

FRANK JAMES ARAÚJO PINHEIRO

**QUEBRA DA DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Stylosanthes*
humilis H.B.K. POR COMPOSTOS SELÊNICOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título de
“Doctor Scientiae”**

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

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

T

P654q
2004

Pinheiro, Frank James Araújo, 1960-
Quebra da dormência de sementes de
Stylosanthes humilis H.B.K. por compostos selênicos
/ Frank James Araújo Pinheiro. – Viçosa : UFV, 2004.
86. : il. ; 29cm

Inclui anexo

Orientador: Raimundo Santos Barros
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

Referências bibliográficas: f. 74-82

1. Semente – Dormência. 2. Semente – Efeito dos compostos selênicos. 3. Fisiologia vegetal.
4. *Stylosanthes humilis*. I Universidade Federal de Viçosa. II. Título

CDD 20.ed. 581.1

FRANK JAMES ARAÚJO PINHEIRO

**QUEBRA DA DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Stylosanthes*
humilis H.B.K. POR COMPOSTOS SELÊNICOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título de
“Doctor Scientiae”**

APROVADA: 29 de janeiro de 2004

Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro

Prof. Maurílio Alves Moreira

Prof^ª. Rosane Maria de Aguiar Euclides

Prof. Raimundo Santos Barros

(Orientador)

A minha família

Isabel Cristina Leão Pinheiro (esposa) e
Carolina Leão Pinheiro e Filipe Leão Pinheiro (filhos)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, irmãos e demais familiares, pelo carinho e incentivo.

À minha esposa Isabel Cristina Leão Pinheiro, pela incondicional ajuda.

À Universidade Federal de Roraima (UFRR), pela oportunidade de aperfeiçoamento e à Universidade Federal de Viçosa (UFV), que proporcionou os meios para a realização do curso de Pós-Graduação.

À Capes-PICDT, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Raimundo Santos Barros, pela compreensão e pelos ensinamentos.

Aos Professores do Depto de Biologia Vegetal e outros Deptos relacionados ao curso de Fisiologia Vegetal - UFV, e em especial, Paulo Roberto Mosquim, Rolf Puschmann e Fernando Luíz Finger, pela amizade e ensinamentos.

Aos Professores Simone Maria de Moraes (Depto de Matemática) e Paulo Roberto Cecon (Depto de informática) da UFV, pelos ensinamentos.

Aos amigos do curso, pelo convívio e colaboração.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e ajuda e, em especial, Claudinéia Regina Pelacani, Dimas Mendes Ribeiro, Alberto Moura de Castro, Elaine Cristina Cabrini e Ana Maria Mapeli.

Aos estudantes de Iniciação Científica Gustavo Augusto Moreira Guimarães e Tales Graciano Coelho, pela amizade e ajuda.

Aos servidores do Depto de Biologia Vegetal da UFV e, em especial, Reginaldo Custódio dos Santos, José Maria Soares, José Antônio das Graças Cornélio, Oswaldo dos Santos Filho, Elizabeth Alves Pena, Geraldo João da Silva, Carlos Raimundo Alves de Souza, Maria Mercês de Souza Gomes, Antônio Teixeira Cordeiro, José Antônio Bhering e Rita de Cássia da Silva.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Frank James Araújo Pinheiro, filho de Leontino Mesquita Pinheiro e Ivanir Araújo Pinheiro, nasceu em Boa Vista, Estado de Roraima, no dia 30 de abril de 1960. Formado como Técnico em Edificações pela Escola Técnica Federal do Amazonas, período 1977 – 1979, Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Goiás, período 1982 - 1986, e Licenciado em Ciências (habilitação em Física) pela Universidade Federal de Goiás, período 1982 – 1986. Coursou Licenciatura Plena de formação especial do Currículo do 2º Grau – Esquema I, pela Universidade Federal do Amazonas, período 1989 – 1990. Especializou-se em Educação, na área de Ciências Biológicas, pelo convênio firmado entre o Governo do Território Federal de Roraima e a Universidade Federal do Ceará, período 1987 – 1989. Coursou o Mestrado em Biologia, na área de Ciências Fisiológicas, pela Universidade Federal de Goiás, período 1992 – 1994. Em 2000, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

PINHEIRO, Frank James Araújo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, Janeiro de 2004. **Quebra da dormência de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. por compostos selênicos.** Orientador: Raimundo Santos Barros. Conselheiros: Fernando Luíz Finger e Rolf Puschmann

A quebra da dormência fisiológica de sementes de estilosante (*Stylosanthes humilis* H.B.K.), leguminosa tropical forrageira de ciclo anual, foi promovida por diversos compostos selênicos. A exposição das sementes dormentes escarificadas aos compostos selênicos em solução, por 18 h, foi suficiente para a promoção de germinação ótima. Sob exposição prolongada das sementes ao selênio, ocorreu redução da germinação, sugerindo a ocorrência de danos ao embrião. Observou-se um atraso de aproximadamente 18 h para o início do processo germinativo estimulado pelos compostos selênicos, em relação às sementes não-dormentes. Nas sementes tratadas, a germinação se completou com 36 h de incubação. A germinação estimulada por Se foi inibida pelos inibidores da biossíntese de etileno aminoetoxivinilglicina, Co^{2+} e ácido abscísico e, também, por Ag^+ , inibidor da ação do regulador. Os efeitos inibitórios dos bloqueadores da biossíntese do etileno foram revertidos pelo ácido 2-cloroetilfosfônico ou pelo ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC). A inibição provocada por Ag^+ foi revertida por solução de HCl de baixo pH. O tratamento das sementes dormentes com os compostos selênicos também provocou aumento da produção de etileno, em níveis semelhantes aos de sementes não-dormentes, correlacionando-se com o aumento da germinação. Níveis altos de ACC livre foram observados em sementes dormentes tratadas com Se. Os picos de produção de ACC livre coincidiram com a ocorrência das maiores taxas de produção de etileno. O K_m aparente da oxidase do ACC *in vitro*, de 75 mmol m^{-3} de ACC, e o K_m aparente *in vivo*, de 44 mmol m^{-3} de ACC, mostraram-se compatíveis com os da literatura. A atividade da oxidase do ACC foi inibida *in vitro* por ácido α -aminoisobutírico, ácido salicílico, ácido acetil-salicílico e *n*-propil galato e, *in vivo*, por Co^{2+} e *n*-propil galato. O Se fez aumentar a atividade da oxidase do ACC *in vitro*, correlacionando-se também com o aumento da germinação.

ABSTRACT

PINHEIRO, Frank James Araújo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, January 2004. **Dormancy breakage in seeds of *Stylosantes humilis* H.B.K. by selenium compounds.** Adviser: Raimundo Santos Barros. Advisory Committee: Fernando Luíz Finger and Rolf Puschmann

Dormancy breakage in response to several selenium compounds was observed in seeds of Townsville stylo (*Stylosanthes humilis* H.B.K.), an annual tropical forage legume. Exposure of seeds to solutions of those compounds for 18 h sufficed to attaining an optimal germination percentage. Prolonged exposures led to decreases in germination indicating the occurrence of damages to seed embryos. A delay of 18 h for the onset of germination occurred in treated seeds in relation to untreated non-dormant seeds. The germination process of treated seeds took about 36 h incubation time to complete. Se-stimulated germination was blocked by the inhibitors of ethylene biosynthesis 2-aminoethoxyvinylglycine (AVG), Co^{2+} and abscisic acid (ABA) and by Ag^+ , an inhibitor of ethylene action. The inhibitory effects of AVG were reverted by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), and those of Co^{2+} and ABA by 2-chloroethylphosphonic acid; inhibition by Ag^+ was reverted by low pH HCl solutions. Selenium compounds induced a large increase in ethylene production in dormant seeds that was comparable to the amounts emanated from non-dormant seeds, and which showed correlated to the increase in their germination. High amounts of free ACC were found in Se-treated seeds, their peaks occurring simultaneously with the highest rates of ethylene emanation. *In vitro* apparent K_m 75 mmol m^{-3} ACC and *in vivo* apparent K_m 44 mmol m^{-3} ACC for ACC oxidase were within the range found in the literature. *In vitro* activity of ACC oxidase was inhibited by α -aminoisobutyric acid, salicylic and acetylsalicylic acids and n-propyl gallate. Inhibition *in vivo* was observed with Co^{2+} and n-propyl gallate. Selenium compounds also caused increases in ACC oxidase activity *in vitro* wich were accompanied by increases in ethylene production and germination.

CONTEÚDO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Quebra da dormência de sementes pelo etileno	1
1.2	Inibição da síntese e da ação do etileno.....	2
1.3	Selênio em plantas	2
1.4	Metabolismo do selênio	3
1.5	Selênio e germinação de sementes	4
1.6	Inter-relações entre selênio e produção de etileno	5
1.7	Biossíntese de etileno	6
2	OBJETIVOS	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1	Condições de cultivo e ensaios de germinação	7
3.2	Quebra da dormência por compostos selênicos	7
3.3	Tempo de exposição a soluções de compostos selênicos	8
3.4	Técnicas de troca das soluções de compostos selênicos pela solução-controle	8
3.5	Toxicidade dos compostos selênicos	8
3.6	Cinética da germinação das sementes	9
3.7	Inibição da síntese e da ação do etileno	9
3.8	Reversão da ação dos inibidores em relação ao efeito dos compostos selênicos	9
3.9	Quantificação do etileno	10
3.10	Quantificação do ACC	11
3.11	Atividade da oxidase do ACC	12
3.12	Inibição da atividade da oxidase do ACC	14
3.13	Delineamento experimental	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1	Efeito dos compostos selênicos na quebra da dormência	16
4.2	Efeito do tempo de exposição das sementes aos compostos selênicos	19
4.3	Efeito das técnicas de troca da solução-teste	21
4.4	Toxicidade dos compostos selênicos sobre a germinação e sobrevivência das sementes	23
4.5	Cinética de germinação das sementes	25
4.6	Efeito dos inibidores da síntese e da ação do etileno em relação aos compostos	

selênicos	28
4.7 Reversão do efeito dos inibidores	31
4.8 Produção de etileno por sementes de estilosante	34
4.9 Efeito dos compostos selênicos na produção de etileno	35
4.10 Produção de etileno por sementes dormentes estimuladas por seleno-L-metionina e seleno-DL-etionina	40
4.11 Níveis de ACC livre em relação à germinação de sementes dormentes expostas aos compostos selênicos	42
4.12 Níveis de ACC conjugado e total em sementes dormentes expostas aos compostos selênicos	46
4.13 Caracterização da atividade da oxidase do ACC <i>in vitro</i>	49
4.14 Cinética da oxidase do ACC <i>in vitro</i>	55
4.15 Inibição da atividade da oxidase do ACC <i>in vitro</i>	56
4.16 Cinética da oxidase do ACC <i>in vivo</i>	59
4.17 Efeito de inibidores da atividade da oxidase do ACC sobre a produção de etileno <i>in vivo</i>	60
4.18 Efeito do ACC na solução de germinação sobre a atividade da oxidase do ACC <i>in vitro</i>	62
4.19 Efeito do tempo de exposição ao ACC na solução de germinação sobre a atividade da oxidase do ACC <i>in vitro</i>	64
4.20 Atividade da oxidase do ACC <i>in vitro</i> em sementes dormentes tratadas com compostos selênicos	65
4.21 Atividade <i>in vivo</i> da oxidase do ACC em sementes dormentes tratadas com compostos selênicos	70
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

Leguminosa tropical de ciclo anual, o estilosante (*Stylosanthes humilis* H.B.K.) destaca-se como importante espécie na formação de pastagens (Mott *et al* 1976, Thomas e Sumberg 1995). O gênero *Stylosanthes* (Leguminosae-Papilionoidea) é originário de regiões tropicais da América do Sul e Central, onde mostra ampla distribuição geográfica e extensa variabilidade genética. Como planta forrageira, foi inicialmente introduzida na Austrália, país de desenvolvimento das primeiras cultivares de *S. guianensis* e *S. humilis* (Hopkinson e Walker 1984). No Brasil, pode ser encontrado nas regiões central e nordeste (Lovato *et al* 1994), escapando das estações secas pela dormência de suas sementes (Lovato *et al* 1999). Adapta-se bem aos solos de baixa fertilidade e baixo pH, como os do Cerrado (Carvalho *et al* 1988).

A germinação das sementes de estilosante é regulada por dois mecanismos, um de natureza tegumentar e outro de dormência fisiológica, estratégias que garantem a sobrevivência da espécie, impedindo a germinação quando as condições de crescimento da plântula são desfavoráveis (Argel e Humpreys 1983). A barreira tegumentar dificulta a entrada de gases e água no embrião (Gardener 1975), e pode ser quebrada facilmente por escarificação física ou química das sementes (Araújo *et al* 2000). A dormência fisiológica das sementes de estilosante é muito acentuada logo após sua maturação e vai sendo perdida gradualmente, até tornarem-se completamente germináveis, em torno de 12 a 15 meses após a colheita (Vieira e Barros 1994).

1.1 Quebra da dormência de sementes pelo etileno

A dormência de sementes de algumas espécies pode ser quebrada pelo etileno, como em amendoim (*Arachis hypogea*) var Virgínia (Ketring e Morgan 1970) e var Natal Comum (Whitehead e Nelson 1992), alface (*Lactuca sativa*) var Grang Rapids (Abeles 1986), *Amaranthus caudatus* L. (Kępczyński 1986), *Chenopodium album* (Machabée e Saini 1991) e *Cyclopia* spp. (Whitehead e Sutcliffe 1995). As sementes dessas espécies germinam quando adquirem a capacidade de sintetizar o etileno ou quando submetidas a tratamentos que, possivelmente, também aumentem sua sensibilidade ao regulador (Whitehead e Sutcliffe 1995).

A dormência fisiológica das sementes de estilosante é quebrada por condições de estresse como altas temperaturas (Holm 1973), metais pesados, como cádmio, zinco e cobre (Delatorre e Barros 1996), tiouréia em elevadas concentrações (Burin *et al* 1987), e baixo pH do meio de germinação (Frigeri 1998, Pelacani 2001). Com os resultados de manipulação dos compostos ácido 2-cloroetilfosfônico (Ethrel, que libera etileno no meio celular) e benziladenina (BA), aplicados combinados ou separadamente, Burin *et al* (1987) e Vieira e Barros (1994) sugeriram que uma citocinina e o etileno seriam necessários para quebrar a dormência de sementes de estilosante. O ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), precursor imediato do etileno

em sua rota biossintética, também quebra parcialmente a dormência (Barros e Delatorre 1998). Íons prata, antagonistas da ação do etileno (Knee 1992), bloqueiam a germinação de sementes não-dormentes (Vieira e Barros 1994, Delatorre *et al* 1997). Em conjunto, esses fatos sugerem que a promoção da germinação de sementes de estilosante ocorre via estímulo da produção de etileno. Assim, sementes recém-colhidas de estilosante provavelmente não germinam pela falta ou baixa capacidade de produção de etileno, como também acontece com *Amaranthus caudatus* (Kępczyński e Kępczyńska 1997).

1.2 Inibição da síntese e da ação do etileno

O estímulo à germinação em sementes não-dormentes é bloqueado por inibidores que afetam a biossíntese e a ação fisiológica do etileno. Inibidores como aminoetoxivinilglicina (AVG) (Kępczyński 1986) e ácido aminooxiacético (AOA) (Sinska e Gladon 1989), que inibem a atividade da sintase do ACC (EC 4.4.1.14), e Co^{2+} (Gallardo *et al* 1994, Vieira e Barros 1994), Zn^{2+} (De Rueda *et al* 1995) e ácido α -amino-isobutírico (AMIB) (Satoh e Esashi 1980, Frigeri 1998), que inibem a atividade da oxidase do ACC (EC 1.4.3), são bons indicadores para inferir-se se a quebra da dormência e a germinação de sementes ocorrem em função da biossíntese de etileno. A ação fisiológica do etileno é inibida por 2,5-norbornadieno (Wang e Woodson 1989, Kępczyński e Kępczyńska 1997, Whitehead e Sutcliffe 1995) e 1-metilciclopropeno (Sisler e Serek 1997), possivelmente por se ligarem a sítios receptores de etileno (Kluge *et al* 2002), exercendo uma ação competitiva com o regulador, e também por Ag^+ (Abeles 1986), que bloqueiam a ligação do etileno aos seus receptores (Abeles *et al* 1992). Mas o mecanismo de inibição não é conhecido; os íons prata poderiam estar agindo mediante uma substituição dos íons cobre nos sítios de ligação do etileno do receptor transmembrânico ETR do etileno (Srivastava 2002). Em sementes dormentes de estilosante, Ag^+ inibiu a germinação estimulada por Ethrel (Vieira e Barros 1994), por metais pesados (Delatorre e Barros 1996) e por soluções de baixos pH(s) (Frigeri 1998, Pelacani 2001), indicando o requerimento do etileno na quebra da dormência das sementes dessa leguminosa.

1.3 Selênio em plantas

A seleno-metionina provocou a quebra da dormência de sementes de estilosante (Barros e Freitas 2000, 2001), possivelmente por desencadear a biossíntese de etileno, devido às condições de estresse promovidas pelo seleno-aminoácido, uma vez que condições de estresse estimulam a biossíntese de etileno em plantas (Yang e Hoffman 1984, Morgan e Drew 1997). Os seleno-aminoácidos seleno-etionina e seleno-metionina foram mais eficientes do que a própria

metionina em estimular a produção de etileno em tecidos florais de *Ipomoea tricolor* Cav (Konze *et al* 1978), devido ao aumento de sua biossíntese (Konze e Kende 1979), possivelmente por servirem também como precursores do etileno (Konze *et al* 1978).

As plantas diferem muito na sua habilidade em acumular selênio em seus tecidos (Virupaksha e Shrift 1965, Shrift 1969). Certas plantas são capazes de hiperacumular selênio na parte aérea, quando crescem em solos seleníferos. Essas plantas são acumuladoras de selênio e incluem espécies dos gêneros *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oonopsis* e *Xylorhiza*, e podem acumular centenas a milhares de miligramas de selênio kg^{-1} de massa seca (MS) nos tecidos. Por outro lado, muitas forrageiras e outras plantas cultivadas, principalmente gramíneas, acumulam menos de 25 mg selênio kg^{-1} MS, não exibindo mais que 100 mg de selênio kg^{-1} MS, quando cultivadas em solos seleníferos. Por isso, são chamadas não-acumuladoras de selênio. Plantas cultivadas crescidas em solos não-seleníferos exibem níveis de selênio entre 0,01 e 1 mg de selênio kg^{-1} MS. Embora as espécies acumuladoras de selênio sejam adaptadas a solos seleníferos, nem todas as espécies de plantas que vivem nesses solos são acumuladoras de selênio. Algumas acumulam somente poucos miligramas de selênio kg^{-1} MS. Por exemplo, no gênero *Astragalus*, espécies acumuladoras e não-acumuladoras podem crescer próximas umas das outras. Em solos seleníferos, por exemplo, *Astragalus bisulcatus* exibiu 5530, *Stanleya pinnata* 1190, *Atriplex nuttallii* 300 e gramíneas 23 mg de selênio kg^{-1} MS (Terry *et al* 2000).

1.4 Metabolismo do selênio

Embora o selênio não seja um nutriente essencial às plantas superiores, seleno-aminoácidos, seleno-proteínas e outros compostos selênicos, em algumas espécies, são encontrados em grandes quantidades (Welch *et al* 1991) e oferecem proteção contra a herbivoria por largatas e infecção por fungos (Hanson *et al* 2003), mas nenhuma função essencial do selênio em plantas foi ainda identificada. Em animais, a essencialidade do selênio, em quantidades traço, é bem estabelecida (Stadman 1990, Terry *et al* 2000). Nas células animais, o selênio contribui com quatro átomos para a formação da molécula da peroxidase da glutatona (GSH-Px) (Miller *et al* 1991). A enzima é amplamente distribuída, no reino animal e protege as membranas celulares contra danos peroxidativos (Whanger *et al* 1977, Stadman 1979), destruindo os peróxidos (H_2O_2) e hidroperóxidos, no citossol e na matriz mitocondrial (Miller *et al* 1991). No reino vegetal, a atividade da GSH-Px foi detectada em poucas espécies (Smith e Shrift 1979).

O selênio só passou a despertar interesse científico após a descoberta de seus efeitos tóxicos, mas, atualmente, é reconhecido como um micronutriente essencial para mamíferos, pássaros e várias bactérias. Entre as diversas doenças causadas pela deficiência nutricional de

selênio em animais, destaca-se a distrofia muscular, conhecida como doença do músculo branco, que atinge carneiros e bezerros jovens (Stadman 1979), frequente em regiões de alta pluviosidade da Nova Zelândia, onde a quantidade de selênio nas plantas forrageiras é baixa e está correlacionada com o baixo conteúdo do elemento no solo (Whanger *et al* 1977).

As plantas acumuladoras de selênio possuem um mecanismo diferente de discriminação do substrato na fase de ativação do seleno-aminoácido (Burnell 1981). Durante a síntese protéica, as células das plantas acumuladoras excluem o seleno-aminoácido de seus polipeptídeos (Brown e Shrift 1981), por um processo que impede a síntese ou provoca uma modificação do seleno-aminoácido, bloqueando sua incorporação em proteínas (Eustice *et al* 1981b). A acumulação do selênio também pode se dar por compartimentalização dentro do vacúolo (Neuhierl e Böck 1996), como selenato, ou na forma de seleno-aminoácido não-protéico (Läuchli 1993, Terry *et al* 2000). O mecanismo usado pelas plantas acumuladoras para tolerar altas quantidades de selênio em seus tecidos é impedir a incorporação de seleno-aminoácidos em proteínas. Esse mecanismo não pode ser usado pelas plantas não-acumuladoras, pois não possuem um sistema enzimático capaz de discriminar os aminoácidos que possuem selênio (Neuhierl *et al* 1999). Por isso, podem incorporar grandes quantidades de seleno-aminoácidos em proteínas, o que resulta em toxicidade (Burnell 1981). Poderia ocorrer também um decréscimo na formação da ligação peptídica, que resultaria em diminuição da síntese de proteína (Eustice *et al* 1981a).

Os principais seleno-aminoácidos incorporados em proteínas são seleno-cisteína e seleno-metionina, em substituição à cisteína e à metionina, respectivamente. As diferenças em tamanho e propriedades de ionização do enxofre e selênio podem produzir alterações significativas na estrutura das proteínas, reduzindo assim sua atividade (Läuchli 1993). A ligação entre dois átomos de selênio é aproximadamente um sétimo maior e um quinto mais fraca do que a ligação dissulfídica, além de poder interferir na formação de pontes dissulfídicas, resultando em uma leve, mas significativa alteração, na estrutura terciária das S-proteínas, levando a efeitos negativos sobre sua atividade catalítica (Terry *et al* 2000).

1.5 Selênio e germinação de sementes

Os efeitos do selênio sobre a germinação foram estudados em sementes de *Vigna radiata* e revelaram-se benéficos sobre o crescimento e a atividade metabólica de enzimas hidrolíticas, quando as sementes foram expostas ao elemento em nível de 0,75 ppm (Lalitha e Easwari 1995). Na leguminosa *Trigonella foenum-graecum*, selenito de sódio a 0,5 ppm também fez aumentar a atividade das enzimas β -galactosidase e β -glicosidase, mas em nível de 1,0 ppm foi levemente

tóxico para o crescimento das plântulas e reduziu a atividade das duas enzimas em 60 % (Sreekala e Lalitha 1998). Por outro lado, o selênio não estimulou a germinação de sementes de repolho (*Brassica oleracea* var *capitata*), alface, rabanete (*Raphanus sativus* var *radícula* Perzoon), duas variedades de sorgo (*Sorghum vulgare sudanense* Hitchc vars Dub-L-Graze e Sugar-Graze) e trigo (*Triticum aestivum* var Caldwell), tratadas com selenato ou selenito de sódio até a concentração de 405 mmol m^{-3} selênio, em pH 5,0. O crescimento inicial da radícula foi dependente da espécie da planta, da forma do selênio e da concentração aplicada (Carlson *et al* 1989). A embebição das sementes de duas cultivares de cabaça-amarga (*Momordica charantia*) cvs Special Six e Moon Shine em solução de selenito de sódio ($0,01 \text{ mol m}^{-3}$), mantidas sob temperatura sub-ótimas ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), fez restaurar o poder germinativo das sementes (Chen e Sung 2001).

1.6 Inter-relações entre selênio e produção de etileno

Seleno-aminoácidos, *n*-propil galato, 1,4-diazobicyclo(2,2,2)octano e vitamina E, por serem extintores de oxigênio singlete e inibirem a peroxidação de lipídios, são considerados protetores da célula (Tappel 1965, Ouannès e Wilson 1968, Mattoo *et al* 1986). Como extintor dos radicais livres, a seleno-metionina protege as membranas celulares internas contra o ataque de agentes peroxidativos, ao mesmo tempo que inibe a produção de etileno induzida por íons cobre na planta aquática *Spirodela oligorrhiza* (Mattoo *et al* 1986, 1992). Contrariamente, quando discos foliares de fumo (*Nicotiana tabacum* ‘Xanthi’) submetidos ao tratamento com CuSO_4 (Mattoo *et al* 1992), segmentos estiolados de hastes de ervilha (*Pisum sativum* L. ‘Alaska’) tratados com auxina (Konze *et al* 1978), e tecidos senescentes de botão floral de *Ipomoea tricolor* ‘Heavenly Blue’ (Konze e Kende 1979), foram incubados com seleno-metionina e, observou-se a biossíntese de etileno, via rota do ACC (Mattoo *et al* 1992).

Considerando-se que o etileno pode ser produzido a partir da peroxidação de lipídios, pela formação de radicais livres, o emprego de extintores de radicais livres, como seleno-metionina, pode auxiliar na identificação da rota biossintética do etileno em plantas. Na germinação de sementes, por exemplo, o selênio possivelmente atue desencadeando a biossíntese de etileno (Jones e Kende 1979). A adição de inibidores da biossíntese ou da ação do etileno impediu a germinação em sementes dormentes de estilosante tratadas com seleno-metionina (Barros e Freitas 2000, 2001). Assim, o emprego de seleno-metionina e de outros compostos selênicos torna-se um bom instrumento para avaliarem-se os efeitos do selênio na quebra da dormência de sementes de estilosante.

1.7 Biossíntese de etileno

Existem evidências (Osborne 1984, Abeles *et al* 1992) de que, em alguns grupos de plantas, tais como pteridófitas e gimnospermas e, principalmente em espécies não-vasculares e menos evoluídas, como as briófitas, opere uma rota de biossíntese do etileno, na qual o ACC não seria convertido em etileno, cujo mecanismo é desconhecido e diferente da rota ocorrente nas plantas superiores (Hyodo e Uritani 1984, Osborne *et al* 1996).

Exceto nas plantas nas quais parece ter ocorrido perda da enzima oxidase do ACC ao longo do processo evolutivo, todas as plantas terrestres produzem e respondem ao etileno com mudanças definidas no crescimento e desenvolvimento (John 1997). O etileno é rapidamente sintetizado a partir de uma ampla variedade de precursores, especialmente durante a ruptura de estruturas celulares, possivelmente agindo nos mecanismos de defesa da planta. Isso sugere que sua ação, como regulador biológico, teve origem nos primórdios da evolução das plantas terrestres em resposta aos sinais de estresse, pois é rapidamente difundido e está associado à desintegração celular (John 1997, Reynolds e John 2000).

Nas plantas vasculares, opera uma rota biosintética em que a enzima sintase do ACC desempenha um papel central e regulatório na produção do ACC, intermediário e precursor imediato do etileno (Flur e Mattoo 1996). O etileno é derivado do aminoácido metionina, que é convertido para *S*-adenosil-L-metionina (SAM), por ação da sintase do SAM (EC 2.5.1.6) que, por sua vez, é convertido em ACC, pela ação da sintase do ACC (Yang e Hoffman 1984, Kende 1993). A etapa final da biossíntese do etileno em plantas superiores se dá via conversão do ACC em etileno, catalisada pela enzima constitutiva oxidase do ACC.

