos (Werker, 2000). Os tricomas podem exercer funções biológicas importantes como desencorajar herbivoria, atrair polinizadores e proteger contra vários tipos de estresse (Werker, 2000; Wagner et al., 2004) e muitas destas funções são o resultado da natureza especializada dos tricomas glandulares (Kang et al., 2009; McDowell et al., 2011).

Alguns processos que desencadeiam a formação de tricomas nas plantas, os estímulos que levam à sua produção e o espaçamento deles na lâmina foliar são conhecidos. Sabe-se que vários genes são responsáveis pela formação dessas estruturas em *Arabidopsis thaliana*, tais como os da família *GLABRA* (*GL1*, *GL2*, *GL3*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*), *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*), (Serna & Martin, 2006; Dalin et al., 2008), responsáveis pela iniciação e pelo espaçamento dos tricomas no limbo. Contudo, *A. thaliana* possui apenas tricomas não glandulares. Estudos sugerem que a formação de tricomas glandulares pode ter bases genéticas diferentes daquelas para formação de tricomas não glandulares. Além disso, os mecanismos que induzem a formação dos tricomas em *Arabidopsis* são análogos àqueles observados para espécies da família Solanaceae (Serna & Martin, 2006; Dalin et al., 2008).

Evidências apontam que, adicionalmente às bases genéticas, os hormônios vegetais estão envolvidos na formação dos tricomas. Estudos indicam que o ácido jasmônico e giberelinas ativas exógenas proporcionam um aumento no número de tricomas em folhas jovens (Traw & Bergelson, 2003). Também há relatos de que danos mecânicos e aqueles causados por herbívoros levam a um rápido aumento nos níveis de ácido jasmônico (Reymond et al., 2000) que, por sua vez pode estimular a formação de tricomas. De outro

modo, foi observado que a aplicação de ácido salicílico leva a uma diminuição no número de tricomas em folhas novas, inibindo a resposta ao ácido jasmônico (Peña-Cortés, et al., 1993; Doares et al., 1995; Traw & Bergelson, 2003). Os níveis de ácido salicílico nas plantas também podem aumentar em resposta a danos causados por alguns herbívoros (Stotz et al, 2002; Van Poecke & Dicke, 2002). Isto sugere que o aumento da produção de tricomas varia de acordo com a identidade do herbívoro e parece depender do *cross-talk* entre ácido jasmônico e ácido salicílico.

1.2. Gás sulfídrico

O sulfeto de hidrogênio, ou gás sulfídrico (H₂S), é uma molécula gasosa, de meia vida curta (12 a 37 h) e reconhecida importância para vários processos do desenvolvimento e nas respostas de plantas a estresses. Os efeitos do H₂S em plantas têm sido estudados há muitos anos, mas só recentemente foi sugerido que este gás atua como uma molécula sinalizadora, à semelhança do observado em células animais (Kimura, 2000; Wang, 2003; Wang, 2012).

Os efeitos fisiológicos do H₂S são geralmente determinados a partir do uso de substâncias capazes de liberar este gás no meio (Wang, 2012). Um cuidado deve ser tomado com relação ao pH das soluções tendo em vista que o H₂S é um ácido fraco em solução aquosa com constante de dissociação (pK_a) de 7,0 a 25 °C e 6,8 a 37 °C. O H₂S pode dissociar-se em H⁺ e ânion hidrossulfeto (HS⁻) que, por sua vez, pode dissociar em H⁺ e anion sulfeto (S²⁻) ao atingir a segunda constante de dissociação (pK_a >17), por meio da seguinte reação: $H_2S \leftrightarrow H^+ + HS^- \leftrightarrow 2 H^+ + S^{2-}$. Dessa forma, a dissociação dos doadores de H₂S, bem como do H₂S em si, é dependente de pH e podem ser geradas interpretações equivocadas dos resultados em sistemas biológicos caso o pH da solução de doador de H₂S não seja devidamente ajustado (Wang, 2012).

Estudos iniciados na década passada revelam o papel sinalizador do H₂S em vários processos nas plantas, incluindo germinação de sementes, organogênese da raiz, movimento das células-guarda e autofagia (Papenbrock et al., 2007; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2009; García-Mata et al., 2010; Álvarez et al., 2012; Lisjak et al., 2013). Alguns estudos tem também relacionado esse gás com a defesa da planta a vários tipos de estresse abiótico, principalmente por aliviar o estresse oxidativo, ao estimular a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Zhang et al., 2008; Yu et al., 2013). Contudo, poucos estudos

relacionaram H₂S à resposta de plantas a estresses bióticos (Hu et al., 2014; Shi et al., 2014). Chen et al. (2014) observaram que, após tratamento com H₂S ocorreu um aumento em quantidade da enzima aleno oxide synthase (AOS), envolvida em uma das etapas iniciais da biossíntese de ácido jasmônico. Os autores sugerem que o H₂S pode ajudar na tolerância ao estresse da planta, aumentando os níveis de ácido jasmônico que tem um conhecido papel na defesa, incluindo o aumento no número de tricomas em folhas novas (Traw e Bergelson, 2003). Shi et al. (2014) também mostraram que a aplicação de um doador de H₂S leva a um aumento na expressão de genes da biossíntese de ácido salicílico e que plantas com baixo conteúdo endógeno de H₂S apresentavam diminuição nos níveis dos transcritos dos genes supramencionados.

Considerando o papel dos tricomas e do H₂S na defesa de plantas a estresses e que o H₂S parece influenciar a via metabólica de hormônios formadores de tricomas (ácido jasmônico e ácido salicílico), um dos objetivos desse trabalho foi avaliar se H₂S também influencia a formação de tricomas.

1.3. *Solanum lycopersicum* L.

Solanum lycopersicum L. (tomate; Solanaceae) é uma cultura economicamente importante, cultivada mundialmente, que possui uma série de características que a torna uma planta modelo, tais como genoma relativamente pequeno (950 Mb), marcadores de mapa genético, ricas coleções de germoplasma (Tomato Genetics Resource Center) e protocolos de transformação eficientes. Além disso, o tomate pode ser considerado um modelo de planta alternativo à *Arabidopsis thaliana* devido a diversas características não encontradas nesta planta da família Brassicaceae, tais como crescimento simpodial independente de fotoperíodo, formação de frutos climatéricos carnosos, presença de folhas compostas, realização de interação com fungos micorrízicos e produção de tricomas glandulares (Carvalho et al., 2011).

Os mutantes são, provavelmente, o material genético mais confiável para acessar informações biológicas em um dado organismo vivo. A plethora de mutantes disponíveis para o tomate é outra característica vantajosa desse modelo vegetal (Emmanuel et al., 2002). No entanto, estudos comparativos que utilizam mutantes de tomate tendem a ser limitados pela diferença de *backgrounds* genéticos. Em tomate, a maioria das mutações conhecidas é distribuída em vários *backgrounds* genéticos, incluindo de espécies selvagens (Campos et al., 2010). Além disso, o tamanho normal das plantas da espécie, maior que um

metro de altura, exige espaços de crescimento consideráveis e o tempo de geração de aproximadamente quatro meses faz com que seja uma planta não tão fácil de se manejar (Meissner et al., 1997). Por estas razões, a cultivar de tomate anão denominada Micro-Tom (MT) está sendo cada vez mais utilizada como um sistema modelo. Devido ao tamanho compacto da planta (aproximadamente quinze centímetros de altura), o MT foi descrito originalmente para fins ornamentais (Scott & Harbaugh, 1989). Contudo, o seu ciclo de vida curto, de aproximadamente dez semanas, e a capacidade de crescimento em altas densidades também tornou o MT um sistema de modelo genético adequado para diversos estudos (Meissner et al., 1997, Carvalho et al., 2011). O potencial do MT como uma ferramenta genômica é amplamente reconhecido e vários recursos para genômica funcional de tomate têm sido desenvolvidos em *background* Micro-Tom (Matsukura et al., 2008).

Uma das características presentes no tomate é a produção de tricomas glandulares. No gênero *Solanum*, sete tipos de tricomas foram relatados em várias espécies de tomate sendo os tipos I, IV, VI e VII glandulares e tipos II, III e V não glandulares (Luckwill, 1943). O tomate cultivado apresenta tricomas glandulares dos tipos I, VI e VII, mas carece do tipo IV, que parece conferir resistência a artrópodes para algumas espécies selvagens de *Solanum*, como *S. galapagense* e *S. pennellii* (Lucatti et al., 2013; Resende et al., 2008). Comparações entre espécies domesticadas e seus progenitores selvagens revelaram que muitos dos metabólitos especializados produzidos em tricomas glandulares foram perdidos durante a domesticação da espécie. A perda desses compostos importantes levou a um aumento da susceptibilidade das culturas domesticadas ao ataque de patógenos e herbívoros, em comparação às selvagens. A reintrodução da via de biossíntese desses compostos em espécies de interesse agrônomo ou comercial pode ser uma forma eficaz de combater a perda de safra devido a insetos e doenças (McDowell et al., 2011).

1.3.1. *Galapagos enhanced trichomes (Get)*

Galapagos enhanced trichomes (Get) é um variante de Micro-Tom obtido recentemente no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Universidade de São Paulo; www.esalq.usp.br/tomato) a partir de cruzamentos realizados entre *S. lycopersicum* cv MT e o selvagem *S. galapagense*. O *Get* apresenta um maior índice de ramificação e folhas menores (pilosas e pegajosas) quando comparadas à linhagem quase isogênica MT, devido provavelmente ao grande número de tricomas glandulares responsáveis pela produção de

aleloquímicos. Apesar de ter sido inicialmente selecionado por apresentar maior densidade de tricomas tipo I, sabe-se que o *Get* também possui tricomas do tipo IV, os quais são considerados ausentes em tomateiro cultivado (Luckwill, 1943). Dessa forma, o variante *Get* apresentou com sucesso a introdução de tricomas tipo IV em *background* genético da cultivar de tomateiro MT (Vendemiatti & Peres, 2015).

Considerando o estado-da-arte, o presente trabalho teve como enfoque o estudo dos efeitos de um doador de H₂S na formação de tricomas em folhas jovens de tomateiros MT e *Get* em desafiadas ou não por estresse mecânico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação exógena de gás sulfídrico na formação de tricomas em folhas de MT e *Get*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da aplicação de H₂S no número de tricomas presentes em folhas recém-expandidas de plantas MT e *Get* em condições ou não de estresse mecânico;
- Investigar a influência do pH da solução de doador de H₂S na resposta das plantas a esta molécula sinalizadora;
- Correlacionar os efeitos do H₂S com os níveis do hormônio ácido salicílico na resposta das plantas às condições impostas;

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal

Todo o material vegetal utilizado nos experimentos foi cultivado na casa de vegetação do Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As sementes de *S. lycopersicum* cv.

