

EDUARDO FERREIRA MEDINA

**ALGUMAS RESPOSTAS DE MONO- E DICOTILEDÔNEAS A AUXINAS  
ASSOCIADAS À AÇÃO DO ETILENO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M491a  
2013

Medina, Eduardo Ferreira, 1988-

Algumas respostas de mono- e dicotiledôneas a auxinas associadas à ação do etileno / Eduardo Ferreira Medina. – Viçosa, MG, 2013.

viii, 56f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Raimundo Santos Barros

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-49

1. Fisiologia vegetal. 2. Plantas - Crescimento. 3. Etileno.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

EDUARDO FERREIRA MEDINA

**ALGUMAS RESPOSTAS DE MONO- E DICOTILEDÔNEAS A AUXINAS  
ASSOCIADAS À AÇÃO DO ETILENO**

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2013

---

Dimas Mendes Ribeiro  
(Co - Orientador)

---

Prof. Marcelo Rogalski  
(Membro externo)

---

Raimundo Santos Barros  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro. Agradeço a Eunice, minha mãe, por tudo que ela significa para mim. Agradeço a Cleide, a grande companheira em todos os momentos. Agradeço também a Dimas, pela sua crucial ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, devido ao seu conhecimento extraordinário em Fisiologia Vegetal e pela grande amizade também. Por fim agradeço a UFV (Universidade Federal de Viçosa) e ao Professor Raimundo.

## **BIOGRAFIA**

Eduardo Ferreira Medina, filho de Fábio Oliveira Medina e Eunice Ferreira Medina, nasceu em Governador Valadares, Minas Gerais, a 19 de abril de 1988. Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa, em 2011. Em fevereiro de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal naquela universidade.

## RESUMO

MEDINA, Eduardo Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Algumas respostas de mono- e dicotiledôneas a auxinas associadas à ação do etileno.** Orientador: Raimundo Santos Barros. Co-orientadores: Dimas Mendes Ribeiro e Adriano Nunes Nesi

As auxinas AIA (ácido indol-3-acético, natural), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, as duas últimas sintéticas) foram aplicadas em plantas de milho (*Zea mays*, monocotiledônea) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, dicotiledônea), visando investigarem-se algumas respostas diferenciais dos dois grupos em relação ao metabolismo do etileno. Plantas de milho tratadas com as auxinas não produziram etileno e não exibiram quaisquer sintomas de senescência e epinastia. O feijão produziu bastante etileno após tratamento. Quando se utilizou aminoetoxivinilglicina (AVG) mais  $\text{Co}^{2+}$  (inibidores da biossíntese de etileno), a epinastia das plantas de feijão foi mantida mas o amarelecimento das plantas mostrou-se reduzido, deduzindo-se ser o amarelecimento um sintoma da ação do etileno. Após pulverização com as auxinas, o milho não exibiu produção do ácido 1-carboxílico-1-amino-ciclopropano (ACC), fato observado no feijão. Assim, na monocotiledônea, as auxinas parecem não induzir a expressão da sintase do ACC (ACS) ou, pelo menos, sua atividade. Quando tratadas com o ACC, as plantas de milho não produziram qualquer traço de etileno, ao contrário as plantas de feijão. Daí deduzir-se que na monocotiledônea, as auxinas parecem também não induzir a expressão ou atividade da oxidase do ACC (ACO) ou a enzima não é ativada. Empregando-se  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  como fonte de íons cianeto, as plantas de milho pareceram se mostrar mais resistentes à intoxicação do que as plantas de feijão. O rendimento quântico máximo de fotossistema II (razão  $F_v/F_m$ ) e os níveis dos pigmentos fotossintéticos não sofreram alterações em

plantas de milho tratadas com as auxinas. As plantas de feijão mostraram quedas significativas em ambas variáveis após pulverização com 2,4-D e 2,4,5-T, mas não com o AIA. A redução nos níveis das clorofilas em plantas de feijão tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T relacionou-se com a clorose observada, desde que ocorreu uma degradação mais acentuada das clorofilas do que dos carotenoides. As xantofilas (neoxantina, anteraxantina e violaxantina) também sofreram uma degradação mais acentuada do que o alfa e beta caroteno em plantas de feijão tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T. Quando AVG e  $\text{Co}^{2+}$  foram fornecidos conjuntamente com as auxinas, não ocorreu queda na razão  $F_v/F_m$  e nem no nível dos pigmentos, com exceção do alfa caroteno. A razão entre clorofila *a* e clorofila *b* também mostrou-se maior nas plantas de feijão tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T do que nas plantas tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T mais AVG e  $\text{Co}^{2+}$ . Nas plantas tratadas com AIA o aumento na razão entre clorofila *a* e clorofila *b* não foi significativo.

## ABSTRACT

MEDINA, Eduardo Ferreira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2013.

**Responses of mono- and dicots to auxins associated with the ethylene action.**

Adviser: Raimundo Santos Barros. Co-Advisers: Dimas Mendes Ribeiro and Adriano Nunes Nesi

The auxins IAA (indole-3-acetic, natural), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, the latter two synthetic) were sprayed on corn (*Zea mays*, monocot) and beans (*Phaseolus vulgaris*, dicot), in order to investigate some differential responses of the two plant groups as associated to ethylene metabolism. Corn plants treated with the auxins did not produce ethylene, not exhibiting also any senescence symptom. Beans plants, on the other hand, produced large amounts of ethylene following treatment with auxins. Aminoethoxyvinylglycine (AVG) plus  $\text{Co}^{2+}$  (ethylene biosynthesis inhibitors) were not able to relieve the epinasty, drying and leaf wrinkling effects in bean plants, but leaf yellowing was considerably reduced, suggesting this was an ethylene effect. Following spraying with auxins, corn plants showed no production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), a response shown by beans plants. Therefore in the monocot, auxins seemed not to induce the expression of ACC synthase (ACS) or its activity. When treated with ACC, corn plants failed to produce any trace of ethylene, unlikely bean plants. This suggested that in monocot, auxins seemed also not to induce the expression or activity of ACC oxidase (ACO) or the enzyme is not activated. Potassium ferrocyanide, employed as a source of cyanide ions, was much more toxic to bean plants than to corn and so the monocot seemed to be more resistant than bean plants. Maximum quantum yield of photosystem II ( $F_v/F_m$ ) and photosynthetic pigments contents kept unchanged in corn plants treated

with the auxins. Bean plants showed significant decreases in both variables following spraying with 2,4-D and 2,4,5-T. Decreases in chlorophyll contents in bean plants treated with 2,4-D and 2,4,5-T correlated well with leaf chlorosis what was shown to be due to a more pronounced fall of chlorophyll contents rather than to an increase in carotenoid contents. The xanthophylls (neoxanthin, violaxanthin and antheraxantina) also showed a higher degradation than the alpha and beta carotenes in bean plants treated with 2,4-D and 2,4,5-T. When AVG and  $\text{Co}^{2+}$  were supplied together with auxin, no appreciable decrease in either the  $F_v/F_m$  ratio or pigment contents was observed, with the exception of alpha carotene. Also the ratio of chlorophyll *a* to chlorophyll *b* was also larger in bean plants treated with 2,4-D and 2,4,5-T than in the plants treated with 2,4-D and 2,4,5-T plus AVG and  $\text{Co}^{2+}$ . The ratio of chlorophyll *a* to chlorophyll *b* did not show any significance in bean plants upon treatment with IAA.

## CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	7
2.1. Material vegetal e estabelecimento de condições experimentais .....	7
2.2. Determinação dos níveis operacionais das auxinas e ácido 2-cloroetilfosfônico .....	7
2.3. Tratamento das plantas com CEPA e ACC .....	8
2.4. Tratamento das plantas com cianeto .....	8
2.5. Inibição da biossíntese do etileno .....	9
2.6. Determinação dos níveis de etileno .....	9
2.7. Quantificação do ACC .....	10
2.8. Atividade <i>in vivo</i> da oxidase do ACC .....	11
2.9. Pigmentos cloroplastídicos .....	11
2.10. Rendimento quântico máximo do Fotossistema II .....	12
2.11. Delineamento experimental .....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
3.1. Determinação dos níveis operacionais das auxinas e CEPA .....	14
3.2. Emissão do etileno nas plantas tratadas .....	23
3.3. Produção de ACC .....	27
3.4. Atividade <i>in vivo</i> da oxidase do ACC .....	29
3.5. Resposta ao CEPA e ACC .....	30
3.6. Efeito do cianeto nas plantas .....	31
3.7. Pigmentos fotossintéticos .....	31
3.8. Rendimento quântico máximo do Fotossistema II .....	37
4. CONCLUSÕES .....	41
5. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	42
6. REFERÊNCIAS .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

A regulação do metabolismo, do crescimento e desenvolvimento, da morfogênese e das respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas é coordenada por moléculas sinalizadoras, dentre as quais os fitohormônios. As auxinas compreendem uma importante classe de fitohormônios, sendo o ácido indol-3-acético (AIA) a auxina natural de maior abundância e relevância fisiológica. Quando aplicadas em baixas concentrações, as auxinas promovem o crescimento por divisão e alongamento das células, sendo utilizadas em cultivos de calos, células e tecidos, em níveis entre  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  M. Além disso, são responsáveis pela coordenação de uma série de processos de desenvolvimento nas plantas, como a regulação da dominância apical, da formação de raízes adventícias e da diferenciação vascular, dentre outros (Taiz e Zeiger, 2006). As auxinas são, sobretudo, coordenadoras espaciais do desenvolvimento das plantas. A distribuição diferencial desse fitohormônio nos tecidos vegetais controla uma grande variedade de processos de desenvolvimento, possibilitando a adaptação das plantas às diferentes condições ambientais (Vanneste e Friml, 2009). O estabelecimento de um gradiente de auxinas é atribuído à biossíntese local (Tao et al., 2008), ao transporte intercelular (Tanaka et al., 2006) e ao catabolismo (Taiz e Zeiger, 2006), controlados por diversos sinais ambientais e de desenvolvimento. Assim, a modulação da distribuição de auxinas proporciona um meio de integrar eficientemente aqueles sinais.

Em concentrações relativamente elevadas, as auxinas apresentam efeito herbicida em plantas dicotiledôneas. Os sintomas herbicidas incluem a epinastia foliar e caulinar, a inibição do crescimento radicular e da parte aérea, a diminuição do alongamento dos entrenós, redução da área foliar e abscisão foliar. Esses sintomas são seguidos por acelerada senescência foliar, clorose progressiva, e pela desestabilização

da integridade de membranas e do sistema vascular, levando à dessecação, necrose e morte da planta (Hansen e Grossmann, 2000; Grossmann, 2003).

Com o advento de herbicidas mais modernos, o emprego das auxinas herbicídicas mostrou certo declínio nos anos 70 e 80 do século passado (Grossmann, 2000). Os herbicidas modernos, no entanto, são empregados em altas doses, levando a efeitos residuais consideráveis ao meio ambiente. Como os herbicidas hormonais são utilizados em doses incomparavelmente menores que os herbicidas modernos, os efeitos residuais no meio ambiente são, em decorrência, bem menores. A preocupação com o meio ambiente levou, assim, ao ressurgimento do interesse, do ponto de vista prático, pelos herbicidas hormonais. Uma maior compreensão do mecanismo de ação de auxinas herbicídicas, certamente, levará a uma melhor racionalização do seu emprego, possibilitando, também, o desenvolvimento de tecnologias mais adequadas para a preservação do meio ambiente.

As classes químicas mais importantes das auxinas herbicídicas sintéticas incluem ácidos fenoxicarboxílicos (ácido 2,4-diclorofenoxiacético – 2,4-D), ácidos benzóicos (Dicamba), piridinas (Plicoram) e quinolinas (Quinclorac, Quinmerac). Quando em altas concentrações, esses compostos promovem o mesmo tipo de resposta nas plantas que o AIA. Tais respostas também são semelhantes às aquelas observadas em linhagens de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o AIA (Romano et al., 1993). As auxinas naturais estão sujeitas a uma mais rápida inativação, por degradação e conjugação, em comparação com as auxinas herbicídicas sintéticas (Woodward e Bartel, 2005). Essas, por sua vez, apresentam efeito mais duradouro e intenso nas plantas, devido à sua alta estabilidade, a uma mais baixa degradação enzimática e, também, por não estarem sujeitas a muitos mecanismos homeostáticos e metabólicos que podem afetar o AIA (Walsh et al., 2006; Grossmann, 2010).

Até o momento, não se sabe as razões do comportamento diferencial das plantas mono- e dicotiledôneas, em resposta às auxinas. Pensava-se, originalmente, que nas plantas sensíveis, as auxinas, em concentrações relativamente elevadas, promoviam um crescimento desordenado que levaria à morte (Gilbert, 1946). Na realidade, metabólitos semelhantes resultantes da aplicação de auxinas sintéticas são encontrados tanto em tecidos de monocotiledôneas, quanto de dicotiledôneas (Lawrence, 1984).

A biologia molecular busca a identificação dos receptores que medeiam as respostas auxínicas. Na década de 1980, abordagens bioquímicas revelaram uma proteína de ligação às auxinas (ABP1), como um candidato a receptor de auxinas (Kelley e Riechers, 2007; Vanneste e Friml, 2009). Estudos mais recentes envolvendo mutantes de *Arabidopsis* resistentes à ação de auxinas ou com inibição do transporte auxínico definiram vários *loci* genéticos envolvidos na sinalização auxínica, incluindo-se a proteína F-box de resposta de inibição de transporte (TIR1), caracterizada como um receptor de auxinas (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski e Leyser, 2005).

Como se tem demonstrado em uma variedade de espécies de dicotiledôneas (Grossmann et al., 2004; Walsh et al., 2006) e em plantas transgênicas superprodutoras de auxinas (Grossmann, 2003; Argueso et al., 2007), as auxinas estimulam a biossíntese de etileno, hormônio vegetal gasoso, de modo que seus efeitos podem correlacionar-se com os efeitos morfo-fisiológicos do etileno. Com o estabelecimento do ciclo de Yang, determinou-se que a enzima-chave da biossíntese do etileno é a sintase do ácido 1-carboxílico-1-amino-ciclopropano (ACS), sendo o ácido 1-carboxílico-1-amino-ciclopropano (ACC) o precursor imediato do etileno na sua rota biossintética. A expressão e a atividade da enzima ACS são significativamente aumentadas em dicotiledôneas tratadas com auxinas em concentrações relativamente elevadas (Grossmann, 2003; Kraft et al., 2007; Pech et al., 2004), o que explicaria a ação das auxinas herbicidas nas plantas sensíveis (dicotiledôneas). Isoformas dessa enzima são

codificadas pela família multigênica *ACS*, à qual pertencem os genes de respostas iniciais a auxinas. Essas isoformas são expressas de forma diferenciada ou, ainda, são reguladas pós-transcricionalmente ou pós-traducionalmente pelo AIA e por auxinas herbicídicas, poucos minutos após sua aplicação (Grossmann e Schmülling, 1995). Em experimentos utilizando-se de plantas transgênicas de tomate que continham o gene antissenso da *ACS* (*LE-ACS2*) e linhagens resistentes a auxinas ou insensíveis ao etileno (*Arabidopsis*, mostarda, tomate), os sintomas morfológicos induzidos por auxinas foram reduzidos ou completamente revertidos (Grossmann e Schmülling, 1995). Os efeitos do AIA e do etileno foram desacoplados em plantas transgênicas de fumo e *Arabidopsis*, cujos resultados mostraram que a maioria dos sintomas (*e.g.* dominância apical, epinastia foliar) era provocado exclusivamente pelas auxinas (Romano et al., 1993).

Suspeita-se que a ação das auxinas (em especial o 2,4-D) é independente da ação do etileno em plantas dicotiledôneas. Um fator importante que implica na inibição do crescimento e na morte celular em resposta às auxinas é a superprodução de cianeto, liberado como ácido cianídrico (HCN), composto bastante tóxico para as células, formado durante a oxidação do ACC a etileno, produzido em quantidades estequiometricamente equivalentes (Grossmann, 1996; Pech et al., 2004). Tittle et al. (1990) atribuíram, pela primeira vez, um papel do HCN no modo de ação do 2,4-D. O HCN inibe metaloenzimas e outras proteínas como, por exemplo, redutases do nitrato e do nitrito, nitrogenase, catalase, dismutase do superóxido, peroxidases, oxidase do citocromo *c*, dentre outras (Solomanson, 1981). Tais enzimas estão envolvidas em muitos processos metabólicos importantes, como a respiração, assimilação de carbono e nitrogênio e o metabolismo de carboidratos. Além disso, o cianeto afeta muitas enzimas envolvidas no metabolismo primário, incluindo-se a enzima fotossintética ribulose-1,5-

bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e a proteína plastocianina, inibindo o transporte de elétrons na fotossíntese (Solomanson, 1981).

As auxinas herbicídicas parecem, também, induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) em dicotiledôneas (Grossmann et al., 2001; Romero-Puertas et al., 2004; Sunohara e Matsumoto, 2008). Estudos mostram que, por exemplo, o acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em plantas tratadas com auxinas herbicídicas contribui para o dano oxidativo no tecido, mediante a peroxidação das membranas lipídicas e, provavelmente, processos de sinalização na senescência (Grossmann et al., 2001). Plantas de *Galium aparine* (dicotiledônea) tratadas com  $H_2O_2$  apresentaram os mesmos sintomas fitotóxicos eliciados pelas auxinas herbicídicas, com progressiva clorose foliar, seguida por murchamento, necrose dos tecidos e morte da planta (Grossmann et al., 2001). Além disso, observa-se uma correlação positiva entre a atividade de enzimas antioxidativas, como a dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato, redutase da glutathione, dentre outras, e a sensibilidade dos tecidos às auxinas herbicídicas (Sunohara e Matsumoto, 2008; Peixoto et al., 2008).

O estresse oxidativo está relacionado a uma série de efeitos adversos, como a inibição do crescimento e a diminuição das taxas fotossintéticas, pois a superprodução de ERO's parece inibir algumas enzimas envolvidas com a redução do carbono nos processos fotossintéticos, como a frutose-1,6-bisfosfatase (Halliwell e Gutteridge, 2000). Estudos realizados com o 2,4,5-T mostram que essa auxina herbicídica ocasiona estresse oxidativo intenso, com consequentes danos nos tilacóides e inibição da atividade do fotossistema II (Segura-Aguilar et al., 1995). Tratamentos com 2,4-D em diversas concentrações ocasionaram diminuição da taxa fotossintética líquida, da condutância estomática, da taxa de transpiração, da eficiência do uso da água e da concentração interna de  $CO_2$ , associadas ao aumento da atividade e da expressão de enzimas antioxidativas, em plantas de ervilha (Romero-Puertas et al., 2004).