A seleno-metionina foi mais eficiente em estimular a biossíntese de etileno, em tecidos florais de *Ipomoea tricolor* Cav, do que a metionina, possivelmente por servir como precursor do etileno de forma mais eficiente que o seu precursor natural (Konze *et al* 1978). O estímulo da biossíntese de etileno pode também resultar de condições de estresse, como ocorre em plantas de tomate e abóbora expostas a sais em altas concentrações (Morgan e Drew 1997), e sementes de alface, que produzem grande quantidade de etileno e apresentam maior germinação quando expostas a condições de estresse osmótico (Prusinski e Khan 1990). Em sementes de estilosante, a germinação estimulada por seleno-metionina provavelmente dispara a biossíntese de etileno (Barros e Freitas 2001), restando saber se esse fenômeno pode também ocorrer em resposta a outros compostos selênicos e o modo de atuação desses compostos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho objetivou investigar a ação de compostos selênicos sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, examinando-se suas inter-relações com a rota biosintética do etileno, via produção de ACC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo e ensaios de germinação

Plantas de estilosante foram cultivadas continuamente em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (20° 45' S e 42° 52' W, 648 m de altitude), Minas Gerais, Brasil, em vasos plásticos com capacidade de 3,5 dm³, contendo duas partes de solo tipo latossolo vermelho amarelo, uma parte de areia e uma parte de esterco bovino curtido. A adubação foi de 0,5 g vaso⁻¹ de N-P-K (25-5-20), aplicados por cobertura em três parcelas, durante o ciclo de vida da planta. A irrigação foi feita diariamente, de forma a manter-se o solo próximo à capacidade de campo. Por ser o estilosante espécie de dia curto (Cameron e 't Mannetje 1977), nos meses de dezembro a março, as plantas foram cobertas com empanada preta, reduzindo-se, assim, o fotoperíodo para oito horas diárias, para promoção da indução floral. Os frutos eram coletados periodicamente, levados para o laboratório e armazenados em sacos de papel até a execução dos ensaios. Dessa forma, sementes de diferentes idades, isto é, com diferentes graus de dormência, encontravam-se sempre disponíveis.

Para a realização dos ensaios, os frutos foram previamente debulhados, por fricção entre duas superfícies emborrachadas e, em seguida, as sementes eram escarificadas por leve fricção entre duas lixas d'água nº 150. Após escarificação, as sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio 0,5 %, por 10 min, e lavadas exaustivamente com água destilada.

As substâncias testadas foram dissolvidas em solução de HCl-KOH, 10 mol m⁻³, pH 7, contendo Tween 80 0,05 %. As sementes eram infiltradas com as soluções-teste (10 cm³), pela aplicação de vácuo, por um período de 4 min, seguido de um intervalo de 3 min, sem vácuo, e de mais 3 min de vácuo (Vieira e Barros 1994). Após infiltração, as sementes, juntamente com as soluções-teste, eram transferidas para placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo ao fundo dois discos de papel de filtro Whatman nº 1; este conjunto era previamente semi-esterelizado em estufa, a 105 °C, por 4 h. As placas de Petri, contendo as sementes e as respectivas soluções-teste, eram mantidas no escuro, em câmara de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA), a 30 °C (Burin *et al* 1987), por um período de cinco dias, durante o qual era registrado, diariamente, o número de sementes germinadas. A semente era considerada germinada quando apresentava protrusão radicular.

3.2 Quebra da dormência por compostos selênicos

A quebra da dormência por compostos selênicos foi realizada expondo-se sementes dormentes de estilosante a soluções dos seguintes compostos: selenato de sódio (Na₂SeO₄), selenito de sódio (Na₂SeO₃), ácido selênico (H₂SeO₄), ácido selenoso (H₂SeO₃), selenouréia

($\text{CH}_4\text{N}_2\text{Se}$), seleno-DL-metionina (ou seleno-L-metionina - $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$), tetracloreto de selênio (SeCl_4) e dióxido de selênio (SeO_2), variando-se a concentração inicialmente da ordem de 10 vezes, na faixa de 0 a 10 mol m^{-3} . Determinada a concentração de cada composto que proporcionou maior germinação, testaram-se níveis maiores e menores em torno do nível selecionado. A concentração, de cada composto selênico que promoveu maior quebra da dormência fisiológica das sementes foi considerada ótima e selecionada para os trabalhos seguintes. As duas formas de seleno-metionina, seleno-DL-metionina e seleno-L-metionina, não mostraram diferenças na promoção da germinação de sementes dormente e, como havia maior disponibilidade da segunda, a maioria dos experimentos foi realizada com ela.

3.3 Tempo de exposição a soluções de compostos selênicos

Para determinar-se o tempo mínimo de exposição necessário para promover-se a quebra da dormência, as sementes dormentes foram expostas às soluções-teste dos compostos selênicos, nas concentrações ótimas, pelos períodos de 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 120 h. No tratamento-controle não houve imersão das sementes nas soluções de compostos selênicos, enquanto o tratamento 0 h consistiu apenas de rápida imersão na solução-teste. Após cada período de exposição, as sementes foram transferidas para solução-controle, reinfiltradas e colocadas em outra placa de Petri com nova solução-controle, e levadas novamente para o germinador até o final do experimento.

3.4 Técnicas de troca das soluções de compostos selênicos pela solução-controle

Determinado o melhor tempo de exposição aos compostos selênicos, foram testadas três técnicas de troca da solução-teste de compostos selênicos pela solução-controle: A - lavagem, reinfiltração e transferência das sementes tratadas para solução-controle, em outra placa de Petri; B - somente transferência das sementes para solução-controle, em outra placa; C - remoção das soluções de compostos selênicos e adição de solução-controle na mesma placa. No controle sem composto selênico não foi feita troca de solução.

3.5 Toxicidade dos compostos selênicos

A toxicidade dos compostos selênicos sobre a germinação foi avaliada expondo-se sementes dormentes às soluções-teste por períodos de 0, 6, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 h. Após cada período de exposição, as sementes foram transferidas para solução-controle, seguindo-se a técnica A de troca da solução (item 3.4), e permaneceram incubadas até o quinto dia na solução-controle. Em seguida, as soluções das placas foram removidas, adicionando-se solução de

tiouréia (TU, 100 mol m^{-3}), continuando a incubação por mais 24 h. A vitalidade das sementes não-germinadas foi determinada considerando-se a germinação após exposição à tiouréia.

3.6 Cinética da germinação das sementes

A cinética de germinação de sementes foi determinada em sementes dormentes e não-dormentes, acompanhando-se a germinação a intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 h e, posteriormente, nos horários de 36, 48, 72, 96 e 120 h. As sementes dormentes foram expostas às soluções-teste dos compostos selênicos (nos níveis ótimos por 18 h, com troca pela técnica A), e também às soluções de Ethrel (ET) mais benziladenina (BA), às concentração de $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, enquanto as sementes não-dormentes foram expostas apenas à solução-controle. Foram ajustadas curvas que descrevem a germinação acumulada ao longo do tempo, utilizando-se de um programa computacional (Calbo *et al* 1989), da qual foram estimadas as respectivas derivadas primeiras, determinando-se, assim, as taxas de germinação sob cada tratamento.

3.7 Inibição da síntese e da ação do etileno

Para verificar-se uma possível relação entre a quebra da dormência de sementes de estilozante provocada por soluções de compostos selênicos e o efeito do etileno, sementes dormentes foram expostas a soluções de selênio contendo alguns inibidores da biossíntese e da ação do etileno. Os inibidores da biossíntese utilizados foram: íons cobalto ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ $1,0 \text{ mol m}^{-3}$) (Gallardo *et al* 1994) e aminoetoxivinilglicina (AVG $0,1 \text{ mol m}^{-3}$) (Barbiker *et al* 1994) e o ácido abscísico (AAB $0,01 \text{ mol m}^{-3}$) (Kępczyński 1986). A inibição da ação fisiológica do etileno foi investigada com Ag^+ ($0,5 \text{ mol m}^{-3}$) (Knee 1992), fornecido na forma de tiosulfato de prata, preparado em solução no sistema $\text{HNO}_3\text{-KOH}$ (pH 7,0), no momento de utilização, misturando-se quatro partes de tiosulfato de sódio com uma de nitrato de prata (Reid *et al* 1980). Como controle, as sementes foram germinadas nas soluções de compostos selênicos sem inibidor.

Os ensaios foram conduzidos expondo-se as sementes dormentes às soluções de compostos selênicos mais o inibidor por 18 h, quando foi feita a troca da solução, transferindo-se as sementes para nova placa de Petri, contendo solução pura do inibidor, onde permaneceram incubadas, com contagem diária da germinação, até o quinto dia. Em seguida foi feita a substituição da solução do inibidor por TU, continuando a incubação e a contagem por mais dois dias, para avaliar-se a vitalidade das sementes.

3.8 Reversão da ação dos inibidores em relação ao efeito dos compostos selênicos

Para tentar-se reverter os efeitos dos inibidores da biossíntese e da ação do etileno, sementes dormentes foram tratadas simultaneamente com as soluções dos compostos selênicos

mais os inibidores por 18 h. Ao final desse período, foi feita a troca da solução, transferindo-se as sementes para nova placa contendo uma mistura do inibidor mais o reverter. Para reverter-se o efeito de Ag^+ , as sementes foram transferidas para solução de HCl (10 mol m^{-3} , pH 2,0), numa tentativa de precipitar-se a prata (Pelacani 2001). A germinação foi registrada até o quinto dia, fazendo-se contagem diária.

Quanto à reversão do efeito dos inibidores da biossíntese do etileno, a de Co^{2+} foi feita com solução de Ethrel (ET $0,1 \text{ mol m}^{-3}$) e a de AVG com solução de ACC ($1,0 \text{ mol m}^{-3}$) (Barros e Freitas 2001). Para reverter-se o efeito do AAB, usou-se ET. Como controle, as sementes foram germinadas nas soluções-teste de selênio sem inibidor.

3.9 Quantificação do etileno

A quantificação do etileno emanado pelas sementes foi efetuada segundo metodologia descrita por Whitehead e Nelson (1992), com pequenas modificações. Lotes de 25 sementes foram infiltrados nas soluções-teste ($2,0 \text{ cm}^3$) e incubados em frascos Erlenmeyer de vidro (25 cm^3), contendo ao fundo, dois discos de papel de filtro Whatman nº 1. O conjunto frasco mais papel era previamente semi-esterelizado em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$, por 4 h. Os frascos selados foram mantidos no escuro, em câmara de crescimento noite/dia (Forma Scientific Inc, Ohio, USA), a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A cada horário de 3, 6, 12, 15, 18, 24, 36, 48 e 72 h a atmosfera interna dos frascos era homogeneizada, utilizando-se de uma seringa de $3,0 \text{ cm}^3$, provida de agulha longa, e retirada uma amostra de $1,0 \text{ cm}^3$ da atmosfera dos frascos, utilizando-se agora de seringas descartáveis *ultra-fine* (agulhas 29 G $\frac{1}{2}$ "). Após a retirada da amostra, era feita a contagem das sementes germinadas e os frascos eram exauridos sob ventilação forçada, em capela, durante 15 min. Nos experimentos com compostos selênicos, em que o etileno não era produzido durante as primeiras 12 h de incubação, os frascos permaneceram abertos, quando foram exauridos e selados. A primeira coleta de amostra gasosa ocorreu seis horas após o fechamento, ou seja, com 18 h de incubação, momento em que também foi feita a troca da solução-teste por solução-controle. Os frascos foram novamente selados para a segunda retirada com 24 h de incubação, repetindo-se as operações de homogeneização, retirada da amostra, exaustão e novo selamento dos frascos nos horários das coletas seguintes. Foram mantidas amostras paralelas para a determinação da massa fresca, a cada horário de coleta da amostra gasosa do período experimental.

As amostras gasosas foram injetadas em cromatógrafo a gás (Hewlett-Packard 5890, série II, USA), equipado com detetor de ionização de chama, e coluna de aço inoxidável ($1,0 \text{ m} \times 6,0 \text{ mm}$), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o dinitrogênio, com 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 °C, respectivamente. A quantificação do etileno foi feita pela comparação das áreas dos picos das amostras obtidas em integrador (Hewlett-Packard 3395, USA) acoplado ao cromatógrafo, com áreas de picos de mistura do padrão de etileno de concentração conhecida.

Aos dados de acúmulo de etileno emanado foram ajustadas curvas que descreveram a emissão acumulada de etileno ao longo do tempo (Calbo *et al* 1989) e, por derivada primeira, foram determinadas as taxas de produção de etileno pelas sementes.

3.10 Quantificação do ACC

O ACC nas sementes foi quantificado segundo metodologia descrita por Gallardo *et al* (1991), com pequenas modificações. Amostras de 250 sementes foram infiltradas com soluções-teste de compostos selênicos ou solução-controle e incubadas em placas de Petri (150 mm de diâmetro), contendo ao fundo dois discos de papel de filtro Whatman nº 1; esse conjunto era previamente semi-esterilizado em estufa, a 105 °C, por 4 h. As placas de Petri, contendo as sementes e as respectivas soluções, eram mantidas no escuro, em câmara de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA), a 30 °C, pelos períodos de 0, 6, 12, 15, 18, 24, 36, 48, e 72 h. Para os ensaios com duração maior que 18 h, as soluções dos compostos selênicos eram trocadas por solução-controle, após aquele tempo de incubação (ver item 3.4). Ao final de cada período, as sementes eram lavadas exaustivamente em água destilada, tiveram determinadas suas massas frescas, e foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a -20 °C. Foram mantidas, também, amostras paralelas de 50 sementes para a determinação da germinação. A extração foi feita triturando-se as amostras em almofariz com pistilo em 10 cm³ de etanol (80 %), mais polivinil-pirrolidona (PVP 5 % m/v), durante 20 min. O extrato foi filtrado em papel de filtro, centrifugado a 28000 g, por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante submetido à evaporação em evaporador rotativo, a 45 °C. O resíduo foi suspenso em 4,0 cm³ de água destilada (extrato original). Metade do extrato original foi utilizado para quantificar-se o ACC livre.

O ACC foi quantificado por conversão química para etileno, seguindo-se a técnica descrita por Lizada e Yang (1979), com eficiência de conversão variando de 73 a 93 %. Uma alíquota de 0,5 cm³ do extrato foi levada a reagir com 0,1 cm³ de cloreto de mercúrio (5,0 µmol), completando-se o volume de reação para 0,8 cm³, com água destilada. O tubo de ensaio contendo os reagentes foi vedado com selador de látex e mantido em banho de gelo. Uma alíquota de aproximadamente 0,2 cm³ de uma mistura resfriada de NaOCl (5 %) e NaOH saturado (v/v 2:1) foi injetada no tubo, o conteúdo foi agitado em vórtex, por 5,0 s, e incubado em banho de gelo por 2,5 min. Após nova agitação por 5,0 s, uma amostra gasosa de 1,0 cm³ da atmosfera do tubo foi retirada para quantificação do etileno.

A outra metade do extrato original foi usada para determinar-se a quantidade de ACC total (ACC livre + ACC conjugado, este possivelmente ácido 1-carboxílico-1-malonil-aminociclopropano - MACC, Mansour *et al* 1986). Após hidrólise ácida com HCl (2,0 N), a 100 °C, por 3,0 h, o extrato foi neutralizado com NaOH saturado e evaporado a 45 °C, até a secura. O resíduo foi ressuspensão em 3,0 cm³ de água destilada. A quantificação do ACC total seguiu os mesmos procedimentos para a quantificação do ACC livre (Lizada e Yang 1979). Pela diferença entre os conteúdos de ACC antes e após a hidrólise, foi determinada a quantidade de ACC conjugado no extrato.

3.11 Atividade da oxidase do ACC

Após inúmeras tentativas não se conseguiu determinar a atividade da sintase do ACC. Este estudo teve-se, portanto, à análise da atividade da oxidase do ACC. Esta foi determinada *in vivo* segundo a técnica descrita por De Rueda *et al* (1995), com pequenas modificações. Amostras de 25 sementes dormentes foram infiltradas com 2,0 cm³ de solução-teste e incubadas em frascos Erlenmeyer de 25 cm³. Amostras pares de sementes dormentes foram infiltradas com soluções-teste ou solução-controle e incubadas, mantendo-se os frascos abertos, por não haver produção de etileno durante as primeiras 18 h, de acordo com ensaios anteriores. Procedeu-se, então, a troca da solução e frasco, transferindo-se as amostras pares das sementes tratadas com selênio para solução-controle ou solução de ACC (1,0 mol m⁻³). Os frascos permaneceram abertos até 27 h para garantir-se uma alta produção de etileno, quando, então, foram exauridos e selados até 33 h de incubação. Nesse momento, foi feita a coleta da amostra gasosa da atmosfera dos frascos e, também determinada a massa fresca das sementes. Os frascos foram mantidos no escuro, em câmaras de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA) a 32 °C. O etileno formado, durante o período de selamento, foi analisado em cromatógrafo a gás, conforme descrito no item 3.9. Dezoito horas após o início dos tratamentos com sementes dormentes, iniciou-se o tratamento com sementes não-dormentes, incubando-se-as com solução-controle ou solução de ACC. Foram então submetidas aos mesmos passos que as sementes não-dormentes.

No estudo da cinética enzimática *in vivo*, as sementes dormentes foram incubadas em soluções de ACC (0,0 - 2,0 mol m⁻³), inicialmente com os frascos abertos durante 8,75 h, após o que foram exauridos durante 15 min e selados, permanecendo assim por mais 6 h, completando-se assim 15 h de incubação. Após a homogeneização da atmosfera interna dos frascos, foi retirada a primeira amostra gasosa (em testes anteriores foi detectada grande produção de etileno nesse período de incubação). Após a primeira coleta de amostras, os frascos permaneceram novamente abertos por mais 2,75 h, quando foram exauridos durante 15 min e selados por mais 6 h, para a segunda coleta de amostras, agora com um total de 24 h de incubação, quando a

produção de etileno mostrou-se máxima. Foram mantidas amostras de sementes paralelas, em cada tratamento, para a determinação da massa fresca. No período em que os frascos permaneceram selados para coleta das amostras, as massas frescas foram determinadas para um tempo médio de 12 h (9 a 15 h) e de 21 h (18 a 24 h) de incubação.

A atividade *in vitro* foi ensaiada segundo a técnica descrita por Fernández-Maculet e Yang (1992), com algumas modificações. Amostras de 250 sementes eram infiltradas nas soluções-teste ou solução-controle, incubadas em placa de Petri (150 mm de diâmetro), contendo ao fundo dois discos de papel de filtro Whatman nº 1. Esse conjunto era previamente semi-esterelizado em estufa, a 105 °C, por 4 h. As placas de Petri, contendo as sementes e as respectivas soluções, eram mantidas no escuro, em câmara de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA), a 30 °C. Para os ensaios de atividade das sementes tratadas com compostos selênicos, elas foram incubadas pelos períodos de 0, 12, 18, 24, 36, 48 e 72 h, fazendo-se a troca das soluções-teste por solução-controle, após 18 h de incubação. Ao final de cada período, as sementes eram lavadas exaustivamente em água destilada, tinham determinadas suas massas frescas, e eram imersas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. As amostras eram maceradas em almofariz com pistilo resfriados e todo o procedimento conduzido sob banho de gelo. A amostra era extraída com 6,0 cm³ do meio de extração, constituído de Tris-HCl 100 mol m⁻³ pH 7,0; glicerol 10 % (v/v); ditioneitol (DTT) 1,0 mol m⁻³; ascorbato de sódio 30 mol m⁻³; Triton X-100 (0,1 % v/v); e PVP 5% (m/v). O homogenado foi filtrado em quatro camadas de tecido musselina e centrifugado a 28000 g, por 20 min, a 4 °C, e 2,0 cm³ do sobrenadante (extrato enzimático) foram aplicados em uma coluna PD-10 (Pharmacia), contendo Sephadex G-25, previamente equilibrado com o meio de reação menos ACC (ver abaixo), para a dessalinização. Descartaram-se os primeiros 0,5 cm³, recolhendo-se 4,0 cm³ seguintes do eluato contendo a enzima, o que foi previamente determinado por análise das frações, para uso nos ensaios de atividade enzimática.

A reação enzimática era iniciada pela adição de uma alíquota de 0,2 cm³ do extrato dessalinizado, em tubo de ensaio selado, incubado por 2 h, a 32 °C, em um volume de reação de 2,0 cm³, constituído de Tris-HCl 100 mol m⁻³, pH 7,0; glicerol 10 % (v/v); ascorbato de sódio 30 mol m⁻³; FeSO₄ 50 mmol m⁻³; NaHCO₃ 30 mol m⁻³; DTT 1,0 mol m⁻³; e ACC 1,0 mol m⁻³ (Fernández-Maculet e Yang 1992). Decorrido o tempo de reação, uma amostra de 1,0 cm³ do gás da atmosfera interna do tubo era analisada para quantificação do etileno. Cada repetição da amostra foi analisada em duplicata. Em amostras sem o extrato enzimático ou com o extrato fervido não foi detectada a formação de etileno. A proteína no extrato enzimático foi determinada de acordo com Bradford (1976).

3.12 Inibição da atividade da oxidase do ACC

Para a inibição da atividade da oxidase do ACC *in vivo*, amostras de 25 sementes foram infiltradas na solução-controle ou solução dos inibidores Co^{2+} e *n*-propil galato (*n*-PG) e incubadas em 2,0 cm³ das respectivas soluções, em frascos Erlenmeyer de 25 cm³. Os frascos foram mantidos abertos no escuro em câmaras de crescimento noite/dia (Forma Scientific, Inc, Ohio, USA) a 32 °C, durante 24 h. Em seguida foi feita a troca da solução dos inibidores por solução-controle, solução de ACC ou solução de mistura conjunta do inibidor mais ACC. Os frascos contendo as sementes permaneceram abertos, por mais 9 h, período de baixa produção de etileno, avaliado anteriormente. Foram então, exauridos sob ventilação forçada em capela, durante 15 min e, selados para novo período de incubação até 15 h, quando foi feita a primeira retirada de amostras. Em seguida, os frascos foram novamente abertos e assim permaneceram até 18 h, para que o próximo período de acúmulo de etileno fosse de 6 h. Procedeu-se então, nova exaustão e selamento até 24 h, efetuando-se a segunda retirada de amostra gasosa na produção máxima de etileno. Foram mantidas amostras paralelas de cada tratamento, para a determinação da massa fresca no período de acúmulo de etileno, com os frascos selados, tomando-se os tempos médios de 12 h (9 a 15 h) e de 21 h (18 a 24 h), após a aplicação do ACC. Os efeitos da inibição foram avaliados pela diminuição da produção de etileno, em relação ao controle com ACC e sem o inibidor.

Os ensaios de inibição da atividade da oxidase do ACC *in vitro* foram realizados adicionando-se uma alíquota de 0,2 cm³ dos inibidores na mistura de reação. Em seguida, foi feita a incubação da mistura de reação, contendo extrato enzimático mais inibidor, a 32 °C, por ser a temperatura ótima para determinar-se a atividade da enzima, conforme item 3.11. Os inibidores testados foram α -amino-isobutírico (AMIB 0 a 100 mol m⁻³), ácido salicílico (AS 0 a 10 mol m⁻³), ácido acetil-salicílico (AAS 0 a 10 mol m⁻³) e *n*-PG (0 a 1,0 mol m⁻³). A inibição foi avaliada pela diminuição da produção de etileno durante o período de reação, em relação ao etileno formado no extrato do controle, sem inibidor.

3.13 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado. Os experimentos de germinação de sementes tiveram a unidade experimental composta por 50 sementes por placa de Petri, com cinco repetições por tratamento. As porcentagens de germinação foram transformadas em arco-seno $(\%G/100)^{1/2}$, para serem submetidas ao tratamento estatístico (Steel *et al* 1997), e as diferenças de médias entre tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scot & Knott (1974), em nível de 5 % de significância.

Os experimentos sobre quantificação do etileno emanado das sementes e sobre atividade enzimática *in vivo* tiveram a unidade experimental constituída de um frasco Erlenmeyer de 25 cm³ selado com 25 sementes, com 10 repetições por tratamento. As diferenças de média entre tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey, em nível de 5 % de significância.

Para os experimentos de quantificação do ACC e de atividade enzimática *in vitro*, os delineamentos experimentais também foram inteiramente casualizados e as unidades experimentais compostas de amostras do extrato de 250 sementes com no mínimo quatro repetições por tratamento. As diferenças de tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey com 5 % de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos compostos selênicos na quebra da dormência

Todos os compostos selênicos empregados, com exposição continuada das sementes durante cinco dias, foram eficientes na quebra da dormência, promovendo a germinação. Mediante esse primeiro experimento foi escolhida, para cada composto selênico, a concentração que melhor promoveu a germinação (Fig 1). A seleno-DL-metionina foi o composto que melhor promoveu a quebra da dormência, levando a uma germinação de 80 %, mas sob uma concentração muito elevada (10 mol m^{-3}).

Em um segundo experimento, sob intervalos mais estreitos de concentração em torno da mais eficaz, observaram-se diferenças significativas na promoção da germinação devido à pequena variação da concentração de todos os compostos (Fig 2). A seleno-metionina, no nível de $1,0 \text{ mol m}^{-3}$, já havia sido testada por Barros e Freitas (2000, 2001), em sementes de estilosante, com resultados semelhantes ao deste experimento. No nível mais alto (10 mol m^{-3}) de seleno-DL-metionina, usado nestes dois primeiros experimentos, repetiram-se os resultados, e a porcentagem de germinação determinada foi semelhante ao nível de $2,5 \text{ mol m}^{-3}$ usado por Barros e Freitas (2000, 2001). Aumentos de concentração em quase todos os compostos selênicos mostraram-se correlacionados com a elevação da porcentagem de germinação até certos níveis, a partir dos quais houve estabilização (tetracloro de selênio e dióxido de selênio) ou inibição da germinação, com exceção da seleno-DL-metionina em que a germinação foi sempre crescente até o nível mais alto testado (Fig 2). Esses efeitos de aumento da germinação seguidos de queda, com o aumento da concentração também foram observados com o Zn^{2+} (Delatorre e Barros 1996) e NaCl (Lovato *et al* 1994).

À exceção da seleno-DL-metionina, cujo emprego de 10 mol m^{-3} levaria a um consumo muito alto, resultando em custos elevados, trabalhando-se, a partir daí com a concentração de $1,0 \text{ mol m}^{-3}$, para os demais compostos, o critério de escolha da concentração foi o de promoção da maior germinação (Fig 2). Os compostos selenato de sódio e selenito de sódio foram os mais eficientes em promover quebra da dormência, com germinação superior a 60 %, enquanto os demais promoveram germinação em torno de 40 %. Os seguintes níveis ótimos para a quebra da dormência das sementes foram selecionados para os trabalhos posteriores: selenato de sódio - $2,0 \text{ mol m}^{-3}$; selenito de sódio - $0,2 \text{ mol m}^{-3}$; ácido selênico - $1,0 \text{ mol m}^{-3}$; ácido selenoso - $0,6 \text{ mol m}^{-3}$; selenouréia - $1,0 \text{ mol m}^{-3}$; tetracloro de selênio - $0,2 \text{ mol m}^{-3}$; dióxido de selênio - $0,2 \text{ mol m}^{-3}$ e, pelas razões já explicadas, foi selecionado para seleno-L-metionina $1,0 \text{ mol m}^{-3}$.