Micro-Tom e do variante natural *MT-Get* utilizadas nesse trabalho foram fornecidas pelo Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, coordenador do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ-USP.

As plantas foram cultivadas em vasos de 150 mL contendo uma mistura de Plantmax[®] e vermiculita expandida (1:1; m/m) suplementada com calcário 4 g/L e NPK 10-10-10 (1 g/L na sementeira e 8 g/L no transplante) e irrigadas uma vez ao dia, segundo protocolos disponíveis (www.esalq.usp.br/docentes/lazaropp/protocols.html; Cap. 2: Plantio, irrigação e adubação).

3.2. Tratamentos

Sulfeto de sódio (Na_2S) foi utilizado como doador de H_2S . Plântulas de Micro-Tom e *MT-Get* com 15 dias de idade, após expansão do primeiro par de folhas, foram aspergidas diariamente com solução de Na_2S nas concentrações de 0 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . O pH das soluções de doador de H_2S foi corrigido para 6,4 ou então mantido a 11, condição observada imediatamente ao final do preparo das soluções. Após 15 dias de tratamento diário, as folhas completamente expandidas foram coletadas para análise de tricomas, seguida de congelamento a -196°C para demais análises. Medição semanal da altura das plantas e do número de folhas produzidas também foi realizada após o início dos tratamentos. A concentração de 100 μM de solução de Na_2S foi escolhida para uso nos experimentos posteriores por proporcionar resultados contrastantes entre tratamentos. Os experimentos foram realizados com cinco replicatas biológicas.

3.3. Injúria mecânica

Plantas com 21 dias de idade foram utilizadas para simular herbivoria conforme procedimento proposto por Kariyat et al. (2013). O dano artificial foi realizado mecanicamente utilizando um furador de rolha para remover um disco de 6 mm de diâmetro da região central de cada uma das duas folhas completamente expandidas de cada planta. Após injúria, as plantas foram tratadas uma vez a cada dois dias, por 21 dias, com solução de Na_2S (pH 6,4) a 0 μM ou 100 μM . Dessa forma, foram obtidos os seguintes conjuntos de tratamentos:

- a) Grupo controle (plantas sem injúria aspergidas com H_2O);

- b) Plantas tratadas com Na₂S 100 μM;
- c) Plantas com injúria;
- d) Plantas com injúria e aspergidas com Na₂S 100 μM.

As folhas produzidas após o início dos tratamentos foram coletadas para análise de tricomas e acúmulo de biomassa. O material remanescente foi congelado em N₂ líquido.

3.4. Densidade e número de tricomas

A densidade e o número de tricomas foram medidos na segunda folha completamente expandida formada após o início dos tratamentos, conforme descrito por Traw & Bergelson (2003) com modificações, uma vez que a densidade de tricomas não é alterada em folhas já existentes. Para a determinação da área foliar, folhas recém-coletadas foram escaneadas, digitalizadas (Scanner fotográfico HP Scanjet G4050) e analisadas usando o programa ImageJ v. 1.29. Uma área de 2 mm² foi delimitada no centro da lâmina foliar de cada folíolo para contagem de tricomas. As imagens foram obtidas usando uma câmara digital (Canon PowerShot A650 IS) acoplada a uma lupa (Zeiss Stemi 2000-C) e os tricomas presentes tanto na face abaxial quanto na face adaxial foram contados. A densidade de tricomas foi calculada dividindo-se o número de tricomas pela área avaliada. O número total de tricomas foi estimado a partir da multiplicação da densidade de tricomas pela área foliar total.

3.5. Determinação do acúmulo de biomassa

Dois folíolos da quinta folha expandida de cada indivíduo foram coletados e imediatamente pesados em balança analítica (Shimadzu AY220) para determinação da massa fresca. Posteriormente, cada amostra fresca foi seca em estufa de circulação forçada de ar 65 °C até obtenção de peso constante. Procedeu-se, então, com a determinação da razão massa fresca/massa seca.

3.6. Quantificação de ácido salicílico

A quantificação de ácido salicílico foi realizada como descrito por Warriar et al. (2013). Amostras foliares de MT e *Get* foram maceradas em N₂ líquido e a extração de ácido salicílico feita com 1 mL de H₂O desionizada. As amostras foram centrifugadas a

10.000 \times g por 10 min, seguida de adição de igual volume de solução de FeCl₃ 0,1% aos sobrenadantes resultantes. Medidas espectrofotométricas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) foram realizadas a 540 nm. A concentração de ácido salicílico foi estimada utilizando uma curva padrão preparada com soluções contendo de 0 a 225 pmols do hormônio comercial padrão (Sigma-Aldrich).

3.7. Quantificação de H₂S endógeno

O conteúdo de H₂S em folhas frescas foi determinado utilizando o equipamento TBR4100 Free Radical Analyzer (WPI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de H₂S foi determinada utilizando uma curva padrão contendo de 0 a 40 nmols de Na₂S, preparada sob atmosfera de argônio, em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

3.8. Quantificação de H₂O₂ endógeno

O conteúdo de H₂O₂ em folhas frescas foi determinado utilizando o analisador de radicais TBR4100 Free Radical Analyzer (WPI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de H₂O₂ foi estimada utilizando uma curva padrão contendo de 0 a 160 nmol de H₂O₂ diluído em solução de acetanilida 2 mM.

3.9. Atividade de enzimas antioxidantes

Folhas congeladas (200 mg) foram maceradas em N₂ líquido na presença de 20 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e extraídas com 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) contendo EDTA 100 μ M e coquetel inibidor de protease (Sigma, EUA). Os homogenatos foliares foram centrifugados a 10.000 \times g por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante usado nas análises de atividade das enzimas do sistema antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

A atividade SOD foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), com modificações descritas por Horta et al. (2014). Os homogenatos foram incubados na presença de tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), L-metionina 13 mM, EDTA 100 μ M, riboflavina 2 μ M e azul de nitro-tetrazólio (NBT) 75 μ M por 10 min a temperatura ambiente numa câmara equipada com lâmpada fluorescente. Os controles consistiram em

reações mantidas na ausência de luz. Medidas espectrofotométricas foram realizadas a 575 nm para determinação do conteúdo de O_2^- remanescente no meio. Uma unidade de atividade SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução de NBT em 50%.

A atividade CAT foi mensurada de acordo com Cakmak e Horst (1991). Os homogenatos foram incubados com tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) e H_2O_2 12,5 mM. A atividade da enzima foi estimada a partir de medidas espectrofotométricas a 240 nm e equação de Lambert-Beer, usando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade de APX foi medida de acordo com Nakano e Asada (1981). Os homogenatos foram incubados com tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), ácido ascórbico 1 mM e H_2O_2 2 mM. A taxa de oxidação do ácido ascórbico foi monitorada a 290 nm. A atividade da enzima foi estimada utilizando $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O teor total de proteína nas amostras de folhas foi determinado de acordo com Bradford (1976).

3.10. Análises estatísticas

Os dados foram primeiramente submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade. O teste *one-way* ANOVA foi usado para comparação das médias seguido de Sidak nos experimentos de atividade enzimática, conteúdo de H_2S , H_2O_2 e ácido salicílico. Para comparação do número de tricomas entre as faces adaxial e abaxial foi empregado o teste *two-way* ANOVA seguido de teste Sidak. As comparações realizadas entre dados obtidos para Micro-Tom e *Get* foram realizadas com teste *t* não pareado. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para análise dos dados não paramétricos (altura e número de folhas). O software utilizado foi o GraphPad Prism ($P < 0,05$). Os experimentos foram realizados com cinco replicatas biológicas.

4. Resultados

4.1. Efeito do H_2S no desenvolvimento de tomateiros e na formação de tricomas

Os dois variantes de tomateiro apresentaram um maior número de tricomas na face abaxial do que na face adaxial da folha. Não houve diferença significativa no número de tricomas entre *Get* e MT nas duas faces foliares. Porém, o número de tricomas glandulares foi significativamente maior na face abaxial das folhas de *Get* em comparação às folhas de

MT (Figura 1).

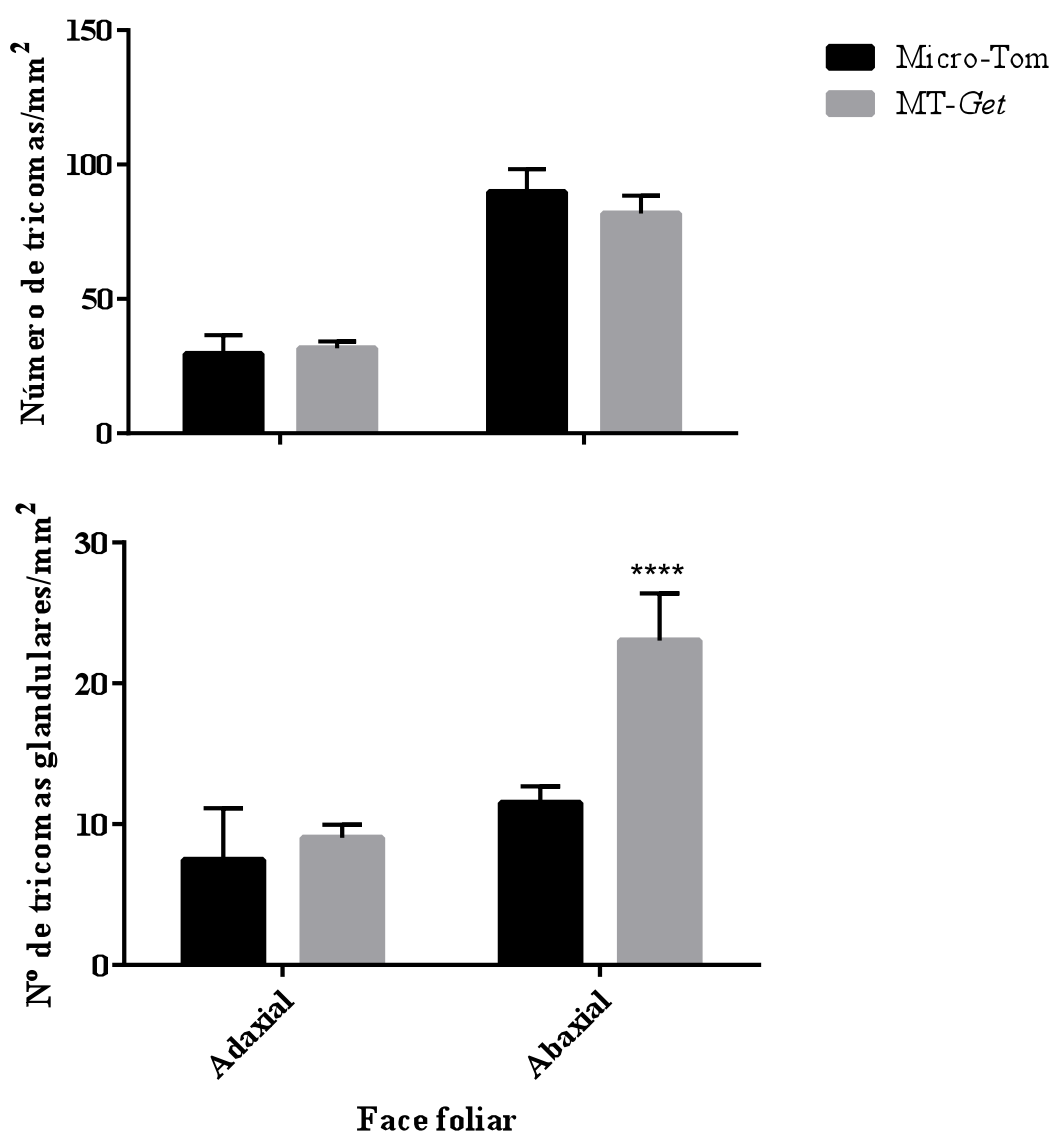


Figura 1. Número de tricomas em folhas de tomateiros **Micro-Tom** e **Get**. Gráfico superior: Número total de tricomas por mm² produzido em cada face foliar. Gráfico inferior: Número de tricomas glandulares produzidos por mm² em cada face foliar. MT (preto) e *Get* (cinza). **** Indica diferença significativa ($P < 0,001$). Barras representam as médias + desvio padrão (SD).

