

ANDREA NUNES VAZ PEDROSO

**Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas
em folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ (Solanaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2009

ANDREA NUNES VAZ PEDROSO

**Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas
em folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ (Solanaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. EDENISE SEGALA ALVES

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Pedroso, Andrea Nunes Vaz

P372a1 Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em folhas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' (Solanaceae) / Andrea Nunes Vaz Pedroso – São Paulo, 2009.
80 p. Il.

Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2009
Bibliografia.

1. Poluição atmosférica. 2. Anatomia foliar. 3. Bioindicadores. I. Título

CDU: 502.55

Aos meus pais Waldir e Ernesta, dedico

“Na vida, as coisas são como tem de ser. Nem sempre acontece o que se quer. Tudo é possível, dentro da relatividade das possibilidades e das percepções. Na natureza, nada é fixo; tudo vibra, tudo muda. A flexibilidade é a grande firmeza. Quando o vento vier, seja como o bambu novinho: balance, mas não caia! Quebrar, para quê?”

Wagner Borges

Agradecimentos

A Deus, acima de tudo, pelo dom da vida e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e de alguma forma me incentivaram a realizar esse feito.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, educação e incentivo. Sem a ajuda de ambos, esse sonho não poderia ter sido realizado.

À minha pequena grande família, em especial, Dalila, Deise, Denise, as pequenas mais lindas Alice e Rafaela, Luiza e Luciana, pelo incentivo constante e principalmente por sempre terem acreditado em mim. Lilica e Billy pela companhia verdadeira.

Ao Instituto de Botânica pela utilização de suas instalações e seus equipamentos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

À Dra Edenise Segala Alves, minha orientadora, que me acolheu desde o início da minha graduação, permitindo meu aperfeiçoamento profissional e pessoal. Muito obrigada pela oportunidade e pela confiança.

Aos coordenadores do programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, em especial à Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro, e aos funcionários Márcia e Antonio por toda ajuda prestada.

À Seção de Anatomia e Morfologia, que possibilitou a realização desse trabalho, em especial à Maria Manoel, pois sem sua atenção e ajuda diária, todo esse trabalho não teria sido tão bem realizado.

Ao pessoal que já fez ou ainda faz parte da seção de Anatomia: Alessandra Carla Fattori Ergesse Machado, Bárbara Baêso Moura, Beleta Baby, Cynthia Hering Rinnert, Diana Yamaguti, Elisa Aoyama, Fernanda Tresmondi, Marcos Kitaura, Renata D'Agostino, valeu pessoal pela companhia e pelos momentos agradáveis tanto dentro quanto fora do laboratório.

Às Dras Agnes Elisete Luchi e Adriana Hissae Hayashi, pela convivência diária, sugestões científicas, cafés, bate papos e amizade.

A toda equipe do Projeto Bioindicadores – FAPESP, pela união do grupo, em especial à Dra Marisa Domingos, que conduziu esse trabalho com muita dedicação, sempre nos incentivando com sábias sugestões e por isso o resultado foi tão satisfatório.

À Ana Paula de Souza Dias, Daiane Teixeira da Silva e Kelly Cristina Almeida Castro, pela imensa ajuda de vocês durante o desenvolvimento deste trabalho, e mais do que isso, a amizade que construímos, adoro vocês meninas.

À Seção de Ecologia, que sempre me recebeu de braços abertos, e em especial aos amigos que sempre me ajudaram à Dra Silvia Sant'Anna, Ms Maurício Lamano, Ms Marisia Esposito, Jéssica Nobre,

Marcele Dafré, Ricardo Nakazato, Sandra Viola, Dra Regina Maria de Moraes, Ms Mirian Cilene Spasiani Rinaldi, e as panteras: Marli, Amarilis, Valdenice e Dorinha.

À Dra Célia Leite Sant'Anna pela disponibilização do microscópio de epifluorescência e à Camila Francieli da Silva Malone pela utilização do mesmo.

Ao Laboratório de Anatomia do Departamento de Botânica –IB/USP, especialmente à técnica Gisele Costa por toda a ajuda e amizade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica – UNESP/Botucatu na pessoa da Dra Daniela Carvalho dos Santos pela possibilidade da utilização do mesmo.

À Claudete dos Santos Tardivo, Maria Helena Moreno e ao Nivalde Antonio Basso do Centro de Microscopia Eletrônica – UNESP/Botucatu pela preparação do material para as análises do MET.

À Dra Silvia Rodrigues Machado UNESP/Botucatu pela contribuição nas análises ao MET.

Ao Instituto de Astronomia e Geofísica da Universidade de São Paulo (IAG/USP) pela concessão dos dados meteorológicos.

Aos membros da banca de qualificação Dra Catarina Carvalho Nievola, Dra Jane Elizabeth Kraus e Dra Marisa Domingos pelas críticas e sugestões.

Ao Dr Eduardo Luiz Longui, pela amizade e grande ajuda principalmente nessa reta final.

À Fernanda Tresmondi, irmã que pude escolher, simplesmente por tudo.

À Fátima Quitério e ao Rafael Tizzi pelas correções e sugestões do abstract.

À Poliana Cardoso, pela ajuda nas técnicas histoquímicas.

Abreviaturas utilizadas

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete

ACS – senescência celular acelerada

AOT20 – Valor horário acumulado acima de 20 ppb de ozônio

AOT40 – Valor horário acumulado acima de 40 ppb de ozônio

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CH_4 – metano

CO – monóxido de carbono

CO_2 – dióxido de carbono

ERO – Espécies reativas de oxigênio

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

H_2S – sulfeto de hidrogênio

HR-like – resposta semelhante à hipersensibilidade

M – corpo receptor de energia

MCP – morte celular programada

NH_3 – amônia

NO_2 – dióxido de nitrogênio

NO_x – óxidos de nitrogênio

O^\cdot – oxigênio atômico

O_2 – oxigênio molecular

O^{2-} - ânion superóxido

O_2H^\cdot – peridroxil

O_3 – ozônio troposférico OH^\cdot – hidroxila

PAN – nitrato de peroxiacetila

R – radicais

RO_2^\cdot – Radicais orgânicos

SO_2 – dióxido de enxofre

VDI – Verein Deutscher Ingenieure

VRPP – Valor de Referência para Proteção da Produtividade Agrícola

λ – comprimento de onda

Índice

1. Introdução e objetivos.....	2
1.1. Formação do ozônio	2
1.2. O ozônio, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo	4
1.3. Detecção precoce da ação das ERO – clorofila a e calose	6
1.4. Detecção precoce da ação das ERO – organelas, células e tecidos.....	6
1.5. Danos visíveis e o biomonitoramento com plantas	8
1.6. <i>Nicotiana tabacum</i> ‘Bel-W3’ – bioindicadora consagrada de ozônio	9
1.7. Hipótese e objetivos	11
2. Material e métodos.....	12
2.1. Local de estudo.....	12
2.2. Cultivo das plantas	12
2.3. Exposição das plantas.....	12
2.4. Análises em microscopia fotônica.....	17
2.5. Análises histoquímicas	18
2.5.1. Acúmulo do peróxido do hidrogênio (H ₂ O ₂)	18
2.5.2. Detecção da morte celular	18
2.6. Análises em microscopia de epifluorescência.....	19
2.7. Análises em microscopia eletrônica de transmissão	20
2.8. Análises estatísticas	20
3. Resultados	21
3.1. Caracterização do ambiente de estudo	21
3.2. Análises estruturais e ultraestruturais.....	28
3.3. Análises estruturais em microscopia de epifluorescência	41
3.4. Análises histoquímicas	45
3.4.1. Acúmulo do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	45
3.4.2. Detecção da morte celular	49
3.4.3. Correlações entre o acúmulo de H ₂ O ₂ e a morte celular e as variáveis ambientais.....	53
4. Discussão	56
5. Conclusões	66
6. Resumo.....	68
7. Abstract	70
8. Literatura citada	72

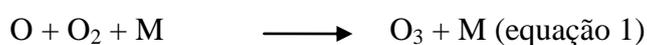
1. Introdução e objetivos

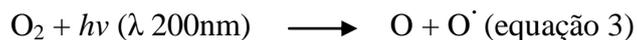
O ar urbano é contaminado por gases oriundos principalmente da queima de combustíveis, os poluentes primários, sendo os mais importantes: dióxido de enxofre (SO₂), sulfeto de hidrogênio (H₂S), óxidos de nitrogênio (NO_x), amônia (NH₃), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). Ozônio troposférico (O₃) e nitrato de peroxiacetila (PAN), poluentes secundários, estão entre os mais prejudiciais à vegetação e à saúde humana e são produtos do *smog* fotoquímico (Freedman 1995, Han & Naeher 2006). O termo *smog* deriva das palavras *smoke* “fumaça” e *fog* “neblina” e foi utilizado inicialmente para designar a névoa que cobriu a cidade de Londres em 1950 (Freedman 1995).

Dentre os poluentes atmosféricos, o ozônio troposférico é o mais estudado quanto aos efeitos na vegetação devido ao seu alto poder oxidante. O termo ozônio deriva do grego *ozein* e significa “cheirar” (Schonbein 1840 *apud* Farrell 2005) uma vez que esse gás possui odor característico ligeiramente adocicado (Faoro & Iriti 2009). É um gás azulado, 1,6 vezes mais pesado que o ar e altamente reativo (Rao *et al.* 2000).

1.1. Formação do ozônio

O ozônio troposférico é formado por meio de reações fotoquímicas a partir da associação do oxigênio molecular (O₂) com o oxigênio atômico, na presença de um corpo receptor de energia (M) (equação 1). O oxigênio atômico (O[·]) pode ser proveniente da fotólise do dióxido de nitrogênio (NO₂) em um comprimento de onda de 440 nm (equação 2), ou da fotólise do oxigênio molecular (O₂) em um comprimento de onda de 200 nm (equação 3).





Em uma atmosfera isenta de poluentes, o ozônio formado é consumido de acordo com a equação 4, que consiste na reação do monóxido de nitrogênio (NO) com o ozônio (O₃), regenerando o dióxido de nitrogênio (NO₂) e consumindo o O₃ (Freedman 1995, Krupa & Manning 1988).



Entretanto, em uma atmosfera poluída (equação 5), o monóxido de nitrogênio (NO) é convertido a dióxido de nitrogênio (NO₂), e pode ser consumido pelos radicais orgânicos (RO₂[·]) (equação 6), desta maneira o ozônio (O₃) é acumulado (equação 7) (Freedman 1995, Kley *et al.* 1999).



O ozônio apresenta um ciclo diário, com maiores concentrações no período das 12 às 15 h, quando a intensidade luminosa é maior. Devido à sua toxicidade, há uma preocupação mundial na determinação das concentrações limites que podem provocar danos a saúde da população e a vegetação.

Em relação à proteção da vegetação, a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) utiliza um índice denominado VRPP – Valor de Referência para Proteção da Produtividade

Agrícola. Este índice é determinado por uma AOT40 (concentração de ozônio acima de 40 ppb acumulada num determinado período) referente a 3.000 ppb acumulados em um trimestre. Para o aparecimento de injúrias visíveis em plantas sensíveis, a Organização Mundial de Saúde (OMS) utiliza uma AOT40 de 200 ppb em um período de cinco dias (Cetesb 2009). A Agência de Proteção Ambiental dos EUA estimou que o ozônio causa nas culturas agrícolas um prejuízo de aproximadamente 500 milhões de dólares ao ano, sem considerar os danos à vegetação nativa (Cetesb 2009).

1.2. O ozônio, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo

O ozônio pouco afeta as superfícies externas das folhas, contudo, ao entrar pelos estômatos e atingir os espaços intercelulares reage rapidamente com os componentes da parede celular, membranas e fluidos presentes no apoplasto. Em consequência dessas reações, o ozônio forma secundariamente espécies reativas de oxigênio (ERO), que vão agir no apoplasto e em diferentes compartimentos celulares, causando o estresse oxidativo (Bray *et al.* 2000, Rao *et al.* 2000, Heath 2008, Overmyer *et al.* 2009).

Entre as ERO, encontram-se o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que após sua formação acaba estimulando a produção das outras espécies como: o radical peridroxil (O_2H^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^\cdot) e o ânion superóxido (O^{2-}) (Bray *et al.* 2000). Estas moléculas, especialmente o OH^\cdot , são muito reativas, afetando lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Como as membranas celulares possuem ácidos graxos poliinsaturados, representam o primeiro alvo das ERO, que alteram a sua fluidez e desencadeiam a peroxidação lipídica (Faoro & Iriti 2009). Contudo, o O^{2-} e o H_2O_2 possuem também um papel sinalizador no mecanismo de defesa vegetal (Bray *et al.* 2000), portanto só serão “nocivos” à planta quando acumulados (Soares & Machado

2007). O peróxido de hidrogênio atua no cruzamento oxidativo (“cross-linking”) de proteínas de parede celular, desenvolvendo com a matriz de polissacarídeos um polímero com várias glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, o que resulta no fortalecimento estrutural da parede celular (Resende *et al.* 2003). O H_2O_2 também atua como substrato das peroxidases e, dessa forma, desencadeia a química da lignificação, com a formação de polímeros de lignina (Resende *et al.* 2003). Tais respostas representam mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos, uma vez que criam barreiras mecânicas efetivas contra os mesmos. Segundo Apel & Hirt (2004), quando um patógeno invade a planta há uma indução na produção do H_2O_2 e um acúmulo inicial muito rápido dessa substância que terá função antifúngica ou antibacteriana. Na sequência, uma produção mais prolongada de H_2O_2 será um sinal para indução de genes que vão desencadear processos de defesa, como a produção de antioxidantes (Apel & Hirt 2004).

As ERO não se formam apenas em decorrência de estressores externos, mas resultam também do metabolismo normal das plantas, em reações de redox e durante a redução incompleta do oxigênio ou oxidação da água nas cadeias transportadoras de elétrons nas mitocôndrias e nos cloroplastos (Bray *et al.* 2000, Apel & Hirt 2004). Assim, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra a ação das ERO, representados pelos antioxidantes, que são moléculas com o poder de neutralização dos efeitos deletérios causados pelas ERO. Estes podem ser enzimáticos como: superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX) ou não-enzimáticos como: ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona (GSH), *N*-acetilcisteína (NAC), tocoferol (vitamina E), carotenóides, fenilpropanóides e poliaminas (Mittler 2002). Os antioxidantes estão localizados no apoplasto, citossol, cloroplastos, membranas, mitocôndrias, parede celular, peroxissomos e vacúolos (Mittler 2002).

1.3. Detecção precoce da ação das ERO – clorofila *a* e calose

As ERO causam um estresse oxidativo que afeta as membranas da célula e organelas com membranas duplas, como cloroplastos e mitocôndrias, são particularmente sensíveis. Como as moléculas de clorofila ficam situadas nas membranas dos tilacóides e atuam como “sondas” intrínsecas de fluorescência, seu padrão de emissão é um indicador da integridade dessas membranas (Oliveira 2005). Dessa forma, o teor e a fluorescência da clorofila *a* são características que estão sendo empregadas atualmente como indicadoras da sensibilidade da planta ao ozônio. Alterações no padrão de fluorescência da clorofila *a* mostram não apenas mudanças no rendimento da fotossíntese, mas, também, permitem a localização precoce do dano causado por algum tipo de estresse, especialmente ao ozônio (Guidi *et al.* 1997, Maxwell & Johnson 2000, Gravano *et al.* 2004), uma vez que estudos microscópicos em secções finas vem mostrando que todos os tecidos fotossintetizantes emitem uma fluorescência vermelha quando expostos à luz azul ou ao UV-A (350-390 nm) (Bolhár-Nordenkampf & Öquist 1993), e quando submetidos ao ozônio essa fluorescência torna-se amarelada (Adams & Lintilhac 1993, Gravano *et al.* 2003).

Outra forma de reconhecer precocemente os danos decorrentes do estresse oxidativo provocado pelo ozônio em plantas envolve a detecção de calose, um polímero de β -1,3-glucano, que se deposita entre a membrana plasmática e a parede celular, habitualmente encontrada em ferimentos e locais de invasão por patógenos (Agrios 2005), mas que também pode ser observada, em microscopia de epifluorescência, ao redor das células que apresentam injúrias microscópicas (Gravano *et al.* 2003, 2004, Bussotti *et al.* 2005).

1.4. Detecção precoce da ação das ERO – organelas, células e tecidos

Além de alterações em processos bioquímicos e fisiológicos, plantas submetidas ao ozônio e sujeitas ao estresse oxidativo podem apresentar alterações ultraestruturais e estruturais. Alguns

trabalhos relatam principalmente modificações nos cloroplastos, que podem ter seu formato alterado (Pääkkönen *et al.* 1995, Günthardt-Goerg *et al.* 1997, Pääkkönen *et al.* 1997, Soda *et al.* 2000, Gravano *et al.* 2003), além de apresentarem intumescimento das membranas dos tilacóides (Pääkkönen *et al.* 1995, Günthardt-Goerg *et al.* 1997), maior elétrondensidade da matriz (Pääkkönen *et al.* 1995, Günthardt-Goerg *et al.* 1997, Pääkkönen *et al.* 1997, Gravano *et al.* 2003), variação na quantidade de plastoglobulos (Pääkkönen *et al.* 1995, Günthardt-Goerg *et al.* 1997, Pääkkönen *et al.* 1997, Soda *et al.* 2000, Gravano *et al.* 2003) e de grãos de amido (Pääkkönen *et al.* 1995, Pääkkönen *et al.* 1997, Soda *et al.* 2000, Gravano *et al.* 2003); usualmente observam-se também alterações em mitocôndrias (Faoro & Iriti 2009), aumento na quantidade de peroxissomos (Oksanen *et al.* 2003, Faoro & Iriti 2009), acúmulo de lipídios e outros depósitos no citoplasma (Soda *et al.* 2000) e na parede celular (Castagna *et al.* 2007).

Em nível estrutural, podem ser observadas modificações nos tecidos foliares, como alterações na espessura do mesofilo (Lawson *et al.* 2002, Gerosa *et al.* 2003, Pedroso 2006, Moura 2007, Alves *et al.* 2008a) e alterações no formato das células do parênquima clorofiliano (Vollenweider *et al.* 2003, Gravano *et al.* 2003, Reig-Armiñana *et al.* 2004, Pedroso 2006), aumento na densidade estomática (Alves *et al.* 2001, Lawson *et al.* 2002, Pedroso 2006, Alves *et al.* 2008a, Domingos *et al.* 2008), formação de escamas anômalas (Alves *et al.* 2008b), entre outras.

Na parede celular do mesofilo, além da lignificação (Resende *et al.* 2003), outra evidencia do estresse oxidativo é o aparecimento de protruções pécticas, estruturas semelhantes a verrugas, mais comumente encontradas no parênquima lacunoso (Vollenweider *et al.* 2003, Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007).

As plantas submetidas ao ozônio podem apresentar também uma resposta que se assemelha àquela decorrente do ataque de patógenos, a resposta de hipersensibilidade (HR). A palavra “hipersensibilidade” foi utilizada pela primeira vez por Stakman (1915), para descrever uma morte celular rápida e pontual observada em plantas inoculadas com fungos. No caso do ozônio, usa-se a

expressão “resposta semelhante à de hipersensibilidade” – HR-like (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007, Vollenweider *et al.* 2003). Tal resposta é um tipo de morte celular programada (MCP) reconhecida pela presença no mesofilo de células mortas preferencialmente nas regiões mais próximas à superfície adaxial da folha (Vollenweider *et al.* 2003). Tais células apresentam alterações características tais como: invaginações da membrana plasmática, presença de fenóis e calose, aumento na condensação da cromatina, presença de restos celulares no citoplasma similares a corpos apoptóticos, vacuolização do citoplasma e ruptura do tonoplasto (Heath 2000, Vollenweider *et al.* 2003, Lam 2004, Paoletti *et al.* 2009).

1.5. Danos visíveis e o biomonitoramento com plantas

Em espécies vegetais sensíveis ao ozônio, as alterações discutidas levam ao aparecimento de sintomas macroscópicos (Krupa *et al.* 2001), presentes predominantemente na superfície adaxial e na região intervenal de folhas mais velhas (Novak *et al.* 2003). Se a exposição ao ozônio for aguda, podem surgir pontuações e necroses. As pontuações são pequenos pontos presentes na superfície adaxial da folha, que indicam a morte de células do parênquima paliçádico, podendo ser brancas, pretas ou avermelhadas; já as necroses apresentam coloração amarronzada e indicam que todos os tecidos da folha nesta região estão mortos. Exposições crônicas ao ozônio levam ao aparecimento de pigmentações, cloroses e senescência prematura, denominada “senescência celular acelerada” (ACS em inglês). As pigmentações representam acúmulo de substâncias fenólicas e podem apresentar coloração que varia entre avermelhado e amarronzado; as cloroses resultam da perda da clorofila, enquanto que a senescência prematura (ACS) é a perda das folhas, e ocorre preferencialmente nas mais jovens e, nas regiões temperadas, antes do outono (Krupa *et al.* 2001, Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007). Essas respostas variam de acordo com o gênero, espécie, cultivar e genótipo vegetal.

1.6. *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ – bioindicadora consagrada de ozônio

Espécies vegetais que podem reagir de forma quantificável e previsível a perturbações ambientais, por meio de alterações nas suas funções vitais ou composição química, podem ser usadas para avaliar a extensão das mudanças em seu ambiente e são denominadas bioindicadoras (Arndt & Schweizer 1991). A cultivar ‘Bel-W3’ de *Nicotiana tabacum* L. – Solanaceae (tabaco) é a planta bioindicadora sensível padronizada e mais amplamente utilizada para qualificação de níveis tóxicos de ozônio (Krupa & Manning 1988, Heggstad 1991, Klumpp *et al.* 2001, Vergé *et al.* 2002). Uma exposição a 30 ppb de ozônio por oito horas, sob condições experimentais, já é suficiente para causar morte celular e necroses foliares em plantas dessa cultivar (Vergé *et al.* 2002). Klumpp *et al.* (2001) e Sant’Anna *et al.* (2008) ressaltam a utilidade do tabaco como bioindicadora do ozônio, uma vez que as injúrias foliares são facilmente observáveis e identificáveis.

No Brasil, a cultivar ‘Bel-W3’ de *Nicotiana tabacum* vem sendo utilizada para avaliar a contaminação do ar pelo ozônio (Domingos *et al.* 1998) no Complexo Industrial de Cubatão e o impacto do poluente na vegetação da Serra do Mar. A cultivar tem sido empregada na avaliação de ozônio também em meio urbano (Domingos *et al.* 2002, Sant’Anna 2007, Sant’Anna *et al.* 2008, Esposito *et al.* 2009).

A cultivar ‘Bel-W3’ foi exposta em locais da Região Metropolitana de São Paulo com altos índices de poluentes atmosféricos, principalmente ozônio, e foi avaliada quanto à presença de sintomas visíveis por Sant’Anna (2007). A cultivar mostrou-se eficiente para distinguir locais e épocas do ano mais e menos afetadas por ozônio. Entretanto, análises estatísticas mais detalhadas indicaram que os danos foliares foram relacionados positivamente com temperatura e radiação e inversamente com alguns precursores do *smog* fotoquímico, sugerindo que outros produtos do *smog* e/ou alguns fatores climáticos poderiam estar contribuindo para o aparecimento das necroses (Sant’Anna *et al.* 2008). Influência do ambiente nas respostas da planta também foi encontrada por

Klumpp *et al.* (2006) que empregaram a cultivar Bel-W3 de tabaco e conseguiram qualificar diferentes cidades européias quanto a presença de ozônio por meio das injúrias visíveis, porém estas relações nem sempre foram lineares, indicando dessa maneira que outros fatores ambientais podem interferir no fluxo de absorção do gás dentro da planta.