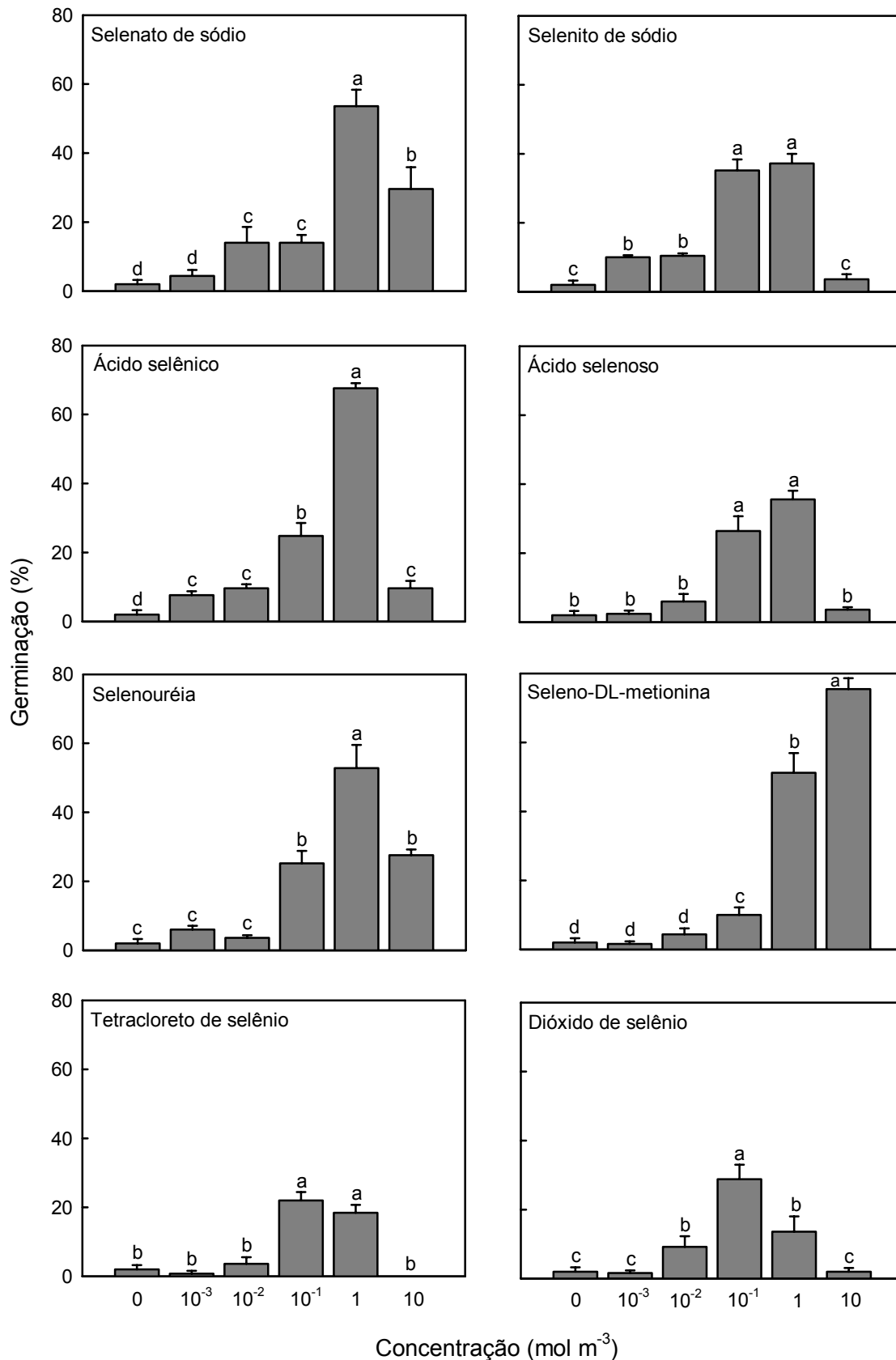


Figura 1 - Efeito de compostos selênicos sobre a germinação de sementes dormentes de estilosante, de 15 dias de idade pós-colheita, sem troca da solução-teste por solução-controle. Média de 5 repetições \pm erro da média. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

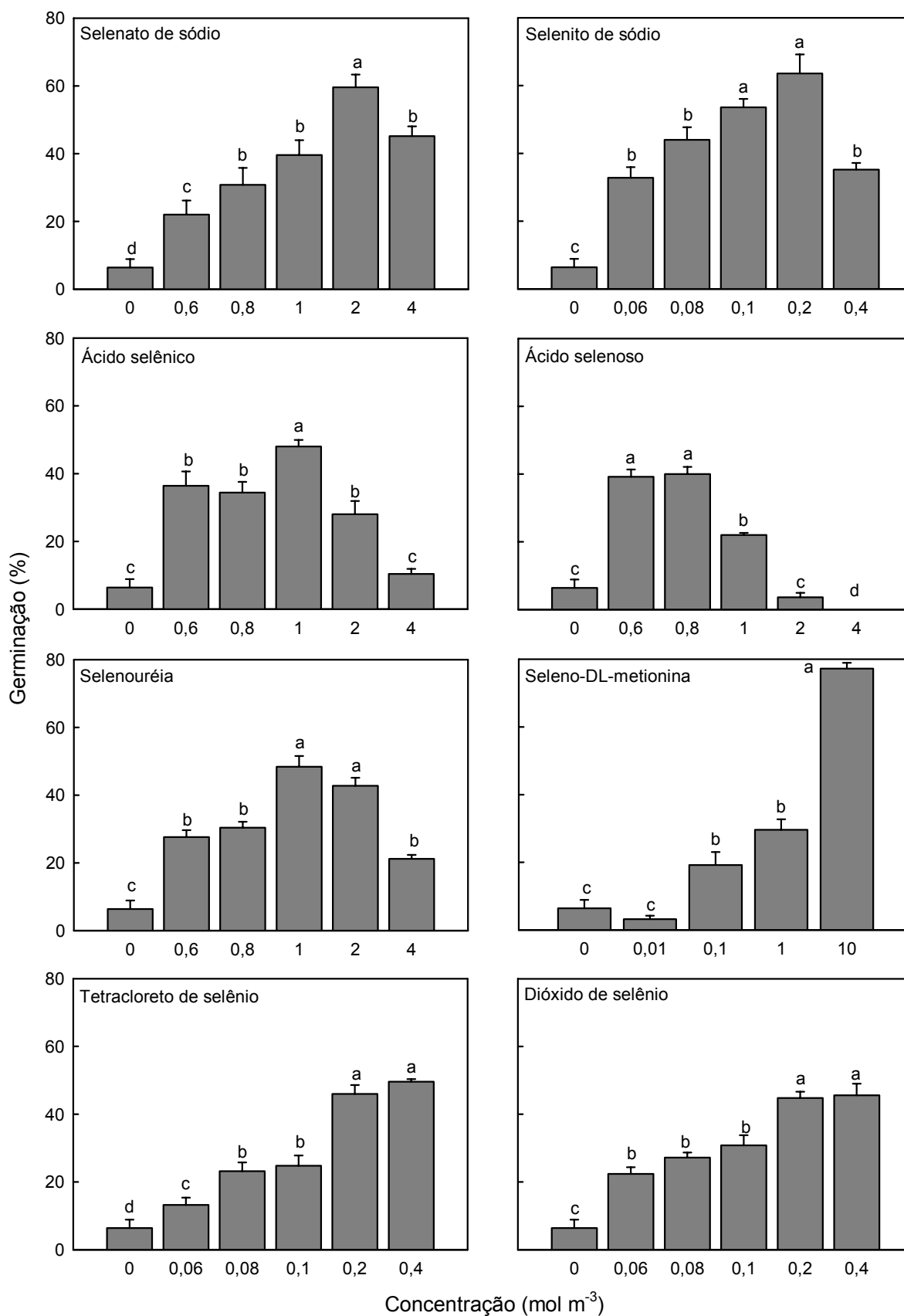


Figura 2 - Efeito de compostos selênicos sobre a germinação de sementes dormentes de estilosate, de 40 dias de idade pós-colheita, sem troca da solução-teste por solução-controle. Média de 5 repetições \pm erro da média. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

A concentração ótima do selenito de sódio usada em sementes de estilosante foi a metade da concentração máxima utilizada por Carlson *et al* (1989), tentando quebrar a dormência de sementes de alfaca. Quanto ao selenato de sódio, a concentração ótima empregada neste trabalho foi cinco vezes maior que a usada por aqueles autores, que não conseguiram promover a germinação de alfaca e de várias outras espécies, usando compostos selênicos. Essas espécies possivelmente possuem mecanismos de estímulo à germinação diferentes do de estilosante, que tem a dormência quebrada quando as sementes são expostas à condição estressante provocada por metais pesados, possivelmente por desencadear a biossíntese de etileno (Delatorre e Barros 1996). Em outras espécies como *Vigna radiata*, quando as sementes foram expostas ao selênio em nível de 0,75 ppm, houve aumento de germinação (Lalitha e Easwari 1995). Em sementes de *Trigonella foenum-graecum*, tratadas com selenito de sódio 0,5 ppm, houve aumento da atividade de enzimas hidrolíticas, o que favoreceu a germinação (Sreekala e Lalitha 1998).

O selênio não é um nutriente essencial para plantas superiores, mas em algumas espécies vegetais seleno-aminoácidos, seleno-proteínas e outros compostos selênicos são encontrados em grandes quantidades, sendo considerado um elemento benéfico para os vegetais (Welch *et al* 1991, Terry *et al* 2000). Mas a faixa de concentração compreendendo os efeitos benéficos e tóxicos é muito estreita; selênio (1,0 ppm) mostrou-se levemente tóxico para o crescimento de plântulas de *Trigonella foenum-graecum* e reduziu a atividade de enzimas hidrolíticas em 60 % (Sreekala e Lalitha 1998).

4.2 Efeito do tempo de exposição das sementes aos compostos selênicos

Considerando-se que o selênio pode ser tóxico e, portanto, pode levar a uma diminuição na germinação, estimou-se então o efeito do tempo de exposição das sementes aos compostos selênicos. A exposição das sementes aos compostos selênicos por somente 18 h proporcionou melhores resultados na germinação (Fig 3). As porcentagens máximas de germinação, ao fim de cinco dias foram: selenouréia - 95,2 %, dióxido de selênio - 88,4 %, tetracloreto de selênio - 86,4 %, ácido selênico - 86,0 %, ácido selenoso - 86,0 %, selenato de sódio - 83,2 %, selenito de sódio - 81,6 %, com exceção da seleno-L-metionina - 56,8 %, na qual a germinação não foi a máxima. A adoção do procedimento de expor as sementes dormentes aos compostos selênicos por somente 18 h, fazendo-se em seguida uma lavagem, reinfiltando e transferindo-se-as para outra placa com solução-controle, resultou em um aumento médio da germinação de 80 %, considerando-se todos os oito compostos selênicos, quando não se efetuou a troca de solução.

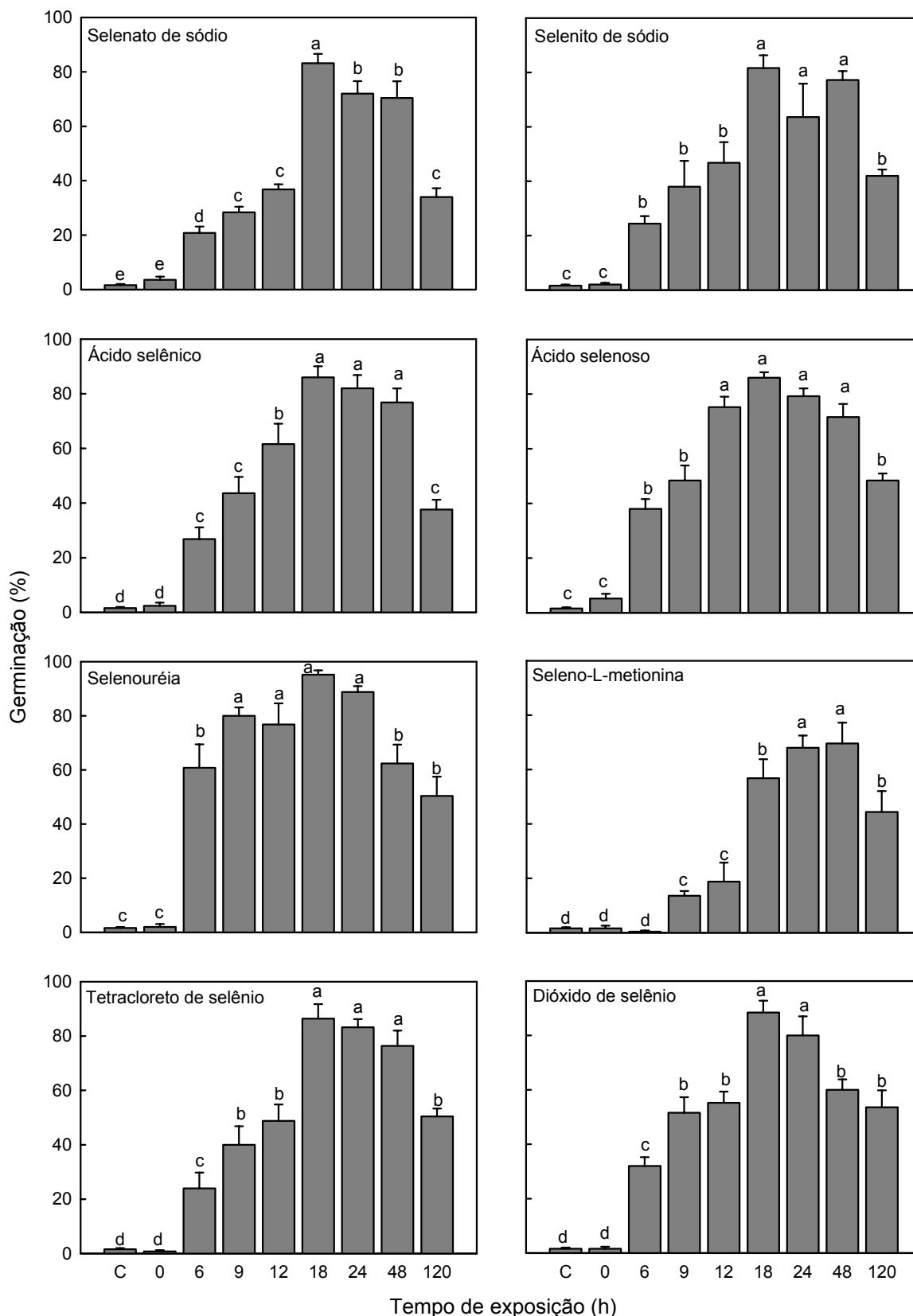


Figura 3 - Efeito do tempo de exposição aos compostos selênicos sobre a germinação de sementes dormentes de estilante, de 60 dias de idade pós-colheita. Após a exposição as sementes foram transferidas para solução-controle, C - sem imersão na solução-teste e 0 com rápida imersão seguida de lavagem. Média de 5 repetições \pm erro da média. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

Esse aumento da germinação variou de 28 % para o selenito de sódio a 119 % para o ácido selenoso. Assim, a retirada do excesso de selênio após o recebimento do estímulo para a quebra

da dormência mostrou-se benéfica ao processo germinativo. Efeitos benéficos na germinação por curta exposição a selenito de sódio $0,01 \text{ mol m}^{-3}$ também foram observados em cultivares Special Six e Moon Shine de cabaça-amarga, sob a temperatura sub-ótima $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o que levaria à recuperação do poder germinativo das sementes dessas cultivares, pela simples embebição das sementes com solução daquele composto (Chen e Sung 2001). Em estilosante, a exposição por somente 12 h a soluções de baixo pH seria suficiente para quebrar a dormência das sementes. Portanto, o estímulo para quebrar a dormência ocorreu nos momentos iniciais de exposição ao agente estimulante (Pelacani 2001).

Com a seleno-L-metionina os tempos de exposição de 24 e 48 h foram melhores em promover a germinação que o tempo de 18 h (Fig 3), o que pode ser justificado por não haver-se empregado a concentração ótima (Fig 1 e 2). Isso não implica que a exposição por 18 h não tenha sido significativa na quebra da dormência das sementes e aumento da germinação, pois a germinação nesse caso aumentou em aproximadamente 20 %, em relação ao sistema sem troca de solução. Sob quase todos os outros compostos não houve diferença significativa nos efeitos dos tempos de 18 h e 24 h; pela Fig 3, no entanto, verifica-se que, de forma geral, o tempo de exposição de 18 h foi o melhor.

4.3 Efeito das técnicas de troca da solução-teste

Para avaliar-se o efeito da troca da solução-teste por solução-controle, após a exposição aos compostos selênicos, foram testadas três técnicas de troca da solução, denominadas A, B e C, descritas no item 3.4. A que proporcionou maior germinação como resultado dos tratamentos com todos os compostos selênicos foi a técnica A, que consistiu em fazer-se uma lavagem, reinfiltração e transferência das sementes para solução-controle contida em outra placa de Petri (Fig 4). Essa técnica de troca da solução passou a ser adotada nos experimentos posteriores. Basicamente, a superioridade dessa técnica deveu-se a realização de nova infiltração com a solução-controle, que, provavelmente, não continha resíduos de selênio. A exposição das sementes dormentes aos compostos selênicos por 18 h resultou num estímulo capaz de promover a germinação, talvez por criação de condições de estresse, o que desencadearia a biossíntese de etileno (Jones e Kende 1979). A exposição, no entanto não pode ser muito prolongada porque

provavelmente, afetaria a síntese protéica impedindo a formação de ligações peptídicas nas regiões meristemáticas do embrião (Eustice *et al* 1981a).

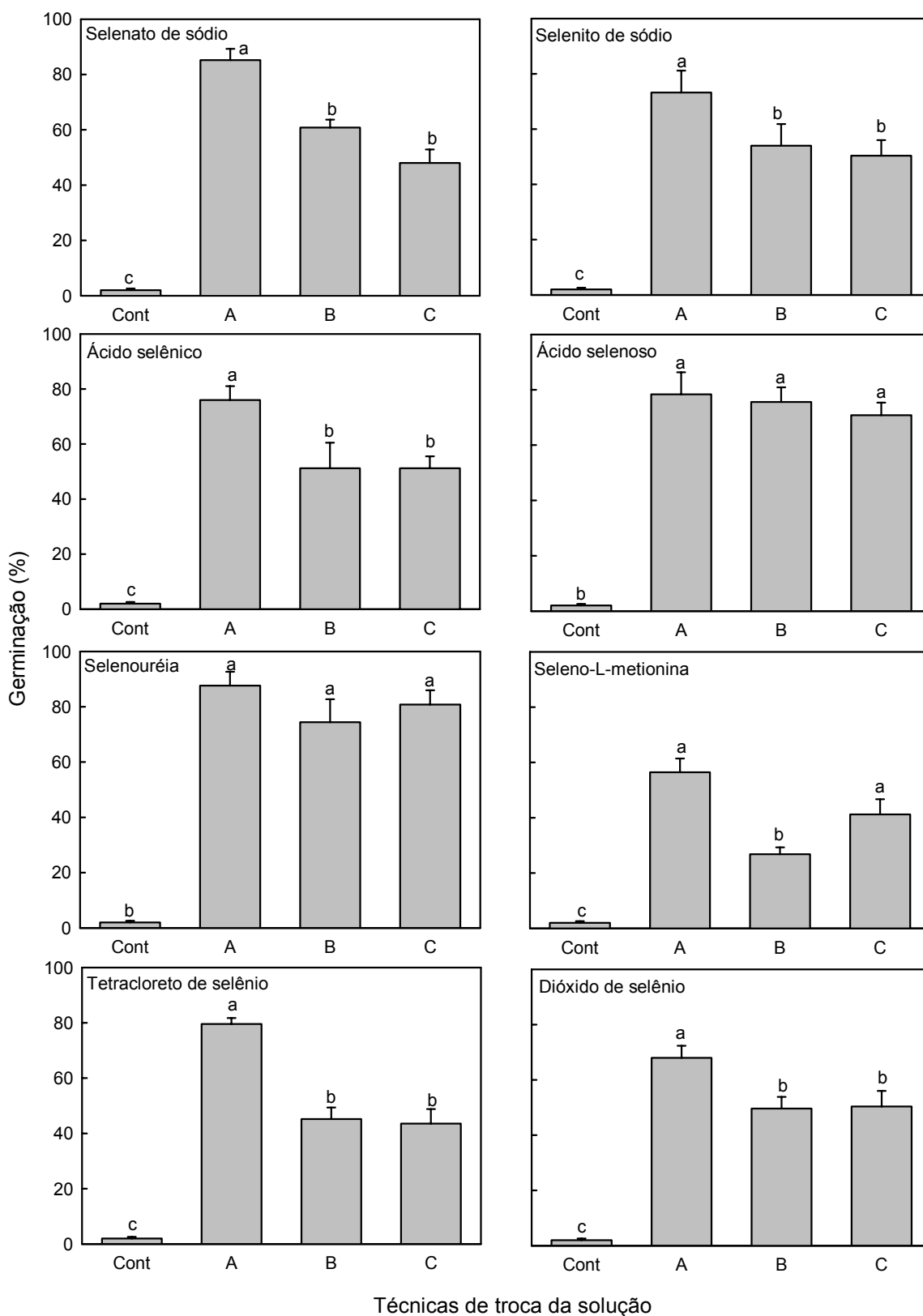


Figura 4 - Efeito das técnicas de troca das soluções-teste pela solução-controlada, após 18 h de exposição aos compostos selênicos, na germinação de sementes dormentes de estilosante, de 60 dias de idade pós-colheita. A - Lavagem, reinfusão e transferência das sementes para solução-controlada em outra placa; B - Transferência das sementes para solução-controlada, em outra placa; C

- Remoção das soluções-teste e adição de solução-controle, na mesma placa. Média de 5 repetições \pm erro da média. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

4.4 Toxicidade dos compostos selênicos sobre a germinação e sobrevivência das sementes

Sob tempos de exposição das sementes maiores que 24 h, praticamente todos aos compostos selênicos causaram redução da germinação. Somente a seleno-L-metionina continuou estimulando a germinação até 72 h, situação talvez explicada pelo emprego de concentração inferior à ótima, permitindo maior tempo de exposição, sem causar toxidez. Com os compostos selênicos que promoveram diminuição da germinação a partir de 24 h, isso poderia ser devido a uma consequência da morte do embrião, ou, simplesmente a uma inibição da germinação. Esse aspecto foi examinado determinando-se a sobrevivência das sementes, pela aplicação de TU, após o tratamento com os compostos selênicos, no quinto dia de incubação (Delatorre *et al* 1997).

A vitalidade das sementes (germinação sob os compostos selênicos + germinação sob TU) começou a ser afetada, de forma quase generalizada, a partir de 72 h de exposição, agravando-se sob tempos maiores de exposição (Fig 5). Esses resultados confirmam que os compostos selênicos mostraram-se tóxicos com efeitos crescentes com o tempo de exposição, levando à morte das sementes.

No geral, o ácido selenoso mostrou-se mais tóxico, promovendo diminuição acentuada da germinação total sob tempos superiores a 48 h, e uma maior mortandade das sementes, enquanto o ácido selênico mostrou-se o menos tóxico. O principal fator responsável pela toxicidade do selênio seria sua incorporação em moléculas em substituição ao enxofre, dada a semelhança entre os dois átomos, de forma que o selênio interfere no metabolismo do enxofre, principalmente em condições de deficiência de sulfato (Zayed e Terry 1992). Em geral, sob tratamentos em que o meio contém altos teores de sulfato, o selenito de sódio parece mais tóxico que o selenato de sódio e, sob baixo teor de sulfato, ocorreria o contrário (Severi 2001). No presente trabalho, sob exposição de 72, 96 e 120 h, o selenato de sódio mostrou-se mais tóxico que selenito de sódio, provocando uma mortandade 8,3 % maior (Fig 5). Sob 120 h de exposição, todos os compostos causaram diminuição significativa na germinação total, como resultado da toxidez ao embrião, impedindo a germinação.

As plantas absorvem selênio principalmente como selenato, selenito ou compostos orgânicos de selênio. As formas orgânicas de selênio podem ser melhores absorvidas pelas plantas do que as formas inorgânicas (Williams e Mayland 1992). As diferenças em tamanho e propriedades de ionização do enxofre e selênio podem levar a significantes alterações na estrutura das proteínas, reduzindo assim sua atividade (Läuchli 1993).

Em experimentos para determinarem-se os efeitos tóxicos do selenato de sódio e do selenito de sódio na planta aquática *Lemna minor* L, observou-se que o selênio pode causar destruição das células do mesofilo nessa planta, afetando a ultra-estrutura dos cloroplastos,

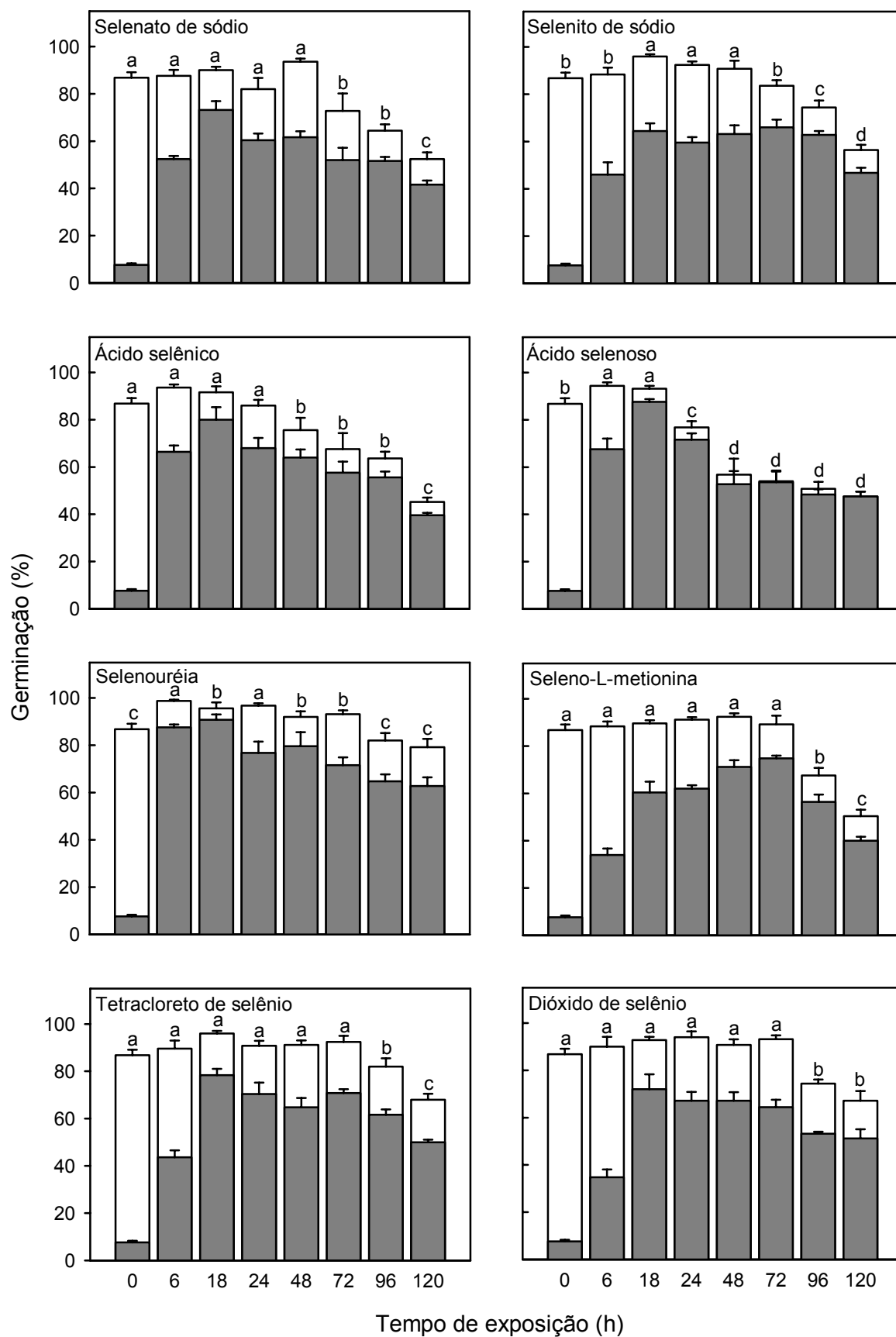


Figura 5 - Toxicidade dos compostos selênicos em sementes dormentes de estilosante, de 145 dias de idade pós-colheita. Germinação sob a solução-teste (■) e posterior tratamento com TU (□). Média de 5 repetições ± erro da média. Médias da germinação total seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

provocando um desarranjo do estroma e destruição da organização do sistema de lamelas e tilacóides. Sob concentrações elevadas, aqueles compostos provocaram total destruição dos plastídios, seguida da morte da célula (Severi 2001). Portanto, quando do emprego de compostos selênicos para promover-se a quebra da dormência de sementes de estilosante, a exposição das sementes não pode ser muito prolongada, requerendo-se apenas de um período capaz de disparar o estímulo, possivelmente a biossíntese de etileno (Barros e Freitas 2001).

4.5 Cinética de germinação das sementes

Para descrever-se o comportamento da germinação de sementes dormentes de estilosante expostas aos compostos selênicos, ajustaram-se as funções Gompertz que melhor descrevessem a cinética de germinação (Calbo *et al* 1989) (Fig 6.1). Isso possibilitou fazerem-se comparações entre germinação estimulada por compostos selênicos com a germinação de sementes dormentes e não-dormentes expostas à solução-controle e sementes dormentes expostas à solução conjunta de ET + BA ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$) (Fig 6.2). Das curvas de germinação integradas ao longo do tempo, foram estimadas as derivadas primeiras para a obtenção das taxas de germinação (Fig 6.1 e 6.2) (Causton 1983). E igualando-se a zero a derivada segunda, obtiveram-se os tempos correspondentes às taxas máximas, e quando houve estabilização da germinação, determinou-se o tempo de saturação da germinação (Tab 1).

A germinação estimulada por compostos selênicos ocorreu de forma sigmoideal, característica de germinação normal, e positivamente inclinada, em que a maioria das sementes germina na primeira metade do período de germinação (Bewley e Black 1994). Sob todos os compostos selênicos, a germinação iniciou-se após 12 h de incubação e só se completou por volta de 36 h (Fig 6.1), enquanto nas sementes dormentes tratadas com ET + BA e nas sementes não-dormentes (solução-controle), a germinação começou com 6 h e com 18 h já estava quase completa (Fig 6.2). Em termos de germinação acumulada, com exceção de seleno-L-metionina que promoveu germinação total das sementes em torno de apenas 40 %, os outros compostos selênicos estimularam germinação superior a 70 %. Os compostos selênicos quebraram a dormência das sementes, mas o tempo para iniciar a germinação e atingir a o ponto máximo da germinação foi maior do que o tempo requerido pelas sementes não-dormentes ou quando as sementes dormentes foram tratadas com ET + BA.

