

FRANCINE FAIA FERNANDES

Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento de ozônio

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

SÃO PAULO

2015

FRANCINE FAIA FERNANDES

Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento de ozônio

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

ORIENTADORA: DRA. EDENISE SEGALA ALVES

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Fernandes, Francine Faia

F363m Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento de ozônio / Francine Fernandes Faia -- São Paulo, 2015.

78 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015 |

Bibliografia.

1. Poluição atmosférica. 2. Anatomia. 3. Estresse oxidativo. I. Título

CDU: 628.395

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo
valioso em todas as suas folhas”

(Johann Goethe)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente.

À CAPES, Programa PNADB (Dra. Marisa Domingos) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento do Projeto (Dra. Regina Maria de Moraes- Proc. FAPESP 2011/51233-0).

Ao Instituto de Botânica e ao Núcleo de Pesquisa em Anatomia pela infraestrutura e suporte oferecidos.

À Dra. Edenise Segala Alves, minha orientadora, pela confiança depositada, por todo conhecimento transmitido e paciência comigo. Sou, e sempre serei muito grata a você.

À Dra. Bárbara Baêso Moura pela colaboração, por todo o conhecimento transmitido desde a minha iniciação científica, pelo exemplo profissional e por sempre me auxiliar nas dúvidas. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Poliana Cardoso pela colaboração, por todo conhecimento transmitido, pela paciência, pelo carinho, dedicação e por acreditar na minha capacidade. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Regina Maria de Moraes pela coordenação do Projeto (FAPESP), pelas importantes contribuições científicas passadas e por viabilizar o desenvolvimento desse estudo.

Aos amigos que fizeram parte do projeto FAPESP: Jéssica Cassimiro, Pedro Assis, Jéssica Picolli, Daniela Faria, Giselle Pedrosa e Wilton Sala.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Anatomia, Dra. Adriana Hissae Hayashi e Dra. Agnes Elisete Luchi, e aos alunos e ex-alunos Dra. Andréa Nunes Vaz Pedroso, Milla Hatamura, Laís Silveira, Gustavo Rodrigues, Danilo Souza, Andrea Pedroso, Vivian Vaitekunas, Camila Moura, Diego Romeiro, Mariana Victorio, e aos funcionários de apoio Maria Manoel e Nilton de Jesus Ribeiro.

Aos amigos e colegas do Instituto de Botânica que de alguma maneira me ajudaram, direta ou indiretamente: Josiane Bison, Marcela Engela, Pedro Pimont, Vitor Almeida, Cristiane Aguiar, Andrea Nunes, Andressa Ribeiro, Ricardo Nakazato e Marcelle Dafré. Especialmente Marcelo Morena, Pedro Bige, Fernanda Cassimiro, Marco Torres e Celso Markowitsch.

Às amigas queridas que entenderam minha ausência durante o mestrado: Fernanda Cassemiro, Marjorie Tocchini, Thais Santos, Nati Lima, Ane Aguiar, Maria Cecília Passos, Gabriela Kawakami, Paula Portioli, Mariane Muchatte, Christiane Antonelli, Carol Giamarini e

Jaqueline Kagueyama. E a que esteve mais presente durante todo período de mestrado, minha querida e incrível amiga “astronilda”, Jéssica Cassimiro.

Ao meu namorado Thiago Mangialardo, o amor da minha vida. Obrigada pelo apoio, incentivo e por acreditar tanto em mim.

E por último, mas não menos importante, à minha família (pai, mãe, irmãos, cunhadas, sobrinho, avô e avó), pelo amor, paciência, educação e por entender os motivos de ausência em muitos momentos durante o mestrado, e mesmo assim estarem sempre presentes. Eu não teria conseguido nada sem vocês! E ao meu avô Faia e avó Conceição, que infelizmente não estão mais presentes, mas tenho certeza que teriam muito orgulho de mim.

Muito Obrigada!

Resumo

O ozônio (O₃) é um poluente fitotóxico que pode causar injúrias visíveis em plantas e tais injúrias auxiliam na identificação de riscos potenciais à vegetação. Os marcadores microscópicos se destacam como única forma de validar essas injúrias como decorrentes de processos oxidativos provocados por O₃. Em condições de campo, o sinergismo entre a exposição ao O₃ e ao estresse luminoso gera danos oxidativos mais intensos quando comparados às situações experimentais em que o estresse é aplicado individualmente. Estes danos são ainda mais intensos em espécies que apresentam maior sensibilidade ao estresse luminoso, como *Astronium graveolens*. Diversos efeitos de combate e contenção de espécies reativas de oxigênio (ROS), derivadas da sinergia entre esses dois fatores ambientais, em especial as respostas desempenhadas pelos polifenóis, são observados estruturalmente de forma a validar a origem do processo oxidativo. Os objetivos deste estudo foram (i) identificar e descrever as injúrias visíveis em folíolos de plantas jovens de *A. graveolens* em situação de campo; (ii) validar os sintomas como decorrentes de O₃, com base em marcadores microscópicos; (iii) testar, em campo, o potencial bioindicador de O₃ da espécie; (iv) caracterizar a deposição de polifenóis no clorênquima das lamínas foliolares. *A. graveolens* apresentou injúrias do tipo *stippling* marcadas pela oxidação da parede celular e de protrusões presentes no apoplasto. Os índices de injúrias testados mostraram linearidade com a SUM0, assim, a espécie pode ser empregada no biomonitoramento do O₃. Ainda, amostras submetidas ao sinergismo (O₃ e estresse luminoso) apresentaram um padrão específico na distribuição espacial de polifenóis no interior do vacúolo, de acordo com a posição da célula em relação àquelas em processo de HR-like. Este padrão obedece ao mesmo encontrado no interior do vacúolo das células epiteliais de canais secretores em desenvolvimento, em que ambos os tecidos envolvidos (parênquima paliádico e canais secretores) apresentam a mesma origem ontogenética (meristema fundamental), indicando que são processos homólogos. A presença de flavonóis na região de estabelecimento de HR-like ressalta o envolvimento destes polifenóis no combate às ROS. Este estudo enfatiza o papel fundamental da anatomia, não somente na validação das injúrias, mas, também, no entendimento dos processos de defesa da planta.

Apresentação

Uma introdução geral inicia a Dissertação, na qual abordamos como ocorre a formação do ozônio troposférico (O_3), a rota de entrada de O_3 na folha, os principais efeitos do poluente em nível celular e as respostas de defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo O_3 . Ainda, tratamos da utilização de injúrias visíveis características de O_3 em programas de biomonitoramento e os aspectos relevantes na validação das injúrias por meio de marcadores microscópicos estruturais. Abordamos as concentrações de O_3 na Região Metropolitana de São Paulo e estudos que avaliaram seu potencial fitotóxico. Enfatizamos a necessidade de se estudar e entender os efeitos do O_3 em espécies arbóreas nativas em especial, em *Astronium graveolens* que vem sendo estudada pelo grupo, e o seu potencial bioindicador de O_3 . A hipótese e os objetivos gerais são destacados ao término da introdução.

Após a introdução geral, apresentamos os dois capítulos que compõe a Dissertação, estando os mesmos formatados de acordo com as normas do periódico Environmental Pollution para o qual as versões em inglês, devidamente corrigidas e revisadas serão encaminhadas. Os artigos a serem submetidos à publicação possuem coautores diferentes que colaboraram significativamente com o estudo; assim, seus nomes já foram incluídos nos capítulos.

O primeiro capítulo trata da validação das injúrias visíveis provocados por O_3 , com base em marcadores microscópicos estruturais em plantas de *A. graveolens*, expostas em situação de campo.

O segundo capítulo trata do sinergismo entre o estresse luminoso e o O_3 nas respostas estruturais de polifenóis em folíolos de *A. graveolens*. Este último capítulo originou-se do interesse em se entender os diferentes aspectos de compostos fenólicos observados durante as análises dos marcadores estruturais apresentados no primeiro capítulo.

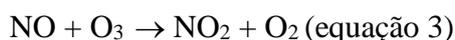
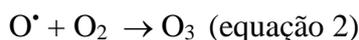
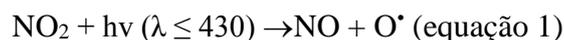
Finalizamos a Dissertação com as conclusões que reúnem os resultados apresentados e discutidos nos dois capítulos.

Sumário

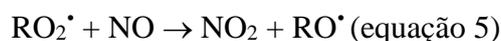
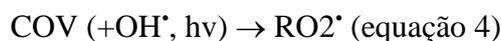
1. Introdução geral	1
2. Hipótese e objetivos gerais	5
3. Referências Bibliográficas	5
Capítulo 1: Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento do ozônio	10
Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução	13
2. Material e Métodos	15
2.1. Caracterização da espécie e do local de estudo	15
2.2. Modo de cultivo e exposição das plantas	15
2.3. Identificação e quantificação dos sintomas visíveis em campo	16
2.4. Análise microscópica	17
2.5. Monitoramento das variáveis climáticas e das concentrações atmosféricas de ozônio	20
2.6. Análise estatística	21
3. Resultados	21
3.1. Caracterização ambiental	21
3.2. Caracterização das injúrias visíveis	22
3.3. Marcadores microscópicos validadores das injúrias visíveis	23
3.4. Quantificação das injúrias visíveis	25
3.5. Influência do ozônio e das variáveis meteorológicas na expressão das injúrias visíveis	26
4. Discussão	33
4.1. As injúrias visíveis em <i>A. graveolens</i>	33
4.2. Ozônio, fatores meteorológicos e injúrias visíveis em <i>A. graveolens</i>	34
4.3. Marcadores microscópicos validadores do efeito do ozônio	37
5. Conclusão	41
6. Referências Bibliográficas	42
Capítulo 2: Sinergismo entre estresse luminoso e ozônio: respostas estruturais de polifenóis em <i>Astronium graveolens</i> (Anacardiaceae)	49
4. Discussão	67
4.1. Considerações sobre as análises de polifenóis em microscopia confocal	67
4.2. Aspectos estruturais do sinergismo entre luz e ozônio	69
4.3. Relações entre canais secretores lisígenos e a ocorrência de HR-like em células do parênquima paliçádico	70
6. Referências Bibliográficas	73
Conclusão	80
Anexo 1	81
Anexo 2	82

1. Introdução geral

O ozônio troposférico (O_3) é um poluente aéreo de origem secundária, formado por meio de reações químicas envolvendo poluentes primários, aqueles emitidos diretamente na atmosfera por fontes estacionárias e móveis, e intermediadas pela radiação solar (Freedman 1995; CETESB 2012). Em uma atmosfera não poluída na qual gases como os óxidos de nitrogênio (NO_x), precursores do O_3 , não estão em excesso têm-se, na presença de luz solar, a seguinte sequência de eventos: No primeiro momento (equação 1) ocorre a decomposição do dióxido de nitrogênio (NO_2) intermediado pela luz solar, gerando monóxido de nitrogênio (NO) e oxigênio atômico (O^*). A molécula de O^* reage rapidamente com a molécula de gás oxigênio (O_2) formando o O_3 (equação 2), enquanto que o outro produto NO reage com o O_3 para regenerar a molécula de NO_2 (equação 3). Dessa forma, o O_3 produzido é consumido não ocorrendo seu acúmulo.



Nos locais onde a atmosfera é diretamente influenciada pelo tráfego urbano e atividades industriais, que produzem grande quantidade de compostos orgânicos voláteis (COVs), estes, na presença de luz solar, reagem com os radicais hidroxila (OH^*) presentes naturalmente na atmosfera formando o radical peróxi (RO_2^*) (equação 4). O RO_2^* oxida NO a NO_2 (equação 5), sem que ocorra o consumo de O_3 (equação 3), havendo o acúmulo do poluente (Freedman, 1995; CETESB 2000; Ashmore, 2005).



O incremento dos níveis de O_3 na troposfera se torna prejudicial ao ambiente e aos seres vivos devido à sua forte ação oxidante, sendo, portanto, o mais estudado dentre os poluentes atmosféricos (Krupa et al., 2001). A rota do O_3 até atingir os tecidos vegetais engloba: (1) o O_3 deve vencer as resistências presentes na superfície foliar, como tricomas e a camada limítrofe da folha; (2) vencendo tais resistências, deve ainda enfrentar a resistência oferecida pelos estômatos ou cutícula (esta última considerada uma via de maior resistência); (3) dentro da folha, no apoplasto, ocorre a ozonólise, o que intensifica a formação de espécies reativas de

oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), entre elas superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), ativando processos de desintoxicação, que, quando não suficientes para neutralização das ROS, levam ao estresse oxidativo (*oxidative burst*, OB) e, conseqüentemente, à oxidação de constituintes celulares: lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Bartosz, 1997; Roshina & Rochina, 2003; Foyer & Noctor, 2005; Heath et al., 2009; Overmyer et al., 2009; Sharma et al., 2012). Algumas ROS são radicais livres, com um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, o que lhes confere alta reatividade (Halliwell, 1992); já o H_2O_2 é um oxidante estável e sem carga, o que facilita sua passagem através da membrana celular e, dependendo da sua concentração, pode levar à morte celular (Oksanen et al., 2003; Resende et al., 2003; Faoro & Iriti, 2009).

Em seu caminho para o interior da célula, as ROS devem vencer alguns compartimentos e estruturas, onde modificam componentes celulares biologicamente importantes. Nesse percurso devem ultrapassar a parede celular e o espaço extracelular existente entre a parede e a membrana plasmática e, por sua vez, a própria membrana antes de atingir o citoplasma (Roshina & Rochina, 2003). Quando se consideram os constituintes celulares, as proteínas são mais sensíveis ao estresse oxidativo do que os lipídios, portanto as ROS reagem primeiramente com as proteínas das membranas celulares e secundariamente com os lipídeos, alterando a permeabilidade membrana celular e, somente após ultrapassar estas barreiras, reagem no citoplasma e núcleo (Rochina & Rochina 2003).

Como já mencionado, as plantas podem ativar processos de desintoxicação em resposta às ROS, produzindo antioxidantes enzimáticos como: ascorbato peroxidase, glutathione redutase, catalase, superóxido dismutase e ainda metabólitos como a glutathione, carotenóides, ácido ascórbico e fenóis (Soares & Machado, 2007). Havendo o desequilíbrio dos antioxidantes/ROS, em condições de estresse em ambiente poluído, os primeiros efeitos decorrentes de O_3 têm início em nível fisiológico e bioquímico, progredindo para nível ultraestrutural, estrutural e, ao final, morfológico, com a expressão de injúrias visíveis foliares.

A poluição atmosférica também pode ser responsável pela indução e alteração da composição de metabólitos secundários (Furlan et al., 1999; Furlan et al., 2010). O O_3 foi correlacionado positivamente com mudanças no metabolismo dos compostos fenólicos (Biolley et al., 2002; Sandre et al., 2014), que são caracterizados por apresentarem um grupo fenol (um grupo hidroxila (-OH) em um anel aromático); quando reúnem pelo menos dois anéis aromáticos são chamados de polifenóis. Estes compostos formam um grande grupo heterogêneo sendo, hidrossolúveis, lipossolúveis ou insolúveis - quando integram grande polímeros (Taiz & Zeiger, 2004), podendo ser classificados com base no número de átomos de carbono na molécula (Vermerris & Nicholson, 2006). O aumento da síntese de polifenóis, como

proantocianidinas (taninos condensados), ocorre como uma resposta ao O₃ (Rezende & Furlan, 2009; Booker et al., 2013) sendo estes encontrados principalmente no vacúolo das células do parênquima paliçádico como constatado por Vollenweider et al., 2003; Tresmondi & Alves, 2011; Guerreiro et al., 2013, Moura et al., 2014) e tais compostos são responsáveis pela expressão de injúrias visíveis em resposta ao O₃ (Furlan et al., 2007; Tresmondi & Alves, 2011; Santos & Furlan, 2013). Muitos polifenóis desempenham um papel importante na defesa da planta contra o estresse oxidativo, funcionando como doadores de elétrons, capazes de atuar como antioxidantes não enzimáticos (Furlan & Santos, 2013), evitando ou diminuindo as concentrações de ROS, quando em quantidade suficiente.

Devido à capacidade das plantas de reagir metabólica, fisiológica, estrutural e morfológicamente às mudanças nas concentrações atmosféricas de poluentes gasosos, estas têm sido muito empregadas como bioindicadoras de qualidade do ar (VDI 1999; 2003; Mulgrew & Williams, 2000). Contudo, plantas a serem empregadas em programas de biomonitoramento devem apresentar injúrias facilmente observáveis, que indiquem, de maneira clara, a presença do poluente.

A existência do O₃ troposférico é conhecida desde 1840 porém, as injúrias foliares provocadas por esse gás foram identificadas pela primeira vez em 1950 (Percy et al., 2003; Ashmore, 2005). Desde então, vem ocorrendo, em países do Hemisfério Norte, o aumento no número de estudos que registram as lesões foliares induzidas por O₃ em plantas (Percy et al., 2003; Bussotti et al., 2003; Novak et al., 2003; Davis & Orendovici 2006; Bussotti & Ferretti 2009; Vollenweider et al., 2013). Para muitas espécies florestais da Europa, já existe a fotodocumentação referente à caracterização macroscópica das injúrias decorrentes do O₃ e dos marcadores estruturais que as validam (ICP-Forests) e tais informações estão disponíveis (Ozone injury in European Forest Species: <http://www.ozoneinjury.org/>). Além disso, existem manuais com protocolos para identificar espécies sensíveis, avaliar as injúrias visíveis e definir a forma de amostragem, entre outras recomendações (ICP, <http://icp-forests.net/page/icp-forests-manual>). Todas essas informações embasam programas de biomonitoramento do O₃ em florestas do hemisfério norte, porém esses protocolos podem não ser aplicáveis no hemisfério sul diante da alta biodiversidade existente em nossas florestas (Domingos et al., 2015).

A plasticidade de resposta e a morfologia da injúria visível vão depender da espécie estudada, do genótipo, da posição e idade da folha, do tempo de exposição e dos fatores meteorológicos (Percy, et al., 2003). Além disso, é de fundamental importância estabelecer se as injúrias presentes nas folhas são causadas realmente por estressores abióticos (no caso poluentes), uma vez que existem diversos sintomas decorrentes de fatores bióticos (Novak et al., 2003). As análises estruturais permitem essa distinção e estão sendo cada vez mais utilizadas

para a validação dos sintomas decorrentes de poluentes atmosféricos (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007).

O O₃ pode induzir estresse oxidativo no apoplasto e mesofilo, resultando em marcadores microscópicos desse estresse ou na resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive like response*, HR-like) e senescência celular acelerada (*accelerated cell senescence*, ACS) (Vollenweider et al., 2003). Dentre os marcadores de estresse oxidativo (SO) podem ser citados: protruções nas paredes celulares voltadas para o apoplasto e alterações nos cloroplastos (Günthardt-Goerg et al., 1997; Schraudner et al., 1998; Vollenweider et al., 2003; Pedroso & Alves, 2015). A resposta de HR-like é um tipo de morte celular programada que ocorre em grupos de células parenquimáticas e é caracterizada por um conjunto de marcadores, dentre eles: colapso da parede celular, condensação do protoplasto, ruptura da membrana celular e incompleta degradação de organelas (Faoro & Iriti, 2009). A resposta de ACS tem como principais marcadores alterações nos cloroplastos, com redução na sua quantidade e formato, (inchaço), aumento do vacúolo, condensação do citoplasma e núcleo, entre outros (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Pierre, 2007). Embora o termo ACS seja utilizado pelos muitos autores citados, que avaliam os efeitos do O₃ em plantas, outros autores relacionam os termos senescência e senescência acelerada às repostas em órgãos e não em células (Hadfield & Bennet, 1997), sendo o termo aceleração de morte celular preferível à aceleração de senescência celular segundo esses autores (Hanaoka et al., 2002; Tanaka et al., 2003; Yao & Greenberg, 2006).

O O₃ vem atingindo valores preocupantes nas grandes cidades ao redor do planeta (Molina & Molina, 2004). Na cidade de São Paulo, cerca de sete milhões de veículos (Detran 2014) são responsáveis pela emissão de 77% de hidrocarbonetos e 80% de NO_x, gases precursores de O₃. Além da presença dos precursores, as condições climáticas da cidade favorecem a formação do O₃, uma vez que ocorrem na região, durante boa parte do ano, dias claros, com alta radiação e temperaturas elevadas (CETESB 2012). Diante disso, o O₃ é o poluente que mais ultrapassa o padrão de qualidade do ar no Estado de São Paulo (160 µg/m³ ≈ 80 ppb até 2012 e 140 µg/m³ ≈ 70 ppb a partir de 2013) mesmo após diversas medidas adotadas para o controle e redução das emissões de seus precursores (CETESB 2012; Detran 2014).

Diante das altas concentrações de O₃ observadas em regiões da cidade de São Paulo, SP estudos que avaliem o potencial fitotóxico desse gás vem sendo realizados (Dias et al., 2007; Sant'Anna et al., 2008, Esposito et al., 2009; Souza et al., 2009; Alves et al., 2011; Dafré-Martinelli et al., 2011; Moura et al., 2011; Pedroso & Alves 2015) embora poucos com espécies arbóreas (Moraes et al., 2011; Tresmondi & Alves, 2011, Furlan et al., 2010; 2013). Assim,

estudos com espécies arbóreas nativas são necessários para selecionar aquelas com capacidade bioindicadora de O₃ em regiões tropicais.

Dentre as espécies tropicais testadas, *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) foi fumigado com O₃, de forma crônica: 70 ppb/6 horas/53 dias, com repetição por 36 dias nas mesmas condições (Moura, 2013) e aguda: 200ppb/4 horas/3 dias (Moura et al., 2014); desenvolvendo injúrias caracterizadas por pontuações marrons entre as nervuras, distribuídas em todo o limbo foliar de maneira homogênea assemelhando-se a “stipples” (Vollenweider et al., 2003). As injúrias visíveis estabelecidas mostram que a espécie é promissora para o biomonitoramento do O₃. Moura (2013) também estabeleceu os principais marcadores microscópicos decorrentes do O₃ em plantas fumigadas, que serviram de base para o presente estudo, que foi desenvolvido em campo.

2. Hipótese e objetivos gerais

A hipótese deste estudo é que *A. graveolens* na presença do O₃ vai apresentar sintomas característicos quando exposto em campo, em local que apresenta concentrações significativas desse poluente, e que os marcadores microscópicos permitirão validar esses sintomas. Assim, o objetivo do presente estudo é identificar marcadores microscópicos decorrentes do O₃ em *A. graveolens*, validar, com base nesses marcadores, os sintomas visíveis nessa planta como decorrentes do O₃ e testar em campo o potencial bioindicador de O₃ da espécie.

3. Referências Bibliográficas

- Alves, E.S., Moura, B.B., Pedroso, A.N.V., Tresmondi, F., Domingos, M., 2011. The efficiency of tobacco Bel-W3 and native species for ozone biomonitoring 159, 3309–15.
- Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment* 28, 949– 964.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19, 47–64.
- Biolley, J.P., Kanoun, M., Goulas, P., 2002. The response of vacuolar phenolic content of common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Bergamo) to a chronic ozone exposure: questions and hypotheses. *Functional Plant Biology* 29, 1–11.
- Booker, F. L., Burkey, K. O., Jones, A. M., 2013. Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell and Environment* 35, 1456–1466.
- Bussotti, F., Ferretti M., 2009. Visible injury, crown condition, and growth responses of selected Italian forests in relation to ozone exposure. *Environmental Pollution* 157, 1427–1437.

- Bussotti, F., Gravano, E., Grossoni, P., Tani, C., Mori, B., 2003. Ultrastructural response of a Mediterranean shrub species to O₃. *Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium*. Elsevier.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2000. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2012. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatórios. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- Dafré-Martinelli, M., Nakazato, R.K., Dias, A.P.L., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M., 2011. The redox state of *Ipomoea nil* 'Scarlet O Hara' growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1645– 1652.
- Davis, D.D., Orendovici, T., 2006. Incidence of ozone symptoms on vegetation within a National Wildlife Refuge in New Jersey, USA. *Environmental Pollution* 143, 555– 564.
- DETRAN-SP, Departamento Estadual de Trânsito de São Paulo. 2014. Disponível em: <http://www.detran.sp.gov.br>
- Dias, A.P.S., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M., 2007. Injúrias latentes e visíveis induzidas pelo ozônio em *Psidium guajava* 'Paluma'. *Hoehnea* 34, 231– 238.
- Domingos, M., Bulbovas, P., Camargo, C.Z.S., Aguiar-Silva, C., Brandão, S.E., Dafré-Martinelli, M., Dias, A.P.L., Engela M.R.G.S., Gagliano, J., Moura, B.B., Alves E.S., Rinaldi, M.C.S., Gomes, E.P.C., Furlan, C.M., Figueiredo A.M.G., 2015. Searching for native tree species and respective potential biomarkers for future assessment of pollution effects on the highly diverse Atlantic Forest in SE-Brazil. In press. *Environmental Pollution in press*.
- Esposito, M.P., Ferreira, L.M., Santana, S.R.M, Domingos, M., Souza, S.R., 2009. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum*. *Atmospheric Environment* 43, 619–623.
- Faoro, F., Iriti, M. 2009. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: Key studies in Mediterranean conditions. *Environmental Pollution* 157, 1470– 477.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Oxidation and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environmental* 28, 1056–1071.
- Freedman, B., 1995. *Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses*. Academic Press, San Diego.
- Furlan, C.M., Salatino, A., Domingos, M., 1999. Leaf contents of nitrogen and phenolic compounds and their bearing with the herbivore damage to *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), under the influence of air pollutants from industries of Cubatão, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22, 317–323.
- Furlan, C.M., Santos, A.C.R., 2013. Levels of phenolic compounds in *Tibouchina pulchra* after fumigation with ozone. *Atmospheric Pollution Research* 4, 250–256.
- Furlan, C.M., Santos, D.Y.A.C., Motta, L.B., Domingos, M., Salatino, A., 2010. Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. *Atmospheric Pollution Research* 1, 30–35.
- Guerrero, C.C., Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P. 2013. Foliar Symptoms Triggered by Ozone Stress in Irrigated Holm Oaks from the City of Madrid, Spain *PLoS ONE* 8, e69171.