Folhas com e sem sintomas visíveis avaliadas por Sant'Anna durante as quatro estações do ano de 2006 (Sant'Anna 2007) foram analisadas quanto à estrutura por Pedroso (2006). A autora observou que, antes do aparecimento de necroses, plantas mantidas no ambiente com maior concentração de ozônio apresentaram aumento na densidade estomática, redução na espessura dos tecidos da lâmina foliar, maior agrupamento dos elementos de vaso na nervura principal, aumento da sinuosidade e redução na espessura da parede das células do parênquima paliçádico; essas modificações ocorreram em folhas que cresceram durante o período de exposição. Foi possível também descrever e comparar áreas saudáveis, de transição e necrosadas em microscopia de luz e varredura. Contudo, as análises foram realizadas em plantas expostas apenas na primavera e verão, as duas estações do ano que apresentam normalmente as maiores concentrações de ozônio e coletadas ao final do período de exposição – 14 dias de acordo com VDI (2003).

Cabe mencionar que este projeto está inserido em um projeto mais amplo, financiado pela FAPESP (Proc. FAPESP 05/51169-9), sob coordenação da Dra. Marisa Domingos intitulado “Respostas fisiológicas, antioxidativas e estruturais a fatores ambientais em plantas bioindicadoras sensíveis a compostos do *smog* fotoquímico”. Os dados gerados no presente estudo serão associados a outros dados biológicos, fisiológicos e metabólicos obtidos para as mesmas plantas. Além disso, outras duas espécies bioindicadoras de ozônio estão sendo investigadas por outros integrantes do projeto FAPESP com relação aos mesmos parâmetros avaliados para o tabaco. Ao final será possível estabelecer, para as três plantas investigadas pelo grupo, se o surgimento dos primeiros sintomas foliares visíveis em plantas bioindicadoras sensíveis, quando expostas em local da cidade de São Paulo poluído por compostos do *smog* fotoquímico, é influenciado por fatores do

ambiente ou por características intrínsecas das plantas ou pela interação entre eles, e também quais fatores exercem maior influência no aparecimento dos sintomas visíveis. Pretende-se ao final determinar, dentre as três espécies avaliadas, qual é a mais indicada para o biomonitoramento de ozônio no local testado.

1.7. Hipótese e objetivos

Neste estudo testa-se a hipótese de que alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas ocorrem em tecidos foliares assintomáticos de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio. Uma vez comprovada tal hipótese, pode-se esperar que os danos estruturais em tecidos ainda assintomáticos podem restringir a absorção de ozônio, contribuindo para explicar a fraca relação entre níveis de ozônio na atmosfera e intensidade de injúrias visíveis encontrada nos trabalhos anteriores.

Assim objetiva-se:

- Verificar essas alterações e em que sequência as mesmas aparecem;
- Determinar se as alterações observadas são mais ou menos severas dependendo dos níveis de contaminação atmosférica e das variações nos fatores meteorológicos.

Ao final, pretende-se contribuir para determinar se a cultivar é adequada para o biomonitoramento do ozônio nas condições do local de estudo.

2. Material e métodos

2.1. Local de estudo

O local de estudo foi a sede do Instituto de Botânica, situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - PEFI (zona sul da cidade de São Paulo) entre os paralelos 28°38'08''S e 23°40'18''S e os meridianos 46°36'48''W e 46°38'00''W. Este local é intensamente afetado pelo *smog* fotoquímico e menos afetado por poluentes primários emitidos por veículos (Domingos *et al.* 1998, Domingos *et al.* 2002, Esposito *et al.* 2009).

2.2. Cultivo das plantas

As plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' foram cultivadas a partir de sementes, em vasos plásticos (1,5 L), contendo substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. Durante o cultivo, os vasos permaneceram em casa de vegetação, com ar filtrado (filtros de poeira grossa e fina e de gases VECO) e condições climáticas monitoradas, sobre caixas plásticas cobertas com tela de arame galvanizado. A irrigação adequada das plantas foi garantida por capilaridade, através de cordões de náilon inseridos na base dos vasos, sendo que uma de suas extremidades permaneceu em contato com as raízes e a outra extremidade ficou mergulhada em água de torneira contida na caixa plástica (VDI 2003); as plantas receberam mensalmente 100 mL da solução nutritiva recomendada por Epstein (1975).

2.3. Exposição das plantas

Segundo recomendação do VDI (2003), as plantas foram expostas quando apresentaram pelo menos sete folhas, em média dois meses após a semeadura. Um dia antes do início de cada exposição, a quarta folha de cada planta (sendo a primeira a mais velha) foi marcada com barbante,

sendo essa folha o ponto de referência para análise dos sintomas foliares visíveis e para as amostragens subsequentes.

As plantas foram expostas em campo sobre suportes construídos com base em modelo proposto por Arndt & Schweizer (1991) e VDI (2003), que foram sombreados visando à redução da intensidade luminosa em 50%. O posicionamento dos suportes em campo foi estabelecido com bússola para padronizar o nível de insolação das plantas (Figura 1), de modo que as plantas permaneceram sombreadas durante todo o tempo, minimizando assim os efeitos da radiação.

Foram realizadas cinco campanhas experimentais durante 15 meses, ao longo dos anos de 2007 e 2008 (Tabela 1), tanto em períodos mais favoráveis à intensificação do processo do *smog* fotoquímico, quanto em períodos menos favoráveis à formação do mesmo, porém distintos quanto às características meteorológicas e à dispersão dos poluentes na atmosfera.

Cada campanha experimental consistiu de duas a seis exposições contínuas de plantas durante 14 dias (VDI 2003). Durante esse período, foram realizadas de duas a quatro coletas, cujas datas foram sorteadas para abranger de 0 a 14 dias de exposição, o que ao longo de todo o experimento garantiu amostras coletadas em praticamente todos os tempos de exposição; em cada coleta foram retiradas aleatoriamente seis plantas (Tabela 1) para as análises estruturais, histoquímicas e presença da calose. Em pelo menos um período de exposição, em todas as coletas foram realizadas também as análises ultraestruturais e da fluorescência da clorofila *a*, a figura 2 ilustra o sistema de coleta. As coletas de amostras de folha para todas as análises aqui efetuadas foram realizadas sempre no período da manhã, por volta das 10h00 min. Durante todo o período de exposição, o ambiente de estudo foi monitorado quanto às variáveis meteorológicas, como a temperatura, umidade relativa do ar e radiação global, dados esses fornecidos pela estação meteorológica do Instituto de Astronomia e Geofísica da USP instalada na mesma região. Medidas contínuas de ozônio troposférico foram realizadas pela equipe do projeto Bioindicadores-FAPESP por meio de monitores HORIBA (APOA-360CE e APNA-360CE) e software IDA-2000 para

aquisição dos valores, que foram disponibilizados para todo o grupo envolvido no projeto. Com base nos valores brutos, calculou-se a AOT20, que corresponde à soma dos valores horários acima de 20 ppb.h.

Lotes de plantas foram concomitantemente mantidos em casa de vegetação e representaram a situação de inicial – tempo zero (Figura 3), que também foram analisados sob todos os enfoques.



Foto: M. Domingos

Figura 1. Método de exposição de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3'.

Tabela 1. Período das campanhas experimentais, número e data das exposições e tempo da coleta (t1 = coleta realizada após 1 dia de exposição, t2 = coleta realizada após 2 dias de exposição e assim sucessivamente) de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio.

Campanhas	Exposições	Período de exposição	Tempos de coleta (t)
Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07)	1	08/10 – 22/10	t1, t3, t8 e t14
	2	22/10 – 05/11	t3, t4 e t8
	3	05/11 – 19/11	t4, t5, t8 e t9
	4	19/11 – 03/12	t2, t11 e t14
	5	03/12 – 17/12	t2 e t14
Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08)	1	10/03 – 24/03	t4, t8 e t11
	2	24/03 – 07/04	t1, t3 e t10
Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08)	1	07/04 – 21/04	t4, t7 e t10
	2	19/05 – 02/06	t1, t8 e t10
	3	09/06 – 23/06	t7 e t10
Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08)	1	14/07 – 28/07	t3, t7 e t11
	2	28/07 – 11/08	t3, t11 e t14
	3	11/08 – 25/08	t4, t8 e t11
	4	25/08 – 08/09	t1, t10 e t14
	5	08/09 – 22/09	t1, t10 e t11
	6	22/09 – 06/10	t2, t9 e t14
Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08)	1	13/10 – 27/10	t8 e t10
	2	27/10 – 10/11	t8, t10 e t14
	3	10/11 – 24/11	t1, t8 e t14
	4	24/11 – 08/12	t4, t8 e t10
	5	08/12 – 22/12	t1 e t10

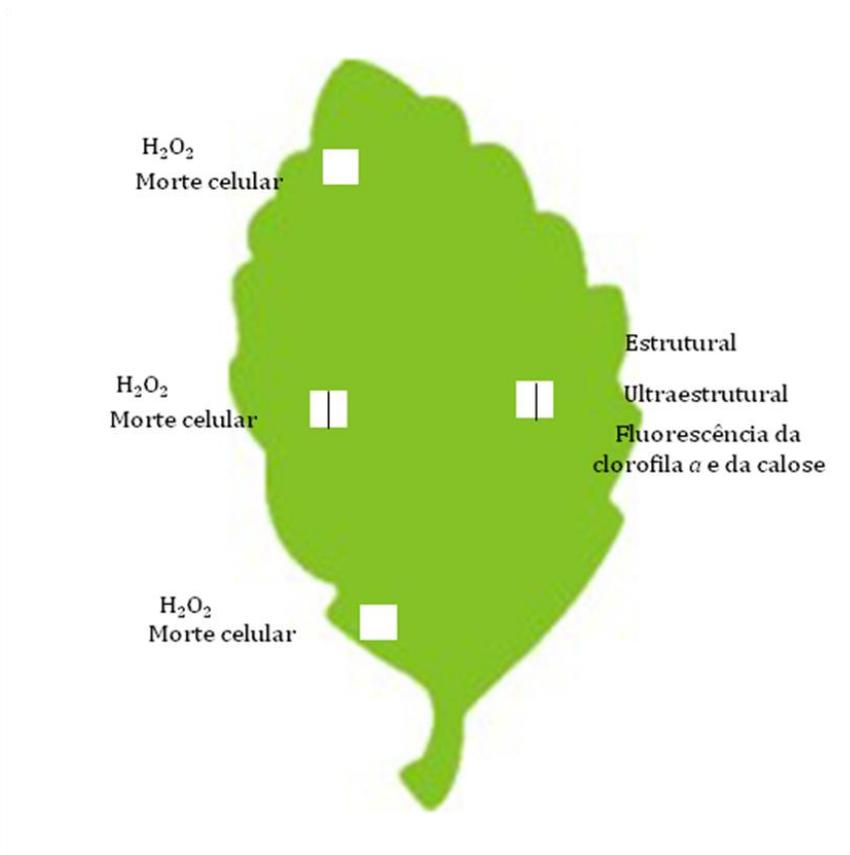


Figura 2. Esquema de coleta das amostras das folhas 6 e 7 de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3'.



Figura 3. Casa de vegetação com filtros para de gases e partículas e controle de temperatura situada no Instituto de Botânica, onde foi mantido o material de referência.

2.4. Análises em microscopia fotônica

Fragmentos assintomáticos da região mediana entre a nervura e a margem da sexta folha (a partir da base do caule e aqui denominada de folha 6 - que já foi expandida para o ambiente) foram fixados em solução de Karnovsky (1965, modificada por Kraus & Arduin 1997). O material foi mantido sob vácuo por cerca de 30 minutos e permaneceu no fixador por 48 horas, sendo armazenado em etanol a 70%.

Posteriormente, parte das amostras foi incluída em glicol-metacrilato (GMA) (historesina marca Leica) de acordo com recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo (Olympus Cut 4055) com espessura de 4 μm . As secções foram coradas em azul de toluidina 0,05% em tampão acetato 0,1 M, pH 4,7 (O'Brien & McCully 1965) e avaliadas qualitativamente em microscópio Olympus BX41-BFIII equipado com sistema de

captura de imagens e sistema semi-automático de medições, software Pro-Express versão 4.0.1, Media Cybernetics.

2.5. *Análises histoquímicas*

2.5.1. *Acúmulo do peróxido do hidrogênio (H_2O_2)*

Para a localização do acúmulo do H_2O_2 nos tecidos foliares foram coletados quatro fragmentos com cerca de 1 cm^2 das folhas frescas 6 e 7 como se vê na Figura 2, num total de oito amostras por planta em seis plantas (N= 48). Os mesmos foram imersos em solução contendo 1 mg mL^{-1} de 3,3'-diaminobenzidina (DAB)-HCl, (pH 5,6 ajustado com hidróxido de sódio) e incubados em câmara escura por oito horas. Em seguida foram clarificados em álcool fervente a 96% (Faoro *et al.* 2001), e montados em glicerina 50%. Como controle negativo, acrescentou-se 10 mM de ácido ascórbico à solução de DAB. As células que mostraram acúmulo de H_2O_2 apresentaram coloração marrom. Em cada coleta, para a quantificação do H_2O_2 , foram considerados dois critérios: (1) o número de plantas que apresentaram acúmulo (N=6) e (2) o número de células presentes numa área de $0,2\text{ mm}^2$ com acúmulo, considerando sete classes: 1 (1-5 células coradas em marrom), 2 (6-10 células), 3 (11-15 células), 4 (16-20 células), 5 (21-25 células), 6 (26-30 células) e 7 (acima de 31 células). As classes foram estabelecidas para permitir melhor comparação de resultados entre as campanhas, uma vez que houve grande variação do número de células com acúmulo entre elas.

2.5.2. *Detecção da morte celular*

A determinação da morte celular foi realizada empregando-se o corante azul de Evans. Fragmentos de folhas frescas, com cerca de 1 cm^2 , foram fervidos por um minuto em mistura contendo 20 mg.mL^{-1} de azul de Evans, ácido láctico, fenol, glicerina e água (1:1:1:1). Logo após, os mesmos foram clarificados por 24 horas em solução aquosa de $2,5\text{g mL}^{-1}$ de cloral hidratado (Iriti *et al.* 2003), e montados em glicerina 50%. As células mortas foram evidenciadas pela coloração azul,

em contraste com as células saudáveis que se apresentaram transparentes. Para a quantificação da morte celular, considerou-se: (1) o número de plantas com células mortas em cada coleta (N=6) e (2) o número médio de células mortas, estabelecido numa área de 0,2 mm², em oito amostras para cada uma das seis plantas avaliadas por coleta (N=48).

As amostras *N. tabacum* em ambos os testes foram analisadas em microscópio Olympus BX41-BFIII equipado com sistema de captura de imagens e sistema semi-automático de medições, software Pro-Express versão 4.0.1, Media Cybernetics.

2.6. Análises em microscopia de epifluorescência

Para a observação da autofluorescência da clorofila *a*, o material foi analisado a fresco. As amostras avaliadas foram coletadas em todas as campanhas de 2008 (verão, outono, inverno e primavera), em um único período experimental, e foram comparadas com plantas da situação inicial, correspondente ao tempo zero de exposição. Todas as amostras foram seccionadas transversalmente à mão livre, com cerca de 30 µm, da folha 6. Para observação da fluorescência primária dos cloroplastos foi utilizado filtro azul, que compreende o comprimento de onda entre 450 a 490 nm, um espelho dicróico e um filtro de 510 nm para determinar a resposta da clorofila (Adams & Lintilhac 1993). As observações foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan 2) na Seção de Ficologia do Instituto de Botânica.

Para detecção de calose, as amostras fixadas e incluídas como já descrito foram seccionadas em micrótomo rotativo com espessura de 5 µm, coradas com azul de anilina 1% em tampão fosfato 0,0065 M, pH 8,5 (O'Brien & McCully 1981) e observadas em microscópio de epifluorescência (Leica) do Laboratório de Anatomia Vegetal (Departamento de Botânica-IB-USP) com filtro ultravioleta, que abrange o comprimento de onda entre 350-390 nm.

2.7. *Análises em microscopia eletrônica de transmissão*

As amostras da folha 6 foram fixadas segundo Karnovsky (1965) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas gradativamente em série acetônica, incluídas em Araldite e seccionadas em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). Secções ultrafinas, com cerca de 90 nm, foram duplamente contrastadas com acetado de uranila 2% por 15 min (Watson 1958) e citrato de chumbo por 15 min (Reynolds 1963) e examinadas ao microscópio de transmissão Philips CM 100. As análises ao MET foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica, UNESP-Botucatu.

2.8. *Análises estatísticas*

Para determinação das diferenças entre a morte celular nas diferentes campanhas experimentais realizou-se análise de variância não paramétrica (Teste de Kruskal – Wallis). Quando o nível de significância ($p < 0,05$) da análise foi atingido, aplicou-se teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas para identificação das diferenças. Foi também realizada correlação de Pearson e teste de regressão linear entre as variáveis meteorológicas com os valores brutos das células que acumularam peróxido de hidrogênio e que apresentaram morte celular. Foram realizadas também correlações e teste de regressão linear dentro de cada estação e entre as estações semelhantes e as contrastantes. Para a realização destas análises foi utilizado o software Sigma Stat®.

3. Resultados

3.1. *Caracterização do ambiente de estudo*

Ao longo de todo o período experimental, o valor médio da temperatura foi de aproximadamente 20 °C, atingindo valores máximos, cerca de 30 °C, nas campanhas da primavera 2007 e 2008. Os valores mínimos, entre 7 e 12 °C, foram encontrados nas campanhas do outono e inverno de 2008 (Figura 4).

A umidade relativa do ar, durante todo o período de exposição, ficou ao redor de 80%. Durante as campanhas experimentais correspondentes outono e inverno de 2008 observaram-se os menores índices, já as campanhas da primavera 2007/2008 e verão 2008 mostraram pouca variação e sempre índices elevados (Figura 5).

Em relação à radiação global, as campanhas referentes ao período do inverno e da primavera de 2008, foram as que apresentaram os maiores valores, quando comparados às demais (Figura 6).

Para se estabelecer a concentração de ozônio durante o período de exposição das plantas foi calculado a AOT20 (valor acumulado acima de 20 ppb). A tabela 2 indica que nas campanhas experimentais correspondentes aos períodos da primavera de 2007 e inverno de 2008, a AOT20 atingiu os maiores valores, que ficaram entre 800 ppb e 1100 ppb. De acordo com a CETESB (2009), o ano de 2008 foi atípico, uma vez que nos meses de setembro a março, considerados mais propícios para a formação do ozônio, houve muitos dias com precipitação, muitas horas com nebulosidade no período da tarde e redução da radiação solar, portanto condições desfavoráveis para a formação desse gás.

No local de referência, casa de vegetação com ar filtrado, durante todo o período de estudo, a concentração horária de ozônio não ultrapassou 5 ppb, registrando-se uma média de 1,5 ppb. As médias de temperatura e umidade relativa do ar foram, respectivamente, 21°C e 75% (Relatório FAPESP proc 05/51169-9). Em relação à luminosidade, na casa de vegetação esta foi cerca de 20%

maior que a do ambiente, uma vez que, de acordo com o protocolo VDI (2003), as plantas são mantidas em suportes com sombrite que reduzem a luminosidade em cerca de 50% (Relatório FAPESP proc. 05/51169-9).

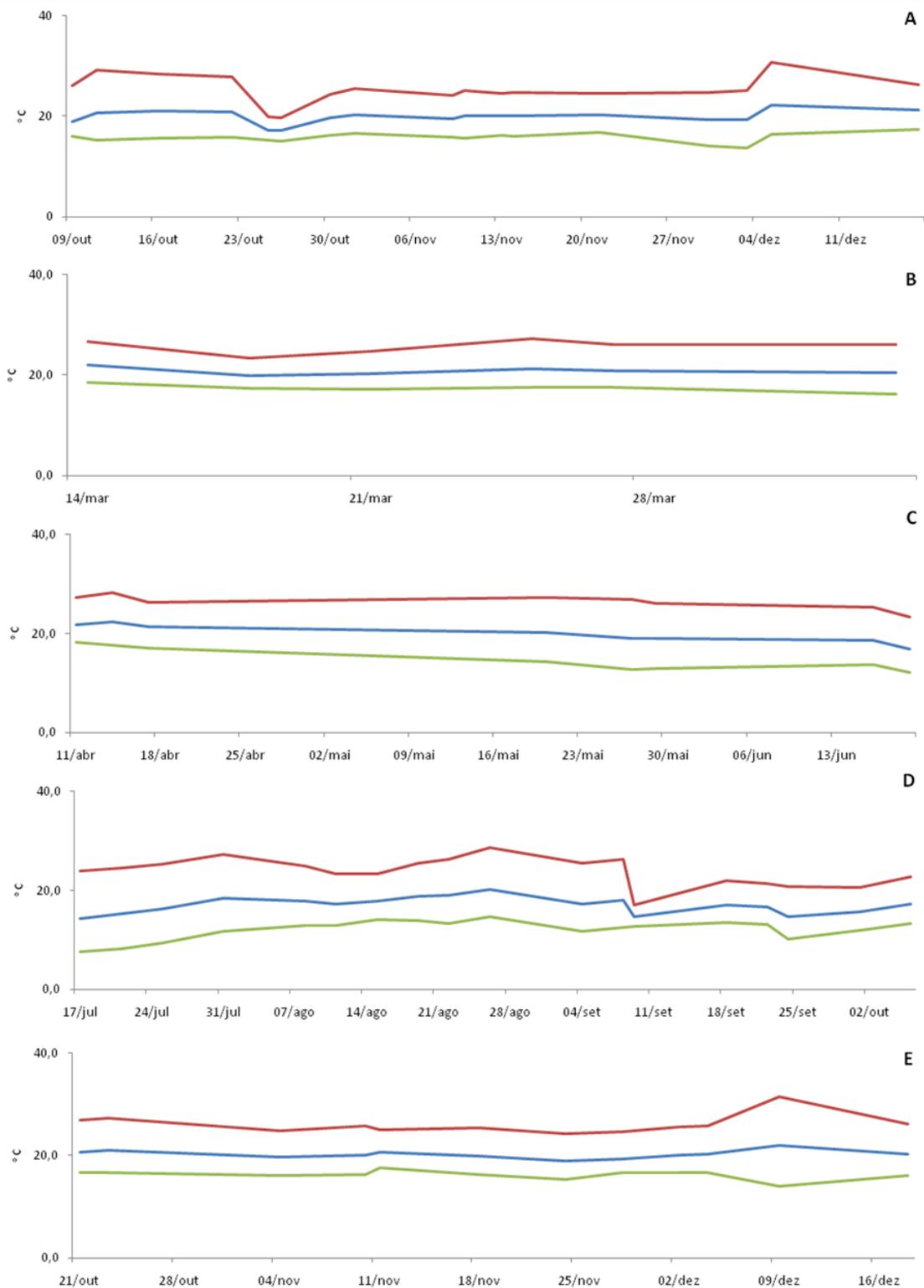


Figura 4. Valores médios (azul), mínimos (verde) e máximos (vermelho) da temperatura (°C) durante o período experimental. A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08).