O atraso na germinação das sementes dormentes tratadas com selênio, em relação às sementes não-dormentes ou dormentes tratadas com ET + BA, deve ter resultado dos processos de absorção dos compostos selênicos, do transporte até atingirem a célula alvo para disparar a biossíntese de etileno ou, ainda, de uma possível metabolização dos compostos. Uma vez superadas

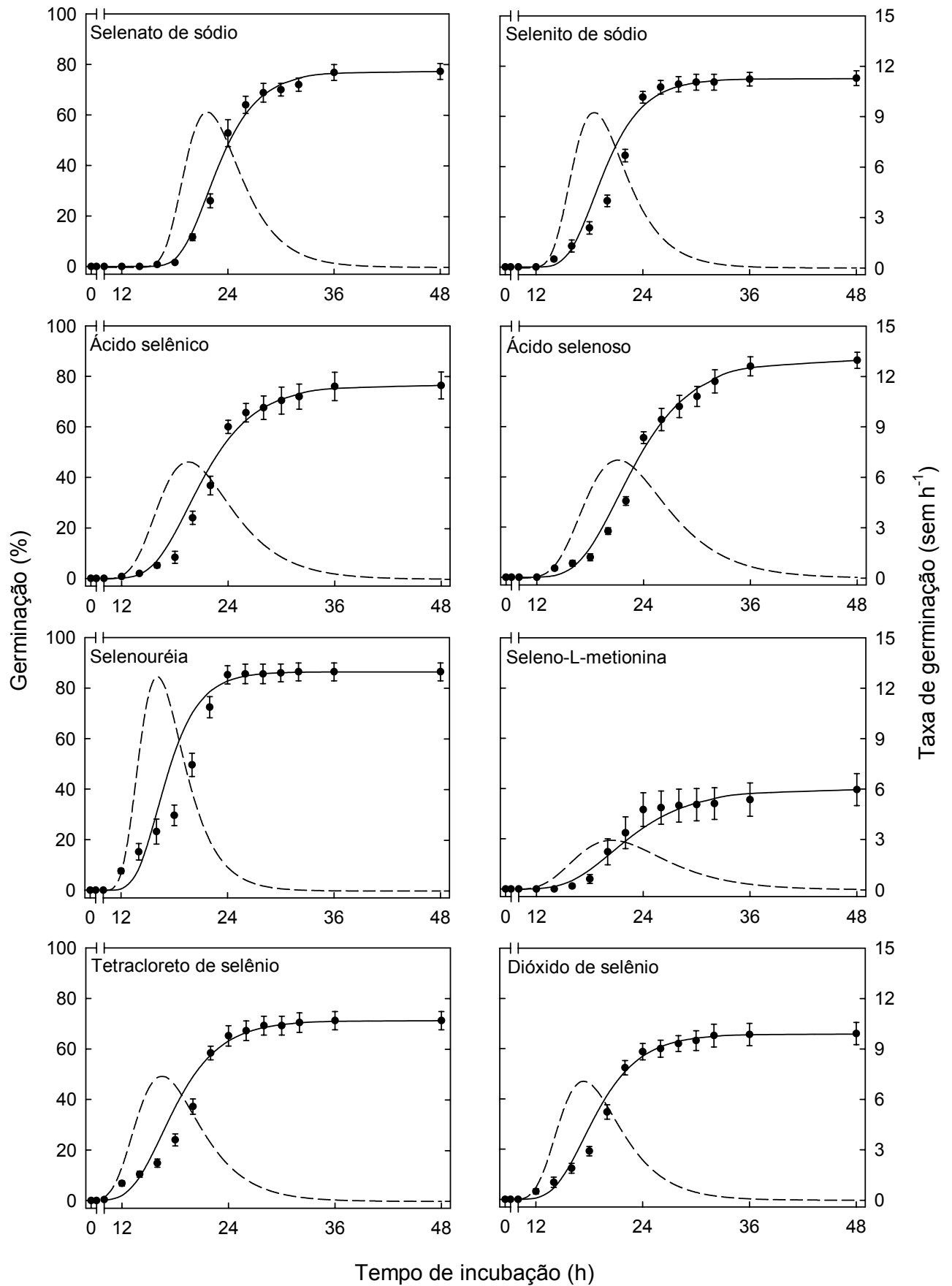


Figura 6.1 - Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes de estilosante de 60 dias de idade pós-colheita expostas aos compostos selênicos. Média de 5 repetições \pm erro da média

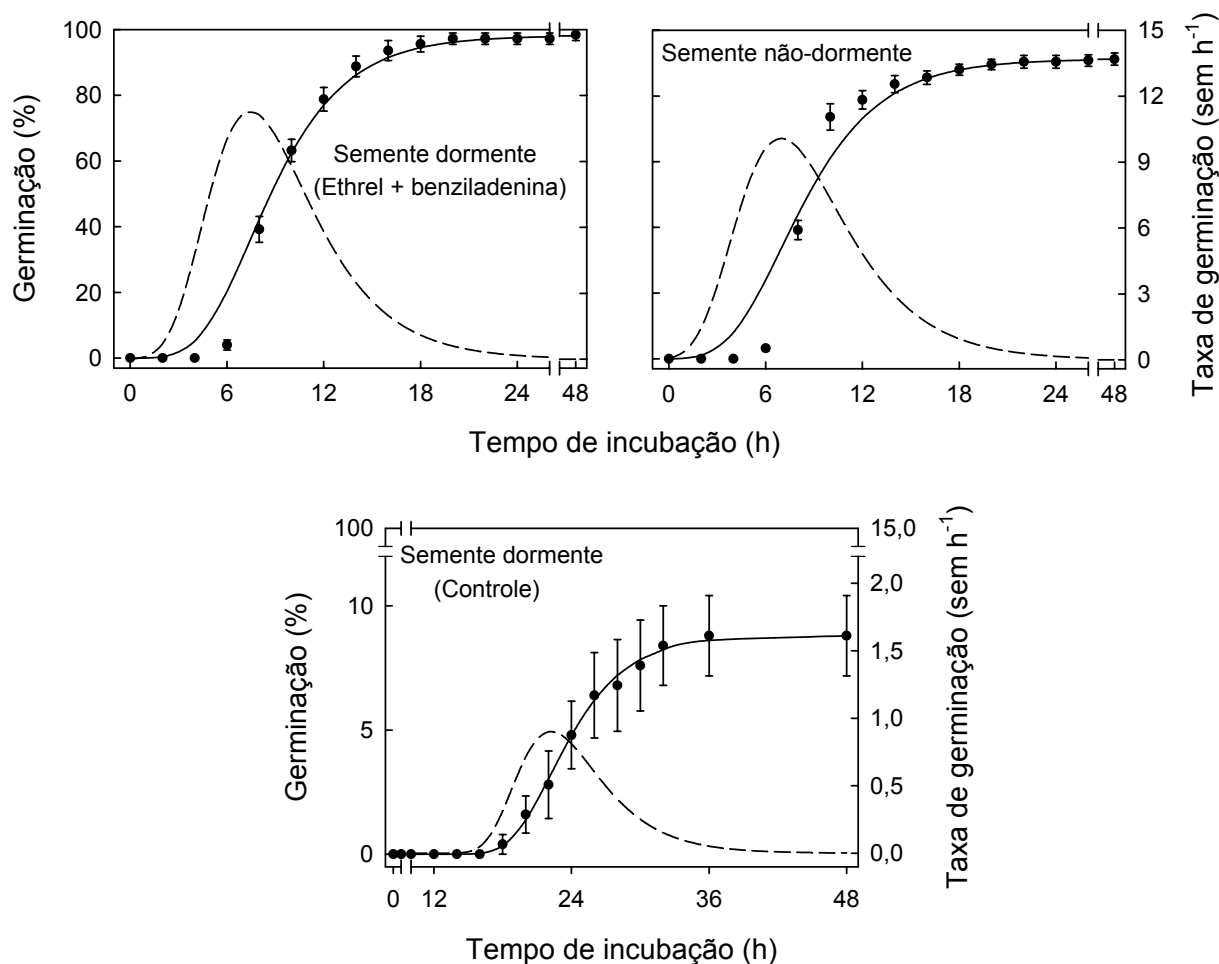


Figura 6.2 - Germinação acumulada (—) e taxa de germinação (---) de sementes dormentes e não-dormentes embebedas em solução-control e de sementes dormentes tratadas com ET + BA. Sementes dormentes de 60 dias e não-dormentes de 400 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições \pm erro da média

essas barreiras, a germinação ocorreria normalmente. Neste experimento, o tempo médio para a germinação atingir a taxa máxima deu-se em torno de 19 h, bem mais demorado do que com as sementes não-dormentes e sementes dormentes tratadas com ET + BA (controles), cujo tempo médio foi de 7 h, e ainda assim inferior ao tempo apresentado pelas sementes dormentes em solução-control de 22 h (Tab 1), e também superior às 6 h determinadas por Frigeri (1998), sob baixo pH. O tempo para atingir-se a germinação máxima estimulada por compostos selênicos também foi bem maior, o dobro (36 h) do tempo gasto pelas sementes dos controles (18 h). A média das taxas máximas de germinação determinada neste trabalho foi de 6 sementes h^{-1} , superior a 4 sementes h^{-1} , determinada sob baixo pH (Frigeri 1998). A selenouréia foi o composto que estimulou maior germinação e promoveu a maior taxa máxima, superando inclusive as sementes dos controles não-dormentes e dormentes tratadas com ET + BA. Com 26 h de embebição, as sementes tratadas com selenouréia já haviam atingido a germinação máxima (Tab 1), enquanto as sementes tratadas com seleno-L-metionina apresentaram a menor taxa dentre todos os compostos selênicos, devido provavelmente à sub-concentração utilizada.

Tabela 1. Alguns parâmetros da cinética de germinação de sementes dormentes de estilosante tratadas com compostos selênicos e com ET + BA e sementes não-dormentes incubadas em solução controle

Tratamento	Taxa máxima (sem h ⁻¹)	Tempo de taxa máxima (h)	Limiar de saturação (h)
Selenato de sódio	9	22	36
Selenito de sódio	9	18	28
Ácido selênico	7	19	36
Ácido selenoso	7	21	36
Selenouréia	13	16	26
Seleno-L-metionina	3	20	26
Tetracloroeto de selênio	7	16	26
Dióxido de selênio	7	17	32
Semente dormente	1	22	36
Semente dormente (ET + BA)	11	7	18
Semente não-dormente	10	7	18

4.6 Efeito dos inibidores da síntese e da ação do etileno em relação aos compostos selênicos

Para avaliar-se se os compostos selênicos estariam promovendo a quebra da dormência das sementes de estilosante pelo estímulo a biossíntese de etileno, foram utilizados inibidores da biossíntese e da ação do etileno para inibir a germinação. E para testar-se se os inibidores juntamente com os compostos selênicos estariam afetando a germinação sem danificar o embrião, após o quinto dia do experimento, a solução de germinação foi substituída por solução de TU. Neste experimento, todos os inibidores usados foram eficazes em inibir a germinação estimulada pelos compostos selênicos, sem afetar a viabilidade das sementes (Fig 7).

Desde que seleno-metionina e seleno-etionina estimularam a biossíntese de etileno em segmentos de haste de ervilha e em tecidos do botão floral de *Ipomoea tricolor* Cav. (Konze *et al* 1978) e que esse fitorregulador está envolvido na quebra da dormência das sementes de estilosante (Burin *et al* 1987, Delatorre e Barros 1996, Vieira e Barros 1994), o uso de inibidores da biossíntese e da ação do etileno pode ser empregado para indicar o requerimento do etileno na quebra da dormência das sementes de estilosante, tratadas com compostos selênicos. Tratamento idêntico tem sido aplicado em sementes de outras espécies que requerem etileno para germinar (Matilla 2000).

No presente trabalho, verificou-se que a quebra da dormência das sementes de estilosante também por compostos selênicos com estrutura molecular bem diferente da seleno-metionina foi, em alguns casos, maior que a promovida pelo próprio seleno-aminoácido. Portanto, é pouco provável que antes tenham sido metabolizados a seleno-metionina para depois agirem. Isso sugere que a rota metabólica do etileno foi ativada por condições de estresse em reposta aos

compostos selênicos, principalmente levando-se em consideração as altas concentrações usadas, como tem sido

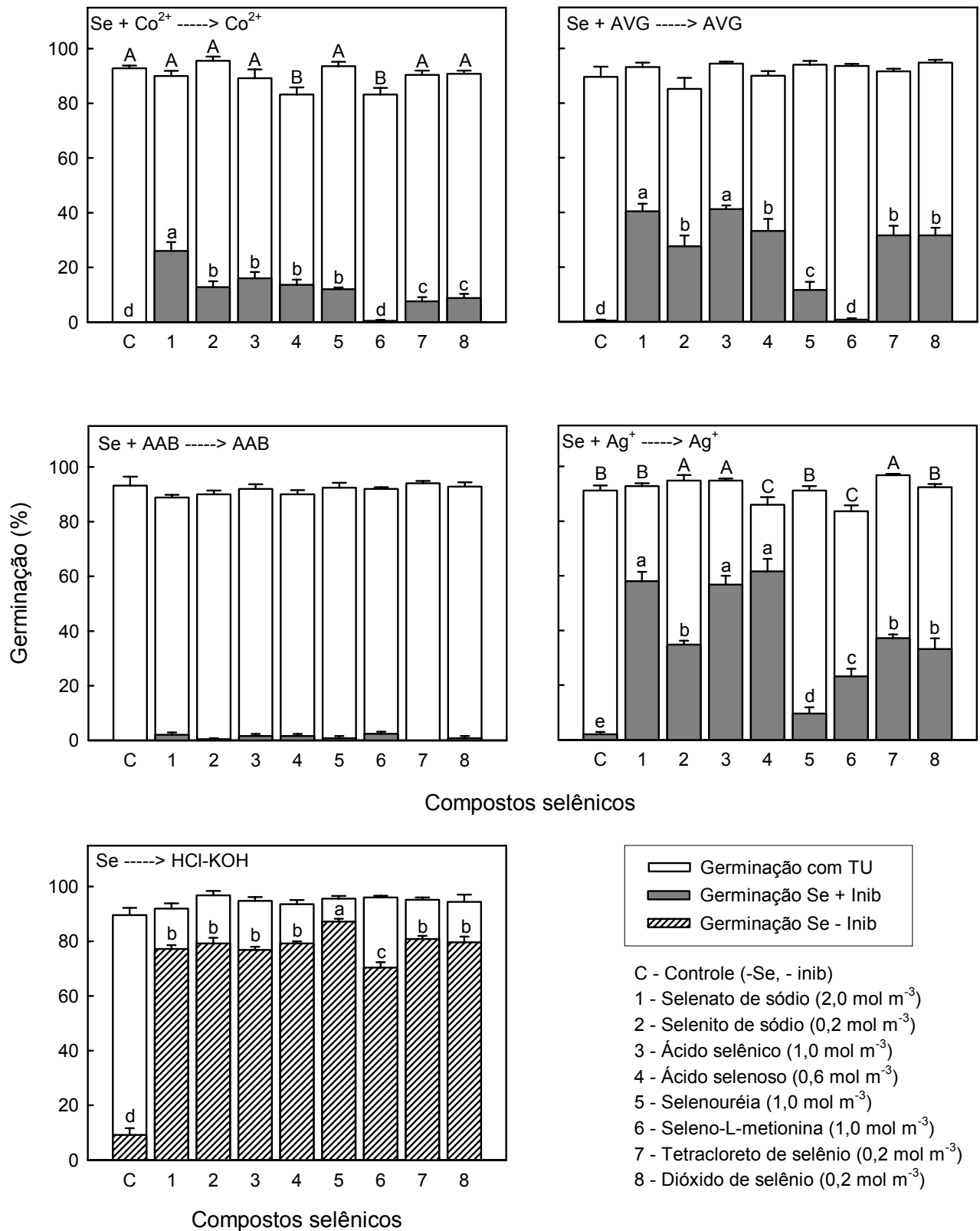


Figura 7 - Efeito dos inibidores da biossíntese e da ação do etileno sobre a germinação de sementes dormentes, de 38 dias de idade pós-colheita, estimuladas por compostos selênicos. As sementes foram expostas por 18 h ao primeiro meio e transferidas para o segundo após a seta. Média de 5 repetições ± erro da média. Médias seguidas de mesma letra minúsculas, dentro de

cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, quanto à germinação estimulada pelos compostos selênicos e por letra maiúscula, quanto à germinação total, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott descrito para outros materiais vegetais (Fluhr e Mattoo 1996, Morgan e Drew 1997). E também tem sido observado que sementes de alface que possuem grande capacidade de produção de etileno germinam melhor sob condições de estresse (Prusinski e Khan 1990), podendo ter ocorrido o mesmo com as sementes de estilosante. Seleno-metionina e seleno-etionina estimularam a biossíntese de etileno em tecidos do botão floral de *Ipomoea tricolor* e, os efeitos de produção de etileno foram intensificados quando aplicados conjuntamente com auxina em segmentos da haste de ervilha. Usando-se (¹⁴C) metionina, foi demonstrado que seleno-metionina e seleno-etionina serviram como precursores do etileno, o que justificaria a intensificação da biossíntese de etileno em tecidos vivos (Konze *et al* 1978). Em estudo da cinética da sintase do SAM, usando-se como substratos metionina e seleno-metionina, em tecidos do botão floral de *Ipomoea tricolor*, observou-se que a sintase do SAM possuía maior afinidade pela metionina, substrato natural dessa enzima e, em meio contendo os dois substratos, a metionina exerceu significativa inibição na conversão de seleno-metionina em Se-adenosil-L-metionina (SeAM) pela sintase do SAM (Konze e Kende 1979).

Analisando-se os efeitos de cada inibidor, verifica-se que o Co²⁺ inibiu a germinação em 85 %, em relação ao controle sem inibidor. Sob a ação do Co²⁺, a germinação promovida pela seleno-L-metionina foi praticamente nula. Sob a AVG, a média de germinação das sementes tratadas com compostos selênicos foi de 35 %, resultando em menor inibição (65 %), em relação à inibição com Co²⁺, inibidores da biossíntese do etileno. Novamente sob o efeito da seleno-L-metionina a germinação foi nula (Fig 7). Em termos médios, a inibição devida ao Co²⁺ e à AVG foi inferior à determinada por Frigeri (1998) e superior à determinada por Pelacani (2001), cujas sementes de estilosante foram estimuladas por exposição ao meio ácido. Assim, a inibição da germinação estimulada por compostos selênicos corrobora os dados encontrados pelas duas pesquisadoras.

Com o AAB, a germinação média foi muito baixa (1,5 %), em relação às sementes do controle sem inibidor, constituindo-se na maior inibição deste experimento (98,5 %) (Fig 7). A inibição mostrou-se superior à determinada por Frigeri (1998) e Pelacani (2001), em meio ácido, em sementes de estilosante e semelhante à inibição da germinação de sementes de *Amaranthus caudatus* (Kępczyński 1986) e grão-de-bico (Gallardo 1992). O AAB é um inibidor de processos de crescimento em geral e, na germinação de sementes, possivelmente agiria impedindo a absorção de água e a emergência da radícula, além de sua ação estar relacionada à biossíntese de etileno ou à alteração de sensibilidade dos tecidos ao etileno (Kępczyński 1986).

Com o Ag^+ , inibidor da ação do etileno, a germinação média das sementes tratadas com compostos selênicos foi de 50 %, em relação às sementes do controle (Fig 7). No entanto, em outros experimentos com sementes de estilosante já foram determinados efeitos de inibição bem maiores (Frigeri 1998, Pelacani 2001), ficando evidente o bloqueio da ação do etileno (Beyer 1976). A ação da prata possivelmente se dá por deslocamento de íons cobre do receptor transmembrânico ETR de etileno, de forma que o receptor não mais possa ligar o etileno (Srivastava 2002).

Embora os inibidores da biossíntese e da ação do etileno tenham demonstrado o possível envolvimento desse regulador no processo de quebra da dormência, o seu emprego não constitui meio indubitável, para determinar-se a essencialidade do etileno na germinação de sementes. Em *Chenopodium album* L., utilizando-se inibidores da biossíntese e da ação do etileno, foi possível determinar-se o requerimento do etileno para a germinação de sementes dormentes (Machabée e Saini 1991). Ademais, o nível de exigência da semente por etileno pode ser muito baixo, como indicado para sementes de *Amaranthus caudatus* (Kępczyński e Karssen 1985), grão-de-bico (Gallardo *et al* 1994) e *C album* (Machabée e Saini 1991).

4.7 Reversão do efeito dos inibidores

Para examinar-se o grau de envolvimento do etileno na quebra da dormência de sementes de estilosante estimulada por compostos selênicos, buscou-se reverter o efeito dos inibidores da biossíntese ou da ação do etileno na germinação com compostos que liberam ou induzem a biossíntese de etileno.

Os efeitos inibitórios do Co^{2+} foram revertidos com ET, resultando em uma germinação média das sementes tratadas com compostos selênicos de 96 %. Essa germinação corresponde a 116 % do controle sem inibidor e sem reverter (Fig 8), em acordo com os resultados de Pelacani (2001), com sementes dormentes da mesma espécie. O ET age liberando etileno no meio celular, demonstrando que a inibição causada pelo Co^{2+} foi superada pela ação do etileno. Em sementes de grão-de-bico, em que o ACC não foi capaz de reverter os efeitos da inibição por Co^{2+} , a germinação foi revertida pela aplicação de etileno (Gallardo *et al* 1994).

Para reverter-se a inibição provocada pelo AVG, utilizou-se ACC e a germinação foi restabelecida numa média de 90 %, que correspondeu a 108 % do controle sem inibidor e sem reverter (Fig 8), semelhante ao resultado encontrado por Pelacani (2001). Esses resultados corroboram os experimentos de Sińska e Gladon (1989), com sementes de maçã (*Malus domestica* Borkh) cv Antonovka e de Babiker *et al* (1994), com sementes de *Striga asiática* L., que também reverteram em 62 % os efeitos de inibição do AVG.

A inibição pelo AAB foi muito alta, possivelmente por ser também um inibidor dos processos de crescimento e desenvolvimento em geral. Como reverteror foi usado o ET, que levou

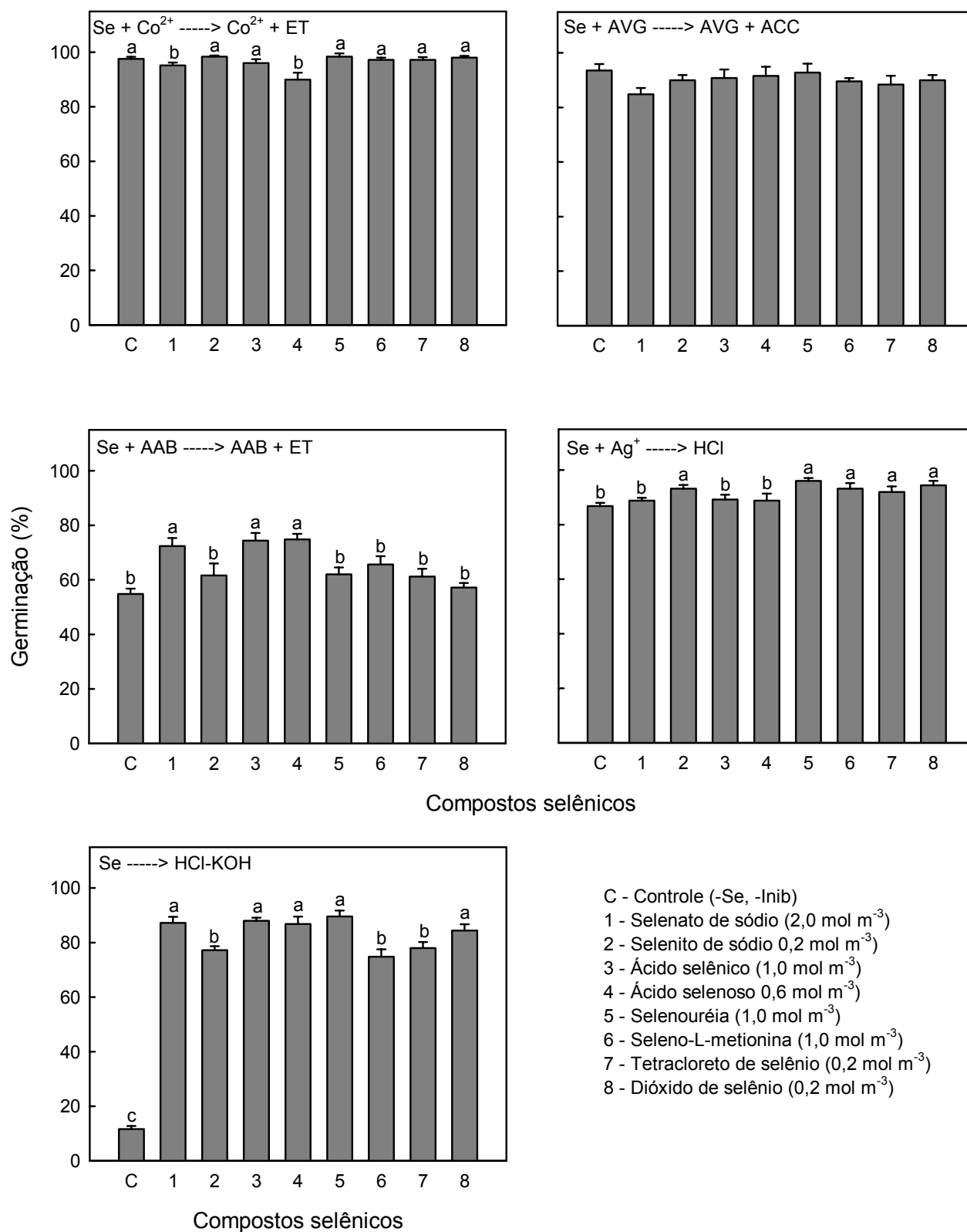


Figura 8 - Reversão do efeito dos inibidores da biossíntese e da ação do etileno fornecidos conjuntamente com os compostos selênicos, pelos reverteros ET (0,1 mol m⁻³), ACC (1,0 mol m⁻³) e HCl (10 mol m⁻³, pH 2,0), em sementes dormentes de 48 dias de idade pós-colheita. Exposição das sementes por 18 h no primeiro meio e transferência para o segundo meio após a

seta. Média de 5 repetições \pm erro da média. Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si, quanto à germinação estimulada pelo revertor ou por compostos selênicos, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott a germinação das sementes tratadas com compostos selênicos a uma média de 66 %, correspondente a 80 % do controle sem inibidor e sem revertor (Fig 8). Essa reversão mostrou-se menor que a encontrada por Pelacani (2001), para a mesma espécie. Em grão-de-bico, os efeitos do AAB também foram revertidos por ET (Gallardo *et al* 1994), e em *Amaranthus caudatus*, a inibição foi revertida por ACC (Kępczyński 1986), o que sugere que o AAB estaria controlando a atividade da sintase do ACC na dormência das sementes de estilosante.

A inibição por Ag^+ , inibidor da ação do etileno, foi revertida por solução de HCl (10 mol m^{-3} , pH 2,0), aplicada após a troca das soluções-teste, sem Ag^+ . Com a reversão, a germinação média alcançou 92 % (correspondente a 110 % do controle sem inibidor e sem revertor) (Fig 8), maior que a observada por Pelacani (2001), em sementes de estilosante.

Com os resultados dos diversos experimentos sobre germinação de sementes dormentes promovida pelos compostos selênicos, foram considerados as porcentagens de germinação e os inversos das concentrações ótimas dos compostos selênicos para construir-se um índice de eficiência ($I_{ef} = Conc^{-1} \times \%G/100$), como é mostrado na Tab 2.

O selenito de sódio, o tetracloreto de selênio e o dióxido de selênio foram os compostos mais eficientes em quebrar a dormência (Tab 2), pois estimularam maior porcentagem de germinação das sementes sob as menores concentrações, enquanto com o selenato de sódio, foi necessária uma concentração 10 vezes maior para obter-se resultado semelhante e, por isso, exibiu menor índice de eficiência.