Os pigmentos fotossintéticos são alvo da senescência induzida pelo etileno e, também, do estresse oxidativo ocasionado pela ação das auxinas herbicídicas em dicotiledôneas. Plantas de *Galium aparine* tratadas com algumas auxinas herbicídicas (Quinmerac, Dicamba e Picloram) apresentaram diminuição significativa dos níveis de clorofila total em comparação com as plantas controle (Grossmann et al., 2001). Smith e Arteca (2000) observaram, por sua vez, que plantas de *Arabidopsis* submetidas ao cianeto também apresentaram diminuição dos níveis de pigmentos fotossintéticos. Além disso, foi observada uma redução dos teores de clorofila em plantas tratadas, via sistema vascular, com ACC sob diferentes concentrações (Grossmann e Kwiatkowski, 1995). Esses fatos, em conjunto, refletem a complexidade da cascata de eventos desencadeada pelas auxinas herbicídicas em plantas sensíveis. Dessa forma, o presente trabalho propõe-se estabelecer o papel de alguns componentes da resposta às auxinas, em especial do 2,4-D, nas plantas mono- e dicotiledôneas, numa tentativa de compor parte do quadro que leva aos efeitos gerais das auxinas herbicídicas.

## **1.1. OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi investigar alguns mecanismos de ação de auxinas, em especial do 2,4-D, que levam a uma resposta diferencial em plantas mono- e dicotiledôneas, relacionados ao metabolismo do etileno.

Pretendeu-se, ainda: *i*) determinar se o etileno exógeno causa respostas diferentes daquelas causadas pelo etileno induzido pelas auxinas; *ii*) determinar se a ação auxínica é independente da produção de etileno.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e estabelecimento de condições experimentais**

Plantas de milho (*Zea mays*, monocotiledônea) variedade UFV-M100 Nativo, e de feijão (*Phaseolus vulgaris*, dicotiledônea) cultivar Ouro Vermelho, foram cultivadas em casas de vegetação em Viçosa (30°45' S, 42°15' W), durante julho de 2011 a janeiro de 2013. As plantas foram utilizadas nos experimentos duas semanas após a germinação, quando foram submetidas aos diversos tratamentos. Foram utilizados vasos de plástico de 0,5 dm<sup>3</sup>, também bandejas plásticas e substrato da marca comercial TROPSTRATO HT (Vida Verde Indústria e Comércio de Insumos Orgânicos Ltda, Mogi Mirim-SP).

### **2.2. Determinação dos níveis operacionais das auxinas e ácido 2-cloroetilfosfônico**

As plantas foram pulverizadas com uma auxina natural (AIA) e duas sintéticas (2,4-D; 2,4,5-T) em diferentes concentrações, entre 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-2</sup> M, em solução de pH 7,0, para o acompanhamento do desenvolvimento dos sintomas característicos. Nessa fase, procurou-se determinar os níveis das auxinas requeridos para o início do desenvolvimento dos sintomas e os níveis indutores dos diversos sintomas, a serem utilizados nos experimentos subsequentes. Os trabalhos concentraram-se, principalmente, na ação do 2,4-D nas plantas. Também foram determinados os níveis operacionais de ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA), substância liberadora de etileno (ver Abeles, 1992), pulverizando-se as plantas, diariamente, com soluções de CEPA variando entre 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-2</sup> M em pH 5,0, para poder separarem-se os efeitos do etileno nas plantas, daqueles produzidos em resposta à pulverização com as auxinas. O CEPA foi pulverizado diariamente durante nove dias nas plantas de milho e feijão, já que com uma pulverização apenas não se observava o desenvolvimento dos sintomas causados pelo etileno.

### **2.3. Tratamento das plantas com CEPA e ACC**

Plantas de feijão e milho foram tratadas com CEPA e ACC, ambos à concentração  $10^{-3}$  M, via solução, à base das hastes cortadas, visando-se separarem-se os efeitos do etileno sintetizado em resposta às auxinas herbicídicas e do etileno fornecido à mono- e à dicotiledônea. As soluções de CEPA e ACC eram fornecidas via infiltração à vácuo (- 0,07 MPa) durante 3 min, com intervalo de 4 min sem vácuo e depois uma outra infiltração à vácuo por mais 3 min. As plantas ainda permaneciam durante 2 h nas soluções para garantir a absorção dos compostos. Após 2 h, as plantas eram transferidas para copos plásticos com água de torneira.

Como o etileno induzido pelas auxinas herbicídicas ocorre pela indução da ACS, o ACC foi também fornecido em solução à base das hastes cortadas das plantas. Isso permitiu observar se os efeitos do ACC mimetizariam os efeitos das auxinas e/ou do etileno puro, já que o etileno puro pode possuir ação diferente da do ACC (sintetizado em resposta às auxinas), uma vez que o ACC leva a produção do etileno e também à formação do HCN, por meio da atividade da ACO. A solução de CEPA e o controle (água) foram preparados em pH 5,0, para atenuar formação espontânea do etileno.

### **2.4 Tratamento das plantas com cianeto**

Foram realizados testes de seleção de concentração do ferrocianeto de potássio  $K_4Fe(CN)_6$ , em plantas de feijão e milho, visando-se obter os efeitos isolados do cianeto. As plantas ficavam expostas por 2 h, com as hastes cortadas imersas nas soluções de  $K_4Fe(CN)_6$ . Em seguida as plantas eram colocadas em copos plásticos contendo água de torneira. O intervalo de concentrações utilizado para o teste em plantas de feijão era de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M de  $K_4Fe(CN)_6$  e para as plantas de milho o intervalo utilizado era de  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  M.

## 2.5. Inibição da biossíntese do etileno

Para investigar-se a possível relação entre a epinastia, senescência e desidratação das folhas mediados pela ação das auxinas herbicídicas com a biossíntese de etileno, plantas de feijão e milho foram pulverizadas com AIA, 2,4-D e 2,4,5-T, sendo conjuntamente tratadas com alguns inibidores da biossíntese, o AVG  $10^{-3}$  M, inibidor da atividade da ACS e o  $\text{Co}^{2+}$   $10^{-3}$  M, inibidor da atividade da ACO, visando-se isolar o efeito do etileno e das auxinas herbicídicas. Ambos inibidores foram fornecidos em solução, à base cortada das hastes das plantas, via infiltração à vácuo (- 0,07 MPa) durante 3 min, com intervalo de 4 min sem vácuo e depois uma outra infiltração à vácuo por mais 3 min. As plantas ainda permaneciam durante 2 h nas soluções para garantir a absorção dos compostos. Após as 2 h, as plantas eram transferidas para copos plásticos com água de torneira, onde recebiam as pulverizações com as auxinas.

## 2.6. Determinação dos níveis de etileno

Após 2 h da pulverização do milho e do feijão com as auxinas, folhas de feijão e secções de folhas de milho, de aproximadamente 2 g de massa fresca (MF), foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer de 250 cm<sup>3</sup> selados contendo, ao fundo, duas camadas de papel de filtro Whatman n° 1 umedecidas com 4 cm<sup>3</sup> água desionizada. A atmosfera interna dos frascos era homogeneizada, ocasionalmente, com uma seringa com agulha longa perfurando o selador.

O etileno emanado das plantas foi quantificado de acordo com a técnica descrita por Saltveit e Yang (1987). Amostras de 1 cm<sup>3</sup> da atmosfera livre dos frascos Erlenmeyer foram coletadas com auxílio de seringas plásticas descartáveis de 1 cm<sup>3</sup> de volume (agulhas 29 G ½”). As amostras foram coletadas 2, 12, 24 e 48 h após o acondicionamento das folhas nos frascos Erlenmeyer.

As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, série II, equipado com detetor de ionização de chama e coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0

mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o nitrogênio, em fluxo de  $30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Os fluxos do hidrogênio e do ar foram mantidos em 30 e  $320 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente. As temperaturas da coluna, do injetor e do detetor foram mantidas em 60, 110 e  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. A quantificação do etileno foi determinada a partir de áreas de pico de etileno, computadas com o *software* N2000 online Chromatostation, associado ao cromatógrafo, por comparação com áreas do padrão de etileno.

## 2.7. Quantificação do ACC

O ACC foi quantificado nas plantas segundo técnica descrita por Gallardo et al. (1991), com algumas modificações. As amostras foram coletadas 2, 12, 24 e 48 h após a pulverização com as auxinas. A extração do ACC foi feita triturando-se as amostras de folhas (aproximadamente 2,0 g de MF) em almofariz com pistilo, com  $10 \text{ cm}^3$  de etanol (80 %) e mais polivinil-polipirrolidona (PVPP 5 % m/v). O extrato foi centrifugado a  $28000 \text{ g}$ , por 20 min, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante submetido à evaporação em evaporador rotativo, a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , até *secura*. O resíduo foi ressuspenso em  $4 \text{ cm}^3$  de água destilada (extrato original). Metade do extrato original foi utilizada para quantificar-se o ACC livre, por conversão química para etileno, seguindo-se a técnica descrita por Lizada e Yang (1979). Uma alíquota de  $0,5 \text{ cm}^3$  do extrato foi tomada em um tubo de ensaio de  $6 \text{ cm}^3$  com  $0,1 \text{ cm}^3$  de cloreto mercúrico ( $\text{HgCl}_2$ ) ( $5 \text{ } \mu\text{mol}$ ), à qual foi adicionada água até um volume de  $0,8 \text{ cm}^3$ . O tubo de ensaio foi vedado com selador de látex e mantido em banho de gelo. Em seguida,  $0,2 \text{ cm}^3$  de uma mistura resfriada de NaOCl (5 %) e NaOH saturado (v/v 2:1) foram injetados no tubo de ensaio vedado, agitado num misturador vórtex, por 5 s, e incubado em banho de gelo por 2,5 min. Após nova agitação do tubo, por 5 s, uma amostra gasosa de  $1,0 \text{ cm}^3$  da atmosfera do tubo foi retirada para a quantificação do etileno, segundo a técnica acima descrita.

A outra metade do extrato original foi utilizada para determinar-se o ACC total (ACC livre + ACC conjugado). Após a hidrólise ácida com HCl (2 N), a 100 °C, por 3 h, o extrato foi neutralizado com NaOH (2 N) e evaporado até a secura, adicionando-se, em seguida, 2,0 cm<sup>3</sup> de água. A quantificação do ACC total seguiu procedimento idêntico para a quantificação do ACC livre. Com a diferença entre os conteúdos de ACC antes (livre) e após a hidrólise (ACC total), foi determinado o ACC conjugado no extrato.

## **2.8. Atividade *in vivo* da oxidase do ACC**

A atividade *in vivo* da ACO foi determinada segundo técnica de De Rueda et al. (1995), com pequenas modificações. As plantas foram tratadas com soluções de ACC às concentrações de 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>M; em seguida, folhas de feijão e secções de folhas de milho (aproximadamente 2 g de MF), foram incubadas em frascos Erlenmeyer de 250 cm<sup>3</sup> selados, contendo ao fundo, duas camadas de papel filtro Whatman n° 1 umedecidas com água desionizada (4 cm<sup>3</sup>). Após 2, 12, 24 e 48 h, foram coletadas amostras gasosas de 1 cm<sup>3</sup> da atmosfera interna dos frascos, para quantificação do etileno emanado pelas folhas de feijão e secções de folha de milho. Os frascos foram mantidos nas câmaras de crescimento, a 30 °C, expostos a uma irradiância de 50 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Também foi quantificado o ACC nas plantas de milho após a absorção do produto, para determinar-se se o ACC havia sido absorvido pela planta.

## **2.9. Pigmentos cloroplásticos**

Amostras foliares, de aproximadamente 2 g de MF, foram coletadas três dias após a pulverização com as auxinas e armazenadas em freezer a - 80°C. Para as análises, 80 mg de material congelado foram macerados em 2 cm<sup>3</sup> de acetona 85%; o extrato, então, foi centrifugado por 10 min, a 15000 g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o volume ajustado, com acetona 85%, para 3 cm<sup>3</sup>. A determinação dos teores

dos pigmentos nas amostras e nos padrões de clorofilas (*a*, *b* e total) e de carotenóides (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, luteína, neoxantina,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno), foi feita em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC, Hewlett-Packard versão 1050, Alemanha), com coluna de fase reversa C18 (Waters Spherisorb® 5 $\mu$ m ODS2 4.6x250 mm Analytical Column) e equipado com detetor de radiação ultravioleta e visível, utilizando-se de um sistema de solventes composto por acetonitrila : água: trietilamina (9 :1: 0,01) e acetato de etila puro. A corrida cromatográfica completa ocorria em 27 min, a 440 nm, em fluxo de 1,2 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> e utilizando-se 20 mm<sup>3</sup> de amostra, sendo o sistema inicial de solvente composto por 75% do conjunto acetonitrila : água : trietilamina e 25% de acetato de etila. Durante 10 min, um gradiente levou o conjunto de solventes para 59% de acetonitrila : água : trietilamina e 41% de acetato de etila. Durante os 10 min seguintes, outro gradiente levava a mistura de solventes para 0% de acetonitrila : água : trietilamina e 100% de acetato de etila. Essa última condição perdurava por mais 2 min. Por fim, durante 5 min, ocorria a pós-corrida, em que era restabelecida a condição inicial para uma nova corrida (ver Ramalho et al., 1997). Foram utilizados padrões dos pigmentos fotossintéticos (DHI Laboratory Products, Horsholm, Dinamarca). Utilizando-se dos padrões, obtiveram-se picos (pontos em mvolt min<sup>-1</sup>) computados com o *software* N2000 online Chromatostation, associado ao cromatógrafo. Ao final, as concentrações eram calculadas por comparação da áreas obtidas com os padrões, sendo os resultados dados em mg g<sup>-1</sup> de MF.

## **2.10. Rendimento quântico máximo do Fotossistema II**

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se de fluorômetro com amplitude de pulso modulado (Mini-PAM, H. Walz, Effeltrich, Alemanha). Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante (0,03  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de

6000  $\mu\text{mol}$  (fótons)  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ). Procedeu-se, ainda, a estimativa da eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ), a partir da simples razão entre a fluorescência variável ( $F_v$ ), que é a subtração de  $F_0$  da  $F_m$ , e a ( $F_m$ ), sendo tal variável fornecida pelo fluorômetro.

### **2.11. Delineamento experimental**

Os experimentos foram delineados de modo inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Para a determinação dos níveis de etileno e da atividade *in vivo* da ACO, a unidade amostral foi um frasco Erlenmeyer de 250  $\text{cm}^3$  fechado, contendo folhas de feijão ou secções de folha de milho. Nos experimentos de análises químicas (quantificação de ACC, atividade *in vivo* da ACO e pigmentos fotossintéticos), cinco amostras de aproximadamente 2,0 g de MF foram analisadas. Nos experimentos para a determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, a unidade amostral foi uma secção de folha de milho e uma folha de feijão. As diferenças entre as médias foram detectadas pelos testes Tukey e Scott-Knott, em nível de 5 % de probabilidade. O teste de Scott-Knott foi utilizado quando era necessário agruparem-se as médias, em experimentos com grande número de tratamentos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação dos níveis operacionais das auxinas e CEPA

O intervalo de concentrações no qual se avaliaram os níveis operacionais para trabalhos com as auxinas foi entre  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  M, sendo os efeitos observados durante nove dias, devido a morte causada pelas auxinas e pelo CEPA nas plantas tratadas com as concentrações mais elevadas, no nono dia (Grossmann, 2010). Nas plantas de feijão tratadas com as auxinas, principalmente no intervalo de concentrações de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  M, o sintoma observado nas primeiras horas foi a epinastia foliar e caulinar. Entre o segundo e terceiro dias, iniciou-se o amarelecimento das folhas das plantas de feijão tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T, à concentração de  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M, a partir do quinto iniciou-se o dessecamento e enrolamento culminando com morte das plantas no nono dia após a aplicação (Grossmann, 2000). Por outro lado, as plantas de feijão tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T às concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M não morreram ao final dos nove dias. As plantas de feijão tratadas com AIA, às concentrações de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  M, apresentaram apenas sintomas de epinastia, nas primeiras horas, sem senescência posterior e sem morte das plantas (Grossmann, 2000). Nas plantas no milho, nenhum dos sintomas foi observado em resposta às auxinas sob quaisquer concentrações (Figuras 1, 5 e 8) (Kelley e Riechers, 2007). A concentração de  $10^{-2}$  M de 2,4-D e 2,4,5-T mostrou-se muito tóxica. A concentração de  $10^{-4}$  M mostrou-se incapaz de levar as plantas à morte, mesmo nove dias após a pulverização com os reguladores. Portanto, a concentração de 2,4-D e 2,4,5-T de  $10^{-3}$  M foi selecionada para a condução dos experimentos posteriores (Figura 2). Como padrão de referência, utilizou-se também a concentração de  $10^{-3}$  M para os trabalhos com o AIA.

Determinou-se, também, a massa seca da parte aérea e raiz, nove dias após a pulverização com as auxinas, observando-se assim que o efeito tóxico das auxinas leva

a uma redução no crescimento das plantas de feijão (Figura 3), como também observaram Halliwell e Gutteridge (2000). Percebeu-se que o AIA, mesmo às concentrações mais elevadas não levou a uma redução drástica na massa seca da planta, ainda que essa auxina causasse forte epinastia (Figura 1). O AIA também não causou senescência foliar tão pronunciada como as auxinas sintéticas (Figura 2) (Monaco et al., 2002). O 2,4-D e 2,4,5-T causaram sintomas bastante semelhantes entre si no feijoeiro, quando foram levadas em conta concentrações equivalentes; contudo o 2,4,5-T pareceu mais tóxico quando comparado com o 2,4-D à concentração de  $10^{-4}$  M. Observou-se ainda que, à concentração de  $10^{-4}$  M, o 2,4-D não promoveu redução da massa seca das plantas na mesma extensão que o 2,4,5-T (Figura 3).