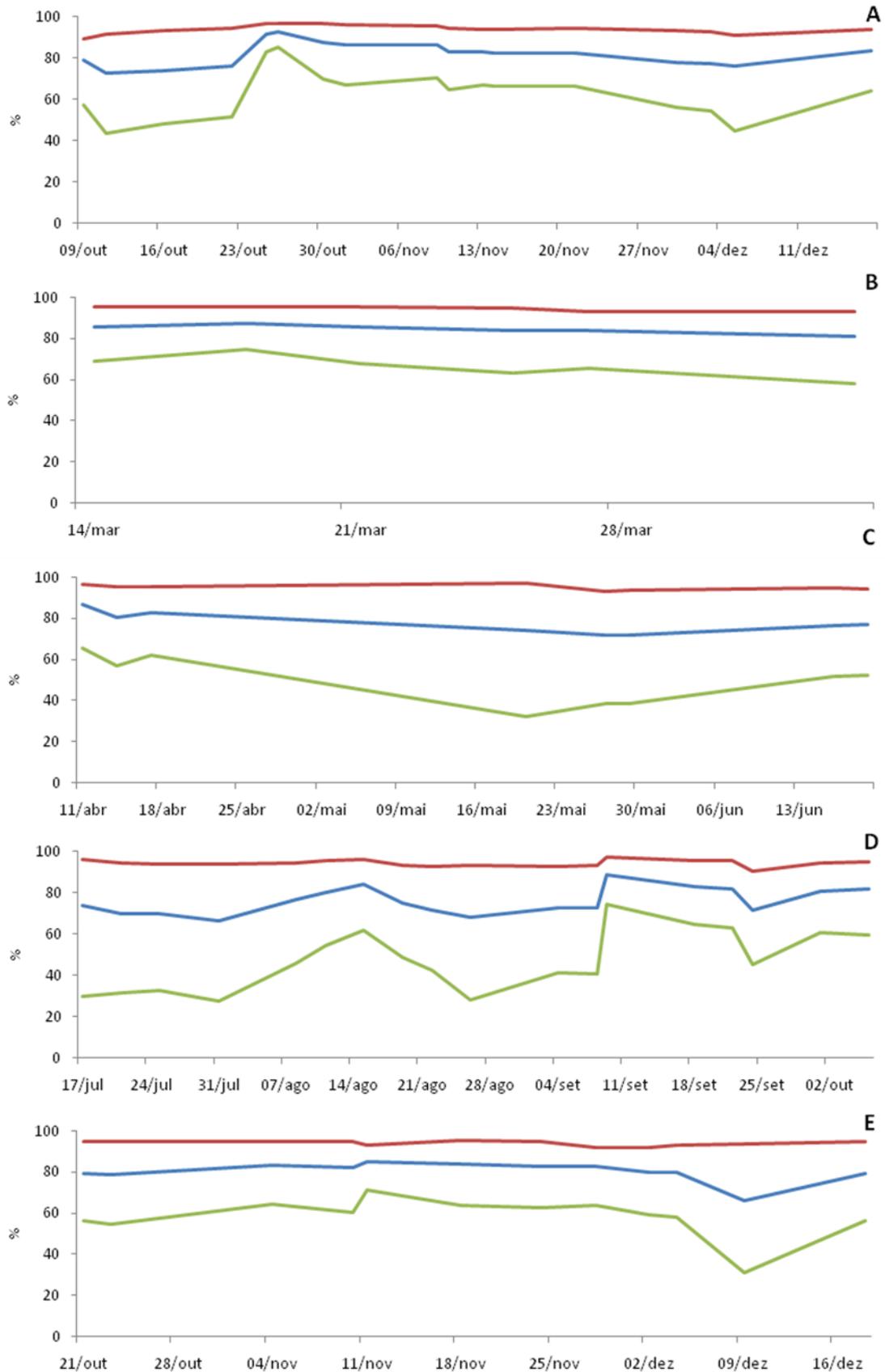


Figura 5. Valores médios (azul), mínimos (verde) e máximos (vermelho) da umidade relativa do ar (%) durante o período experimental. A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08).

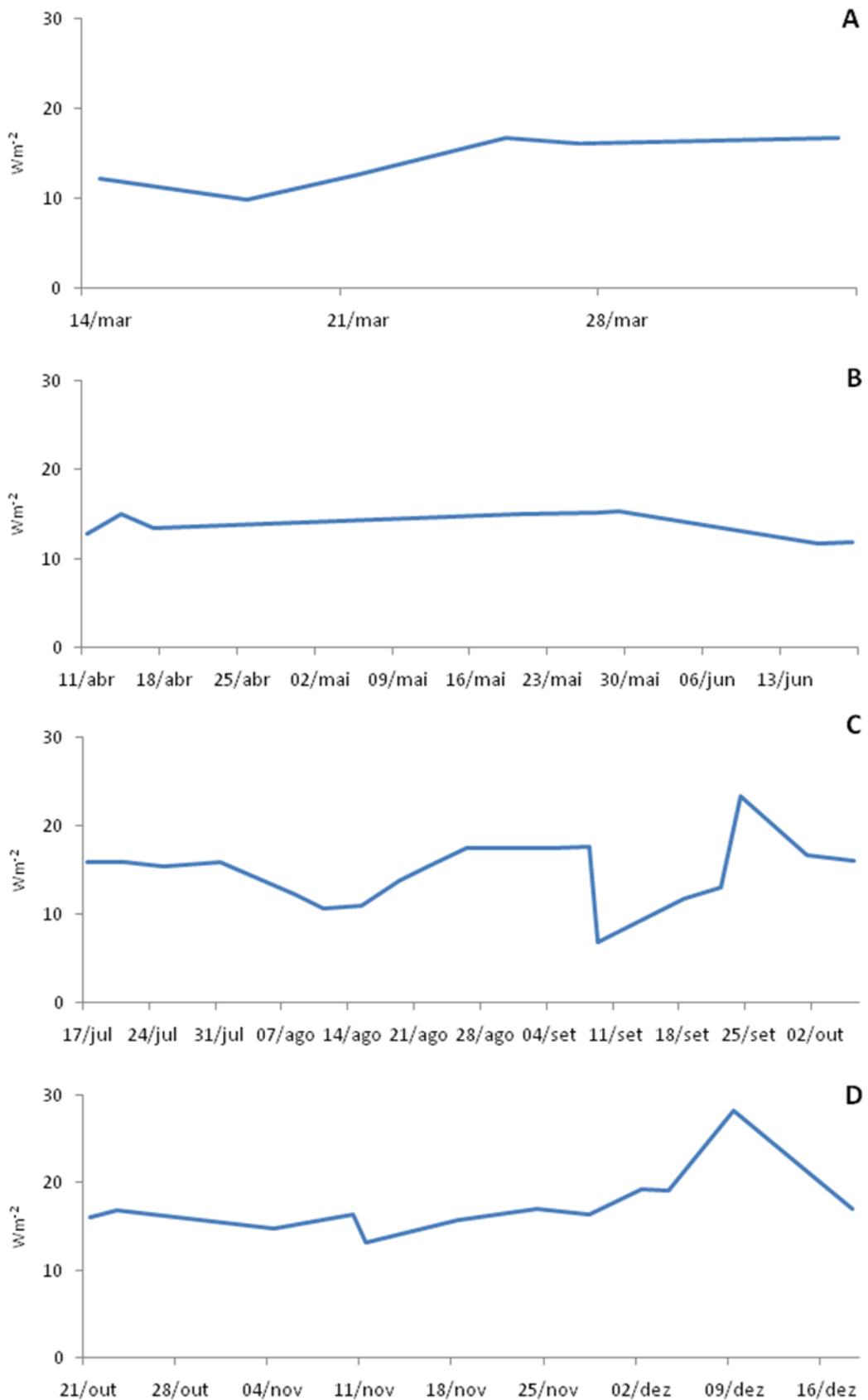


Figura 6. Valores médios da radiação global durante o período experimental. A. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). B. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). C. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). D. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08).

Tabela 2. Valores da AOT20 (ppb) durante o período experimental. A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08). (t1 = coleta após um dia de exposição, t2 = dois dias de exposição e assim sucessivamente).

Campanhas	Exposições	Períodos de exposição	Tempo de coleta (t)	AOT20 (ppb)
Primavera 2007	1	08/10 – 22/10	t1	29,5
			t3	746,6
			t8	746,6
			t14	1040,4
	2	22/10 – 05/11	t3	13,7
			t4	13,7
			t8	206
	3	05/11 – 19/11	t4	-
			t5	-
			t8	-
			t9	-
	4	19/11 – 03/12	t2	50,9
			t11	50,9
			t14	50,9
	5	03/12 – 17/12	t2	0
			t14	320,6
Verão 2008	1	10/03 – 24/03	t4	101,8
			t8	101,8
			t11	226,7
	2	24/03 – 07/04	t1	0
			t3	0
			t10	166,9
Outono 2008	1	07/04 – 21/04	t4	212,1
			t7	283,4
			t10	342,5
	2	19/05 – 02/06	t1	0
			t8	5,7
			t10	23,3
	3	09/06 – 23/06	t7	0
			t10	0
Inverno 2008	1	14/07 – 28/07	t3	254,1
			t7	893,8
			t11	1008,2
	2	28/07 – 11/08	t3	333,2
			t11	511,9
			t14	623,8
	3	11/08 – 25/08	t4	201,7
			t8	909,9
			t11	1099,9
	4	25/08 – 08/09	t1	262,9
			t10	956,4

	5	08/09 – 22/09	t14	1080,9
			t1	0
			t10	225,5
			t11	225,5
	6	22/09 – 06/10	t2	-
			t9	-
			t14	35,1
Primavera 2007	1	13/10 – 27/10	t8	619,3
			t10	748,3
	2	27/10 – 10/11	t8	102,4
			t10	102,4
			t14	213,8
	3	10/11 – 24/11	t1	10,4
			t8	289,9
			t14	289,9
	4	24/11 – 08/12	t4	0
			t8	113,1
			t10	188,8
	5	08/12 – 22/12	t1	200,7
			t10	798,9

- dados não obtidos

continuação da tabela 2.

3.2. *Análises estruturais e ultraestruturais*

Em *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ exposta em São Paulo foram observadas alterações estruturais em microscopia fotônica e ultraestruturais em microscopia eletrônica de transmissão em folhas assintomáticas a olho nú. Após o terceiro dia de exposição do período correspondente a primavera de 2007, notou-se retração do citoplasma nas células do mesofilo (Figura 7) e deslocamento dos cloroplastos provavelmente em decorrência as alterações no tonoplasto. Tais alterações foram observadas principalmente nas células do parênquima paliçádico (Figuras 7A – 7E, 11D) quando comparadas às do parênquima lacunoso (Figura 7F). Estas alterações também foram notadas em todo o período experimental. Observou-se ligeira sinuosidade nas paredes anticlinais das células do mesofilo, principalmente naquelas próximas à câmara subestomática. O conteúdo citoplasmático das mesmas apresentou aspecto mais denso (Figuras 8B – 8D), quando comparado ao material de referente ao tempo zero, aquele mantido sob ar filtrado em casa de vegetação e caracterizado por paredes anticlinais lisas, vacúolos íntegros e cloroplastos posicionados na região periférica das células (Figura 8A).

A sinuosidade das paredes pode ser observada nas células paliçádicas mais distantes da cavidade subestomática a partir do terceiro dia da campanha referente à primavera de 2007, sendo intensificada aos oito dias (Figuras 8E, 8F e 12A). Além disso, as mesmas apresentam espessamento da parede celular (Figuras 11C, 11D – 11F) e muitos vacúolos em seu citoplasma (Figura 12B).

As células do parênquima lacunoso apresentam protruções na parede celular (Figuras 9D – 9F, 12D – 12F), já observadas após o terceiro dia de exposição; estas foram encontradas durante todo o período experimental, com maior frequência nas plantas da campanha correspondente ao período do inverno de 2008.

Nas folhas assintomáticas, independentemente da exposição, as células epidérmicas de ambas as superfícies mostraram-se arredondadas em secção transversal e com paredes íntegras; os

estômatos, igualmente, não apresentaram alterações em relação ao material de referência (Figuras 8B – 8D). Os tecidos vasculares não apresentaram alterações ao logo do período de exposição, tanto em folhas assintomáticas como naquelas com sintomas visíveis macroscopicamente (Figuras 8D).

Após oito dias de exposição, na campanha correspondente a primavera de 2007, os cloroplastos do mesofilo, principalmente no parênquima paliçádico, mostraram ligeira deformação (Figura 9F), provavelmente decorrente da presença de numerosos grãos de amido. Estes foram claramente observados ao MET (Figuras 13B – 13E) juntamente com plastoglóbulos menos elétrondensos. Constatou-se, nesses cloroplastos, intumescimento e desorganização dos tilacóides (Figuras 13F), diferenciando-os dos cloroplastos observados no material de referência, que apresentaram um formato elíptico característico, poucos grãos de amido, plastoglóbulos escuros, tilacóides achatados e empilhados e estroma com coloração clara (Figura 13A).

Além dos cloroplastos foram observadas alterações nas mitocôndrias e nos peroxissomos. As mitocôndrias do material de referência apresentaram cristas desenvolvidas e matriz com aspecto íntegro (Figura 14A), enquanto que aquelas de plantas expostas ao ozônio apresentaram a matriz elétrondensa e, em seu interior, cristas dilatadas e corpos elétrondensos (Figura 14B). Em células do parênquima paliçádico de plantas expostas ao ozônio, peroxissomos com matriz mais elétrondensa foram observados com frequência, e com cristais de catalase (Figuras 14C – 14D), o que não ocorreu no material de referência (Figura 14A).

Análises do núcleo em células de folhas assintomáticas mostraram que o mesmo apresentou-se disposto periféricamente e com forma arredondada após dois dias de exposição, como se vê em amostra referente a campanha da primavera de 2007 (Figura 8E). Porém após sete dias, apresentou alteração em seu formato, adquirindo forma alongada (Figura 10A) com aparente condensação da cromatina (Figuras 10B – 10C); tal condensação foi confirmada ao MET, como se vê nas figuras 15B – 15D em material referente a campanha correspondente ao outono de 2008.

Ao final da exposição, ou seja, no 14º dia na campanha do inverno de 2008, em regiões visualmente sadias de folhas sintomáticas, observou-se o colapso total de um grupo de células do parênquima paliçádico (Figuras 16A – 16C), o que caracteriza uma resposta semelhante à hipersensibilidade (HR-like) decorrente do estresse oxidativo causado pelas ERO. Posteriormente, esse colapso se estendeu ao parênquima lacunoso, aumentando os espaços intercelulares da folha e também às células epidérmicas nas duas superfícies, como se vê na figura 16D.

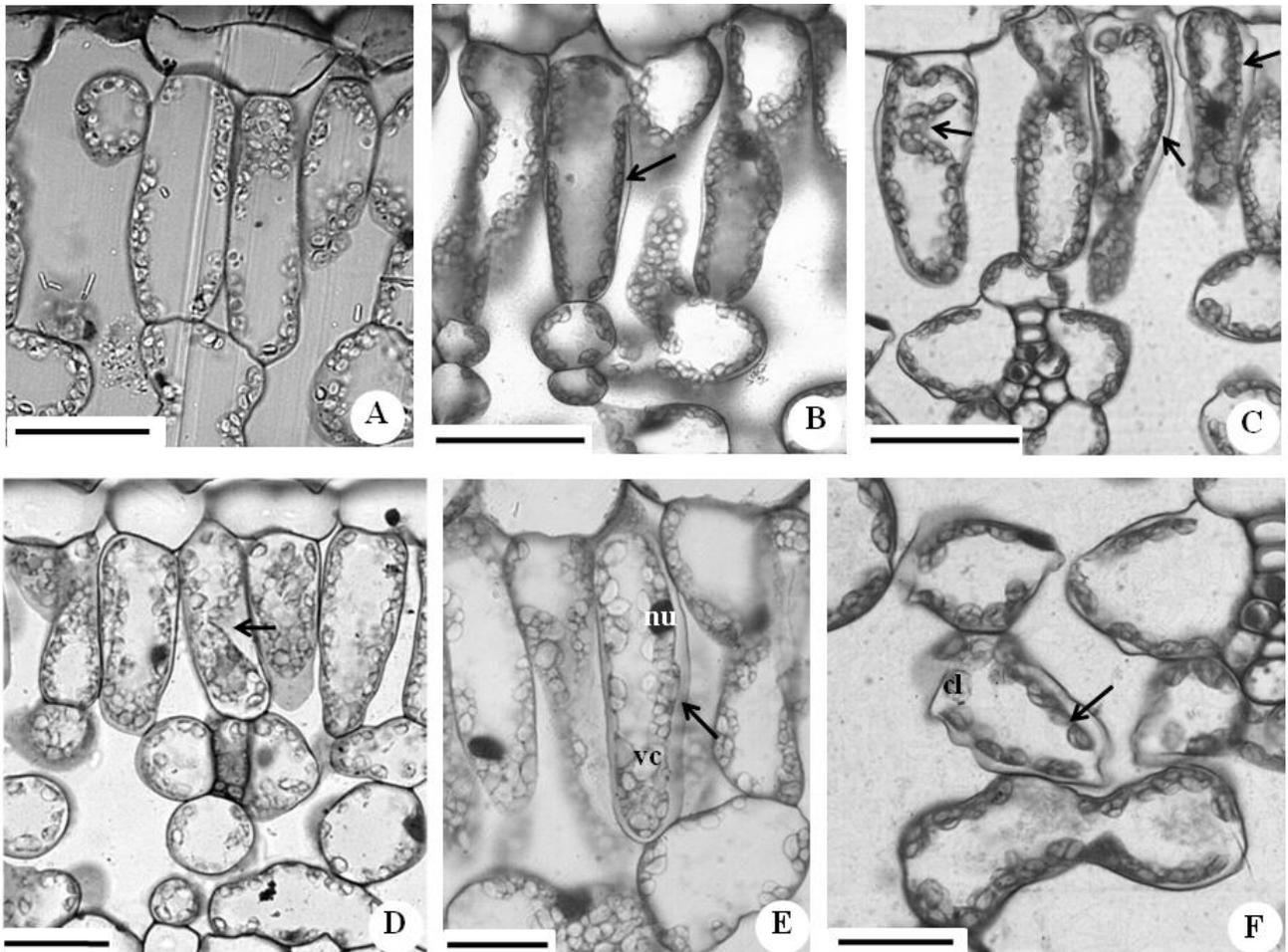


Figura 7. Fotomicrografias de secções transversais de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ após três dias de exposição na campanha correspondente à primavera de 2007. A. Material referente ao tempo zero. B– F. Retração do citoplasma das células do mesofilo (setas). A – D. Notar, no parênquima paliçádico, mudanças no formato e disposição dos cloroplastos (cl) provavelmente devido a alterações no tonoplasto. E. Vacuolização (vc) das células do parênquima paliçádico. F. Retração do citoplasma das células do parênquima lacunoso. nu = núcleo. (A – D. barras = 50 µm; E – F. barras = 25 µm).

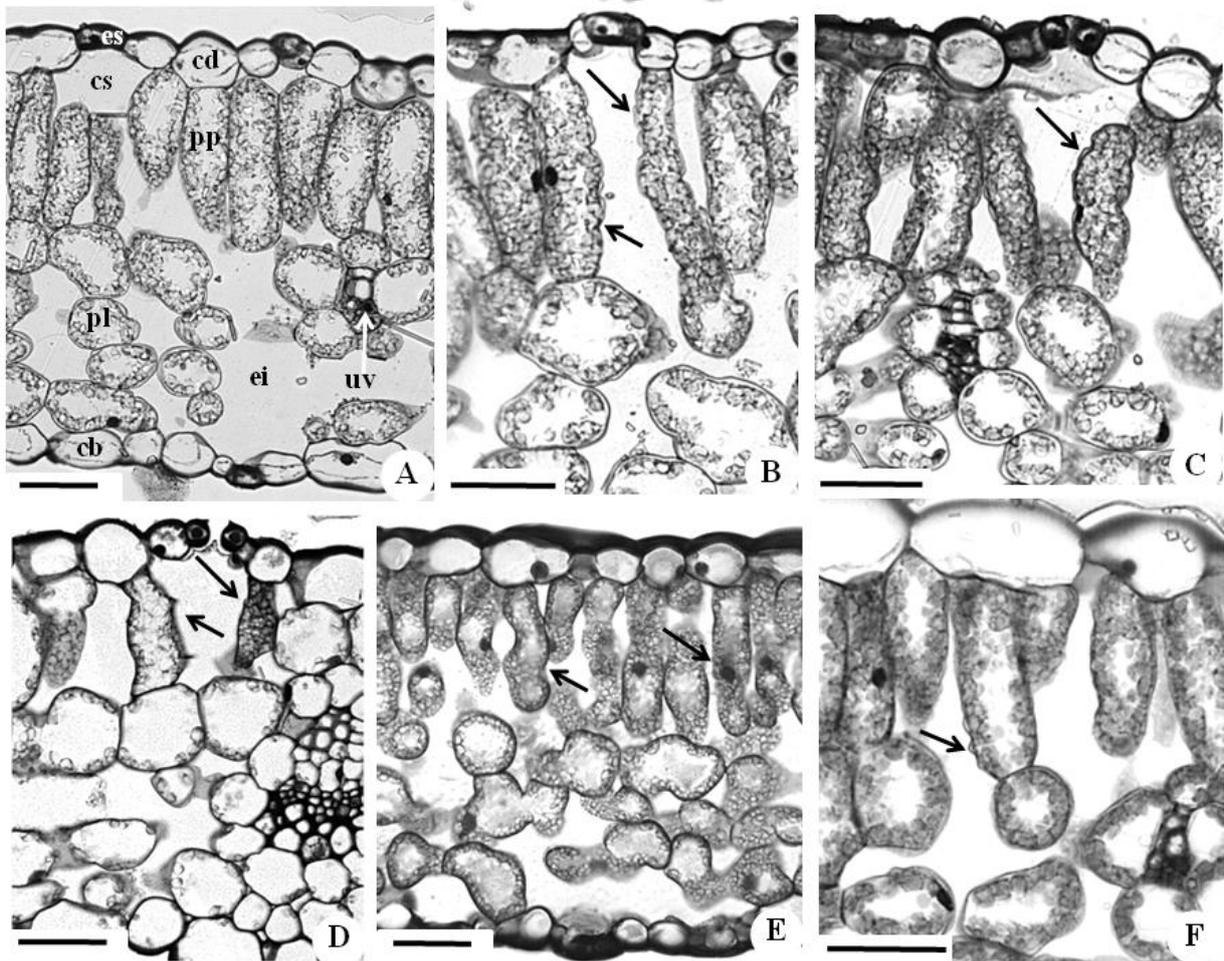


Figura 8. Fotomicrografias de seções transversais de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' da campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Material referente ao tempo zero. B – E. Plantas expostas por três dias em ambiente contaminado por ozônio. B – D. Presença de sinuosidade nas paredes anticlinais das células do parênquima paliçádico disposta ao redor da câmara subestomática (setas). E. Presença de sinuosidades nas paredes anticlinais de células do parênquima paliçádico afastadas das câmaras subestomáticas (setas). F. Plantas expostas por oito dias em ambiente contaminado por ozônio. Notar adensamento do conteúdo citoplasmático das células do mesófilo e protrusões na parede anticlinal de célula do parênquima paliçádico (seta). cb = células epidérmicas abaxiais; cd= células epidérmicas adaxiais; cs = câmara subestomática; ei = espaço intercelular; pl = parênquima lacunoso; pp = parênquima paliçádico, uv = unidade vascular. (barras = 50 µm).