A aplicação de doador de H₂S a pH 11 não afetou o desenvolvimento dos tomateiros, independentemente da concentração utilizada (Figura 2). Contudo, o número de tricomas foi cerca de 30% menor em comparação ao controle (não tratado) na face adaxial das folhas novas de MT, nas três concentrações de Na₂S utilizadas, e nas concentrações de 100 e 200 µM em *Get* (Figura 3).

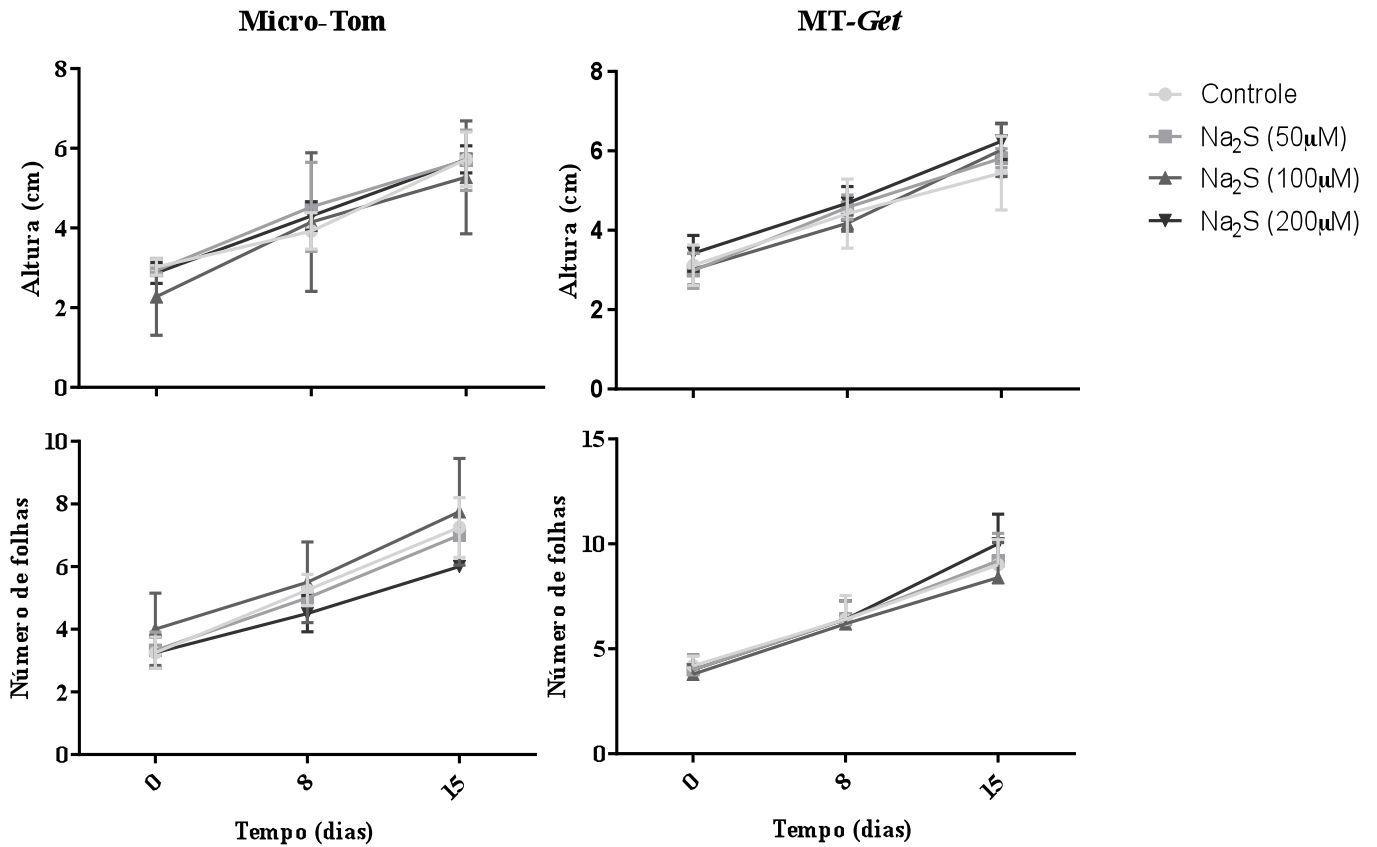


Figura 2. Efeito da aplicação de H₂S em diferentes concentrações na altura e no número de folhas de MT e *Get*. Barras representam as médias ± SD.

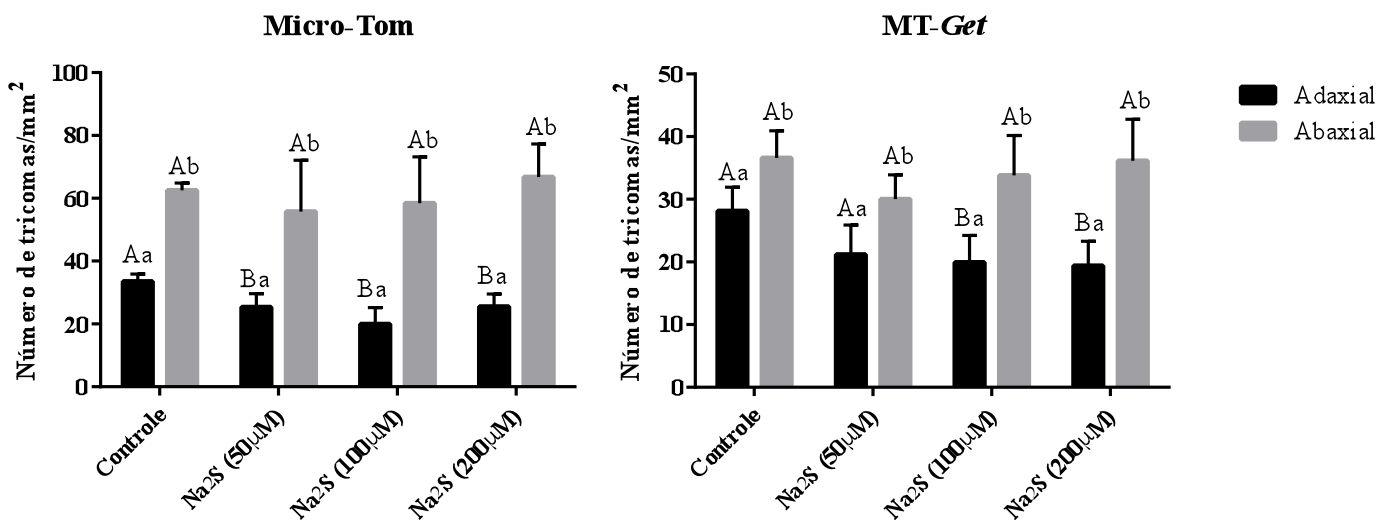


Figura 3. Efeito do Na₂S (pH 11) no número de tricomas em tomateiros Micro-Tom e *Get*. Letras maiúsculas representam comparações entre os tratamentos. Letras minúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento, entre as faces adaxial e abaxial.

Uma vez que a aplicação de H₂S diminuiu o número de tricomas, avaliou-se se houve uma alteração nos níveis endógenos de ácido salicílico em folhas de plantas tratadas com doador de H₂S a 100 μM. Não foi encontrada diferença significativa na concentração de ácido salicílico entre as plantas tratadas e as plantas controle (Figura 4).

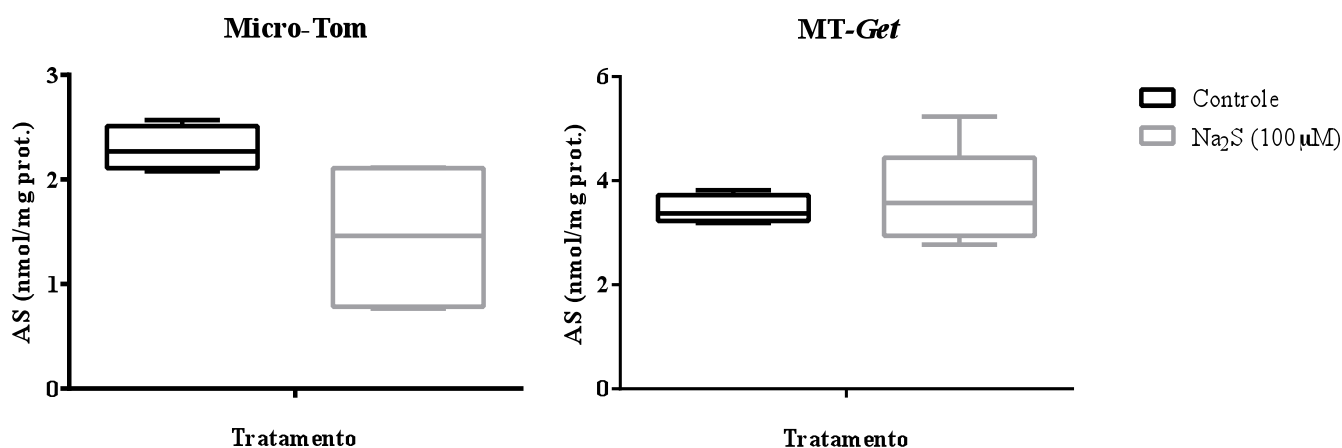


Figura 4. Efeito da aplicação de H₂S no conteúdo endógeno de ácido salicílico. Barras representam as médias ± SD.