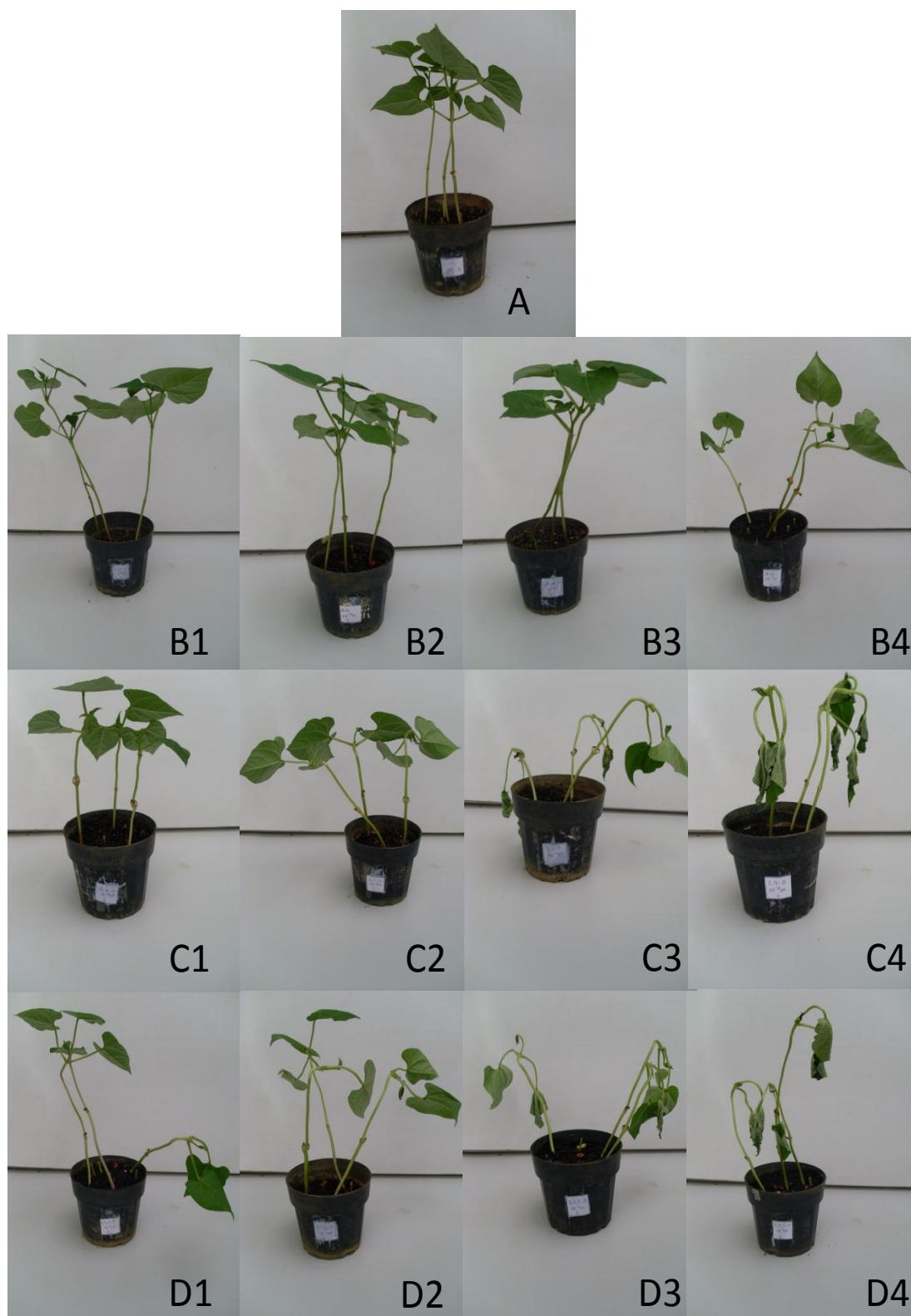
As plantas de milho não exibiram qualquer sintoma de senescência após pulverização com as auxinas (Kelley e Riechers, 2007). Tal fato é aparentemente explicado pela limitada translocação e pela rápida degradação das auxinas exógenas em monocotiledôneas (Monaco et al., 2002), e por diferenças no conjunto de aminoácidos na ABP1 das monocotiledôneas, que impede o desencadeamento das respostas que normalmente ocorrem nas dicotiledôneas em resposta às auxinas (Woo et al., 2002). Nove dias após a pulverização com as auxinas, também colheram-se as plantas de milho para se determinar-se a matéria seca da parte aérea e das raízes (Figura 4). Observaram-se pequenas diferenças na matéria seca, da parte aérea, das plantas quando se compararam os efeitos das diferentes concentrações das auxinas. O 2,4,5-T principalmente causou as maiores quedas na massa seca da parte aérea do milho.

Avaliou-se o efeito do CEPA em feijão e milho, sob concentrações que variaram de  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  M, para comparação com os efeitos das auxinas. Os sintomas foram observados durante nove dias, com as plantas recebendo pulverizações diárias de CEPA (Figuras 6 e 9). A partir da concentração de  $10^{-3}$  M, o CEPA mostrou-se bastante tóxico ao feijoeiro (Figura 7). O CEPA também levou a um amarelecimento acentuado no

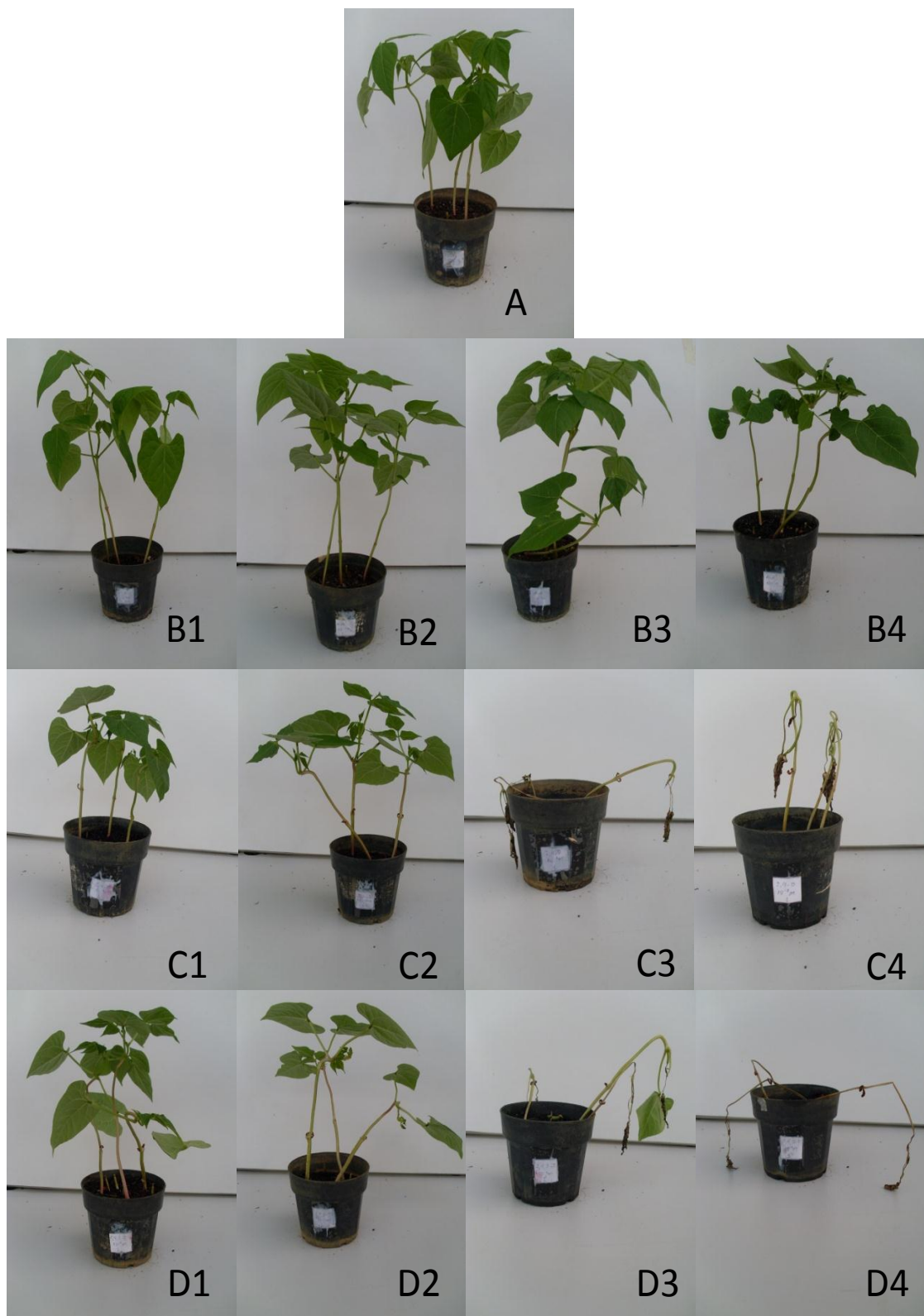
feijoeiro (Abeles, 1992), sem causar epinastia, a partir da concentração de  $10^{-3}$  M, levando à morte das plantas, nove dias após o início das pulverizações (Figura 6) (Grossmann et al., 2004). O CEPA causou profunda diminuição na massa seca de plantas de feijão, principalmente às concentrações de  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  M (Figura 7) (Walsh et al., 2006).

Nas plantas de milho, observou-se uma diminuição da massa seca da parte aérea com o aumento da concentração de CEPA (Figura 10) (Abeles et al., 1992), muito maior do que a observada nas plantas de milho tratadas com as auxinas (Kelley e Riechers, 2007). As raízes, por sua vez, não exibiram qualquer efeito do CEPA em sua massa seca, quando se compararam as plantas submetidas às diferentes concentrações do regulador (Figura 10). As plantas de milho também mostraram um amarelecimento (Abeles, 1992), principalmente das folhas mais velhas e nas bordas das mais novas, nove dias após pulverização com o CEPA  $10^{-3}$  M e  $10^{-2}$  M (Figura 9). As auxinas por não induzirem a formação de etileno no milho (ver Figura 11), não foram capazes de causar senescência nas plantas, como aconteceu com a pulverização diária de CEPA no milho (Kelley e Riechers, 2007).

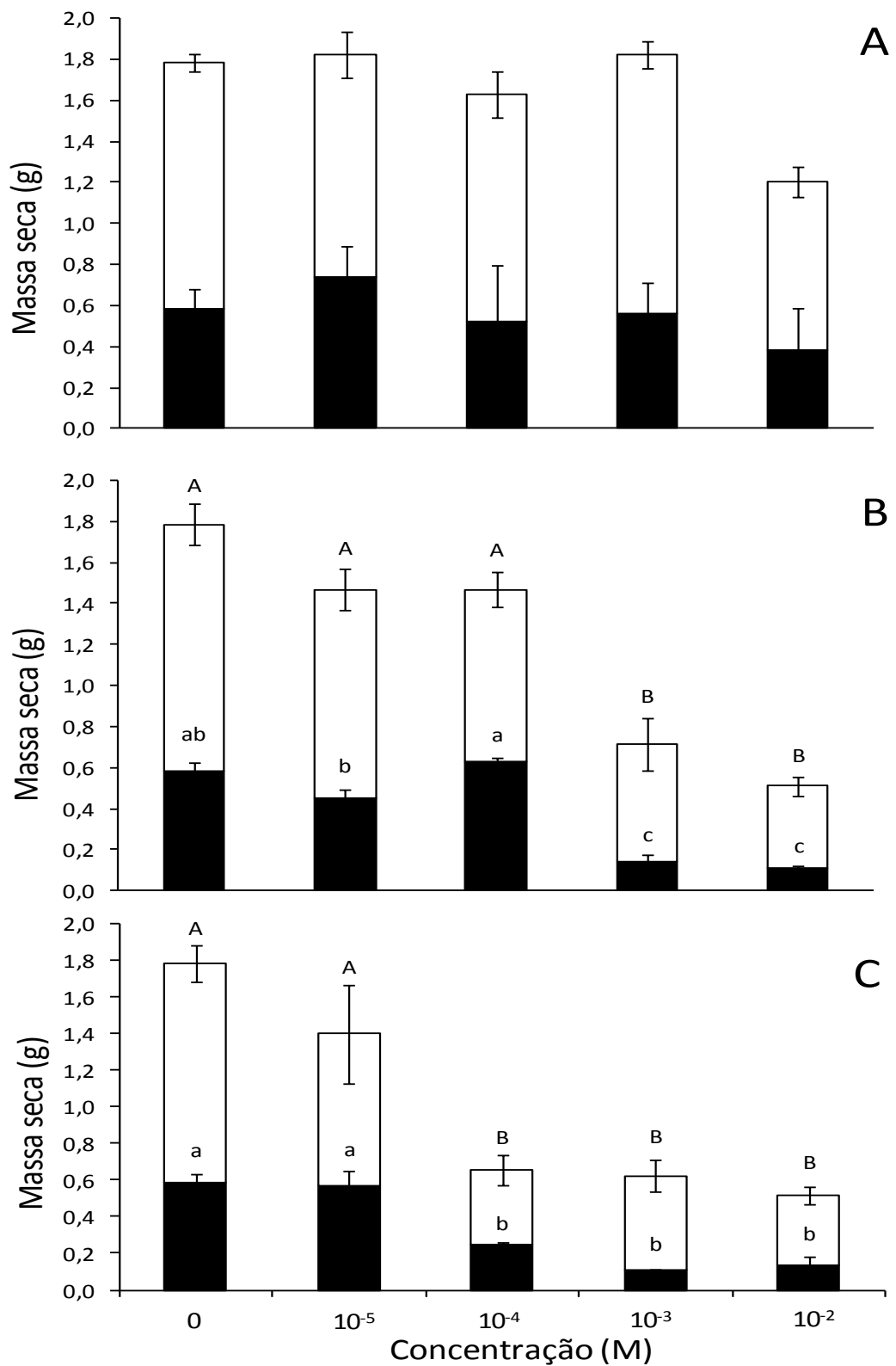
Mesmo apresentando leve grau de senescência, o milho mostrou-se muito mais tolerante ao CEPA do que o feijão visto que, ao final dos nove dias, nenhuma planta de milho havia morrido (Figura 9).



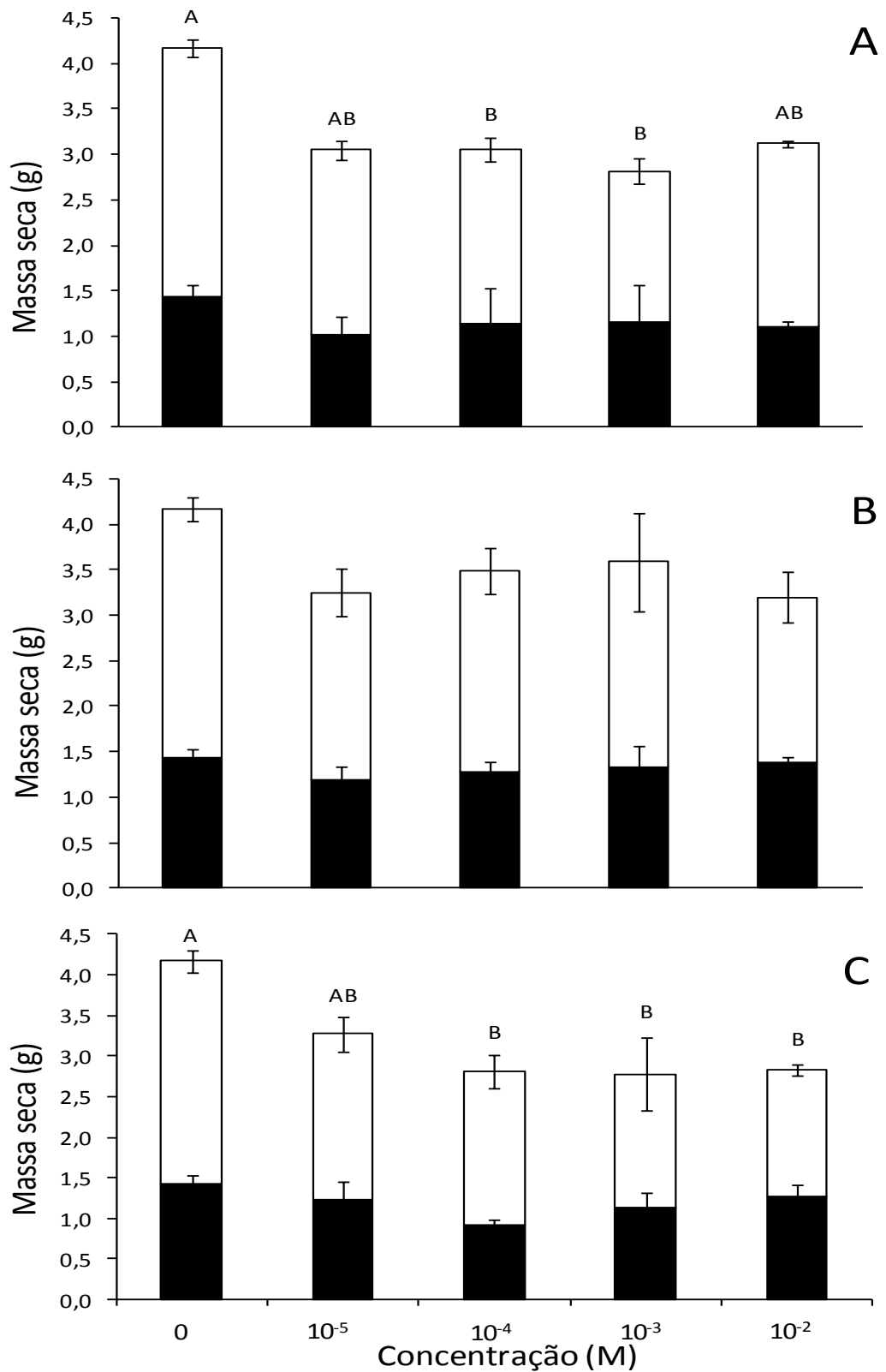
**Figura 1** Plantas de feijão dois dias após pulverização com: água (Controle, A); AIA  $10^{-5}$  M (B1); AIA  $10^{-4}$  M (B2); AIA  $10^{-3}$  M (B3); AIA  $10^{-2}$  M (B4); 2,4-D  $10^{-5}$  M (C1); 2,4-D  $10^{-4}$  M (C2); 2,4-D  $10^{-3}$  M (C3); 2,4-D  $10^{-2}$  M (C4); 2,4,5-T  $10^{-5}$  M (D1); 2,4,5-T  $10^{-4}$  M (D2); 2,4,5-T  $10^{-3}$  M (D3) e 2,4,5-T  $10^{-2}$  M (D4)



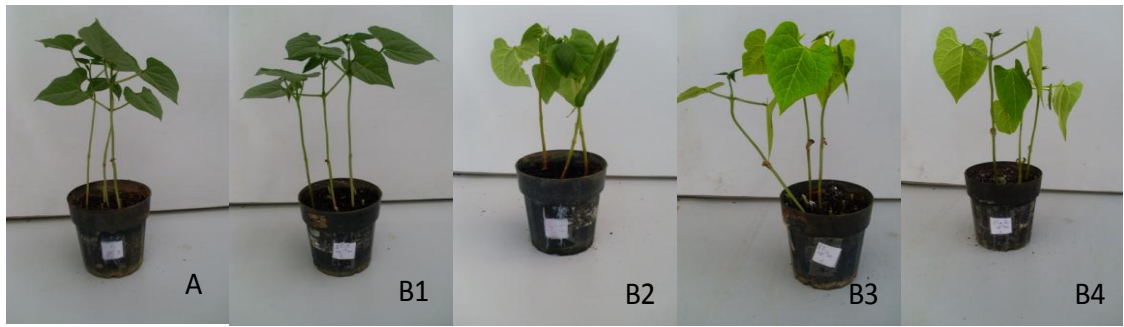
**Figura 2** Plantas de feijão nove dias após pulverização com: água (Controle, A); AIA  $10^{-5}$  M (B1); AIA  $10^{-4}$  M (B2); AIA  $10^{-3}$  M (B3); AIA  $10^{-2}$  M (B4); 2,4-D  $10^{-5}$  M (C1); 2,4-D  $10^{-4}$  M (C2); 2,4-D  $10^{-3}$  M (C3); 2,4-D  $10^{-2}$  M (C4); 2,4,5-T  $10^{-5}$  M (D1); 2,4,5-T  $10^{-4}$  M (D2); 2,4,5-T  $10^{-3}$  M (D3) e 2,4,5-T  $10^{-2}$  M (D4)



