

Interações do ácido indolil-3-acético e calcio sobre o fluxo de água de células de *Nitella*

por

Antonia Lélia Guadagnuci Piccolo

(Recebido para publicação em 14 de Abril, 1977).

Abstract: The effect of indol-3-acetic acid (IAA) and calcium (Ca^{++}) on the flow of water through *Nitella* cells was studied. *Nitella cernua* Braun was selected because it is possible to study the permeability of a single isolated cell. IAA was used at a concentration of $0,28 \cdot 10^{-3}$ M and CaCl_2 at 10^{-3} M. The effect of IAA on the isolated cells was confirmed by the increase of plasticity and permeability of the plasmalema of the treated cells with absorption and a consequent elimination of water. The effect was reversed by Ca ions.

É conhecido que as auxinas produzem mudanças na absorção de vários materiais inclusive água, pelas células vegetais. Isso levou alguns pesquisadores a propor efeitos diretos da auxina sobre as membranas (Bungenberg de Jong & Saubert, 1937); mais tarde outros (Commoner & Mazia, 1942; Reinders, 1938, 1942) observaram que as auxinas aumentam a absorção de água por certas espécies de tecidos vegetais e ainda outros (Brian & Rideal, 1952; Veldstra, 1947) reafirmaram a hipótese acima sem contudo, explicarem a causa de tal aumento.

As auxinas, e entre elas o ácido indolil-3-acético ou AIA, parecem atuar de modo semelhante ao EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético), quelando o Ca^{++} , de modo indireto, como foi proposto por Bennet-Clark (1956). O AIA provoca vários efeitos numa célula: estimula a respiração, aumenta a síntese de ácidos ribonucleicos e ácidos pécnicos. Algumas dessas substâncias podem ligar-se a ions bivalentes, como Ca^{++} ; na literatura são encontrados trabalhos onde se observa uma relação entre AIA e Ca^{++} . Alguns pesquisadores (Bennet-Clark, 1956; Cooil & Bonner, 1957) observaram que concentrações relativamente altas de Ca^{++} inibem o crescimento de segmentos de coleoptila, enquanto K a aumenta.

Em trabalho anterior, Piccolo e Arens (1969) demonstraram o efeito do AIA sobre a transpiração de células de *Nitella*, com aumento da perda de água.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar as interações do AIA e Ca^{++} sobre a permeabilidade da célula de *Nitella*.

* Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

O material escolhido foi uma alga de água doce, *Nitella cernua*, Braun, cujos entre-nós constituídos por uma única célula, constituem excelente material para estudos dessa natureza. Os entre-nós possuíam, em média, 12 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro e pesavam 110 mg.

A solução de AIA empregada era $0,28 \cdot 10^{-3}$ M, apresentando um pH entre 5 e 6; a concentração da solução de CaCl_2 era 10^{-3} M.

O método desenvolvido no presente trabalho já foi aplicado em estudos de permeabilidade (Arens, 1951; Dainty & Hope, 1959; Fensom & Dainty, 1963). Foi feito o estudo da permeabilidade em áreas diferentes da mesma célula, comparando a extremidade da célula de *Nitella* tratada, com o outro não tratado, esperando que porventura houvesse saída ou entrada de água nas 2 partes.

A célula a ser tratada era colocada verticalmente num tubo de ensaio contendo 4 ml de AIA. Os 2 últimos cms celulares ficavam na solução. O resto da célula ficava exposto ao ar saturado de água, pois o conjunto permanecia numa câmara úmida para evitar a perda de água da célula. Para delimitar a porção tratada da não tratada, foi enrolado ao redor da célula um fio passado por lanolina; este separava as 2 porções e impedia a subida da solução pela superfície da mesma. Passados os minutos de tratamento, a célula era retirada e a porção tratada era enxugada cuidadosamente com papel de filtro.

Em seguida passava para um conjunto formado por 3 tubos de vidro (A, B e C). O tubo A era capilar e continha água. O tubo B tinha 3 mm de diâmetro interno e também continha água. O tubo C tinha 3 mm de diâmetro e ficava vazio. Os tubos A e C eram graduados de modo a permitir fácil leitura. Os 3 tubos foram montados horizontalmente em placa de gesso num mesmo plano. A célula era colocada nesse conjunto, de modo que a porção tratada era enfiada no tubo vazio (C) e a não tratada no tubo B. A porção da célula que ficava entre os tubos B e C era bem protegida com lanolina.

Foram feitas observações da possível absorção de água pela porção não tratada (em A) e da possível perda de água pela porção tratada (em C). As leituras foram feitas em intervalos de 20 minutos durante uma hora e depois em intervalos maiores num total de 16 a 20 horas de observação.

Nos experimentos em que se testou o Ca^{++} para reverter o efeito do AIA, a célula sofria primeiro o tratamento com AIA, e depois com CaCl_2 e em seguida passava para o conjunto antes descrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos realizados são apresentados na Tabela 1.