- Günthardt-Goerg, M.S., McQuattie, C.J., Scheidegger, C., Rhiner, C., Matyssek, R., 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell. *Canadian Journal of Forest Research* 27, 453–463.
- 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.
- Hadfield, K.A. e Bennett, A.B., 1997. Programmed senescence of plant organs. *Cell Death & Differentiation* 4, 662–670.
- Halliwell, B., 1992. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609–1623.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y., 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiology* 129, 1181–1193.
- Heath, R.L., Lefohn, A.S., Musselman, R.C., 2009. Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment* 43, 2919–2928.
- Krupa, S.V., 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.
- Molina, M.J., Molina L.T., 2004. Megacities and Atmospheric Pollution, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 54, 644–680.
- Moraes, R.M., Furlan, C. M., Meirelles, S.T., Santos, D.Y.A.C., Souza, S. R., Viola, S.R.A.S., Rezende, F.M., Barbosa, J.M., Domingos, R. L. 2011. Avaliação da sensibilidade da goiabeira 'Pedro Sato' ao ozônio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46, 971–978.
- Moura, B.B, Alves, E.A., Souza, S.R., Domingos, M., Vollenweider, P., 2014. Ozone phytotoxic potential with regard to fragments of the Atlantic Semi-deciduous Forest downwind of Sao Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 192, 65–73.
- Moura, B.B., 2013. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos. Dissertação de Doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo.
- Moura, B.B., Souza, S.R., Alves, E.S., 2011. Structural responses of *Ipomoea nil* (L.) Roth 'Scarlet O'Hara' (Convolvulaceae) exposed to ozone. *Acta Botanica Brasilica* 25, 122–129.
- Mulgrew, A. Williams, P., 2000. Biomonitoring of air quality using plants. WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control/Federal Environmental Agency-Germany, Report 10, Berlin.
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Kräuchi, 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.
- 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.
- Overmyer, K., Wrzaczek, M., Kangasjärvi, J., 2009. Reactive Oxygen Species in Ozone Toxicity. *Environmental Pollution* 125, 31–40.

- Pedroso, AN.V. Alves, E.S., 2015. Temporal dynamics of the cellular events in tobacco leaves exposed in São Paulo, Brazil, indicate oxidative stress by ozone. *Environmental Science and Pollution Research* DOI 10.1007/s11356-014-4025-y.
- Percy, K.E., Legge, A.H., Krupa, S.V., 2003. Tropospheric ozone: A continuing threat to global forests? In: Karnosky, D.F., Percy, K., Chappelka, A.H., Simpson, C., Pikkarainen, J. *Air Pollution, Global Change and Forests in the New Millennium*. Elsevier.
- 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.
- Rezende, F.M., Furlan, C.M., 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76, 1445–1450.
- Roschina, V.V., Roschina, V.D., 2003. *Ozone and plant cell*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sandre, A.A., Pina, J.M., Moraes, R.M., Furlan, C.M., 2014. Anthocyanins and tannins: is the urban air pollution an elicitor factor? *Brazilina Journal of Botany* 37, 9–18.
- Sant’Anna, S.M., Espósito, M.P., Domingos, M. & Souza, S.R., 2008. Suitability of *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment* 151, 389– 394.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Camp, W.V., Inze, D., Langebartels, C., Sandermann, Jr.H., 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal* 16, 235–245.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* doi:10.1155/2012/217037.
- Soares, A.M.S. Machado, O.L.T., 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica* 1, 9–19.
- Souza, S.R., Sant’Anna, S.M., Rinaldi, M.C.S., Domingos, M., 2009. Short-term Leaf Responses of *Nicotiana tabacum* ‘Bel-W3’ to Ozone under the Environmental Conditions of São Paulo, SE – Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 251– 258.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3ed. Artmed.
- Tanaka, R., Hirashima, M., Satoh, S., Tanaka, A., 2003. The *Arabidopsis-accelerated cell death* gene *ACDI* is involved in oxygenation of pheophorbide *a*: inhibition of the pheophorbide *a* oxygenase activity does not lead to the “stay-green” phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 44, 1266–1274.
- Tresmondi, F., Alves, E.S., 2011. Structural changes in *Psidium guajava* ‘Paluma’ leaves exposed to tropospheric ozone. *Acta Botanica Brasilica* 25, 122–129.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 1999. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.
- 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.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. *Phenolic compound biochemistry*. Published by Springer ISBN: 978-1-4020-5163-0.

- Vollenweider P., Fenn M.E., Menard T., Günthardt-Goerg M., Bytnerowicz A., 2013. Structural injury underlying mottling in ponderosa pine needles exposed to ambient ozone concentrations in the San Bernardino Mountains near Los Angeles, California. *Trees* 27, 895- 911.
- 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.
- Yao, N., Greenberg, J.T., 2006. Arabidopsis accelerated cell death2 modulates programmed cell death. *The Plant Cell* 18, 397–411.

Capítulo 1

Marcadores microscópicos para a validação de sintomas em espécie nativa a ser empregada no biomonitoramento do ozônio

Francine Faia Fernandes^a, Bárbara Baesso Moura^b e Edenise Segala Alves^c

^a Programa de pós graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.

^b Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

^c Núcleo de Pesquisa em Anatomia, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.

Resumo

O ozônio é um poluente fitotóxico que pode causar injúrias visíveis em plantas e estas auxiliam na identificação de áreas com risco potencial à vegetação. Marcadores microscópicos permitem a validação das injúrias em campo. Os objetivos deste estudo foram acompanhar e descrever as injúrias visíveis em folíolos de plantas jovens de *A. graveolens* ao longo do tempo, em situação de campo e validá-los como decorrentes de O₃, com base em marcadores microscópicos, além de testar em campo o potencial bioindicador de O₃ dessa espécie. *A. graveolens* apresentou injúrias do tipo *stippling* marcadas pela de oxidação de protrusões presentes no apoplasto e da parede celular. Os índices de injúrias testados mostraram linearidade com a SUM0, assim, a espécie pode ser empregada no biomonitoramento do O₃.

Palavras-chave: estresse oxidativo, injúrias visíveis, *stippling*, *Astronium graveolens*, Anacardiaceae

Abstract

Ozone (O₃) is a phytotoxic pollutant that can cause visible injuries on plants and these injuries can be used as indicators of the potential risk to vegetation. Microscopic markers allow the validation of injuries in the field. This study aimed to monitor and describe over time the visible injuries on seedling leaflets of *A. graveolens*, and also to validate the injuries as resulting from O₃, based on microscopic markers. In addition aimed to test the O₃ bioindicator potential of this species in the field. *A. graveolens* showed stippling marked by the oxidation of apoplastic wart-like protrusions and cell wall. The injury index showed linear correlation with Sum0, thus the species can be used in the biomonitoring O₃

Keywords: Anacardiaceae, *Astronium graveolens*, oxidative burst, stippling, visible injuries.

1. Introdução

A Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), onde residem cerca de 20 milhões de habitantes (IBGE, 2014) enfrenta problemas com relação à qualidade do ar devido aos poluentes provenientes, principalmente da sua frota automotiva, que produz precursores de ozônio (O₃). Na RMSP, o O₃ ultrapassa inúmeras vezes o padrão de qualidade do ar estabelecido para o Estado de São Paulo de 80 ppb em 1h (CETESB, 2012), e, em 2012 esse padrão foi ultrapassado muitas vezes, principalmente nas épocas mais quentes do ano, primavera e verão (CETESB, 2012). Apesar do padrão de qualidade do ar se referir à saúde humana (CETESB, 2012), valores, como os registrados, também são potencialmente prejudiciais à saúde das florestas (Paoletti et al., 2007). Diferentes índices foram criados para estimar o risco do O₃ à vegetação e estabelecer limites de proteção. Entre eles a SUM 00 (soma de todas as concentrações horárias em um ano) e a SUM 60 (soma das concentrações horárias superiores a 60 ppb em um ano), criadas nos Estados Unidos, e a AOT40 (dose acumulada acima de 40 ppb durante a estação de crescimento) mais empregada na Europa (Paoletti et al., 2007).

Além dos índices citados, com base em parâmetros biológicos, é possível avaliar se há concentrações fitotóxicas de O₃ no ambiente. Assim, índices baseados nas injúrias visíveis em folhas podem auxiliar na identificação de áreas com risco potencial à vegetação (Manning, 2003; Sanz & Calatayud, 2009; ICP, 2010). Mesmo apresentando grande variabilidade, as injúrias visíveis decorrentes do O₃ compartilham traços em comum e podem ser utilizadas para fins de bioindicação do poluente (Paoletti et al., 2009), sendo a espécie bioindicadora aquela que responde de modo específico e característico quando submetida a concentrações expressivas de O₃, podendo ser um detector biológico e ecológico significativo (Manning, 2003).

Entre as injúrias visíveis características provocadas por O₃ destacam-se: clorose (*chlorosis*), manchas cloróticas (*chlorotic mottling*), branqueamento (*bleaching*), necroses (*flecking*), pequenas manchas puntiformes com pigmentação de coloração vermelha a marrom escuro (*brown or red stippling*), avermelhamento foliar (*reddening*), que sempre estão presentes entre nervuras na face adaxial da folha (Krupa et al., 2001; Novak et al., 2003; Orendovici et al., 2003; Vollenweider et al., 2003; Rezende & Furlan, 2009; Sanz & Calatayud, 2009; ICP 2010). Apesar das injúrias visíveis não incluírem todas as formas possíveis de prejuízo às florestas, avaliar sua presença pode ser uma ferramenta valiosa no estabelecimento do impacto de O₃ em espécies sensíveis (Sanz & Calatayud, 2009; ICP, 2010). Porém, o reconhecimento da injúria visível exige treino e muitas espécies apresentam injúrias que são facilmente confundíveis com processos naturais como o de senescência, que devem ser desconsiderados nos estudos que tratam do biomonitoramento (Bussoti et al., 2003). Dentre os tipos de injúrias,

as pontuações intervernais (*stippling*), restritas à superfície adaxial das folhas, são de fácil detecção, o que permite maior precisão na avaliação do efeito fitotóxico do O₃ (Bussotti et al., 2006).

As injúrias induzidas por O₃ já foram avaliadas em mais 75 espécies na Europa e em, 66 espécies norte-americanas, entre árvores arbustos e ervas, e a maioria foi validada em condições controladas (Innes et al., 2001; Orendovici et al., 2003; Porter, 2003; <http://www.gva.es/ceam/ICP-forests/>). Os muitos estudos, especialmente aqueles baseados em fumigação, sugerem que análises microscópicas dos tecidos foliares são uma ferramenta eficaz para validar as injúrias visíveis e, conseqüentemente, avaliar o prejuízo que o O₃ causa à vegetação. Da mesma forma que as injúrias visíveis, muito dos marcadores microscópicos são observados nas diferentes espécies já estudadas (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007; Faoro & Iriti, 2009). Dessa forma, esses padrões já estabelecidos contribuem na determinação das respostas ao estresse decorrente O₃ em espécies ainda pouco estudadas.

A utilização de marcadores microscópicos, que indicam mudanças em nível celular e na composição química dos tecidos (Kivimäenpää et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007), apresenta: uma série de vantagens já que permite: (1) separar indicadores de estresse oxidativo causado por agentes bióticos, incluindo fungos e bactérias, daqueles causados por O₃; (2) comparar respostas de plantas em campo com aquelas obtidas sob condições controladas, (3) e estabelecer estágios iniciais de alterações nos tecidos muito antes do aparecimento da injúria visível (Kivimäenpää et al., 2003; Vollenweider et al., 2003).

Embora existam muitos estudos sobre os efeitos do O₃ em espécies arbóreas, praticamente todos foram realizados com espécies de regiões temperadas ou mediterrâneas, portanto estudos com espécies nativas são necessários. Alguns experimentos já foram realizados com espécies nativas do Brasil para avaliar os efeitos do O₃ quanto a presença das injúrias visíveis (Furlan et al., 2007; Furlan, 2008; Moura, 2013). Além disso, marcadores microscópicos foram também avaliados em espécies arbóreas nativas (Moura, 2013), incluindo *Astronium graveolens* fumigada em câmaras fechadas enriquecidas com O₃. A espécie respondeu ao poluente com injúrias visíveis de fácil detecção em campo e com marcadores microscópicos similares aos descritos na literatura, além de outros específicos (Moura, 2013).

Os objetivos deste estudo foram descrever as injúrias visíveis apresentados por *A. graveolens* ao longo do tempo e validá-las como decorrentes de O₃ com base em marcadores microscópicos, além de testar em campo o potencial bioindicador de O₃ dessa espécie. A hipótese deste estudo é que *A. graveolens* na presença do O₃ vai apresentar sintomas característicos quando exposta em campo, em local que apresenta concentrações significativas desse poluente, e que os marcadores microscópicos permitirão validar esses sintomas.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização da espécie e do local de estudo

Astronium graveolens Jacq. (Anacardiaceae) é uma espécie arbórea nativa semidecidual (Carvalho, 1994) classificada como secundária inicial (Ribeiro et al., 2005). Apresenta folhas compostas, imparipinadas, com folíolos opostos (Fig. 1A-C).

Plantas de *A. graveolens* foram expostas no Fitotério do Instituto de Biociências (23°33'58''S, 46°43'53''W) localizado na Universidade de São Paulo – Campus Butantã, zona oeste da capital paulista. Próximo ao local de estudo, encontra-se a estação IPEN-USP, de monitoramento da qualidade do ar da CETESB (Companhia Ambiental de São Paulo), que monitora ininterruptamente as concentrações horárias de ozônio (O₃) e de outros poluentes aéreos, além de registrar dados meteorológicos. Essa estação, desde que foi instalada em 2007, tem registrado altas concentrações de O₃ no local, que ultrapassam o padrão de qualidade do ar (160 µg/m³ ≈ 80 ppb) e os níveis de atenção, (200 µg/m³ ≈ 102 ppb), estabelecidos pela resolução CONAMA nº 03/90 e pela Legislação do Estado de São Paulo que, a partir de 2013, estabeleceu para o estado como padrão de qualidade do ar para o O₃: 140 µg/m³- 8 h, mantendo o mesmo valor para o nível de atenção (200 µg/m³ - 8h).

2.2. Modo de cultivo e exposição das plantas

Mudas de *A. graveolens*, com cerca de 25cm de altura e quatro pares de folhas totalmente expandidas, foram adquiridas de viveiro certificado (Bioflora, São Paulo); estas foram transplantadas para vasos de 2L com cordões de náilon inseridos nos mesmos. Cinco mudas foram plantadas em vasos de 35L. Utilizou-se como substrato casca de pinus (Tropstrato HT Hortaliças – Vida Verde®) e vermiculita na proporção 3:1. As plantas foram mantidas para aclimação, por um período de um a dois meses, em casa de vegetação situada no Instituto de Botânica (23°38'28"S - 46°37'22"W), localizado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), sob ar filtrado e sombrite, que permitiu 65% da passagem de luz. Durante esse período, as plantas foram regadas diariamente e adubadas a cada 10 dias com Peters (10:10:10). Após o período de aclimação, 6 a 10 plantas foram mantidas na casa de vegetação, servindo como material de referência, e 12 a 25 plantas foram expostas em campo, sob condições ambientais monitoradas. As plantas foram dispostas em suportes metálicos com sombrite 35%, no teto e nas laterais, idêntico ao usado na casa de vegetação. Nos suportes, foram dispostas três caixas plásticas com água e essas foram cobertas com tela metálica para dar sustentação à placa de

isopor perfurada sobre a qual os vasos foram dispostos (Fig. 1F). A irrigação das plantas se deu por capilaridade através de cordões de nylon submersos na água das caixas. O sistema descrito e o posicionamento dos suportes em campo estão de acordo com o protocolo recomendado pelo VDI (VDI 2003). No início e ao longo das exposições, as folhas de todas as plantas foram numeradas sequencialmente da base para o ápice, sendo diferenciadas as folhas já existentes no início das exposições e denominadas folhas velhas (FV) daquelas que surgiram ao longo das exposições e denominadas folhas jovens (FJ). Cada exposição teve a duração de 90 dias (13 semanas), totalizando quatro exposições que abrangeram todas as estações do ano, com início em setembro/2012 e término em outubro/2013 (1ª exposição: 06/09/2012 a 06/12/2012; 2ª exposição: 21/01/2013 a 21/04/2013; 3ª exposição: 23/04/2013 a 21/07/2013; e 4ª exposição: 23/07/2013 a 26/10/2013;). As cinco plantas mantidas em vasos de 35L permaneceram em campo por 365 dias (52 semanas), com o objetivo de registrar a aparência das injúrias visíveis ao longo do tempo.

2.3. Identificação e quantificação dos sintomas visíveis em campo

Semanalmente, todas as folhas foram avaliadas, com a ajuda de uma lupa de 10 x de aumento, quanto à presença de injúrias visíveis suspeitas de serem decorrentes de O₃, tomando-se como base o trabalho de Moura (2013) que expos *A. graveolens* ao O₃ em situação controlada.

Tais injúrias foram previamente divididas em quatro categorias e registradas em uma ficha de campo (Anexo 1). As categorias foram criadas para evitar a perda de informações, uma vez que no início das exposições ainda não tínhamos certeza de quais seriam as injúrias seguramente decorrentes do O₃. Para três das categorias: pontuação marrom (PM), mancha (M) e sintoma novo (SN) estimou-se a porcentagem da área de folíolo ocupada por cada uma delas. A quarta categoria (pontuação branca-PB) não foi quantificada por se tratar de uma injúria muito pequena. Somente após a validação das injúrias, com base nos marcadores microscópicos (item 3.3), desconsideramos as informações relacionadas às categorias M, SN e PB, que não mostraram marcadores microscópicos característicos de O₃.

A quantificação das injúrias foi baseada nas recomendações do Manual do ICP (2004) que classifica os sintomas em: 0 (sem sintomas visíveis induzidos por ozônio), 1 (1%-5% de sintomas visíveis induzidos por O₃), 2 (6%-50% de sintomas visíveis induzidos por O₃) e 3 (51%-100% de sintomas visíveis induzidos por O₃ – Anexo 2). Foi calculado semanalmente o Índice de Injúria de Folíolos (IIFL), baseado em El-Khatib (2003) e modificado de acordo com as classes recomendadas pelo ICP e já descritas:

$$\text{IIFL (\%)} = \frac{(\text{N}_1 \times 1) + (\text{N}_2 \times 2) + (\text{N}_3 \times 3)}{(\text{N}_0 + \text{N}_1 + \text{N}_2 + \text{N}_3) \times 3} \times 100$$

Onde N_1 , N_2 , N_3 representam a quantidade de folhas com sintomas classificados respectivamente na classe 1, classe 2, classe 3, e N_0 é o número de folhas que não apresentaram sintomas foliares visíveis induzidos por O_3 .

Foram também estabelecidas semanalmente outros dois índices indicativos de injúrias: a incidência (INC) - porcentagem de plantas com injúria em relação ao número total de plantas e a severidade em folhas (SF) e folíolos (SFL) - porcentagem de folha/folíolos com injúria em relação ao número total de folhas/folíolos, descritos por Chappelka et al. (1997).

Ao final de cada exposição, os sintomas foram fotografados para não se perder nenhuma informação, uma vez que a validação dos mesmos como decorrentes do O_3 estava em curso.

2.4. Análise microscópica

Durante a primeira exposição, regiões das folhas com injúrias visíveis potencialmente decorrentes de O_3 foram seccionadas a fresco, a $20\mu\text{m}$, em micrótomo de congelamento Leica CM100; as secções foram observadas em microscópio de campo claro (Olympus BX53) para uma prévia avaliação das injúrias e em microscópio de epifluorescência (Olympus BX53) - filtro azul tipo LBD, para avaliação da fluorescência das clorofilas (Adams & Lintilhac, 1993). Injúrias que não estavam restritas ao mesófilo ou que aparentavam ser induzidas por outros fatores, como patógenos, não foram consideradas. Assim, com base nessa análise microscópica inicial e no trabalho de Moura (2013), estabeleceu-se o que potencialmente seriam as injúrias decorrentes do O_3 e que foram exaustivamente avaliadas ao longo do estudo, por meio de análises estruturais e testes histoquímicos indicados na Tabela 1.

Para tanto, ao final de cada exposição, fragmentos com cerca 1 mm de folhas sintomáticas expostas em campo e de folhas assintomáticas mantidas na casa de vegetação sob ar filtrado foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato Soerensen 0,067 M, pH 7, colocados sob vácuo e armazenados a 4°C , para análises posteriores. Parte do material foi desidratado em série etanólica e incluído em Histo-resina Leica e/ou resina LR White, e secções semi-finas de $1,25\mu\text{m}$ foram obtidas em ultramicrótomo Leica EM UC6. Foram selecionadas e observadas, para cada teste histoquímico específico e para as análises estruturais, 5 secções de 3 a 8 plantas sintomáticas e de 2 plantas assintomáticas por exposição. As secções, após serem submetidas aos diferentes testes (Tabela 1), foram montadas em Fluoromount (Sigma-Aldrich) ou Neomount (Merck), de acordo com a exigência de cada teste. Testes histoquímicos também foram realizados em material fresco (Tabela 1), sendo as lâminas montadas em glicerina 50%.

As observações foram realizadas em microscopia de campo claro e epifluorescência (microscópio Olympus BX53), sendo as imagens capturadas com câmera Olympus (Q Color5) acoplada ao microscópio com interface através do software Image Pro-express 6.3.

Tabela 1. Testes para análise estrutural e histoquímicos aplicados em *A. graveolens*.

Corante/Reagente	Referência	Solução	Tempo de Coloração/Reação (min)	Cor em luz transmitida	Excitação (nm)	Marcador	Fig.
Sem tratamento*	-	secção fresca ou fixada em glicerina 50%	-	-	-	Visão geral	3A,B,C,D
Autofluorescência*	-	secção fresca em fluoromount	-	-	340-380	Clorofila/liginina/polifenóis	3E
Azul de Toluidina	Feder & O'Brien, 1968	1% Aq.	8	Azul	450-490	polifenóis	3F
/p Phenilenediamina	Kivimäempää et al., 2004	1% Aq. / 1% em iso-propanol:methanol = 1:1	8	Azul /Cinza escuro	-	Metacromático	3L
PARS	Gahan, 1984	0,5% ácido periódico; reagente Schiff ; 0,5% metabisulfito de potássio em 0.05 N HCL	10; 20; 3x5	Rosa	-	Lipídios	3H,I
Coomassie Blue	Wetzel et al., 1989	0,025% comassie brilliant blue em etanol: ácido acético 3:1	25	Azul claro	-	Polissacarídeos	3M,Q
Xylidine Ponceau	Vidal, 1970	1% de xylidine em ácido acético: 3%	25	Vermelho	-	Proteínas	3R,S
Azul de Anilina	Gerlach, 1984	0,01% em solução tampão pH 8,2	10	-	340-380	Calose	Não mostrado
Calcofluor White	Munch, 1989	1% calcofluorwhite M2R em etanol: 50%	4	-	340-380	Celulose	3N,O
Corifosfina	Weis et al., 1988	0,03% corifosfina Aq.	2	-	450-490	Pectina	3J
Vermelho de Rutênio	Gregory & Baas, 1989	0,01% Aq.	10	Rosa/Vermelho	-	Pectina	3K
Cloreto férrico	Johansen, 1940	10% Aq.	5 dias	-	-	Compostos fenólicos	3P
Vanilina Ácida*	Sarkar & Howarth, 1976	vanilina 10%	Observado no reagente	Marrom/preto Vermelho	-	Proantocianidinas	Não mostrado
DMACA	Modificado de acordo com Gutmann & Feucht, 1991	0,1% DMACA em butanol: 98% H ₂ SO ₄ = 20:1	potência 450 W com ciclos de irradiação de 15 s em microondas	Azul	-	Proantocianidinas	3G

* secções obtidas em micrótomo de congelamento

2.5. Monitoramento das variáveis climáticas e das concentrações atmosféricas de ozônio

Para a caracterização ambiental do local de exposição, dados horários de temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e a radiação global, foram monitorados por uma estação meteorológica (WatchDog, Spectrum, IL, USA) implementada nas proximidades dos suportes com as plantas. Tais dados foram também disponibilizados pelo IAG-USP (Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP). A radiação fotossinteticamente ativa (*photosynthetic active radiation*, PAR) foi calculada com base na radiação global disponibilizada pelas estações. O déficit de pressão de vapor (*vapor pressure deficit*, VPD) foi calculado com base nas médias de temperatura e umidade relativa do ar dos dias de exposição, por meio de software Autogrow Sistema Ltd. (<http://www.autogrow.com/downloads/download-software-e-drivers>).