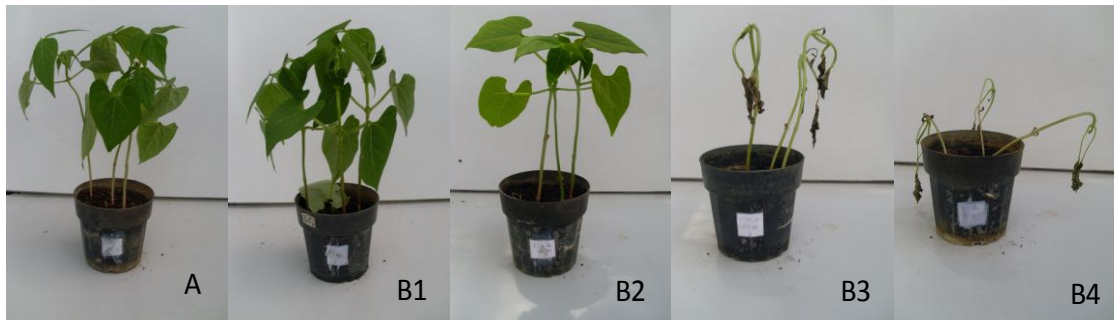
**Figura 3** Massa seca das raízes (barra preta) e parte aérea (barra branca) de plantas de feijão, nove dias após pulverização com AIA (A); 2,4-D; 2,4-D (B) e 2,4,5-T (C) em diferentes concentrações. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey



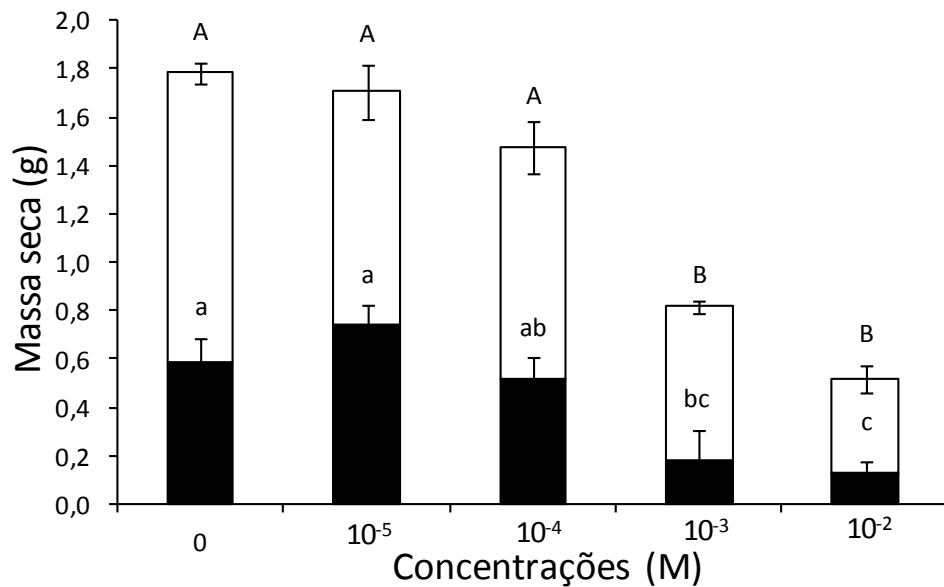
**Figura 4** Massa seca das raízes (barra preta) e parte aérea (barra branca) de plantas de milho, nove dias após pulverização com AIA (A); 2,4-D; 2,4-D (B) e 2,4,5-T (C) em diferentes concentrações. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey



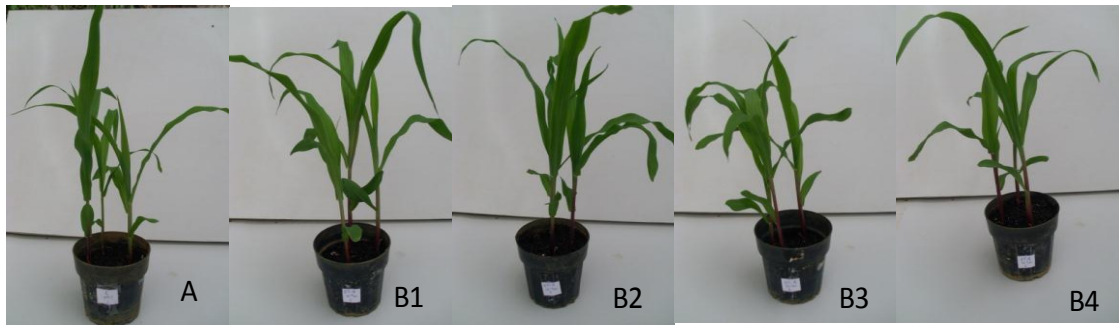
**Figura 5** Plantas de feijão após dois dias recebendo pulverização diária com: água pH 5,0 (Controle, A); CEPA  $10^{-5}$  M (B1); CEPA  $10^{-4}$  M (B2); CEPA  $10^{-3}$  M (B3); CEPA  $10^{-2}$  M (B4)



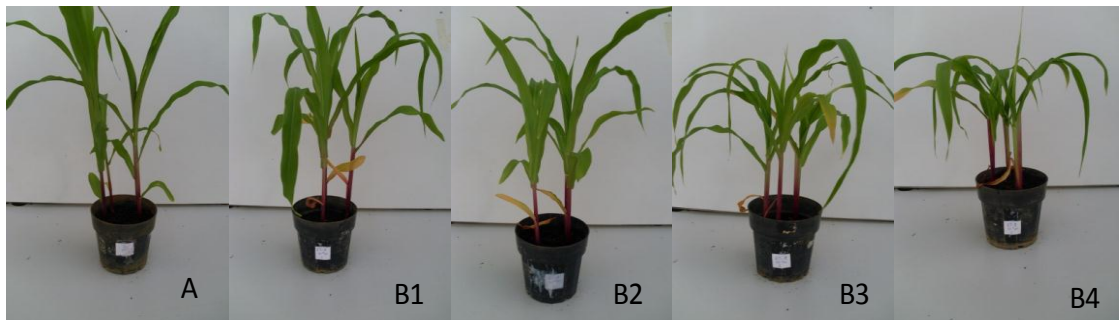
**Figura 6** Plantas de feijão após nove dias recebendo pulverização diária com: água pH 5,0 (Controle, A); CEPA  $10^{-5}$  M (B1); CEPA  $10^{-4}$  M (B2); CEPA  $10^{-3}$  M (B3); CEPA  $10^{-2}$  M (B4)



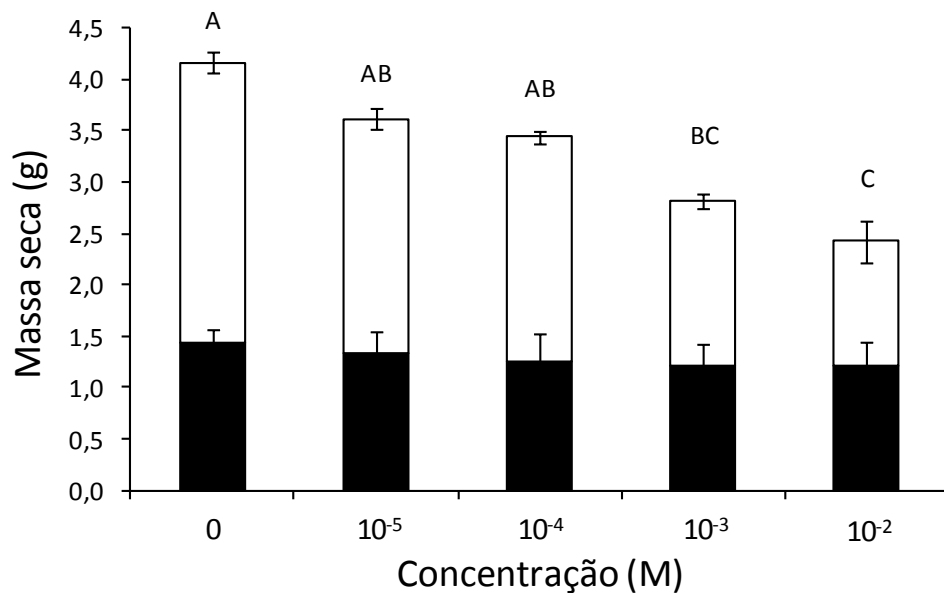
**Figura 7** Massa seca das raízes (barra preta) e parte aérea (barra branca) de plantas de feijão, após nove dias de pulverizações diárias com CEPA em diferentes concentrações. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey



**Figura 8** Plantas de milho após dois dias recebendo pulverização diária com: água pH 5,0 (Controle, A); CEPA  $10^{-5}$  M (B1); CEPA  $10^{-4}$  M (B2); CEPA  $10^{-3}$  M (B3); CEPA  $10^{-2}$  M (B4)



**Figura 9** Plantas de milho após nove dias recebendo pulverização diária com: água pH 5,0 (Controle, A); CEPA  $10^{-5}$  M (B1); CEPA  $10^{-4}$  M (B2); CEPA  $10^{-3}$  M (B3); CEPA  $10^{-2}$  M (B4)

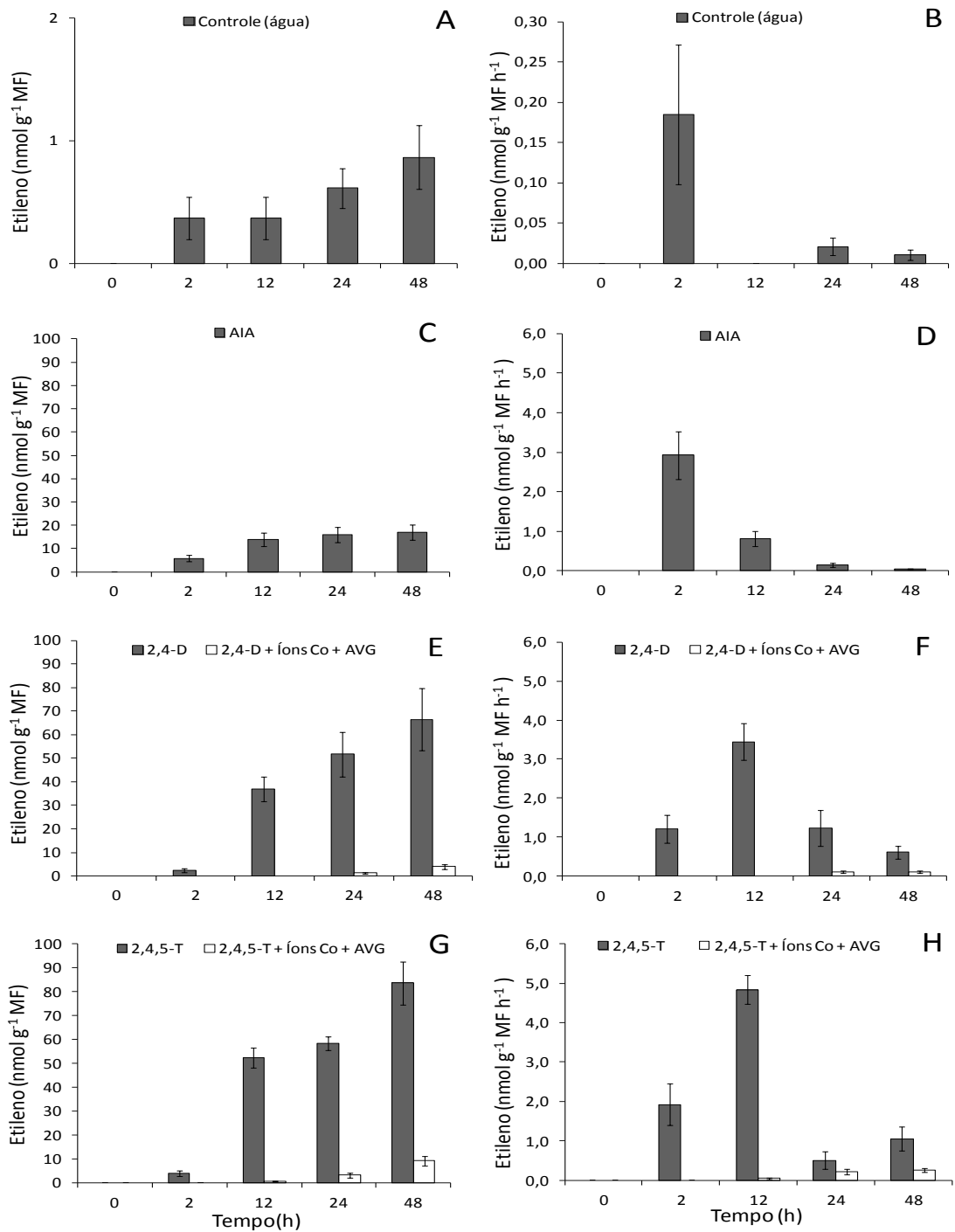


**Figura 10** Massa seca das raízes (barra preta) e parte aérea (barra branca) de plantas de milho, após nove dias de pulverizações diárias com CEPA em diferentes concentrações. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey

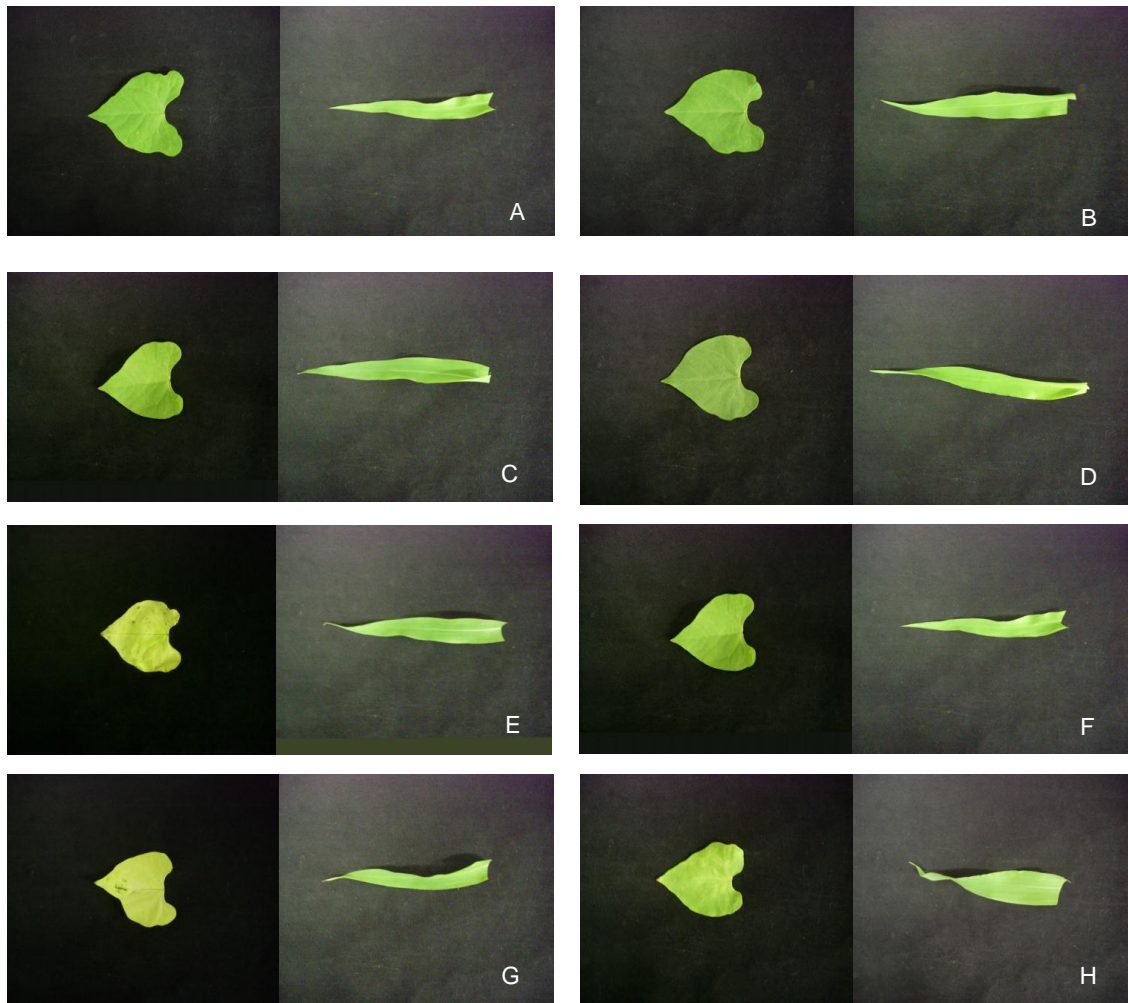
### 3.2 Emissão do etileno nas plantas tratadas

Quantificou-se o etileno emanado pelas plantas, em resposta à aplicação das auxinas, como maneira de inferir-se sobre a associação do etileno com as demais variáveis em estudo, tais como, concentração de pigmentos, razão  $F_v/F_m$ , exibição de epinastia, desidratação, enrolamento das folhas e senescência. O feijoeiro produziu grandes quantidades do gás, ao contrário das plantas de milho, que não o produziram (Figura 11). Ademais, o feijão mostrou sinais claros de epinastia, desidratação, enrolamento das folhas e amarelecimento, sintomas absolutamente não observados no milho (Kelley and Riechers, 2007; Woo et al., 2002) (Figuras 12 e 13).

O etileno emanado pelas plantas de feijão tratadas com as auxinas sintéticas foi em torno de sete a nove vezes maior que o emanado pelas plantas tratadas com a auxina natural (Figura 11). Uma possível explicação seria de que o AIA é mais rapidamente metabolizado pelas plantas do que as auxinas sintéticas (2,4-D e 2,4,5-T), principalmente pela ação do citocromo P450, que promove hidroxilação do anel aromático auxínico e pela ação da proteína GH3, que conjuga o AIA com aminoácidos (Grossmann., 2010). Aparentemente, o citocromo P450 e a proteína GH3 não atuam degradando as auxinas sintéticas (Kelley and Riechers 2007). Nas plantas de feijão não-tratadas com as auxinas, praticamente não foi detectada a produção de etileno. Sob a auxina natural, o pico de produção de etileno ocorreu por volta de 2 h após pulverização das plantas de feijão; já sob as sintéticas, esse pico de produção de etileno ocorreu 12 h após a pulverização. A explicação se dá pelo fato de as respostas desencadeadas pelo AIA ocorrerem mais rapidamente do que as respostas desencadeadas pelas auxinas sintéticas, pois o AIA é, possivelmente, transportado mais rapidamente para o interior celular (Jones, 1994; Lobler and Klambt, 1985; Ray, 1977).