Tabela 2. Índice de eficiência dos compostos selênicos na quebra da dormência de sementes de estilosante

Composto (nível)	Experimento (Germinação %)					Média	I_{ef}	
	1	2	3	4	5			
Selenato de sódio (2 mol m^{-3})	83,2 \pm 3,4	85,2 \pm 4,1	73,2 \pm 3,7	77,2 \pm 1,4	87,2 \pm 2,2	81,2	0,41	d
Selenito de sódio (0,2 mol m^{-3})	81,6 \pm 4,7	73,2 \pm 8,0	64,4 \pm 3,3	79,2 \pm 2,1	77,2 \pm 1,5	75,1	3,76	a
Ácido selênico (1,0 mol m^{-3})	86,6 \pm 4,0	76,0 \pm 5,1	80,0 \pm 5,3	76,8 \pm 1,2	88,0 \pm 1,1	81,5	0,81	cd
Ácido selenoso (0,6 mol m^{-3})	86,0 \pm 2,0	78,4 \pm 7,9	87,6 \pm 1,2	79,2 \pm 0,8	86,8 \pm 2,7	83,6	1,39	b
Selenouréia (1,0 mol m^{-3})	95,2 \pm 1,6	87,6 \pm 5,0	90,8 \pm 2,2	87,2 \pm 1,0	89,6 \pm 2,1	90,1	0,90	c
Seleno-L-metionina (1,0 mol m^{-3})*	56,8 \pm 7,0	56,4 \pm 5,0	60,4 \pm 4,5	70,4 \pm 1,9	74,8 \pm 2,7	63,8	0,64	cd
Tetracloreto de selênio (0,2 mol m^{-3})	86,4 \pm 5,3	79,6 \pm 2,1	78,4 \pm 2,6	80,8 \pm 1,2	78,0 \pm 2,2	80,6	4,03	a
Dióxido de selênio (0,2 mol m^{-3})	88,4 \pm 4,4	68,0 \pm 4,3	72,0 \pm 6,3	79,6 \pm 2,1	84,4 \pm 2,3	78,5	3,92	a

Experimentos: 1-Tempo de exposição, 2-Técnicas de troca das soluções, 3-Toxicidade dos compostos selênicos, 4-Inibidores da síntese e da ação do etileno, 5-Reversão do efeito dos inibidores. * Para Seleno-DL-metionina, I_{ef} =

0,08 (concentração 10 mol m^{-3} , nos experimentos de efeito de compostos selênicos sobre a germinação (Fig 1 e 2), conduzidos sem troca da solução-teste por solução controle, com 18 h de exposição. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey

O fato de que os compostos selênicos promovem a quebra da dormência das sementes de estilosante, levando à germinação, de que essa germinação é inibida por substâncias anti-etilênicas e de que os efeitos inibitórios são revertidos por substâncias associadas à produção do gás na célula levam à sugestão de que o etileno estaria envolvido na quebra da dormência e germinação das sementes de estilosante.

4.8 Produção de etileno por sementes de estilosante

A emanção de etileno por sementes não-dormentes e dormentes incubadas em solução-controle (HCl-KOH pH 7,0) em recipiente submetido a exaustão da atmosfera do tubo, após cada retirada da amostra (Pelacani 2001), é mostrada na Fig 9, observando-se também a germinação dessas sementes. Nas sementes não-dormentes a germinação já era observada com 6 h de embebição e aumentou progressivamente com o aumento da produção de etileno até aproximadamente 16 h de incubação, quando foi superior a 70 %, e a taxa de produção de etileno atingiu o ponto máximo (Fig 9). A pequena diferença de tempo (21 h) para a taxa de produção de etileno, estimada por semente, para atingir o ponto máximo, pode ser explicada pela constância do parâmetro número de sementes, ao contrário da variação da matéria fresca.

Observa-se uma relação estreita entre a produção de etileno e a germinação de sementes não-dormentes de estilosante, sendo ambos os fenômenos descritos por curvas de forma sigmóide, caracterizada por uma fase lenta no início, seguida de uma fase logarítmica, em que a germinação e a produção de etileno aumentaram exponencialmente com o tempo até atingirem o ponto máximo e, finalmente, ocorreu uma redução progressiva da emanção de etileno, devido a redução das taxas, até a saturação do processo.

Resultados semelhantes de produção de etileno foram obtidos com o mesmo material e condições de ensaio por Pelacani (2001). Aumento na produção de etileno durante a germinação também foram verificados em sementes de alface cv Grand Rapids (Abeles 1986), de *C álbium* L. (Machabée e Saini 1991) e de nabo (*Brassica rapa* L.) cv Rapa (Rodriguez-Gacio e Matilla 2001). Diferentemente das sementes não-dormentes, as sementes dormentes, quando incubadas no mesmo meio (HCl-KOH pH 7,0), praticamente não produzem etileno e, por isso, não germinam, a menos que lhes seja fornecido etileno para a quebra da dormência. Diversos

trabalhos demonstraram o envolvimento do etileno com a quebra da dormência das sementes estilósante (Pelacani 2001, Ribeiro 2003).

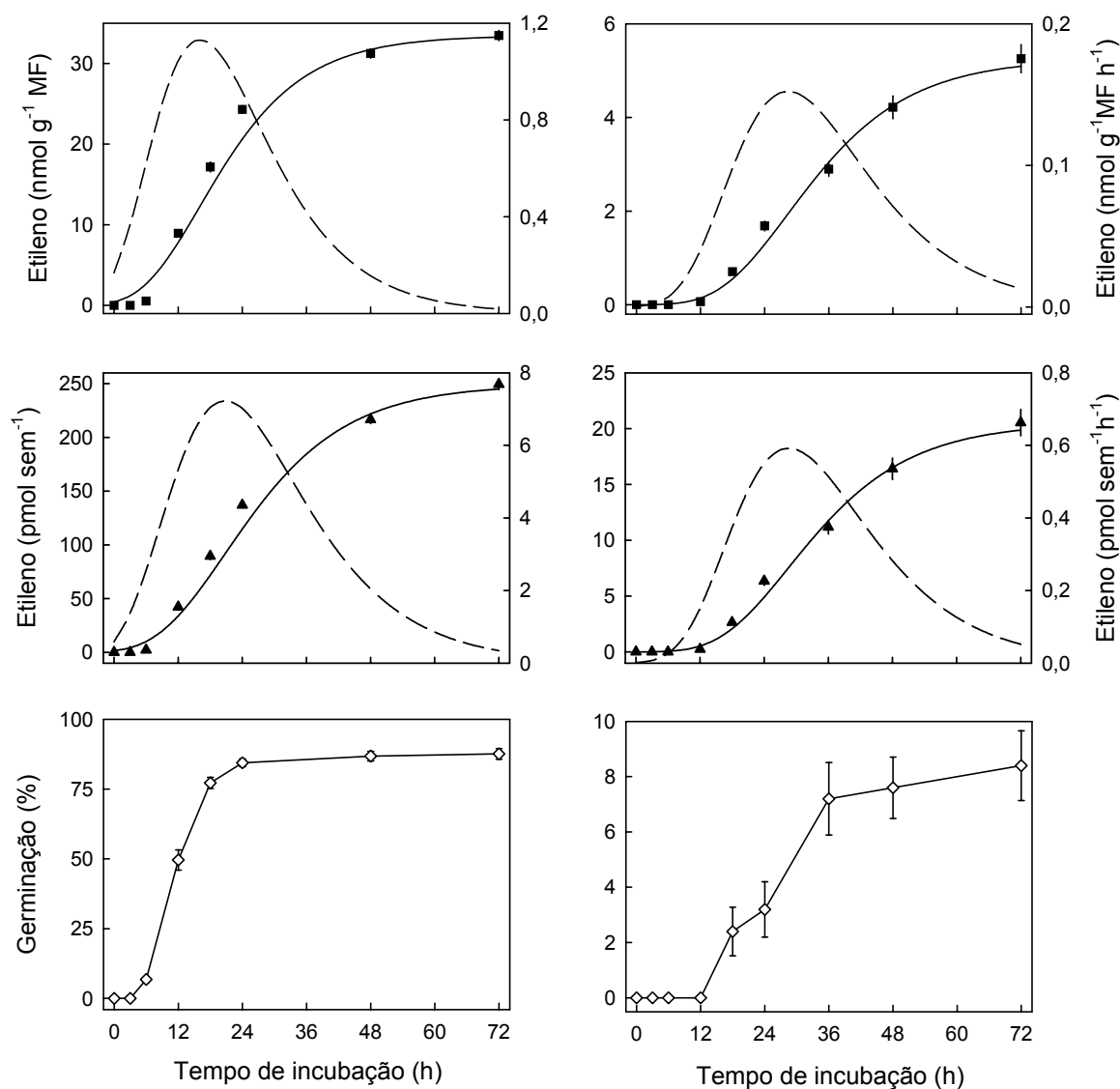


Figura 9 - Produção de etileno (—), taxa de produção de etileno (---) e germinação de sementes não-dormentes de 300 dias (à esquerda) e sementes dormentes de 65 dias (à direita), de idade pós-colheita, em frascos Erlenmeyer. Experimentos realizados em datas diferentes. Média de 10 repetições \pm erro da média, que não aparece quando menor que o símbolo. Observar a diferença de escala entre sementes não-dormentes e dormentes

4.9 Efeito dos compostos selênicos na produção de etileno

Considerando-se que os compostos selênicos estimulam a germinação de sementes dormentes de estilósante (Fig 3), possivelmente via produção de etileno, sementes dormentes foram expostas aos compostos selênicos para quantificação do etileno emanado. Eles promoveram a quebra da dormência das sementes que liberaram etileno em quantidades bem maiores que as sementes dormentes não-tratadas, após 24 h de embebição (Fig10.1 e 10.2). A produção de etileno em sementes tratadas ocorreu com um atraso de 18 h em relação às sementes

não-dormentes, resultado que se correlacionou com a germinação observada em placa de Petri (Fig 6.1). O incremento na produção de etileno correlacionou-se com o aumento da germinação promovida por todos os compostos selênicos (Fig11). Embora o mecanismo pelo qual os compostos selênicos promovem a quebra da dormência de sementes não seja conhecido, existe a possibilidade de que atuem como fator de estresse, estimulando, assim, a biossíntese de etileno nos seus tecidos. Outra possibilidade seria os compostos selênicos funcionarem como precursores do etileno em sua rota biossintética, após o selênio ser incorporado na seleno-metionina (Konze *et al* 1978, Konze e Kende 1979), o que parece pouco provável desde que compostos tão díspares promoveram cinética de germinação semelhante (Fig11) e, possivelmente, apresentam diferenças quanto a absorção.

O requerimento do etileno na germinação de sementes de estilosante foi sugerido por Burin *et al* (1987), Vieira e Barros (1994), Barros e Delatorre (1998), Delatorre *et al* (1997) e Frigeri (1998). Sua produção pelas sementes foi quantificada por Pelacani (2001) e, mais recentemente, seu requerimento associado à sensibilidade das sementes, foi avaliado por Ribeiro (2003). A germinação das sementes dormentes de estilosante pode ser promovida também por outras condições de estresse, como altas temperaturas (Mott e Mckeeon 1979, McIvor e Gardener 1987), tiouréia em altas concentrações (Ballard e Buchwald 1971, Delatorre *et al* 1997), metais pesados (Delatorre e Barros 1996), baixo pH do meio de germinação (Frigeri 1998, Pelacani 2001) e seleno-metionina (Barros e Freitas 2000, 2001), que também parecem estar envolvidos com a biossíntese de etileno.

Com todos os compostos selênicos observou-se uma correlação entre o início da produção de etileno (Fig10.1 e 10.2) e o início da germinação (Fig11), por volta de 18 h de incubação para a selenouréia e a seleno-L-metionina e 24 h para as sementes tratadas com os demais compostos. A fase linear de emissão de etileno, período em que ocorre maior taxa de produção de etileno mostrou-se entre 24 e 48 h, sendo 33 h de incubação o tempo médio para a maior taxa de produção de etileno. Os dados de produção de etileno confirmam a germinação observada em placa de Petri (Fig 6.1, 13.1 e 13.2). Tempo semelhante para a produção de etileno atingir a taxa máxima também foi observado por Pelacani (2001), quando sementes dormentes de estilosante foram estimuladas a germinar por exposição a baixo pH do meio de germinação. Essa fase de grande produção de etileno foi acompanhada pelo aumento da porcentagem de germinação e, ao início da estabilização da emissão de etileno, por volta de 48 h, as sementes expostas aos compostos selênicos já apresentavam mais de 70 % de germinação.

A germinação estimulada por compostos selênicos foi retardada e ocorreu mais lentamente, do que nas sementes não-dormentes em solução-controle, cuja taxa máxima de produção de etileno ocorreu por volta de 13 h de incubação. Tempo semelhante para atingir

a taxa máxima, também foi observado por Pelacani (2001). A germinação das sementes não-

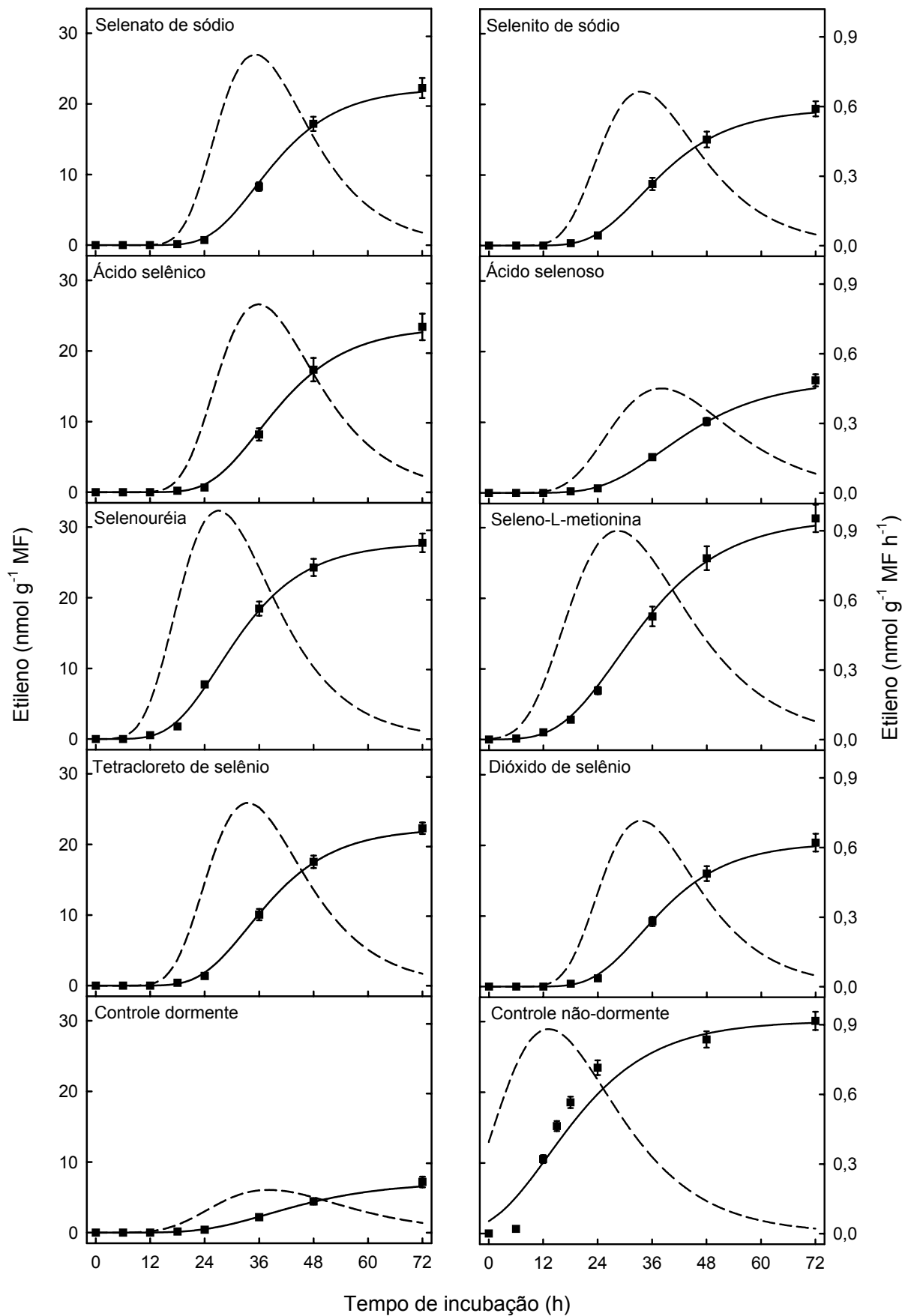


Figura 10.1 - Produção de etileno (—) e taxa de produção de etileno (---) por sementes dormentes de 8 dias de idade pós-colheita tratadas com compostos selênicos, e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita. Média de 10 repetições \pm erro da média

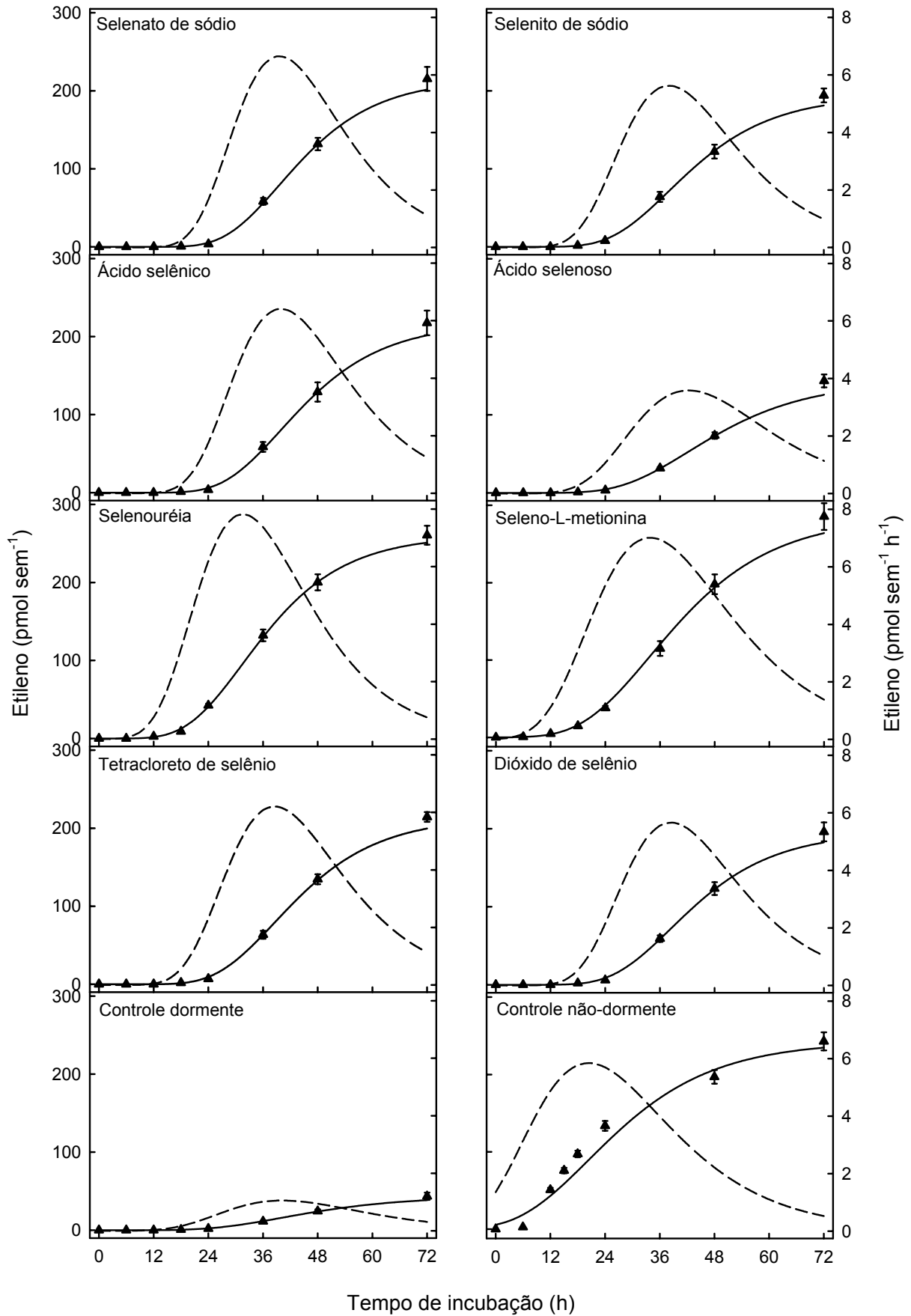


Figura 10.2 - Produção de etileno (—) e taxa de produção de etileno (---) por sementes dormentes de 8 dias de idade pós-colheita tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita. Média de 10 repetições \pm erro da média

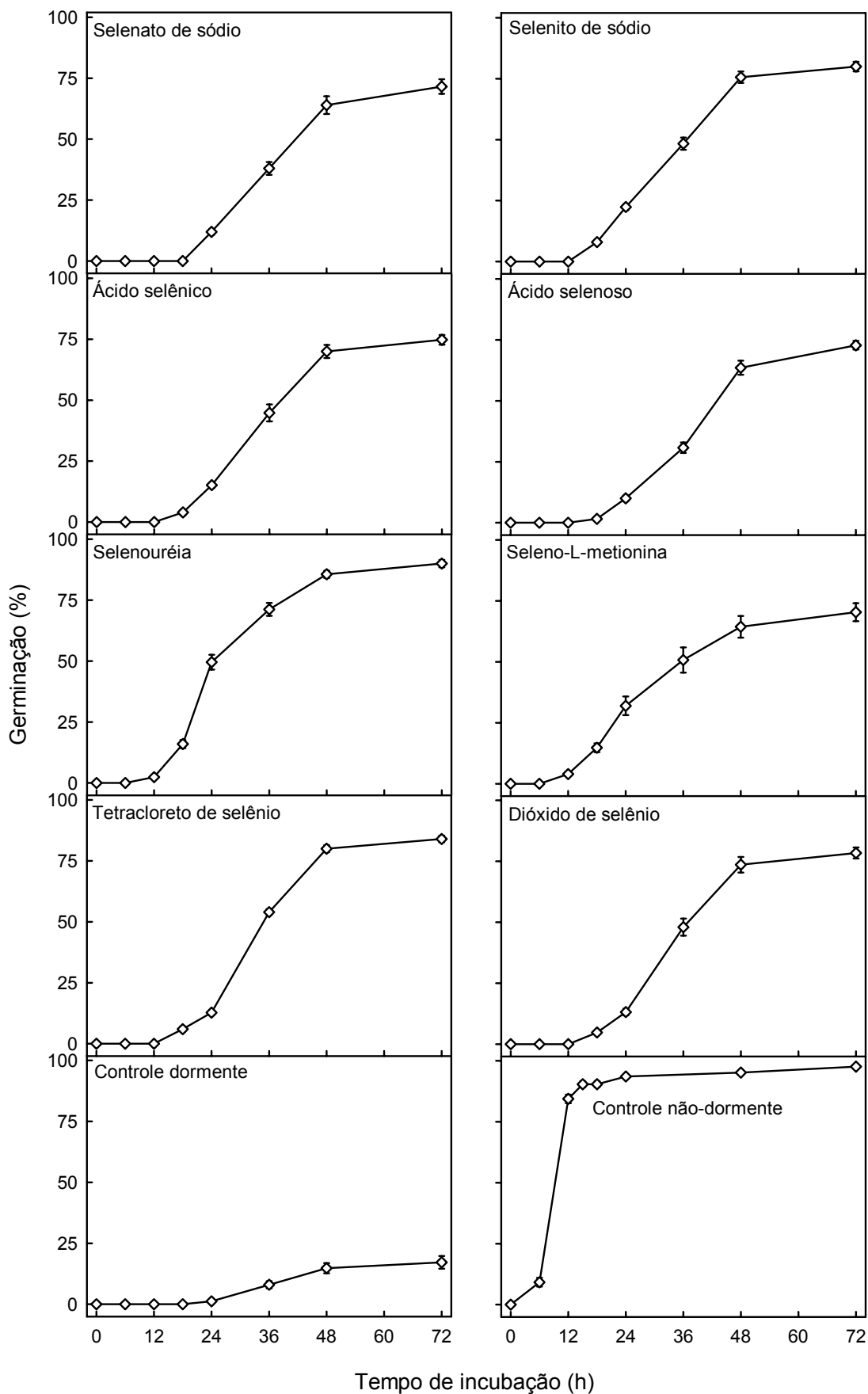


Figura 11 - Germinação de sementes dormentes de 8 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita, em frascos Erlenmeyer. Média de 10 repetições \pm erro da média.

dormentes iniciou-se após 6 h de incubação, ocorreu de forma rápida e, com 15 h já ocorrera mais de 90 % de germinação. Certamente, esse fenômeno também ocorreu com a germinação estimulada pelos compostos selênicos, que tiveram de ser absorvidos, transportados e, possivelmente metabolizados para que ativassem o sistema biossintético e induzissem a produção de etileno, resultando na quebra da dormência e na germinação.

À exceção do ácido selenoso, não houve grandes diferenças entre as taxas máximas de produção de etileno de sementes dormentes tratadas com compostos selênicos e as sementes não-dormentes incubadas em solução-controle (Fig10.1 e 10.2). Em média, as taxas de produção de etileno foram três vezes maiores que as taxas de sementes dormentes da mesma espécie estimuladas a germinar por baixo pH do meio de germinação (Pelacani 2001). A selenouréia e a seleno-L-metionina foram os compostos que estimularam as maiores produções de etileno. A germinação promovida pelas duas substâncias também diferiu pouco. A selenouréia destacou-se dentre todos os compostos selênicos por promover maior germinação das sementes dormentes, enquanto a seleno-L-metionina foi o composto que menos estimulou a germinação (Tab 2), ressaltando-se, contudo, que a concentração empregada deste composto foi sub-ótima (Fig 2). A taxa de produção de etileno das sementes expostas ao ácido selenoso foi a menor dentre todas, porém a germinação não foi afetada na mesma intensidade, mostrando-se em torno de 75 %, não muito diferente da germinação estimulada pelos demais compostos. Possivelmente, a redução da taxa de produção de etileno, ocorrida com as sementes expostas ao ácido selenoso, seja explicada pelo efeito de toxicidade na germinação provocado por esse composto (ver Fig 5).

4.10 Produção de etileno por sementes dormentes estimuladas por seleno-L-metionina e seleno-DL-etionina

A seleno-L-metionina, comparada aos demais compostos selênicos utilizados nesta pesquisa, sempre estimulou mais a biossíntese de etileno (Fig 10.1 e 10.2) e foi o composto que mais estimulou a produção de ACC livre pelas sementes (ver Fig 13.1 e 13.2), possivelmente por também servir como precursor do etileno em sua rota biossintética (Konze *et al* 1978). Em um outro experimento, com novo lote de sementes, a produção de etileno das sementes expostas a seleno-L-metionina foi praticamente o dobro (Fig 12.1) da produção de etileno observada no primeiro experimento (Fig 10.1 e 10.2), embora a diferença de idade pós-colheita das sementes fosse mínima.