Para caracterização das condições do ambiente na casa de vegetação, outra estação meteorológica (WatchDog, Spectrum, IL, USA) foi posicionada no local a partir da segunda exposição, de janeiro a dezembro de 2013, onde dados horários de temperatura e umidade foram registrados. Os mesmos, foram registrados também por sensores conectados a um registrador de dados a cada 10 minutos para complementar dados não disponíveis.

Para a caracterização do ambiente no local de exposição, as concentrações horárias de O₃, registradas na estação IPEN-USP da CETESB, foram acessadas em (<http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/32-qualar>). Para os dados faltantes, concentrações atmosféricas de O₃ foram retiradas de outras estações da CETESB mais próximas do local de estudo. As médias e máximas de O₃ das 24h e as médias e máximas para o período de luz (8:00 as 18:00) foram calculadas. Com base em dados horários das 8:00 às 18h, foi calculada a AOT40 anual (exposição acumulada de ozônio acima de um limiar de 40 ppb), para o período todo de exposição e com os dados horários das 24h foi calculado a SUM0 (soma das concentrações médias horárias de ozônio) e a SUM06 (soma das concentrações horárias médias de ozônio $\geq 0,06$ ppm h).

Considerando-se o sistema de filtragem de ar da casa de vegetação, as concentrações atmosféricas de O₃ no seu interior foram insignificantes ($< 10 \mu\text{g m}^{-3} = 20$ ppb, Bulbovas et al., 2010).

2.6. Análise estatística

As diferenças estatísticas dos índices de injúrias visíveis entre as exposições foram testadas usando One-Way ANOVA “repeated measurements” considerando todas as datas amostrais, seguido do teste Tukey para verificar interações ($p < 0,05$).

Ainda, para cada um dos índices indicativos de injúrias visíveis estabelecidos, e com todas as datas amostrais, foi realizada uma análise de regressão dessas variáveis dependentes em conjunto com as variáveis independentes: médias ou máximas de temperatura (T), umidade relativa do ar (UR), déficit de pressão de vapor (VPD) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e os valores acumulados de precipitação (P) e PAR, empregando-se o método de “backward stepwise”. Quando necessário, as variáveis dependentes passaram por transformações apropriadas. Variáveis independentes relacionadas, como VPD, T e UR, não foram analisadas em conjunto. Com base em matrizes de correlação previamente estabelecidas (dados não mostrados), foi realizada a seleção das variáveis que passaram nos testes de normalidade e homocedasticidade. Apenas o modelo mais explicativo para cada indicador, ou seja, aquele com o maior coeficiente de determinação – r^2 , foi selecionado e apresentado nos resultados. Foi também realizada a correlação de Pearson entre SUM0 e a SUM06 com todos os índices de injúria (IIFL, INC, SF, SFL) para determinar qual foi aquele que melhor se correlacionou com os índices de O_3 .

3. Resultados

3.1. Caracterização ambiental

A casa de vegetação apresentou médias de temperatura de 19°C a 25°C, umidade relativa do ar de 62% a 78%.

Para a caracterização ambiental do campo, nas quatro exposições (Fig. 1A-H), consideramos as médias de variáveis meteorológicas que estatisticamente mostraram influência na expressão das injúrias visíveis, além de alguns valores máximos dessas variáveis. Dessa forma, foi excluído o déficit de pressão de vapor (VPD), que não mostrou essa influência. Cabe destacar que a maior parte da 1ª exposição (70% do período) abrangeu o período chuvoso, indicado na figura 1 pela cor cinza, enquanto que a 2ª exposição foi realizada inteiramente nesse período. Já a 3ª exposição foi realizada no período seco, indicado na mesma figura pela cor branca, enquanto que 70% da 4ª exposição ocorreu também no período seco.

O período chuvoso apresentou precipitação acumulada de cerca de 100 mm (Fig. 1A) a 350 mm (Fig. 1B) enquanto que no período seco a precipitação foi de 0 mm a 25 mm (Fig. 1A, C-D). De maneira geral, no período chuvoso, em relação ao período seco, os valores médios da PAR foram maiores, variando \approx de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1A-B) a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1D) e $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1D) a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1A), respectivamente; a temperatura média foi mais alta: cerca de 15°C (Fig. 1D) a 25°C (Fig. 1B) e 10°C (Fig. 1D) a 20°C (Fig. 1C-D), respectivamente. Da mesma forma, valores máximos de temperatura ocorreram no período chuvoso (33°C a 36°C) em comparação com o período seco (29°C a 34°C). Na transição do período seco para o chuvoso, ocorreu uma queda acentuada da temperatura e um pico da PAR (Fig. 1A e D). Independentemente dos períodos de exposição, os valores médios de umidade relativa do ar foram altos, variando entre 60% e 100% (Fig. 1D), estando as máximas entre 98% e 100%.

As condições meteorológicas foram favoráveis para formação de O_3 durante todo o período de exposição das plantas em campo, porém, nas exposições que apresentaram alta PAR ocorreram maiores índices de exposição cumulativa de O_3 . Ao final de cada exposição, com duração de 13 semanas cada uma (90 dias), valores maiores de SUM0 e SUM06 foram determinados na 1ª exposição (SUM0= 55 ppm h e SUM06= 3 ppm h - Fig. 1E) seguidos da 2ª (SUM0= 45 ppm h e SUM06= 0,9 ppm h - Fig. 1F), 4ª (SUM0=38 ppm h e SUM06= 0,6 ppm h - Fig. 1H) e 3ª exposição (SUM0= 26 ppm h e SUM06=0,2 ppm h - Fig. 1G). Na 4ª exposição, as concentrações de O_3 aumentaram ao término do período seco e início do período chuvoso, quando a PAR atingiu os picos mais altos em relação a todas as outras exposições.

3.2. Caracterização das injúrias visíveis

Para caracterizar as injúrias visíveis, foram avaliados, ao final das exposições, 1.732 folíolos de *A. graveolens* em casa de vegetação (Fig. 2B) e 3.344 folíolos em campo (Fig. 2F). Em campo, foram observadas injúrias visíveis caracterizadas macroscopicamente como pontuações intercostais castanhas, o tipo denominado inicialmente de “pontuação marrom (PM)”, semelhantes a *stipplings*, de distribuição homogênea por todo limbo foliolar (Fig. 2G-J) em ambas as faces (Fig. 2G-H), independentemente da exposição; já nas plantas mantidas em casa de vegetação não foram observadas injúrias semelhantes (Fig. 2D-E). Além disso, as injúrias foram mais frequentes em folhas mais velhas em relação às mais novas, possivelmente devido ao maior tempo de exposição ao O_3 . Plantas mantidas por até 12 meses em campo

apresentaram, ao final da exposição, folhas mais escuras e mais coriáceas em relação às plantas mais jovens, com os mesmos tipos de injúria, porém aparentemente maiores (Fig. 2I).

Cabe destacar que análises estruturais e testes histoquímicos permitiram estabelecer marcadores microscópicos que validaram as injúrias visíveis como decorrentes do O₃. Tais marcadores serão apresentados a seguir.

3.3. Marcadores microscópicos validadores das injúrias visíveis

Independentemente do tempo exposição, os mesmos marcadores foram observados nas amostras expostas em campo. Os marcadores mais importantes foram sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Marcadores microscópicos decorrentes do ozônio observados em *A. graveolens*.

Resposta fisiológica	Marcador microscópico	Casa de vegetação	Campo	Fig.
Estresse oxidativo	Protrusões de parede celular voltadas para o apoplasto	+	++	3D,I,J,K
	Oxidação das protrusões	-	+++	3D,K
	Oxidação da parede celular	-	++	3D
Alteração na eficiência fotossintética	Alteração na fluorescência das clorofilas	-	+++	3E
Acúmulo de antioxidantes	Acúmulo de polifenóis nas células do parênquima paliçádico	-	++	3F
Reação de defesa e reparação	Deposição de celulose provocando espessamento da parede celular	-	++	3O
Resposta de hipersensibilidade (HR-like)	Tipo de morte celular rápida (PCD) Pequenos grupos distintos de células; Colapso das células do parênquima paliçádico; Desorganização do conteúdo celular; Acúmulo de antioxidantes	-	++	3L,M

- = não observado,

+ = > 50% das amostras observadas;

++ = < 50% das amostras observadas

+++ = 100% das amostras observadas

Ao nível dos tecidos, a injúria visível observada em *A. graveolens* (*stippling*) se caracterizou pela oxidação de compostos fenólicos presentes em células do parênquima paliçádico (Fig. 3A vs B). Empregando-se o corante azul de toluidina, acrescido do reagente p-fenilodiamina, confirmou-se a natureza desses compostos, que não foram observados em amostras assintomáticas (Fig. 3H vs I). Além disso, intensa oxidação nas paredes celulares e nas protrusões presentes nas mesmas (Fig. 3C vs D,K) conferiram a coloração acastanhada à

injúria. Tais protrusões, de origem péctica (Fig. 3J-K) e voltadas para o apoplasto, foram mais frequentes no parênquima lacunoso (Fig. 3I), próximo às câmaras subestomáticas, o que levou à presença da injúria visível também na face abaxial do folíolo (Fig. 2H), o que não foi observado em amostras assintomáticas (Fig. 3H).

Ainda na região do *stippling* foi observada a perda da fluorescência primária das clorofilas. Essa alteração sempre se apresentou restrita às células do parênquima paliçádico, sem atingir células do parênquima lacunoso, que mantiveram o padrão vermelho da autofluorescência das clorofilas (Fig. 3E). Na mesma região, foi observado o acúmulo de polifenóis no vacúolo de células do parênquima paliçádico (Fig. 3F), porém, com base em testes específicos para detecção desses compostos (Tabela 1) não foi observado o acúmulo de proantocianidinas (taninos condensados). Na região da injúria visível, algumas células colapsadas apresentaram aspecto diferente quanto ao acúmulo de compostos e, na região mais colapsada (Fig. 3G-seta), os compostos apresentaram aspecto mais denso quando comparado aos da porção inferior da célula (Fig. 3G).

Em regiões dos folíolos com *stippling*, em grupos distintos de células do parênquima paliçádico, observou-se colapso parcial ou total das paredes, alteração no formato e condensação dos cloroplastos e desorganização do conteúdo celular (Fig. 3L-M). O teste para polissacarídeos (Tabela 1) foi positivo nas células da região sintomática (Fig. 3M-asterico). Na mesma região, foi observado acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos das células do parênquima paliçádico (Fig. 3M- cabeça de seta).

Em amostras sintomáticas ocorreu o espessamento de parede celular provocado pela deposição de celulose e pectina, comparado a amostras assintomáticas que apresentaram paredes mais finas (Fig. 3N vs O). Essa deposição não foi homogênea, uma vez que se observou diferença no brilho das paredes, sendo este maior nas células do parênquima lacunoso próximo às câmaras subestomáticas (Fig. 3O). Não foi evidenciado espessamento de parede devido a deposição de calose (figura não mostrada).

Com base nos resultados positivos dos testes para polissacarídeos (Fig. 3Q) e compostos fenólicos totais (Fig. 3P), em amostras sintomáticas, constatou-se o acúmulo de compostos fenólicos glicosilados no apoplasto, ocupando grande parte dos espaços intercelulares próximo a câmaras subestomáticas. Além disso, na mesma região, não foi evidenciado espessamento maciço devido a polissacarídeos de parede como calose e celulose (figura não amostrada).

Adjacente a região do *stippling*, foi observada diminuição na quantidade de cloroplastos que se apresentaram com formato mais arredondado e com acúmulo de plastoblóbulos, além da ausência de grãos de amido (Fig. 3S) em comparação com as amostras assintomáticas, que

apresentaram cloroplastos discoides, presentes na região periférica das células do parênquima paliádico (Fig. 3R).

3.4. *Quantificação das injúrias visíveis*

O surgimento das injúrias visíveis na 1ª e 2ª exposições ocorreu entre a segunda e terceira semanas, enquanto que na 3ª e 4ª exposições este se deu a partir da quarta semana (Fig. 1E-F vs G-H).

No período chuvoso, os índices de injúrias visíveis foram maiores em relação ao período seco, o que se observa claramente nas exposições que abrangeram esses dois períodos, como a 1ª e 4ª exposições (Fig. 1E,H). Além disso, tais índices aumentaram ao longo do tempo em todas as exposições. Os maiores valores coincidiram com as exposições que apresentaram maior SUM0 e SUM06. Assim, na 1ª exposição seguida da 2ª, foram encontrados índices mais altos em comparação com os valores encontrados na 3ª e 4ª exposições (Fig. 1E-F vs G-H).

Na 1ª e 2ª exposições o INC atingiu valores $\geq 50\%$ na sexta e quarta semanas, respectivamente (Fig. 1E-F), enquanto na 3ª e 4ª exposições, o INC só atingiu valores $\geq 50\%$ na décima e décima primeira semanas, respectivamente (Fig. 1G-H). O INC, ao final de cada exposição, foi cerca de: 90% (1ª e 2ª exposições), 80% (3ª exposição) e 60% (4ª exposição - Fig. 1E-H). Não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a 1ª e 2ª exposições (58% e 61%, respectivamente) ou entre a 3ª e 4ª exposições (29% e 21%, respectivamente - Tabela 3), mas a 1ª e 2ª diferiram da 3ª e 4ª.

Na 1ª exposição a SF atingiu valores $\geq 50\%$ na nona semana de exposição, enquanto a SFL atingiu tais valores na última semana (Fig. 1E). Ao final de cada exposição SF e SFL foram, respectivamente, cerca de: 70% e 60% (1ª exposição -Fig. 1E), 50% e 30% (2ª exposição--Fig. 1F), 30% e 10% (3ª exposição--Fig.3G), 30% e 20% (4ª exposição-Fig. 1H). O decréscimo nos valores de SF e SFL na 2ª, 3ª e 4ª exposições decorreu da queda de folhas com injúrias visíveis, que foram substituídas por folhas novas (Fig. 1F-H). Como se vê na tabela 3, a maior diferença na SF foi encontrada entre a 1ª e a 4ª exposições (32% e 7%), enquanto que na SFL a maior diferença foi entre a 1ª e 3ª exposições (23% e 4%).

O IIFL na 1ª e 2ª exposições foi cerca de 10% e 5% respectivamente, enquanto a 3ª e 4ª exposições foi de 2%. A maior diferença significativa foi encontrada entre a 1ª e a 3ª exposições (8% e 2%).

Tabela 3. Índices de injúrias visíveis (média \pm erro; mediana). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as exposições; INC: Incidência; SF: Severidade em folha; SFL: Severidade em folíolo; IIFL: Índice de injúria em folíolos.

Índice de Injúria (%)	1ª exposição	2ª exposição	3ª exposição	4ª exposição
INC	a	a	b	b
	58 \pm 11	61 \pm 10	29 \pm 8	21 \pm 9
	70	84	16	20
SF	a	ab	bc	c
	32 \pm 7	27 \pm 5	11 \pm 3	7 \pm 2
	26	35	10	6
SFL	a	ab	c	bc
	23 \pm 5	16 \pm 3	4 \pm 1	5 \pm 1
	15	21	3	4
IIFL	a	ab	c	bc
	8 \pm 2	5 \pm 1	2 \pm 0,4	2 \pm 1
	6	6	2	3

Dentre os índices de injúria estudados, o IIFL foi o que melhor se correlacionou com a SUM06 ($r = 0,868$) e, especialmente, com a SUM0 ($r = 0,908$), embora os demais índices também se correlacionaram de forma significativa ($p < 0,001$ - tabela 4).

Tabela 4. Correlação de Pearson entre os índices de ozônio (O_3) e os índices de injúrias visíveis. Incidência (INC), Severidade em folhas (SF), Severidade em folíolos (SFL) e Índice de Injúria em folíolos (IIFL).

Índice de O_3	Índice de Injúria	r
SUM0	INC	0,869
	SF	0,882
	SFL	0,883
	IIFL	0,908
SUM06	INC	0,673
	SF	0,795
	SFL	0,852
	IIFL	0,868

Todos os valores foram significativos ($p < 0,001$)

3.5. Influência do ozônio e das variáveis meteorológicas na expressão das injúrias visíveis

A análise de regressão multivariada indicou que os índices de injúria visível, foram explicados por combinações lineares significativas de flutuações nos níveis de O_3 e nas

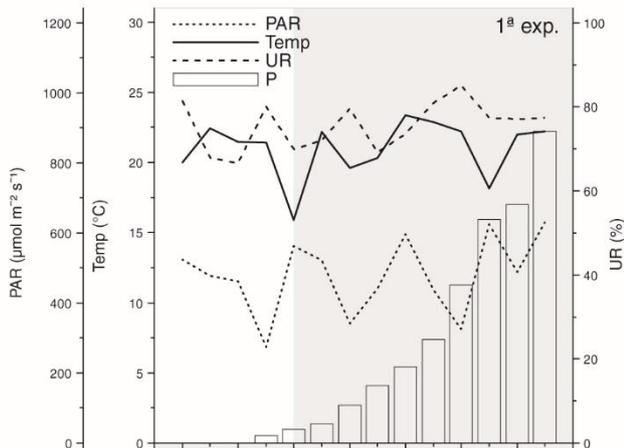
variáveis meteorológicas. As injúrias visíveis apresentaram correlação positiva com a SUM0 e SUM06, PAR acumulada e com as médias e máximas de temperatura e umidade relativa do ar, enquanto apresentaram correlação negativa com a precipitação acumulada (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis ambientais preditivas que influenciaram significativamente nas injúrias visíveis de *A. graveolens* exposto de setembro/12 a out/2013 (incluindo dados de todas as coletas). T: temperatura, UR: umidade relativa do ar, P: precipitação pluviométrica, PAR: radiação fotossinteticamente ativa, Max: máximas, Med: médias, Acum: acumulada; O₃: índices de ozônio SUM0 e SUM06, r²: coeficiente de determinação, p: nível de significação. (+): relação positiva significativa, (-): relação negativa significativa, ni: variável não incluída no modelo linear. INC: Incidência; SF: Severidade de folha; SFL: Severidade de folíolos; IIFL: Índice de injúria de folíolos. Rank ou raiz (quadrada): tipo de transformação aplicada aos índices de injúria para correção da não-normalidade.

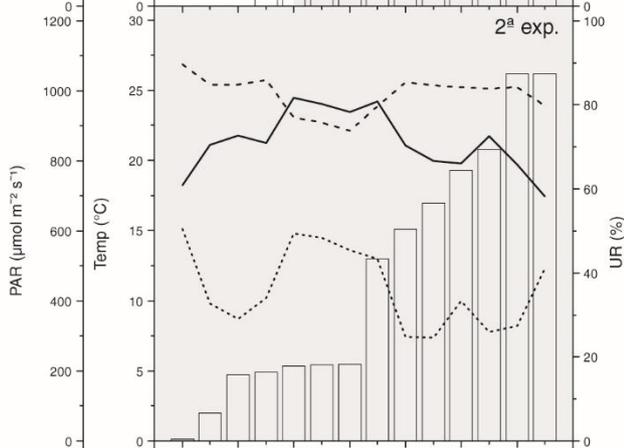
Índice de Injúria (%)	T (°C)	UR (%)	P (mm)	PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	O ₃ (ppm h)	r ²	p
INC (rank)	+ (max)	+ (med)	-	ni	+ (SUM0)	0,946	<0,001
SF	+ (max)	+ (max)	Ni	+(acum)	+ (SUM06)	0,956	<0,001
SFL (raiz)	+ (med)	+ (max)	-	ni	+ (SUM0)	0,935	<0,001
IIFL (raiz)	ni	+ (med)	-	+(acum)	+ (SUM06)	0,919	<0,001

Fig. 1. Caracterização das variáveis climáticas, perfil dos índices de exposição cumulativa de O₃ e quantificação das injúrias visíveis em *A. graveolens*, exposto em campo, no Fitotério do Instituto de Biociências-USP, São Paulo, SP; 1ª exposição: 06/09/2012 a 06/12/2012; 2ª exposição: 21/01/2013 a 21/04/2013; 3ª exposição: 23/04/2013 a 21/07/2013; 4ª exposição: 23/07/2013 a 26/10/2013; médias semanais da radiação fotossinteticamente ativa (PAR), temperatura (Temp), umidade relativa do ar (UR) e volume de precipitação (P) acumulada em cada exposição (A-D); Índices de injúria (média e erro): Incidência (INC), Severidade em folhas (SF), Severidade em folíolos (SFL), Índice de injúria em folíolos (IIFL); SUM0 e SUM6 (E-H); a área da figura em cinza representa o período chuvoso e a área em branco o período seco.