Para avaliar se o pH da solução poderia influenciar os resultados referentes ao número de tricomas, foi realizado um experimento com solução de Na₂S 100 μM, porém com o pH ajustado para 6,4. Após correção do pH, a resposta da planta com relação ao número de tricomas produzidos em folhas novas foi alterada. Foi observado um aumento na produção de tricomas na face adaxial de folhas novas tanto em MT (80% de aumento) quanto em *Get* (48% de aumento). Não houve diferença significativa no número de tricomas da face abaxial nos dois variantes. Contudo, a proporção de tricomas glandulares aumentou em média 87% na face adaxial das plantas *Get* e 112 e 88% nas faces adaxial e abaxial, respectivamente, nas plantas MT (Figura 5).

Em várias espécies de plantas, a densidade de tricomas em folhas novas aumenta após danos herbívoros e a injúria mecânica é um meio para induzir esse tipo de estresse em plantas (Traw and Dawson, 2002; Agrawal, 2000; Traw & Bergelson 2003). Dessa forma, avaliou-se a resposta de plantas sob injúria mecânica ao tratamento com H₂S no que tange a formação de tricomas, uma vez que H₂S parece estar relacionado à via de síntese de hormônios ligados a defesa contra herbivoria. O dano mecânico por si só, não afetou o número de tricomas nas folhas novas dos tomateiros. Entretanto, plantas *Get* danificadas e tratadas com doador de H₂S apresentaram conteúdo aumentado de tricomas na face adaxial

enquanto que este aumento foi visualizado nas duas faces foliares de MT (Figura 5). A proporção de tricomas glandulares também não sofreu alteração em plantas apenas sujeitas ao dano mecânico. A aplicação de Na₂S, contudo, causou aumento no número desse tipo de tricomas na face adaxial das folhas de *Get* e nas duas faces foliares de MT (Figura 5).

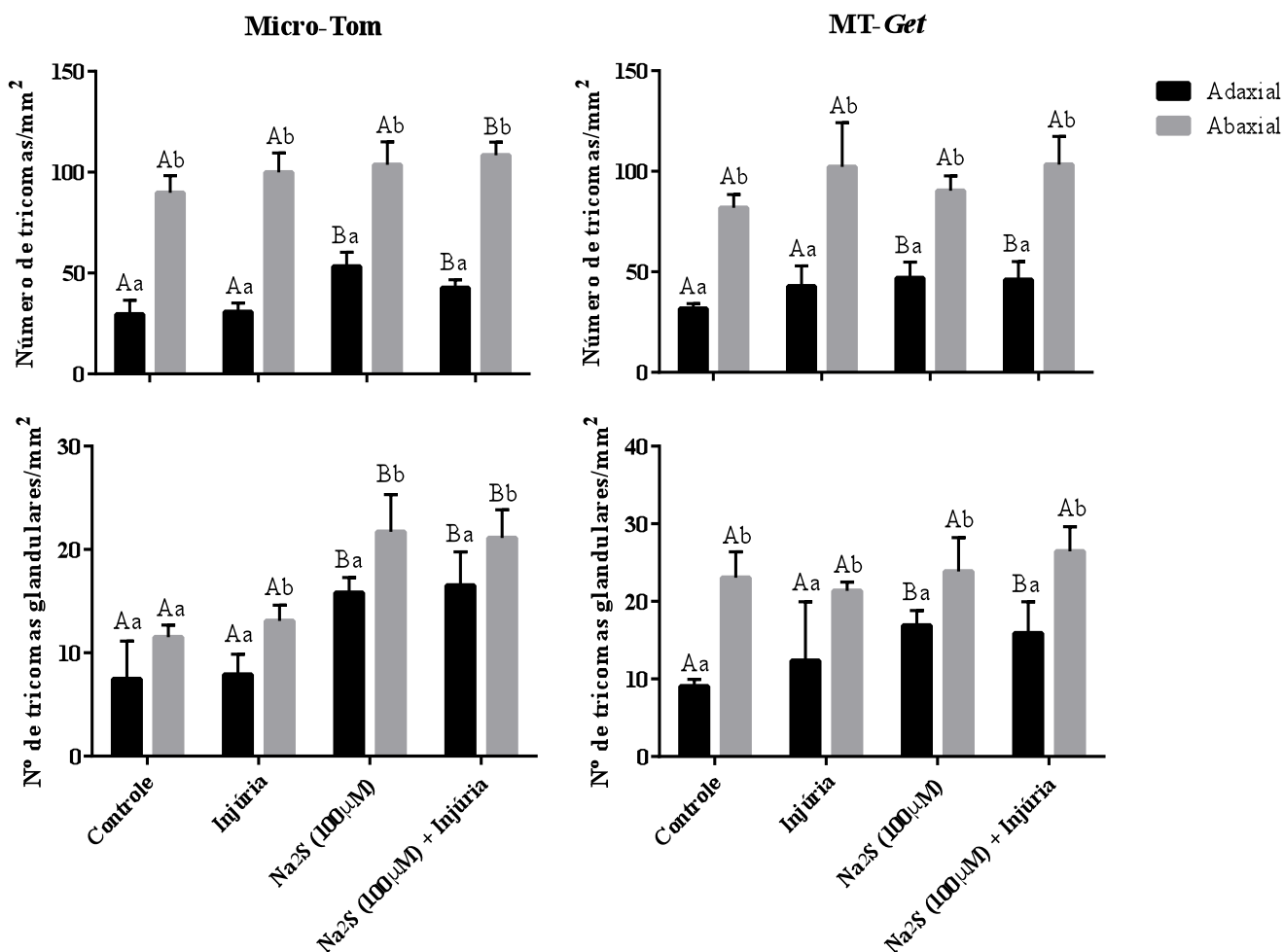


Figura 5. Efeito da aplicação de Na₂S (pH 6,4) em plantas de *Micro-Tom* e *Get* sob injúria mecânica quanto à formação de tricomas. Barras representam as médias ± SD. Letras maiúsculas representam comparações entre os tratamentos. Letras minúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento, entre as faces adaxial e abaxial. Letras diferentes representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Uma vez que a resposta das plantas com relação à formação de tricomas foi alterada devido a aplicação de solução de Na₂S com pH ajustado, foi avaliado o conteúdo de ácido salicílico nas folhas dos tomateiros para observar se houve alteração na concentração desse hormônio. Mesmo com pH ajustado, não foi observada diferença na concentração de ácido salicílico nas plantas de MT tratadas quando comparadas com as

plantas controle. Plantas de *Get* que sofreram apenas injúria apresentaram conteúdo de ácido salicílico reduzido em 44% em comparação à plantas não injuriadas. (Figura 6). O tratamento de plantas danificadas com solução de Na_2S com pH ajustado para 6,4 restabeleceu os níveis endógenos de ácido salicílico nas folhas de *Get*, atestado pela ausência de diferença significativa dessas plantas com aquelas do tratamento controle (não danificadas) (Figura 6). Notavelmente, plantas controle de *Get* possuem um conteúdo endógeno de ácido salicílico 58% maior que as plantas controle de MT (Figura 7).

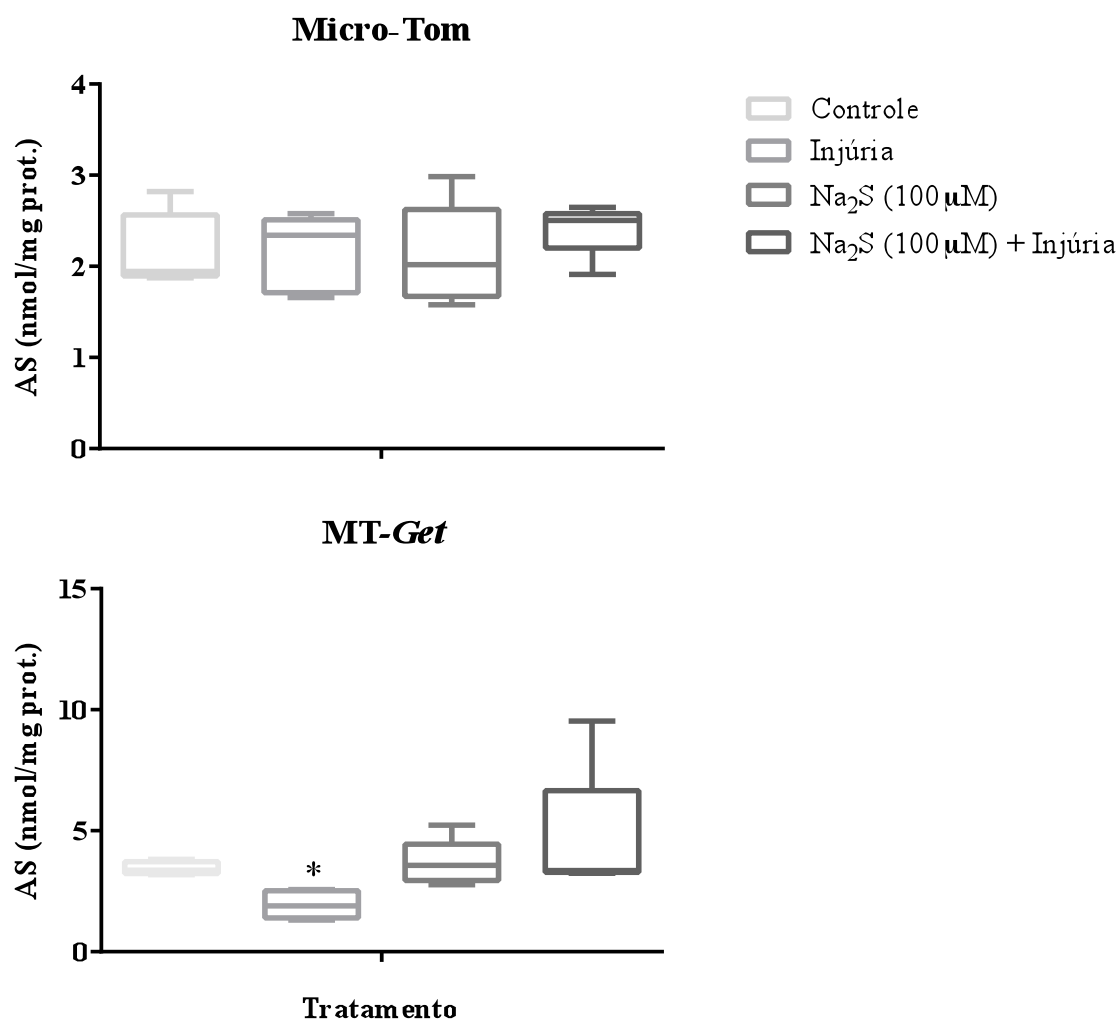


Figura 6. Efeito da aplicação de Na_2S (pH 6,4) no conteúdo de ácido salicílico em tomateiros *Micro-Tom* e *Get*. Barras representam as médias \pm SD.* Representa diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