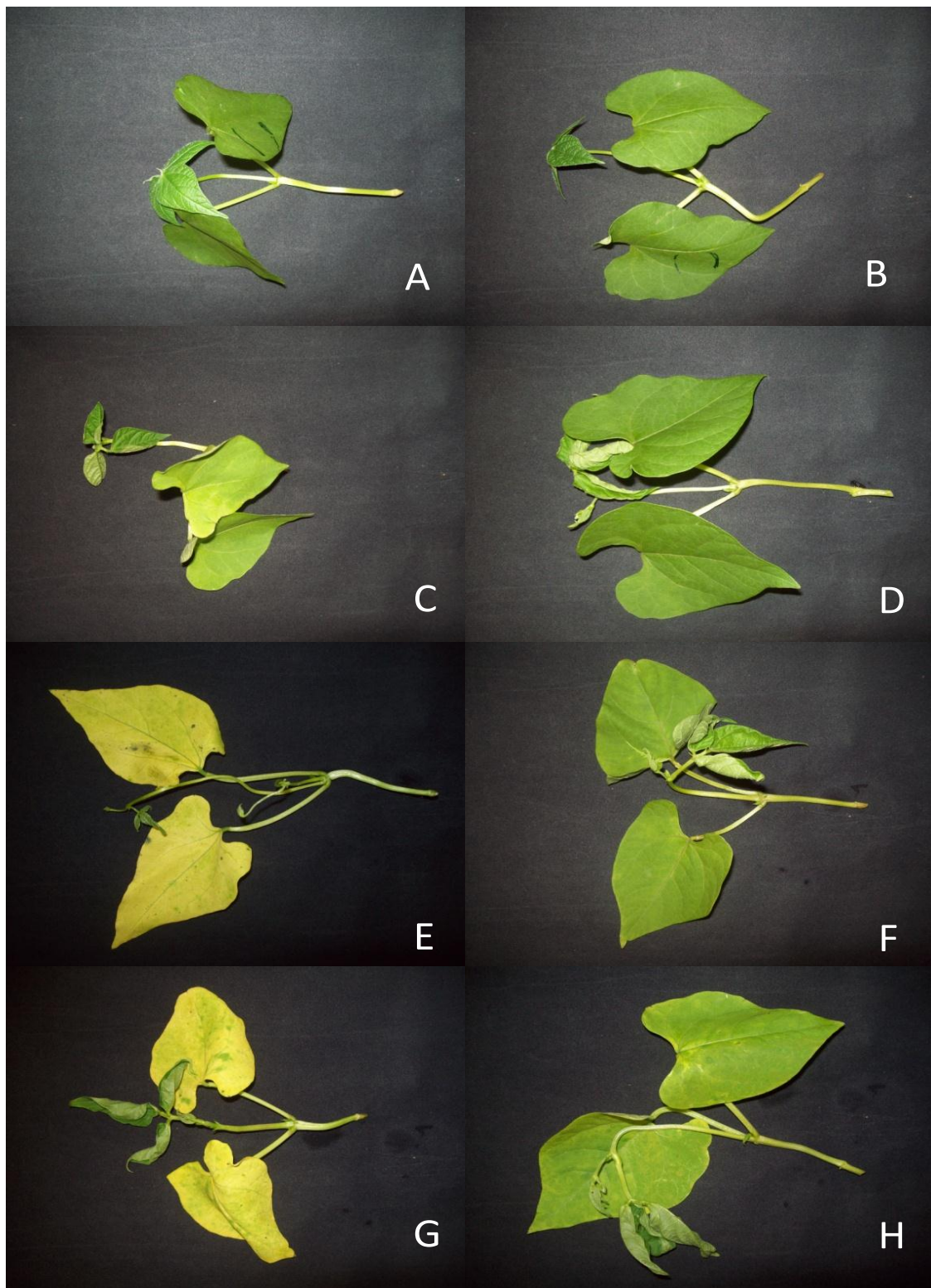


**Figura 11** Acúmulo (esquerda) e taxa de produção (direita) de etileno em plantas de feijão duas semanas após emergência, tratadas com: água (Controle, A e B); AIA (C e D); 2,4-D; 2,4-D + AVG + Co<sup>2+</sup> (E e F); 2,4,5-T; 2,4,5-T + AVG + Co<sup>2+</sup> (G e H). Plantas-controle de feijão mais AVG e Co<sup>2+</sup> e as tratadas AIA mais AVG e Co<sup>2+</sup> não produziram etileno. Notar diferença de escala nas plantas do controle



**Figura 12** Folhas de milho e feijão três dias após serem tratadas com: água (A), AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (B); AIA (C); AIA + AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (D); 2,4-D (E); 2,4-D + AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (F); 2,4,5-T (G); 2,4,5-T + AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (H)

A produção de etileno pelo feijoeiro pulverizado com auxinas foi inibida por  $\text{Co}^{2+}$  e aminoetoxivinilglicina (AVG), inibidores da biossíntese de etileno (Figura 11). No entanto, o sintoma de epinastia e foi mantido (Figura 13); o amarelecimento das plantas, nessa condição mostrou-se reduzido, deduzindo-se ser o amarelecimento um sintoma provocado exclusivamente pelo etileno (Abeles et al., 1992) (Figuras 5 e 6).



**Figura 13** Plantas de feijão com duas semanas pós emergência, três dias após serem tratadas com: água (A); AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (B); AIA (C); AIA + AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (D); 2,4-D (E); 2,4-D + AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (F); 2,4,5-T (G); 2,4,5-T + AVG +  $\text{Co}^{2+}$  (H)

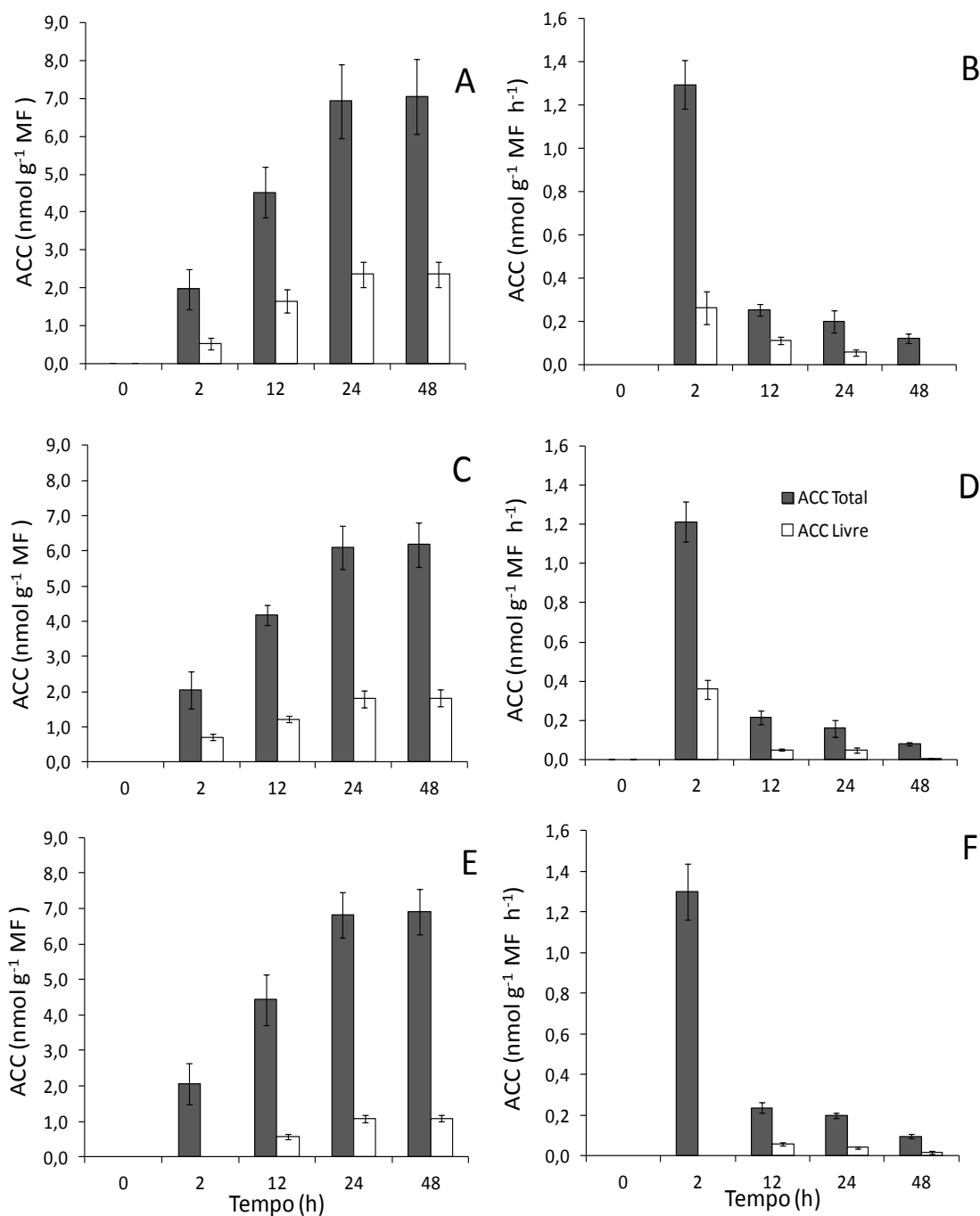
### 3.3. Produção de ACC

No intuito de avaliar-se a atividade da ACS em resposta às auxinas, procedeu-se a determinação do ACC em plantas de feijão e milho. Além disso, pretendeu-se também observar se as auxinas sintéticas indiretamente estimulavam mais a ACS que a auxina natural, já que foi observada uma maior produção de etileno nas plantas de feijão tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T do que nas tratadas com o AIA (Figura 11) (Grossmann., 2010).

Nas plantas de milho não se observou a formação de ACC em resposta às auxinas. Nas plantas de feijão pulverizadas com as auxinas, o ACC total mostrou-se semelhante em resposta às três auxinas (Figura 14) (Grossmann e Schmülling, 1995). As plantas de feijão pulverizadas com água (controle) produziram muito menos ACC do que as tratadas com as auxinas. O ACC livre por sua vez, foi encontrado em maior quantidade nas plantas pulverizadas com AIA, em comparação com as plantas pulverizadas com 2,4-D e 2,4,5-T. Como a atividade total da ACC é a soma do ACC total com etileno produzido, as plantas de feijão pulverizadas com as auxinas sintéticas devem ter produzido muito mais ACC do que as plantas tratadas com o AIA (Grossmann e Schmülling, 1995) (Kelley e Riechers 2007).

A atividade da ACO foi estimulada durante um período maior de tempo nas plantas tratadas com 2,4-D e 2,4,5-T do que nas tratadas com AIA, devido à maior persistência dessas auxinas na forma ativa nas plantas de feijão (Figura 13) (Kelley e Riechers 2007). Talvez por isso, uma menor quantidade de ACC livre tenha sido encontrada nas plantas tratadas com as auxinas sintéticas do que nas tratadas com o AIA. Nas plantas de feijão não-tratadas com as auxinas observou-se uma produção muito baixa de ACC (ver legenda da Figura 14). Esses dados mostram que a ACS parece haver sido induzida ou estimulada tanto pela auxina natural, quanto pelas sintéticas. O principal sintoma observado nas plantas de feijão tratadas com ACC foi o

amarelecimento, sintoma idêntico ao observado pelas plantas de feijão tratadas com o CEPA, diferentemente das auxinas, que além de causarem o amarelecimento, também provocaram epinastia, desidratação e enrolamento das folhas (Figura 13 e 16).



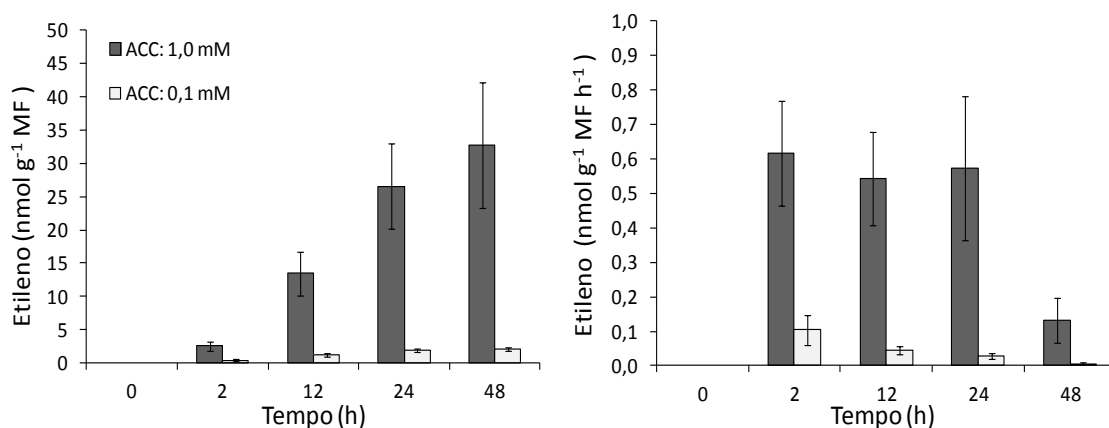
**Figura 14** Acúmulo (esquerda) e taxa de produção (direita) de ACC livre e total em plantas de feijão, duas semanas pós emergência, tratadas com AIA (A e B); 2,4-D (C e D); 2,4,5-T (E e F). As plantas-controle produziram em média, em todas as horas avaliadas, 0,71 nmol de ACC g<sup>-1</sup> MF (ACC livre) e 1,793 nmol de ACC g<sup>-1</sup> MF (ACC total). As plantas de milho não produziram ACC em resposta às auxinas

### 3.4. Atividade *in vivo* da oxidase do ACC

Vários genes que codificam a ACS já foram identificados, mostrando-se os níveis de transcrição elevados após a aplicação de auxinas. Isso sugere que o aumento na transcrição é, ao menos em parte, responsável pelo aumento na produção de etileno em resposta às auxinas (Nakagawa et al., 1991; Liang et al., 1992). Demonstrou-se, também que o AIA induziu acúmulo de transcritos da ACO; além disso, o próprio etileno fez aumentar a atividade da ACO em folhas de citrus (Peck e Kende, 1995). Pelo fato de a ACS estar presente em tão baixa quantidade nos tecidos vegetais (0,0001% do total de proteínas do tomate maduro) e ser muito instável, é difícil purificar-se essa enzima para análises bioquímicas (Taiz e Zeiger, 2006). Assim, procedeu-se a determinação da atividade *in vivo* da ACO, para ter-se mais uma variável que auxilie na demonstração dos efeitos das auxinas em plantas de feijão e para se observar que o milho além de não produzir o ACC, também não se mostrou capaz de convertê-lo a etileno. Como visto anteriormente, as auxinas (AIA, 2,4-D e 2,4,5-T) levaram a uma produção semelhante de ACC (Figura 14), mas a produção de etileno, foi muito maior em plantas de feijão tratadas com as auxinas sintéticas (Figura 11), sugerindo que há uma regulação diferencial da ACO por parte das auxinas naturais e sintéticas, já que as auxinas sintéticas não são tão rapidamente metabolizadas como o AIA (Kelley and Riechers 2007). Nas plantas de milho não se observou atividade *in vivo* da ACO. Nas plantas de feijão, a concentração de 1,0 mM de ACC, se mostrou ótima para detectar-se a atividade *in vivo* da ACO (Figura 15).

Para demonstrar-se a ocorrência de absorção do ACC em plantas de milho, determinou-se o ACC naquelas plantas tratadas com ACC durante 2 h. As plantas tratadas, exibiram, em média 1,3 nmol g<sup>-1</sup> MF de ACC livre e 5,7 nmol g<sup>-1</sup> MF de ACC total. No milho não tratado, não se detectou qualquer traço de ACC. Isso mostra que as

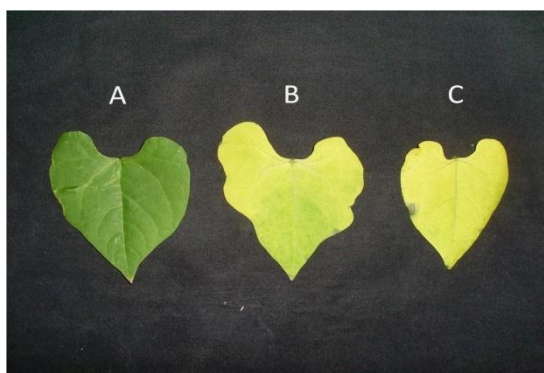
plantas de milho realmente não promovem a oxidação do ACC a etileno, que não ocorreu devido a não atividade da ACO.



**Figura 15** Atividade *in vivo* da ACO em plantas de feijão tratadas com ACC às concentrações de 1,0 , 0,1 e 0,01 mM. Etileno acumulado (esquerda) e taxa de produção de etileno (direita). Plantas de milho não mostraram atividade *in vivo* da ACO. As plantas tratadas com ACC 0,01 mM produziram quantidades insignificantes de etileno. Controle com água ver Figura 11

### 3.5 Resposta ao CEPA e ACC

Plantas de feijão foram tratadas com CEPA e ACC, para a detecção de possíveis diferenças nos sintomas causados nas folhas, levando-se em conta que a oxidação do ACC, além de produzir etileno, promove a formação de cianeto (Grossmann, 1996). Foram empregados CEPA e ACC à concentração de  $10^{-3}$  M, aplicados via absorção por hastes cortadas. As plantas tratadas com ACC e CEPA apresentaram senescência acentuada (Grossmann e Kwiatkowski, 1995), que ocorreu entre o segundo e o terceiro dia após a aplicação do ACC e CEPA, não se observando o fenômeno de epinastia, desidratação e enrolamento das folhas (Figura 16), um possível efeito das auxinas.



**Figura 16** Folhas de feijão 3 dias após tratamento com: água (Controle, A); ACC (B) e CEPA (C), ambos a  $10^{-3}$  M. Folhas com 2 semanas pós emergência

### 3.6 Efeito do cianeto nas plantas

Observando-se os danos causados pelo  $K_4Fe(CN)_6$ , (clorose e ressecamento) (ver Figuras 3 e 4 do Anexo), o milho pareceu mais tolerante ao ferrocianeto de potássio (Grossmann e Kwiatkowski, 1995). As concentrações de  $K_4Fe(CN)_6$  com melhor operacionalidade para trabalhos futuros, devido aos efeitos foram a de  $2 \times 10^{-4}$  M para feijão e  $10^{-2}$  M para milho. Devido às altas concentrações utilizadas para o aparecimento dos sintomas do cianeto, esta molécula parece não ser tão importante para a formação de sintomas em resposta às auxinas (Grossmann, 1996; Pech et al., 2004).