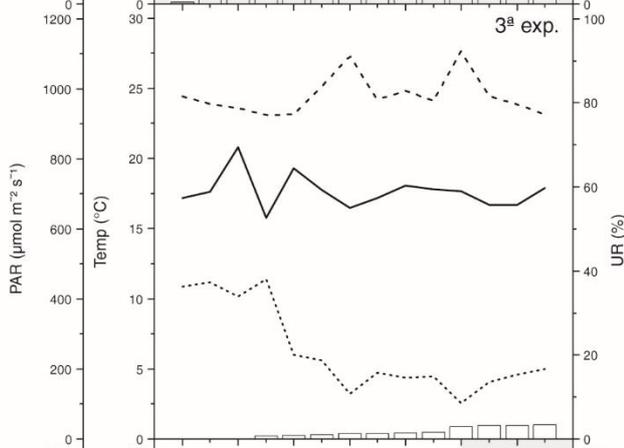
A



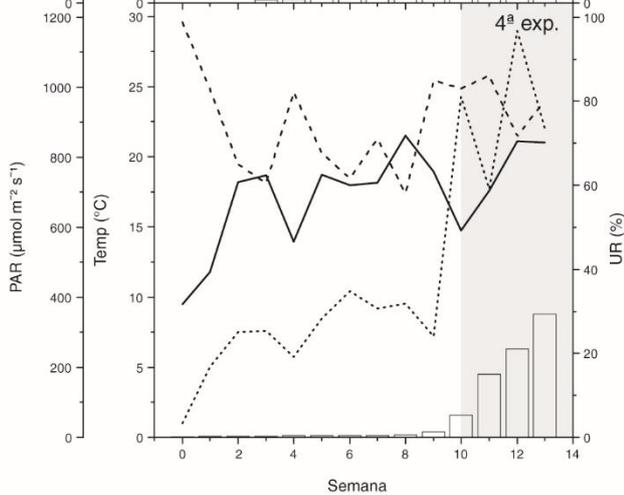
B



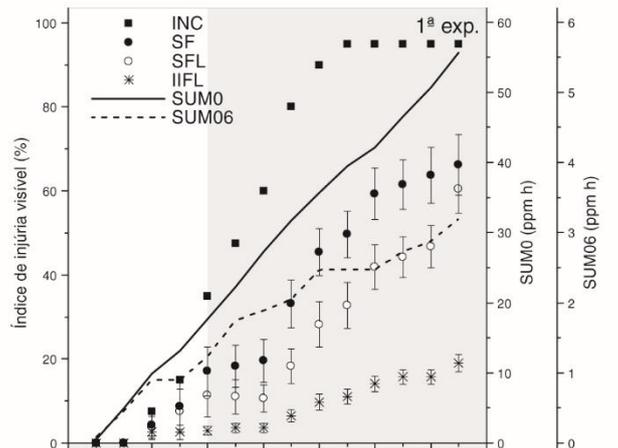
C



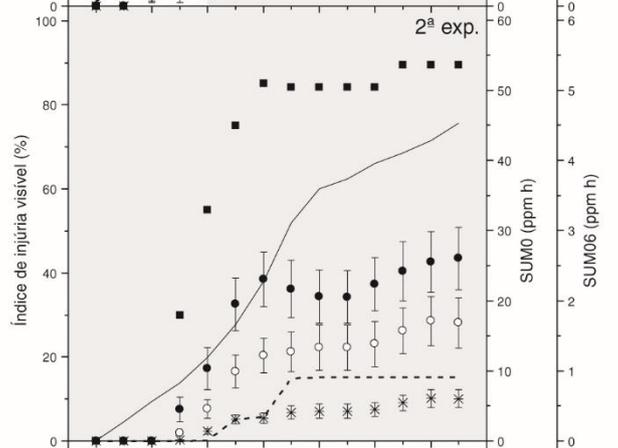
D



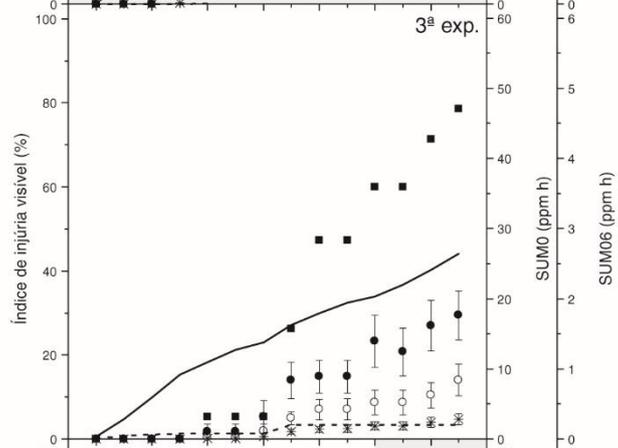
E



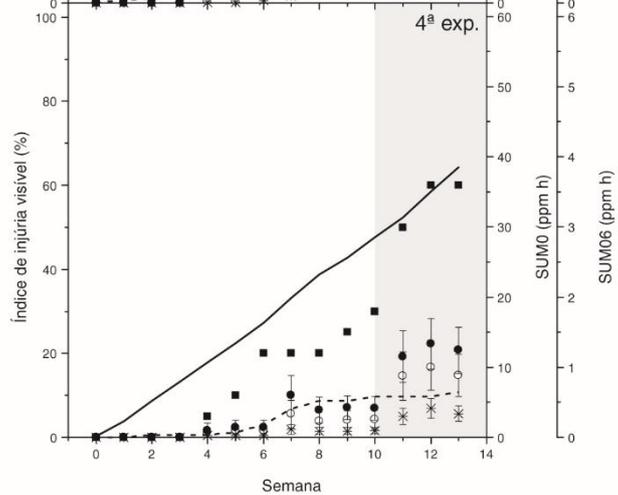
E



F



G



H

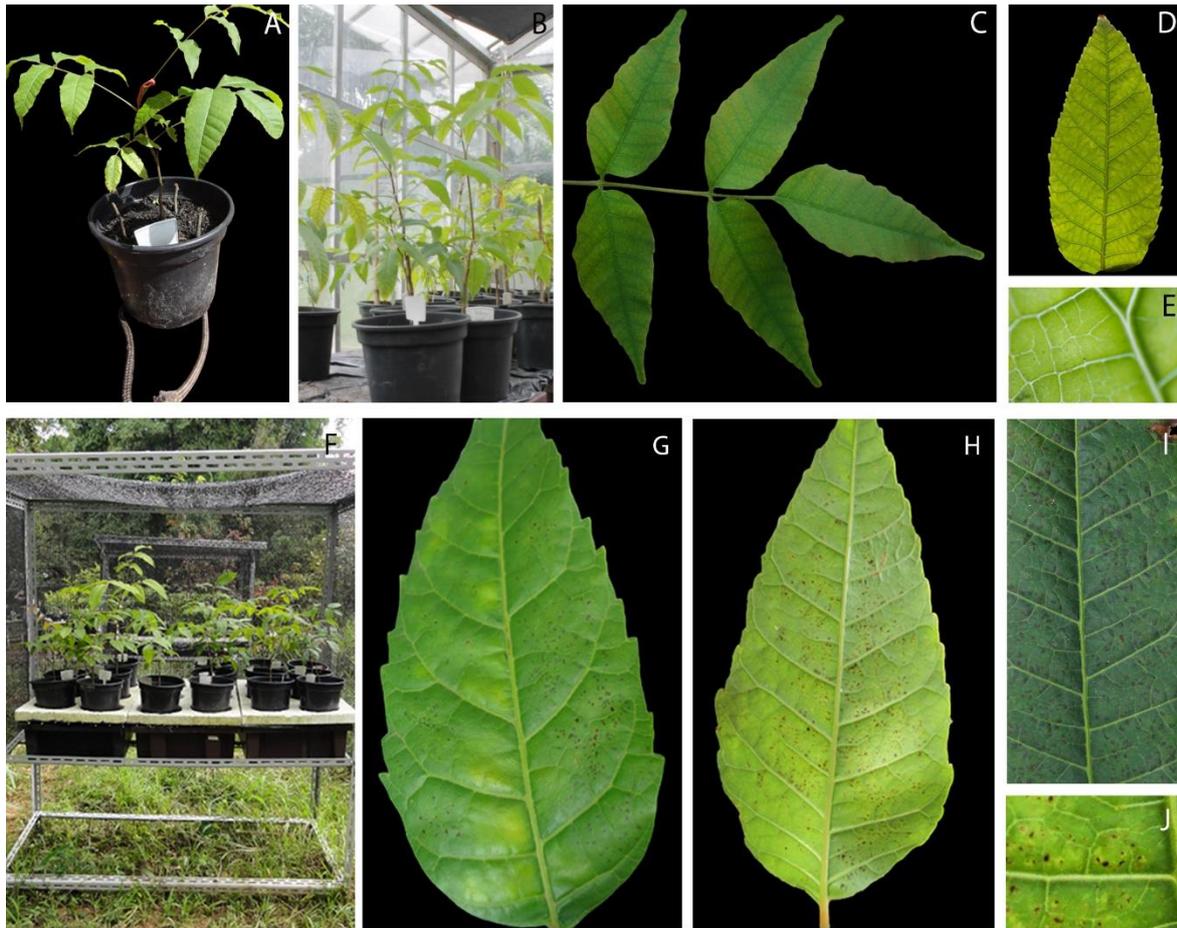
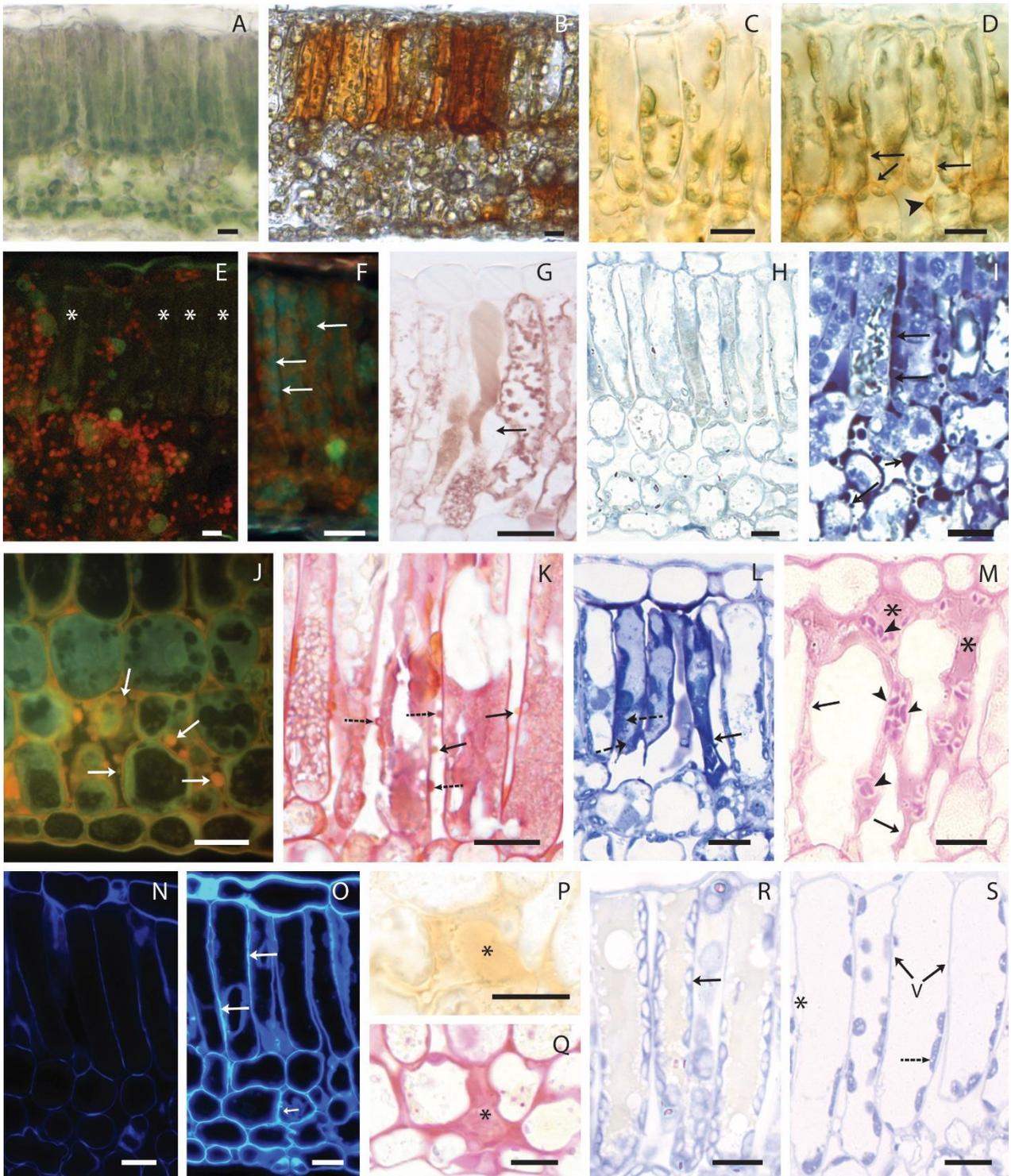


Fig. 2. Caracterização da planta, folha, sistema de exposição e injúrias visíveis em *Astronium graveolens*. Plantas em casa de vegetação com ar filtrado (B-E) e plantas expostas em campo sob ar ambiente (F-J). Aspecto da muda envasada utilizada nas exposições (A). Exposição das plantas em casa de vegetação (B). Folha composta imparipinada sem injúria visível (C). Folíolo sem injúria visível (assintomática) D. Detalhe da superfície adaxial do folíolo assintomático (E). Sistema de exposição das plantas em campo, onde se vê suporte metálico coberto com sombrite (teto e laterais), três caixas com água e os vasos encaixados em placa de isopor disposta sobre as caixas (F). Distribuição das injúrias visíveis (pontuações intercostais de coloração escura) pelo folíolo sintomático, observadas nas faces adaxial (G) e abaxial (H) após 90 dias de exposição. Folíolo mais escuro, com injúrias visíveis aparentemente maiores em indivíduos mais velhos mantidos por 12 meses em campo (I). Detalhe da injúria visível presente na superfície adaxial do folíolo (J).

Fig. 3. Secções transversais de folíolos de *Astronium graveolens*. Material fresco sem tratamento (A-B,E), material fixado sem tratamento (C-D,F), material fixado -análise estrutural (H,I,L) e material fixado-histoquímica (G,J,K,M-S) em folíolos assintomáticos da casa de vegetação (A,C,H,N, R) e folíolos sintomáticos do campo (B,D-G,I-M,O-Q,S) que mostram marcadores de estresse decorrente do O₃. Sintoma restrito ao mesofilo, caracterizado pelo intenso estresse oxidativo, de coloração castanha (B), se diferenciando das amostras assintomáticas (A). Oxidação da parede celular (D setas) e protrusão (D cabeça de seta), em contraste com amostras assintomáticas que não apresentaram esses marcadores (C). Alteração no padrão da autofluorescência das clorofilas no parênquima paliçádico (E asterisco). Acúmulo de polifenóis (F setas). Teste negativo para acúmulo de proantocianidinas com maior intensidade de outros compostos na porção colapsada (G setas). Maior acúmulo de compostos fenólicos no parênquima paliçádico em amostra sintomática e presença de grandes protrusões no mesofilo (I setas), com maior intensidade da reação no parênquima lacunoso voltadas para o apoplasto (I) não observado no mesofilo de amostras assintomáticas da casa de vegetação (H). Protrusões (setas) de origem péctica (J). Estágios distintos de oxidação das protrusões (K), mais oxidada em laranja (seta) e menos oxidada em rosa (seta tracejada). Estágios de condensação de cloroplastos (seta tracejada) e células parenquimáticas com paredes total ou parcialmente colapsadas (setas) e a desorganização do conteúdo celular, indicando HR-like (L). Células com características de HR-like (M), incluindo paredes totalmente colapsadas (setas), acúmulo de amido (cabeça de seta) e teste de polissacarídeos positivo (asterisco) dentro do vacúolo. Maior espessamento da parede pela deposição de celulose em amostras sintomáticas (O), em especial em regiões mais fluorescentes (setas), com destaque próximo a câmara estomática, em comparação com amostras assintomáticas (N). Acúmulo de compostos fenólicos no apoplasto (P). Teste positivo para polissacarídeos (coloração rosa) no apoplasto adjacente ao estômato (Q). Em amostra assintomática (R) presença de cloroplastos na periferia da célula com grãos de amido (seta) enquanto que, em amostra sintomática (S), células parenquimáticas com grande vacúolo (V), com menor presença de cloroplastos (asterisco) que não apresentam amido. Nos cloroplastos da amostra sintomática (S) observam-se plastoglóbulos (seta tracejada). Barras: = 10 µm.



4. Discussão

4.1. As injúrias visíveis em *A. graveolens*

Para que as injúrias visíveis sejam seguramente atribuídas ao ozônio (O_3), as plantas devem ser expostas ao poluente em condições controladas. Assim, as injúrias observadas em plantas fumigadas podem servir como padrão de comparação, auxiliando na identificação de injúrias visíveis decorrentes de O_3 em campo; no entanto, as características morfológicas e estruturais das plantas podem diferir em função das condições ambientais e concentrações de O_3 , provocando grande plasticidade de resposta (Paoletti et al., 2009).

Indivíduos jovens de *A. graveolens* expostos no local de estudo que, de acordo com a CETESB (2012), apresenta concentrações elevadas de O_3 , mostraram injúrias em seus folíolos durante as quatro estações do ano. Tais injúrias, caracterizadas como *stipplings* de coloração marrom e distribuição uniforme, também foram observadas na mesma espécie por Moura (2013) em plantas fumigadas com O_3 (70 ppb h por cerca de 60 dias).

Comparando as injúrias observadas no presente estudo com aquelas descritas por Moura (2013) em experimento de fumigação, as primeiras foram mais intensas com coloração mais escura. Apesar das plantas terem sido expostas em suportes com sombrite, que reduziu a intensidade luminosa em 35%, a luz pode ter contribuído para a formação de injúrias visíveis foliolares mais intensas, em comparação com as descritas por Moura (2013). O O_3 , em sinergismo com a intensidade luminosa, promove maior produção de ROS nos cloroplastos, excedendo a capacidade de desintoxicação e gerando o estresse oxidativo (Foyer et al., 1994; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007), portanto, o desenvolvimento da injúria visível ocorre principalmente nas porções mais iluminadas do mesófilo (Vollenweider et al., 2003, Vollenweider et al., 2013).

Em *A. graveolens*, as injúrias visíveis foram observadas nas duas superfícies do limbo foliolar, ao contrário do que é descrito na literatura que, baseada em espécies de ecossistemas temperados, informa serem as injúrias características de O_3 restritas à superfície adaxial da folha (Novak et al., 2003; ICP, 2010). Contudo, nossos resultados estão de acordo com Moura (2013) que observou, na mesma espécie, injúrias nas duas superfícies dos folíolos, o que mostra que espécies florestais brasileiras podem apresentar resposta diferente daquelas descritas para espécies de regiões temperada (Bussotti & Ferretti, 2009) e mediterrânea (Orendovici et al., 2003).

As injúrias foram visualizadas principalmente nas folhas mais velhas, o que está de acordo com a literatura (Novak et al., 2003; ICP, 2010) e pode ser atribuído ao maior tempo de exposição ao O₃ (VanderHeyden et al., 2001), ou ainda ao fato das folhas mais jovens estarem aclimatadas à presença do O₃ em campo, podendo apresentar sensibilidade reduzida. Esses resultados sugerem que estágios de desenvolvimento da folha podem influenciar no aparecimento da injúria visível (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007).

4.2. Ozônio, fatores meteorológicos e injúrias visíveis em *A. graveolens*

Para determinação do agente ambiental causador da injúria visível deve-se considerar a própria caracterização morfológica da injúria (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007) e também o histórico do local de estudo (Agrios, 2005). A área de estudo localiza-se na cidade de São Paulo e está sob clima subtropical, com verões úmidos e invernos secos (Alvares et al., 2014). A frota automotiva da cidade contribui com concentrações substanciais de precursores de O₃ (CETESB 2012); além disso, o local é cercado por vegetação que é uma grande fonte de emissão dos compostos orgânicos voláteis (COVs), precursores de O₃ (Calfapietra et al., 2009). Esses fatores contribuem para as altas concentrações de O₃ que vem sendo registradas na área de estudo desde a instalação da estação medidora em 2007 (CETESB, 2012), causando danos a vegetação local como constatado por Furlan et al. (2007), que observaram injúrias características em árvores já adultas de *Psidium guajava*, espécie bioindicadora de O₃. Além disso, no Brasil os níveis de radiação solar são favoráveis à formação de O₃ em concentrações fitotóxicas durante o ano inteiro (Moura et al., 2014), o que não ocorre em regiões de clima temperado onde o O₃ se forma principalmente no verão (Castell-Balaguer et al., 2012). Essa presença constante do poluente explica o que foi observado em plantas jovens de *A. graveolens* no local, que apresentaram injúrias visíveis em todas as exposições.

No local de estudo, embora presente o ano todo, as concentrações de O₃ apresentaram um perfil sazonal característico de grandes centros urbanos (Ferretti et al., 2012), com valores mais elevados na estação chuvosa (primavera e verão), que se caracteriza por altas temperaturas e maior incidência de radiação, sendo a última importante na formação do O₃ (CETESB, 2012). As variações nas concentrações de O₃ ao longo do ano foram detectadas pelas plantas, que apresentaram maiores índices de injúria em exposições que abrangeram todo ou grande parte do período chuvoso (1^a e 2^a exposições). Além disso, durante o ano de 2012, foi observado o maior número de dias com altas concentrações de O₃ nos últimos 10 anos (CETESB, 2013), o que explica o alto índice de injúrias visíveis, especialmente na 1^a exposição.

Picos nos índices de injúrias visíveis foram observados na transição do período seco para o chuvoso, que ocorreram na 1ª e 4ª exposições. Em tais períodos, segundo a CETESB (2013), registraram-se as maiores ocorrências de altas concentrações de O₃ no estado de São Paulo.

Análises de regressão multivariada permitem identificar variáveis ambientais que regulam os efeitos do O₃ em plantas bioindicadoras (Biondi et al., 1992). Na expressão das injúrias visíveis em *A. graveolens* o O₃ interagiu com outros fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa do ar e radiação.

De acordo com Biondi et al. (1992) as concentrações de O₃, em conjunto com as temperaturas médias e máximas, estão correlacionadas positivamente com a presença das injúrias visíveis. Além disso, o O₃ intensifica as injúrias visíveis causadas por temperatura elevada, que também pode aumentar o estresse oxidativo em plantas, atuando, primeiramente, na fotossíntese, com alterações nos cloroplastos que podem se estender também às mitocôndrias e peroxissomos. (Suzuki & Mittler, 2006; Kivimäenpää et al., 2014). Ainda, altas temperaturas, assim como o O₃, provocam redução e inativação da rubisco, o que leva à interrupção da fixação de CO₂ e diminuição da fotossíntese (Pell et al.; 1992; Takahashi & Murata, 2008). Em *A. graveolens*, Ribeiro et al. (2005) mostraram que temperaturas altas, ao redor de 40°C, promoveram alteração na fotossíntese com fotoinibição do fotossistema II(PSII) e lenta recuperação do mesmo.

Apesar da análise de regressão multivariada ter indicado correlação positiva entre injúrias visíveis e temperatura elevada, esta, assim como o VPD, pode aumentar a taxa de transpiração, diminuindo a condutância estomática e, conseqüentemente, reduzir a entrada de O₃ via estômatos (Orendovici-Best et al., 2008; Gerosa et al., 2009), o que evitaria a formação de injúrias visíveis. Porém, em um estudo paralelo com os mesmos indivíduos, Cassimiro (2015) verificou que as taxas de condutância estomática em *A. graveolens* apresentaram pouca variação sazonal ao longo das exposições, o que explica a correlação positiva encontrada. Além disso, a alta umidade relativa do ar e a disponibilidade de água no solo podem ter propiciado maior abertura estomática durante todo o período de exposição, já que estes fatores são limitantes para o funcionamento estomático (Smith et al., 2012). Com isso, a entrada de O₃ via estômato foi facilitada, o que levou à formação de injúrias visíveis em todas as exposições.

A radiação fotossinteticamente ativa acumulada (PAR), juntamente com as altas concentrações de O₃ influenciaram na expressão das injúrias visíveis nas plantas em campo, o que pode ter provocado maior estresse oxidativo no aparato fotossintético, uma vez que, como registrado na literatura (Paoletti et al., 2009), o sinergismo entre essas variáveis facilita atingir

rapidamente o limiar necessário para provocar as injúrias visíveis. Portanto, exposições nas quais a PAR foi constantemente alta, menor SUM0 e SUM06 foram necessárias para provocar o aparecimento inicial das injúrias, enquanto que nas exposições com PAR mais baixa, maiores SUM0 e SUM06 foram necessárias para atingir esse limiar.

Índices de injúria em *A. graveolens* mostraram correlação positiva com a SUM0 e SUM06. Outros estudos também identificaram correlação das injúrias com índices anuais cumulativos (Miller et al., 1998; Panek et al., 2002; Orendovici-Best et al., 2008; Smith et al., 2012; Moura et al., 2014; Pedroso & Alves, 2015). A SUM0 é importante em áreas onde ocorrem altas concentrações horárias médias de O₃ (Musselman et al., 2006), como observado no local de estudo. Recentemente foi mostrado que índices baseados nas concentrações anuais (SUMxx) parecem ser mais adequados para avaliar o risco potencial do O₃ em florestas tropicais, dado que o dossel da floresta semidecidual permanece com folhas, independentemente da estação, e com concentrações expressivas de O₃ durante o ano todo (Moura et al., 2014). *A. graveolens* é uma espécie semi-decídua que permanece com folhas durante a maior parte do ano, com breves períodos de troca. Seu crescimento se dá tanto no período chuvoso como no período seco (Gutiérrez-Soto et al., 2008), portanto, índices anuais são melhores para explicar os efeitos do O₃ na espécie (Moura et al., 2014).

Os impactos reais do O₃ nas plantas dependem do fluxo acumulado do poluente no interior da folha. Esse fluxo é baseado no modelo DO₃SE (*Deposition of Ozone for Stomatal Exchange, DO₃SE*) que diferentemente dos índices que consideram somente as concentrações de O₃ no ar, considera: temperatura do ar, déficit de pressão de vapor, disponibilidade hídrica do solo, estágio fenológico da planta e a condutância estomática (Emberson et al., 2000, UNECE, 2010). O fluxo tem maior embasamento biológico, uma vez que os parâmetros comentados influenciam no movimento estomático e, conseqüentemente, na entrada de O₃ na planta (UNECE, 2010). Cassimiro (2015) estabeleceu o fluxo estomático de O₃ para *A. graveolens* em um estudo paralelo realizado com as mesmas plantas aqui estudadas. A autora correlacionou os índices de injúrias visíveis com o fluxo e a SUM0, obtendo forte correlação entre os parâmetros considerados, indicando a importância da SUM0 para se avaliar os efeitos do O₃ na espécie testada.

4.3. Marcadores microscópicos validadores do efeito do ozônio

Nenhum marcador microscópico de estresse oxidativo, por si só, é indicador específico de O₃ (Günthardt-Goerg and Vollenweider, 2007). Assim, para atribuir uma injúria visível como decorrente de O₃ deve-se combinar marcadores que indiquem alterações na estrutura e na composição química dos tecidos, estas últimas determinadas por meio de testes histoquímicos. A presença simultânea de alguns marcadores pode confirmar que o O₃ é o causador das respostas de estresse observadas em folhas, validando assim o sintoma visível (Kivimäenpää et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007).

Em *A. graveolens*, as mudanças observadas nos tecidos e na composição química foram típicas de estresse associado ao O₃ e semelhantes às aquelas observadas em experimento de fumigação por Moura (2013). Microscopicamente a injúria se caracterizou principalmente pela intensa reação de oxidação das protruções e da parede celular, e por vezes, de compostos fenólicos nos vacúolos das células parenquimáticas. Compostos fenólicos oxidados são responsáveis pelo escurecimento dos tecidos (Sawain, 1976; Vermerris & Nicholson, 2006), o que explica a coloração acastanhada da injúria do tipo *stippling* visível e de fácil detecção nas plantas em campo. Essas reações de oxidação intensas no apoplasto e na parede celular também foram observadas por Moura (2013) em plantas fumigadas da mesma espécie e, segundo a autora, essas reações são os marcadores mais importante e aqueles que provocaram o desenvolvimento inicial da injúria visível. Além disso, pelo fato do parênquima lacunoso ser o tecido de maior área de difusão do O₃, as protruções oxidadas ocorrem com maior intensidade nesse tecido, e foram responsáveis pela presença da injúria visível na face abaxial da folha.