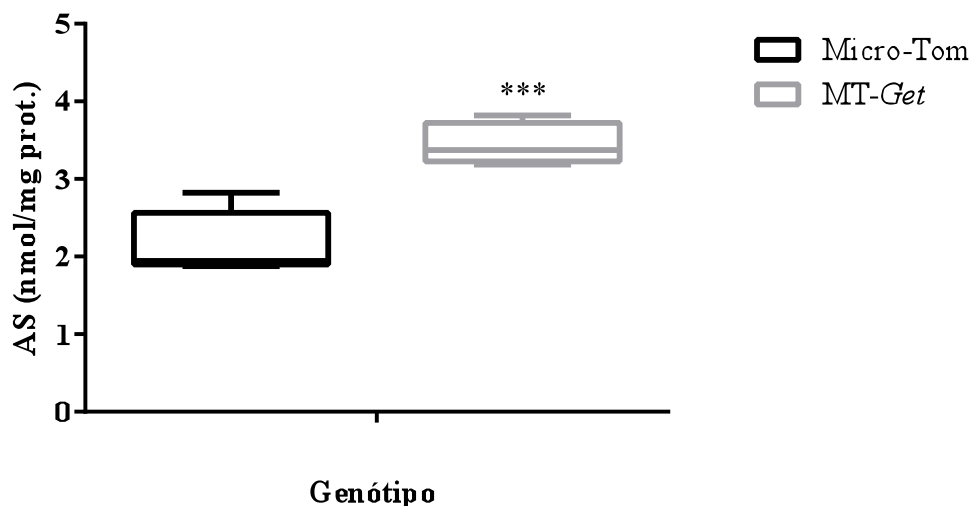


Figura 7. Conteúdo endógeno de ácido salicílico em folhas de tomateiros **Micro-Tom** e *Get*. Barras representam as médias \pm SD. *** Representa diferença significativa entre os genótipos ($P < 0,001$).

4.2. Quantificação de H₂S

Para avaliar se a aspersão das plantas com Na₂S realmente contribuiu para o aumento dos níveis de H₂S nas folhas, foi realizada quantificação do conteúdo endógeno de H₂S tanto em Micro-Tom quanto em *Get*. Como esperado, folhas de Micro-Tom tratadas com Na₂S 100 μ M apresentaram conteúdo aumentado deste gás nas células, que correspondeu ao dobro daquele observado em plantas controle (não tratadas com Na₂S) (Figura 8). Contudo, quando danificadas mecanicamente as plantas não apresentaram diferença significativa no conteúdo de H₂S quando comparadas as controle. As folhas de *Get* tratadas não apresentaram diferença significativa nos níveis de H₂S (Figura 8).

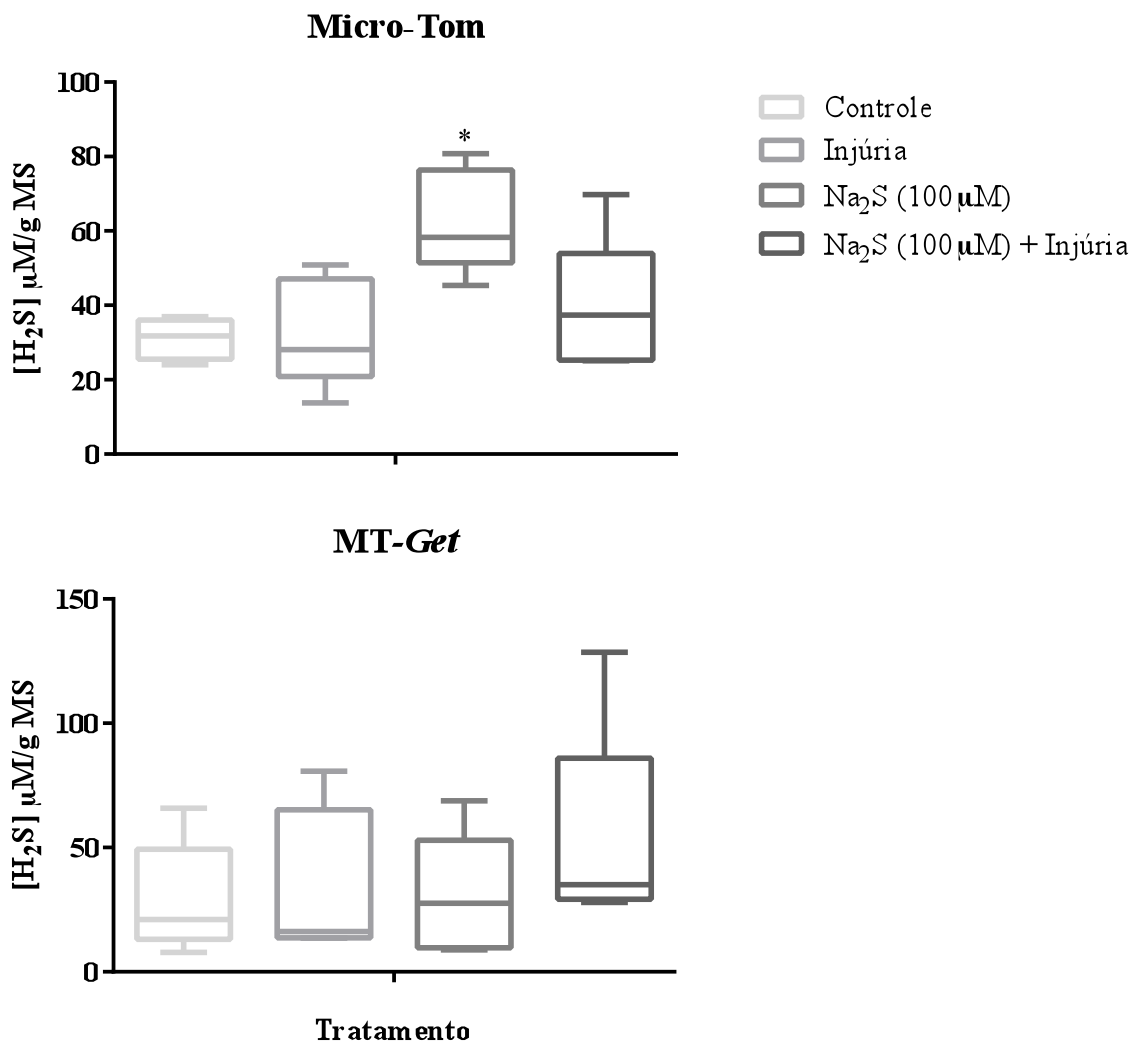


Figura 8. Efeito da aplicação de solução de Na₂S e dano mecânico no conteúdo endógeno de H₂S. Barras representam as médias ± SD. * Indica diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

4.3. Quantificação de H₂O₂ e avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Uma vez que a injúria mecânica gera estresse oxidativo e que H₂S está relacionado à defesa da planta, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, foi avaliado se o H₂S exógeno afetou a resposta oxidativa das plantas ao estresse imposto. A extensão do estresse oxidativo sofrido pelas plantas foi investigada por meio da dosagem dos níveis de H₂O₂ nas células de folhas. O conteúdo de H₂O₂ não foi alterado significativamente pelo tratamento com H₂S nos tomateiros com ou sem injúria (Figura 9). O conteúdo de peróxido de hidrogênio nas plantas controle de MT e de *Get* não apresentaram diferença significativa (Figura 10).

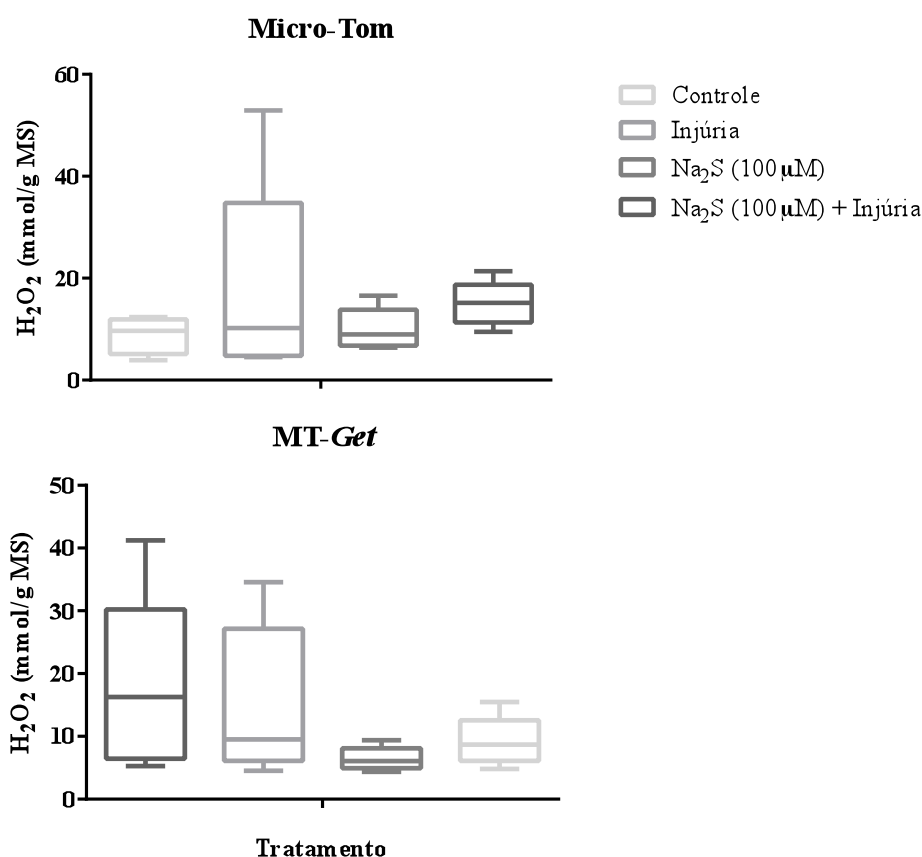


Figura 9. Efeito da aplicação de Na₂S no conteúdo de H₂O₂ em plantas danificadas. Barras representam as médias ± SD.

A atividade CAT nas folhas não foi alterada independentemente do tratamento para os dois genótipos estudados (Figura 11). As atividades SOD e APX nas folhas de *Get* não foram significativamente diferentes daquelas exibidas por plantas controle, independentemente do tratamento utilizado. A atividade SOD foi significativamente menor nas plantas de Micro-Tom que sofreram injúria, com uma redução de 43% na atividade, e o tratamento com H₂S parece ter revertido essa condição (Figura 11). A atividade APX também foi significativamente menor nas plantas de Micro-Tom que sofreram injúria (redução de 43% em média). Porém, o tratamento com H₂S não reverteu essa condição e as plantas com danos mecânicos, tratadas com Na₂S 100 µM também mostraram uma atividade APX 41% menor que aquela de plantas controle (Figura 12). As plantas controle de *Get* e MT não apresentam diferença significativa na atividade CAT e APX, entretanto a atividade de SOD nas plantas *Get* foi 84% menor do que a de plantas de MT (Figura 11).