Com o tempo médio de observação de 20 horas, verificou-se que as células controle não apresentam fluxo (Tabela 1, A): essas células não absorveram água mas perderam, em média, $0,345 \text{ mm}^3$ por célula. Isto parece indicar que pelo método utilizado, a parte da célula que fica na água sofre algum efeito, o que provoca a saída da líquidos.

TABELA 1

Determinação do fluxo de água em células de Nitella sob a ação do AIA e Ca⁺⁺

Tipo de experimento	No. de experimentos	Tratamento com AIA (minutos)	Pós-tratamento com Ca ⁺⁺ (minutos)	Fluxo de água	
				Média de absorção (mm ³)	Média de perda (mm ³)
A	13	—	—	0	0,345
B	11	60	—	15,70	9,52
C	5	60	120	5,00	0,50

A — experimento controle

B — tratado com AIA

C — tratado com AIA e posteriormente com Ca⁺⁺

Nos experimentos em que as células foram tratadas unilateralmente com solução de AIA $0,28 \cdot 10^{-3}$ M durante 60 minutos, foi observado o seguinte (Tabela 1,B): a célula absorvia água no lado não tratado e eliminava água unilateralmente na extremidade tratada, sendo visível o deslocamento do líquido. Ocorreu, pois, um fluxo. Os valores médios obtidos foram $15,70 \text{ mm}^3$ de absorção e $9,52 \text{ mm}^3$ de perda (descontando-se, deste último valor, a quantidade média que saiu das células controle, $0,345 \text{ mm}^3$, temos um valor de $9,175 \text{ mm}^3$). Portanto: $15,70 \text{ mm}^3$ de absorção e $9,175 \text{ mm}^3$ de eliminação. A diferença desses 2 valores, ou seja, $6,525 \text{ mm}^3$ ficou dentro da célula, pois houve maior absorção do que eliminação. Como as células estavam turgidas no início do experimento, o resultado acima descrito parece indicar o seguinte: o AIA tem 2 efeitos nas membranas: 1) sobre permeabilidade com conseqüente aumento da entrada de água e fluxo de líquido; 2) sobre a plasticidade, com conseqüente aumento do volume da célula, permitindo manter um certo volume de água absorvida dentro dela.

Deve ser ressaltado que a perda de água não produziu perda de turgescência celular.

Admitindo que a saída de líquido era devida a um efeito reversível podia-se admitir a volta da permeabilidade ao estado normal pela substituição dos íons de Ca^{++} . Para provar esta hipótese algumas células foram tratadas unilateralmente com solução de AIA durante 60 minutos, e em seguida a mesma extremidade sofreu tratamento com CaCl_2 , 0,001 M durante 60 ou 120 minutos. Após o tratamento a célula passou para o conjunto de medição.

Os resultados obtidos indicam que o tempo de exposição de 60 minutos na solução de Ca^{++} , é curto, revertendo o efeito só parcialmente, de modo que a célula perdeu água numa quantidade de 5 mm^3 em 16 horas. Mas quando o tempo de tratamento com CaCl_2 foi de 120 minutos, praticamente não houve eliminação de líquido pela célula (Tabela 1,C), indicando que o aumento da permeabilidade provocada pelo AIA pode ser revertido por íons bivalentes como Ca^{++} .

Comparando o resultado do experimento C com o do A, observa-se novamente o efeito sobre a plasticidade das membranas devido ao AIA. Determinando a diferença entre o que perdeu a célula-controle ($0,345 \text{ mm}^3$) e a célula tratada com Ca^{++} ($0,50 \text{ mm}^3$), ou seja, $0,155 \text{ mm}^3$, tem-se o valor real da água perdida pela célula tratada com Ca^{++} . Portanto os valores são $5,00 \text{ mm}^3$ de absorção e $0,155 \text{ mm}^3$ de eliminação. A diferença entre esses 2 valores $4,845 \text{ mm}^3$ corresponde a quantidade de água absorvida que ficou dentro da célula. Este fato pode ser explicado através de um efeito do AIA sobre as propriedades da parede da célula. Heyn (1940) observou que aplicações de auxina causam um aumento pronunciado na extensibilidade das paredes da célula; tal aumento permitiria maior absorção de água. Também Tagawa e Bonner (1957) trabalhando com coleoptila de aveia observaram que o efeito da auxina em promover o crescimento está associado com o aumento na plasticidade e elasticidade das membranas das células.

O AIA aumenta a permeabilidade da membrana para água e íons, provocando a saída de líquido da célula. Na literatura especializada encontram-se trabalhos que se referem à exudação de líquido das células, devido ao ácido indolil-acético; foi observada a exudação de líquido de secções do caule de ervilha que cresceu na presença de IAA mais iodocetado; o exudado continha frutose, lipídeos, ácido orgânico, asparagina, amino-ácidos e fosfato; foi proposta como causa da exudação o aumento da permeabilidade da membrana da célula (Christiansen, 1950).