Considerando que o apoplasto é o principal sitio de ação do O₃ (Overmyer et al., 2009), compostos fenólicos glicosilados, presentes no local, são possivelmente flavonoides, já que tais compostos são citados como presentes no apoplasto (Booker et al., 2013) e podem ter uma função importante de defesa contra a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), atuando como doadores de elétrons (Agati et al., 2012; Booker et al., 2013) e evitando danos às plantas. Descartamos a possibilidade de serem taninos, já que os taninos são armazenados apenas nos vacúolos devido à sua alta toxicidade. (Joel & Fanh 1980; Vollenweber & Dietz, 1981). Apesar da presença de flavonoides no apoplasto, tais compostos não foram suficientes para eliminar e evitar os efeitos do O₃ nas plantas estudadas, cujos danos progrediram para nível celular. Booker et al. (2013), em genótipo de *Arabidopsis thaliana* exposto ao O₃ em câmeras sob condições controladas, também concluíram que os compostos fenólicos presentes no apoplasto foram insuficientes para evitar danos do poluente nas plantas estudadas. O acúmulo de flavonóides no

apoplasto não foi mencionado por Moura (2013) em experimento de fumigação com a mesma espécie, assim como em estudos com outras espécies que utilizaram marcadores microscópicos como validadores de estresse decorrente de O₃ (Vollenweider et al., 2003; Paoletti et al., 2009, entre outros). Marcador visualmente semelhante ao acúmulo de flavonóides glicosilados observado em *A. graveolens* foi encontrado por Vollenweider et al. (2013) em *Pinus*, porém esse foi atribuído ao espessamento maciço de parede por polissacarídeos (pectina e celulose) e lignina ocupando o espaço intercelular. Isso mostra que marcadores visualmente semelhantes podem ter origem diferente e que os testes histoquímicos são indispensáveis no estabelecimento dos marcadores. Contudo, flavonóides glicosilados no apoplasto não foram visualizados com frequência, portanto, não foram considerados como marcadores microscópicos de estresse oxidativo efetivos.

O cloroplasto é considerada a organela mais sensíveis ao O₃, sendo o primeiro compartimento celular a mostrar alterações numa situação de estresse oxidativo (Sutinen et al., 1990). O O₃ degrada a clorofila, o que leva à produção adicional de ROS e, conseqüentemente, à morte celular (Hörtensteiner & Kräutler, 2011). A degradação da clorofila provoca mudanças na sua autofluorescência (Gravano et al., 2003; Bussoti et al., 2005) nas células do parênquima paliçádico como também a redução na eficiência fotossintética da planta (Gravano et al., 2004; Bussoti et al., 2011). Decréscimo na autofluorescência da clorofila indica danos aos cloroplastos podendo ser um marcador útil na avaliação das injúrias induzidas por O₃ (Pedroso & Alves 2015).

Na mesma região do folíolo de *A. graveolens* onde se observou a perda da autofluorescência registrou-se também o acúmulo de polifenóis. Outros trabalhos também identificaram o acúmulo de polifenóis nas células parenquimáticas (Bartoli et al., 2013), em especial na região que apresentou alteração da autofluorescência da clorofila (Bussoti et al., 2005), assim como observado em experimentos de fumigação aguda em *A. graveolens* (200 ppb 4h/dia durante 3 dias, Moura et al. 2014b) resposta frequentemente causada por estresse oxidativo provocado por O₃ (Vollenweider et al., 2003; Faoro & Iriti, 2009).

Amostras de folíolos assintomáticos e sintomáticos de *A. graveolens* não apresentaram acúmulo de proantocianidinas (taninos condensados), uma vez que o teste histoquímico com vanilina ácida não mostrou a coloração vermelha esperada adjacente a injúria, com a coloração natural dos tecidos, enquanto que na região da injúria observou-se a coloração marrom que indica reação de oxidação de compostos fenólicos. Há registros na literatura de acúmulo de proantocianidinas na região adjacente a injúria e ausência desses compostos na região da injúria provocada por O₃, quando empregado o mesmo teste. (Guerrero et al., 2013; Vollenweider et

al., 2003; Vollenweider et al., 2003b). Os autores associaram a resposta ao aumento da oxidação na região da injúria (Guerrero et al., 2013; Vollenweider et al., 2003) ou à completa oxidação de proantocianidinas (Moura et al., 2014b). Além disso, a oxidação de proantocianidinas, seguindo um gradiente no tecido e em nível celular, constitui um importante marcador de estresse decorrente de O₃ para a validação dos sintomas (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). No presente estudo, apesar de ter ocorrido oxidação de compostos fenólicos na região da injúria estes, ao contrário dos trabalhos citados, podem ser do tipo taninos hidrolisáveis (ver cap. 2, elagitaninos), que estão presentes nas folhas da espécie como constado por Silva et al. (2011) com base em análise bioquímica.

Em *A. graveolens* as protrusões pécticas foram um importante marcador de estresse oxidativo decorrente do O₃ e se destacaram principalmente no apoplasto do parênquima lacunoso (caracterização anatômica de folíolos no cap 2). A presença de protrusões pécticas no apoplasto é citada na literatura como um importante marcador de estresse oxidativo crônico (Günthardt-Goerg et al., 1997; Vollenweider et al., 2003) que permite a validação da injúria visível provocada pelo O₃ (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). Além disso, sua presença no apoplasto do parênquima lacunoso se explica devido à rota de penetração do poluente (Paoletti et al., 2009), que entra pelos estômatos, atravessa a câmara subestomática e atinge espaços intercelulares (Roschina & Roshchina, 2003) do parênquima lacunoso. O O₃ aumenta a concentração de íons de cálcio citosólico (Ca²⁺) e as protrusões atuam na desintoxicação, uma vez que sequestram Ca²⁺ formando pectato de cálcio (Günthardt-Goerg et al., 1997). Diante disso, o parênquima lacunoso em folhas de *A. graveolens* parece desempenhar um papel importante na desintoxicação, uma vez que ocorreu intensa formação de protrusões de parede no apoplasto desse tecido, o que também foi observado por Moura (2013).

Além dos marcadores observados em folíolos de *A. graveolens*, a espécie apresentou marcadores estruturais característicos de HR-like (*Hypersensitive-like response -HR-like*) na região do *stippling* e ACS (*accelerated cell senescence-ACS*) adjacente a essa região. HR-like e ACS são respostas de morte celular induzidas por O₃ e podem se desenvolver lado a lado no mesófilo (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). Essas respostas são mediadas por ROS e os marcadores microscópicos estruturais (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007) e ultraestruturais (Doorn et al., 2011) permitem distinguir entre esses dois tipos de morte celular. A morte celular representa uma capacidade parcial da célula para neutralizar o efeito fitotóxico extremo provocado pelo O₃, limitando a expansão do dano oxidativo (Bartoli et al., 2013).

A HR-like, também descrita como necrose por outros autores (Doorn et al., 2011), é semelhante àquela que ocorre em decorrência do ataque de patógenos-HR (Schraudner et al., 1998; Shandermann et al., 1998;), porém, nesse caso, o elicitor é um fator abiótico. A HR-like é rápida e acidental, ocorre em questão de minutos e está sempre restrita a grupos discretos de células parenquimáticas, que vão apresentar alterações na composição e oxidação de fenólicos, incompleta degradação das organelas e alteração da membrana celular (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007; Faoro & Iriti 2009). Em folíolos de *A. graveolens* marcadores estruturais característicos de HR-like abrangeram colapso parcial ou total das paredes celulares, alteração no formato e condensação dos cloroplastos e desorganização do conteúdo celular. Em folhas sintomáticas do campo, células necróticas apresentaram grãos de amido grandes dentro dos cloroplastos, provavelmente em decorrência de alterações na permeabilidade da membrana celular que interferiram na exportação de açúcar (Grantz, 2003) o que não ocorreu adjacente a região de HR-like.

Considerando simultaneamente o teste histoquímico (PARS) e a análise dos tecidos em microscopia de epifluorescência foi possível inferir que compostos presentes no interior do vacúolo das células em HR-like são polifenóis glicosilados (detalhes no cap 2.), o que encontra respaldo na literatura, que menciona reação positiva do teste PAS na presença de polifenóis glicosilados nos vacúolos (Geier, 1980), embora Moura (2013) associou a reação positiva do PARS com o acúmulo de polissacarídeos. A deposição de polifenóis glicosilados nos vacúolos em *A. graveolens* não foi suficiente para evitar a HR-like, apesar da espécie apresentar uma grande diversidade de compostos fenólicos (Silva et al., 2011) que atuam como agentes redutores e eliminadores de H₂O₂ (Yamasaki et al., 1997), uma ROS que induz estresse oxidativo e morte celular (Gerosa et al., 2009b).

A ACS também pode ocorrer em resposta ao O₃ e é caracterizada por um processo observado na maioria dos tecidos foliares e idêntico ao processo de envelhecimento celular natural, porém mais rápido (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). A ACS e o envelhecimento natural apresentam os mesmos marcadores estruturais, como redução no tamanho e quantidade de cloroplastos, degradação e condensação do núcleo, aumento do vacúolo, acúmulo de compostos fenólicos e acúmulo acentuado de plastoglobulos (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007) e, em regiões temperadas não se confundem, uma vez que ocorrem em períodos distintos, ou seja, os efeitos do O₃ se expressam no verão, ao passo que o envelhecimento natural ocorre no outono (Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). Como espécie semi-decídua *A. graveolens* mantém suas folhas durante a maior parte do

ano, o que dificulta separação entre ACS e o envelhecimento natural, não sendo a primeira um bom validador de O₃.

Em condições de baixa radiação foi necessária uma concentração aguda de O₃ (200 ppb h / 8h) para desencadear a resposta de HR-like em plantas de *A. graveolens* (Moura et al., 2013), enquanto que a alta radiação no campo pode contribuir de forma sinérgica com O₃, potencializando o efeito oxidativo, com maior acúmulo de ROS nos cloroplastos, atingindo rapidamente a concentração necessária para desencadear as respostas de ACS e HR-like (Paoletti et al., 2009; Moura, 2013).

Em *A. graveolens*, o espessamento de parede ocorreu por deposição de celulose. Segundo Bussotti et al. (2005) esse espessamento de parede pode ser irregular e ocorre pelo aumento da atividade metabólica, especialmente no complexo Golgi, tendo por objetivo reforçar a resistência mecânica e evitar o risco de colapso celular.

Finalmente, as injúrias visíveis foram validadas como decorrente de O₃ com base no conjunto de marcadores microscópicos observados em amostras de *A. graveolens*. Além disso, dentre outros poluentes que poderiam provocar danos oxidativos, o NO₂ se mostrou em concentrações baixas, não ultrapassando o padrão da qualidade do ar estabelecido para o estado de São Paulo (260 µg/m³) em nenhum momento ao longo do experimento. As concentrações de SO₂ não são monitoradas pela estação IPEN-USP justamente porque o poluente é encontrado em regiões industriais, (CETESB, 2012; CETESB 2013), o que indica que tal poluente não se encontra em concentrações relevantes no local de estudo, que se encontra em área urbana.

5. Conclusão

- A. *graveolens*, uma espécie arbórea nativa, se mostrou bioindicadora de O₃, adequada para fins de biomonitoramento do poluente, já que apresentou injúrias visíveis específicas caracterizadas como *stippling*: de coloração escura e de distribuição intercostal, e de fácil detecção em campo, validadas por meio de marcadores microscópicos estruturais reconhecidamente indicadores de estresse oxidativo decorrente de O₃, e de acordo com aqueles descritos para a mesma espécie com base em fumigação crônica e aguda realizadas por Moura (2013) e Moura et al. (2014b).

Os marcadores observados foram: intensa reação no apoplasto com a formação de protrusões de origem péctica, oxidação dessas protrusões e da parede celular, espessamento de parede por deposição de celulose, diminuição da autofluorescência das clorofilas, acúmulo de polifenóis e HR-like.

Marcadores indicativos de acúmulo de flavonoides glicosilados e ACS não foram validadores das injúrias foliolares em *A. graveolens*, já que não foi possível distinguir claramente a ACS do envelhecimento natural.

Índices de injúrias visíveis apresentaram correlação positiva com a SUM0 e SUM06 integrada a parâmetros como a PAR acumulada, médias e máximas de temperatura e umidade relativa do ar em análise regressão multivariada. Os índices de injúrias visíveis testados mostraram linearidade com a SUM0 e a SUM06, por meio da correlação de Pearson, sendo que para a SUM0 a correlação foi mais forte.

Considerando que a espécie apresentou correlação entre as injúrias e os índices de O₃, a mesma pode ser empregada no biomonitoramento do O₃.

6. Referências Bibliográficas

- Adams, T., Lintilhac, M., 1993. Fluorescence microscopy of fresh tissue as a rapid technique for assessing early injury to mesophyll. *Biotech Histochem* 68, 3–7.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*, fifth ed. Elsevier Academic Press.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 6, 711–728.
- Bartoli, G., Forino L.M.C., Tagliasacchi, A.M., Durante, M., 2013. Cell death induced by ozone stress in the leaves of *Populus deltoides* × *maximowiczii*. *Biologia Plantarum* 57, 514–524.
- Biondi, F., Mignanego, L., Schenone, G., 1992. Correlation between environmental parameters and leaf injury in *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Bel-W3'. *Environmental Monitoring and Assessment* 22, 73–87.
- Booker, F. L., Burkey, K. O., Jones, A.M., 2013. Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell and Environment* 35, 1456–1466.
- Bulbovas, P., Moraes, R.M., Rinaldi, M.C.S., Cunha, A. L., Delitti, W.B.C., Domingos, M., 2010. Leaf antioxidant fluctuations and growth responses in saplings of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) under an urban stressing environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 664–670.
- Bussotti F., Ferretti M., 2009. Visible injury, crown condition, and growth responses of selected Italian forests in relation to ozone exposure. *Environmental pollution* 157, 1427–1437.
- 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.

- Bussotti, F., Desotgiu, R., Cascio, C., Pollastrini, M., Gravano, E., Gerosa, G., Marzuoli, R., Nali, C., Lorenzini, G., Salvatori, E., Manes, F., Schaub, M., Strasser, R.J., 2011. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental and Experimental Botany* 73, 19–30.
- Bussotti, F., Schaub, M., Cozzi, A., Gerosa, G., Novak, K., Hug, C., 2006. Sources of errors in assessing ozone visible symptoms on native vegetation. *Environmental Pollution* 140, 257–268.
- Bussotti, F., Schaub, M., Cozzi, A., Krauchi, N., Ferretti, M., Novak, K., Skelly, J.M., 2003. Assessment of ozone visible symptoms in the field: perspectives of quality control. *Environmental Pollution* 125, 81–89.
- Calfapietra, C., Fares, S., Loreto, F., 2009. Volatile organic compounds from Italian vegetation and their interaction with ozone. *Environmental Pollution* 157, 1478–1486.
- Carvalho, P.E.R. 1994. *Especies florestais brasileiras: recomendacoes silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Embrapa. CNPF/SPI, Brasília.
- Cassimiro, J., 2015. *Avaliação de índice de proteção a vegetação baseado na dose fitotóxica de ozônio*. Tese de mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Castell-Balaguer, N., Tellez, L., Mantilla, E., 2012. Daily, seasonal and monthly variations in ozone levels recorded at the Turia river basin in Valencia (Eastern Spain). *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 3461–3480.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2012. *Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatórios*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2013. *Operação Inverno – 2013: Qualidade do ar. Série Relatórios*. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- Chappelka, A., Renfro, J., Somers, G., Nash, B., 1997. Evaluation of ozone injury on foliage of blackcherry (*Prunus serotina*) and tall milkweed (*Asclepias exalata*) in Great Smoky Mountains National Park. *Environmental Pollution* 95, 3–18.
- Doorn, W.G. V., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Breusegem, F.V., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V., 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 18, 1241–1246.
- El-Khatib, A.A., 2003. The response of some common Egyptian plants to ozone and their use as biomonitors. *Environmental Pollution* 124, 419–428.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Simpson, D., Tuovinen, J.P., 2000. Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution* 109, 403–413.
- Faoro, F., Iriti, M. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: Key studies in Mediterranean conditions. *Environmental Pollution* 157, 1470–1477.
- Feder, N., O'Brien., 1968. *Plant Microtechnique: Some Principles and New Methods*. *American Journal of Botany* 55, 123–142.
- Ferretti, M., Cristofolini, F., Cristofori, A., Gerosa, G., Gottardini, E., 2012. A simple linear model for estimating ozone AOT40 at forest sites from raw passive sampling data. *J. Environ. Monit.* 14, 2238–2244.

- Foyer H.C., Lelandais, M., Kunert K., J.1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92, 696–717.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A., Sanz, M.J., 2007. *Psidium guajava* ‘Paluma’ (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environmental Pollution* 147, 691–695.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Sanz, M.J., Domingos, M., Salatino, A., 2008. *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn., a native Atlantic Forest species, as a bio-indicator of ozone: Visible injury. *Environmental Pollution* 152, 361–365.
- Gahan, P.B., 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry*. London: Academic Press.
- Geier, T., 1980. PAS-positive reaction of phenolic inclusions on plant cell vacuoles. *Histochemistry*. 65,167–171.
- Gerlach, D., 1984. *Botanische Mikrotechnik*. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Gerosa, B., Marzuoli, R., Desotgiu, R., Bussotti, F., Ballarin-Denti, A., 2009. Validation of the stomatal flux approach for the assessment of ozone visible injury in young forest trees. Results from the TOP (transboundary ozone pollution) experiment at Curno, Italy. *Environmental Pollution* 157, 1497–1505.
- Gerosa, G., Finco, A., Mereu, S., Vitale, M., Manes, F., Denti, A.B., 2009b. Comparison of seasonal variations of ozone exposure and fluxes in a Mediterranean Holm oak forest between the exceptionally dry 2003 and the following year. *Environmental Pollution* 157, 1737–1744.
- Grantz, D.A., 2003. Ozone impacts on cotton: towards an integrated mechanism. *Environmental Pollution* 126, 331–344.
- Gravano, E., Bussotti, F., Strasser, R.J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J., Tani, C., 2004. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121, 620–633.
- Gravano, E., Giuliotti, 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.
- Gregory M, and Baas P., 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38, 125–174.
- Guerrero, C.C., Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P., 2013. Foliar Symptoms Triggered by Ozone Stress in Irrigated Holm Oaks from the City of Madrid, Spain *PLoS ONE* 8, e69171
- Günthardt-Goerg, M.S., McQuattie, C.J., Scheidegger, C., Rhiner, C., Matyssek, R., 1997. Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell. *Canadian Journal of Forest Research* 27, 453–463.
- 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.
- Gutiérrez-Soto, M.V., Pacheco, A., Holbrook., 2008. Leaf age and the timing of leaf abscission in two tropical dry forest trees. *Trees* 22, 393–401.

- Gutmann, M., Feucht, W., 1991. A new method for selective localization of flavan-3-ols in plant tissues involving glycolmethacrylate embedding and microwave irradiation. *Histochemistry* 96, 83–86.
- Hörtensteiner, S., Krätler, B., 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807, 977–988.
- IBGE. Nota Técnica. Estimativas da população dos municípios Brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2014.
- ICP. 2004. Manual on methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads & levels and air pollution effects, risks and trends. ICP Mapping and Modelling, UNECE CLRTAP.
- ICP. 2010. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests.
- Innes, J.L., Skelly, J.M., Schaub, M., 2001. Ozone and broadleaved species. A guide to the identification of ozone-induced foliar injury. Paul Haupt Verlag, Bern.
- Joel, D.M., Fahn, A., 1980. Ultrastructure of the resin Ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 1. Differentiation and senescence of the shoot ducts. *Annals of Botany* 46, 225–233.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- Kivimäenpää, M., Sutinen, S., Karlsson, P.E., Sellden G., 2003. Cell structural changes in the needles of Norway spruce exposed to long-term ozone and drought. *Annals of Botany* 92, 779–793.
- Kivimäenpää, M., Jonsson, A.M., Stjernquist, I., Sellden, G., Sutinen, S., 2004. The use of light and electron microscopy to assess the impact of ozone on Norway spruce needles. *Environmental Pollution* 127, 441–453.
- Kivimäenpää, M., Riikonen, J., Sutinen, S., Holopainen, T., 2014. Cell structural changes in the mesophyll of Norway spruce needles by elevated ozone and elevated temperature in open-field exposure during cold acclimation. *Tree Physiology* 34, 389–403.
- Krupa, S.V., 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.
- Manning, J.W., 2003. Detecting plant effects is necessary to give biological significance to ambient ozone monitoring data and predictive ozone standards. *Environmental Pollution* 126, 375–379.
- Miller, P., Guthrey, R., Schilling, S., Carrol, J., 1998. Ozone injury responses of ponderosa and Jeffrey pine in the Sierra Nevada and San Bernardino mountains in California. General Technical Report (GTR) Proceedings of the international Symposium on air pollution and climate change effects on forest ecosystems. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-166, 35–42.
- Moura, B.B., 2013. Análises estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos. Tese de doutorado. Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo.
- Moura, B.B., Alves, E.A., Souza, S.R., Domingos, M., Vollenweider, P., 2014. Ozone phytotoxic potential with regard to fragments of the Atlantic Semi-deciduous Forest downwind of Sao Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* 192, 65–73.

- Moura, B.B., Souza, S.R., Alves, E.S. 2014b. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environmental Science and Pollution Research* 192, 75–73.
- Munch, L., 1989. *Fluorescence Analysis in Food*. Longman Scientific and Technical, Harlow.
- Musselman, R., Lefohn, A., Massman, W., Heath, R., 2006. A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* 40, 1869–1888.
- Novak, K., Skelly, J. M., Schaub, M., Kräuchi, N., Hug, C., Landolt, W. Bleuler, P., 2003. *Environmental Pollution* 125, 41–52.
- Orendovici, T., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Sanz, M.J., Smith, G.C., 2003. Response of native plants of northeastern United States and southern Spain to ozone exposures; determining exposure/response relationships. *Environmental Pollution* 125, 31–40.
- Orendovici-Best, T., Skelly, J.M., Davis, D.D., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Stevenson, R.E., 2008. Ozone uptake (flux) as it relates to ozone-induced foliar symptoms of *Prunus serotina* and *Populus maximowizii* X *trichocarpa*. *Environmental Pollution* 151, 79–92.
- Overmyer, K., Wrzaczek, M., Kangasjärvi, J. 2009. Reactive Oxygen Species in Ozone Toxicity. DOI 10.1007/978-3-642-00390-5_12.
- Panek, J.A., Kurpius, M.R., Goldstein, A.H., 2002. An evaluation of ozone exposure metrics for a seasonally drought-stressed ponderosa pine ecosystem. *Environmental Pollution* 117, 93–100.
- Paoletti E., De Marco A., Raccaluto S., 2007. Why should we calculate complex indices of ozone exposure? Results from Mediterranean background sites. *Environmental Monitoring and Assessment* 128, 19–30.
- Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M.S., 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. *The Science of the Total Environment* 407, 1631–1643.
- Pedroso, A.N.V., Alves, E.S., 2015. Temporal dynamics of the cellular events in tobacco leaves exposed in São Paulo, Brazil, indicate oxidative stress by ozone. *Environmental Science and Pollution Research* DOI 10.1007/s11356-014-4025-y.
- Pell, E.J., Eckardt, N., Enyedp, J., 1992. Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytology* 120, 397–405.
- Porter, E., 2003. Ozone sensitive plant species on national park service and U.S. fish and wildlife service lands: results of a June 24–25, workshop. US Department of the Interior. NPS D1522.
- Resolução CONAMA 03/1990, de 28/06/1990, dispõe sobre os padrões de qualidade do ar previstos no PRONAR. Publicação DOU: 22/08/1990, pp. 15937–15939.
- Rezende, F.M., Furlan, C.M., 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76, 1445–1450.
- Ribeiro, R.V., Souza, M.G., Oliveira, R.F., Machado, E.C., 2005. Photosynthetic responses of tropical tree species from diferente successional groups under contrasting irradiance conditions. *Revista Brasil. Botânica* 28,149–161.

- Roschina, V.V., Roschina, V.D., 2003. Ozone and plant cell. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Sandermann, H., Ernst, Jr.D., Heller, W., Langebartels, C., 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3, 47–50.
- Sanz, M.J. and Calatayud, V. Ozone injury in European Forest Species. 2009. <http://www.ozoneinjury.org>.
- Sarkar, S.K., Howarth, R.E., 1976. Specificity of the vanilin test for flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 24, 317–320.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Camp, W.V., Inze, D., Langebartels, C., Sandermann, Jr.H., 1998. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal* 16, 235–245.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* doi:10.1155/2012/217037.
- Silva, V.C., Napolitano, A., Eletto, D., Rodrigues, C.M., Pizza, C., Vilegas, W., 2011. Characterization of gallotannins from *Astronium graveolens* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 17, 365–375.
- Smith, G., 2012. Ambient ozone injury to forest plants in Northeast and North Central USA: 16 years of biomonitoring. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 4049–4065.
- Sutinen, S., Skarby, L., Wallin, G., Sellden, G., 1990. Long-term exposure of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open top chambers II. Effects on the ultrastructure of needles. *New Phytologist* 115, 345–355.
- Suzuki, N. and Mittler, R., 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126, 45–51.
- Swain, T. 1976. Nature and properties of flavonoids. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press Inc, London.
- Takahashi, S., Murata, N., 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* 13, 178–82.
- UNECE - United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-range Transboundary Air Pollution. 2010. Manual on methodologies and criteria for modeling and mapping critical loads e levels and air pollution effects, risks and trends.
- VanderHeyden, D., Skelly, J., Innes, J., Hug, C., Zhang, J., Landolt, W., Bleuler, P., 2001. Ozone exposure thresholds and foliar injury on forest plants in Switzerland. *Environmental Pollution* 111, 321–331.
- 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.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. Phenolic compound biochemistry. Published by Springer ISBN: 978-1-4020-5163-0.