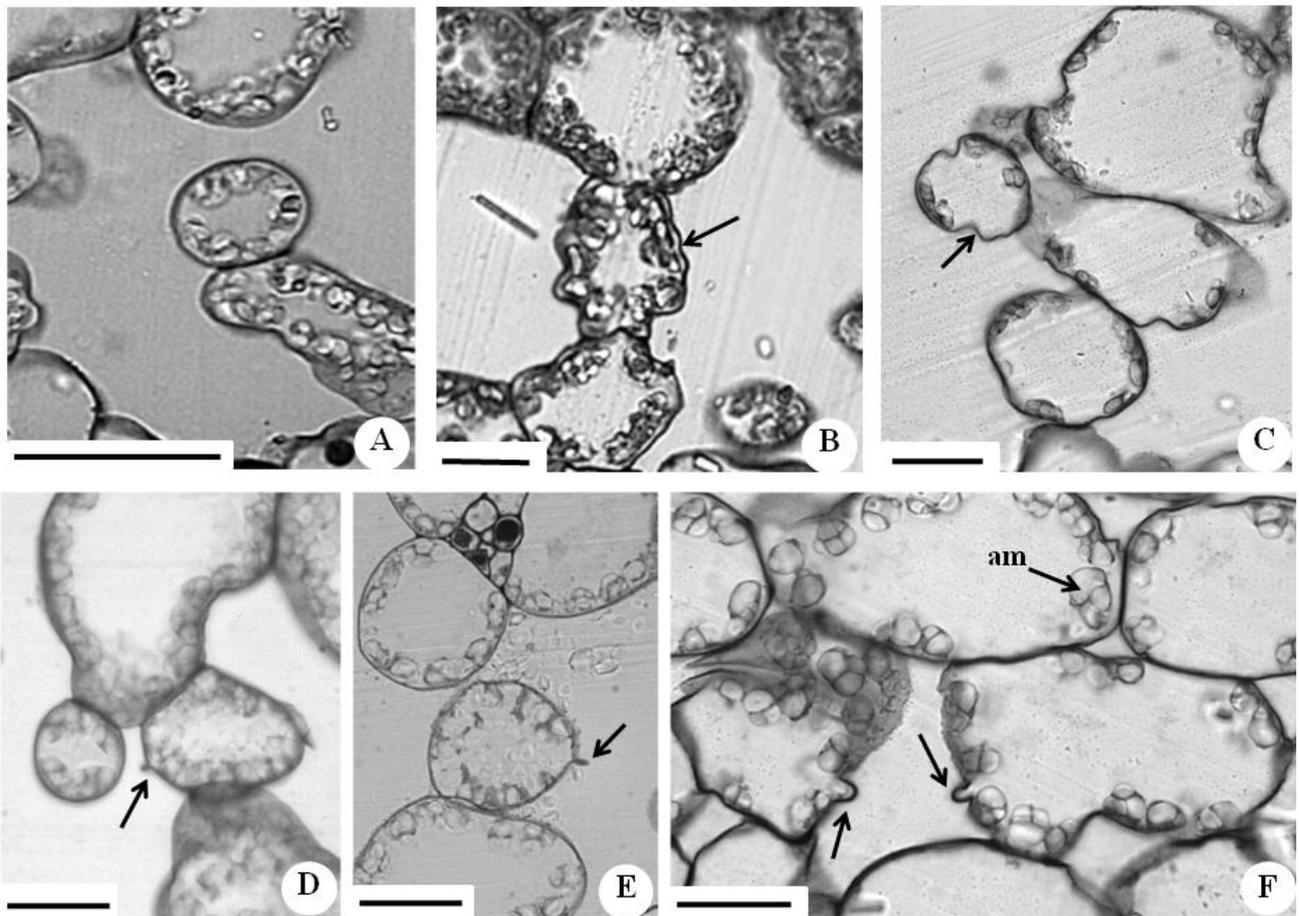


Figura 9. Fotomicrografias de secções transversais de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio na campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Material referente ao tempo zero. B – C. Presença de sinuosidade nas paredes anticlinais das células do parênquima lacunoso (setas) em plantas expostas por três dias em ambiente contaminado por ozônio. D – F. Protrusões nas células do parênquima lacunoso (setas) em plantas expostas por oito dias. am = amido. (A. barra = 100 μm ; B – D, F. barras = 25 μm ; E. barra = 50 μm).

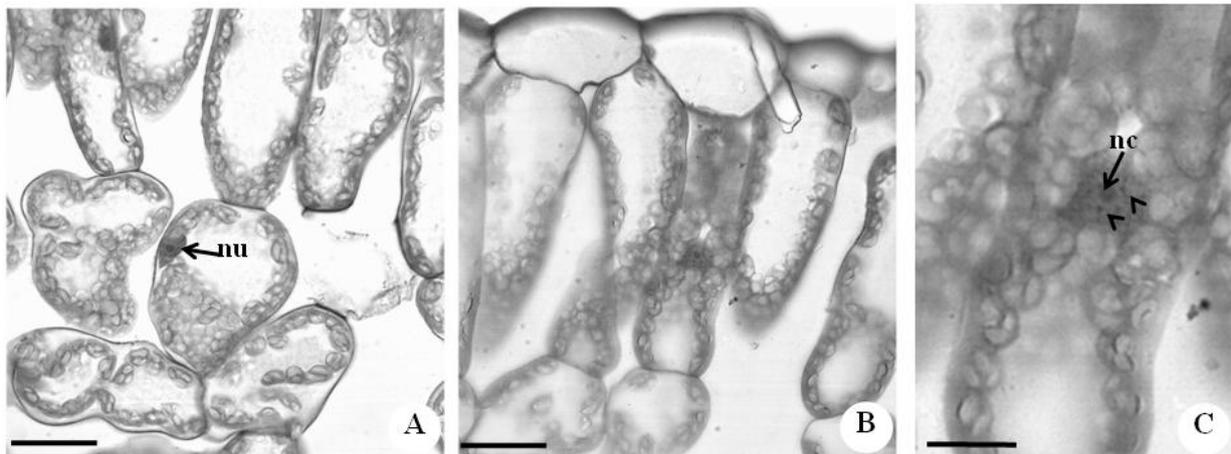


Figura 10. Fotomicrografias de seções transversais de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio após sete dias de exposição na campanha correspondente ao período do outono de 2008. A. Alteração no formato do núcleo (nu). B. Condensação da cromatina. C. Detalhe da condensação da cromatina (cabeça de seta) (nc = nucléolo). (A – B. barras = 25 μm ; C. barras = 10 μm).

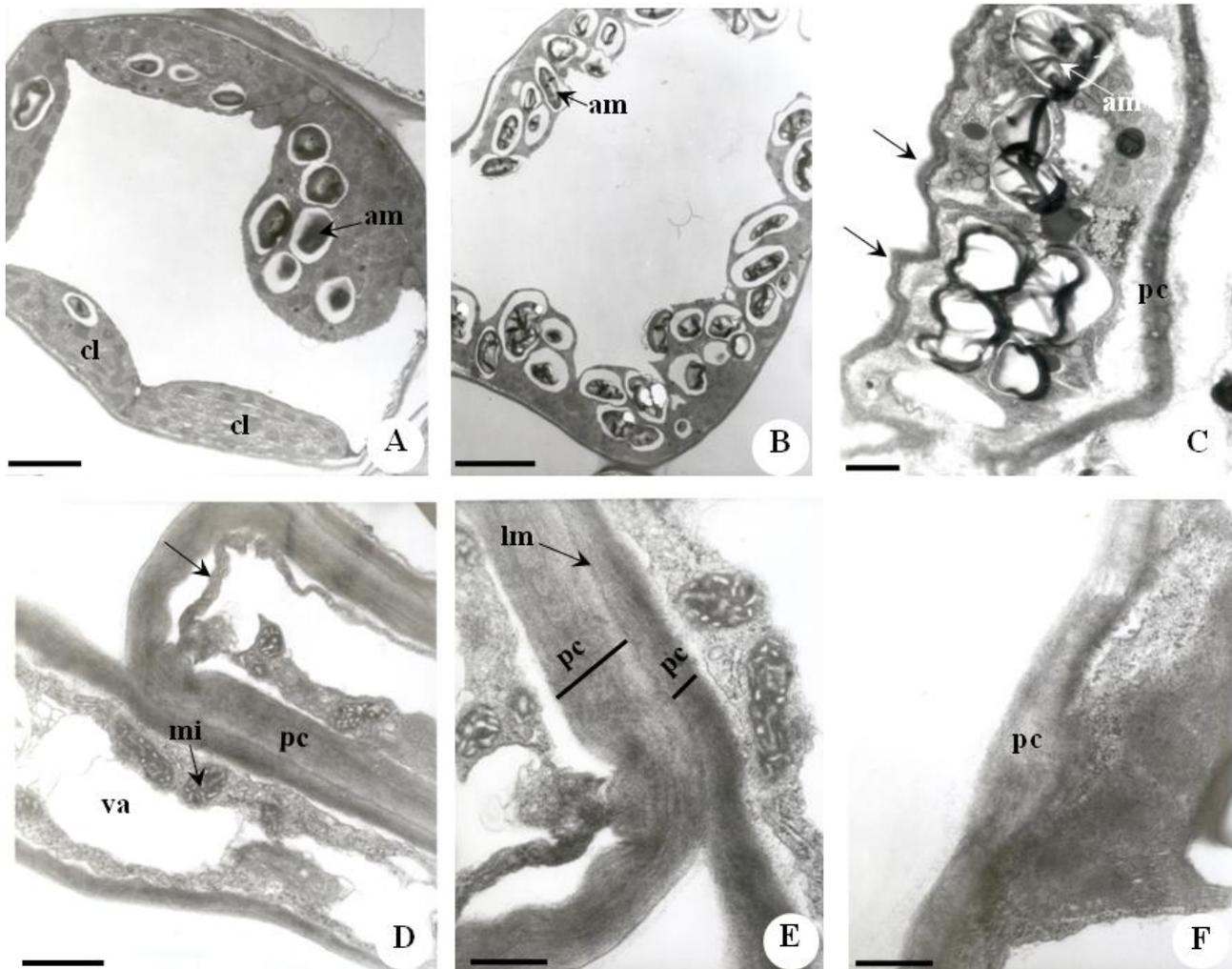


Figura 11. Elétronmicrografias de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio na campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Célula do parênquima lacunoso do material de referente à situação inicial com cloroplastos (cl) e grãos de amido (am) com aspecto característico. B – F. Plantas assintomáticas expostas em ambiente contaminado com ozônio. B. Célula do parênquima lacunoso. Notar a presença de numerosos grãos de amido (am). C. Célula do parênquima lacunoso com sinuosidade acentuada (setas) na parede celular (pc) e alteração no formato dos grãos de amido (am). D. Retração do citoplasma na célula paliádica (seta), vacuoma (va) e mitocôndrias elétrondensas (mi). E. Célula parenquimática com espessamento da parede (pc). F. Detalhe do espessamento da parede celular (pc). lm = lamela média. (A, C. barras = 2 μm ; B. barra = 5 μm ; D. barra = 1 μm ; E – F. barras = 0,5 μm).

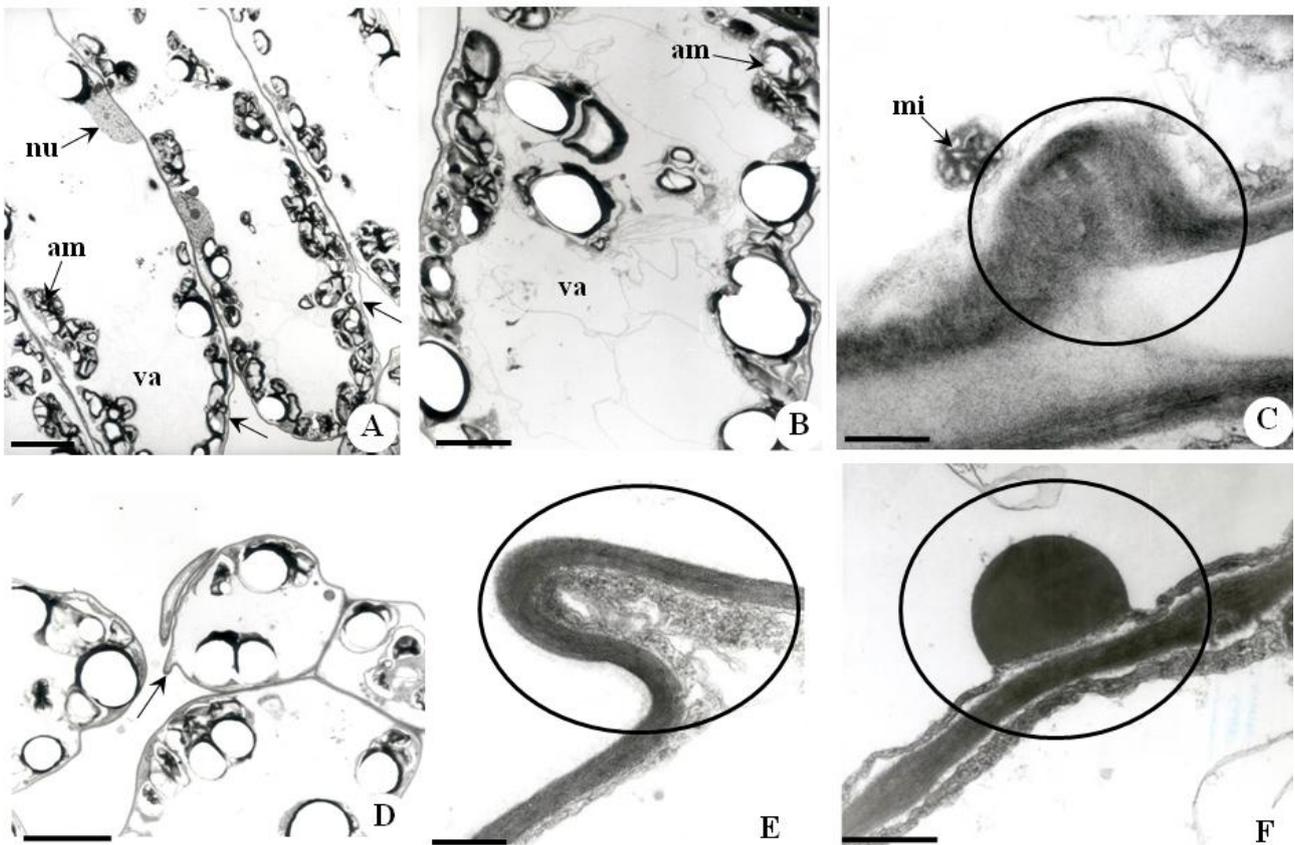


Figura 12. Elétronmicrografias de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio na campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Células do parênquima paliçádico com sinuosidades na parede celular (seta), degradação do amido (am) e vacúolos desenvolvidos (va). B. Detalhe dos vacúolos (va) e do amido (am). C. Início da formação de protrusão em célula do parênquima lacunoso e uma mitocôndria (mi) elétron-densa. D. Célula do parênquima lacunoso com projeção na parede (seta). E. Detalhe da projeção. F. Protrusão; notar o espessamento da parede celular. (A. barra = 10 μm ; B, D. barra = 5 μm ; C, E. = 0,5 μm ; F. barra = 1 μm).

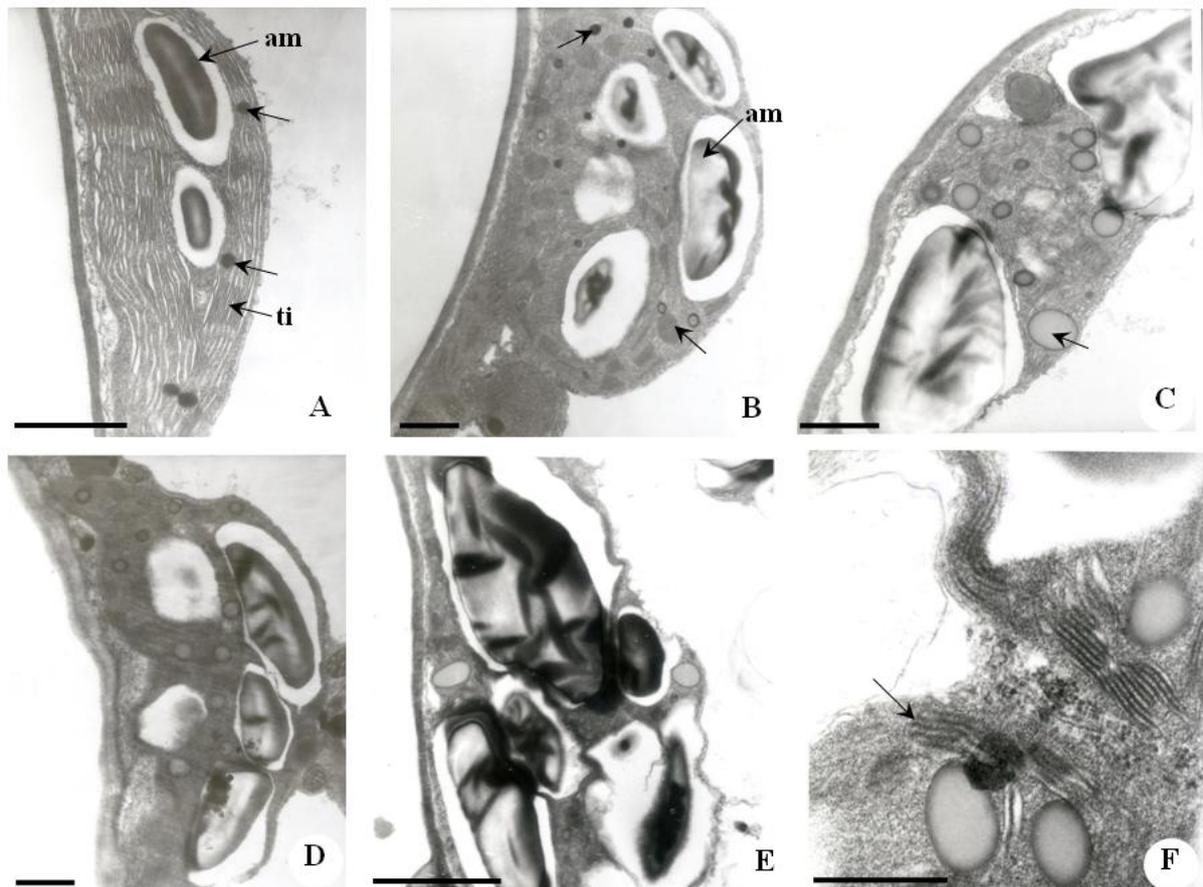


Figura 13. Elétronmicrografias de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ expostas em ambiente contaminado por ozônio na campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Material de referente a situação inicial mostrando cloroplasto com aspecto elíptico, com tilacóides organizados (ti), grãos de amido (am) e plastoglóbulos (setas) do tecido paliçádico. B – F. Cloroplastos do tecido paliçádico de plantas expostas em ambiente contaminado com ozônio. B. Cloroplasto intumescido com abundância de grãos de amido e de plastoglóbulos. C. Presença de grãos de amido e plastoglóbulos de coloração clara com conteúdo lipídico (seta). D. Deformação do cloroplasto. E. Alteração no formato dos grãos de amido quando comparado ao material da situação inicial. F. Detalhe da intumescência dos tilacóides (seta). (A – E. barras = 1 μm ; F. barra = 0,5 μm).

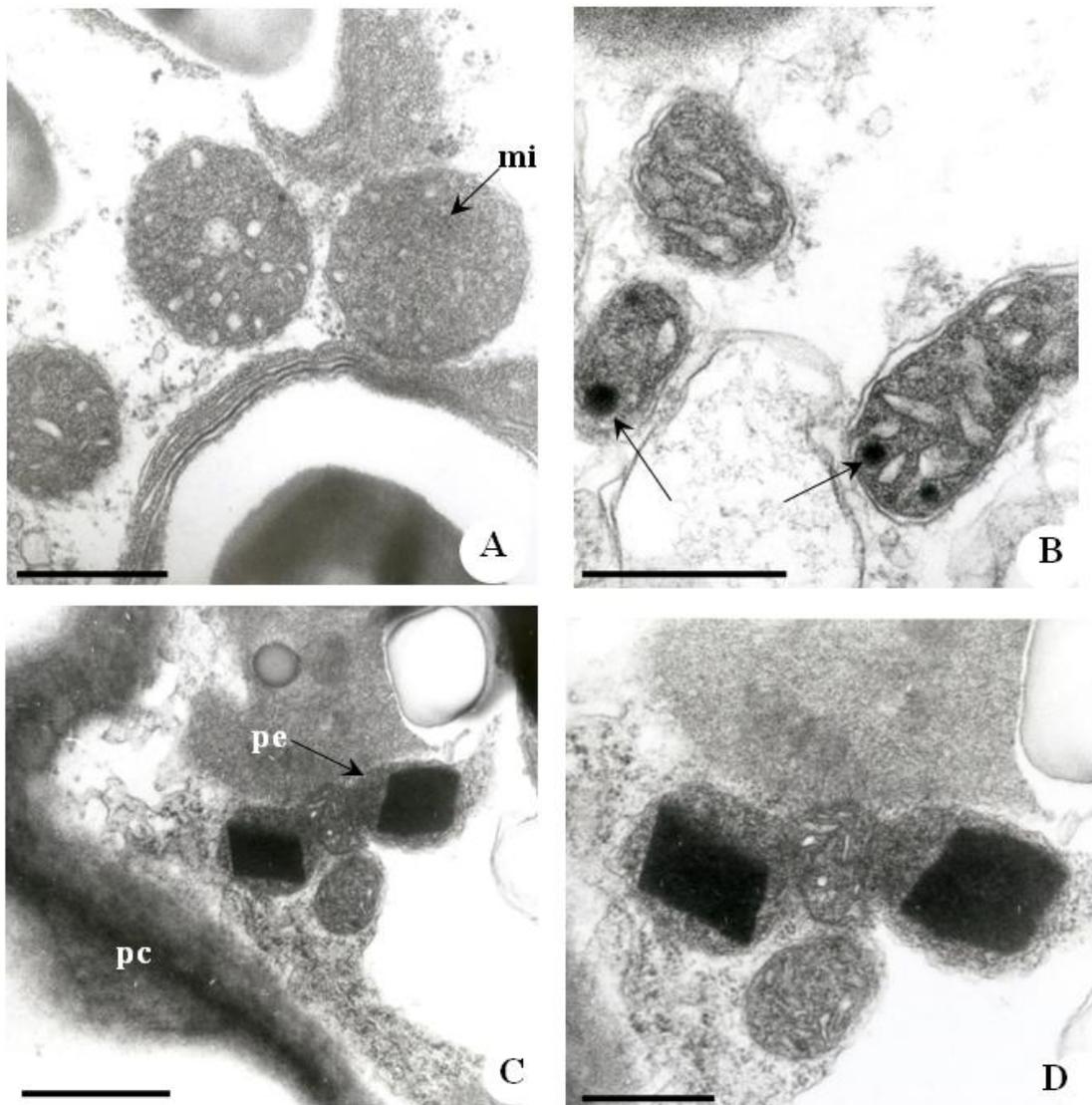


Figura 14. Elétronmicrografias de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio na campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Material de referente a situação inicial apresentando mitocôndrias com aspecto usual (mi). B – D. Material exposto em ambiente contaminado com ozônio. B. Alteração na forma das mitocôndrias. Notar as cristas mitocondriais dilatadas e compostos elétron-densos (seta) em seu interior. C. Espessamento da parede celular (pc) do parênquima paliçádico e presença de peroxissomos (pe). D. Detalhe da figura C destacando os cristais de catalase nos peroxissomos. (A, B, D. barra = 0,5 μm ; C. barra = 1 μm).