### 3.7 Pigmentos fotossintéticos

Como forma de estimarem-se parâmetros associados à senescência, principalmente em plantas de feijão tratadas com as auxinas, foram estimadas a razão entre clorofila *a* e *b*, a concentração de pigmentos fotossintéticos e no próximo tópico serão apresentados os valores da razão  $F_v/F_m$ . Durante a senescência, induzida pelo etileno, a clorofila *b* é reduzida à clorofila *a*, ocorrendo, assim, um acúmulo desta (Hörtensteiner, 1999). Observando-se as razões entre clorofila *a* e clorofila *b* nas plantas de feijão (Figura 17), percebe-se que as plantas tratadas com as auxinas sintéticas alcançaram maiores valores do que as plantas-controle e as plantas tratadas

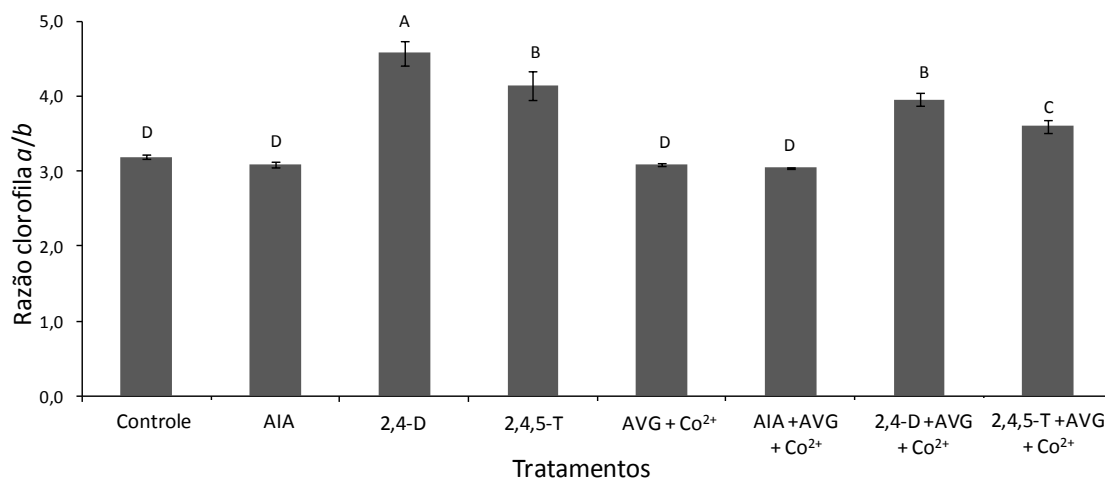
conjuntamente com as auxinas mais AVG e  $\text{Co}^{2+}$ . No caso do feijoeiro, o 2,4-D foi a auxina que levou a uma maior razão clorofila *a* e de clorofila *b*. Por outro lado, a razão entre clorofila *a* e clorofila *b*, em plantas de feijão tratadas com o AIA foi estatisticamente igual à razão do controle. As auxinas sintéticas de mostraram-se mais danosas ao feijão do que o AIA como também observaram Kelley e Riechers (2007). Isso mostra que o etileno produzido em resposta às auxinas é um dos principais responsáveis pela senescência foliar, principalmente por causar grande aumento na atividade de clorofilases (Trebish et al., 1993).

A razão entre as clorofilas nas plantas de milho não mostrou qualquer diferença estatística entre os efeitos dos tratamentos (Figura 18). Esses resultados confirmam o fato de as plantas de milho não terem produzido etileno em resposta às auxinas.

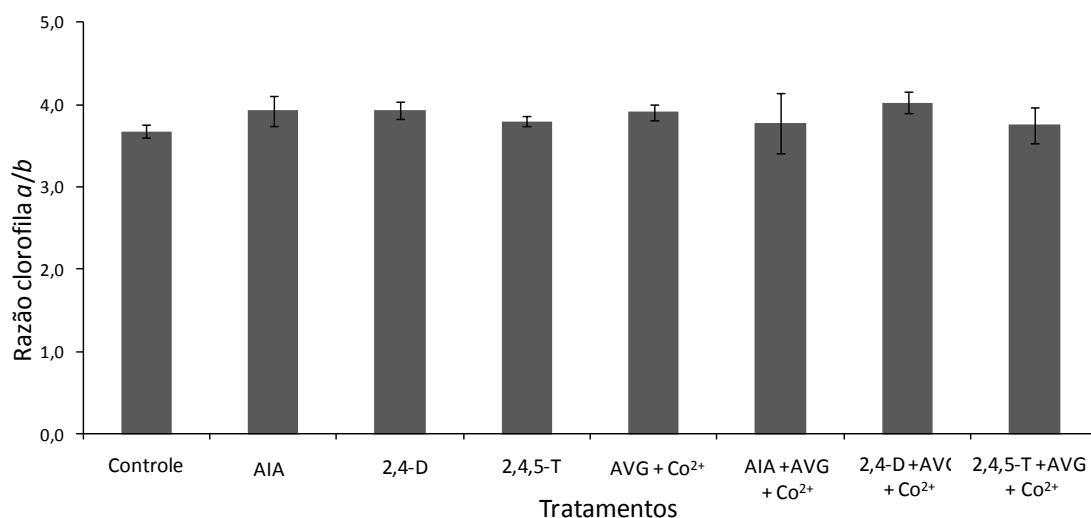
As plantas de feijão exibiram perda de clorofila total e de carotenoides durante a senescência, quando tratadas com as auxinas sintéticas. Entretanto, a queda nos níveis de clorofila total foi maior do que a queda nos níveis dos carotenoides, o que leva ao amarelecimento das folhas; tal fato é explicado devido a uma maior estabilidade estrutural dos carotenoides (ver Tabela 1 do Anexo) (Biswal e Mohanty, 1976). A queda nas concentrações dos carotenos ( $\alpha$  e  $\beta$  caroteno) foi menor que a queda dos níveis das xantofilas (neoxantina, violaxantina, anteraxantina e luteína) em plantas de feijão (Tabela 1).

Nas plantas de feijão, os níveis absolutos de todos os pigmentos, com exceção do  $\alpha$ -caroteno, foram menores nas plantas tratadas com as auxinas sintéticas (Grossmann et al., 2001), sendo tais quedas não observados, quando as auxinas foram simultaneamente fornecidas com os inibidores da produção de etileno (ver Tabela 1 do Anexo). Inclusive as plantas-controle de feijão mostraram valores menores dos níveis de luteína, clorofila *b* e clorofila *a*, do que as plantas de feijão tratadas com AVG e  $\text{Co}^{2+}$  e com AIA em conjunto com AVG e  $\text{Co}^{2+}$  (ver Tabela 1 do Anexo), enfatizando-se que as

plantas de feijão dos dois tratamentos não produziram etileno e as plantas-controle o produziram (ver Figura 11). Os níveis dos outros pigmentos em feijão apresentaram valores estatisticamente iguais, quando compararam-se as plantas-controle com as plantas tratadas com AVG e  $\text{Co}^{2+}$  e AIA mais AVG e  $\text{Co}^{2+}$ . Isso mostra mais uma vez, o papel do etileno produzido em resposta às auxinas na senescência das plantas de feijão. Por outro lado, nas plantas de milho não se observou qualquer diferença estatística nos efeitos das concentrações dos pigmentos fotossintéticos, entre as plantas pulverizadas com as auxinas e as plantas controle (Tabela 2) (ver Tabela 2 do Anexo). A zeaxantina tanto em milho e feijão não foi detectada, talvez devido à baixa luminosidade do local em que as plantas foram mantidas (Taiz e Zeiger, 2006), após o tratamento com as auxinas. São apresentados cromatogramas de plantas de feijão tratadas com água (Controle) e com 2,4-D (ver Figuras 3 e 4 do Anexo), como exemplo da queda observada nos níveis de pigmentos em plantas de feijão tratadas com 2,4-D.



**Figura 17** Razão entre clorofilas *a* e *b*, três dias após plantas de feijão serem tratadas com: água (Controle); AIA; 2,4-D; 2,4,5-T; AVG + Co<sup>2+</sup>; AIA + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4-D + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4,5-T + AVG + Co<sup>2+</sup>. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott



**Figura 18** Razão entre clorofilas *a* e *b*, três dias após plantas de milho serem tratadas com: água (Controle); AIA; 2,4-D; 2,4,5-T; AVG + Co<sup>2+</sup>; AIA + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4-D + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4,5-T + AVG + Co<sup>2+</sup>. As razões não apresentaram diferença estatística entre si, em nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott

**Tabela 1** Concentrações dos pigmentos fotossintéticos em porcentagem do controle (100%), em plantas de feijão três dias após serem tratadas com água (Controle); AIA; 2,4-D; 2,4,5-T; AVG + Co<sup>2+</sup>; AIA + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4-D + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4,5-T + AVG + Co<sup>2+</sup>. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, na mesma coluna, em nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott

Tratamento	Neoxantina	Violaxantina	Anteraxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	$\alpha$ Caroteno	$\beta$ Caroteno
Controle	100,0 A	100,0 A	100,0 A	100,0 C	100,0 B	100,0 B	100,0 D	100,0 A
AIA	66,2 B	50,5 B	138,7 A	88,4 C	75,5 B	72,9 B	97,1 D	83,8 B
2,4-D	26,9 C	27,8 B	52,2 B	57,4 D	12,2 D	17,4 D	314,3 B	50,5 C
2,4,5-T	46,0 C	55,3 B	43,5 B	91,6 C	21,1 D	26,9 D	471,4 A	71,7 B
AVG + Co <sup>2+</sup>	102,7 A	94,7 A	147,8 A	140,1 A	113,8 A	109,9 A	168,6 D	129,4 A
AIA + AVG + Co <sup>2+</sup>	105,8 A	88,7 A	176,1 A	140,6 A	117,4 A	112,1 A	122,9 D	124,2 A
2,4-D + AVG + Co <sup>2+</sup>	58,6 B	68,6 A	52,2 B	109,7 B	42,1 C	51,6 C	240,0 C	89,0 B
2,4,5-T + AVG + Co <sup>2+</sup>	38,4 C	41,5 B	34,8 B	69,8 D	37,5 C	41,8 C	120,0 D	59,7 C

**Tabela 2** Concentrações dos pigmentos fotossintéticos em porcentagem do controle (100%), em plantas de milho três dias após serem tratadas com água (Controle); AIA; 2,4-D; 2,4,5-T; AVG + Co<sup>2+</sup>; AIA + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4-D + AVG + Co<sup>2+</sup>; 2,4,5-T + AVG + Co<sup>2+</sup>

Tratamento	Neoxantina	Violaxantina	Anteraxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	$\alpha$ Caroteno	$\beta$ Caroteno
Controle	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
AIA	163,2	124,2	169,6	225,1	157,9	168,9	80,7	141,5
2,4-D	135,1	103,4	46,4	124,5	127,4	136,6	102,2	101,1
2,4,5-T	119,3	98,3	41,1	127,0	122,3	125,9	160,5	101,8
AVG + Co <sup>2+</sup>	168,2	114,1	39,3	140,8	124,6	132,6	140,1	121,2
AIA + AVG + Co <sup>2+</sup>	91,5	81,4	50,0	93,2	98,5	99,7	40,3	88,6
2,4-D + AVG + Co <sup>2+</sup>	129,4	100,5	46,4	120,3	105,4	114,6	221,1	102,1
2,4,5-T + AVG + Co <sup>2+</sup>	140,2	110,0	48,2	116,7	122,1	120,6	199,9	100,4

### 3.8. Rendimento quântico máximo do Fotossistema II

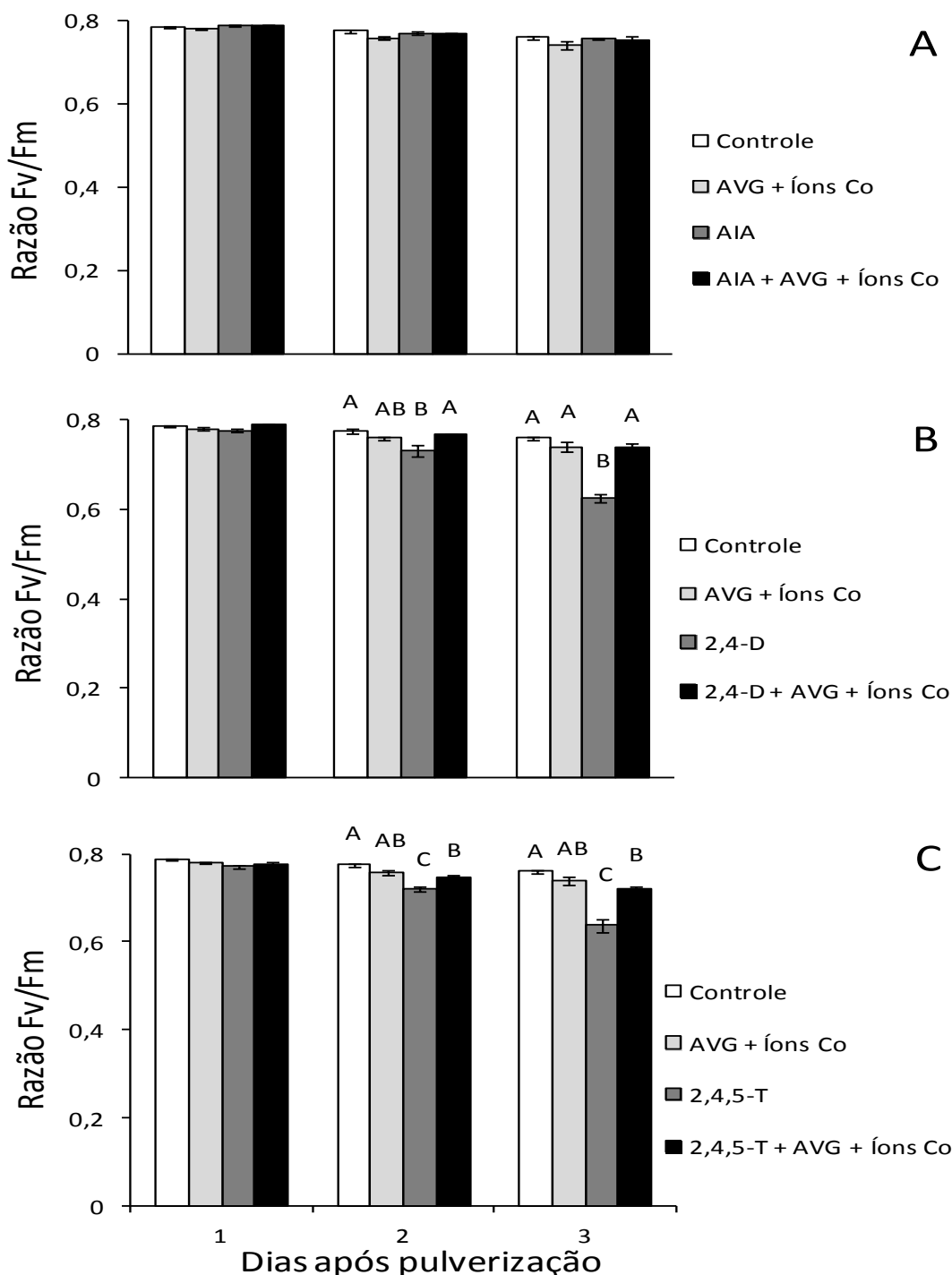
Para investigar-se a aparente senescência acelerada nas plantas de feijão tratadas com as auxinas, foi acompanhado, além do conteúdo de pigmentos, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (razão  $F_v/F_m$ ), como um diagnóstico de senescência das folhas (Oh et al., 1996), sendo aquelas variáveis relacionadas com as funções dos cloroplastos.

As técnicas de medição da fluorescência da clorofila *a* têm sido amplamente utilizadas, nos últimos anos, como ferramenta eficaz na avaliação da eficiência fotossintética e no estudo do estresse do aparelho fotossintético, principalmente quando associada a outros métodos não invasivos, em especial, o rendimento quântico máximo do fotossistema II, que é a razão entre fluorescência variável ( $F_v$ ) e a fluorescência máxima após adaptação ao escuro ( $F_m$ ). A razão  $F_v/F_m$  é usada como um indicador sensível do desempenho fotossintético da planta, com valores ótimos em torno de 0,83 para a maioria das plantas saudáveis. Alterações na  $F_v/F_m$  são atribuídas a mudanças na eficiência da extinção (*quenching*) não-fotoquímica. Valores de  $F_v/F_m$  abaixo de 0,83 são bons indicadores de estresses ambientais, em particular, de danos fotoinibitórios os quais levam à senescência (Ramalho et al., 1997).

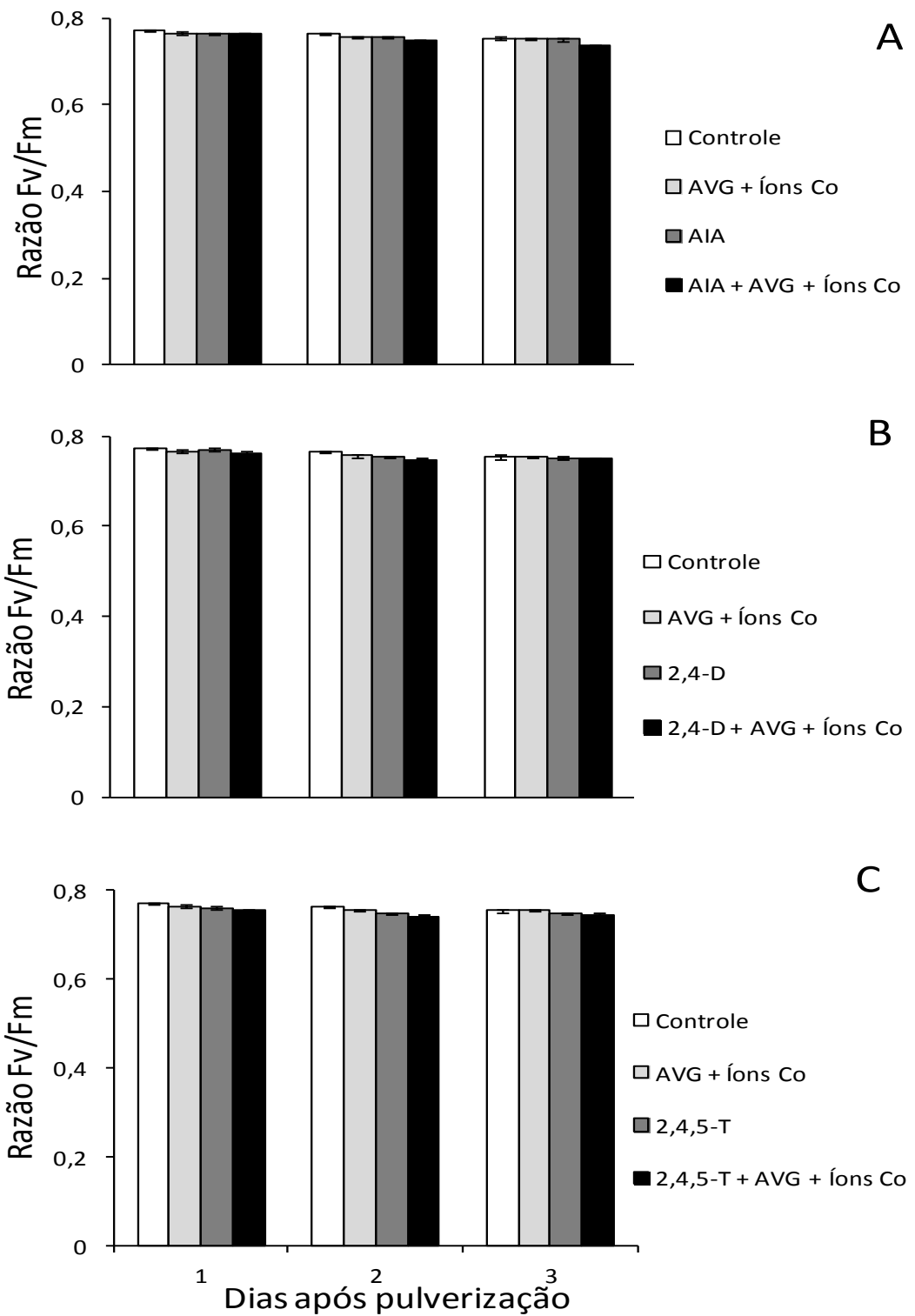
As plantas de feijão sofreram quedas significativas na razão  $F_v/F_m$  após pulverização com 2,4-D e 2,4,5-T. As plantas tratadas com AIA não sofreram reduções elevadas na razão  $F_v/F_m$ , possivelmente pelo fato de o AIA ter sido rapidamente metabolizado pelas plantas de feijão (Kelley and Riechers 2007) (Figura 19). Em plantas de feijão pulverizadas com as auxinas sintéticas em conjunto com AVG e  $Co^{2+}$ , a queda na razão  $F_v/F_m$  não foi observada, mostrando, assim, que o etileno produzido, levou a uma queda na razão  $F_v/F_m$ .