- Vidal, B.C., 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine Ponceau 2R. *Annales d'Histochemie* 15, 289–296.
- Vollenweber, E., Dietz, H.V., 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20, 869–932.
- Vollenweider, P., Ottiger, M., Günthardt-Goerg, M. S., 2003a. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124, 101–118.
- Vollenweider, P., Bussotti, F., Manninen, S. 2003b. Microscopical validation of ozone symptoms in beech leaves sampled during the 4th International Training Course on the Assessment of Ozone Visible Injury.
- .
- Vollenweider P., Fenn M.E., Menard T., Günthardt-Goerg M., Bytnerowicz A., 2013. Structural injury underlying mottling in ponderosa pine needles exposed to ambient ozone concentrations in the San Bernardino Mountains near Los Angeles, California. *Trees* 27, 895–911.
- Weis, K.G., Polito, V.S., Labavitch, J.M., 1988. Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* [Mill] DA Webb) fruits. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 36, 1037–1041.
- Wetzel, S., Demmers, C., Greenwood, J.S., 1989. Spherical organelles, analogous to seed protein bodies, fluctuate seasonally in parenchymatous cell of hardwoods. *Canadian Journal of Botany* 67, 3439–3445.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara, N., 1997. Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 11 5, 1405–1412.

Capítulo 2

Sinergismo entre estresse luminoso e ozônio: respostas estruturais de polifenóis em *Astronium graveolens* (Anacardiaceae)

Francine Faia-Fernandes^a, Poliana Cardoso-Gustavson^b, Edenise Segala Alves^c

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.

^b Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil.

^c Núcleo de Pesquisa em Anatomia, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil.

Resumo

Em condições de campo, o sinergismo entre a exposição ao ozônio e ao estresse luminoso gera danos oxidativos mais intensos quando comparados a situações experimentais em que o estresse é aplicado individualmente. Estes danos são ainda mais intensos em espécies que apresentam maior sensibilidade ao estresse luminoso, como *Astronium graveolens*. Diversos efeitos de combate e contenção de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivados deste processo de sinergia, em especial as respostas desempenhadas pelos polifenóis, são observados estruturalmente, restritas à descrição na região da injúria, de forma a validar a origem do processo oxidativo. No entanto, a análise estrutural de alterações fora da injúria e de estruturas constitutivas de defesa das plantas pode permitir o reconhecimento de padrões e *insights* quanto aos processos de defesa da planta neste cenário. Neste estudo, hipotetizamos a existência de um padrão de deposição dos polifenóis e estabelecimento de HR-like que segue o mesmo observado nas células epiteliais dos canais secretores lisígenos. De fato, amostras submetidas ao sinergismo apresentaram um padrão específico na distribuição espacial de polifenóis no interior do vacúolo de acordo com a posição da célula em relação àquelas em processo de HR-like. Este padrão obedece ao mesmo encontrado no interior do vacúolo das células epiteliais de canais secretores em desenvolvimento, em que ambos os tecidos envolvidos (parênquima paliçádico e canais secretores) apresentam a mesma origem ontogenética (meristema fundamental), indicando que ambos os processos são homólogos. Testes histoquímicos apontam que estes polifenóis são taninos hidrolisáveis e sugerimos que os diferentes aspectos observados correspondem às variações temporais no processo de polimerização destes elagitaninos. Ainda, a presença de flavonóis na região de estabelecimento de HR-like ressalta o envolvimento destes polifenóis no combate às ROS. Este estudo enfatiza o papel fundamental da anatomia não somente na validação, mas também no entendimento dos processos de defesa da planta.

Palavras-chave: canais secretores, elagitaninos, flavonóis, parênquima paliçádico, quercetina.

Abstract

In field conditions, the synergism between ozone and light stress generates more intense oxidative damages compared to experimental situations in which the stress factor is applied individually. These damages are even more intense in light stress sensitive species as *Astronium graveolens*. Several effects from combat and restraining reactive oxygen species (ROS) derived from this synergy process, in particular the polyphenols responses, can be visualized structurally (descriptions usually restricted to the region of injury) to validate the source of the oxidative process. However, the structural analysis of alterations outside injury in addition to the constituent structures of plant defense may allow the recognition of patterns and insights about the processes of plant defenses in this scenario. Here, we hypothesized the existence of a polyphenols' deposition pattern and establishment of HR-like response that follows the same one observed in the epithelial cells of the lysigenous secretory ducts. Indeed, samples subjected to this synergism exhibited a specific pattern in the spatial distribution of polyphenols inside the vacuole of palisade parenchyma cells according to their position in relation to the ones on HR-like processes. Conversely, this same pattern is observed inside the epithelial cells' vacuole of secretory ducts during their development. Both involved tissues (palisade parenchyma and secretory ducts) have the same ontogenetic origin (ground meristem), an indicative that both processes are homologous. Histochemical tests show that these polyphenols are hydrolysable tannins, and we suggested that their differential aspects correspond to temporal variations in the ellagitannins processes of polymerization. Furthermore, the presence of flavonols in regions close to HR-like responses emphasizes the involvement of these polyphenols to combat ROS. This study highlights the pivotal role of anatomy in both validating ozone symptoms and also in the knowledge of plant defense processes.

Keywords: ellagitannins, flavonols, palisade parenchyma, quercetin, secretory ducts.

1. Introdução

O excesso de radiação solar (compreendendo majoritariamente a região visível do espectro de luz) que atinge o aparelho fotossintético expõe os cloroplastos a um excedente de excitação energética que provoca uma intensa formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) e ativa antioxidantes enzimáticos e de baixo peso molecular, como os polifenóis, no combate aos danos fotooxidativos (Fini et al., 2012; Agati et al., 2012, 2013), principalmente em espécies com maior sensibilidade à luz (Wolf et al., 2010), como *Astronium graveolens*, uma espécie secundária inicial (Ribeiro et al., 2005). O dano oxidativo pode ser intensificado devido à uma resposta sinérgica apresentada por tecidos expostos à intensa luminosidade combinada à exposição ao ozônio (Foyer et al., 1994; Bussotti, 2008; Vollenweider et al., 2003), gerando respostas de oxidação de polifenóis, aceleração da morte celular e senescência foliar, e estabelecimento de HR-like (*hypersensitive like response*) também combatidas pelas mesmas defesas antioxidantes (Vollenweider et al., 2003; Paoletti et al., 2009; Moura, 2013).

Em células saudáveis, a habilidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio (i.e., desenvolver uma atividade redutora) é desempenhada por alguns flavonóis¹ como a quercetina (Agati et al., 2013), presente em folíolos de *A. graveolens* (tabela 1). Durante o estresse luminoso, o excesso de energia de excitação promove a geração de H₂O₂ e ¹O₂ e diminui a atividade da ascorbato peroxidase nos cloroplastos, causando a difusão destas ROS para fora do cloroplasto; os flavonóis limitam esta difusão, retardando os sinais que levam à morte celular programada (Agati et al., 2012). Em plantas saudáveis, derivados glicosilados de flavonóis (forma menos tóxica à planta) são encontrados no apoplasto, parede celular, membrana do cloroplasto e vacúolo (Endo et al., 2012, Petrusa et al. 2013) em quantidades mínimas, normalmente não detectáveis em técnicas analíticas de rotina (Agati et al., 2013). A indução de sua síntese é estimulada pela luz visível (Agati et al., 2012, 2013) e, devido ao aumento em sua concentração, torna-se facilmente observada por meio de análises de fluorescência.

¹ Flavonóis são uma classe de flavonóides definidos pela presença de um grupo catecol como esqueleto do anel B que constitui a estrutura destes compostos. A presença de dois radicais hidroxilas no anel B da quercetina torna esta molécula mais efetiva como agente redutor em relação a outros flavonóis, como a miricetina e o kaempferol (Agati et al., 2012).

Tabela 1. Principais polifenóis identificados por Silva et al., (2011) a partir do extrato de folíolos saudáveis de *A. graveolens*. Note a ausência de taninos condensados.

Flavonóides	Taninos hidrolisáveis e seus precursores
Quercetina	Ácido gálico
Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo	Ácido elágico
Quercetina- <i>O</i> -deoxi-hexosídeo	Elagitaninos
Miricetina- <i>O</i> -deoxi-hexosídeo	
Quercetina-galoil-pentosídeo	
Quercetina-galoil- <i>O</i> -deoxi-hexosídeo	
Quercetina-galoil-hexosídeo	

O ozônio (O₃), enquanto constituinte da poluição atmosférica, também pode atuar na indução de polifenóis (Furlan et al., 1999, 2010; Bussotti et al., 2005; Bartoli et al., 2013). O O₃ apresenta forte ação oxidante em relação aos outros poluentes (Kurpa et al., 2001), correlacionando-se positivamente às alterações no metabolismo de polifenóis (Biolley et al., 2002; Sandre et al., 2014). As injúrias visíveis, características de estresse oxidativo causado pelo O₃ em lâminas foliares de diferentes espécies, são causadas pela indução de síntese, acúmulo e/ou oxidação destes compostos (Krupa et al., 2001; Rezende & Furlan, 2009; Booker et al., 2013). Dentre os polifenóis descritos como respostas ao O₃ destacam-se os flavonóis, antocianinas e taninos² condensados (Vollenweider et al., 2003; Bussotti et al., 2005; Furlan et al., 2007; Tresmondi & Alves, 2011; Guerreiro et al., 2013, Moura, 2003; Moura et al., 2014). Até o momento, alterações em relação aos taninos hidrolisáveis em resposta ao O₃ não são relatadas na literatura.

Constitutivamente, os taninos são encontrados no interior de estruturas secretoras devido à alta toxicidade destes compostos às células vegetais (Castro & Demarco, 2008). Canais secretores são de ocorrência ubíqua em Anacardiaceae, cujo exsudato apresenta composição heterogênea diversa, composta majoritariamente por polissacarídeos, polifenóis e terpenóides, variável de acordo com a espécie (Vassilyev, 2000). Em *Astronium graveolens*, essas glândulas apresentam uma secreção descrita como óleo-resina, composta por polifenóis (tabela 1) e terpenóides, produzida a partir da lise de células epiteliais (secreção holócrina – Chen &

² Taninos são caracterizados pela sua capacidade de interagir com proteínas. Estruturalmente, podem ser divididos em duas grandes classes, os taninos condensados e hidrolisáveis. Taninos condensados (ou proantocianidinas) são produzidos em Spermatophyta, e caracterizados como flavonoides ligados por uma ligação C-C interflavana em C-4–C8 ou C-4–C-6 entre monômeros de flavan-3-ol. Evolutivamente, os taninos hidrolisáveis são mais derivados que os condensados, e limitados às famílias de eudicots mais recentes. Taninos hidrolisáveis são ésteres complexos de ácido gálico com glicosídeos (majoritariamente glicose), em que a divisão e classificação em galotanninos e elagitaninos é baseada na presença ou ausência de uma ligação intramolecular C-C entre os grupos galoil, respectivamente (Tharayil et al., 2011).

Wiemer, 1984; Carmello-Guerreiro & Paoli, 2000; Silva et al., 2011; Hernández et al., 2013). Destacando-se apenas a fração fenólica desta secreção, Joel & Fahn (1980a, 1980b) descreveram um aspecto distinto do conteúdo vacuolar das células epiteliais dos canais secretores ao longo da sua ontogênese, cujo último estágio (prévio à lise) constitui um vacúolo completamente preenchido por compostos fenólicos de aspecto denso. De forma geral, as funções geralmente atribuídas a estes canais referem-se à proteção contra herbivoria, entrada e proliferação de microorganismos e selamento de ferimentos (Langenhein, 1990).

Em situações de estresse oxidativo causado pelo excesso de luz e/ou O₃, taninos apresentando diversos aspectos são encontrados no interior do vacúolo de células do mesófilo (Bussoti et al., 1997; Reig-Arminãna et al., 2004; Kivimäenpää et al., 2014). No entanto, embora estes diferentes aspectos possam estar relacionados à presença de polifenóis distintos e/ou a diferentes graus de polimerização destes compostos (Franceschi et al., 1998), esta relação e um provável padrão no seu aparecimento em células do mesófilo ainda são desconhecidos.

Durante análises de validação de sintomas em campo observamos em *A. graveolens* (cap. 1) a ocorrência de compostos fenólicos de diferentes aspectos no vacúolo de células do parênquima paliçádico, ao longo de toda a extensão dos folíolos sintomáticos, e estabelecimento de HR-like, contrastando com estudos prévios envolvendo plantas da mesma espécie fumigadas em câmaras, em que estes resultados não foram encontrados, uma vez que a autora conduziu seu experimento de fumigação sob uma luminosidade menor do que a registrada em campo (Moura, 2013). Estes eventos sugerem a ocorrência de um sinergismo entre o estresse luminoso e o O₃. A hipótese deste capítulo refere-se à existência de um padrão de deposição dos polifenóis e estabelecimento de HR-like em resposta ao sinergismo, que segue o mesmo observado nas células epiteliais dos canais secretores lisígenos, ou seja, a ocorrência de processos homólogos de defesas constitutivas e induzidas. Para testá-la, procedemos à localização e descrição do padrão de deposição dos polifenóis induzidos pelo estresse e comparação com o encontrado nas células epiteliais dos canais secretores.

2. Material e métodos

2.1. Cultivo e exposições

Mudas de *Astronium graveolens* foram adquiridas em viveiro comercial (Bioflora, São Paulo), uniformizadas por altura da parte aérea (20 cm) e transplantadas para vasos de plástico contendo substrato tipo Eucatex Plantmax misturado com vermiculita na proporção de 3:1. Em

seguida, foram acomodadas por um mês em uma casa de vegetação com ar filtrado situada no Instituto de Botânica, São Paulo. Os vasos permaneceram sobre caixas de polietileno utilizadas como reservatórios de água, cobertas com grades de metal para suporte, e possuindo, cada vaso, duas cordas de náilon mantidas mergulhadas na água, garantindo o suprimento hídrico contínuo para as plantas, 100 ml de solução nutritiva do tipo Peters foram aplicados em cada vaso a cada 15 dias. O suporte foi coberto com telas de sombrite que permitem 65% da passagem de luz. Uma estação meteorológica (WatchDog, Spectrum, IL, USA) foi implementada no interior da casa de vegetação para registrar dados da umidade relativa do ar e temperatura.

Após o período de aclimação, um lote com 10 plantas foi mantido em casa de vegetação, enquanto outro, com 20 plantas, foi exposto no Fitotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, nas mesmas condições de rega da casa de vegetação, e tela de sombrite. A área de exposição localizava-se próximo à estação de monitoramento da qualidade do ar IPEN-USP (CETESB) e da estação meteorológica IAG-USP; no local também foi instalado uma estação meteorológica (WatchDog, Spectrum, IL, USA). As concentrações horárias de O₃ foram obtidas de dados disponibilizados pela CETESB via *on-line*. Os dados meteorológicos como as medidas constantes de temperatura, umidade relativa do ar, volume de precipitação e radiação solar foram disponibilizados pelo IAG-USP ou registrados pela estação instalada. A partir dos dados horários disponibilizados pela CETESB, foram calculadas a SUM0 (soma de todas as concentrações horárias de O₃) e a SUM06 (soma de todas as concentrações horárias de O₃ acima de 0,06 ppm h), enquanto a radiação fotossinteticamente ativa foi calculada com base na radiação global disponibilizada pelas estações de monitoramento. Ao todo, foram efetuadas quatro exposições, com duração de 90 dias cada, com início em setembro/2012 e término em outubro/2013 (1^a exposição, de 06/09/2012 à 06/12/2012; 2^a, de 21/01/2013 à 21/04/2013; 3^a, de 23/04/2013 à 21/07/2013; 4^a, de 23/07/2013 à 26/10/2013).

Ao início de cada exposição, os folíolos já presentes em cada indivíduo foram marcados de forma a distingui-los dos novos que se desenvolveriam durante o período de exposição. Os nós visíveis foram numerados a partir da base do vaso, em que os primeiros correspondiam às lâminas foliolares completamente expandidas, enquanto os últimos àquelas recém formadas.

2.2. Análises microscópicas

Fragmentos de folíolos que apresentavam injúrias visíveis decorrentes do ozônio (cf. capítulo 1) situados entre o 1^a e 5^a nós de plantas expostas em campo, e folíolos correspondentes de plantas mantidas em casa de vegetação foram fixados em glutaraldeído 2,5% em solução tampão fosfato de sódio 0,067 M, pH 7,0, e armazenados em geladeira à 4°C.

Parte do material destinado às análises estruturais e histoquímicas foi desidratado em série etflica e incluído em resina LR White (London Resin Company) ou historesina Leica (Leica Microsystems), e seccionado transversalmente (1,25 μm) em ultramicrotomo Leica (EMUC6). Os tratamentos aplicados estão apresentados na tabela 2.

O material destinado às análises em microscopia por fluorescência widefield e confocal foram os provenientes de material fixado, seccionados transversalmente (20 μm) em criostato Leica (CM1100) e montado em meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich). Algumas amostras não fixadas foram também observadas sob microscopia confocal nas mesmas condições de análise para assegurar que as alterações no aspecto dos polifenóis não refletiam artefatos de fixação.

Parte das secções foi observada sob filtro azul (entre 400–450 nm) em microscópio widefield Leica DM 5500B (Laboratório de Neurociências, UFABC). Neste microscópio, procedeu-se à análise da máxima projeção, obtida a partir de secções de 10 μm de profundidade em modo Z-stack. Este modo caracteriza-se por imagens de determinada espessura (0,5 – 1 μm) adquiridas em dado intervalo de profundidade (eixo Z). Todas as imagens adquiridas podem ser processadas e agrupadas em uma única imagem (máxima projeção). Assim, é possível analisar a distribuição espacial da emissão dos compostos de interesse.

As secções foram observadas sem nenhum tratamento e também submetidas ao reagente natural A (NA) 0,1% (Sigma-Aldrich) em metanol para análises em microscopia confocal; este reagente apresenta reação seletiva com compostos de estrutura 3-hidróxi-flavona, esqueleto de flavonóis. A reação entre o NA e estes compostos promove o aumento ou a diminuição da fluorescência emitida pelo flavonol (Schnitzler et al., 1996, Hutzler et al., 1998, Tattini et al., 2000).

As amostras sem reagente e tratadas com NA, bem como uma lâmina contendo uma gota do reagente foram excitadas com lasers de 364 e 488 nm, usualmente usados na visualização de compostos fenólicos (Schnitzler et al., 1996, Hutzler et al., 1998, Tattini et al., 2000). As emissões foram obtidas em modo λ -stack, que corresponde a uma série de imagens da mesma região microscópica, cada uma obtida com diferentes comprimentos de onda em incrementos de 10 ou 11 nm, a fim de caracterizar as emissões específicas de diferentes compartimentos ou compostos celulares. As emissões foram observadas entre 367–699 nm. Desta forma, estabelecemos que (i) o reagente NA não apresenta emissão sob as condições analisadas e (ii) a excitação de 364 nm foi a ideal para a observação tanto do material sem reagente quanto daquele tratado com NA.

As observações foram efetuadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510-Meta (Central Analítica, Instituto de Química-USP). Espectros de emissão de pontos específicos foram obtidos a partir de pontos (*region of interest*, ROI) arbitrariamente selecionados nas imagens, na plataforma de análises de imagens Zeiss LSM Image Browser. As amostras em widefield e confocal foram observadas em aumentos de 25 e 40x.

Tabela 2. Reagentes aplicados na identificação de metabólitos em *Astronium graveolens*.

reagente	estrutura-alvo (reação)	compostos alvo*	cor em luz transmitida	referência
azul de Toluidina, pH 6.8	apresenta metacromasia de acordo com a densidade de cargas positivas		compostos fenólicos em verde (por mera adição de cores), compostos protonados em lilas, compostos neutros em azul	Feder & O'Brien, 1968
p-parafenilenodiamina	reação com hidrocarbonetos insaturados	lipídios	cinza	Kivimäempää et al., 2004
reação PAS e PARS	neutralização de aldeídos e cetonas livres com tretrahidretoboreto de sódio; oxidação de estruturas α -1,2-glicol com ácido periódico e identificação do produto pelo reagente de Schiff. A reação PARS se distingue da PAS pela omissão da primeira etapa – neutralização dos aldeídos e cetonas. Dessa forma, outras reações, como a identificação de calose por meio do reagente Calcofluor white, podem ser aplicadas em uma mesma lamina.	polissacarídeos	magenta	Geier, 1980; Gahan, 1984
solução aquosa de cloreto férrico 10%	formação de complexos entre os íons Fe^{3+} e hidroxilas dos compostos fenólicos em meio aquoso	compostos fenólicos	marrom a preto	Johansen, 1940
natural A (NA) 0,1%	reação seletiva com compostos de estrutura 3-hidróxi-flavona	flavonóis	aumento ou a diminuição da fluorescência emitida pelo flavonol	Tattini et al., 2000
DMACA	reação seletiva com compostos de estrutura flavan-3-ol	proantocianidinas	azul	Gutmann & Feucht, 1991
vanilina ácida 10%	reação seletiva com compostos de estrutura flavan-3-ol e flava-3,4-diol	proantocianidinas	vermelho	Sarkar & Howarth, 1976
solução de Sudan black B em álcool etílico 70%	partição: migração do corante a partir da solução alcoólica para compostos mais hidrofóbicos	compostos lipofílicos	azul a preto	Pearse, 1985

*constituídos por ou apresentam as características detectadas pela estrutura-alvo

3. Resultados

3.1. Caracterização ambiental

Em relação às condições de temperatura e umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação, estas apresentaram valores médios entre 19–25°C e 62–78%, respectivamente.

Em campo (Fig. 1), as médias mensais de umidade relativa (UR) mantiveram-se altas durante todas as exposições (cerca de 70–90%), enquanto a precipitação (P) apresentou variações durante o período seco (setembro/2012; abril a setembro/2013), e chuvoso (outubro/2012 a abril/2013; outubro/2013). As médias mensais mais elevadas de temperatura (T) foram registradas na 1ª e 2ª exposições. Da mesma forma, os maiores valores médios mensais da radiação fotossinteticamente ativa (*photosynthetic active radiation*, PAR) foram registrados na 1ª e 2ª exposições, seguida da 4ª, todas divergindo da 3ª exposição, cujas médias foram as mais baixas. A concentração do ozônio (O₃) mostrou-se relevante em todas as exposições, em que o maior SUM0 e SUM06 foram observados na 1ª e 2ª exposições, abrangendo boa parte da estação chuvosa, com picos de 20 ppm h (outubro/2012 e março/2013) e 1,5 ppm h (setembro/2012 e outubro/2012), respectivamente. Os menores valores de SUM0 (7 ppm h) e SUM06 (0,02 ppm h) foram observados na 3ª exposição (junho e maio de 2013, respectivamente), durante o período seco (Fig. 1).

3.2. Aspectos estruturais das lâminas foliulares

Em secção transversal, as lâminas foliulares das plantas mantidas em casa de vegetação (Fig. 2A) apresentaram cutícula fina e epiderme unisseriada em ambas as faces, cujos estômatos foram encontrados restritos à superfície abaxial da lâmina. O mesofilo bilateral constitui-se por uma camada de células do parênquima paliçádico, alongadas e justapostas, apresentando um grande vacúolo central e citoplasma hialinos, cloroplastos periféricos de aspecto achatado, e três a quatro camadas de células do parênquima lacunoso de aspectos semelhantes ao paliçádico, porém com pronunciados espaços intercelulares. Apresenta, ainda, idioblastos cristalíferos contendo cristais do tipo drusa, e canais secretores dispersos no mesofilo. O feixe vascular é do tipo colateral, cujas células parenquimáticas do floema não apresentaram conteúdo denso.

Em contraste, amostras de indivíduos mantidos em campo mostraram acúmulo acentuado de polifenóis no vacúolo das células do parênquima paliçádico ao longo de toda a extensão da lâmina foliolar (Fig. 2A vs B). O aspecto destes compostos no interior do vacúolo mostrou-se variável, sendo identificado e distinto em quatro grupos: 1- denso, preenchendo todo o vacúolo (Fig. 2C, H); 2- grânulos finos ou grossos, preenchendo uniformemente todo o vacúolo (Fig. 2D-E, I); 3- um denso anel ao longo da periferia do vacúolo (Fig. 2F); 4- glóbulos

densos, dispersos ou ligados ao anel denso periférico no interior do vacúolo (Fig. 2G). A identificação dos compostos de todos os aspectos visualizados como polifenóis foi realizada inicialmente pela coloração esverdeada em azul de toluidina, e confirmada por meio de testes com o cloreto férrico (Fig. 2H-I). Ainda, a co-ocorrência de grupos alfa 1,2-glicol foi identificada por meio da reação PAS e PARS (Fig. 2J-K). Não foi observado o acúmulo de proantocianidinas ou um caráter lipofílico destes compostos, inferido a partir do resultado negativo dos testes com DMACA, vanilina ácida e Sudan black B.

As células epiteliais dos canais secretores de amostras provenientes da casa de vegetação e do campo apresentaram o vacúolo preenchido por polifenóis cujo aspecto também apresenta variações semelhantes às encontradas no vacúolo das células do parênquima paliçádico de amostras do campo (Fig. 2L vs 2M).