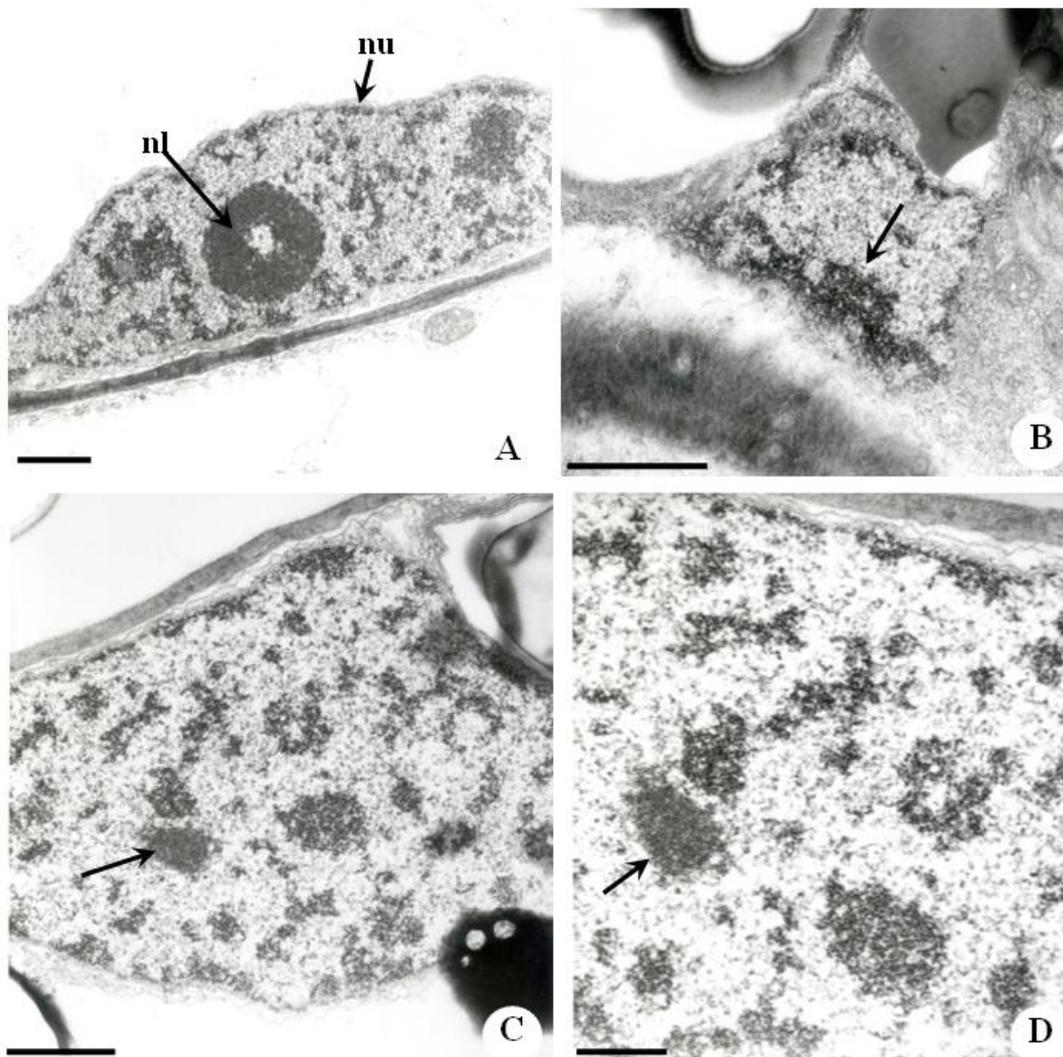


Figura 15. Elétronmicrografias de tecidos assintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio na campanha correspondente ao período da primavera de 2007. A. Núcleo irregular (nu) e nucléolo esférico (nl). B – D. Condensação da cromatina (setas). (A – C. barras = 1 μm ; D. barra = 0,5 μm).

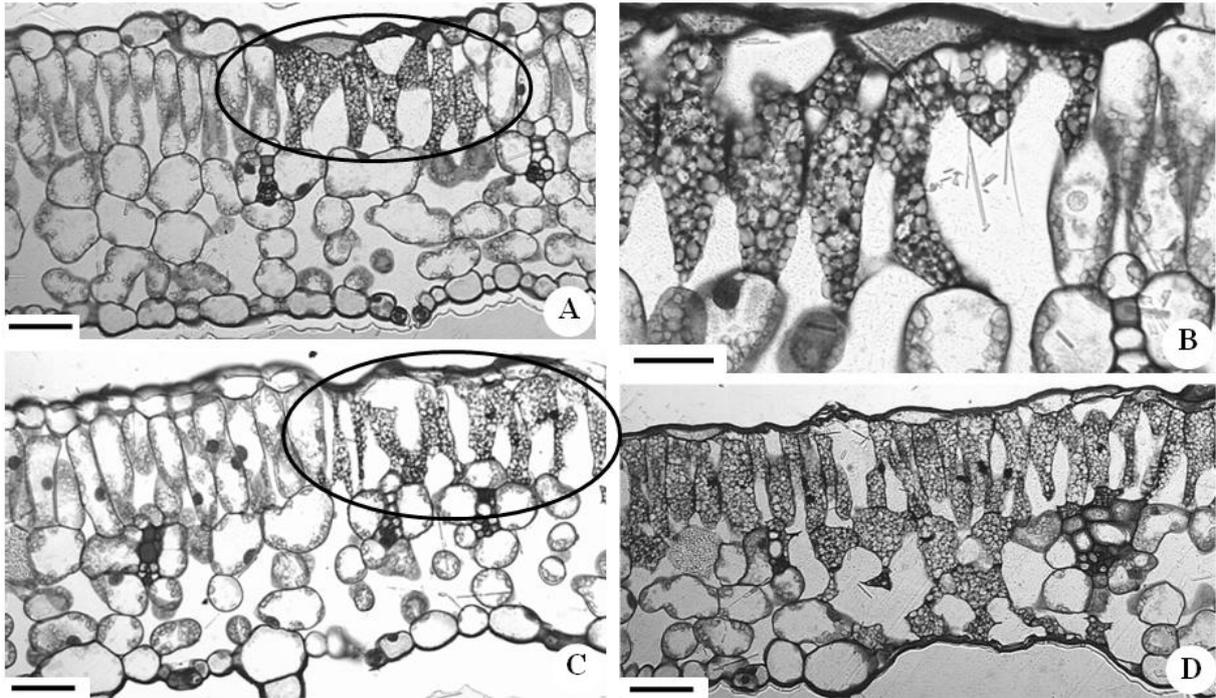


Figura 16. Fotomicrografias de secções transversais de tecidos sintomáticos de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio após 14 dias de exposição na campanha correspondente ao inverno de 2008. A – D. Grupo de células mortas no parênquima paliádico evidenciando resposta semelhante à hipersensibilidade (HR-like) decorrente de estresse oxidativo (elipses). D. Células do mesofilo em estágio avançado de dano. (A, C – D. barras = 50 μm ; B. barra = 25 μm).

3.3. *Análises estruturais em microscopia de epifluorescência*

Nas plantas mantidas em casa de vegetação, observou-se que a autofluorescência dos cloroplastos foi similar e intensa nas células do parênquima paliçádico e lacunoso e estes se mostraram íntegros. (Figuras 17A e 17C). Contudo, após três dias de exposição, apesar da ausência de sintomas visíveis, nas plantas mantidas no ambiente, observou-se diminuição na intensidade da fluorescência emitida pelos cloroplastos, evidenciada pela coloração vermelha mais fraca (Figura 17B) e deformações na forma dos mesmos (Figura 17D).

Após 10 dias de exposição na campanha que corresponde ao verão de 2008, notou-se uma acentuada diminuição na intensidade da coloração vermelha emitida pelos cloroplastos (Figuras 18A – 18B) e, em algumas regiões do parênquima paliçádico, foi possível observar mudança na coloração, que passou de vermelha para amarela (Figuras 18C – 18D), indicando alteração na capacidade fotossintética das plantas. Nessas mesmas áreas, pode-se observar a deformação dos cloroplastos (Figura 18D).

Não foi detectada a presença de calose no material de referência (Figura 19A) e nem tampouco nas folhas assintomáticas e sintomáticas de tabaco, ao longo de todo o período experimental (Figura 19B).

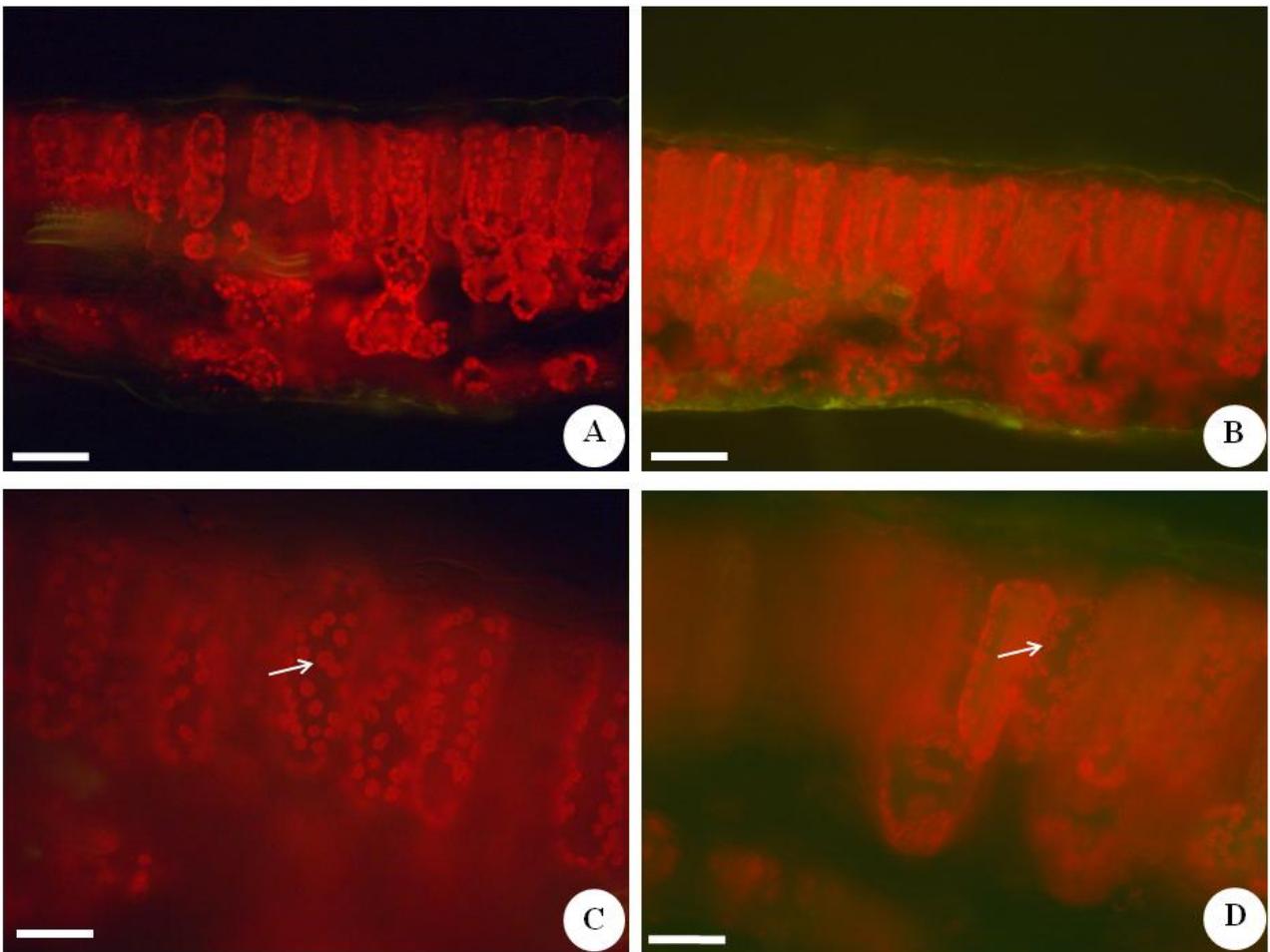


Figura 17. Fotomicrografias de secções transversais da folha de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ mostrando autofluorescência dos cloroplastos em microscopia de epifluorescência (450–490 nm). A e C. Material referente ao tempo zero. A. Fluorescência primária dos cloroplastos no mesofilo. C. Detalhe dos cloroplastos íntegros (seta). B e D. Plantas assintomáticas coletadas após três dias de exposição em ambiente com ozônio na campanha experimental correspondentente ao verão de 2008. B. Diminuição na intensidade da fluorescência dos cloroplastos no mesofilo. D. Detalhe da alteração na forma dos cloroplastos (seta). (A – B. barras = 100 μm ; C – D. barras = 50 μm).

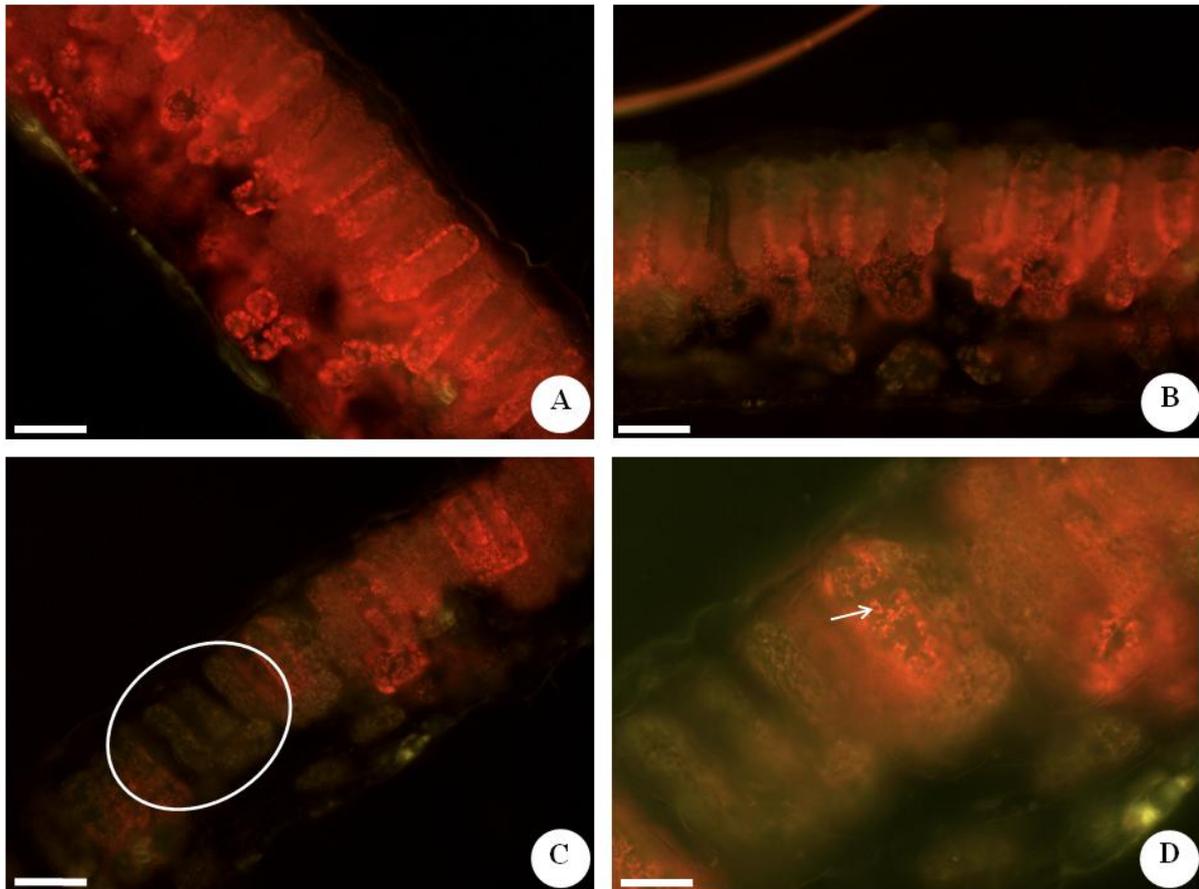


Figura 18. Fotomicrografias de secções transversais da folha de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ mostrando autofluorescência dos cloroplastos em microscopia de epifluorescência (450–490 nm). A – D. Plantas assintomáticas coletadas após 10 dias de exposição em ambiente com ozônio na campanha experimental correspondente ao verão de 2008. B. Notar uma significativa diminuição na intensidade da fluorescência primária dos cloroplastos no mesofilo e alteração na sua forma (seta). C – D. C. A região amarelada corresponde aos locais onde houve perda da clorofila (elipse). D. Detalhe da figura anterior. (A – C. barras = 100 μm ; D. barra = 50 μm).

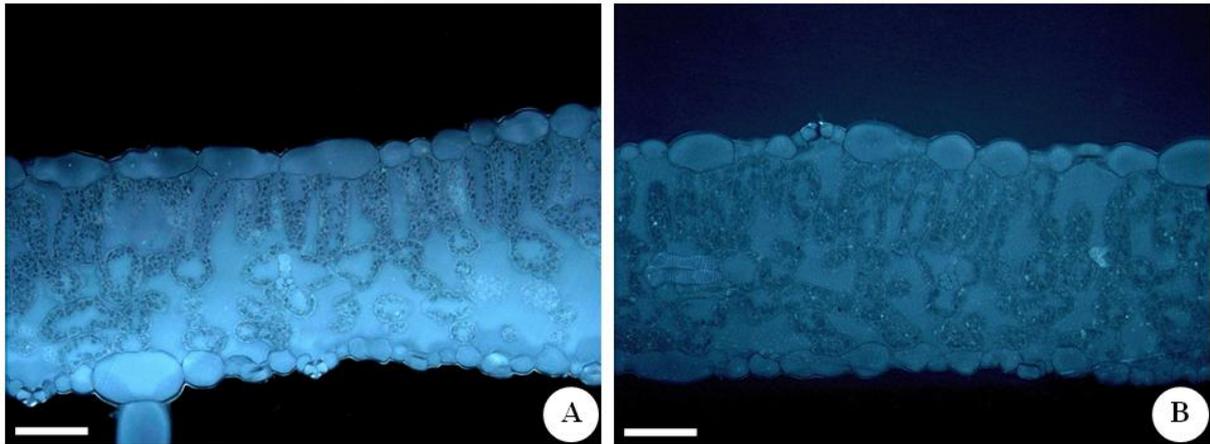


Figura 19. Fotomicrografias de secções transversais de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' coradas com azul de anilina (excitação UV, no comprimento de onda entre 350–390 nm) para fluorescência de calose. A. Material referente ao tempo zero. B. Plantas com tecidos assintomáticos coletadas após 10 dias de exposição em ambiente com ozônio no período correspondente à primavera de 2008. Notar ausência de calose nos dois tratamentos. (barras = 100 μ m).

3.4. Análises histoquímicas

3.4.1. Acúmulo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Como se viu em Material & métodos, ao longo de todo o período experimental, iniciado em 08/10/2007 e finalizado em 22/12/08, no qual plantas de *Nicotiana tabacum* Bel W3 foram expostas de forma padronizada em ambiente sujeito ao ozônio na cidade de São Paulo, foram realizadas cinco campanhas experimentais, que somaram 21 exposições de 14 dias. Durante esse período, foram realizadas 61 coletas (seis plantas por coleta e oito amostras por planta, quatro amostras da folha 6 e quatro da folha 7) e as datas das coletas foram determinadas por sorteio, distribuindo-se do primeiro até o 14º dia de exposição. Quando se considera o acúmulo de peróxido de hidrogênio nessas plantas, verifica-se que em todas as coletas, dentre as seis plantas analisadas, pelo menos uma apresentou acúmulo evidenciado pela coloração marrom escuro observada em diferentes tecidos foliares e, em três campanhas, mais da metade das plantas coletadas mostraram esse acúmulo. (Figura 20).

A determinação do acúmulo foi realizada por comparação com o material controle, que é obtido quando se adiciona ácido ascórbico ao DAB; o ácido ascórbico neutraliza o peróxido de hidrogênio, portanto o material não apresentará células com a coloração marrom, indicativa da presença de peróxido de hidrogênio (Figura 21). Nas demais amostras foi possível detectar, em todas as campanhas experimentais, a presença do precipitado marrom, depositado em todos os tecidos foliares, principalmente naqueles próximos aos estômatos e, também, nos cloroplastos de células do parênquima paliçádico circundantes da cavidade subestomática (Figuras 21B – 21F). Cabe destacar que esse acúmulo foi encontrado em grupos de células espalhados no material amostrado e que algumas células ficaram fortemente coradas. Além disso, em todas as campanhas as células do parênquima paliçádico foram aquelas onde a localização do peróxido de hidrogênio foi mais frequente (Figura 22).

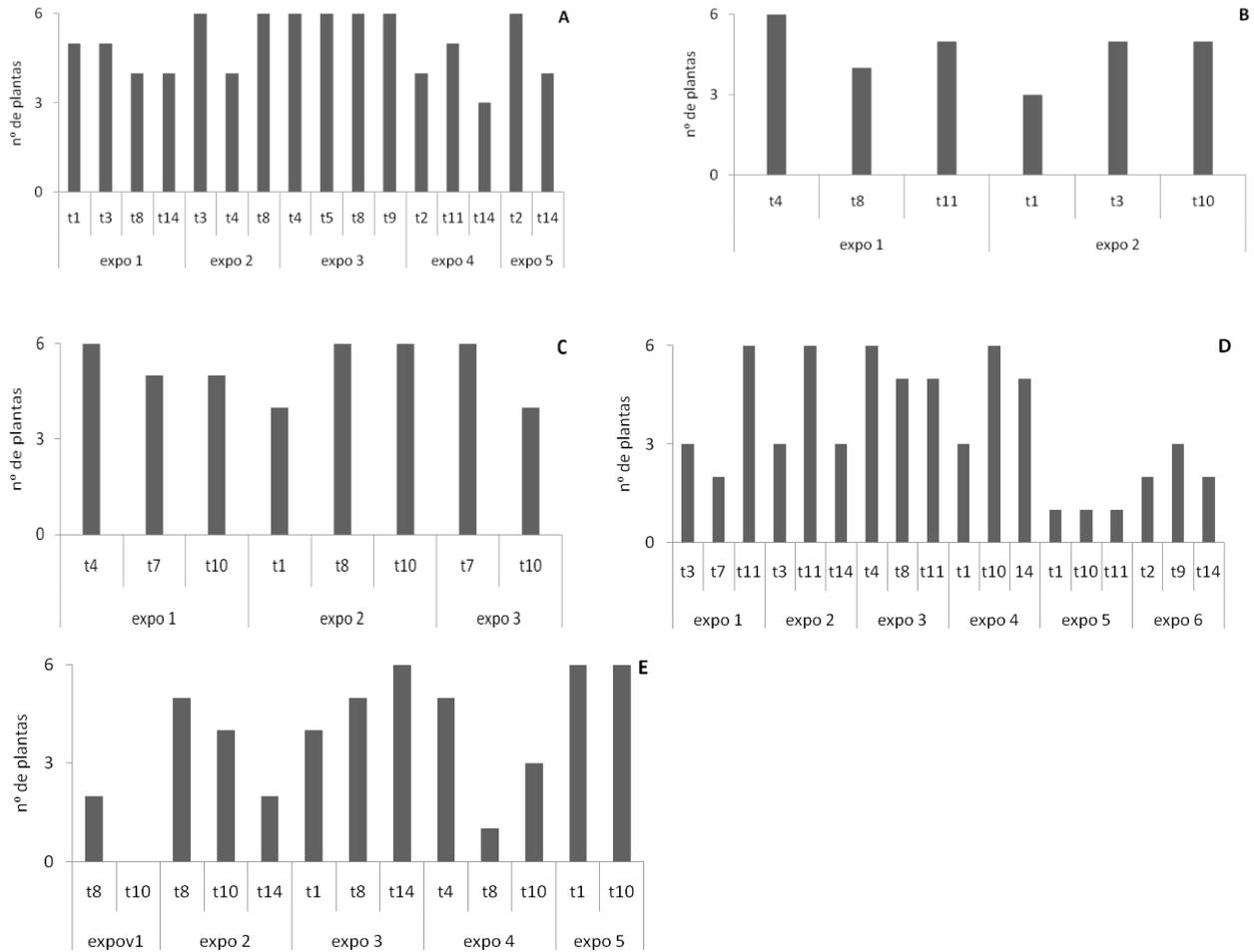


Figura 20. Número de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em ambiente contaminado por ozônio que apresentaram acúmulo de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) ao longo das campanhas experimentais (t1 = 1 dia de exposição, t2 = 2 dias de exposição e assim sucessivamente) A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08).