Comparando-se a produção de etileno de sementes expostas à seleno-L-metionina com a de sementes expostas a seleno-DL-etionina, observa-se que as sementes tratadas com o primeiro

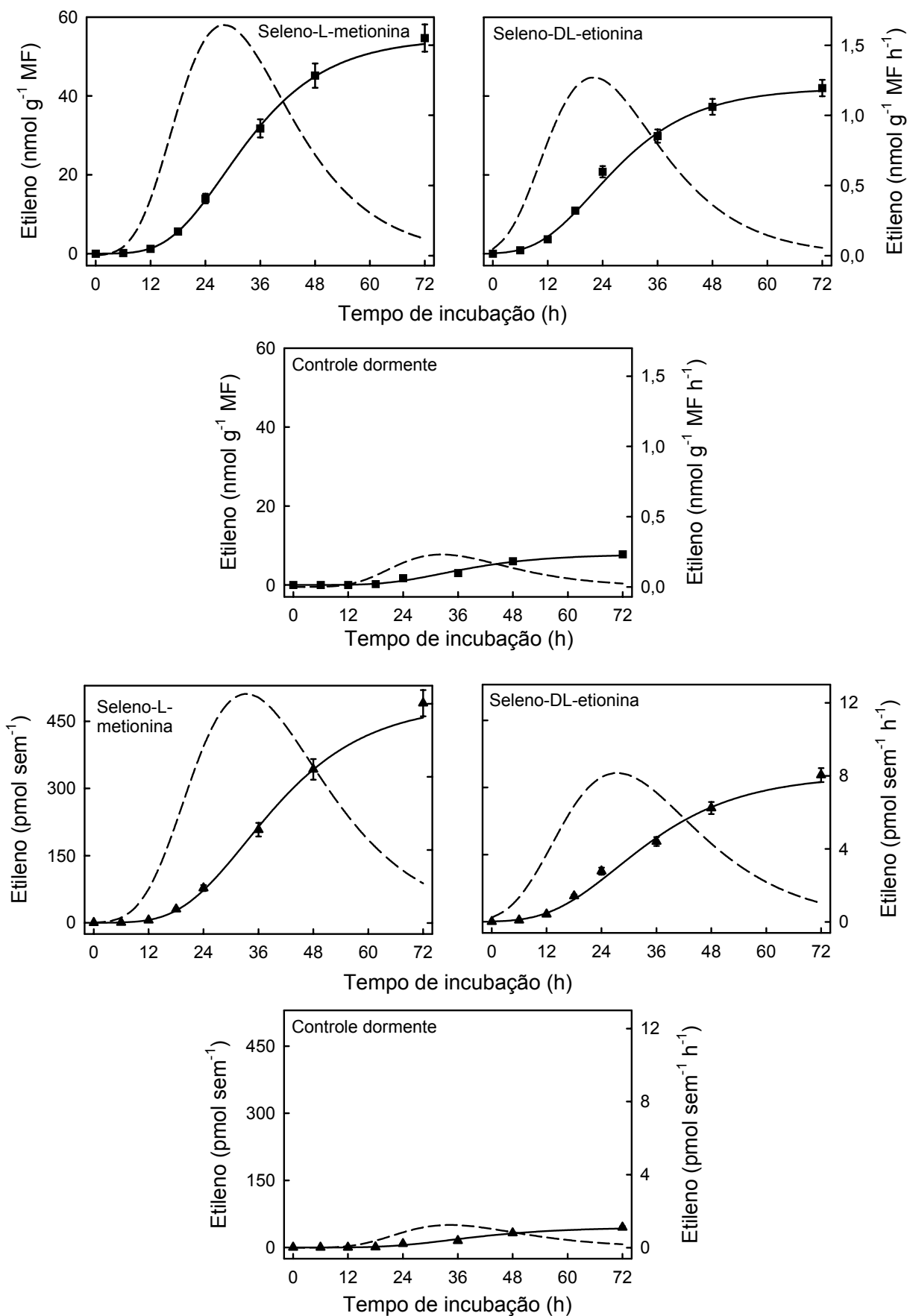


Figura 12.1 - Produção de etileno (—) e taxa de produção de etileno (---) por sementes dormentes de estilosante de 14 dias de idade pós-colheita tratadas com seleno-L-metionina e com seleno-DL-etionina. Média de 10 repetições \pm erro da média

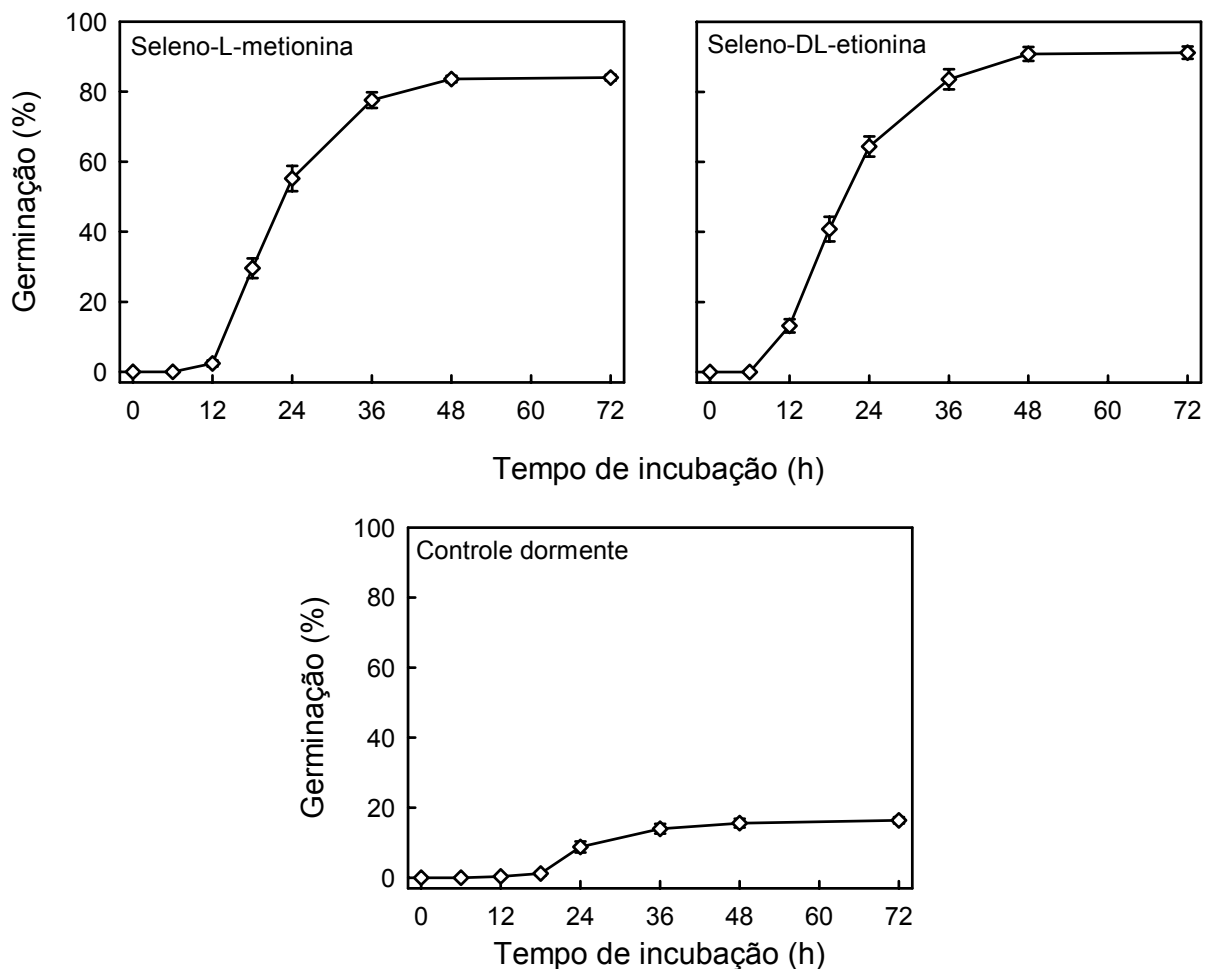


Figura 12.2 - Germinação de sementes dormentes de estilosate de 14 dias de idade pós-colheita tratadas com seleno-L-metionina e seleno-DL-etionina em frascos Erlenmeyer.. Média de 10 repetições \pm erro da média

composto produziram mais etileno (Fig 12.1), semelhantemente aos resultados encontrados para segmentos da nervura do botão floral de *Ipomoea tricolor* Cav. Cv Heavenly Blue, quando expostos aos dois seleno-aminoácidos. A produção de etileno por seções da haste de plântulas de ervilha foi, no entanto, o oposto, quando foram expostas a cada seleno-aminoácido e depois transferidas para uma solução de auxina ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$) (Konze *et al* 1978). Sob os dois seleno-aminoácidos, o aumento da germinação mostrou-se correlacionado com o aumento da emissão de etileno (Fig 12.2), e 80 % da germinação ocorreu no intervalo de 12 a 36 h, quando também ocorreu a taxa máxima de produção de etileno (Fig 12.1).

4.11 Níveis de ACC livre em relação à germinação de sementes dormentes expostas aos compostos selênicos

Para avaliar-se como o ACC das sementes correlacionava-se com a germinação promovida pelos compostos selênicos, foram determinados os níveis de ACC livre e conjugado

durante o processo de germinação de sementes dormentes de estilosante tratadas com aqueles compostos.

Os níveis de ACC livre nas sementes dormentes estimuladas a germinar pelos oito compostos selênicos são mostrados nas Fig 13.1 e 13.2, as quais também mostram a germinação. Aparentemente, apenas o ACC livre é convertido a etileno (Hoffman e Yang 1982, Hoffman *et al* 1983, Mansur *et al* 1986, Yang e Hoffman 1984).

Em sementes dormentes e não-dormentes, o nível de ACC livre antes da embebição foi praticamente zero, implicando que, nessas sementes, não há substrato para a formação de etileno (Fig 10.1 e 10.2). Do início da embebição até aproximadamente 12 h, a maioria dos compostos selênicos não estimulou a biossíntese de ACC, com exceção de selenouréia e seleno-L-metionina. Em sementes não-dormentes, no mesmo período, já se observava uma considerável produção de ACC e, no intervalo de 12 até 24 h, a produção foi significativamente maior (teste t $p \leq 0,05$) do que nas sementes do controle dormente (Fig 13.1 e 13.2). Por isso, as sementes expostas aos compostos selênicos não germinaram durante as primeiras 12 h de incubação (Fig 11). Posteriormente, todos os compostos selênicos estimularam a biossíntese de ACC até 36 h, em níveis bem superiores àquele das sementes do controle dormente, superando, em muito, inclusive, o nível de ACC livre nas sementes não-dormentes. O estímulo à germinação seguiu o mesmo comportamento dos níveis de ACC livre (Fig 13.1 e 13.2), resultado que também está correlacionado com a produção de etileno (Fig 10.1 e 10.2), sugerindo que a rota biossintética do etileno foi ativada pelos compostos selênicos. Embora não se tenha conseguido avaliar a atividade da sintase do ACC, o acúmulo de ACC livre constitui uma estimativa indireta dessa ativação. Aumentos do teor de ACC livre, associados à promoção da germinação, também foram observados quando sementes dormentes de estilosante foram expostas à solução de baixo pH (Pelacani 2001). Esses resultados indicam ter ocorrido ativação da enzima sintase do ACC em resposta ao estresse causado pelo selênio.

Em outros materiais sensíveis ao etileno, como sementes de amendoim (Hoffman *et al* 1983) e de grão-de-bico cv Castellana (Gallado *et al* 1991, 1992), também foi observado um aumento no teor de ACC livre durante a germinação. Esse acúmulo poderia favorecer a biossíntese de etileno necessária à promoção da quebra da dormência e a germinação das sementes de estilosante (Fig 13.1 e 13.2). Os níveis máximos de ACC livre ocorreram nas sementes tratadas com seleno-L-metionina, mais do que o dobro exibido pelas sementes tratadas com os demais compostos selênicos, refletindo talvez a incorporação de seleno-metionina na rota biossintética do etileno (Fig 13.1 e 13.2). Isso, no entanto, não se refletiu na germinação.

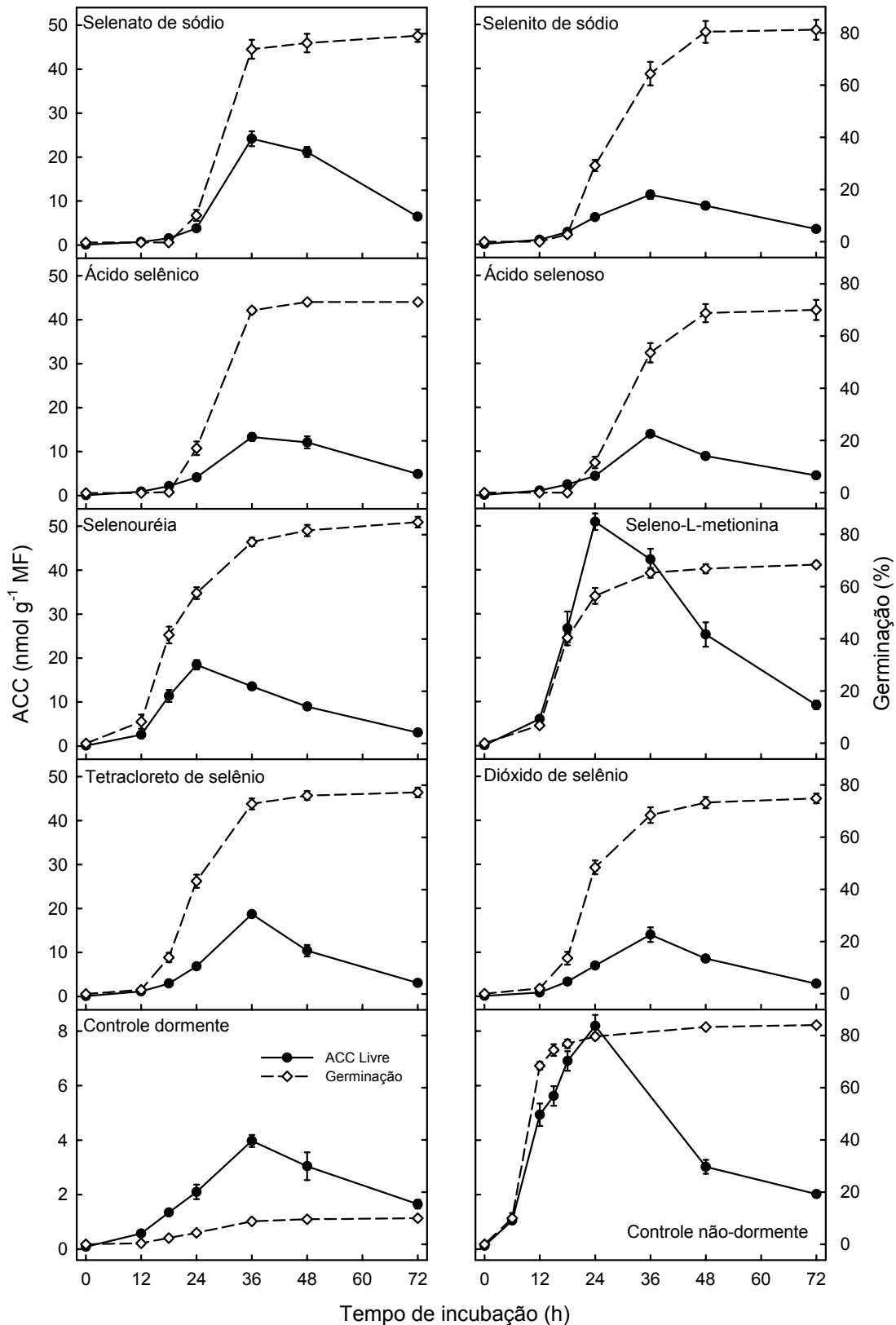


Figura 13.1 - Níveis de ACC livre e germinação de sementes dormentes de estilosante de 15 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita. Níveis de ACC em sementes tratadas com compostos selênicos e controle dormente - média de 4 repetições; níveis de ACC no controle não-dormente e germinação sob todos os tratamentos - média de 5 repetições \pm erro da média. Observar a diferença de escala para as sementes não-tratadas (controles)

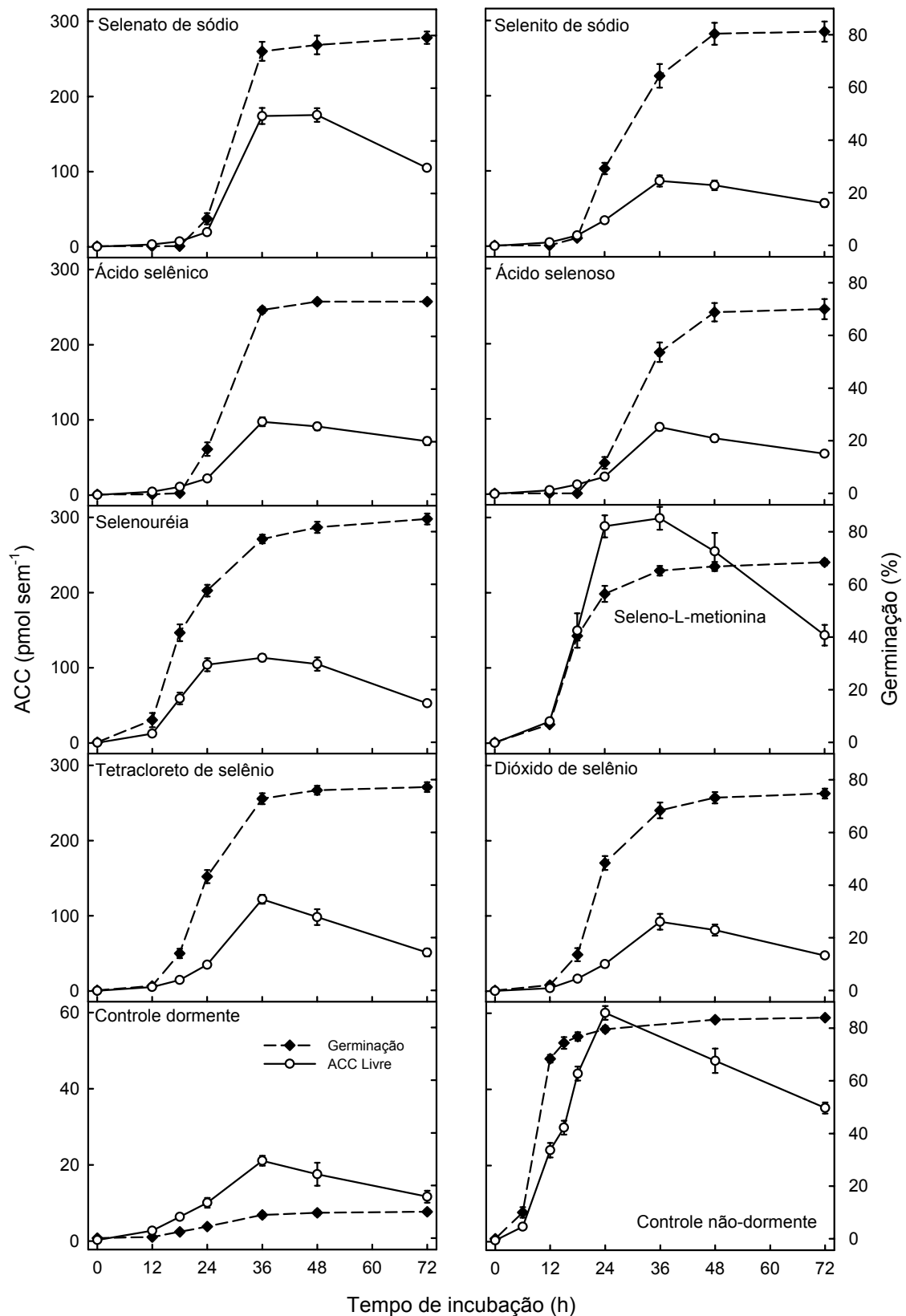


Figura 13.2 - Níveis de ACC livre e germinação de sementes dormentes de estilosante de 15 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita. Níveis de ACC em sementes tratadas com compostos selênicos e controle dormente - média de 4 repetições; níveis de ACC no controle não-dormente e germinação em todos os tratamentos - média de 5 repetições \pm erro da média. Observar a diferença de escala para as sementes não-tratadas (controles)

De forma geral, nas sementes tratadas com selênio o nível de ACC livre atingiu o máximo após 36 h de incubação, quando a germinação já alcançava valores superiores a 60 %, exceção novamente para as sementes tratadas com selenouréia, seleno-L-metionina e as do controle não-dormente cujos níveis atingiram o máximo com 24 h de incubação, correlacionando-se com o aumento da germinação. Após o pico, houve uma queda generalizada no nível de ACC livre em todas as sementes. Esse comportamento indica que as sementes do controle dormente exibiram germinação inexpressiva porque não foram estimuladas por um agente capaz de promover um acúmulo de ACC livre que levasse à biossíntese de etileno (Kępczyński e Kępczyńska 1997). E nas sementes do controle não-dormente, embora tenha sido determinado teor de ACC livre bem menor em relação às sementes tratadas com selênio, a produção de etileno foi equivalente às sementes tratadas, e em alguns casos até superior (Fig 10.1 e 10.2). Deve ser considerado também, que nas sementes não-dormentes, o ACC livre provavelmente tenha sido consumido para a produção de etileno durante a germinação, o que possivelmente justificaria seu baixo teor em relação às sementes dormentes tratadas com selênio, cujos teores de ACC livre começaram a diferir significativamente (teste t $p \leq 0,05$) das sementes do controle dormente, a partir de 12 h de embebição para as sementes tratadas com selenouréia e seleno-L-metionina e, com 36 h para as sementes tratadas com os demais compostos selênicos.

4.12 Níveis de ACC conjugado e total em sementes dormentes expostas aos compostos selênicos

Já antes da incubação, o nível de ACC conjugado era aproximadamente 150 vezes maior que o nível de ACC livre, nas sementes dormentes e 90 vezes maior nas sementes não-dormentes, possivelmente acumulado durante a formação e o desenvolvimento das sementes, e que poderia ser utilizado no início do período de embebição (Sato e Esashi 1984, Matilla 2000). O acúmulo de ACC conjugado talvez seja um fenômeno comum durante a formação de tecidos reprodutivos (Hanley *et al* 1989). Níveis de ACC conjugado 77 vezes maiores que o nível de ACC livre no início da germinação foram observados em sementes de amendoim (Hoffman *et al* 1983), e 116 vezes maiores em sementes de grão-de-bico (Gallardo *et al* 1991). Neste experimento, do início da embebição até 12 h de incubação, nas sementes tratadas com selênio e nas do controle dormente, parece ter ocorrido uma diminuição do teor de ACC conjugado quando expresso com base na MF (Fig 14.1); isso pode ser justificado pelo aumento da MF devido a embebição, mas o teor de ACC conjugado permaneceu constante quando expresso pelo número de sementes (Fig 14.2). Nas sementes do controle não-dormente, o acúmulo de ACC conjugado iniciou-se por volta de 6 h de incubação.

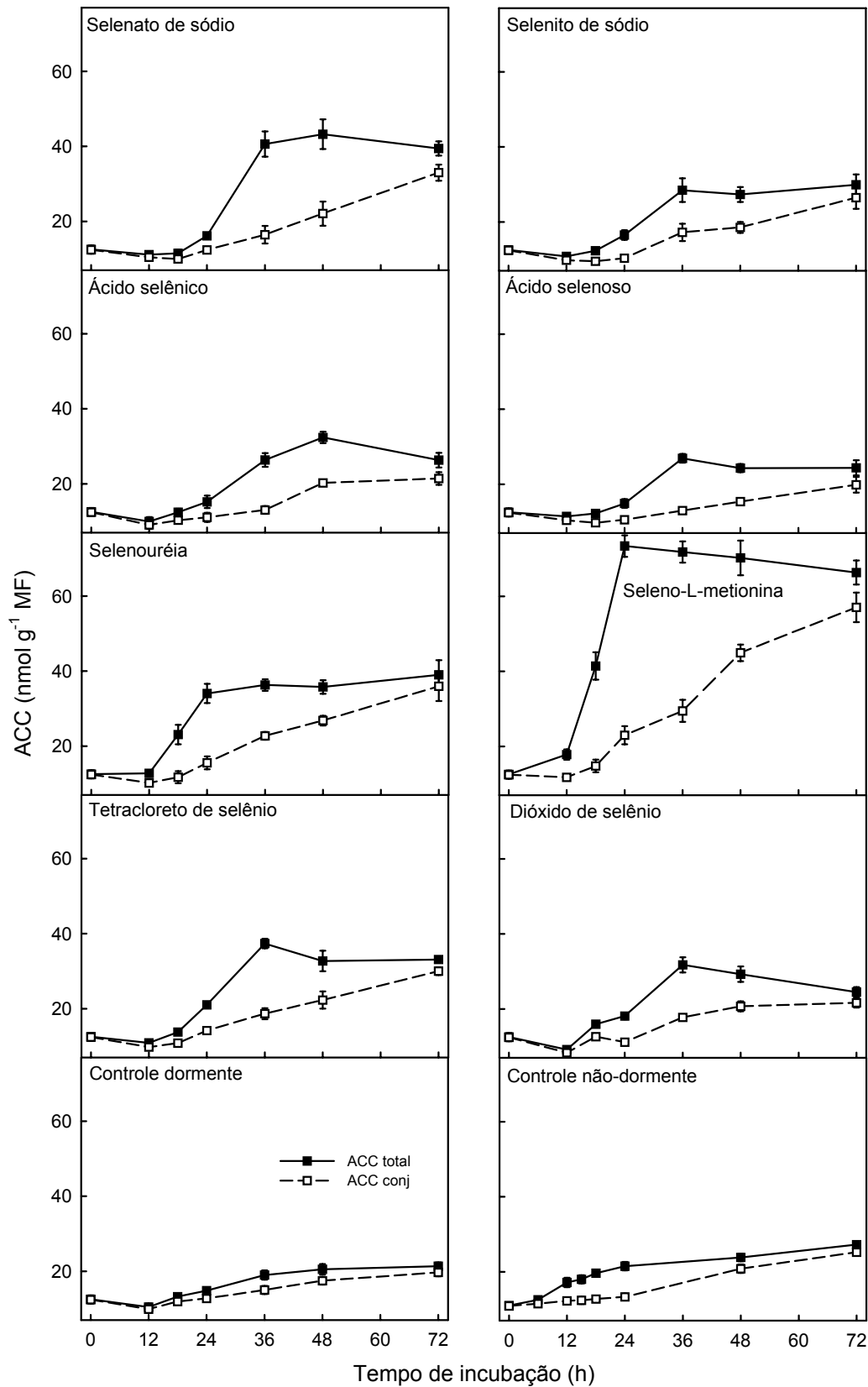


Figura 14.1 - Níveis de ACC conjugado e total em sementes dormentes de estilosante de 15 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita. Níveis de ACC em sementes tratadas com compostos selênicos e controle dormente - média de 4 repetições; controle não-dormente - 5 repetições \pm erro da média

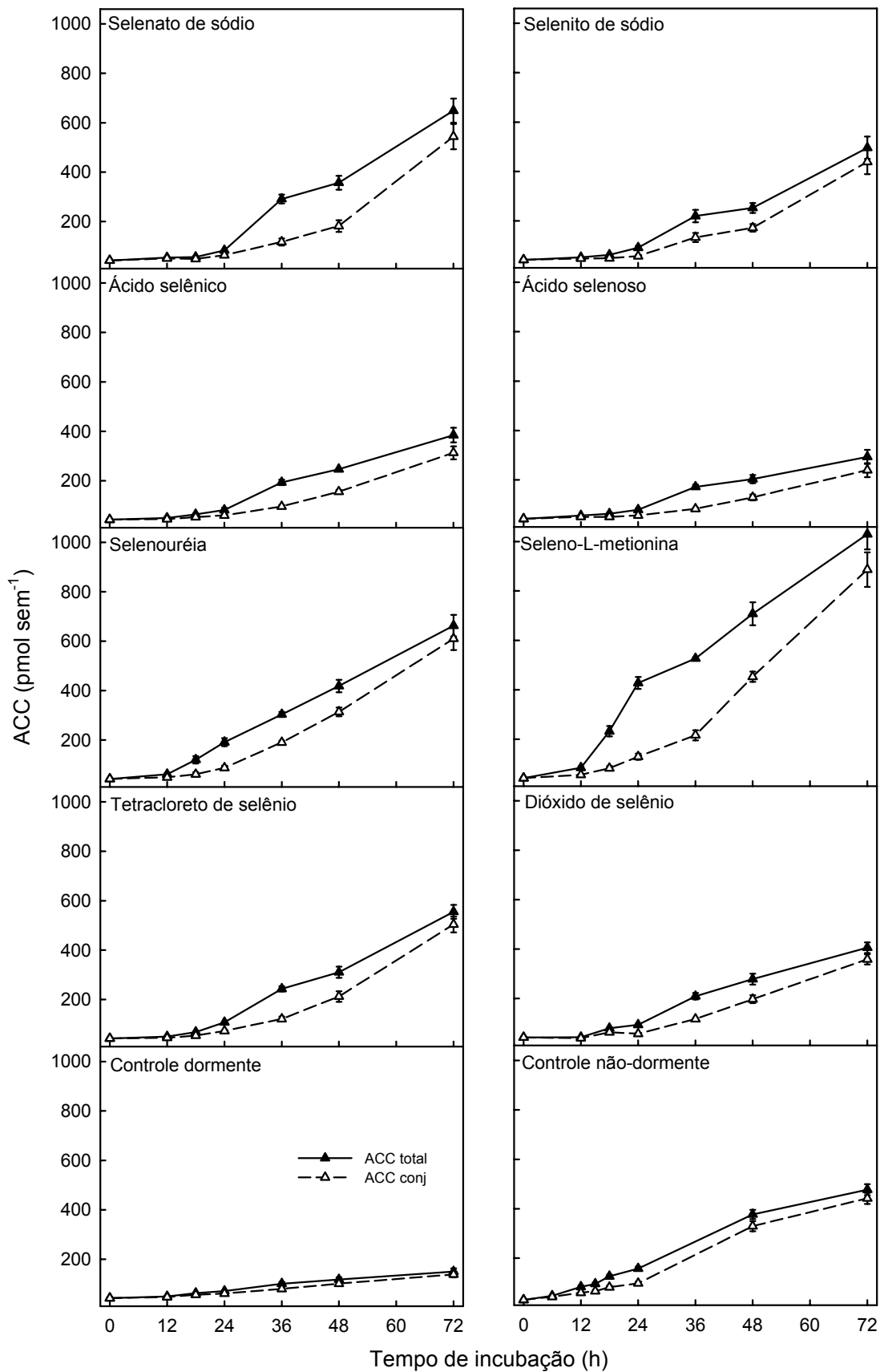


Figura 14.2 - Níveis de ACC conjugado e total em sementes dormentes de estilosante de 15 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita. Níveis de ACC em sementes tratadas com compostos selênicos e controle dormente - média de 4 repetições; controle não-dormente - 5 repetições \pm erro da média

Com 24 h de incubação, em média, as sementes tratadas com selênio apresentavam 37 % do ACC acumulado após a embebição na forma conjugada. As sementes do controle dormente apresentavam 66 %, no mesmo período, e as sementes do controle não-dormente, com 6 h de incubação, apresentavam 78 % do ACC acumulado na forma conjugada. Nesses períodos, a demanda pelo consumo de ACC livre foi grande, mostrando-se associado com o início da germinação (Fig 13.1 e 13.2), o que sugere que boa parte do ACC biossintetizado durante a germinação também não é consumido. Os motivos para esse acúmulo de ACC na forma conjugada são desconhecidos (Matilla 2000). Aumentos do teor de ACC conjugado a partir de 12 h de incubação também foram observados quando sementes dormentes de estilosante foram expostas a baixo pH do meio de germinação (Pelacani 2001).