O aspecto dos polifenóis no interior dos vacúolos das células parenquimáticas não exibiu um padrão aleatório, mas distinto e específico de acordo com a posição das células em relação às células em HR-like: polifenóis do tipo 1 foram encontrados sempre na região do estabelecimento da injúria visível, enquanto os tipos 2 e 3 sempre adjacentes à esta região (Fig. 2M-N); já o tipo 4 foi visualizado nas regiões mais afastadas da injúria, e em menor frequência. O vacúolo das células em HR-like sempre exibiu o tipo 1 (Fig. 2N). O mesmo padrão foi observado em microscopia widefield, em que células em HR-like não apresentaram emissão (Fig. 2O-tracejado), enquanto o tipo 1 foi observado no local da injúria, e os tipos 2 e 3 adjacentes a este (Fig. 2O).

3.3. Análises dos polifenóis em microscopia confocal

Em amostras fixadas de lâminas foliolas provenientes da casa de vegetação, os pontos (ROI) foram arbitrariamente posicionados na região apical e basal de células do parênquima paliçádico, e em células epiteliais do canal secretor. Independentemente da posição nas células do parênquima paliçádico, houve uma intensa emissão apenas referente à clorofila, a partir de 650 nm. Em contraste, as células epiteliais apresentaram picos (de baixa intensidade, comparados à emissão de clorofila) entre 350–500, 500–550 e 550–600 nm (Fig. 3A).

Em amostras fixadas provenientes de plantas mantidas em campo que exibiam injúrias visíveis (ver detalhes no cap. 1), os ROI foram situados no ápice e base de células do parênquima paliçádico, e um sobre a região da injúria, todos exibindo um padrão de emissão semelhante: dois picos entre 400-500 nm, um entre 500-550 nm e outros dois entre 550-650 nm, cuja intensidade foi maior na região de estabelecimento de HR-like, e levemente maior no ROI localizado próximo a epiderme da face adaxial. Em ROI localizados no local de injúria e em células fora desta região de secções tratadas com NA, observou-se que a região de

estabelecimento de HR-like e paredes celulares adjacentes apresentaram emissão apenas quando na presença deste reagente, cujo espectro exibe padrão semelhante, porém com intensidades diferenciadas (Fig. 3C).

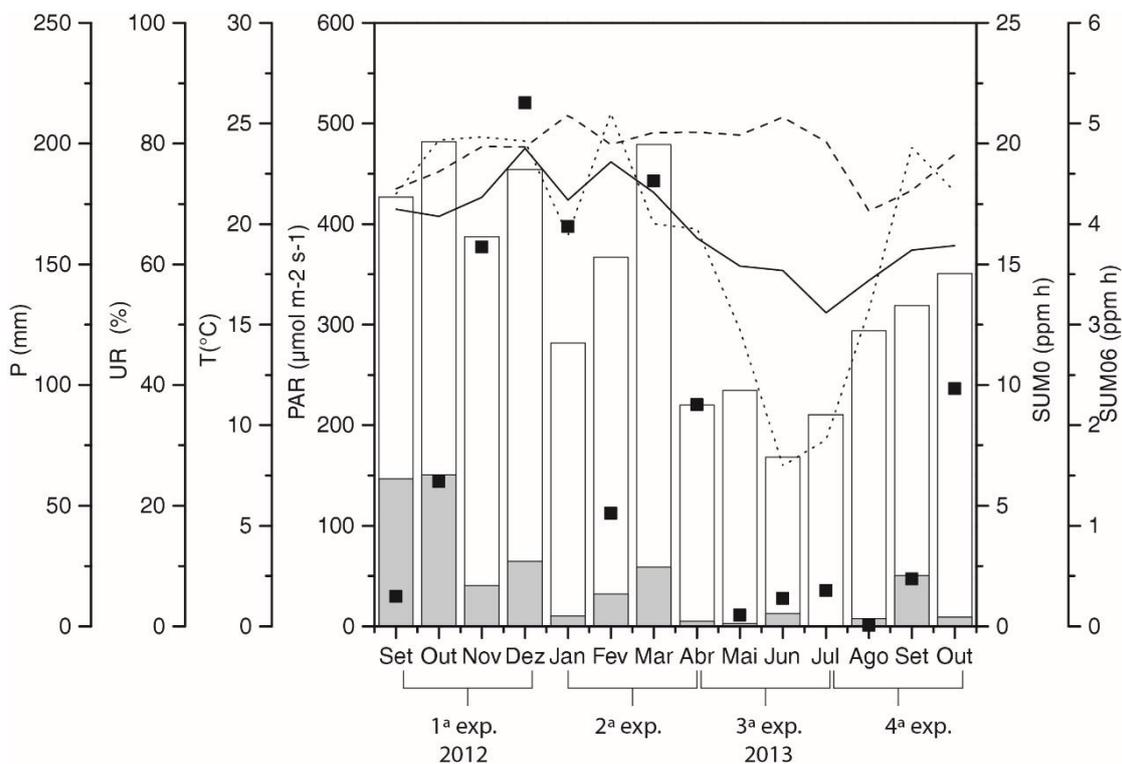


Fig. 1. Caracterização dos parâmetros climáticos e dos índices cumulativos de ozônio no Fitotério do Instituto de Biociências da USP (São Paulo, SP) durante os períodos de exposição das plantas (setembro/2012 a outubro/2013). SUM0, barra sem preenchimento; SUM06, barra preenchida em cinza; linha tracejada, medias mensais de umidade relativa (UR); linha pontilhada, radiação fotossinteticamente ativa (PAR); linha continua, temperatura (T); quadrados preenchidos, volume acumulado de precipitação mensal (P).

Fig. 2. Aspectos estruturais de lâminas foliulares de *Astronium graveolens*, enfatizando os polifenóis (Pf) no interior do vacúolo de células do parênquima paliçádico (PP). Amostras provenientes da casa de vegetação (A) e do campo (B-O) observadas em microscopia de campo claro (A-N) e microscopia widefield (O). Plantas sadias com conteúdo hialino do vacúolo das células do PP (A), contrastando com as amostras do campo (B) com vacúolo completamente preenchido por Pf. (C–G) Detalhes dos aspectos dos Pf no interior do vacúolo de diferentes células do PP: tipo 1 (f1), denso, preenchendo todo o vacúolo da célula (C); tipo 2 (f2), granuloso fino (D) ou grosso (E); tipo 3 (f3), denso em anel ao longo da periferia do vacúolo (F); tipo 4 (f4), globular e denso (G). Natureza fenólica do conteúdo vacuolar confirmada pelo reagente cloreto férrico (H-I). Co-ocorrência de glicosídeos no interior do vacúolo confirmada pelas reações PARS (J) e PAS (K). Padrão de distribuição dos diferentes aspectos de polifenóis no interior das células epiteliais do canal secretor (L) e das células do PP (M). Estabelecimento de HR-like em uma célula do PP (N); note plasmólise (setas) em uma célula contendo compostos fenólicos do tipo 1 (denso). Padrão de distribuição e emissão dos polifenóis no interior do vacúolo das células do PP (O); note ausência de emissão na região da injúria (linha tracejada). Barras=5µm.

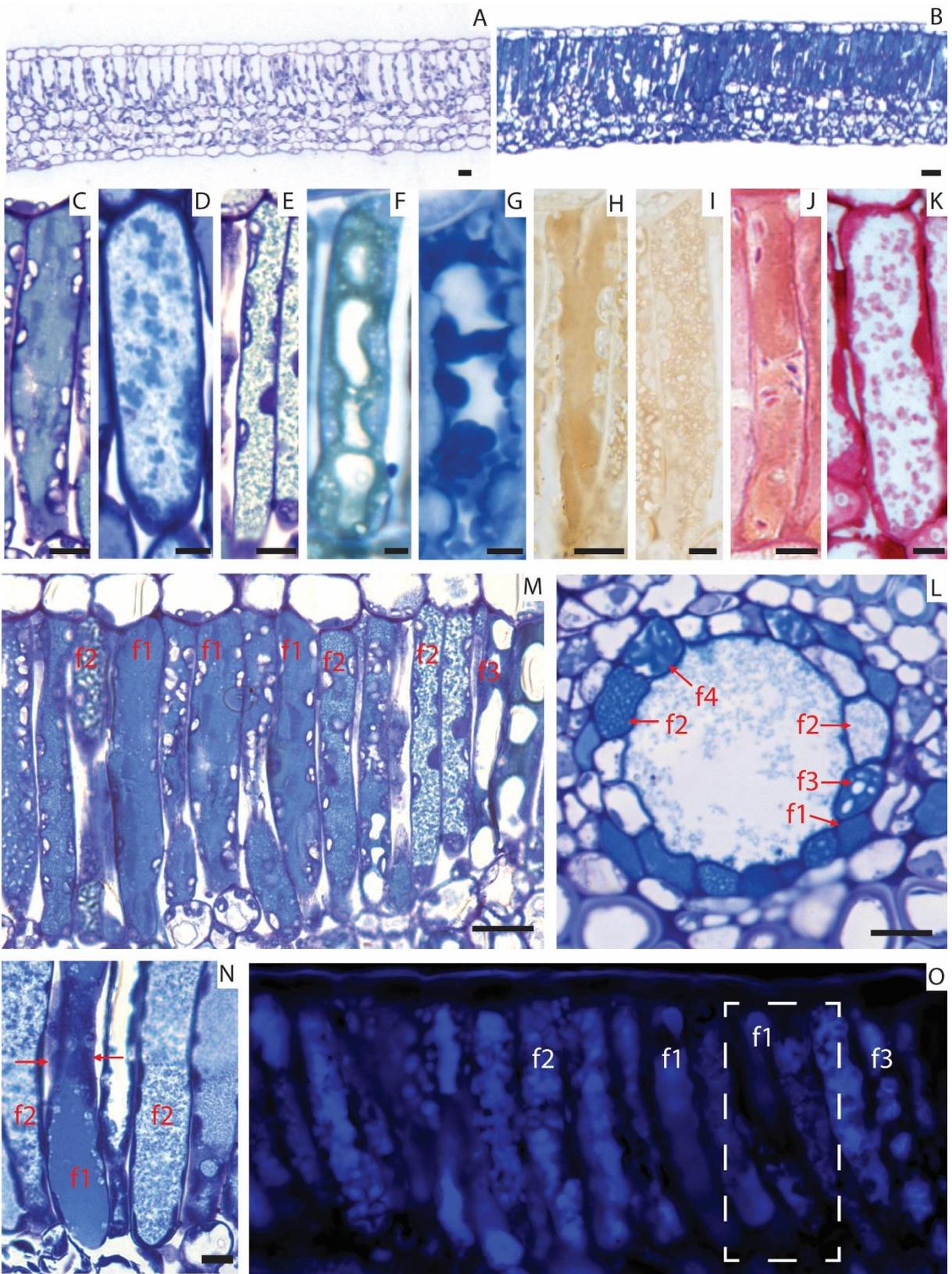
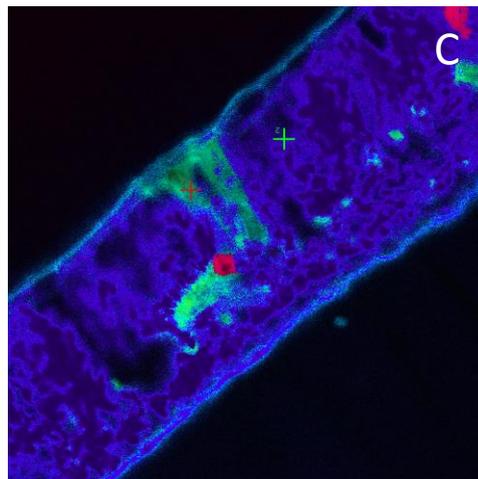
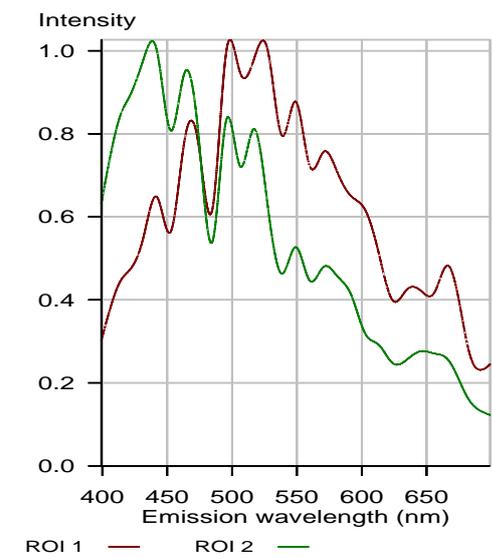
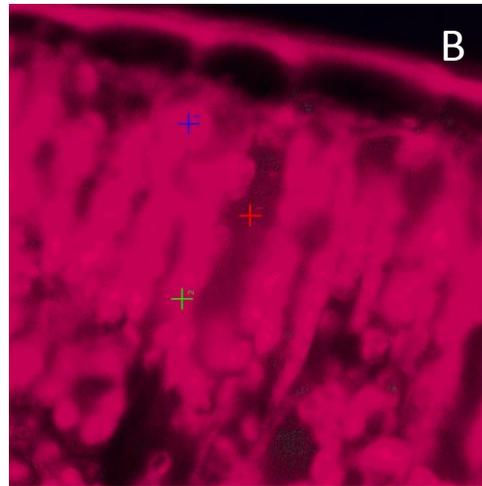
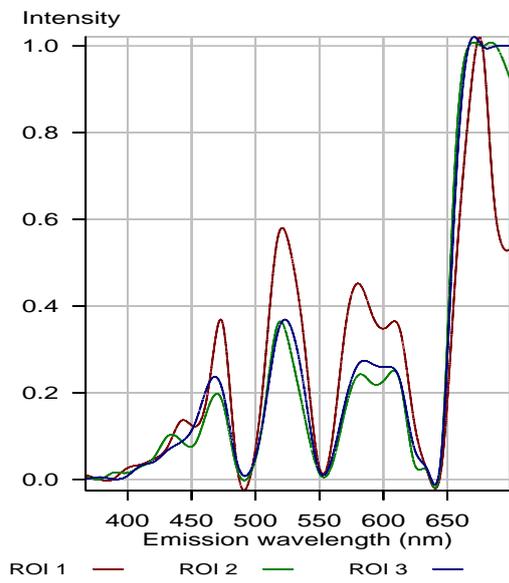
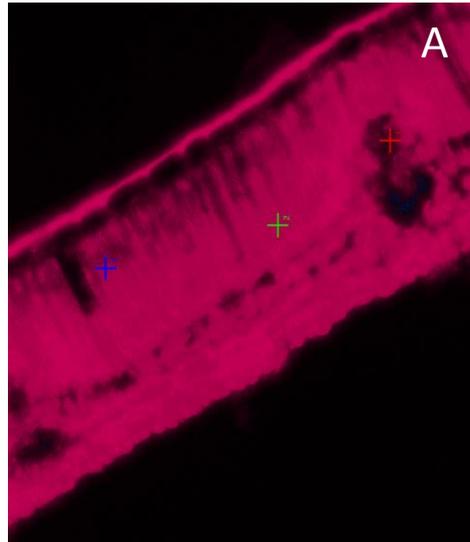
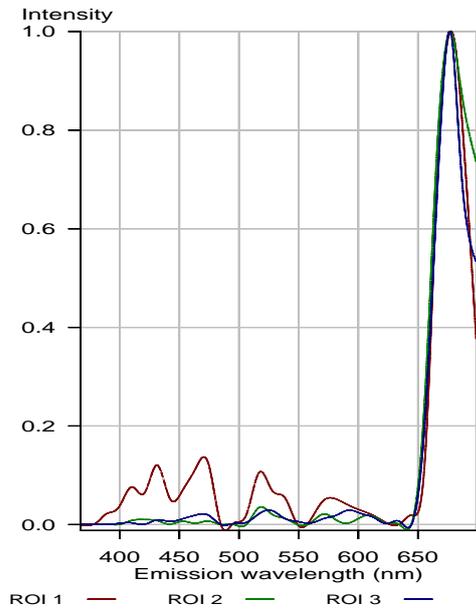


Fig. 3. Espectros de emissão de polifenóis de folíolos de *Astronium graveolens* provenientes de casa de vegetação (A) e campo (B–C) em microscopia confocal. Espectro de emissão de amostras fixadas (A–C) e tratadas com o reagente natural A (C). Emissão referente apenas à clorofila (> 650 nm) nos pontos situados na região apical e basal do parênquima paliçádico (ROI 2 e 3), e diversos picos adicionais entre 350–600 nm a partir da célula epitelial do canal secretor (ROI 1) (A). Emissão a partir da região de estabelecimento de HR-like (ROI 1), e região apical e basal das células do parênquima paliçádico (ROI 2 e 3); note que o espectro é semelhante em todos os ROI, com picos entre 400–650 nm referindo-se à polifenóis e > 650 nm à clorofila, diferindo apenas em intensidade (B). Emissão a partir de células na região de HR-like (ROI 1) e adjacente (ROI 2). A região de HR-like apresenta emissão apenas quando na presença do reagente. Note que a emissão da célula adjacente é semelhante, diferindo apenas na intensidade dos picos ao longo do espectro (C).



4. Discussão

4.1. Considerações sobre as análises de polifenóis em microscopia confocal

As amostras submetidas à microscopia confocal foram previamente fixadas, procedimento que diminui a intensidade da autofluorescência emitida, mas não a retira completamente, sendo possível a observação do espectro de fluorescência de polifenóis mesmo em baixa intensidade (Cardoso-Gustavson & Davis, 2015). Outra vantagem da previa fixação, no presente estudo, é a possibilidade de se observar apenas a emissão do alvo (polifenóis), descartando sobreposição com outros compostos e/ou estruturas em movimento (principal dificuldade quando se observam células vivas). O glutaraldeído forma ligações cruzadas com as cadeias laterais das proteínas, formando grupos hidroximetil³. Este fixador penetra nas proteínas e ácidos nucleicos para reagir com grupos amina livres. Pode, também, reagir com alguns lipídios insaturados, particularmente na presença de íons cálcio, mas não reage com carboidratos (Eltoum et al., 2001). Por conseguinte, a ausência de grupos amina em polifenóis sugere a inexistência de ligações cruzadas entre estes compostos e o glutaraldeído. Para excluir, definitivamente, a possibilidade de que os padrões de polifenóis no interior do vacúolo constituíam artefato de técnica, procedemos à análise de amostras não-fixadas e, embora a observação torna-se mais difícil devido à emissão simultânea de compostos da maioria das estruturas subcelulares, foi possível avaliar que o processo de fixação realmente não afetou o padrão de deposição dos polifenóis.

Infelizmente, não há nenhum *probe* fluorescente disponível que seletivamente forme adutos com flavonóides individuais em diferentes matrizes. É notável, também, que padrões de emissão *in situ* podem apresentar certa distinção dos observados *in vitro* já que estes são obtidos a partir do composto purificado, enquanto a molécula encontra-se estabilizada por diferentes ligações nas células. Desta forma, é necessário, além do conhecimento da emissão dos padrões *in vitro*, de dados de literatura em que a emissão *in situ* do composto-alvo também tenha sido avaliada (Roschina & Roschina, 2003; Roschina, 2008, 2012). O uso de diferentes testes histoquímicos e análises de fluorescência, que evidenciam diferentes propriedades da molécula-alvo, bem como a localização de determinados compostos em dados compartimentos e impossibilidade de sua ocorrência em outros (p. ex., compostos fenólicos nunca estão dispersos no citoplasma, enquanto terpenóides e polissacarídeos – à exceção de frutanos – não são encontrados no vacúolo) facilitam a posterior interpretação dos dados obtidos.

³ Também conhecido como “base Tris”. A nomenclatura IUPAC é 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol e fórmula (HOCH₂)₃CNH₂.

A interpretação também foi facilitada pelo conhecimento prévio dos polifenóis constitutivos de *A. graveolens* (Silva et al., 2011). A partir dessas informações, foi possível dirigir os estudos para a localização das principais classes (flavonóis e elagitaninos) de polifenóis durante os eventos de estresse. Apenas com os testes histoquímicos, foi possível determinar que os compostos no interior dos vacúolos e na região de estabelecimento de HR-like são polifenóis glicosilados, pois apresentam glicosídeos constituindo sua estrutura. E, também, que os compostos nas paredes e células em HR-like são flavonóis. Resultados negativos com testes para a detecção de compostos lipofílicos e taninos condensados (proantocianidinas) excluíram a sua ocorrência, em conformidade com os resultados das análises de taninos hidrolisáveis e flavonóis constitutivos dos folíolos desta espécie (Silva et al., 2011).

Assim, assumimos que os compostos no interior do vacúolo das células parenquimáticas consistem em elagitaninos em diferentes fases de polimerização, baseando-nos inicialmente no fato de que os taninos são compostos altamente citotóxicos que devem ser confinados no vacúolo da célula ou em glândulas como canais/cavidades secretoras e laticíferos (Joel & Fanh 1980a; Vollenweber & Dietz, 1980). O vacúolo é um local de armazenamento de compostos antioxidantes, não constituindo um sistema antioxidante efetivo, visto que está fisicamente separado dos centros de formação de ROS – apoplasto, parede celular, citosol, cloroplastos (Agati et al., 2012, 2013). Ainda, os taninos (pelo menos os condensados) não atuam diretamente como antioxidantes (Tharayi et al., 2011). Adicionalmente, os elagitaninos observados no vacúolo das células parenquimáticas exibem um gradiente de intensidade de emissão, mais intenso quanto mais próximo à epiderme adaxial, evidência adicional da relação destes compostos com a proteção contra estresse luminoso, e não efetivamente no combate às ROS.

A localização de polifenóis fora do vacúolo refere-se, possivelmente, aos flavonóis glicosilados descritos em *A. graveolens*, visto a sua identificação no protoplasto, parede celular e apoplasto (Endo et al. 2012, Petrusa et al. 2013). A emissão de derivados glicosilados de quercetina apresenta valores máximos entre 540–560 nm (Buer & Muday 2004, Buer et al., 2007, Toda et al., 2012) nas mesmas condições de análise do presente estudo. Estes dados são coerentes com a alta intensidade de sinal (pico) encontrado em regiões do paliádico que não apresentavam autofluorescência (amostras provenientes do campo) e cuja intensidade de emissão foi aumentada (o suficiente para ser detectada e distinta) com o reagente natural A. Note que o pico entre 500–550 nm apresentou uma maior área relativa, que aqui atribuímos à convolução dos picos de emissão de derivados de quercetina. Estes picos são posteriormente distintos (deconvoluídos) apenas quando na presença de natural A. Entre os flavonóis, a

quercetina apresenta maior capacidade antioxidante (Buchter et al., 2013). Devido à alta capacidade destes flavonóis em combater ROS, é coerente a sua ocorrência na região de HR-like (parede celular e protoplasto), apoplasto e em células adjacentes (porém, em menor intensidade). Perceba que a região de estabelecimento de HR-like e adjacências estão sob forte oxidação, justamente devido ao papel oxidante dos flavonóis. Desta forma, o composto deixa de apresentar autofluorescência e passa a emitir uma coloração marrom nos tecidos, característica de oxidação de fenólicos, e que se relaciona às alterações em sua estrutura química causadas por esta ação.

Em relação aos demais picos provenientes tanto das células epiteliais dos canais secretores de amostras da casa de vegetação quanto das células do parênquima paliçádico de amostras do campo (tratados ou não com natural A), nossa sugestão é a de que possivelmente estejam relacionados à emissão pelos elagitaninos e seus precursores. Diferentes padrões de deposição de polifenóis podem estar relacionados, de fato, a precursores de um produto final, ou a processos de polimerização de moléculas complexas (Franceschi et al., 1998). No entanto, não encontramos, até o momento, nenhum estudo que apresente uma descrição do padrão de emissão *in situ* destes compostos. A observação do vacúolo hialino das células do parênquima paliçádico de amostras provenientes da casa de vegetação indica, a princípio, a ausência de polifenóis. Sob microscopia confocal, no entanto, o mesmo material apresentou picos muito pequenos de emissão na região de polifenóis, confirmando a proposição de que os polifenóis estão presentes em baixa concentração no vacúolo de células saudáveis, não detectáveis por técnicas usuais de análises (Agati et al., 2013), mas sim por meio de técnicas de imagem de maior sensibilidade. O que se segue, nas amostras do campo, é a presença de elagitaninos no vacúolo de todas as células do parênquima paliçádico, indicando a indução de defesas. Estes compostos estão relacionados aos processos de senescência celular (natural e acelerada), e defesa contra estresse biótico (War et al., 2012), e tem alta relevância na interação planta-solo-detritos (folhas senescentes liberadas por ela mesma), pois plantas que apresentam taninos não realocados durante a senescência parecem ganhar uma vantagem competitiva através da alteração da ciclagem de nutrientes, ao disponibilizar para si mesma derivados de carbono investidos na defesa (Zhang et al., 2009).