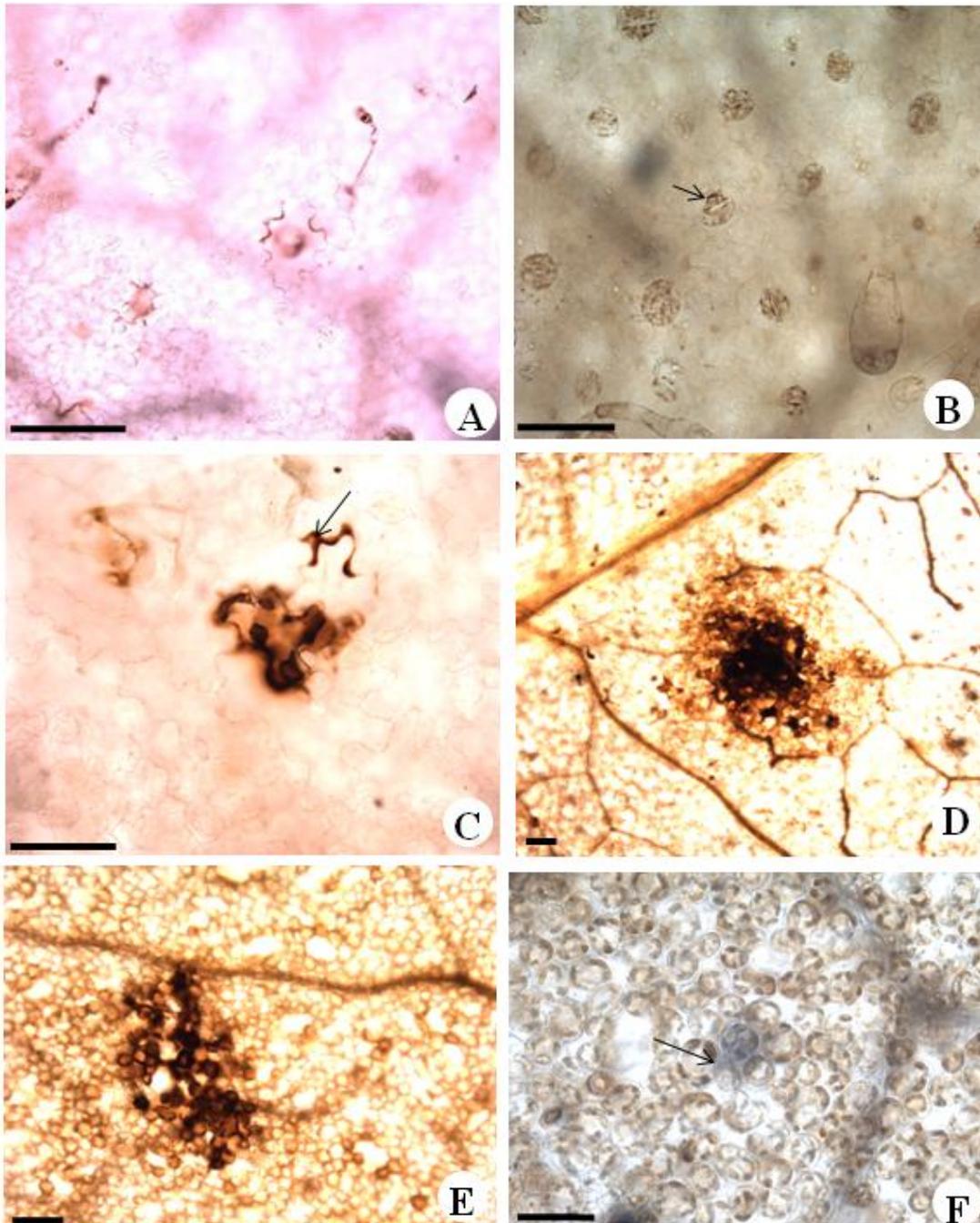


Figura 21. Fotomicrografias de secções paradérmicas de folhas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' tratadas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) que marca em marrom escuro a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A. Controle negativo - solução de DAB acrescida de 10 mM de ácido ascórbico. B. Presença de H_2O_2 nos estômatos (es). C. Acúmulo de H_2O_2 nas células epidérmicas da superfície adaxial (seta). D. Acúmulo de H_2O_2 nas células do parênquima lacunoso. E. Acúmulo de H_2O_2 nas células do parênquima paliçádico. F. Presença de H_2O_2 nos cloroplastos do parênquima paliçádico (seta). (A – E. barras = 100 μ m; F = barra = 50 μ m).

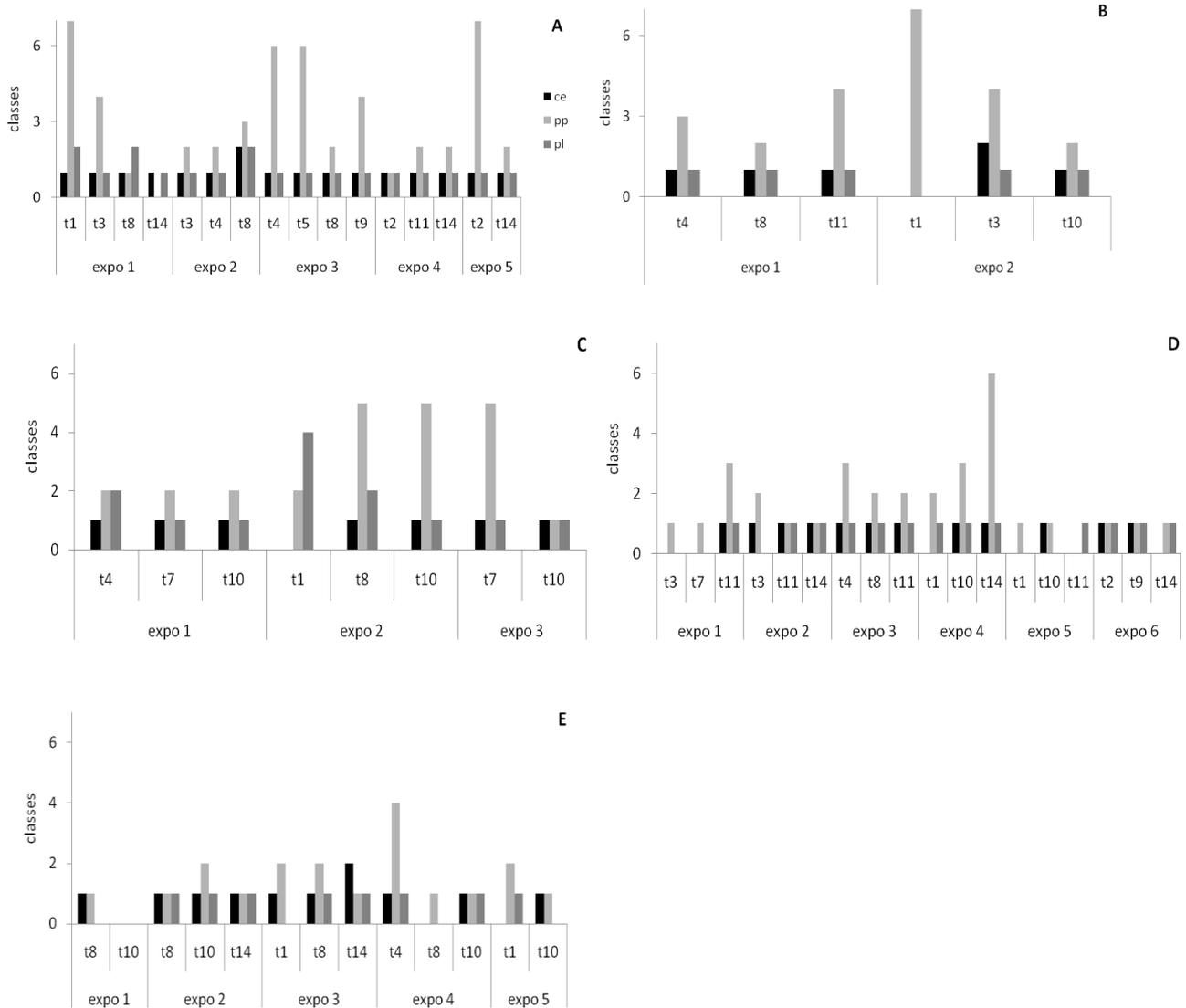


Figura 22. Número de células, distribuídas em classes (1 = 1 – 5 células; 2 = 6 – 10 células; 3 = 11 – 15 células; 4 = 16 – 20 células; 5 = 21 – 25 células; 6 = 26 – 30 células e 7 = mais de 31 células), e localização de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) acumulado em diferentes tecidos de folhas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' ao longo das campanhas experimentais (t1 = 1 dia de exposição, t2 = 2 dias de exposição e assim sucessivamente) ce = células epidérmicas. pp = parênquima paliçádico, pl = parênquima lacunoso. A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08).

3.4.2. Detecção da morte celular

Para avaliar a presença de células mortas em folhas de *N. tabacum* 'Bel-W3' foi considerada a mesma amostragem utilizada na análise do acúmulo de peróxido de hidrogênio, ou seja, foram realizadas cinco campanhas, 21 exposições de 14 dias e 61 coletas de seis plantas e oito amostras por planta, em cada coleta. A morte celular foi evidenciada por meio do corante azul de Evans e observada antes do aparecimento dos sintomas visíveis. As células saudáveis permanecem transparentes e as células mortas apresentaram coloração azul (Figura 23).

Durante todo o período experimental, foram observadas células mortas em pequenos grupos, distribuídos por todo o tecido foliar, mas, principalmente, no parênquima paliçádico (Figuras 23B e 23E – 23F). Os estômatos também apresentaram coloração azul e as células ao redor da cavidade subestomática ficaram coradas em azul intenso (Figuras 23D – 23F). Na campanha experimental IV, correspondente ao inverno de 2008 e às maiores concentrações de AOT20 (Figura 6), foi observada a maior quantidade de plantas com células mortas (Figura 24 D). A morte celular também foi observada nas plantas expostas durante as demais campanhas (Figura 24 A-E) sendo os menores valores registrados na campanha experimental correspondente ao período do outono de 2008, com baixos valores de AOT20 (Figura 6) Além do número de plantas, avaliou-se também o número de células mortas/área e esses dados foram tratados estatisticamente. Nas campanhas correspondentes ao inverno e primavera de 2008 foram observadas cerca de 120 células mortas numa área de 0,2 mm², valor cerca de 4,5 vezes maior que aquele observado na campanha que corresponde ao outono (Figura 25), quando a AOT20 foi baixa. Na exposição 1 das campanhas da primavera 2007 e verão 2008, observou-se um aumento significativo no número de células mortas ao longo do tempo, enquanto que nas demais exposições essa progressão não foi observada. Nas coletas realizadas ao final de cada exposição sempre foram observadas células mortas, o que nem sempre ocorreu nas coletas realizadas no início das exposições (Figura 24A, C e E).

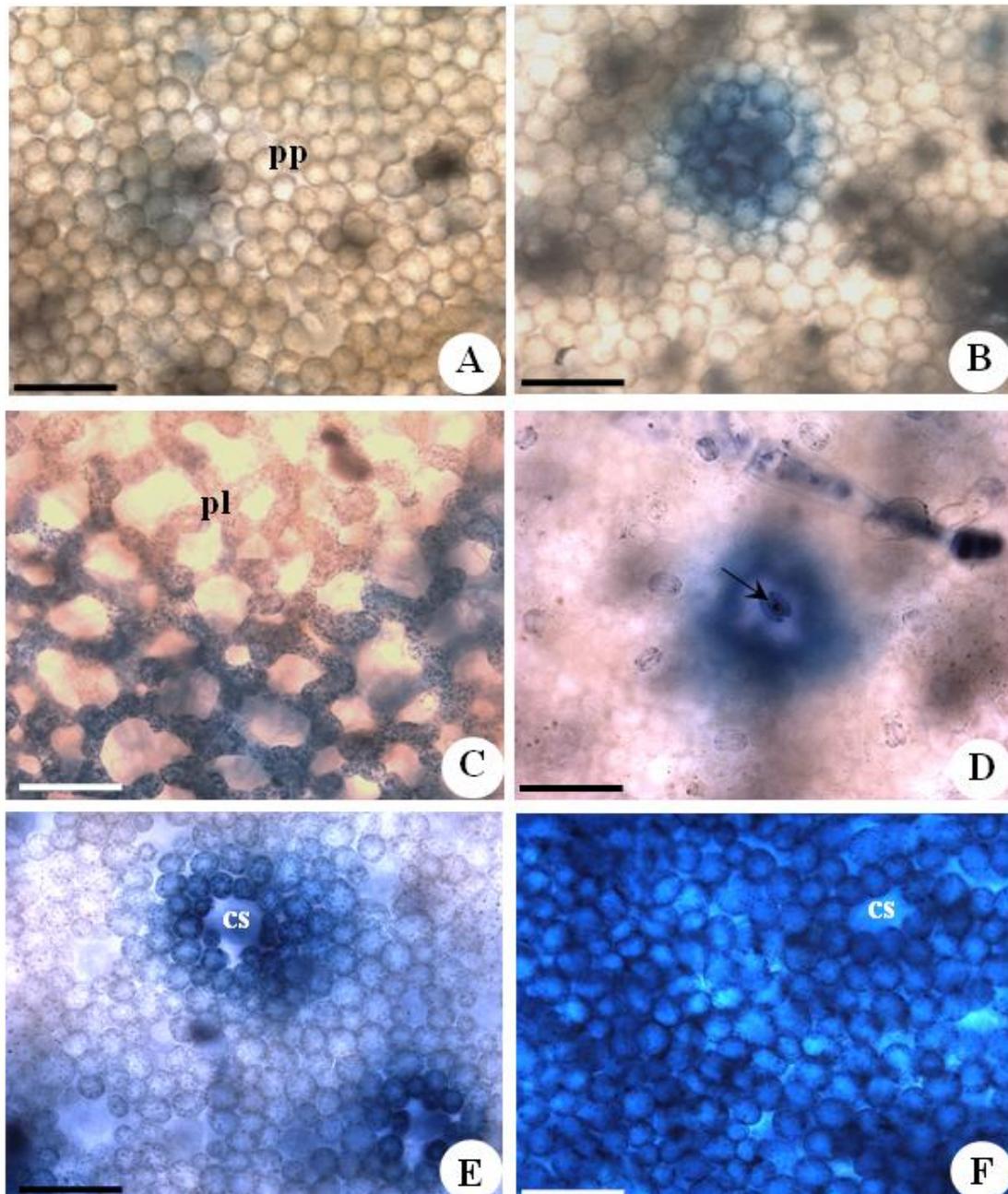


Figura 23. Fotomicrografias de seções paradérmicas de folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ expostas em ambiente submetido ao ozônio. Caracterização e localização das células mortas com o corante azul de Evans. A. Material referente ao tempo zero com células do parênquima paliçádico (pp) sadias. Nota: O que se observa em azul nesta figura corresponde a tricomas da superfície abaxial vistos por transparência e danificados durante o processamento do material, situação diferente daquelas indicada nas demais figuras que destacam as células mortas presentes no mesofilo. B. Grupo de células mortas no parênquima paliçádico. C. Células mortas no parênquima lacunoso. D. Estômato (seta) não funcional corado em azul. E. Células mortas ao redor da cavidade subestomática (cs). F. Morte celular generalizada no parênquima paliçádico na campanha que corresponde ao inverno de 2008. (barras = 100 μ m).

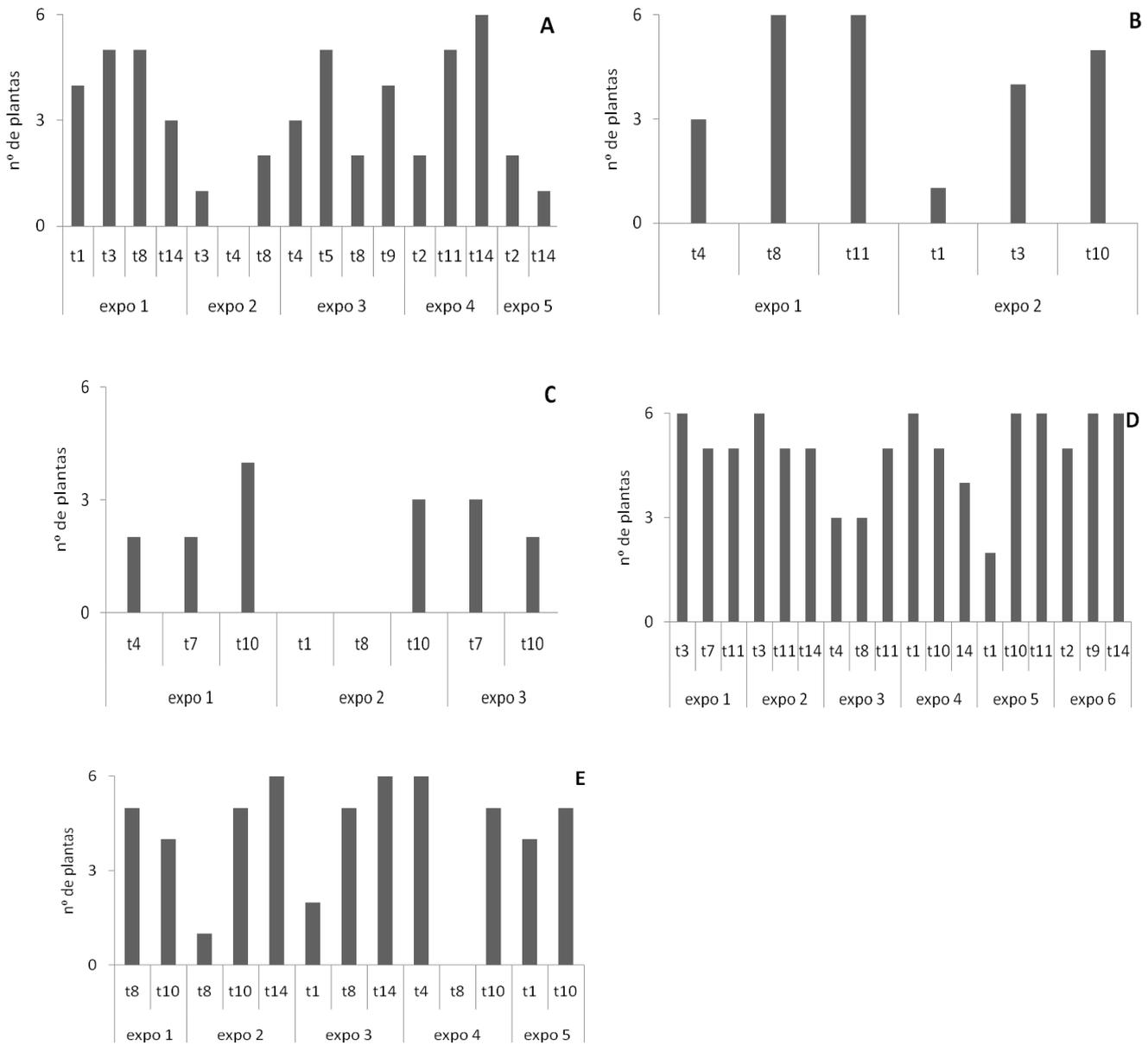


Figura 24. Número de plantas que apresentaram morte celular em folhas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em São Paulo, durante as campanhas experimentais ao longo dos tempos de exposição (t1 = 1 dia de exposição, t2 = 2 dias de exposição e assim sucessivamente). A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08).

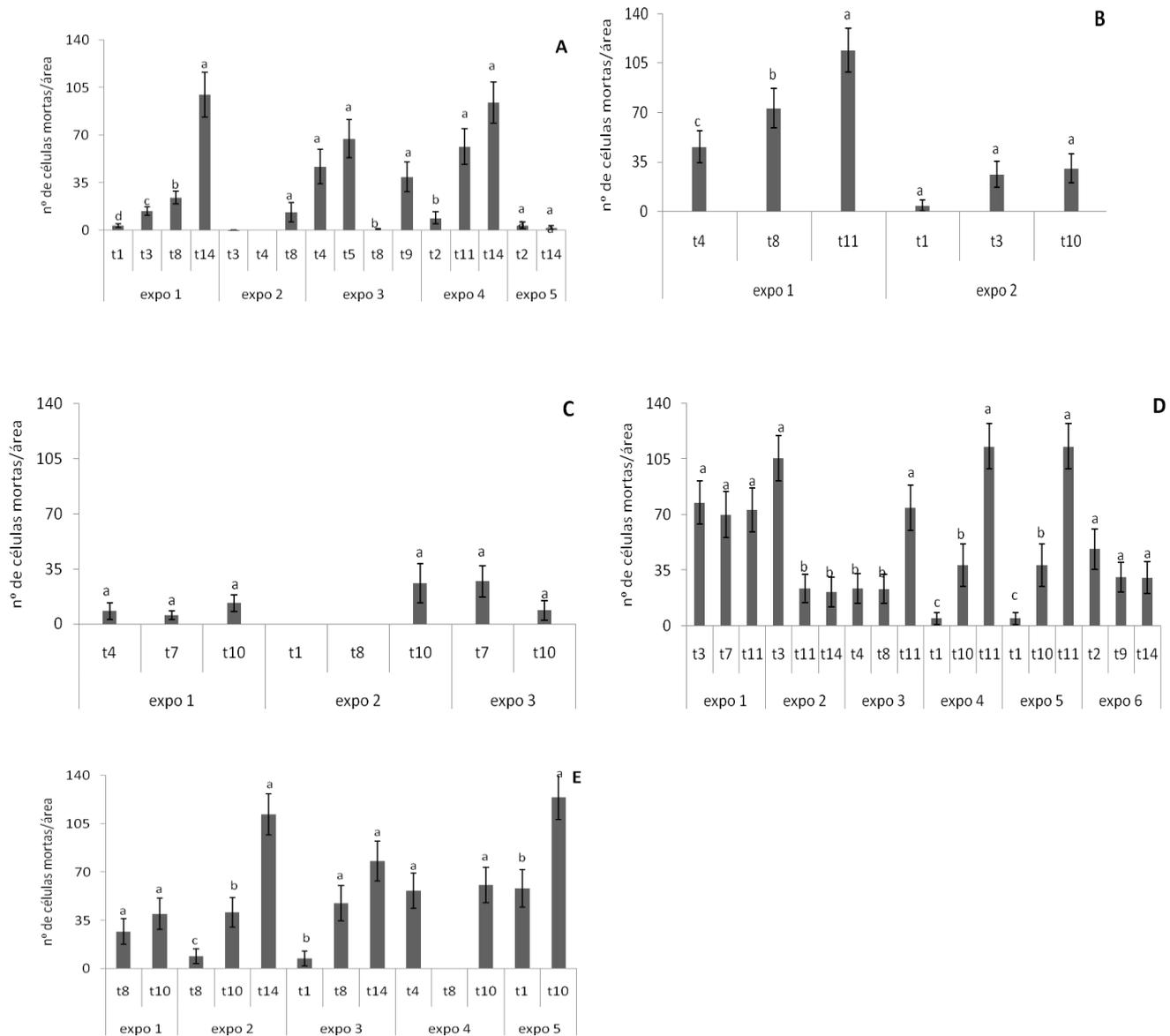


Figura 25. Valores médios (e erro-padrão) de células mortas em folhas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em São Paulo, durante as campanhas experimentais ao longo do tempo de exposição (t1 = 1 dia de exposição, t2 = 2 dias de exposição e assim sucessivamente). A. Primavera 2007 (08/10/07 – 17/12/07). B. Verão 2008 (10/03/08 – 07/04/08). C. Outono 2008 (07/04/08 – 23/06/08). D. Inverno 2008 (14/07/08 – 06/10/08). E. Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tempos dentro de cada exposição.