A razão  $F_v/F_m$  não sofreu alterações significativas em plantas de milho pulverizadas com as auxinas em relação as plantas-controle (Figura 20). Esses

resultados mostram como a senescência provocada pelas auxinas é estimulada, principalmente, pela formação do etileno (Segura-Aguilar et al., 1995). As auxinas, *per se*, não estariam provocando diretamente a senescência nas dicotiledôneas.



**Figura 19** Razão  $F_v/F_m$  acompanhada durante três dias em plantas de feijão tratadas com: água (Controle); AVG +  $Co^{2+}$ ; AIA; AIA + AVG +  $Co^{2+}$  (A); água; AVG +  $Co^{2+}$ ; 2,4-D; 2,4-D + AVG +  $Co^{2+}$  (B); água; AVG +  $Co^{2+}$ ; 2,4,5-T; 2,4,5-T + AVG +  $Co^{2+}$  (C). Médias seguidas de mesma letra, em cada um dos dias, não diferem entre si, em nível de 5%, pelo teste de Tukey



**Figura 20** Razão  $F_v/F_m$  acompanhada durante três dias em plantas de milho tratadas com: água (Controle); AVG +  $Co^{2+}$ ; AIA; AIA + AVG +  $Co^{2+}$  (A); água; AVG +  $Co^{2+}$ ; 2,4-D; 2,4-D + AVG +  $Co^{2+}$  (B); água; AVG +  $Co^{2+}$ ; 2,4,5-T; 2,4,5-T + AVG +  $Co^{2+}$  (C). Médias não apresentaram diferença estatística, em nível de 5%, pelo teste de Tukey

Os níveis dos pigmentos fotossintéticos (carotenoides e clorofilas) correlacionaram-se diretamente com os valores da razão  $F_v/F_m$  e com o etileno emanado em resposta às auxinas, principalmente as auxinas sintéticas, que foram as que mais induziram a produção de etileno no feijoeiro (ver Figura 11). Esses resultados mostram a importância desses pigmentos na eficiência da extinção (*quenching*) não-fotoquímica da luz e o papel do fisiológico do etileno em resposta às auxinas (Grossmann et al., 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

As auxinas sintéticas mostraram-se extremamente tóxicas, quando fornecidas sob altas concentrações, principalmente às dicotiledôneas, sendo o etileno biossintetizado em resposta às auxinas, um dos principais contribuintes pela toxicidade. O milho por sua vez, se mostrou praticamente insensível às auxinas, quase não exibindo sintomas de senescência. Também se mostrou incapaz de produzir etileno. Plantas de milho pulverizadas com CEPA, porém, exibiram diminuição da massa seca e uma leve senescência como também foi observada por Abeles et al. (1992). Já as pulverizações com as auxinas levaram a pequenas quedas na matéria seca das plantas de milho. Em outras palavras o milho respondeu relativamente mais ao etileno do que às auxinas.

A atividade da ACS e da ACO pareceu fundamental para a exibição das respostas diferenciais das mono- e dicotiledôneas. Não foi detectada a atividade da ACS na monocotiledônea, desde que o ACC não foi formado. Também não foi detectada a atividade *in vivo* da ACO, pois o milho não produziu etileno em resposta ao ACC.

As plantas de milho pareceram mais tolerantes ao  $K_4Fe(CN)_6$  do que as plantas de feijão. As plantas tratadas exibiram desidratação e enrolamento das folhas, sintomas característicos da ação das auxinas. As concentrações empregadas do cianeto, no entanto, foram bastante elevadas.

O feijão apresentou clorose característica de senescência, que pareceu um efeito exclusivo do etileno, em resposta ao tratamento com as auxinas. Por outro lado, a epinastia foliar e caulinar, murcha e enrolamento das folhas pareceram efeitos exclusivos das auxinas, visto que mesmo com o tratamento das plantas com as auxinas em conjunto com AVG e  $Co^{2+}$ , reduziu-se a senescência mas aqueles sintomas foram mantidos.

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* estão sendo reproduzidos, de forma a fornecerem um número suficiente de sementes e de plantas para comprovação de alguns resultados aqui encontrados. Os mutantes a serem testados serão: defectivos na produção de etileno (*aco2*); insensíveis ao etileno (*ein2-5*); superprodutores de etileno (*eto1-1*) (Alonso and Ecker., 2001); tolerantes ao 2,4-D (*aar1-1*) (Rahman et al., 2006); e defectivos na desintoxicação do cianeto (*bsas3-1*) (Watanabe et al., 2008). Utilizando-se desses mutantes, tentar-se á separar os efeitos das auxinas, do etileno e do cianeto.

Também determinar-se-á a atividade de enzimas antioxidativas, como a dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e redutase da glutaciona, para se observar uma possível participação diferencial do etileno e das auxinas como indutores de danos oxidativos. Além disso, verificar-se-ão os danos às membranas celulares com a quantificação de aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos.

Determinar-se-á a atividade *in vitro* da ACO após o tratamento das plantas com as diferentes auxinas, para constatar-se se realmente as auxinas sintéticas induzem atividade do num meio livre de células. E também para discernir se a ACO se mostrou inativa, ou ausente em plantas de milho.

Futuramente, dever-se-á determinar a atividade da sintase da  $\beta$ -cianoalanina nas mono- e nas dicotiledôneas, para testar-se a tolerância dos dois grupos de plantas ao  $CN^-$ .

Também serão realizados testes com as auxinas, o ACC, o CEPA, AVG e  $Co^{2+}$  em outras mono- e dicotiledôneas para a detecção dos sintomas (epinastia, murcha, enrolamento de folhas e senescência) aqui observados, e produção do etileno em outras espécies mono- e dicotiledôneas.

Outras avaliações como trocas gasosas (vapor de água por  $\text{CO}_2$  e  $\text{CO}_2$  por  $\text{O}_2$ ) também deverão ser feitas, afim de esclarecer melhor o papel do etileno no metabolismo das mono- e dicotiledôneas de forma geral.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abeles FB, Morgan PW, Seltveit Jr ME** (1992) Ethylene in plant biology, 2nd edn. London: Academic Press.
- Alonso JM, Ecker JR** (2001) The ethylene pathway: A paradigm for plant hormone signaling and interaction. *Science* **70**: re1.
- Argueso CT, Hansen M, Kieber JJ** (2007) Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 92-105
- Biswal UC, Mohanty P** (1976) Aging-induced changes in photosynthetic electron transport of detached barley leaves. *Plant and Cell Physiology* **17**: 323-331
- De Rueda PM, Gallardo M, Matilla AJ, Sánchez-Xalle IM** (1995) Preliminary characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase properties from embryonic axes of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Experimental Botany* **46**: 695-70
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445
- Fernández-Maculet JC, Yang SF** (1992) Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. *Plant Physiology* **99**: 751-754
- Gallardo M, Delgado MM, Sánchez-Calle IM, Matilla AJ** (1991) Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds. *Plant Physiology* **97**: 122-127
- Gilbert FA** (1946) The status of plant-growth substances and herbicides in 1945. *Chemical Reviews* **39**: 199-218
- Grossmann K, Kwiatkowski J** (1995) Evidence for a causative role of cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the herbicidal mode of action of quinclorac in barnyard grass. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **51**: 150-160
- Grossmann K, Schmülling T** (1995) The effects of the herbicide quinclorac on shoot

growth in tomato is alleviated by inhibitors of ethylene biosynthesis and by the presence of an antisense construct to the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase gene in transgenic plants. *Plant Growth Regulation* **16**: 183-188

**Grossmann K, Kwiatkowski J, Tresch S** (2001) Auxin herbicides induce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *Journal of Experimental Botany* **52**: 1811-1816

**Grossmann K, Rosenthal C, Kwiatkowski, J** (2004) Increases in jasmonic acid caused by indole-3-acetic acid and auxin herbicides in cleavers (*Galium aparine*). *Journal Plant Physiology* **161**: 809-814

**Grossmann K** (1996) A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. *Physiologia Plantarum* **97**: 772-775

**Grossmann K** (2000) The mode of action of auxin herbicides: a new end to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science* **5**: 506-508

**Grossmann K** (2003) Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 109-122

**Grossmann K** (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science* **66**: 113-120

**Halliwell B, Gutteridge JMC** (2000) *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK. pp 139-205

**Hansen H, Grossmann K** (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* **124**: 1437-1448

**Hörtensteiner S** (1999) Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 330–347

**Jones AM** (1994) Auxin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology* **45**: 393-420

- Kelley KB, Riechers DE** (2007) Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **89**: 1-11
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The Arabidopsis TIR1 protein is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-451
- Kraft M, Kuglitsch R, Kwiatkowski J, Frank M, Grossmann K** (2007) Indole-3-acetic acid and auxin herbicides up-regulate 9-cisepoxycarotenoid dioxygenase gene expression and abscisic acid accumulation in cleavers (*Galium aparine*): interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1497-1503
- Lawrence DK** (1984) The metabolism of synthetic plant growth regulators in plants. *In* A Crozier, JR Hillman, eds, *The biosynthesis and metabolism of plant hormones*, Vol 1. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 231-264
- Liang X, Abel S, Keller J, Shen N, Theologis A** (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 11046–11050.
- Lizada MCC, Yang SF** (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Analytical Biochemistry* **100**: 140-145
- Lobler M, Klambt D** (1985) Auxin-binding proteins of corn (*Zea mays* L.) I. Purification by immunological methods and characterization. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 9848-9853
- Monaco TJ, Weller SC, Ashton FM** (2002) *Weed Science: Principles and Practices*. Wiley-Blackwell, New York
- Nakagawa JH, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H** (1991) Cloning of the complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase

and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant and Cell Physiology* **32**: 1153–1163

**Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH, Nam HG** (1996). A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**: 739–754.

**Pech J-C, Bouzayen M, Latché A** (2004) Ethylene biosynthesis. In PJ Davies, ed, *Plant hormones, biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 115-136

**Peck S, Kende H** (1995) Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant Molecular Biology* **28**: 293–301

**Peixoto F, Gomes-Laranjo J, Vicente J, Madeira V** (2008) Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1125-1133

**Pinheiro FJA, Barros RS, Coelho TG, Souza BML** (2008) Breaking dormancy of *Stylosanthes humilis* seeds with selenium compounds. *Seed Science Research* **18**: 47-53

**Rahman A, Nakasone A, Chhun T, Ooura C, Biswas KK, Uchimiya H, Tsurumi S, Baskin TI, Tanaka A, Oono Y** (2006) A small acidic protein 1 (SMAP1) mediates responses of the *Arabidopsis* root to the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Journal* **47**: 788–801

**Ramalho JC, Pons TL, Groenvelde HW, Nunes MA** (1997) Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum* **101**: 229-239

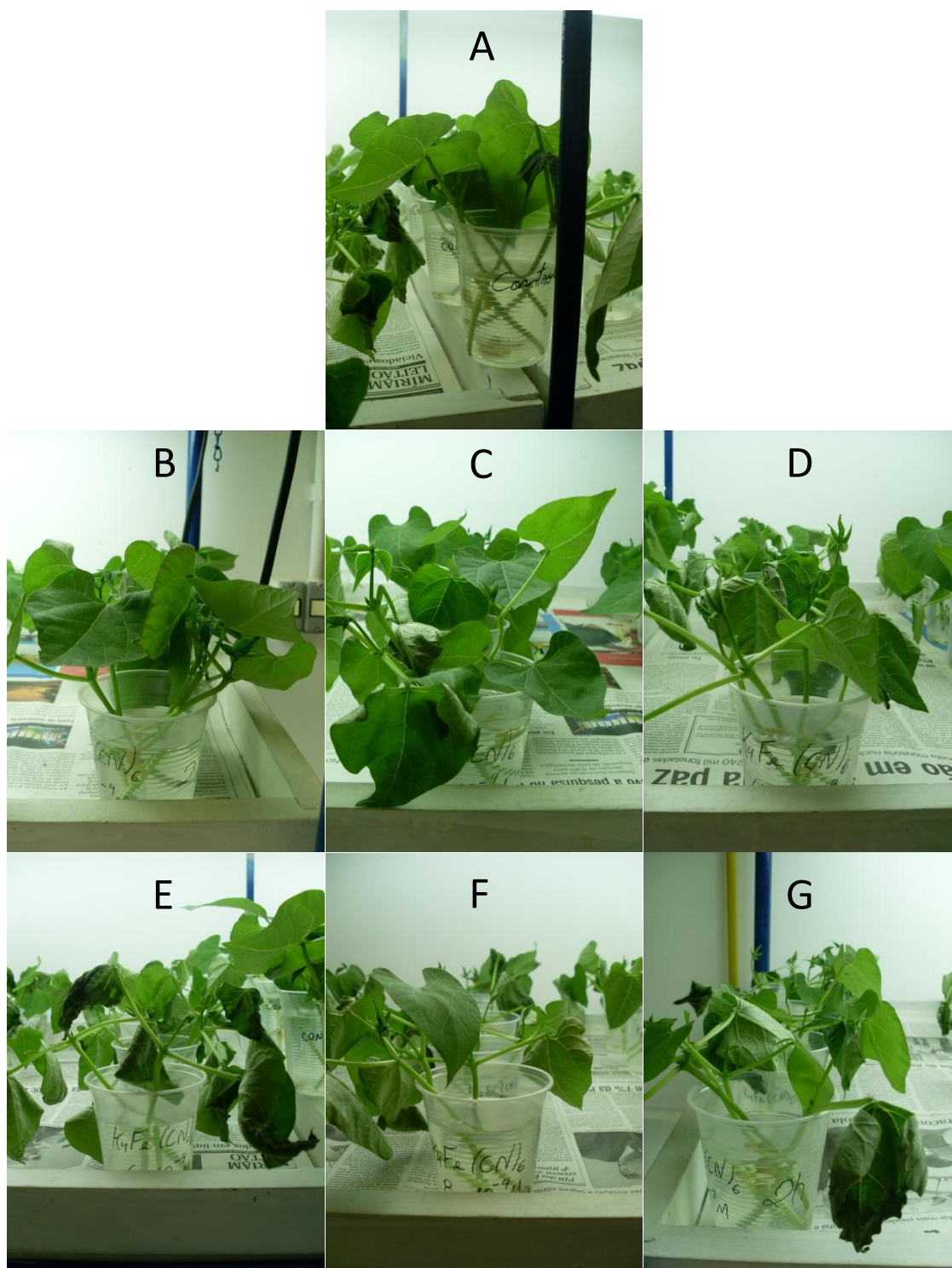
**Ray PM** (1977) Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. *Plant Physiology* **60**: 585-591