4.2. Aspectos estruturais do sinergismo entre luz e ozônio

Estudos cujo foco é a validação de injúrias visíveis causadas especificamente pelo O₃ geralmente são realizados no interior de câmaras de fumigação, de forma a isolar a fonte de estresse. Ainda neste contexto, e ressaltando a relevância da anatomia, a única forma de se

validar corretamente a ocorrência de dada injúria como estresse oxidativo causado pelo O₃ é, justamente, por meio de análises estruturais e histoquímicas. Assim, após conhecer o efeito isolado deste poluente, é possível entender padrões de respostas quando um segundo estresse é adicionado. Estes efeitos podem ser antagônicos, em que um estresse protege a planta do segundo, ou a resposta a um estresse confere defesa ao outro (Foyer et al., 1994; Bussotti, 2008; Pollastrini et al., 2010), ou sinérgicos, em que um estresse potencializa o efeito do outro, como a interação entre o O₃ e o estresse luminoso. Este tipo de sinergismo é a base dos estudos que envolvem *open top chambers*, visto que as plantas são expostas a ambos os estresses simultaneamente (Paoletti et al., 2009; Pollastrini et al., 2010), em uma situação mais próxima à encontrada no ambiente natural. Dessa forma, como ambos os processos promovem uma intensa formação de ROS, o limiar para indução de morte celular programada (i.e., estabelecimento de HR-like) torna-se menor. Nos estudos desenvolvidos por Moura (2013), em que indivíduos jovens de *A. graveolens* (similares ao usados aqui) foram cronicamente fumigados com O₃ (70 ppb, 6h/dia durante 53 dias, e uma segunda repetição de 36 dias nestas mesmas condições), não foram observadas respostas do tipo HR-like, apenas o surgimento de protrusões na parede celular e processos de oxidação de compostos fenólicos (cf. cap. 1). No entanto, respostas do tipo HR-like foram observadas quando as plantas foram fumigadas de forma aguda (200 ppb 4h/dia durante 3 dias), bem como a ocorrência de taninos no interior do vacúolo das células do parênquima paliçádico, que também apresentavam aspecto denso nas células em HR-like (Moura 2013). Isso indica que o processo de formação de ROS deve ser necessariamente intenso, tornando-se inviável o combate destes compostos pelas células, para desencadear processos de indução de morte celular programada nesta espécie.

Considerando o presente estudo, embora as concentrações de ozônio tenham sido relativamente baixas, comparadas ao estresse agudo e crônico induzidos por Moura (2013), o estresse oxidativo previamente causado pelo excesso de luz provavelmente já havia induzido a formação de ROS, e a formação de O₃ durante algumas horas do dia ao longo do tempo de exposição provocou uma ação sinérgica, intensificando a geração de ROS e levando então ao estabelecimento de HR-like.

4.3. Relações entre canais secretores lisígenos e a ocorrência de HR-like em células do parênquima paliçádico

Interessantemente, o aspecto dos elagitaninos no vacúolo das células do parênquima paliçádico apresentou um padrão, ocorrendo de forma densa nas células na região de injúria e em processos de HR-like e de forma globular e granulosa (densa a fina) em regiões afastadas.

Aspectos distintos de polifenóis no vacúolo das células do mesofilo também foram observadas em espécies submetidas ao O₃ em combinação com outras fontes de estresse abiótico, como a intensa radiação ou a baixa disponibilidade de água no solo; em ambos os casos, os estresses atuaram em sinergismo com o O₃, aumentando o estresse oxidativo (Bussoti et al., 1997, Kivimäenpää et al., 2014, Reig-Arminana et al., 2004). No entanto, em nenhum destes estudos houve uma identificação de um padrão espacial dos aspectos dos polifenóis.

O padrão observado no vacúolo das células do parênquima paliçádico também foi relatado durante os processos de secreção de óleo-resina (terpenóides e polifenóis) pelas células epiteliais de canais e cavidades secretoras em espécies de Anacardiaceae (Joel & Fahn, 1980b; Carmello-Guerreiro & Paoli, 2000; Machado & Carmello-Guerreiro, 2001; Lacchia, 2006; Lacchia & Guerreiro, 2009). De modo geral (Joel & Fahn, 1980a, 1980b), o processo de formação destas glândulas nesta família é, majoritariamente, esquizolisígeno e ocorre em células originadas no meristema fundamental (quando não associadas às iniciais vasculares). Durante o processo de desenvolvimento da glândula, as células epiteliais sintetizam os metabólitos constituintes da secreção, liberados por meio de lise celular (secreção holócrina). Embora Joel & Fahn (1980a, 1980b) tenham elaborado poucas considerações acerca da fração fenólica desta secreção, eles relataram que o vacúolo adquiria um aspecto cada vez mais eletrôn-denso, culminando em um conteúdo completamente denso no momento da lise. Perceba que tanto estas glândulas quanto as células do parênquima paliçádico têm origem no meristema fundamental. A ocorrência de processos similares não seria apenas uma analogia, mas sim processos homólogos⁴ de defesa. Desta forma, comparando a fase secretora da glândula e os padrões observados no parênquima paliçádico, não é surpreendente que processos de morte celular programada (HR-like) ocorram justamente nas células cujo vacúolo apresenta conteúdo denso. Da mesma forma que diferentes padrões de taninos são observados no interior das células epiteliais e que culminam no aspecto denso anterior à lise celular, expandimos este raciocínio para as células do parênquima paliçádico.

O ozônio e o estresse causado pelo excesso de luz podem induzir a senescência foliar (i.e., promover a aceleração da senescência⁵), que se refere aos processos de degradação e realocação de metabolitos para outras partes da planta (Yao & Greenberg, 2006), embora a realocação de taninos seja baixa (em contraste com outras classes de polifenóis solúveis) posto

⁴ Tal qual estruturas são denominadas homólogas quando apresentam uma origem em comum, os processos em si, quando compostos ou organizados por partes homólogas, também podem ser considerados homólogos. Essas vias são conservadas ao longo do tempo evolutivo e transmitidas por meio de descendência (Gilbert & Bolker, 2001).

⁵ O termo “senescência” e, por conseguinte, “senescência acelerada” referem-se aos órgãos (Hadfield & Bennet, 1997). Em referência às células, o termo correto é “morte celular” e “aceleração de morte celular”, respectivamente (Hanaoka et al., 2002; Tanaka et al., 2003; Yao & Greenberg, 2006), em oposição ao uso do termo “senescência celular acelerada”, embora muito utilizado por autores (Vollenweider et al., 2003; Günthardt-Goerg & Vollenweider, 2007) que avaliam os efeitos do O₃ em plantas.

que estes compostos são reciclados para a planta de forma indireta, pela degradação no solo (Zhang et al. 2009).

Do exposto, interpreta-se que as células que constituem o parênquima paliçádico estejam em processo de resposta ao excesso de luz e, provavelmente, em processo de aceleração de morte celular, dada a semelhança entre o padrão dos taninos no vacúolo destas células com as células secretoras que entrarão em lise na fase secretora. Este processo de aceleração de morte celular culmina no processo de senescência foliar (acelerada). Esta planta é uma secundária inicial e apresenta sensibilidade quando exposta a altos níveis de radiação fotossinteticamente ativa, e recuperação lenta quando na fotoinibição do fotossistema II (Ribeiro et al., 2005). Quando na presença do ozônio, há então uma intensificação na produção de ROS produzidas, resultando em respostas de combate a esses compostos por meio de flavonóis com alto poder antioxidante (quercetina), e estabelecimento de HR-like observadas em células já comprometidas pelo estresse luminoso, ou seja, aquelas que apresentam elagitaninos do tipo 1.

Padrões de respostas semelhantes (mesma origem ontogenética, aspectos semelhantes do conteúdo vacuolar e lise celular em células específicas) entre canais secretores e células do parênquima paliçádico indicam a possibilidade de ambos os fenômenos apresentarem uma mesma base genética. De fato, estes processos estão relacionados à uma mesma família de genes denominada WRKY (Huh et al., 2012, Robatzek & Somssich, 2001; Wu et al., 2008). Proteínas WRKY são fatores de transcrição planta-específicos codificados por uma família multigênica já identificada em diversas espécies de Tracheophyta, incluindo representantes de eudicots (Huh et al., 2012). Fatores de transcrição WRKY são considerados atuantes em funções regulatórias nas defesas constitutivas e induzidas contra estresses bióticos e abióticos, bem como em processos de senescência celular e, não surpreendentemente, também na regulação de processos de respostas de hipersensibilidade – embora apenas relatado em relação ao vírus mosaico do tabaco (Huh et al., 2012). Esta base genética comum, associada às análises realizadas no presente estudo, sustentam a hipótese deste capítulo de que os processos de defesa no sinergismo entre estresse luminoso e ozônio que envolvem a síntese de elagitaninos e respostas HR-like são homólogos aos de desenvolvimento e secreção de polifenóis por células epiteliais dos canais secretores.

6. Referências Bibliográficas

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* 196, 67–76.
- Agati, G., Brunetti, C., Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35–45.
- Bartoli, G., Forino L.M.C., Tagliasacchi, A.M., Durante, M., 2013. Cell death induced by ozone stress in the leaves of *Populus deltoides* × *maximowiczii*. *Biologia Plantarum* 57, 514–524.
- Biolley, J.P., Kanoun, M., Goulas, P., 2002. The response of vacuolar phenolic content of common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Bergamo) to a chronic ozone exposure: questions and hypotheses. *Functional Plant Biology* 29, 1–11.
- Booker, F.L., Burkey, K.O., Jones, A.M., 2013. Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell & Environmental* 35, 1456–1466.
- Büchter, C., Ackermann, D., Havermann, S., Honnen, S., Chovolou, Y., Fritz, G., Kampkötter, A., Wätjen, W., 2013. Myricetin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16. *International Journal Molecular Sciences* 14, 11895–11914.
- Buer, C.S., Muday, G.K. 2004. The transparent testa4 Mutation Prevents Flavonoid Synthesis and Alters Auxin Transport and the Response of Arabidopsis Roots to Gravity and Light. *The Plant Cell*, 16, 1191–1205.
- Buer, C.S., Muday, G.K., Djordjevic, M.A., 2007. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in Arabidopsis. *Plant Physiology* 145, 478–490.
- Bussotti, F., 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Global Change Biology* 14, 2727–2739.
- 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.
- Bussotti, F., Gravano, E., Grossoni, P., e Tani, C., 1998. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytologist* 138, 469–479.

- Cardoso-Gustavson, P., Davis, A.R., 2015. Is nectar reabsorption restricted by the stalk cells of floral and extrafloral nectary trichomes? *Plant Biology* 17, 134–146.
- Carmello-Guerreiro, S.M., Paoli, A.A.S., 2000. Estrutura do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) com notas taxonômicas. *Revista Brasileira de Botânica* 23, 87–96.
- Castro, M.M., Demarco, D., 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications* 3, 1273–1284.
- Chen, T., Wiemer D., 1984. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. *Naturwissenschaften* 71, 97–98.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R.B., Grizzle, W.E., 2001. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *Journal of Histotechnology* 24, 173–190.
- Endo, A., Tatematsu, K., Hanada, K., Duermeyer, L., Okamoto, M., Yonekura-Sakakibara, K., Saito, K., Toyoda, T., Kawakami, N., Kamiya, Y., Seki, M., Nambara, E., 2012. Tissue-specific transcriptome analysis reveals cell wall metabolism, flavonol biosynthesis and defense responses are activated in the endosperm of germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiology* 53, 16–27.
- Feder, N., O'Brien, 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55, 123–142.
- Fini, A., Guidi, L., Ferrini, F., Brunetti, C., Ferdinando, M.D., Biricolti, S., Pollastri, S., Calamai, L., Tattini, M., 2012. Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: An excess light stress affair? *Journal Plant Physiology* 169, 929–939.
- Foyer, H.C., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Pisyologia Plantarum* 92, 696–717.
- Franceschi, V.R., Krekling, A.A., Christiansen, E., 1998. Specialized phoem parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *American Journal of Botany* 85, 601–615.
- Furlan, C.M., Moraes, R.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Salatino, A., Sanz, M.J., 2007. *Psidium guajava* ‘Paluma’ (the guava plant) as a new bio-indicator of ozone in the tropics. *Environmental. Pollution* 147, 691–695.
- Furlan, C.M., Salatino, A., Domingos, M., 1999. Leaf contents of nitrogen and phenolic compounds and their bearing with the herbivore damage to *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), under the influence of air pollutants from industries of Cubatão, São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22, 317–323.

- Furlan, C.M., Santos, D.Y.A.C., Motta, L.B., Domingos, M., Salatino, A. 2010. Guava flavonoids and the effects of industrial air pollutants. *Atmospheric Pollution Research* 1, 30–35.
- Gahan, P.B., 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry*. London: Academic Press.
- Geier, T. 1980. PAS-positive reaction of phenolic inclusions in plant cell vacuoles. *Histochemistry* 65,167–71.
- Gilbert, S.F., Bolker, J.A., 2001. Homologies of processes and modular elements of embryonic construction. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 291, 1–12.
- Guerrero, C.C., Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P., 2013. Foliar Symptoms Triggered by Ozone Stress in Irrigated Holm Oaks from the City of Madrid, Spain. *Plos One*, 8, 10-13.
- Günthardt-Goerg, M.S., Vollenweider, P., 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostic perspectives. *Environmental. Pollution* 147, 467–88.
- Gutmann, M., Feucht, W., 1991. A new method for selective localization of flavan-3-ols in plant tissues involving glycolmethacrylate embedding and microwave irradiation. *Histochemistry* 96, 83–86.
- Hadfield, K.A. e Bennett, A.B., 1997. Programmed senescence of plant organs. *Cell Death & Differentiation* 4, 662–670.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y., 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiology* 129,1181–1193.
- Hernández, V., Mora, F., Araque, M., Montijo, S.D., Rojas, L., Meléndez, P. e Tommasi, N.D., 2013. Chemical composition, and antibacterial activity of *Astronium graveolens* Jacq essential oil. *Revista Latinoamericana de Química* 41,2.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heller, W., Jungblut, T.P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G., e Schnitzler, J.P., 1998. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*. 49, 953–965.
- Joel, D.M., Fahn, A. 1980b. Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 2. Resin secretion in the primary stem ducts. *Annals of Botany* 46, 779–783.
- Joel, D.M., Fahn, A., 1980a. Ultrastructure of the resin Ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 1. Differentiation and senescence of the shoot ducts. *Annals of Botany* 46, 225–233.

- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- Kivimäenpää, M., Jonsson, A.M., Stjernquist, I., Sellden, G., Sutinen, S., 2004. The use of light and electron microscopy to assess the impact of ozone on Norway spruce needles. *Environmental Pollution* 127, 441–453.
- Kivimäenpää, M., Riikonen, J., Sutinen, S., Holopainen, T., 2014. Cell structural changes in the mesophyll of Norway spruce needles by elevated ozone and elevated temperature in open-field exposure during cold acclimation. *Tree Physiology* 34, 389–403.
- Krupa, S.V., 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.
- Lacchia, A.P.S., 2006. Estruturas secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de espécies de Anacardiaceae: anatomia, histoquímica e ultra-estrutura [Thesis]. Instituto de Biologia- UNICAMP.
- Lacchia, A.P.S., Carmello Guerreiro, S.M., 2009. Aspectos ultra-estruturais dos canais secretoras em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Botanica Basilica* 23, 376–388.
- Langenheim, J.H. 1990. Plant Resins. *American Scientist* 78, 16–24.
- Lees, G.L., Gruber, M.Y., Suttill, N.H., 1995. Condensed tannins in sainfoin. II. Occurrence and changes during leaf development. *Canadian Journal of Botany* 73, 1540–1547.
- Machado, S., Carmello-Guerreiro, S.M. 2001. Estrutura e desenvolvimento de canais secretoras em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Acta Botanica Basilica* 15, 189–195.
- Moura, B.B., 2013. Análise estruturais e ultraestruturais em folhas de espécies nativas sob influência de poluentes aéreos [Thesis]. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- Moura, B.B., Souza, S.R., Alves, E.S., 2014. Response of Brazilian native trees to acute ozone dose. *Environmental Science and Pollution International Research* 21, 4220–4227.
- Paoletti, E., Contran, N., Bernasconi, P., Günthardt-Goerg, M.S., 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.
- Pearse, A.G.E., 1985. Histochemistry: theoretical and applied. v.II. Livingstone, Edinburgh.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A., 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 14950–14973.

- Pollastrini, M., Desotgiu, R., Cascio, C., Bussotti, F., Cherubini, P., Saurer, P., Gerosa, G., Marzuoli, R. 2010. Growth and physiological responses to ozone and mild drought stress of tree species with different ecological requirements. *Trees* 24, 695–704.
- Reig-Arminiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., García-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.
- Rezende, F.M., Furlan, C.M., 2009. Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76, 1445–1450.
- Ribeiro, R.V., Souza, M.G., Oliveira, R.F., Machado, E.C., 2005. Photosynthetic responses of tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions. *Revista Brasileira de Botânica* 28, 149–161.
- Robatzek, S., Somssich, I.E., 2001. A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *The Journal* 28, 123–133.
- Roschina, V.V., Roschina, V.D., 2003. Ozone and plant cell. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Roshchina V.V., 2008. Fluorescing world of plant secreting cells. Science Publishers, Enfield, UK.
- Roshchina, V.V., 2012. Vital Autofluorescence: application to the study of plant living cells. *International Journal of Spectroscopy* 2012, ID 124672.
- Sandre, A.A., Pina, J.M., Moraes, R.M., Furlan, C.M., 2014. Anthocyanins and tannins: is the urban air pollution an elicitor factor?. *Brazilina Journal of Botany* 37, 9–18.
- Sarkar, S.K., Howarth, R.E., 1976. Specificity of the vanillin test for flavanols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 24, 317–320.
- Schnitzler, J.P., Jungblut, T.P., Heller, W., Kofeerlei, M., Hutzlek, P., Heinzmann, U., Schmelzer, E., Dieter, E., Langebartel, C., Sandermann, H., 1996. Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist* 132, 247–258.
- Sharma, H.C., 2012. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1306–1320.
- Silva, V.C., Napolitano, A., Eletto, D., Rodrigues, C.M., Pizza, C., Vilegas, W., 2011. Characterization of gallotannins from *Astronium graveolens* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry and matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 17, 365–375.

- Sutinen, S., Skarby, L., Wallin, G., Sellden, G., 1990. Long-term exposure of Norway spruce, *Picea-Abies* (L) Karst, to ozone in open-top chambers. 2. Effects on the ultrastructure of needles. *New Phytologist* 115, 345–355.
- Tanaka, R., Hirashima, M., Satoh, S., Tanaka, A., 2003. The *Arabidopsis-accelerated cell death* gene *ACD1* is involved in oxygenation of pheophorbide *a*: inhibition of the pheophorbide *a* oxygenase activity does not lead to the “stay-green” phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 44, 1266–1274.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinellis, P., Mulinaccis, N., Romani, A., 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148, 69–77.
- Tharayil, N., Suseela, V., Triebwasser, D.J., Preston, C.M., Gerard e Jeffrey, P.D., Dukes, J.S., 2011. Changes in the structural composition and reactivity of *Acer rubrum* leaf litter tannins exposed to warming and altered precipitation: climatic stress-induced tannins are more reactive. *New Phytologist* 191,132–145.
- Toda, K., Haruko, K., Senthil, K., Shimada, N., Aoki, T., Ayabe, S., Shimada, S., Sakura, M., Miyazaki, Y., Takahashi, R., 2012. The soybean F3'H protein is localized to the tonoplast in the seed coat hilum. *Planta* 236, 79–89.
- Tresmondi, F., Alves, E.S. 2011. Structural changes in *Psidium guajava* ‘Paluma’ leaves exposed to tropospheric ozone. *Acta Botanica Brasilica* 25, 122–129.
- Vassilyev, A.E. 2000. Quantitative ultrastructural data of secretory duct epithelial cells in *Rhus toxicodendron*. *International Journal Plant Sciences* 161, 615-630.
- Vollenweber, E., Dietz, H.V., 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20, 869–932.
- 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.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2012. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1306-1320.
- Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R., Rensing, S.A., 2010. The Molecular and physiological responses of *Physcomitrella patens* to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology* 153, 1123–1134,
- Wu, H., Ni, Z., Yao, Y., Guo, G., Sun, Q., 2008. Cloning and expression profiles of 15 genes encoding WRKY transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Progress in Natural Science* 18, 697–705.

- Yao, N. e Greenberg, J.T., 2006. Arabidopsis accelerated cell death2 modulates programmed cell death. *The Plant Cell* 18, 397–411.
- Zhang, L., Ye, G., Lin., Y., Zhou, H., Zeng, Q., 2009. Seasonal changes in tannin and nitrogen contents of *Casuarina equisetifolia* branchlets. *Journal of Zhejiang University Science B* 10,103–111.

Conclusão

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento da pesquisa permitiram responder satisfatoriamente às hipóteses inicialmente formuladas; as hipóteses e suas respectivas respostas são detalhadas adiante.

(1) *A. graveolens* na presença do O₃ vai apresentar injúrias visíveis características quando exposta em campo com esse gás e que os marcadores microscópicos permitirão validar essas injúrias.

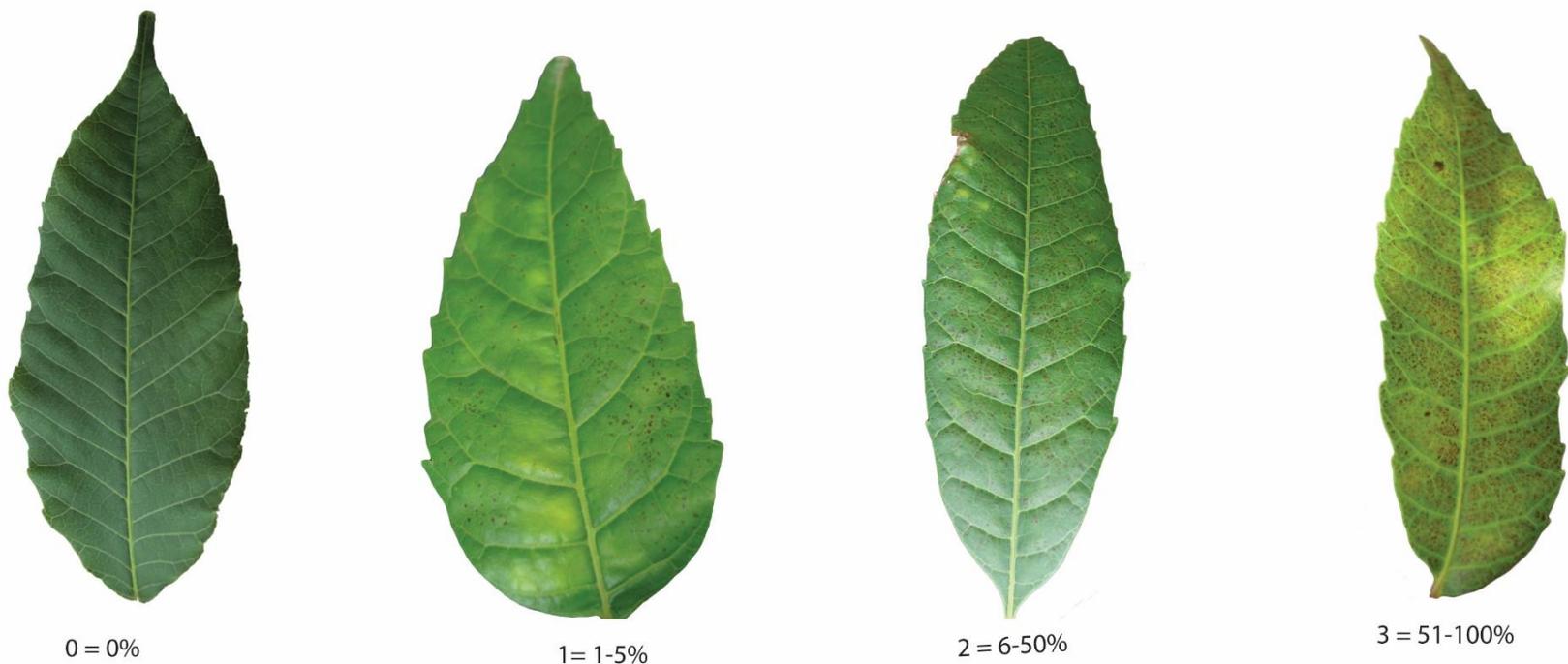
A. graveolens respondeu ao O₃ com injúrias visíveis e os marcadores observados em amostras sintomáticas do campo, permitiram sua validação

(2) A existência de um padrão de deposição dos polifenóis e estabelecimento de HR-like em resposta ao sinergismo seguem o mesmo padrão observado nas células epiteliais dos canais secretores lisígenos constitutivos.

Observamos processos homólogos de desenvolvimento (canais secretores) e defesa (ao sinergismo), programada, em adição à ocorrência de um mesmo padrão de distribuição espacial de elagitaninos, ambos culminando em processos de morte celular.

Essa Dissertação ressalta a relevância da anatomia no entendimento dos processos de defesa da planta aos fatores ambientais, colocando-a como peça fundamental em estudos de biomonitoramento.

Anexo 2



Quantificação das injúrias em folíolos de *A. graveolens* baseada nas recomendações do Manual do ICP (2004) que classifica os sintomas em categorias: 0 (sem sintomas visíveis induzidos por ozônio), 1 (1%-5% de sintomas visíveis induzidos por O₃ ocupando a área do folíolo), 2 (6%-50% de sintomas visíveis induzidos por O₃ ocupando a área do folíolo) e 3 (51%-100% de sintomas visíveis induzidos por O₃ ocupando a área do folíolo).