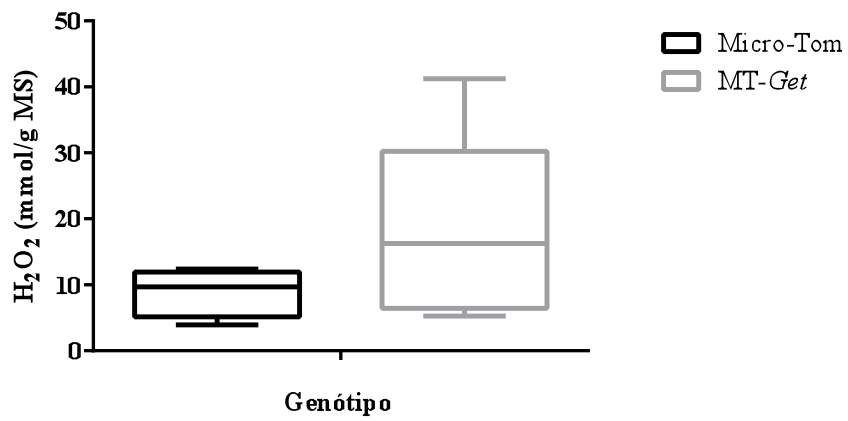


Figura 10. Conteúdo endógeno de H₂O₂ em tomateiros MT e *Get*. Barras representam as médias ± SD.

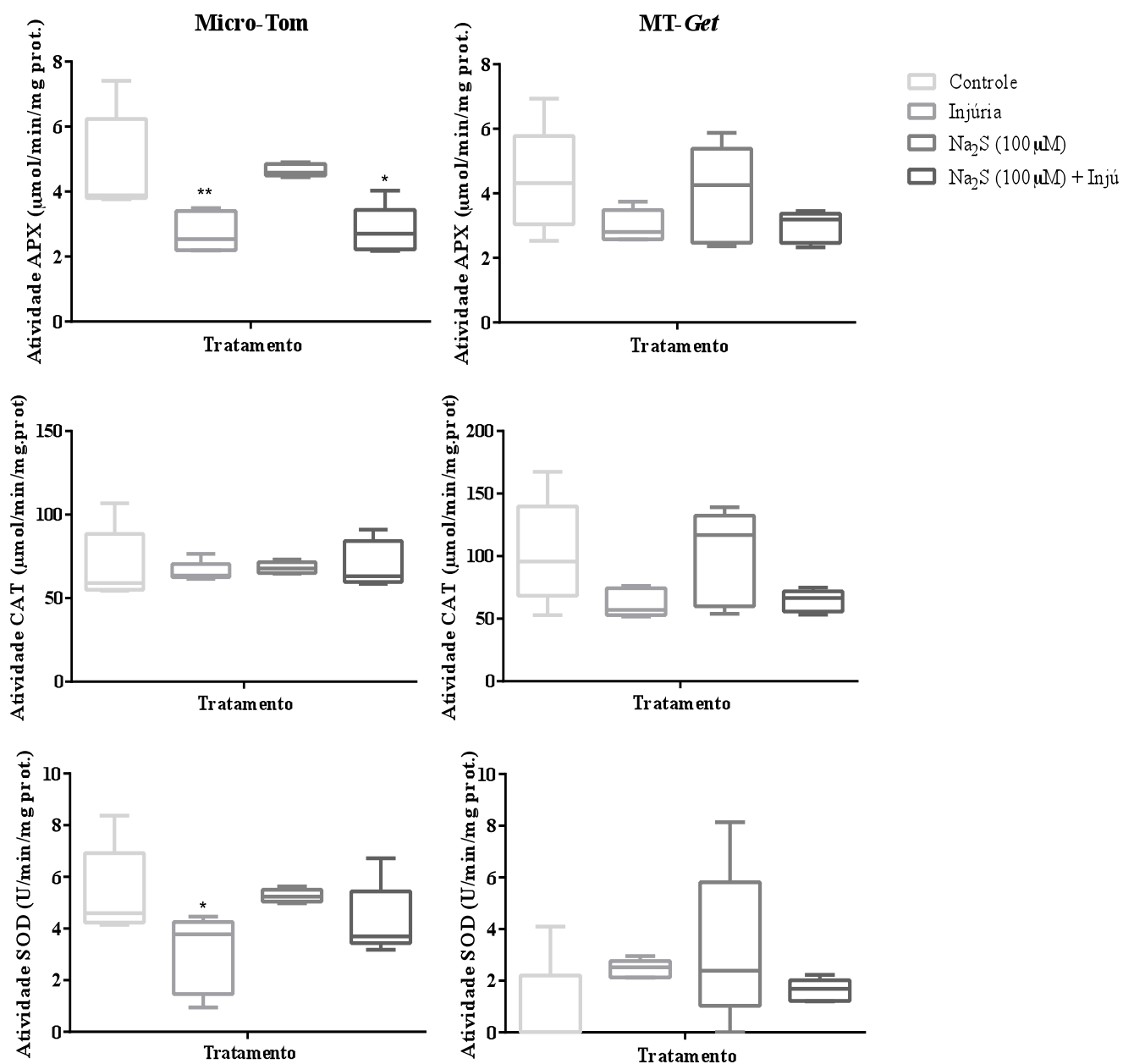


Figura 11. Efeito da aplicação de solução de Na_2S e dano mecânico na atividade das enzimas antioxidantes. Barras representam as médias \pm SD. * Indica diferença significativa entre os tratamentos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

5. Discussão

Apesar de não haver diferença significativa no número de tricomas nos dois genótipos, *Get* produziu um maior número de tricomas glandulares na face abaxial quando comparado a *MT* (Figura 1). Isso parece resultar do fato de que *Get* produz uma grande quantidade de tricomas tipo IV, que não são encontrados em *MT* (Vendemiatti & Peres,

2015).

Muitos artigos relacionam H_2S com desenvolvimento e crescimento aumentados em plantas (Dooley, 2013; Chen et al., 2014). Apesar deste dado, a aplicação de H_2S nas folhas das plantas não alterou o crescimento e a produção de folhas (Figura 2). Isso pode ser explicado porque em muitos desses estudos as plantas são cultivadas diretamente em solução de H_2S . Com isso uma quantidade maior de H_2S deve ser absorvida pelas plantas do que apenas borrifando a solução na superfície foliar. O H_2S absorvido pela planta nesse trabalho não foi suficiente para afetar o desenvolvimento e a produção de folhas das plantas.

O pH da solução de doador de H_2S afeta consideravelmente a resposta nas plantas. O doador de H_2S utilizado nesse trabalho foi o Na_2S , que pode ser hidrolisado, gerando H_2S segundo a reação $Na_2S + H_2O \rightarrow NaOH + NaHS \rightarrow NaOH + H_2S$.

O Na_2S é completamente hidrolisado quando em solução com pH acima de 7,0 (Yarar & Dogan, 1987). Após a formação de H_2S na solução, a molécula sofre dissociação em H^+ e HS^- . A Figura 12 mostra a dependência do pH na liberação de H_2S a 25 e 37 °C (adaptado de Hughes et al., 2009).

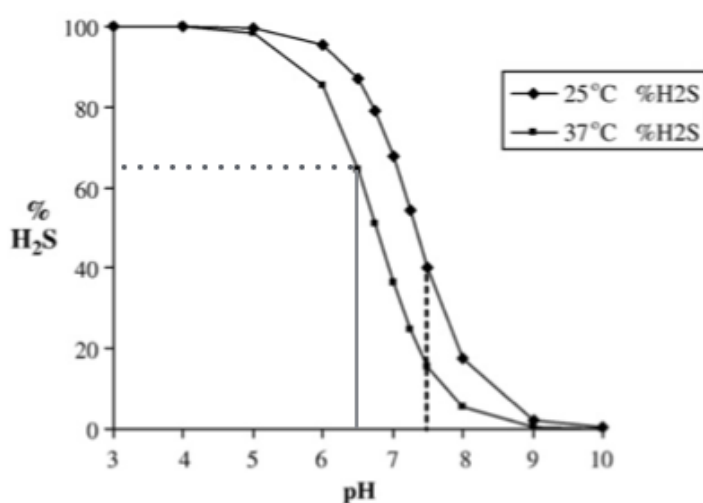


Figura 12. Dependência do pH na distribuição de H_2S a 25 e 37 °C. Adaptado de Hughes et al. 2009.

Dessa forma observa-se que a solução de Na_2S com pH ajustado para 6,4 possui aproximadamente 60% de H_2S e 40% de HS^- a 37 °C, enquanto que solução de Na_2S com pH igual ou maior que 10,0 apresenta HS^- como espécie dominante. As duas formas de sulfeto podem contribuir diretamente na ação biológica do Na_2S (Hughes et al., 2009). Porém, o H_2S na forma aniônica é pouco oxidado no ar e a medida que o pH da solução aumenta acima de 6,0 a concentração do ânion HS^- aumenta, sob efeito da dissociação, e essa espécie é rapidamente oxidada no ar (Chen & Morris, 1972). Assim, os resultados

observados ao utilizar a solução de Na₂S (pH 11,0) não devem ser relacionados a ação biológica de H₂S, uma vez que este provavelmente foi oxidado na presença de oxigênio. Como também observado por Wang (2012), muitos trabalhos publicados não mencionam esse ajuste importante de pH quando doadores de H₂S são utilizados.

Os resultados encontrados com a solução de pH 11,0 são, provavelmente, devido ao fato de o pH da solução ser muito alto. A aspersão dessa solução pode ter alterado o pH das folhas. Wilkinson & Davies (2008) reportaram que a aspersão de solução de tampão fosfato com diferentes valores de pH permitiu a manipulação do pH apoplástico foliar em plantas intactas, sem nenhum estresse. Muitos processos durante o desenvolvimento da planta exibem relações com o pH: o estado de dissociação dos nutrientes, por exemplo, determina a taxa de absorção deles; a atividade de muitas enzimas, o crescimento e a extensão da parede celular estão diretamente relacionados com a acidez do meio (Lodish et al., 2000; Gerendás & Sattelmacher, 2005); a distribuição de ácido abscísico no meio, bem como o fechamento estomático também aumenta com o aumento do pH (Wilkinson & Davies, 2008). Dessa forma, a alteração do pH das células das folhas pode ter inibido em parte o processo de diferenciação dos tricomas.