O aumento da permeabilidade causada pelo IAA está relacionado com o Ca, pois a auxina pode atuar como um agente quelante. Pesquisadores observaram que

um certo número de agentes quelantes, estruturalmente não relacionadas às auxinas naturais causam respostas de crescimento iguais a elas (Bennet-Clark, 1956; Heath & Clark, 1956). Concentrações tão baixas como 10^{-10} M de EDTA deram estimulação mensurável do crescimento de coleoptila de trigo. Isto sugeriu que as auxinas podem ser agentes quelantes e que suas ações fisiológicas podem ser baseadas em tais propriedades. É conhecido que o IAA estimula a síntese de RNA e ácidos pécticos, que são substancias complexadoras de Ca. Foi observado que o tratamento de plantas de *Datura stramonium* com 24-D, que é uma substância que age no crescimento, reduziu a quantidade de cristais de oxalato de calcio, normalmente depositado nas células (Wassberg & Goodrich, 1956). Isto indica uma interação com o metabolismo de Ca $^{++}$.

RESUMEN

Se estudió el efecto del ácido indolil-3-acético (AIA) y el del calcio sobre el flujo de agua en células de *Nitella*. Se escogió *Nitella cernua* Braun porque permite el estudio de la permeabilidad en un organismo unicelular. El AIA se usó en una concentración de $0,28 \times 10^{-3}$ M y el CaCl_2 en la de 10^{-3} M. Su efecto sobre las células aisladas se confirmó por el incremento de la plasticidad y la permeabilidad del plasmalema de las células tratadas y por la absorción y la consiguiente eliminación de agua. Este efecto se invirtió con iones de calcio.

BIBLIOGRAFIA

- Arens, K.**
1951. *Contribuição para o conhecimento da absorção e da condução de água nas células de Nitella cernua Braun. Tese. Univ. do Brasil. Rio de Janeiro.*
- Bennet-Clark T. A.**
1956. A hypothesis on salt accumulation and the mode of action of auxin. p. 284-294. In R. L. Wain & Wightman (eds.). *The chemistry and mode of action of plant growth substances*. Butterworth Scientific Publications, London.
- Brian, R. C., & E. K. Rideal**
1952. On the action of plant growth-regulators. *Biochim. biophys. Acta.*, 9: 1-18.
- Bungenberg de Jong, H. G., & G. G. P. Saubert**
1937. Fortschritte zum Thema der Modelle der Protoplasmamembranem. Rolle des Cholesterins, Mitbeteiligung der Phosphatidsäuren bzw. Eiweisse neben Phosphatiden. *Protoplasma*, 28: 352-59.
- Christiansen, C. S.**
1950. The metabolism of stem tissues during growth and its inhibition. V. Nature and significance of the exudate. *Arch. Biochem.*, 29: 357-68.
- Commoner, B., & D. Mazia**
1942. The mechanism of auxin action. *Plant Physiol.*, 17: 682-85.
- Cooil, B. J., & J. Bonner**
1957. The nature of growth inhibition by calcium in the *Avena* coleoptile. *Planta*, 48: 696-723.

Dainty, J., & A. B. Hope

1959. The water permeability of cells of *Chara australis*. R. Br. Australian. *J. Biol. Sci.*, 12: 136-45.

Fensom, D. S., & J. Dainty

1963. Electro-osmosis in *Nitella*. *Canad. J. Bot.*, 41: 685-91.

Heath, O. V. S., & J. E. Clark

1956. Chelating agents as plant growth substances. A possible clue of the mode of action of auxin. *Nature*, 177: 1118-21.

Heyn, A. N. J.

1940. The physiology of cell elongation. *Bot. Rev.*, 6: 515.

Leopold, A. C., & P. E. Kriedemann

1975. *Plant growth and development*. McGraw-Hill, 2^a ed. New York.

Piccolo, A. L. G., & K. Arens

1969. O efeito do IAA sobre a transpiração de células isoladas de *Nitella cernua* Braun. *Ciência e Cultura*, 2: 725-27.

Reinders, D. E.

1938. The process of water intake by discs of potato tuber tissue. *Proc. Roy. Acad. Sci. Amsterdam*, 41: 820-31.

Reinders, D. E.

1942. Intake of water by parenchymatic tissue. *Rec. Trav. Bot. Neerl.*, 39: 1-140.

Tagawa, T., & J. Bonner

1957. Mechanical properties of the *Avena* coleoptile as related to auxin and to ionic interactions *Plant Phys.*, 32: 207-12.

Veldstra, H.

1947. Considerations on the interaction of ergons and their "substrates". *Biochim biophys. Acta*, 1: 364-78.

Veldstra, H.

1953. The relation of chemical structure to biological activity in growth substances. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 4: 151-198.

Wassberg, C., & F. J. Goodrich

1956. A study of the anatomical effects produced in the leaves of *Datura stramonium* L. by the action of 2,4 dichlorophenoxyacetic. *J. Amer. Pharm. Ass.*, 45: 495-97.