3.4.3. Correlações entre o acúmulo de H_2O_2 e a morte celular e as variáveis ambientais

Na tabela 2 são apresentados os valores do coeficiente de correlação de Pearson e o grau de significância entre o acúmulo do peróxido de hidrogênio e a morte celular as variáveis: temperatura, umidade, radiação global e AOT20 nas plantas de *N. tabacum* 'Bel-W3' durante todo o período experimental.

Tabela 3. Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e grau de significância (p) entre as variáveis meteorológicas: temperatura ($^{\circ}C$), umidade (%) e radiação global ($W m^2$), a AOT20 (valor acumulado acima de 20 ppb de ozônio), acúmulo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (n $^{\circ}$ de células com precipitado marrom/área) e morte celular (n $^{\circ}$ de células mortas/área) em folhas de *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' expostas em São Paulo durante todo o período experimental.

		AOT20	Temperatura	Umidade	Radiação
H_2O_2	r	0,043	0,256	0,101	0,048
	p	0,753	0,047	0,401	0,752
Morte celular	r	0,386	0,129	0,246	0,194
	p	0,004	0,328	0,057	0,206

As análises de regressão revelaram uma correlação positiva regular entre a morte celular e a AOT20, e o acúmulo do peróxido de hidrogênio com a temperatura (Tabela 3 e Figuras 26 e 27).

Quando se relacionou os dados de morte celular e AOT20, considerando separadamente as cinco campanhas experimentais, foram observadas correlações significativas. Na Tabela 4 são apresentados os valores dos coeficientes de correlação de Pearson e na Figura 27 as análises de regressão. Durante a campanha correspondente ao período da primavera de 2008, foi obtido um valor de R^2 baixo, porém significativo.

Também foram correlacionados dados de morte celular, reunindo-se algumas das campanhas experimentais, com a AOT20 (Tabela 4 e Figura 27), obtendo-se correlações positivas com os dados das campanhas do outono/2008 e inverno/2008, e as campanhas correspondentes à primavera 2007/2008 e inverno de 2008.

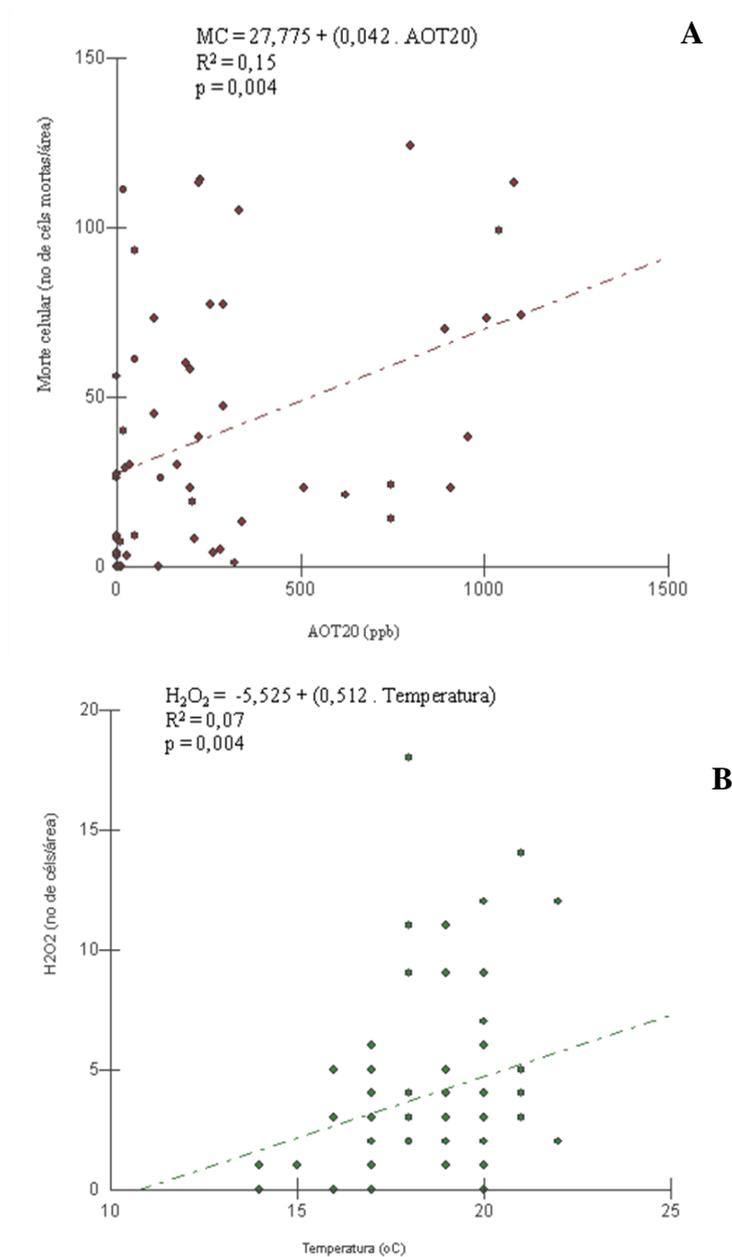


Figura 26. Correlação entre os valores médios de morte celular e AOT20 (A) e entre acúmulo do H₂O₂ e temperatura (B) em *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' exposta na cidade de São Paulo.

Tabela 4. Valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e grau de significância (p) entre morte celular (n° de células mortas/área) e AOT20 (valor acumulado acima de 20 ppb de ozônio) nas campanhas experimentais (Pri 07=Primavera 2007).

	Campanhas experimentais							
	Pri 07	Ver 08	Out 08	Inv 08	Pri 08	Pri 07/08 e Ver 08	Out/Inv 08	Pri 07/08 e Inv 08
r	0,378	0,779	0,131	0,131	0,606	0,349	0,495	0,371
p	0,224	0,067	0,752	0,228	0,034	0,055	0,013	0,017

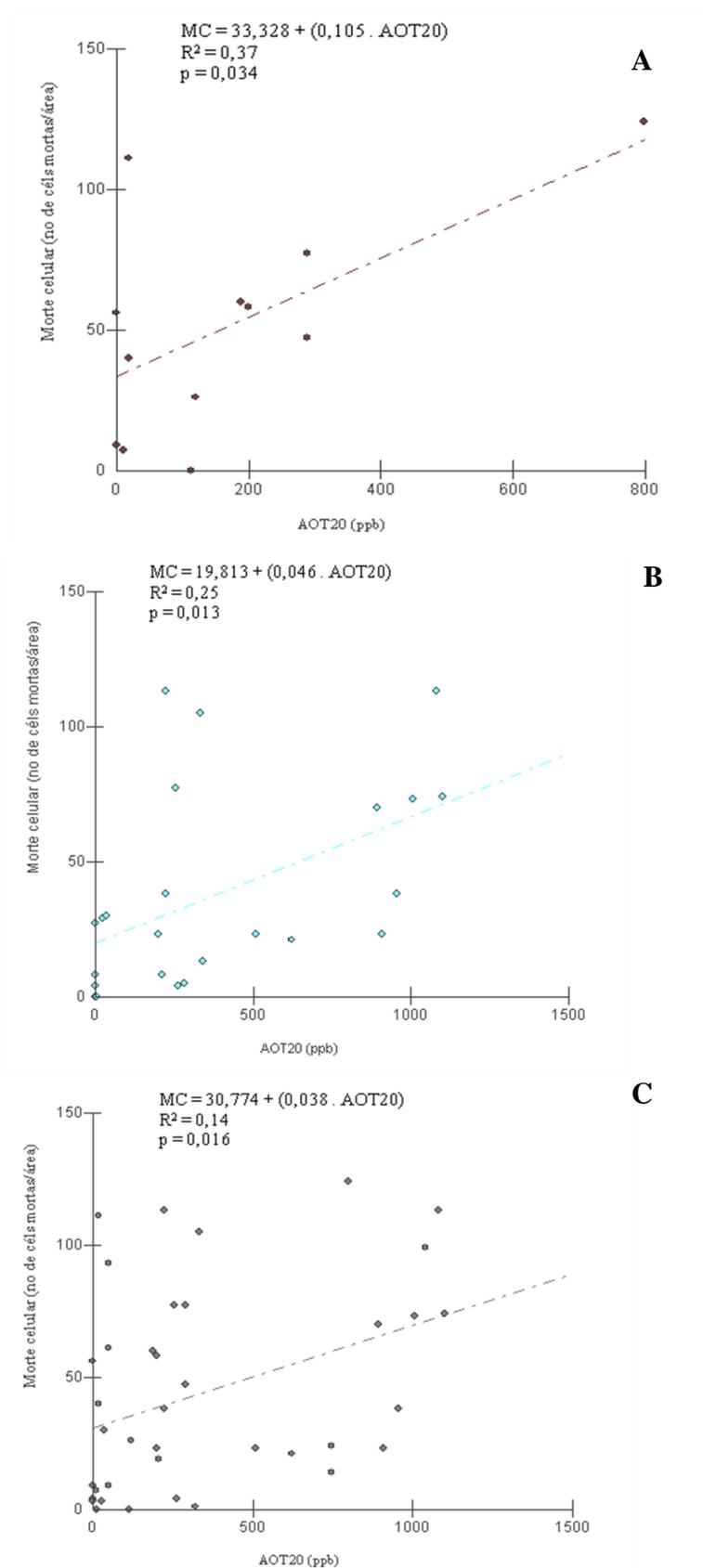


Figura 27. Correlação entre os valores médios de morte celular nas folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ expostas em São Paulo e a AOT20 durante o período experimental. (A) Campanha Primavera 2008 (13/10/08 – 22/12/08). (B). Campanhas Outono e Inverno de 2008 (07/04/08 – 23/06/08; 14/07/08 – 06/10/08). (C). Campanhas Primavera 2007/2008 e Inverno 2008 (08/10/07 – 17/12/07; 14/07/08 – 06/10/08; 13/10/08 – 22/12/08).

4. Discussão

Durante todo o período experimental foi observada no local de estudo a presença de ozônio, em maiores concentrações no inverno e na primavera, sendo que nesta estação foram constatadas também as maiores máximas de temperatura. Os efeitos da radiação foram minimizados uma vez que as plantas foram mantidas durante seu cultivo e exposição em situação de luminosidade reduzida em 50%.

O ozônio, após entrar na folha pelos estômatos, é convertido no apoplasto a espécies reativas de oxigênio – ERO (Pellinen *et al.* 1999) que iniciam uma série de eventos em cascata que alteram organelas e células. Estudos apontam que a estrutura foliar favorecem a intensificação dessas alterações (Ferdinand *et al.* 2000, Gerosa *et al.* 2003). Pedroso & Alves (2008) constataram que a cultivar estudada apresenta grandes espaços intercelulares e estômatos em ambas as superfícies da folha, provavelmente estas características contribuem para sua grande a sensibilidade ao ozônio.

Nas plantas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ expostas em ambiente contaminado com ozônio, especialmente na primavera, foram observadas em folhas assintomáticas alterações estruturais e ultraestruturais descritas na literatura como decorrentes da ação dessas ERO, dentre elas a retração do citoplasma. Tal alteração já foi descrita para a mesma cultivar por Pasqualini *et al.* (2003) quando esta foi fumigada com 150 ppb de ozônio por 5 horas durante um único dia, portanto pode representar uma resposta tanto a concentrações agudas como crônicas, situação do presente estudo.

O colapso da parede celular em células do parênquima paliçádico observado na cultivar ‘Bel-W3’ exposta em São Paulo é outra alteração estrutural frequentemente notada em plantas submetidas ao ozônio. Tal colapso também foi descrito por outros autores em plantas de região temperada. Vollenweider *et al.* (2003) observaram o mesmo em *Robinia pseudoacacia*, Paoletti *et al.* (2009) em *Fraxinus ornus*, uma espécie tolerante ao ozônio. Reig-Armiñana *et al.* (2004) notaram o colapso das paredes celulares de *Pistacia lentiscus* quando exposta a concentrações de 80

ppb de ozônio. Desta maneira pode-se afirmar que esta característica é comumente observada em espécies com diferentes graus de sensibilidade ao ozônio.

Detectou-se também em *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' exposta em São Paulo a presença de protruções nas paredes celulares nas células do parênquima lacunoso. Tais protruções são descritas como projeções de natureza péctica semelhantes a "verrugas" e consideradas respostas comuns decorrentes do estresse oxidativo (Vollenweider *et al.* 2003, Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007). De acordo com Taiz & Zieger (2004) as pectinas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose, e também estabelecem a porosidade da parede celular para as macromoléculas. Provavelmente em decorrência da formação das ERO há uma desagregação dessa rede ocasionando a peroxidação lipídica, e como consequência, as pectinas formam projeções na parede das células. Vários autores relatam sua presença em plantas de diferentes espécies submetidas ao ozônio, em câmaras de fumigação ou provenientes de ambiente contaminado por esse gás. Os muitos exemplos mostram que exposições agudas podem levar ao aparecimento de protruções indiscriminadamente nas células do mesofilo, enquanto que exposições crônicas, como a realizada neste estudo, levam ao aparecimento das mesmas apenas no parênquima lacunoso. Paoletti *et al.* (2009) constataram tais protruções em *Fraxinus ornus* fumigada com 150 ppb de ozônio (8 horas dia/7 semanas), tanto no parênquima paliçádico como no lacunoso. Reig-Armiñana *et al.* (2004) ressaltaram a presença das mesmas nas células do mesofilo de *Pistacia lenticus* quando exposta a concentrações de 80 ppb de ozônio (8 horas/7 meses). Günthardt-Goerg *et al.* (1997) fumigando com 75 ppb de ozônio (12 horas dia/8 meses) *Betula pendula* e *Populus×euramericana* notaram as protruções nas células do parênquima lacunoso no início do experimento, porém ao final da exposição, as mesmas também foram encontradas nas células do parênquima paliçádico. Vollenweider *et al.* (2003) encontraram protruções apenas no parênquima lacunoso em *Corylus avelana* coletada em ambiente contaminado com ozônio (AOT40 28,20 ppm/12 meses), o mesmo foi constatado por Vollenweider *et al.* (2003) e Bussotti *et al.* (2005) em *Viburnum lantana*. Neste estudo pode ser notado o espessamento da parede celular das células do

parênquima paliçádico. Tal espessamento provavelmente decorre do acúmulo de camadas de celulose e foi observado por Bussotti *et al.* (2005) em plantas de *Acer pseudoplatanus*, considerada uma espécie sensível ao ozônio, coletadas após quatro meses de exposição (AOT40 78.2 ppm h). Segundo os autores essa resposta resulta no aumento da resistência mecânica da célula, ou uma intensificação nos processos de desintoxicação ligados às atividades de enzimas presentes na parede.

Outra alteração na parede celular observada em plantas expostas ao ozônio é a deposição de calose entre a membrana plasmática e a parede celular. A deposição ocorre preferencialmente nas células do parênquima paliçádico (Gravano *et al.* 2003, Bussotti *et al.* 2005) e pode ser facilmente visualizada em microscopia de epifluorescência, quando se utiliza o corante azul de anilina (O'Brien & McCully 1981). Ljubešić & Britvec (2006) encontraram depósitos de calose em células do parênquima lacunoso, geralmente próximos aos espaços intercelulares, em *Vitis vinifera*. Gravano *et al.* (2003) citam a deposição de calose ao redor de células injuriadas em *Ailanthus altissima*; o mesmo foi observado por Gravano *et al.* (2004) em células colapsadas do parênquima paliçádico de folhas de *Fraxinus excelsior* e *Viburnum lantana*. Os autores informam que o depósito de calose forma uma camada protetora que isola células injuriadas das sadias, numa resposta semelhante a que ocorre em plantas afetadas por patógenos (Agrios 2005). Pasqualini *et al.* (2003) observaram o acúmulo de calose na cultivar 'Bel-W3' de tabaco nas áreas com lesões típicas de ozônio, contudo no presente estudo não foi observada a presença desse polissacarídeo em folhas com e sem sintomas visíveis, provavelmente a cultivar não apresentou esta resposta metabólica decorrente do estresse ocasionado pelo ozônio. Entretanto, futuras análises serão realizadas para confirmar tal hipótese.

Há consenso na literatura que as alterações estruturais observadas em plantas submetidas ao ozônio ocorrem preferencialmente no mesófilo, portanto nas regiões intervenais da folha; dessa forma, a estrutura dos tecidos vasculares permanece inalterada (Vollenweider *et al.* 2003), situação observada no presente trabalho. Contudo observações recentes em *Psidium guajava* mostraram que

células companheiras do floema de plantas submetidas a ambiente poluído, principalmente por ozônio, apresentaram alterações quando comparadas com aquelas de plantas mantidas em ambiente isento de poluentes (Tresmondi, comunicação pessoal). No xilema, Pedroso (2006) constatou maior agrupamento dos elementos de vaso da nervura principal de *N. tabacum* em plantas mantidas em ambiente contaminado com ozônio na cidade de São Paulo. Maior agrupamento de vasos é uma resposta observada em plantas submetidas a fatores de estresse, entre eles a poluição (Alves 1995).

Em nível ultraestrutural, as organelas mais afetadas por poluentes como o ozônio são principalmente os cloroplastos e as mitocôndrias, uma vez que as cadeias transportadoras de elétrons existentes em seu interior são alvo das ERO (Bray *et al.* 2000). Neste estudo os cloroplastos apresentaram alterações em seu formato, intumescimento dos tilacóides, aumento da elétrondensidade do estroma, aumento na quantidade de amido e de plastoglóbulos.

Alguns estudos indicam que estas alterações ocorrem tanto em plantas fumigadas, quanto naquelas expostas em ambiente contaminado por ozônio. Loreto *et al.* (2001) fumigando a cultivar 'Bel-W3' de tabaco com 300 ppb de ozônio (3 horas/1 dia) observaram a redução das membranas dos tilacóides e seu desempilhamento, ocasionando a expansão do cloroplasto que assumiu um formato arredondado. Ljubešić & Britvec (2006) relataram um aumento na elétrondensidade das organelas em geral, incluindo os cloroplastos, em *Vitis vinifera* quando fumigada com 50 mm³ de ozônio (7 horas/5 dias).

Em plantas coletadas em ambiente sujeito ao ozônio, portanto exposições crônicas a este gás, igualmente foram encontradas alterações em cloroplastos. Gravano *et al.* (2003) observaram em *Ailanthus altissima* coletada em ambiente com ozônio (AOT40 de 30.900 ppb h/3 meses), mudança no formato dos cloroplastos devido ao intumescimento dos tilacóides, presença de numerosos plastoglóbulos e grandes grãos de amido, principalmente nas células do parênquima paliçádico, além do aumento na elétrondensidade do estroma. Gravano *et al.* (2004) notaram respostas similares em folhas de *Fraxinus excelsior*, *Viburnum lantana* e *Prunus avium* expostos em câmara não filtrada sujeita a AOT40 de 20.276 ppb h/3 meses. As mesmas alterações foram

observadas por Soda *et al.* (2000) em acículas sintomáticas de *Pinus halepensis* com AOT40 de 20.000 ppb h/5meses.

Os danos nos cloroplastos decorrentes do estresse oxidativo refletem diretamente na eficiência da fotossíntese (Heath 1994). De acordo com Oliveira (2005), as membranas dos tilacóides contêm moléculas de clorofila que atuam como “sondas” intrínsecas de fluorescência, cujo padrão de emissão é um sensível indicador da integridade dessas membranas. Mudanças na intensidade da emissão da fluorescência da clorofila *a* podem indicar precocemente os danos visíveis (Guidi *et al.* 1997), sendo consideradas bom instrumento para avaliação dos sintomas decorrentes do ozônio.

Neste estudo observou-se, em microscopia de epifluorescência, a mudança na intensidade do vermelho emitido pelos cloroplastos presentes em células do parênquima paliçádico e, posteriormente, a mudança do vermelho para o amarelo, o que indica que os mesmos foram danificados. O parênquima paliçádico foi o mais afetado, uma vez que este tecido apresenta grande atividade fotossintética (Taiz & Zieger 2004).

Alguns trabalhos mostraram alterações no padrão da fluorescência da clorofila em plantas expostas em ambiente contaminado por ozônio; entre eles o de Adams & Linthilhac (1993) em acículas de *Picea rubens* e o de Soda *et al.* (2000) em *Pinus halepensis*, principalmente nas células próximas às cavidades subestomáticas. Essas mesmas alterações também foram observadas, preferencialmente nas células do parênquima paliçádico, em folhas de angiospermas como: *Ailanthus altissima* (Gravano *et al.* 2003), *Fraxinus excelsior*, *Prunus avium* & *Viburnum lantana* (Gravano *et al.* 2004) e *Acer pseudoplatanus* (Bussotti *et al.* 2005). As alterações encontradas nesta organela podem ser associadas com a senescência foliar, uma vez que, nesse estágio de desenvolvimento, as células dos tecidos foliares apresentaram alterações estruturais e bioquímicas semelhantes àquelas observadas em células em processo de morte programada (Lim *et al.* 2007).

Entretanto, sabe-se também que, o metabolismo vegetal é alterado e há uma perda de estabilidade inicial das funções quando a planta está sob estresse (Larcher 2000). Segundo Taiz &

Zieger (2004), folhas maduras são consideradas fontes, pois fornecem produtos fotossintéticos para as folhas jovens e imaturas. Neste trabalho as folhas analisadas apresentaram aumento no acúmulo de amido quando comparadas ao material referente ao tempo inicial, possivelmente isto é consequência dessas alterações.

Além dos cloroplastos, as mitocôndrias são sensíveis ao efeito das EAO. No presente estudo, as mitocôndrias apresentaram alterações como: dilatação de suas cristas, aumento da elétrondensidade da sua matriz e presença de corpos elétrondensos em seu interior.

Mitocôndrias mais elétrondensas foram observadas em *Betula pendula* fumigada com 75 ppb de ozônio por 12 horas dia/8 meses (Günthardt-Goerg *et al.* 1997). Na mesma planta Pellinen *et al.* (1999) observaram a desintegração da matriz mitocondrial após um único pulso de ozônio de 150 ppb/8 horas.

Além das alterações em cloroplastos e mitocôndrias observou-se no presente estudo aumento na quantidade de peroxissomos com depósitos de cristais de catalase nas plantas expostas em ambiente contaminado por ozônio São Paulo, quando comparadas com o material referente à situação inicial. De acordo com Taiz & Zieger (2004), os peroxissomos possuem a função de remoção de hidrogênios de substratos orgânicos, consumindo O₂. O peróxido potencialmente danoso é degradado nos mesmos pela enzima catalase e os depósitos encontrados mostram uma intensa síntese de catalase na célula.

A condensação da cromatina e a degeneração do núcleo são citados na literatura como outros eventos que ocorrem em plantas submetidas ao ozônio e foram observados na cultivar 'Bel-W3' de tabaco exposta em São Paulo. Tal resultado também foi constatado por Pasqualini *et al.* (2003) que fumigou a mesma cultivar com 150 ppb de ozônio/5 horas e por Paoletti *et al.* (2009) em *Fraxinus ornus* submetida à mesma concentração deste gás por 8 horas.

Em *N. tabacum* pode ser notada a formação de pequenos vacúolos no citoplasma das células do parênquima paliádico, com o aumento no vacuoma, termo que engloba todos os vacúolos presentes na célula, tecido ou planta (Evert 2006). A formação de pequenos vacúolos também foi

constatada por Günthardt-Goerg *et al.* (1997) em *Betula pendula* fumigada com 75 ppb (12 horas dia/8 meses).