Ao aplicar a solução de Na₂S com pH ajustado para 6,4 foi observado aumento no número de tricomas na face adaxial das folhas dos dois variantes de tomate, em comparação às plantas controle. Um aumento no número de tricomas também foi encontrado na face abaxial das folhas de MT quando estas haviam sofrido injúria mecânica (Figura 6). O dano mecânico deve ter permitido a entrada de H₂S mais facilmente na planta de MT. Por isso, com o dano e aplicação de Na₂S houve diferença significativa no número de tricomas também da face abaxial. Isso não ocorreu nas plantas *Get*. É possível que a produção de aleloquímicos tenha dificultado a entrada de H₂S na face abaxial das folhas, lado que tem maior número de tricomas glandulares. Esses aleloquímicos podem ter atuado como uma barreira física para a entrada de H₂S. Isso explicaria o porquê de não se ter observado diferença significativa na formação de tricomas na face abaxial das folhas, mesmo após injúria. Isso também pode explicar o aumento na proporção de tricomas glandulares na face adaxial das folhas dos dois variantes e apenas na face abaxial de MT. Estes resultados sugerem que H₂S está relacionado ao desenvolvimento de tricomas em tomateiro e parece estar mais relacionado à formação de tricomas glandulares, uma vez que em MT a aplicação de doador de H₂S aumentou o número de tricomas glandulares na face abaxial, sem aumentar o número total de tricomas.

Muitos trabalhos tem relatado que tanto o dano artificial quanto o dano causado por

herbívoros induzem um aumento na densidade de tricomas (Traw & Dawson, 2002; Traw & Bergelson, 2003; Valkama et al., 2005). O aumento da densidade de tricomas em resposta ao dano só pode ser observada nas folhas em desenvolvimento, durante ou logo após o ataque de insetos, uma vez que a densidade de tricomas nas folhas existentes não é alterada (War et al., 2012). Por isso, a contagem de tricomas foi realizada na segunda folha formada após aplicação do dano. Nesse trabalho, apenas o dano mecânico não causou aumento da produção de tricomas nas folhas novas dos tomateiros (Figura 5). Resultados similares foram reportados na literatura e se devem, possivelmente ao fato de que o dano causado por herbívoros difere enormemente do dano promovido artificialmente, tendo em vista que indutores bioquímicos específicos, presentes na saliva dos herbívoros, não são mimetizados quando da indução mecânica de injúria (De Vos & Jander, 2009; Kariyat, 2013). Além disso, alguns herbívoros podem induzir tanto as vias dependentes de jasmonato quanto de salicilato (Stotz et al, 2002;. Van Poecke e Dicke, 2002), e assim a herbivoria nem sempre pode levar a um aumento sistêmico da produção de tricomas.

Como esperado, o conteúdo de H₂S foi significativamente maior nas plantas de MT tratadas com doador de H₂S. Porém, nas plantas que sofreram injúria e foram tratadas com doador de H₂S isso não ocorreu (Figura 8). Talvez, da mesma forma que o dano pode ter permitido uma entrada mais rápida de H₂S nas células também pode ter permitido a saída, não sendo detectado assim um maior conteúdo de H₂S no momento da coleta. No momento da coleta não houve diferença significativa no conteúdo de H₂S nas plantas *Get* tratadas com relação as plantas controle (Figura 8). Uma vez que a quantificação do conteúdo endógeno de H₂S avalia a folha no momento da coleta, isso significa que nesse momento as plantas *Get* tratadas não possuíam níveis mais altos de H₂S que as plantas controle, no entanto, *Get* parece sim ter absorvido o H₂S fornecido, como sugerem os resultados da quantificação de tricomas. Assim, pode ser que as plantas *Get* tenham feito uso do H₂S mais rapidamente.

A respeito do estresse oxidativo gerado pela injúria mecânica, não foi observada diferença significativa nos níveis de H₂O₂ nas plantas que sofreram injúria com relação às plantas controle nos dois genótipos estudados (Figura 9). Isto se deve ao fato de a análise do conteúdo endógeno de H₂O₂ ter sido realizada dias após a indução do estresse. An et al. (2009) observaram que o conteúdo de H₂O₂ atinge valores máximos uma hora após a indução do estresse por injúria mecânica, sendo os níveis basais restabelecidos duas horas após o estímulo. Assim, o tempo gasto desde o dano mecânico e o início do tratamento até a coleta pode ter sido suficiente para que os níveis de H₂O₂ fossem normalizados, não

significando que outras espécies reativas estariam em níveis aumentados por ocasião do estresse oxidativo.

Uma vez que não foi encontrada diferença significativa no conteúdo de H_2O_2 , também não era esperado encontrar diferença significativa na atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX, nas folhas de plantas que sofreram apenas injúria. Porém, folhas de plantas de MT injuriadas apresentaram valores de atividade SOD e APX menores que os registrados para células de folhas de plantas controle (Figura 11). Uma possível explicação para o resultado observado seria o aumento transiente da atividade de enzimas do sistema antioxidante, incluindo SOD. É sabido que o mesmo sinal que induz a atividade SOD no apoplasto, por exemplo, induz a atividade dessa enzima nos outros compartimentos celulares, como o cloroplasto (Bowler, 1992). Foi observado que, diferentemente da resposta da planta a estresse abiótico (Asada, 2006), o estresse oxidativo induzido por herbivoria não altera a produção de ROS no cloroplasto, (Apel and Hirt, 2004; Maffei et al., 2007). Com o passar do tempo, a atividade SOD aumentada contribuiria para a diminuição da concentração de O_2^- (substrato da SOD) no cloroplasto que influenciaria na atividade enzimática por depleção de substrato para a mesma. Dessa forma, o produto da atividade SOD (o H_2O_2) seria produzido em menor quantidade, o que afetaria negativamente a atividade APX no cloroplasto (principal local de biossíntese de APX). Como a CAT está localizada nos peroxissomos, a atividade dessa enzima não é afetada pela redução nos níveis de H_2O_2 no cloroplasto. Além disso, An et al. (2009) sugeriram que a CAT desintoxica com sucesso o H_2O_2 gerado por dano mecânico. Dessa forma a atividade CAT parece ter sido suficiente para proporcionar o controle dos níveis de H_2O_2 nas células.

Estudos indicam que uma queda na atividade de enzimas antioxidantes pode ocorrer devido a estresse oxidativo (Maffei et al., 2007). Klessig e colaboradores (2000) mostraram que, diferentemente das respostas da planta a estresse abiótico, na resposta ao ataque de patógenos a atividade das enzimas antioxidantes é suprimida por ácido salicílico e diminui, permitindo um acúmulo de ROS e ativação de morte celular programada na região infectada. Este não parece ser o caso das plantas de MT, uma vez que o conteúdo de H_2O_2 não foi maior que aquele de folhas de plantas controle. Além disso, essa resposta é induzida pelo aumento no conteúdo de ácido salicílico após a infecção, o que não aconteceu no caso de tomateiro (Figura 6).

A concentração de ácido salicílico diminuiu nas plantas *Get* que sofreram injúria (Figura 6). Isso pode ser resultado de um aumento na concentração de ácido jasmônico.

Este hormônio possui reconhecido papel na resposta da planta a danos por herbívoros, sendo relatado que sua concentração celular aumenta após danos mecânicos (Reymond et al., 2000; Fürstenberg-Hägg et al., 2013). O *cross-talk* entre esses dois hormônios pode levar a planta a priorizar a ativação de uma via sinal, em particular, em detrimento de outra. Evidências de que o ácido salicílico pode inibir a expressão de genes induzida por ácido jasmônico levantam a possibilidade de que o contrário também possa ocorrer (Doares et al., 1995; Reymond & Farmer, 1998; Traw e Bergelson, 2003) O ferimento de uma planta pode ativar a via dependente de ácido jasmônico e inibir a indução de genes de defesa dependentes de ácido salicílico contra patógenos (Reymond & Farmer, 1998). Dessa forma, a diminuição na concentração de ácido salicílico nas plantas *Get* que sofreram injúria pode ter ocorrido devido ao aumento na concentração de ácido jasmônico após indução do estresse. A aplicação de H₂S nas plantas *Get* que sofreram injúria parece ter revertido esse processo (Figura 6). Estudos relatam que H₂S pode induzir o aumento na concentração tanto de ácido salicílico quanto de ácido jasmônico (Chen et al., 2014; Shi et al., 2014).

Não houve diferença significativa na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas *Get* (Figura 11). Esse resultado sugere que as plantas desse genótipo restabeleceram a atividade dessas enzimas mais rapidamente que as de MT. No entanto, diferentemente das outras enzimas antioxidantes, as plantas de *Get* tem menor atividade SOD do que de MT (Figura 11). Isso pode torná-las menos eficientes na resposta a estresse oxidativo.

A menor atividade SOD encontrada nas plantas de MT que sofreram injúria parece ter sido revertida pelo tratamento com Na₂S (Figura 11). A SOD é a primeira linha de defesa contra ROS, dismutando superóxido em H₂O₂ no apoplasto (Bowler, 1992; Apel and Hirt, 2004; Maffei, 2007; An et al., 2009). O H₂S liberado a partir de Na₂S em meio aquoso pode ter surtido efeito somente na atividade SOD devido ao fato de essa enzima atuar no apoplasto e no citossol da célula. Dessa forma, o método de aplicação de H₂S utilizado deve ter sido suficiente para a molécula chegar até o apoplasto da célula e exercer uma atividade, mas não deve ter sido suficiente para que a molécula chegue aos compartimentos celulares como peroxissomos (local de abundância de CAT) (Apel and Hirt, 2004) e cloroplastos (local de abundância de APX) (Bowler, 1992). Apesar de o H₂S ser uma molécula lipofílica e atravessar facilmente a membrana plasmática, a meia vida dessa molécula é curta e ela se difunde no meio muito facilmente.

O papel do H₂S de sinalizar o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e

consequentemente na redução de ROS em plantas sob vários tipos de estresse tem sido reportado (Shi et al., 2013; Shi et al., 2014; Hu et al., 2014). Não foi observada diferença significativa no conteúdo de H_2O_2 e nem na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas tratadas com Na_2S , em relação às plantas controle dos dois genótipos estudados (Figuras 10 e 11). De fato, foi encontrada uma redução significativa na atividade APX após dano mecânico mesmo com tratamento com Na_2S , sugerindo que a fonte de H_2S pode ter estimulado o controle não enzimático dos níveis de H_2O_2 superproduzido durante as primeiras horas de estresse oxidativo gerado. Embora durante a análise em um único intervalo de tempo não se tenha observado alterações na atividade das enzimas antioxidantes, não se pode descartar que o H_2S exerceu algum efeito no sistema enzimático em intervalos de tempo anteriores. Nesse trabalho, a coleta das plantas foi feita 21 dias após o dano mecânico e início do tratamento com Na_2S , enfocando a formação de tricomas em folhas recém-formadas, tendo em vista que tal gênese leva semanas para ser realizada (Maffei et al., 2007; War et al., 2012). Para avaliar se a aplicação de H_2S induz uma resposta positiva nas plantas MT e *Get* com relação ao estresse oxidativo gerado pelo dano mecânico, coletas destrutivas devem ser realizadas nas primeiras horas após indução do estresse.