**Romano CP, Cooper ML, Klee HJ** (1993) Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **5**: 181-189

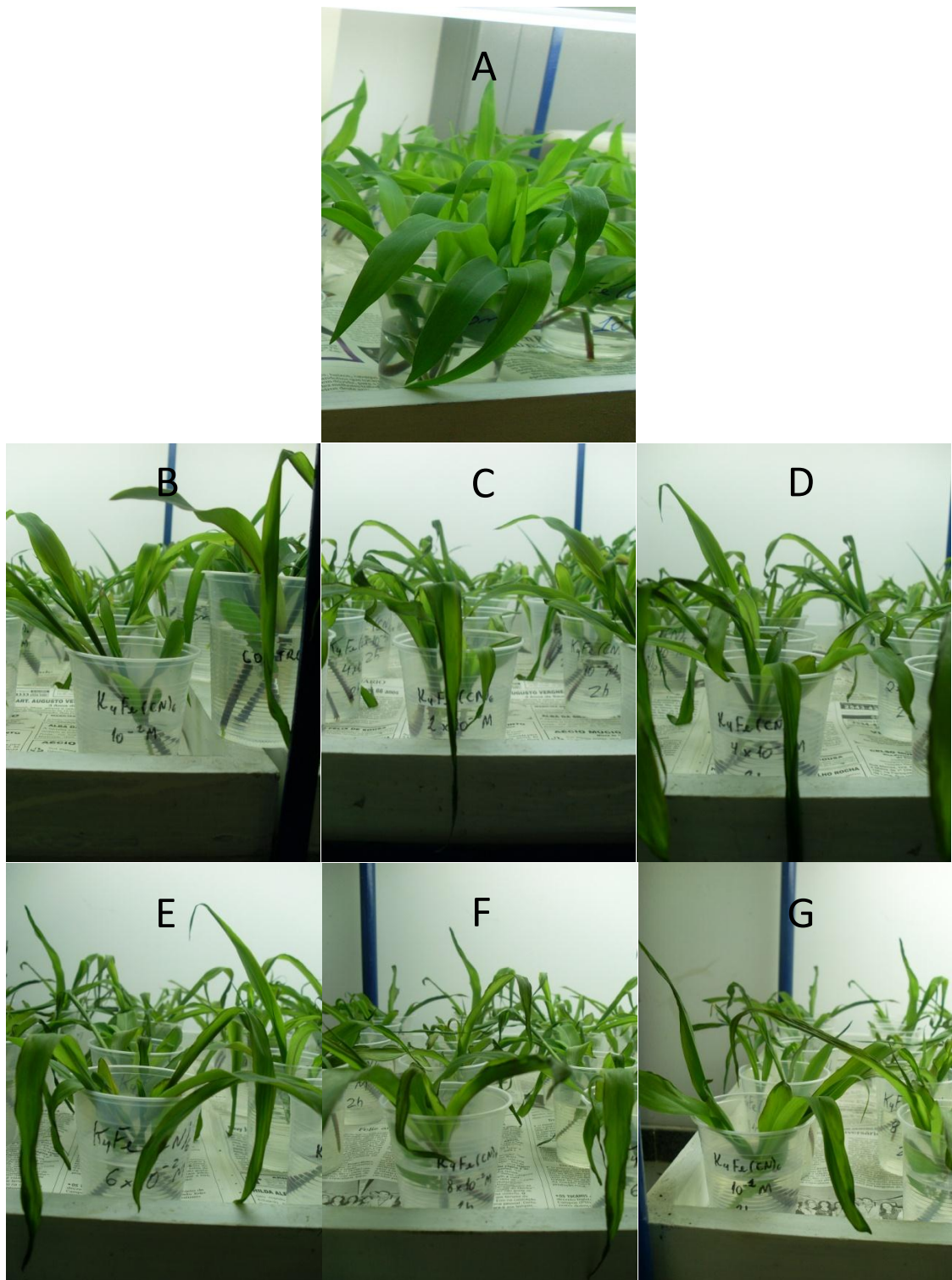
- Romero-Puertas MC, McCarthy IM, Gómez M, Sandalio LM, Corpas SJ, Del Río LA, Palma JM** (2004) Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1135-1148
- Saltveit-Jr ME, Yang SF** (1987) Ethylene. *In* Rivier L, Crozier A, eds, Principles and practice of plant hormone analysis, Vol 2. Academic Press, London, UK. pp 367-401
- Segura-Aguilar J, Hakman I, Rydström J** (1995) Studies on the mode of action of the herbicidal effect of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on germinating Norway spruce. *Environmental and Experimental Botany* **35**: 309-319
- Smith JM, Arteca RN** (2000) Molecular control of ethylene production by cyanide in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **109**: 180-187
- Solomanson LP** (1981) Cyanide as a metabolic inhibitor. *In* Vennesland EE, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, eds, Cyanide in biology, Academic Press, London, UK. pp 11-28
- Sunohara Y, Matsumoto H** (2008) Quinclorac-induced cell death is accompanied by generation of reactive oxygen species in maize root tissue. *Phytochemistry* **69**: 2312-2319
- Taiz L, Zeiger E** (2006) Plant physiology. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, USA.
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J** (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**: 2738-2754
- Tao Y, Ferrer J-L, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164-176

- Title FL, Goudey S, Spencer MS** (1990) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on endogenous  $\beta$ -cyanoalanine synthase activity and ethylene evolution in seedlings of soybean and barley. *Plant Physiology* **94**: 1143-1148
- Trebitsh T, Goldschmidt EE, Riov J** (1993) Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in *Citrus* fruit peel. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **90**: 9441–9445
- Vanneste S, Friml J** (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005-1016
- Walsh TA, Neal R, Merlo AO, Honma M, Hicks GR, Wolff K, Matsumura W, Davies PJ** (2006) Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**: 542-552
- Watanabe M, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Noji M, Saito K**, (2008) Physiological roles of the  $\beta$ -substituted alanine synthase gene family in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**: 310-320
- Woo EJ, Marshall J, Baulry J, Chen JG, Venis M, Napier R M, Pickersgill R W** (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO Journal* **21**: 2877±2885
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**: 707-735

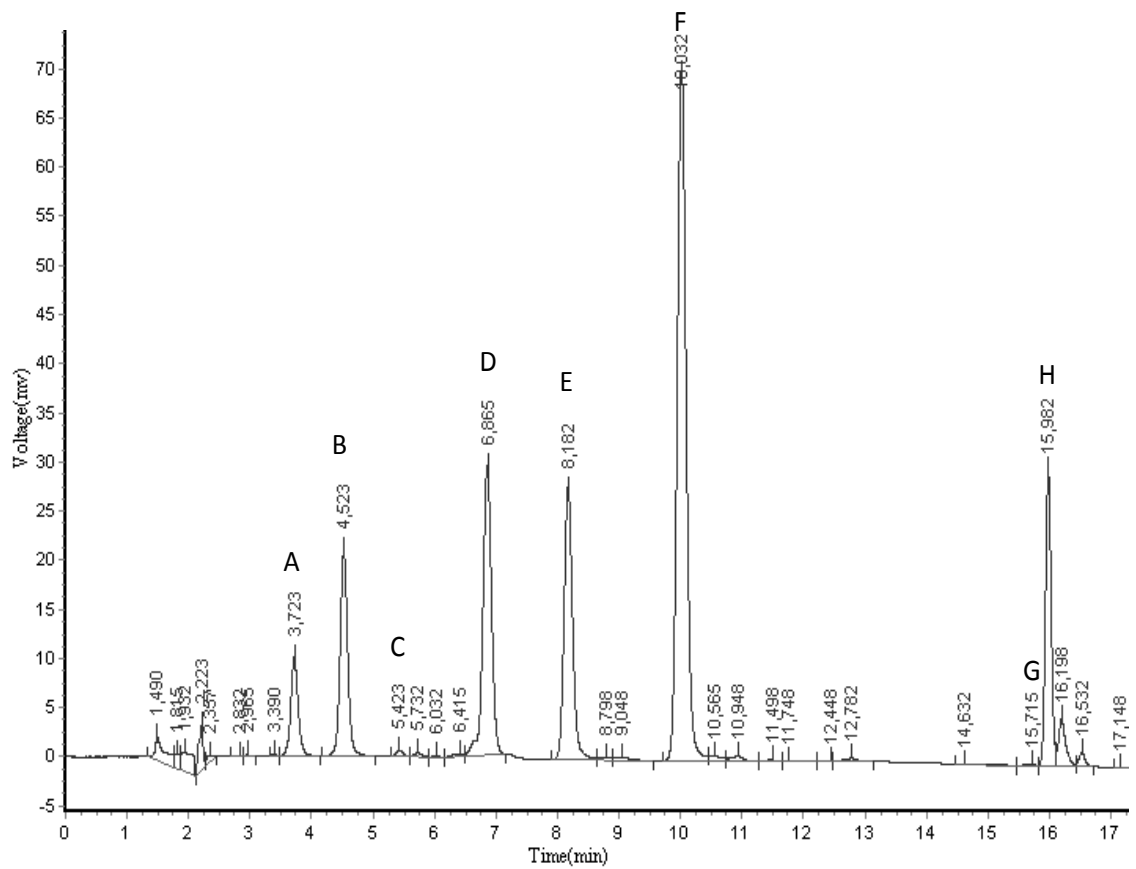
## **ANEXO**



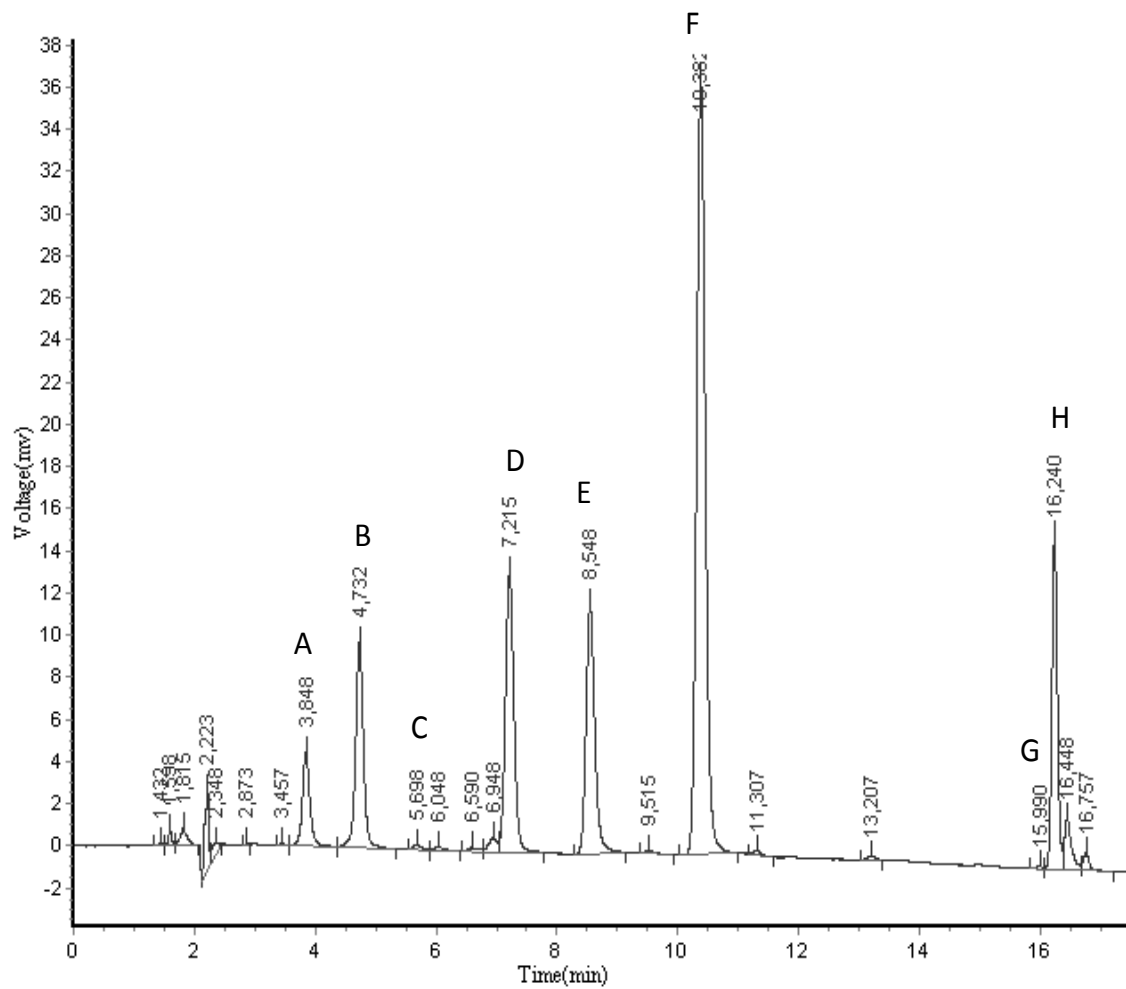
**Figura 1** Plantas de feijão dois dias após tratamento com água (Controle, A);  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $10^{-4}$  M (B);  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $2 \times 10^{-4}$  M (C);  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $4 \times 10^{-4}$  M (D);  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $6 \times 10^{-4}$  M (E);  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $8 \times 10^{-4}$  M (F) e  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $10^{-3}$  M (G)



**Figura 2** Plantas de milho dois dias após tratamento com água (Controle, A);  $K_4Fe(CN)_6$   $10^{-2}$  M (B);  $K_4Fe(CN)_6$   $2 \times 10^{-2}$  M (C);  $K_4Fe(CN)_6$   $4 \times 10^{-2}$  M (D);  $K_4Fe(CN)_6$   $6 \times 10^{-2}$  M (E);  $K_4Fe(CN)_6$   $8 \times 10^{-2}$  M (F) e  $K_4Fe(CN)_6$   $10^{-1}$  M (G)



**Figura 3** Cromatograma de amostra de planta de feijão tratada com água (Controle). Os números acima dos picos dos pigmentos são seus respectivos tempos de retenção. Neoxantina (A), Violaxantina (B), Anteraxantina (C), Luteína (D), Clorofila *b* (E), Clorofila *a* (F),  $\alpha$  Caroteno (G) e  $\beta$  Caroteno (H)



**Figura 4** Cromatograma de amostra de planta de feijão tratada com 2,4-D. Os números acima dos picos dos pigmentos são seus respectivos tempos de retenção. Neoxantina (A), Violaxantina (B), Antheraxantina (C), Luteína (D), Clorofila *b* (E), Clorofila *a* (F),  $\alpha$  Caroteno (G) e  $\beta$  Caroteno (H)

**Tabela 1** Concentrações dos pigmentos fotossintéticos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF), em plantas de feijão três dias após serem tratadas com água (Controle); AIA; 2,4-D; 2,4,5-T; AVG +  $\text{Co}^{2+}$ ; AIA + AVG +  $\text{Co}^{2+}$ ; 2,4-D + AVG +  $\text{Co}^{2+}$ ; 2,4,5-T + AVG +  $\text{Co}^{2+}$ . Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, na mesma coluna, em nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott

Tratamento	Neoxantina	Violaxantina	Anteraxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	$\alpha$ Caroteno	$\beta$ Caroteno
Controle	51,5 $\pm$ 6,3 A	58,6 $\pm$ 4,8 A	4,6 $\pm$ 0,5 A	114,2 $\pm$ 11,6 C	255,2 $\pm$ 24,3 B	815,1 $\pm$ 74,6 B	3,5 $\pm$ 1,0 D	155,5 $\pm$ 19,3 A
AIA	34,1 $\pm$ 2,9 B	29,6 $\pm$ 1,6 B	6,2 $\pm$ 0,5 A	101,0 $\pm$ 7,4 C	192,7 $\pm$ 14,4 B	594,0 $\pm$ 40,0 B	3,4 $\pm$ 0,5 D	130,3 $\pm$ 12,8 B
2,4-D	13,9 $\pm$ 0,6 C	16,3 $\pm$ 1,5 B	2,4 $\pm$ 0,8 B	65,6 $\pm$ 4,0 D	31,1 $\pm$ 2,9 D	142,0 $\pm$ 12,1 D	11,0 $\pm$ 1,0 B	78,6 $\pm$ 5,8 C
2,4,5-T	23,7 $\pm$ 2,6 C	32,4 $\pm$ 3,1 B	2,0 $\pm$ 0,3 B	104,6 $\pm$ 8,4 C	53,8 $\pm$ 8,3 D	219,9 $\pm$ 29,9 D	16,5 $\pm$ 1,5 A	111,6 $\pm$ 8,2 B
AVG + $\text{Co}^{2+}$	52,9 $\pm$ 6,2 A	55,5 $\pm$ 7,5 A	6,8 $\pm$ 1,7 A	160,0 $\pm$ 11,9 A	290,4 $\pm$ 23,9 A	896,3 $\pm$ 72,8 A	5,9 $\pm$ 1,4 D	201,3 $\pm$ 15,0 A
AIA + AVG + $\text{Co}^{2+}$	54,5 $\pm$ 6,6 A	52,0 $\pm$ 7,0 A	8,1 $\pm$ 2,3 A	160,6 $\pm$ 18,2 A	299,7 $\pm$ 36,1 A	914,0 $\pm$ 111,5 A	4,3 $\pm$ 0,8 D	193,1 $\pm$ 22,6 A
2,4-D + AVG + $\text{Co}^{2+}$	30,2 $\pm$ 1,5 B	40,2 $\pm$ 1,9 A	2,4 $\pm$ 0,1 B	125,3 $\pm$ 4,5 B	107,4 $\pm$ 13,1 C	420,8 $\pm$ 42,7 C	8,4 $\pm$ 1,1 C	138,4 $\pm$ 12,1 B
2,4,5-T + AVG + $\text{Co}^{2+}$	19,8 $\pm$ 1,6 C	24,3 $\pm$ 1,6 B	1,6 $\pm$ 0,2 B	79,7 $\pm$ 4,5 D	95,7 $\pm$ 12,5 C	341,0 $\pm$ 36,7 C	4,2 $\pm$ 0,7 D	92,8 $\pm$ 5,8 C

**Tabela 2** Concentrações dos pigmentos fotossintéticos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF), em plantas de milho três dias após serem tratadas com água (Controle); AIA; 2,4-D; 2,4,5-T; AVG +  $\text{Co}^{2+}$ ; AIA + AVG +  $\text{Co}^{2+}$ ; 2,4-D + AVG +  $\text{Co}^{2+}$ ; 2,4,5-T + AVG +  $\text{Co}^{2+}$ . Os valores não apresentaram diferença estatística

Tratamento	Neoxantina	Violaxantina	Anteraxantina	Luteína	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a</i>	$\alpha$ Caroteno	$\beta$ Caroteno
Controle	29,6 $\pm$ 3,1	64,0 $\pm$ 4,0	5,6 $\pm$ 0,8	102,5 $\pm$ 10,4	185,1 $\pm$ 17,2	681,0 $\pm$ 55,3	0,5 $\pm$ 0,16	193,9 $\pm$ 11,6
AIA	48,3 $\pm$ 15,3	79,5 $\pm$ 21,9	9,5 $\pm$ 3,7	230,8 $\pm$ 63,4	292,3 $\pm$ 57,5	1150,2 $\pm$ 249,0	0,4 $\pm$ 0,24	274,4 $\pm$ 60,0
2,4-D	40,0 $\pm$ 9,0	66,2 $\pm$ 9,6	2,6 $\pm$ 0,5	127,6 $\pm$ 18,7	235,8 $\pm$ 25,0	930,4 $\pm$ 107,2	0,5 $\pm$ 0,14	196,1 $\pm$ 27,3
2,4,5-T	35,3 $\pm$ 7,4	62,9 $\pm$ 18,3	2,3 $\pm$ 0,4	130,2 $\pm$ 25,8	226,4 $\pm$ 36,4	857,4 $\pm$ 131,8	0,8 $\pm$ 0,38	197,3 $\pm$ 33,8
AVG + $\text{Co}^{2+}$	49,8 $\pm$ 1,8	73,0 $\pm$ 7,8	2,2 $\pm$ 0,7	144,3 $\pm$ 17,2	230,6 $\pm$ 23,7	902,7 $\pm$ 96,3	0,7 $\pm$ 0,29	235,1 $\pm$ 30,3
AIA + AVG + $\text{Co}^{2+}$	27,1 $\pm$ 1,2	52,1 $\pm$ 3,1	2,8 $\pm$ 1,1	95,5 $\pm$ 3,6	182,4 $\pm$ 13,3	678,9 $\pm$ 68,0	0,2 $\pm$ 0,07	171,8 $\pm$ 7,1
2,4-D + AVG + $\text{Co}^{2+}$	38,3 $\pm$ 6,8	64,3 $\pm$ 5,0	2,6 $\pm$ 0,7	123,3 $\pm$ 12,8	195,1 $\pm$ 29,8	780,5 $\pm$ 115,4	1,1 $\pm$ 0,63	197,9 $\pm$ 14,1
2,4,5-T + AVG + $\text{Co}^{2+}$	41,5 $\pm$ 11,5	70,4 $\pm$ 8,6	2,7 $\pm$ 0,6	119,6 $\pm$ 14,8	226,0 $\pm$ 45,7	821,3 $\pm$ 146,5	1,0 $\pm$ 0,38	194,7 $\pm$ 21,6