A principal forma de conjugação do ACC, em tecidos vegetais, é o malonil-ACC (MACC), que parece irreversível para a forma livre e é também biologicamente inativo (Yang e Hoffman 1984, Mansour *et al* 1986). Contudo, existem relatos de que, sob certas condições de estresse, o MACC possa ser hidrolisado, servindo como fonte de ACC livre (Jiao *et al* 1986, Hanley *et al* 1989). A conjugação funcionaria como um mecanismo para controlar um possível excesso de ACC livre, o que regularia a biossíntese de etileno (Martin-Remesal *et al* 2000). Neste experimento, de forma geral, nas sementes tratadas com todos os compostos selênicos, verificou-se um crescente acúmulo de ACC conjugado a partir de 24 h (Fig 14.1 e 14.2), paralelo ao acréscimo do teor de ACC livre até este atingir o nível máximo, continuando o acúmulo de ACC conjugado até 72 h. Isso sugere que mesmo após atingir-se o nível de ACC livre suficiente para o etileno promover a quebra da dormência, a sintase do ACC e a malonil-transferase do ACC continuariam bastante ativas.

4.13 Caracterização da atividade da oxidase do ACC *in vitro*

Para avaliarem-se os efeitos dos compostos selênicos na ativação da rota biossintética do etileno durante a quebra da dormência das sementes de estilosante, determinou-se a atividade e fez-se a caracterização da oxidase do ACC. As condições iniciais de estudo foram baseadas naquelas descritas por Fernández-Maculet e Yang (1992), para frutos de maçã cv Golden Delicious. Dentre os vários sistemas-tampão testados, o tampão Tris-HCl 100 mol m⁻³, pH 7,0 nos meios de extração e de reação foi o que proporcionou a melhor atividade da enzima (Fig 15.1, 15.2 e 15.3). O pH 7,0 também se mostrou ótimo para a atividade da oxidase do ACC de eixo embrionário de sementes de grão-de-bico, com tampão HEPES (200 mol m⁻³) (De Rueda *et al* 1995) e de frutos de mamão (*Carica papaya*) cv Sunrise Solo, com o tampão Tris-HCl (100 mol m⁻³) (Dunkley e Golden 1998). No entanto, diferiu no valor do pH para outros materiais, tais como pH 6,7 para extrato de frutos de pêra (*Pyrus communis*) cv Blanquilla, com tampão

HEPES (100 mol m^{-3}) (Vioque e Castellano 1994), pH 7,2 em frutos de maçã cv Golden Delicious, com tampão Tris-HCl (100 mol m^{-3}) (Fernández-Maculet e Yang 1992), pH 7,2 de frutos de melão (*Cucumis melo* L.), com tampão Tris-HCl (100 mol m^{-3}) (Ververidis e John 1991), pH 7,2 com enzima purificada de fruta-pão (*Artocarpus altilis*) cv White heart, com tampão Tris-HCl (100 mol m^{-3}) (Williams e Golden 2002) e pH 7,5 em frutos de abacate (*Persea americana* Mill.) cv Hass, com tampão Tris-HCl (100 mol m^{-3}) (McGarvey e Christoffersen 1992). Observa-se que os valores de pH variando de 6,5 a 7,2 (Fig 15.1, 15.2 e 15.3), determinados nesse ensaio, apresentaram boa atividade da enzima e estão de acordo com os valores encontrados por outros autores em diversos materiais.

A melhor temperatura para a atividade da oxidase do ACC do extrato de sementes de estilozante foi de 32 °C (Fig 15.1, 15.2 e 15.3), e a atividade manteve-se alta com pouca variação no intervalo entre 30 e 35 °C. Em frutos de abacate, McGarvey e Christoffersen (1992), utilizando fracionamento com sulfato de amônia, encontraram dois tipos de oxidase do ACC designadas EFE1 e EFE2, em que a temperatura ótima da EFE1 variou de 25 – 30 °C, não se fazendo relato para a EFE2. Vioque e Castellano (1994) determinaram as temperaturas (28 e 38 °C) em que a atividade da oxidase do ACC em frutos de pêra foi máxima. O resultado desses dois últimos autores diferiu desta pesquisa, porque a 32 °C, esses autores encontraram uma redução significativa da atividade, justificada por eles pela expressão de duas formas de oxidase do ACC, sob diferentes temperaturas. De Rueda *et al* (1995) também determinaram dois pontos de atividade máxima, a 27,5 e 35 °C, com redução de atividade a 30 °C. Para enzima purificada do extrato de fruta-pão, a temperatura ótima foi de 28 °C (Williams e Golden 2002). A temperatura ótima para a atividade da enzima *in vivo* em frutos de maçã foi de 30 °C (Yang e Hoffman 1984).

A acumulação de etileno durante os ensaios de atividade foi linear com o tempo no intervalo de 15 a 150 min (Fig 15.1, 15.2 e 15.3), seguida de diminuição de atividade, possivelmente devido a inativação da enzima. Para adequarem-se as condições de trabalho, foi escolhido o tempo de 120 min, assegurando-se assim maior acúmulo de etileno durante a reação. Em condições de ensaio semelhantes, Fernández-Maculet e Yang (1992), trabalhando com oxidase do ACC de extrato de maçã e Dunkley e Golden (1998), com extrato de frutos de mamão, obtiveram relação linear de produção de etileno com tempo superior a 120 min. De Rueda *et al* (1995), em extrato do eixo embrionário de sementes de grão-de-bico, obtiveram atividade da oxidase do ACC linear com o tempo de incubação durante 90 min. Kruzmane e Ievinsh (1999), trabalhando com plântulas de cevada (*Hordeum vulgare* L) cv Abava, obtiveram relação linear de acúmulo de etileno durante o ensaio de atividade somente ente 10 e 40 min.

O tempo de 120 min de incubação também foi usado em ensaios com a oxidase do ACC purificada do extrato de fruta-pão, por Williams e Golden (2002). O tempo de reação mais

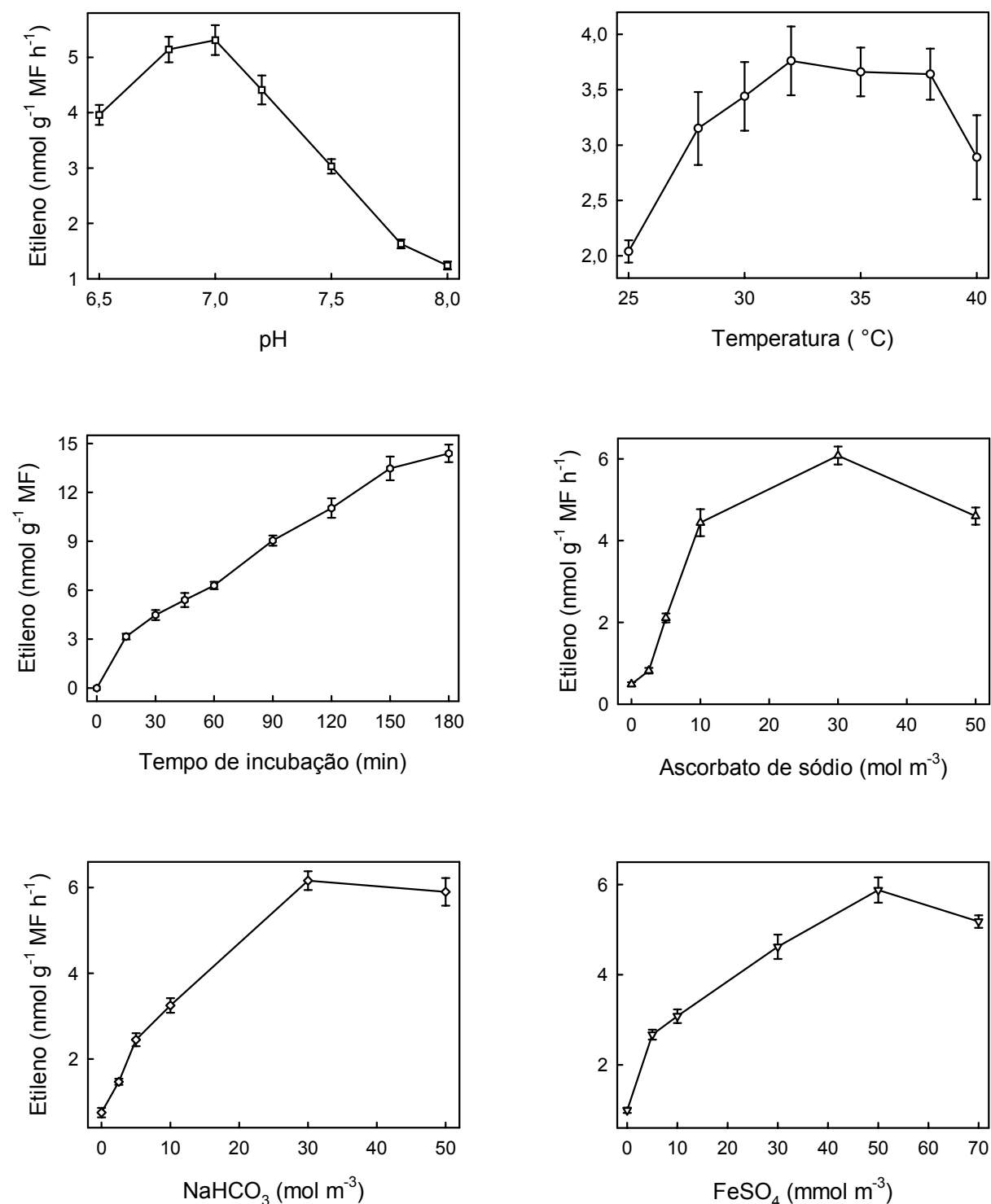


Figura 15.1 - Efeito do pH, da temperatura, do tempo de incubação e dos cofatores ascorbato de sódio, NaHCO₃ e FeSO₄, sobre a atividade da oxidase do ACC. O pH do meio de extração para avaliar-se o efeito do pH foi 7,2. O efeito particular de cada fator ou cofator foi medido sob condição ótima dos demais fatores. Extrato de sementes não-dormentes de aproximadamente 360 dias de idade pós-colheita, incubadas em HCl-KOH pH 7,0, por 18 h. Média de 5 repetições ± erro da média

utilizado tem sido de 60 min (Ververidis e John 1991, Smith e John 1993, Rodriguez-Gacio e Matilla 2001). Portanto, ainda que nas condições deste trabalho o tempo de 120 min tenha sido satisfatório, mais estudos são necessários para avaliar-se o melhor tempo de incubação.

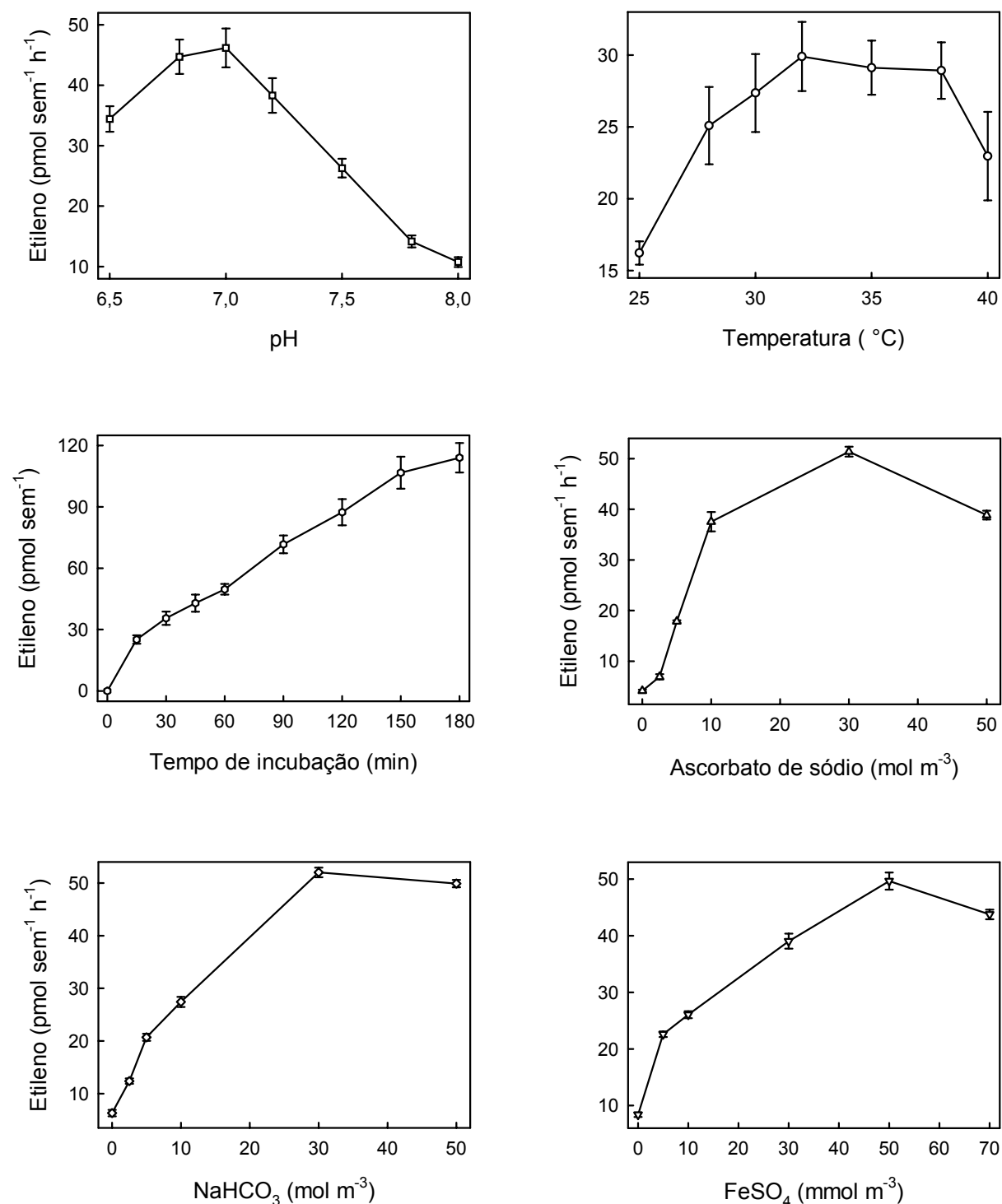


Figura 15.2 - Efeito do pH, da temperatura, do tempo de incubação e dos cofatores ascorbato de sódio, NaHCO₃ e FeSO₄, sobre a atividade da oxidase do ACC. O pH do meio de extração para avaliar-se o efeito do pH foi 7,2. O efeito particular de cada fator ou cofator foi medido sob condição ótima dos demais fatores. Extrato de sementes não-dormentes de aproximadamente 360 dias de idade pós-colheita, incubadas em HCl-KOH pH 7,0, por 18 h. Média de 5 repetições ± erro da média

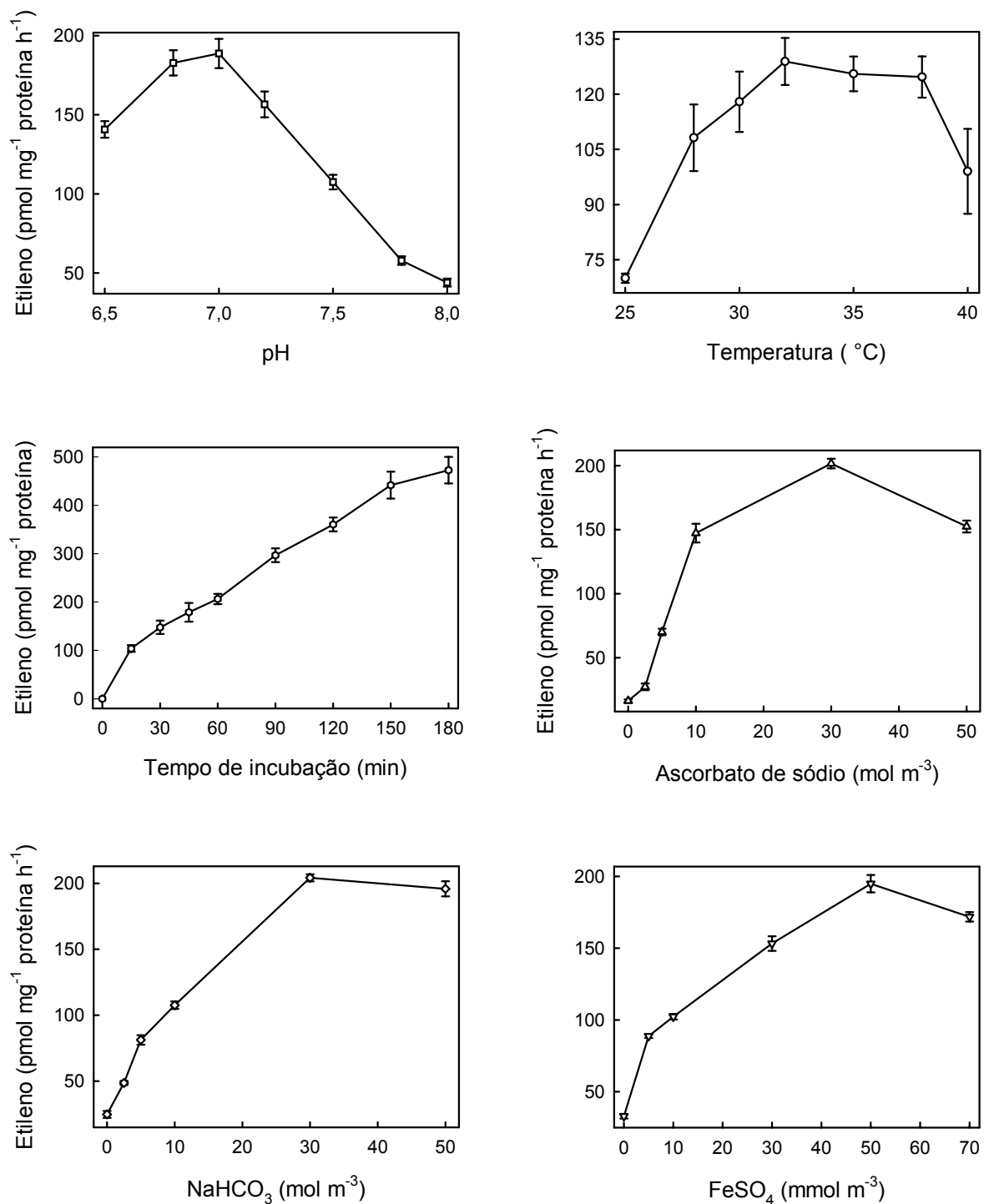


Figura 15.3 - Efeito do pH, da temperatura, do tempo de incubação e dos cofatores ascorbato de sódio, NaHCO₃ e FeSO₄, sobre a atividade da oxidase do ACC. O pH do meio de extração para avaliar-se o efeito do pH foi 7,2. O efeito particular de cada fator ou cofator foi medido sob condição ótima dos demais fatores. Extrato de sementes não-dormentes de aproximadamente 360 dias de idade pós-colheita, incubadas em HCl-KOH pH 7,0, por 18 h. Média de 5 repetições ± erro da média

O requerimento de alguns cofatores pela oxidase do ACC de semente de estilante foi determinado sob condições ótimas dos outros fatores. Semelhantemente a outros materiais, o requerimento por ascorbato de sódio foi muito acentuado e a atividade da enzima foi muito reduzida quando a extração foi executada sem ascorbato de sódio. Utilizou-se, então, a

concentração de 30 mol m^{-3} de ascorbato de sódio no meio de extração para impedir a oxidação do extrato de sementes. Esse nível também foi usado no meio de extração de outros materiais (Fernández-Maculet e Yang 1992, McGarvey e Christoffersen 1992, Moya-Leon e John 1995, Kruzmane e Ievinsh 1999). O efeito do ascorbato de sódio no meio de reação é mostrado na Fig 15.1, 15.2 e 15.3, observando-se que 30 mol m^{-3} proporcionaram uma maior atividade da enzima e, portanto, esse nível foi utilizado em todos os outros experimentos em ensaio *in vitro*. Esse valor também foi encontrado para a oxidase do ACC de frutos de melão (Ververidis e John 1991, Smith e John 1993), frutos de abacate (McGarvey e Christoffersen 1992), frutos de banana (*Musa* grupo AAA) subgrupo Cavendish (Moya-Leon e John 1995), plântulas de cevada e pinheiro (Kruzmane e Ievinsh 1999). Níveis mais baixos foram encontrados em outros materiais, como 10 mol m^{-3} em frutos de pêra (Vioque e Castellano 1994) e $6,0 \text{ mol m}^{-3}$ em eixo embrionário de sementes de grão-de-bico (De Rueda *et al* 1995); no último material encontrou-se forte inibição da enzima sob valores superiores a $6,0 \text{ mol m}^{-3}$. Além de funcionar como cofator da enzima, o ascorbato de sódio é antioxidante, protegendo o meio de reação contra o ataque de agentes oxidativos (Kende 1993).

A conversão do ACC para etileno é ativada por CO_2 (Fernández-Maculet *et al* 1993, Fluhr e Mattoo 1996), que pode ser fornecido como NaHCO_3 , na mistura de reação. Com NaHCO_3 , a conversão de ACC para etileno mostrou-se superior à injeção de CO_2 na atmosfera do meio (Smith e John 1993); por isso, utilizou-se o NaHCO_3 no meio de reação. O nível que proporcionou melhores resultados de atividade da oxidase do ACC foi 30 mol m^{-3} (Fig 15.1, 15.2 e 15.3), semelhante ao encontrado por Smith e John (1993), com a oxidase do ACC de extrato dessalinizado de frutos de melão. Nível ótimo menor (20 mol m^{-3}) foi encontrado em extrato de banana (Moya-Leon e John 1995) e plântulas de cevada e pinheiro (Kruzmane e Ievinsh 1999). Níveis mais baixos provocaram sensível perda de atividade da enzima, enquanto níveis mais altos que 30 mol m^{-3} não reduziram tanto a atividade.

O nível ótimo de Fe^{2+} para a atividade da oxidase do ACC de sementes de estilósante foi 50 mmol m^{-3} , mostrado nas Fig 15.1, 15.2 e 15.3. Foi semelhante ao encontrado em frutos de maçã (Fernández-Maculet e Yang 1992) e flores de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) cv White Sim (Nijenhuis-De Vries *et al* 1994). Esse nível foi bem inferior ao de 200 mmol m^{-3} encontrado em pêra (Vioque e Castellano 1994), e 100 mmol m^{-3} , em frutos de abacate (McGarvey e Christoffersen 1992) e banana (Moya-Leon e John 1995). Mas foi superior a 10 mmol m^{-3} encontrado para plântulas de cevada e pinheiro (Kruzmane e Ievinsh 1999) e 4 mmol m^{-3} para o eixo embrionário de sementes de grão-de-bico (De Rueda *et al* 1995). Os dois últimos níveis são muito baixos em relação a outros materiais, e são explicados, possivelmente, pela existência de altos níveis de ferro endógenos naqueles materiais. Níveis maiores que 50 mmol m^{-3} provocaram redução da atividade da enzima e, sob valores muito baixos, também houve redução da atividade, devido à falta de Fe^{2+} .

4.14 Cinética da oxidase do ACC *in vitro*

A atividade da oxidase do ACC ensaiada em extrato de sementes não-dormentes de estilozante seguiu a cinética de Michaelis-Menten e o K_m aparente mostrou-se em torno de 75 mmol m^{-3} de ACC, com base na MF, por semente ou por proteína (Fig 16, inserto). Esse valor indica uma alta afinidade da enzima pelo substrato, e foi próximo dos 85 mmol m^{-3} encontrado em frutos de melão (Ververidis e John 1991), 77 mmol m^{-3} em plântulas de cevada cv Abava, 61 mmol m^{-3} em plântulas de pinheiro (*Pinus sylvestris* L.) (Kruzmane e Ievinsh 1999), e $57,5 \text{ mmol m}^{-3}$ em pêra cv Blanquilla (Vioque e Castellano 1994). Mostrou-se mais alto do que os 32 mmol m^{-3} determinados em frutos de abacate cv Hass (McGarvey e Christoffersen 1992), 28 mmol m^{-3} em eixo embrionário de sementes de grão-de-bico (De Rueda *et al* 1995) e menor que 175 mmol m^{-3} em abóbora de inverno (*Cucurbita maxima* Duch.) cvs Ebisu e Miyako (Hyodo *et al* 1993). Observa-se, portanto, que há uma grande variação do valor de K_m , que depende do material analisado.

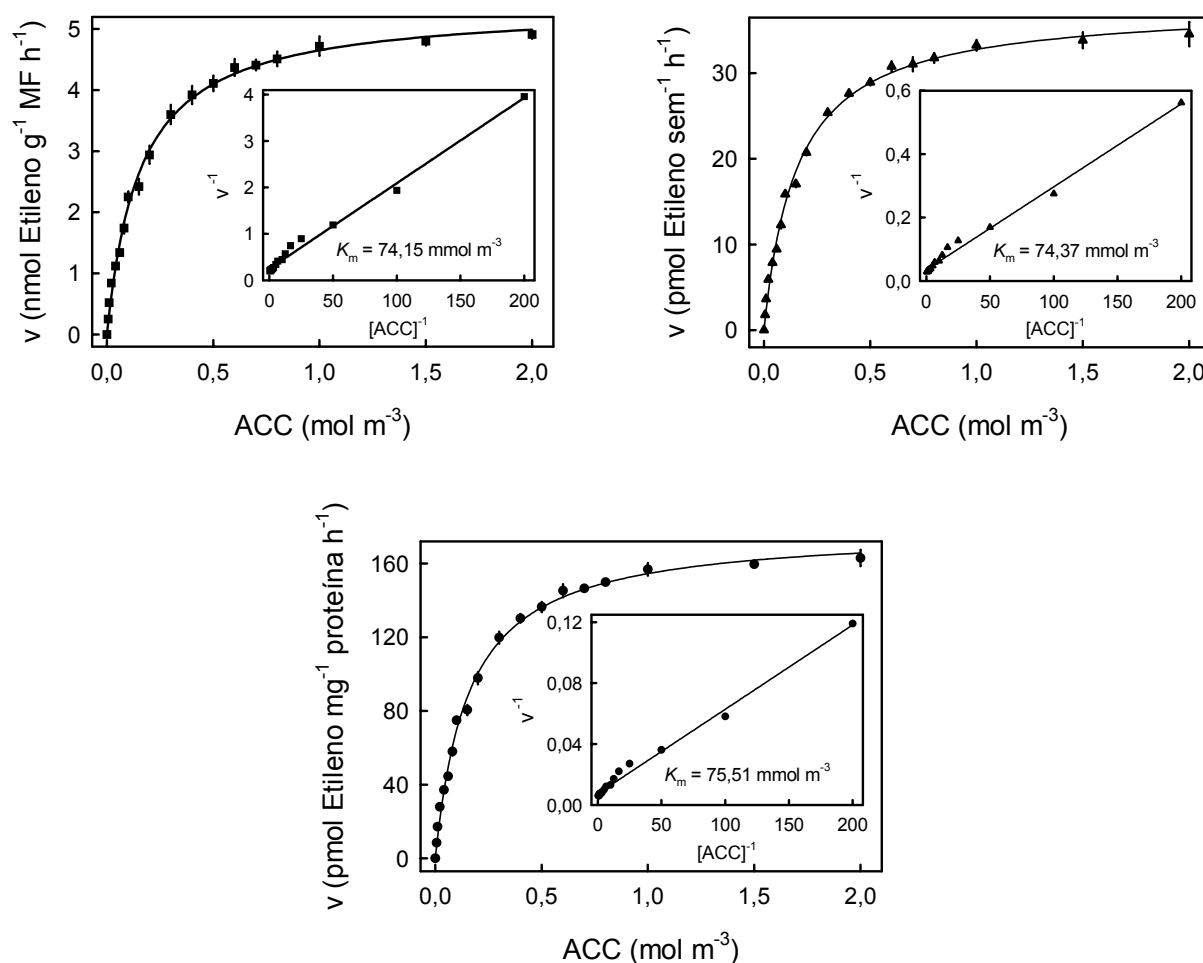


Figura 16 - Efeito da concentração de ACC sobre a produção de etileno em extrato enzimático de sementes não-dormentes de estilozante de 300 dias de idade pós-colheita, incubadas por 18 h e representação de Lineweaver-Burk (insertos), com K_m indicados. Média de 5 repetições \pm erro da média

4.15 Inibição da atividade da oxidase do ACC *in vitro*

Um dos mais conhecidos inibidores da atividade da oxidase do ACC é o Co^{2+} (Yang e Hoffman 1984). Neste trabalho, porém, não foi possível avaliar-se seu efeito *in vitro*, por ter ocorrido produção química de etileno nas diversas tentativas efetuadas, quando se empregou o Co^{2+} . Utilizaram-se então, outros inibidores da oxidase do ACC, mostrado na Fig 17.1, 17.2 e 17.3, em extratos de sementes não-dormentes.