6. Conclusões

O método de aplicação do H_2S utilizado nesse trabalho permitiu a avaliação da formação de tricomas em folhas recém-formadas. Nas condições experimentais utilizadas, o H_2S não afetou o crescimento das plantas.

A aplicação de Na_2S (pH 11,0) parece ter alterado o pH das folhas e essa alteração pode ter culminado na inibição e/ou atraso da formação de tricomas em folhas novas. Dessa forma, o ajuste no pH da solução de doador de H_2S para condição levemente ácida é crucial para observar os verdadeiros efeitos desse gás na planta. O gás sulfídrico sinaliza processos celulares que podem desencadear a indução da formação de tricomas em folhas jovens de tomateiros. A resposta das plantas ao H_2S exógeno não parece ter relação com uma alteração no conteúdo de ácido salicílico. O período de tratamento foi suficiente para observar a produção de tricomas nas folhas, porém com esse tempo não foi possível avaliar o estresse sofrido pelas plantas devido ao dano mecânico. As plantas parecem ter se recuperado do estresse induzido pela injúria mecânica antes do período de avaliação.

7. Referências Bibliográficas

Agrawal, A.A. (2000) Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Ecology* 81: 1804–1813.

Álvarez, C., García, I., Moreno, I., Pérez-Pérez, M. E., Crespo, J. L., et al. (2012) Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4621–4634.

An Y., Shen Y-B., Zhang Z-X. (2009) Effects of mechanical damage and herbivore wounding on H₂O₂ metabolism and antioxidant enzyme activities in hybrid poplar leaves. *Journal of Forestry Research*. 20(2): 156–160.

Apel, K., Hirt, H., (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.

Asada, K., (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.

Bowler C, Van Montagu M, Inzé D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83–116.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Cakmak, I., Horst, W.J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum* 83, 463-468.

Campos, M., Carvalho, R.F., Benedito, V., Peres, L. (2010) Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signaling & Behavior* 5:3, 267-270.

Carvalho, R.F., Campos, M., Pino, L., Crestana, S., Zsogon, A., Lima, J., Benedito, V., Peres, L. (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: ‘Micro-Tom’ as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* 7:18.

- Chen, K.Y., Morris, J.C. (1972) Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. Environ. Sci. Technol. 6:529–537; 1972.
- Chen, J., Liu, T-W., Hu, W-J., Simon, M., Wang, W-H., et al. (2014) Comparative Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins Induced by Hydrogen Sulfide in *Spinacia oleracea* Leaves. PLoS ONE 9(9): e105400.
- Dalin, P., Agren, J., Bjorkman, C., Huttunen, P., Karkkainen, K. (2008) Leaf Trichome Formation and Plant Resistance to Herbivory. A. Schaller (ed.), *Induced Plant Resistance to Herbivory* p. 89 - 105.
- De Vos, M., And G. Jander. (2009) *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 32: 1548–1560.
- Doares, S.H., Narvaes-Vasquez, J., Conconi, A., Ryan, C.A. (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol*, 108:1741-1746.
- Dooley, F.D., Nair, S.P., Ward, P.D. (2013) Increased Growth and Germination Success in Plants following Hydrogen Sulfide Administration. PLoS ONE 8(4): e62048.
- Emmanuel, E., Levy, A. A. (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:112-117.
- Fürstenberg-Hägg, J.; Zagrobelny, M.; Bak, S. (2013) Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10242-10297.
- García-Mata, C., Lamattina, L. (2010) Hydrogen sulphide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytol* 188: 977–984.
- Gerendás, J., Sattelmacher, B. (2005) Dynamics of H⁺ Flux in the Apoplast. in *Handbook of Plant Growth pH as the Master Variable*. Rengel. p 240-280.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*. 59, 309-314.
- Horta, L.P., Braga, M.R., Lemos-Filho, J.P., Modolo, L.V. (2014) Organ-coordinated response of early post-germination mahogany seedlings to drought. *Tree Physiol*. tpu017.

- Hu, K. D., Wang, Q., Hu, L. Y., Gao, S. P., Wu, J., Li, Y. H., et al. (2014). Hydrogen Sulfide Prolongs Postharvest Storage of Fresh-Cut Pears (*Pyrus pyrifolia*) by Alleviation of Oxidative Damage and Inhibition of Fungal Growth. *PLoS ONE*, 9(1), e85524.
- Hughes, M.N., Centelles, M.N., Moore, K.P. (2009) Making and working with hydrogen sulfide The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free Radical Biology & Medicine* 47 1346–1353.
- Kang, J.H.; Shi, F.; Jones, D.A.; Marks, D.M.; Hower, G.A. (2009) Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *Journal of Experimental Botany*. Lancaster, v. 6, p. 1053-1064.
- Kariyat, R.R., Balogh, C.M., Moraski, R.P., De Moraes, C.M., Mark C. Mescher, M.C., Stephenson, A.G. (2013) Constitutive And Herbivore-Induced Structural Defenses Are Compromised By Inbreeding In *Solanum carolinense* (Solanaceae) *American Journal of Botany* 100(6): 1014–1021.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., et al. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8849–55.
- Kimura, H. (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 267:129–133.
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., Hancock, J. T. (2013) Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? *Plant Cell Environ* 36: 1607–1616.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000) The Dynamic Plant Cell Wall. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. Section 22.5.
- Luckwill, L. C. (1943) The genus *Lycopersicon*: historical, biological, and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. *Aberden University Press*, 44p.
- Lucatti, A.F., Heusden, A.W., De Vos, R.C.H., Visser, R.G.F., Vosman, B. (2013) Differences in insect resistance between tomato species endemic to the Galapagos Islands. *BMC Evolutionary Biology*, 13:175.

- Maffei, M.E., Mithofer, A., Boland, W. (2007) Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*. 68:2946-59; PMID:17825328.
- Matsukura, C., Aoki, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Asamizu, E., Saito, T., Shibata, D., Ezura, H. (2008) Comprehensive Resources for Tomato Functional Genomics Based on the Miniature Model Tomato Micro-Tom. *Current Genomics*, 9, 436-443.
- Mcdowell, E.T., Kapteyn, J., Schmidt, A., Li, C., Kang, J., Descour, A., Shi, F., Larson, M., Schillmiller, A., An, L., et al. (2011) Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome types. *Plant Physiology*, 155, 524–539.
- Meissner, R.; Jacobson, Y.; Melamed, S.; Levyatuv, S.; Shalev, G.; Ashri, A.; Elkind, Y.; Levy, A. (1997) A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, 12:1465-1472.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Papenbrock, J., Riemenschneider, A., Kamp, A., Schulz-Vogt, H., Schmidt, A. (2007) Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants - from the field to the test tube and back. *Plant Biol* 9: 582–588.
- Peña-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191: 123-128.
- Resende, J.T.V., Maluf, W.R., Cardoso, M.G., Faria, M.V., Gonçalves, L.D., Nascimento, I.R. (2008) Resistance of tomato genotypes with high level of acylsugars to *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard. *Scientia Agricola*, v.65, n.1, p.31-35.
- Reymond, P., Farmer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant. Biol.* Oct;1(5):404-11.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E. (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707–719

- Scott J., Harbaugh B. (1989) Micro-Tom: A miniature dwarf tomato. Florida Agric Exp Station Circular, 370:1-6, 1989.
- Schillmiller, A.L., Last, R.L., Pichersky, E. (2008) Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal* 54: 702–711.
- Serna, L., Martin, C. (2006) Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends Plant Sci* 11:1360–1385.
- Shi, H., Ye, T., Chan, Z. (2013) Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). *Plant Physiol Biochem* 71: 226–234.
- Shi. H., Ye. T., Han. N., Bian. H., Liu. X., Chan. Z. (2014) Hydrogen sulfide regulates abiotic stress tolerance and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* xx: xxx–xxx.
- Stotz, H.U., Koch, T., Biedermann, A., Weniger, K., Boland, W., Mitchell-Olds, T. (2002) Evidence for regulation of resistance in *Arabidopsis* to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta* 214:648–652.
- Traw, M.B., Dawson, T.E. (2002) Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. *Oecologia* 131: 526–532.
- Traw, M.B., Bergelson, J. (2003) Interactive Effects of Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Gibberellin on Induction of Trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* Vol. 133, pp. 1367–1375.
- Valkama, E., Koricheva, J., Ossipov, V., Ossipova, S., Haukioja, E., Pihlaja, K. (2005) Delayed induced responses of birch glandular trichomes and leaf surface lipophilic compounds to mechanical defoliation and simulated winter browsing. *Oecologia* 146:385–393.
- Vendemiatti, E. & Peres, L.E.P. (2015) Compreendendo a via de desenvolvimento de tricoma glandular em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) utilizando mutantes e variações genéticas naturais. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

- van Poecke, R.M.P., Dicke, M. (2002) Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *J Exp Biol* 53:1793–1799.
- Wagner, G.J., Wang, E., Shepherd, R.W. (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann Bot (Lond)* 93: 3–11.
- Wang R. (2003) The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*. 5:493–501.
- Wang, R. (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed, *Physiological Reviews*, vol. 92, no. 2, pp. 791–896.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012) Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1306–1320.
- Warrier, R.R., Paul, M., Vineetha, M.V. (2013) Estimation Of Salicylic Acid In Eucalyptus Leaves Using Spectrophotometric Methods. *Genetics and Plant Physiology Vol. 3 (1–2)*, PP. 90–97.
- Werker, E. (2000) Trichome diversity and development. *Adv Bot Res* 31: 1–35
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (2008) Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *Journal of Experimental Botany*, p 1-13.
- Yarar, B. Dogan, Z.M. (1987) Sulfide as a Depressant. in *Mineral Processing Desing* p 53 – 55.
- Yu, L.X., Zhang, C.J., Shang, H.Q., Wang, X.F., Min, W.E. I., Yang, F.J., Shi, Q.H., (2013). Exogenous hydrogen sulfide enhanced antioxidant capacity, amylase activities and salt tolerance of cucumber hypocotyls and radicles. *J. Integr. Agric.* 12, 445-456.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H., et al. (2008) Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates the oxidative damage against copper stress. *J Integr Plant Biol* 50: 1518–1529.

Zhang, H., Tang, J., Liu, X. P., Wang, Y., Yu, W., et al. (2009) Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana*, and *Glycine max*. *J Integr Plant Biol* 51: 1086–1094.