De acordo com Vollenweider *et al.* (2003) o aumento na vacuolização da célula é um indicador da senescência celular acelerada (ACS em inglês), que ocorre em plantas submetidas ao ozônio. A ACS é definida por Günthardt-Goerg & Vollenweider (2007) como um processo que acontece em folhas jovens antes do outono, diferindo assim da senescência natural, que ocorre em folhas de espécies decíduas no outono.

Segundo Vollenweider *et al.* (2003) além da ACS, plantas submetidas ao ozônio podem apresentar uma resposta característica denominada de “resposta semelhante à de hipersensibilidade” (HR-like), que se assemelha àquela observada em plantas submetidas a patógenos (Lam 2004). A HR-like é um tipo de morte celular programada (PCD) e os critérios para identificá-la são: ausência de patógenos, restrição da morte celular a um pequeno grupo de células, ruptura do conteúdo celular, degeneração do núcleo e máxima condensação da cromatina, colapso da parede celular e degradação incompleta de remanescentes celulares e condensação dos mesmos em corpos semelhantes aos apoptóticos (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007).

Neste estudo foi possível observar a HR-like nas plantas expostas no ambiente durante o inverno, quando foram observados as maiores AOT20, contudo as outras alterações ultraestruturais e estruturais descritas anteriormente foram observadas nas plantas de todas as campanhas experimentais, mesmo nos períodos com valores baixos de AOT20.

Atualmente, alterações estruturais e ultraestruturais vêm sendo utilizadas na validação dos sintomas decorrentes do ozônio, principalmente em plantas de regiões temperadas. (Vollenweider *et al.* 2003, Faoro & Iriti 2009). Muitos estudos confirmam esse potencial como o de Bussotti *et al.* (2005) que investigaram cinco espécies vegetais com diferentes graus de sensibilidade ao ozônio e observaram HR-like em todas elas. A mesma resposta foi descrita por Loreto *et al.* (2001) em plantas assintomáticas da cultivar ‘Bel-W3’ de tabaco fumigadas com 300 ppb de ozônio por 3 horas/1 dia. Na cidade de São Paulo, em locais com altas concentrações deste gás, também foi

observada HR-like em folhas sintomáticas de *Ipomea nil* (Moura 2007) e da cultivar ‘Bel-W3’ de tabaco (Pedroso 2006).

Algumas técnicas histoquímicas permitem detectar sintomas decorrentes do ozônio e sua validação (Faoro & Iriti 2009). O acúmulo de peróxido de hidrogênio, que indica o estresse oxidativo, pode ser observado empregando-se o reagente 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e visualizado na forma de um precipitado marrom que se acumula em diferentes tecidos foliares. Tal substância pode ser acumulada primeiramente na parede celular e na membrana plasmática e, posteriormente, no citoplasma e em organelas celulares, sendo considerado um sinalizador da morte celular (Pellinen *et al.* 1999, Faoro & Iriti 2001, Iriti *et al.* 2003). Esta, por sua vez, pode ser visualizada com o corante azul de Evans, que detecta células mortas antes do aparecimento de sintomas visíveis.

Estudos realizados em câmaras de fumigação com diferentes espécies vegetais, incluindo a cultivar aqui estudada, mostraram a relação existente entre o acúmulo de peróxido de hidrogênio e a morte celular, e tem permitido estabelecer o grau de sensibilidade da espécie vegetal, bem como a validação dos sintomas decorrentes do ozônio (Iriti *et al.* 2003, Iriti & Faoro 2006).

Pasqualini *et al.* (2003) observaram na cultivar ‘Bel-W3’ de tabaco o acúmulo de peróxido de hidrogênio e células mortas concentradas em pequenos trechos do mesofilo distribuídos por toda a superfície foliar, quando a planta foi fumigada com 150 ppb de ozônio/5 horas. Iriti *et al.* (2006) fumigaram a mesma cultivar de tabaco e *Lycopersicon pimpinellifolium* com 50 ppb de ozônio/3 horas e observaram o mesmo padrão de distribuição dos sintomas em ambas as espécies, destacando que a localização ocorreu preferencialmente nas células circundantes aos estômatos, padrão esse que também foi encontrado na cultivar sensível Canellino de *Phaseolus vulgaris* quando a mesma foi fumigada com um único pulso de 150 ppb (Faoro & Iriti 2005).

Neste trabalho observou-se acúmulo do peróxido de hidrogênio em todos os tecidos foliares, preferencialmente nas células do parênquima paliçádico circundantes da cavidade subestomática e em todas as campanhas experimentais, especialmente no início das exposições. Este acúmulo

provavelmente pode ser relacionado com o aumento do número de peroxissomos. Uma relação similar foi encontrada por Oksanen *et al.* (2003) com plantas fumigadas de *Populus tremuloides* e *Betula papyrifera*. com AOT40 de 20,6 ppm h/4 meses.

Além disso, em todo o período experimental, pode ser observada morte celular, especialmente no tecido paliçádico, que aumentou linearmente ao longo do período de exposição. De acordo com Levine *et al.* (1994) o peróxido de hidrogênio tem o papel de sinalizador de morte celular, sendo que um único pulso de peróxido de hidrogênio já é suficiente para ativar os mecanismos de hipersensibilidade celular, que vão levar à formação de injúrias visíveis.

Os maiores valores referentes à morte celular foram obtidos no inverno e na primavera, períodos esses com as maiores AOT20 e, no caso da primavera, também valores máximos de temperatura. As análises de regressão indicaram que essas duas variáveis ambientais apresentaram correlação positiva e podem ter influenciado diretamente a resposta da cultivar estudada

Com base no que foi observado, a cultivar 'Bel-W3' de tabaco apresentou, ao longo de cada exposição e em todo o período experimental, alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas no mesofilo que indicam a ação das ERO. Destaca-se que mesmo em baixas concentrações de ozônio tais respostas foram observadas, confirmando a sensibilidade da cultivar a esse gás.. Os resultados obtidos com bases nas análises realizadas confirmam que a temperatura também influencia nas respostas da planta como estabelecido por Sant'Anna (2007) com base em danos visíveis.

Embora a radiação seja reconhecidamente um agente indutor de ERO, descarta-se a influência da mesma nos resultados, uma vez que as plantas foram expostas segundo protocolo que preconiza uma redução de 50% nos valores de radiação, o que se acredita tenha minimizado os efeitos da mesma. Contudo, por se tratar o ozônio de um poluente fotoquímico, a radiação foi determinante na formação do mesmo, tendo assim uma influência indireta nos resultados.

Destaca-se que as respostas da planta frente ao ambiente testado foram importantes, uma vez que podem ser consideradas como referência para outras espécies vegetais, principalmente as espécies tropicais, quando se pretende a validação dos sintomas decorrentes do ozônio.

5. Conclusões

- i. *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ apresentou alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas durante todo o período experimental, principalmente no inverno e na primavera, quando a AOT20 foi maior, indicando que ozônio contribuiu significativamente na formação das alterações; assim, a cultivar detecta a presença de ozônio, mesmo em concentrações mais baixas podendo ser empregada no monitoramento desse gás no local de estudo. As alterações observadas na cultivar foram: (1) retração do citoplasma, (2) colapso e espessamento da parede celular preferencialmente das células do parênquima paliçádico, (3) aparecimento de protruções nas células do parênquima lacunoso, (4) degeneração do núcleo & condensação da cromatina, que culminaram na morte de pequenos grupos de células no tecido paliçádico (HR-like) As organelas mais danificadas foram os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, sendo que esses últimos, comumente encontrados em *N. tabacum* expostas no ambiente analisado, podem representar resposta de defesa, uma vez que estão envolvidos na síntese de catalase, enzima que neutraliza o peróxido de hidrogênio, uma ERO formada na presença de poluentes aéreos, especialmente o ozônio. As alterações observadas seguiram sempre a mesma sequência acima indicada independente do período experimental e da concentração de ozônio presente no local estudado.
- ii. Além do ozônio presente no ambiente de estudo, a temperatura pode ter contribuído para o aparecimento das alterações observadas, enquanto que a radiação parece não ter influenciado diretamente os resultados.
- iii. As alterações estruturais e ultraestruturais observadas, muitas delas indicativas de processos de senescência celular, podem ser utilizadas como indicadores dos efeitos dos poluentes presentes no local estudado, contaminado principalmente por ozônio – que comprovadamente provoca senescência celular, servindo de parâmetros para a avaliação de outras espécies expostas nas mesmas condições.

- iv. Estudos que avaliem simultaneamente a temperatura e as concentrações de ozônio são recomendados.

6. Resumo – (Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em folhas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ (Solanaceae). A cultivar sensível ‘Bel-W3’ de *Nicotiana tabacum* é comumente empregada em países de clima temperado como bioindicadora do ozônio, por apresentar sintomas característicos, como necroses e cloroses intervenais. Contudo, estudos anteriores mostraram que, quando exposta em São Paulo, outros fatores, além do ozônio, possivelmente interferiram na resposta da planta. Dessa forma, objetiva-se contribuir com informações que possam explicar a fraca relação existente entre a concentração de ozônio e os danos observados na folha, determinando-se, por meio de análises estruturais, ultraestruturais e testes histoquímicos, as possíveis alterações e a sequência de eventos que levam aos sintomas visíveis, correlacionando-os com dados do ambiente. As plantas foram expostas em ponto da cidade de São Paulo com altas concentrações de ozônio, ao longo de cinco campanhas experimentais nos anos de 2007 e 2008. Cada campanha consistiu em exposições contínuas de 14 dias e, nesse período, foram realizadas coletas aleatórias entre 0 e 14 dias de exposição. Em cada coleta foram retiradas seis plantas cujas folhas 6 e 7 foram fixadas e processadas segundo técnicas usuais para análises em microscopia fotônica e microscopia eletrônica de transmissão. Para as análises histoquímicas foram utilizados o reagente 3,3'-diaminobenzidina e o corante azul de Evans, que evidenciam o acúmulo de peróxido de hidrogênio e a morte celular, respectivamente. Em microscopia de epifluorescência, foram observadas em amostras à fresco a autofluorescência dos cloroplastos. Nos períodos correspondentes ao inverno e a primavera foram observadas alterações estruturais e ultraestruturais mais evidentes, como: retração do citoplasma das células do mesófilo, sinuosidade das paredes anticlinais das células paliçádicas e espessamento de suas paredes, protruções nas células do parênquima lacunoso, condensação da cromatina, presença de vacuoma, alterações na forma e autofluorescência dos cloroplastos, intumescência dos tilacóides, aumento dos plastoglóbulos, mitocôndrias com matriz elétrondensa e com cristas dilatadas. Observou-se também resposta semelhante à hipersensibilidade (HR-like), caracterizada pela morte celular de pequenos grupos de células do parênquima paliçádico. As plantas apresentaram maior acúmulo de peróxido de

hidrogênio e aumento significativo no número de células mortas ao longo do tempo, principalmente no parênquima paliçádico. Observou-se correlação positiva entre o número de células mortas e a AOT20 (valor acumulado acima de 20 ppb.h de ozônio) e também entre o acúmulo de peróxido de hidrogênio, o que indica estresse oxidativo, e a temperatura. Os resultados confirmam a alta sensibilidade da cultivar ao ozônio e que, além desse gás, a temperatura parece interferir na resposta da planta. Estudos que associem esses dois parâmetros de forma controlada são recomendados.

Palavras-chave: poluição atmosférica, estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio, morte celular, anatomia foliar, HR-like

7. Abstract – (Structural, ultrastructural and histochemical changes in leaves of *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ (Solanaceae). The cultivar ‘Bel-W3’ of *Nicotiana tabacum* is the most frequently used for ozone biomonitoring in temperate climate countries, because it shows characteristic symptoms as intervenal necroses on the leaves. However, a recent study performed in the city of São Paulo, showed that, beside ozone, other features interfere in the plant response. The aim is to contribute with information that could explain why there are a weak relation between ozone concentration and foliar damages, and determine through structural and ultrastructural analyses and histochemical tests the possible changes and the sequence of events leading to visible symptoms, correlating them with environmental data. The plants were exposed in a site affected by high concentrations of ozone in São Paulo during the years 2007 and 2008. Each exposure lasted 14 days and during this period, samples were taken at randomly between 0 and 14 days of exposure. At each sampling day six plants were removed and the leaves 6 and 7 were collected, fixed and processed by usual techniques for analysis by light microscopy and transmission electron microscopy. For histochemical analysis were used 3,3'-diaminobenzidine and Evans blue staining, which show the accumulation of hydrogen peroxide and cell death, respectively. Microscopy epifluorescence using the autofluorescence of the chloroplasts was observed in fresh samples. More evident structural and ultrastructural alterations were observed in the winter and spring as shrinkage of the cytoplasm of the mesophyll cells, the sinuous anticlinal walls of palisade cells and thickening of the cell walls, protrusions on cells walls of spongy parenchyma, chromatin condensation, presence of vacuome, changes in shape and autofluorescence of the chloroplasts, swelling of thylacoids, increase of plastoglobuli, electron dense mitochondrial matrix and swollen cristae. There was also similar hypersensitive response (HR-like), characterized by cell death of small groups of palisade parenchyma cells. The plants showed higher hydrogen peroxide accumulated and a significant increase in the number of dead cells over time, specially in the palisade parenchyma. There was a positive correlation between the number of dead cells and AOT20 (accumulated hourly ozone exposure above 20 ppb threshold) and also between the hydrogen peroxide accumulated, indicating

oxidative stress, and temperature. The results confirm the high sensitivity of cultivar to ozone and besides this gas, the temperature seems to affect the response of the plant. Nevertheless, controlled studies involving temperature and ozone concentrations are recommended

Key-words: air pollution, oxidative stress, hydrogen peroxide, cell death, foliar anatomy, HR-like

8. Literatura citada

- Adams, T. & Lintilhac, M.** 1993. Fluorescence microscopy of fresh tissue as a rapid technique for assessing early injury to mesophyll. *Biotechnic Histochemistry* 68: 3-7.
- Agrios, G. N.** 2005. *Plant Pathology*. 5 ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Alves, E.S.** 1995. The effects of the pollution on wood of *Cecropia glazioui* (Cecropiaceae). *IAWA Journal* 16: 69-80.
- Alves, E. S, Giusti P. M, Domingos M, Saldiva P. H. N, Guimarães E. T. & Lobo D. J. A.** 2001. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 567-576.
- Alves, E. S., Tresmondi, F. & Longui, E. L.** 2008 a. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 22: 241-248.
- Alves, E. S, Moura, B. B & Domingos, M.** 2008 b. Structural analysis of *Tillandsia usneoides* L. exposed to air pollutants in São Paulo city–Brazil. *Water Air and Soil Pollution* 189: 61-68.
- Apel, K. & Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373–99.
- Arndt, U & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In: Ellenberg et al.* (eds.). *Biological monitoring. Signals from the environment*. Vieweg, Eschborn, pp. 199-298.
- Bolhàr-Nordenkamp, H. R. & Öquist, G.** 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. *In: D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhàr-Nordenkamp, R.C. Leegood & S.P. Long.* (eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman & Hall, London, pp. 193-206.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. *In: B. B. Buchanan, W. Gruissen & R. L. Jones* (eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, New York, pp. 1158-1203.

- Bussotti, F., Agati, G., Desotgiu, R., Matteini, P. & Tani, C.** 2005. Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytologist* 166: 941–955.
- Castagna, A., Ederli, L., Pasqualini, S., Mensuali-Sodi, A., Baldan, B., Donnini, S. & Ranieri, A.** 2007. The tomato ethylene receptor LE-ETR3 (NR) is not involved in mediating ozone sensitivity: causal relationships among ethylene emission, oxidative burst and tissue damage. *New Phytologist* 174: 342–356.
- Cetesb 2009.** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo de 2008. CETESB, Série Relatórios, São Paulo.
- Domingos, M., Klumpp, A & Klumpp, G.** 1998. Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50: 230-236.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M. C.** 2002. Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. *In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221-249.*
- Domingos, M., Bulbovas, P., Alves, E.S. & Moraes, R.M.** 2008. Potencial de utilização de pau-brasil na arborização urbana. *In: R.C.L.F. Ribeiro, C.J. Barbedo, E.S. Alves, M. Domingos & M.R. Braga (org.). Pau-Brasil da semente à madeira. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 115-131.*
- Epstein, E.** 1975. *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas.* Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Esposito, M. P., Ferreira, M. L., Sant’Anna, S. M. R., Domingos, M. & Souza, S. R.** 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ under environmental conditions in São Paulo, SE – Brazil. *Atmospheric Environment* 43: 619-623.

- Evert, R.F.** 2006. Esau's plant anatomy. 3 ed. Wiley Interscience, New Jersey.
- Faoro, F., Sant, S., Iriti, M., Maffi, D. & Appiano, A.** 2001. Chitosan-elicited resistance to plant viruses: a histochemical and cytochemical study. *In*: R.A.A. Muzzarelli (ed.). Chitin Enzymology. Atec, Grottamare, pp. 57-62.
- Faoro, F. & Iriti, M.** 2005. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49: 585-592.
- Faoro, F. & Iriti, M.** 2009. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: key studies in Mediterranean conditions. *Environmental Pollution* 157: 1470-1477.
- Farrell, A.E.** 2005. Learning to see the invisible: discovery and measurement of ozone. *Environmental Monitoring and Assessment*. 106: 59–80.
- Ferdinand, J.A.; Fredericksen, T.S.; Kouterick, K.B. & Skelly, J.M.** 2000. Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. *Environmental Pollution* 108: 297-302.
- Freedman, B.** 1995. Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2 ed. Academic Press Inc. San Diego.
- Gerosa, G., Marzuoli, R., Bussotti, F., Pancrazi, M. & Ballarin-Denti, A.** 2003. Ozone sensitivity of *Fagus sylvatica* and *Fraxinus excelsior* young trees in relation to leaf structure and foliar ozone uptake. *Environmental Pollution* 125: 91-98.
- Gravano, E., Giulietti, V., Desotgiu, R., Bussotti, F., Grossoni, P., Gerosa, G. & Tani, C.** 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution* 121: 137-146.
- Gravano, E., Bussotti, F., Strasser, R.J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J. & Tani, C.** 2004. Ozone symptom in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121: 620-633.

- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P.** 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 147: 467-488.
- Günthardt-Goerg, M.S., McQuattie, C.J., Scheidegger, C., Rhiner, C. & Matyssek, R.** 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 453-463.
- Guidi, L., Mali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G. & Soldatini, G. F.** 1997. The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars. *Journal of Experimental Botany* 48: 173-179.
- Han, X. & Naeher, L.P.** 2006. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environmental International* 32: 106-120.
- Heath, R.L.** 1994. Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynthesis Research* 39: 439-51.
- Heath, M.C.** 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Heath, R.L.** 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? *Environmental Pollution*. 155: 453-463.
- Heggstad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C, and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- Iriti, M., Rabotti, G., Ascensão, A. & Faoro, F.** 2003. Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51: 4308-4314.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F.** 2006. Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution*. 141: 275-282.
- Karnovsky, M.J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.

- Kley, D., Kleinmann, M., Sanderman, H. & Krupa, S.** 1999. Photochemical oxidants: state of the science. *Environmental Pollution* 100: 19-42.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 511-518.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Rø-Poulsen, H., Ribas, A., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and zone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40: 7437-7448.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-137.
- Krupa, S., McGrath, M. T., Andersen, C. P., Booker, F. L., Burkey, K. O., Chappelka, A. H., Chevone, B. I., Pell, E. J., Zilinskas, B. A.** 2001. Ambient ozone and plant health. *Plant Disease* 85: 4-12.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.
- Lam, E.** 2004. Controlled cell death, plant survival and development. *Nature* 5: 305-315.
- Lawson, T., Craigan, J., Black, C.R., Colls, J. J., Landon, G. & Weyers, J. D. B.** 2002. Impact of elevated CO₂ and O₃ on gas exchange parameters and epidermal characteristics in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Experimental Botany* 53: 737-746.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C.** 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Ljubešić, N. & Britvec, M.** 2006. Tropospheric ozone-induced structural changes in leaf mesophyll cell walls in grapevine plants. *Biologia, Bratislava* 61: 85-90.

- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F. & Pasqualini, S.** 2001. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126: 993–1000.
- Maxwell, K. & Johnson, G. N.** 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405–410.
- Moura, B.B.** 2007. Respostas estruturais em *Ipomea nil* (L.) Roth cv. Scarlet O'Hara (Convolvulaceae) exposta ao ozônio. Dissertação de Mestrado. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo.
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kraüchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P.** 2003. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution* 125: 41–52
- O'Brien, T. P. & McCully, M. E.** 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-373.
- O'Brien, T. P. & McCully, M. E.** 1981. The study of plant structure. Principles and Selected Methods. Termacarphii, Melbourne.
- Oksanen, E., Häikiö, E., Sober, J. & Karnosky, D.F.** 2003. Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist* 161: 791–799.
- Oliveira, J. G.** 2005. Estresse luminoso: uma abordagem a partir de variáveis de fluorescência da clorofila *a*. In: R.M.C. Nogueira, E.L. Araújo, L.G. Willadeno & U.M.T. Cavalcante, (eds.). *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. Universidade Federal Rural do Pernambuco, Pernambuco.

- Overmyer, K., Wrzaczek, M. & Kangasjärvi, J.** 2009 Reactive Oxygen Species in Ozone Toxicity. In: L.A. del Río & A. Puppó (eds.). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Springer, Dordrecht, pp. 191-207.
- Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, T. & Kärenlampi, L.** 1995. The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist* 132: 145-154.
- Pääkkönen, E., Holopainen, T. & Kärenlampi, L.** 1997. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth) in relation to ambient levels of ozone in Finland. *Environmental Pollution* 96: 117-127.
- Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M. & Vollenweider, P.** 2009. Structural and physiological responses to ozone in Manna ash (*Fraxinus ornus* L.) leaves of seedlings and mature trees under controlled and ambient conditions. *Science of the Total Environment* 407: 1631-1643
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Torre, G.D. & Ferranti, F.** 2003. Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133: 1122–1134.
- Pedroso, A.N.V.** 2006. Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo.
- Pedroso, A.N.V. & Alves, E.S.** 2008. Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio. *Acta Botanica Brasilica* 22: 21-28.
- Pellinen, P., Paiva, T. & Kangasjärvi, J.** 1999. Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal* 20: 349-356.
- Rao, M. V., Koch, J. R. & Davis, K. R.** 2000. Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* 44: 345–358.

- Reig-Armiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., Garcia-Breijo, F. J., Ibars, A. & Sanz, M. J.** 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution* 132: 321-331.
- Resende, M. L. V., Salgado, S. M. L. & Chaves, Z. M.** 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 123-130.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead tissue citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* 17: 208.
- Sant'Anna, S. M. R.** 2007. Potencial de uso de *Nicotiana tabacum* Bel W3 para biomonitoramento dos níveis de contaminação atmosférica por ozônio, na cidade de São Paulo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo.
- Sant'Anna, S. M. R., Esposito, M. P., Domingos, M. & Souza, S. R.** 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 151: 389-394.
- Soares, A. M. S. & Machado, O. L. T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica* 1: 9-19.
- Soda, C., Bussotti, F., Grossoni, P., Barnes, J., Mori, B. & Tani, C.** 2000. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. *Environmental and Experimental Botany* 44: 69-82.
- Stakman, E.C.** 1915. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* 4: 193-200.
- Taiz, L. & Zieger, E.** 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure. VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

- Vergé, X., Chapuis, A. & Delpoux, M.** 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *Environmental Pollution* 85: 337-349.
- Vollenweider, P., Ottiger, M. & Günthardt-Goerg, M. S.** 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124: 101-118.
- Watson, M. L.** 1958. Staining of tissues for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology* 4: 475.