A inibição máxima da atividade da oxidase do ACC causada pelo AMIB foi de 65 %, valor considerado baixo, principalmente porque a concentração do inibidor foi alta (100 mol m⁻³). Corroboram, no entanto, os resultados descritos para a inibição *in vitro* em maçã cv Golden Delicious (Fernández-Maculet e Yang 1992) e abacate cv Hass (McGarvey e Christoffersen 1992), sob concentrações bem menores. Mesmo sendo o AMIB um análogo estrutural do ACC (Satoh e Esashi 1980), seu efeito de inibição competitiva tem sido descrito como muito baixo (Vioque e Castellano 1994, De Rueda *et al* 1995). Em condições *in vivo*, provocou o acúmulo de ACC livre em tecido de segmentos cotiledonares de *Xanthium pennsylvanicum* Wallr, impedindo a conversão do ACC em etileno (Satoh e Esashi 1983). Por isso, tem-se sugerido que o AMIB confere ativação da sintase do ACC (Malerba *et al* 1996).

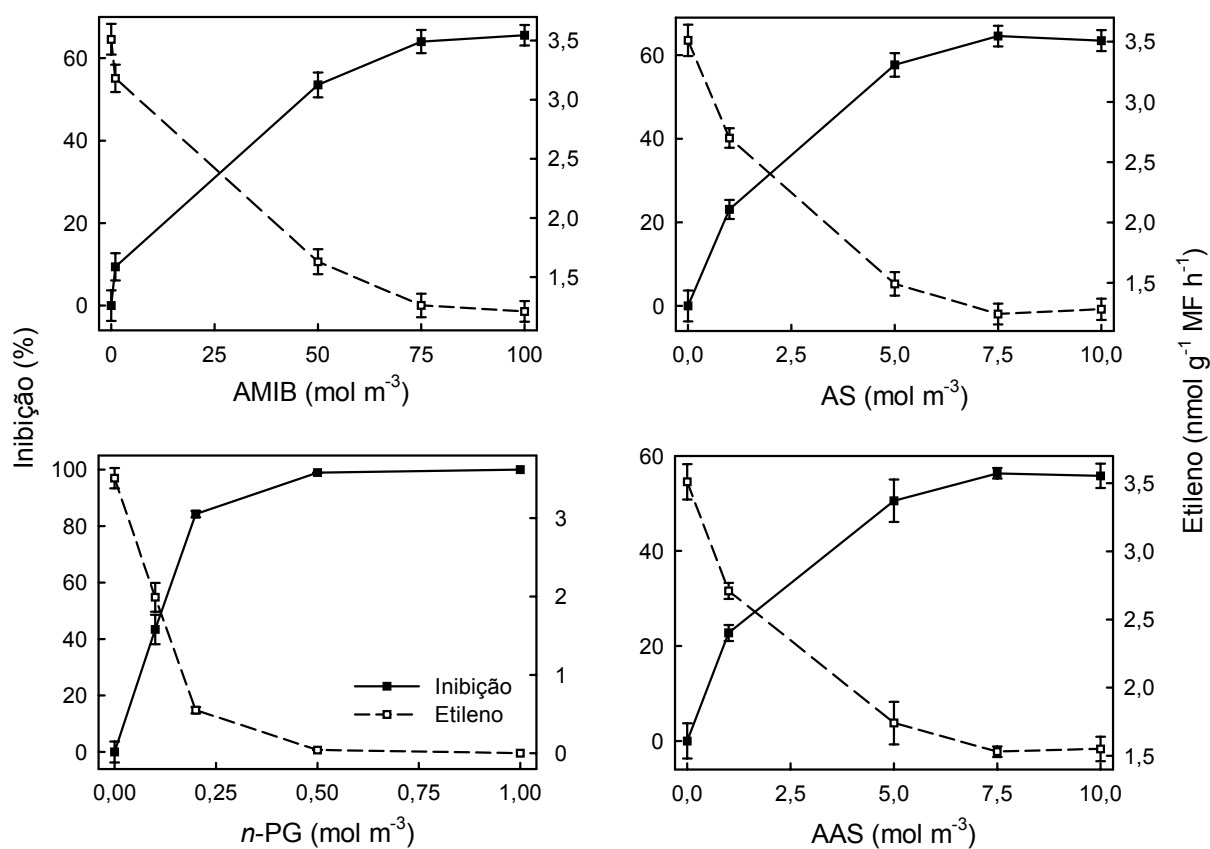


Figura 17.1 - Efeito da inibição da atividade da oxidase do ACC por ácido α -amino-isobutírico (AMIB), ácido salicílico (AS), *n*-propil galato (*n*-PG) e ácido acetil-salicílico (AAS), adicionados ao meio de reação com extrato de sementes não-dormentes de 300 dias de idade pós-colheita, embebidas por 18 h. Média de 5 repetições \pm erro da média

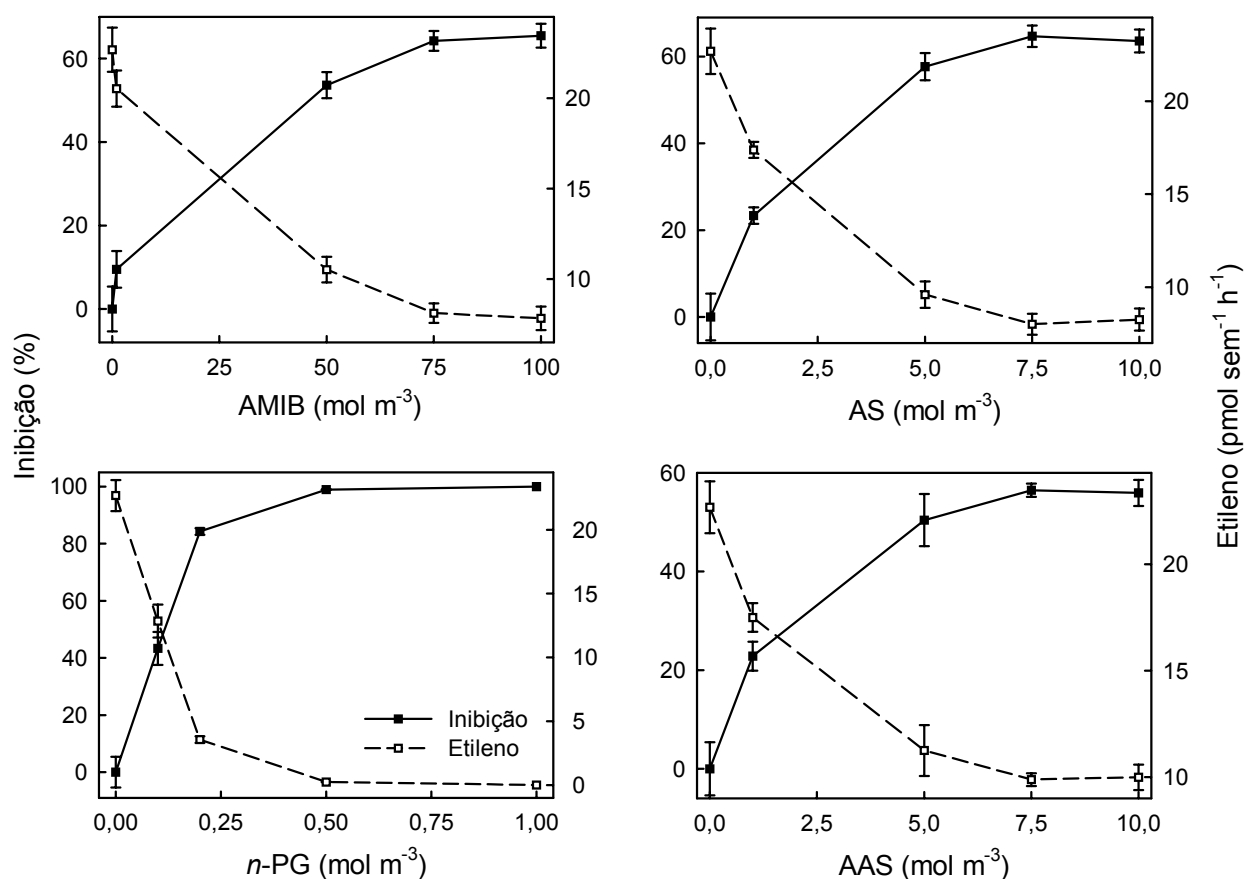


Figura 17.2 - Efeito da inibição da atividade da oxidase do ACC por ácido α -amino-isobutírico (AMIB), ácido salicílico (AS), *n*-propil galato (*n*-PG) e ácido acetil-salicílico (AAS), adicionados ao meio de reação com extrato de sementes não-dormentes de 300 dias de idade pós-colheita, embebidas por 18 h. Média de 5 repetições \pm erro da média

Em sementes dormentes de estilozante estimuladas a germinar pelo baixo pH do meio de germinação, o AMIB (50 mol m^{-3}) inibiu a germinação em 55 %, em sementes embebidas em placa de Petri. Com sementes não-dormentes, à mesma concentração, inibiu a produção de etileno em 52 %, mas reduziu a germinação em somente 7 % (Pelacani 2001). Portanto, o AMIB aparentemente não se mostra um bom inibidor da atividade da oxidase do ACC, exigindo concentrações muito altas para pouca inibição.

O efeito inibitório do AS *in vitro*, na concentração máxima usada (10 mol m^{-3}), foi de 63 % (Fig 17.1, 17.2 e 17.3). Semelhante inibição foi determinada com a oxidase do ACC do extrato de eixo embrionário de sementes de grão-de-bico (De Rueda *et al* 1995), e enzima parcialmente purificada de frutos de melão (Smith *et al* 1992), porém sob concentração 10 vezes menor. O efeito de inibição da biossíntese do etileno, usando-se AS, também foi demonstrado, sob baixas concentrações, em culturas de célula de pêra cv Passe Crassane com resultados bem significativos (Leslie e Romani 1986, 1988). O AS também inibiu a germinação de sementes dormentes de estilozante, incubadas sob baixo pH (Pelacani 2001).

Com o AAS, a inibição máxima da atividade da oxidase do ACC foi de 56 % (Fig 17.1, 17.2 e 17.3), resultado semelhante ao determinado para AS, e possivelmente explicado pela transformação de AAS em AS em solução aquosa. Em maçã, demonstrou-se o efeito de inibição da oxidase do ACC, por AAS, tanto *in vitro* como *in vivo* (Fan *et al* 1996). Os efeitos de inibição ocorreram sob concentração 1000 vezes menor. O AAS também inibiu em 55 % a germinação de sementes dormentes de estilosante, expostas a baixo pH do meio de germinação, em placa de Petri, sob concentração de $1,0 \text{ mol m}^{-3}$. Inibiu também a produção de etileno em 61 % e a germinação de sementes não-dormentes em 8 %, àquela concentração (Pelacani 2001).

O *n*-PG mostrou-se o inibidor da atividade *in vitro* da oxidase do ACC utilizado mais eficiente, chegando a promover 100 % de inibição, sob a concentração de $1,0 \text{ mol m}^{-3}$ (Fig 17.1, 17.2 e 17.3). Inibição de 98,7 %, usando-se $3,0 \text{ mol m}^{-3}$, foi observada em extrato de frutos de melão var Galia (Smith *et al* 1992), 91 % ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$), em extrato do eixo embrionário de sementes de grão de bico cv Castellana (De Rueda *et al* 1995), e 100 % ($0,5 \text{ mol m}^{-3}$), em frutos de pêra cv Blanquilla (Castellano e Vioque 2000). Inibições menores, como 46 % ($0,2 \text{ mol m}^{-3}$), com a enzima purificada de fruta-pão (*Artocarpus altilis*) cv white heart (Williams e Golden 2002)

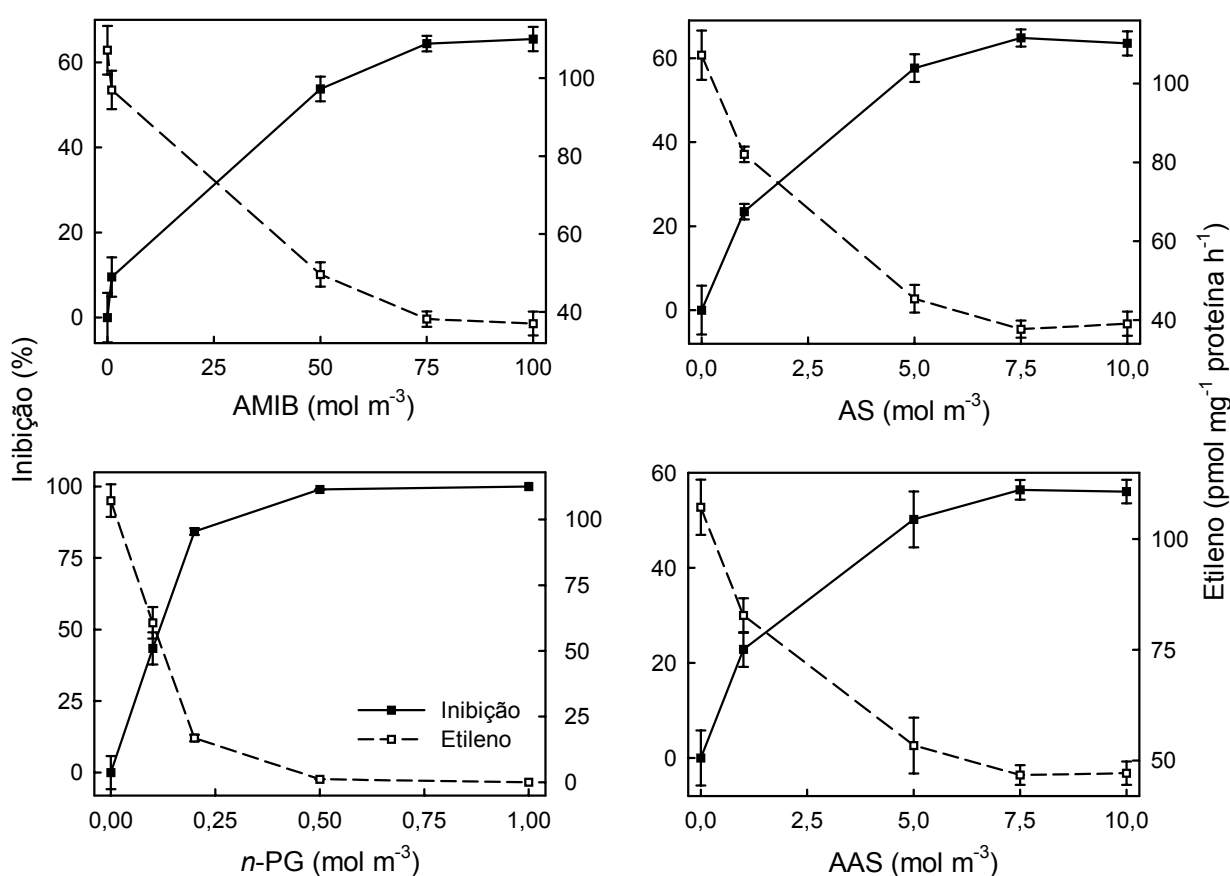


Figura 17.3 - Efeito da inibição da atividade da oxidase do ACC por ácido α -amino-isobutírico (AMIB), ácido salicílico (AS), *n*-propil galato (*n*-PG) e ácido acetil-salicílico (AAS),

adicionados ao meio de reação com extrato de sementes não-dormentes de 300 dias de idade pós-colheita, embebidas por 18 h. Média de 5 repetições \pm erro da média e 16,6 % ($0,24 \text{ mol m}^{-3}$), e com a enzima purificada de frutos de mamão (*Carica papaya*) cv Sunrise Solo (Dunkey e Golden 1998), também foram descritas.

A oxidase do ACC pode ser inibida por uma grande variedade de compostos. O *n*-PG é um dos mais poderosos extintores de radicais livres em tecidos de plantas e seu efeito como inibidor da biossíntese de etileno em plantas já foi demonstrado (Apelbaum *et al* 1981b). Satoh e Esashi (1983) compararam a eficiência de *n*-PG e Co^{2+} sobre produção de etileno por cotilédones de *Xanthium pennsylvanicum* Wallr e encontraram que *n*-PG 10 mol m^{-3} ou Co^{2+} $0,2 \text{ mol m}^{-3}$ inibiram a produção de etileno em 80 %. Em tecido de maçã, para atingir-se a inibição de 93 % foi necessário $1,0 \text{ mol m}^{-3}$ de *n*-PG (Apealbaum *et al* 1981b). O composto foi ineficiente em inibir a produção de etileno em segmentos florais de *Ipomoea tricolor* Cav (Konze *et al* 1980) e em suspensão de células de maçã. No último material, o Co^{2+} em baixas concentrações inibiu a produção de etileno (Yang e Hoffman 1984). Para inibir a atividade da oxidase do ACC purificada de fruta-pão cv white heat em 46,1 %, foram necessários $0,2 \text{ mol m}^{-3}$, enquanto Co^{2+} , a $0,1 \text{ mol m}^{-3}$, inibiu a atividade em 91,7 %. Considerando-se que a ação do *n*-PG não é muito específica e exige concentrações relativamente altas para exercer a inibição, resta saber se inibe a produção de etileno realmente agindo como extintor de radicais livres.

4.16 Cinética da oxidase do ACC *in vivo*

A cinética *in vivo* da oxidase do ACC de sementes dormentes de estilosante foi avaliada em dois períodos com 15 h, quando a taxa de produção de etileno de sementes dormentes tratadas com ACC era crescente e 24 h de embebição das sementes em solução de ACC, quando a taxa de produção de etileno dessas sementes, avaliada em outro experimento, atingia o máximo. A atividade seguiu a cinética de Michaelis-Menten e os valores de K_m são indicados na Fig 18.1 e 18.2. O K_m aparente de 44 mmol m^{-3} encontrado com 15 h de embebição, correspondendo, possivelmente, ao valor mais exato, quando a atividade da oxidase do ACC era crescente e, a pequena elevação do valor do K_m observada no horário de 24 h, pode ser explicada por uma possível perda de atividade da enzima, reduzindo a afinidade pelo substrato, o que altera a V_{max} .

O K_m aparente *in vivo* para a oxidase do ACC nas sementes dormentes de estilosante sob 15 h de embebição mostrou-se próximo ao valor 34 mmol m^{-3} encontrado em segmentos de feijão (*Vigna radiata* L.) (Yip *et al* 1988), e inferior a 120 mmol m^{-3} , determinado em folhas estioladas de trigo e em eixo embrionário de sementes de grão-de-bico (Yip *et al* 1988, De Rueda *et al* 1995). O K_m aparente determinado *in vivo*, em sementes dormentes, foi um

pouco menor que o K_m determinado *in vitro* em sementes não-dormentes de estilosate (Fig 16), possivelmente porque as condições da enzima no tecido vegetal sejam mais adequadas.

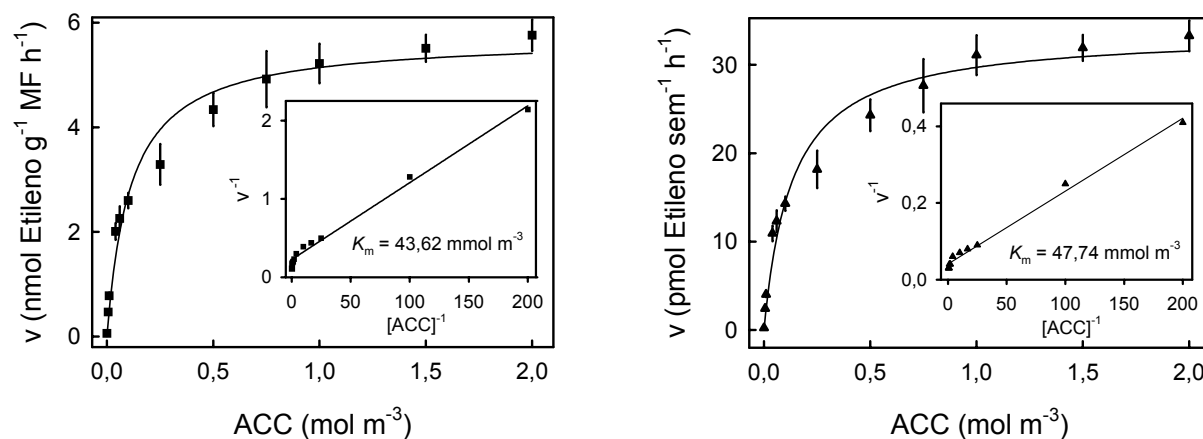


Figura 18.1 - Efeito do ACC sobre a produção de etileno em sementes dormentes de estilosate de 80 dias de idade pós-colheita, obtida após 15 h de embebição na solução do substrato, e representação de Lineweaver-Burk, mostrada nos insertos, com os respectivos K_m aparentes indicados. Média de 5 repetições \pm erro da média

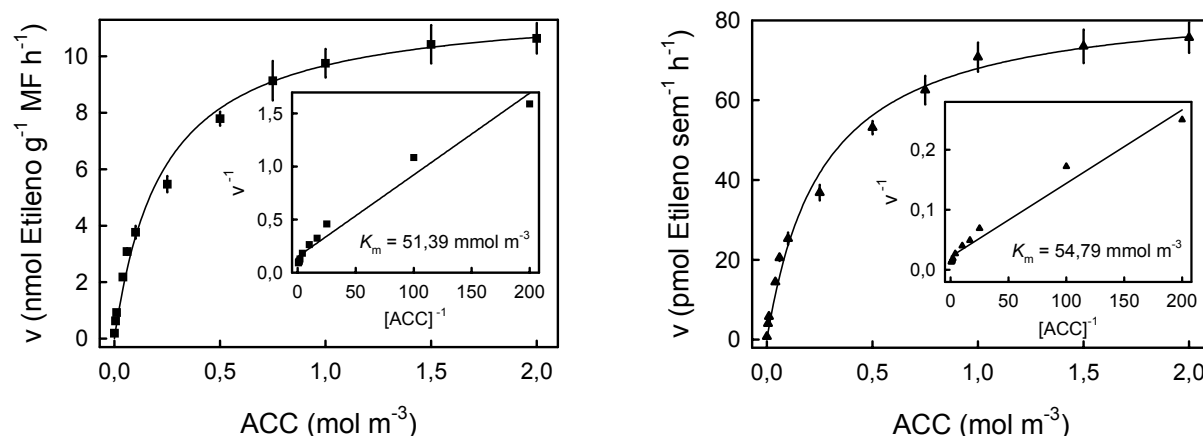


Figura 18.2 - Efeito do ACC sobre a produção de etileno em sementes dormentes de estilosate de 80 dias de idade pós-colheita, obtida após 24 h de embebição na solução do substrato, e representação de Lineweaver-Burk, mostrada nos insertos, com os respectivos K_m aparentes indicados. Média de 5 repetições \pm erro da média

4.17 Efeito de inibidores da atividade da oxidase do ACC sobre a produção de etileno *in vivo*

A inibição da atividade da oxidase do ACC *in vivo* foi avaliada expondo-se, inicialmente, as sementes dormentes, por um primeiro período de 24 h, aos inibidores Co^{2+} e *n*-PG, para só então, num segundo período, avaliarem-se os efeitos de inibição em dois horários, com 15 h (Tab 3.1) e 24 h (Tab 3.2) de exposição das sementes ao inibidor mais ACC. E cada efeito de inibição foi avaliado em relação ao controle (sem inibidor), com teor correspondente de ACC, após a transferência, como indica a Tab 3.1.

Co^{2+} é um conhecido inibidor da biossíntese de etileno, por bloquear a conversão de ACC para etileno (Yu e Yang 1979), pela enzima oxidase do ACC (Yang e Hoffman 1984). Por isso, quando as sementes dormentes de estilante foram tratadas com Co^{2+} tiveram a produção de etileno inibida em mais de 90 % (Tab 3.1 e 3.2), e o nível de inibição persistiu até 24 h após as sementes terem sido expostas ao inibidor mais ACC. O tratamento de sementes dormentes de estilante com Co^{2+} ($1,0 \text{ mol m}^{-3}$) e estimuladas a germinar por exposição a baixo pH do meio de germinação fez reduzir a germinação em até 70 %. Diminuiu também a produção de etileno em 99,5 %, em sementes não-dormentes com 48 h de incubação, sem que fosse alterada a germinação (Pelacani 2001). Quando sementes de grão-de-bico e eixo embrionário de sementes germinadas foram tratados com CoCl_2 (50 mol m^{-3}) + ACC (200 mmol m^{-3}), observou-se 100 % inibição tanto da germinação das sementes como da produção de etileno pelos eixos embrionários (Gallardo *et al* 1994).

Tabela 3.1. Efeito da inibição da atividade *in vivo* da oxidase do ACC em sementes dormentes de 75 dias de idade pós-colheita, pelos inibidores cobalto e *n*-propil galato (*n*-PG), 15 h após a transferência das sementes do primeiro para o segundo meio, indicada após a seta. Média de 5 repetições \pm erro da média

Tratamento	Etileno ($\text{nmol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	Inibição (%)	Etileno ($\text{pmol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Inibição (%)
HCl-KOH → HCl-KOH	$0,26 \pm 0,03$	-	$0,99 \pm 0,10$	-
HCl-KOH → ACC (0,1)	$0,84 \pm 0,04$	-	$3,82 \pm 0,20$	-
HCl-KOH → ACC (1,0)	$4,08 \pm 0,22$	-	$20,38 \pm 1,11$	-
Co^{2+} (1,0) → Co^{2+} (1,0)	$0,01 \pm 0,00$	94,53	$0,05 \pm 0,00$	94,81
Co^{2+} (1,0) → ACC (0,1) + Co^{2+} (1,0)	$0,02 \pm 0,00$	97,66	$0,07 \pm 0,00$	98,23
Co^{2+} (2,0) → Co^{2+} (2,0)	$0,01 \pm 0,00$	94,21	$0,05 \pm 0,00$	94,57
Co^{2+} (2,0) → ACC (1,0) + Co^{2+} (2,0)	$0,12 \pm 0,01$	97,02	$0,46 \pm 0,05$	97,73
<i>n</i> -PG (0,5) → <i>n</i> -PG (0,5)	$0,02 \pm 0,00$	91,79	$0,08 \pm 0,01$	92,29
<i>n</i> -PG (0,5) → ACC (0,1) + <i>n</i> -PG (0,5)	$0,09 \pm 0,01$	89,15	$0,33 \pm 0,03$	91,41
<i>n</i> -PG (1,0) → <i>n</i> -PG (1,0)	$0,03 \pm 0,00$	89,65	$0,09 \pm 0,01$	90,52
<i>n</i> -PG (1,0) → ACC (1,0) + <i>n</i> -PG (1,0)	$0,04 \pm 0,00$	98,96	$0,15 \pm 0,01$	99,27

Concentração em mol m^{-3} mostrada entre parênteses. As sementes permaneceram nas soluções-controle e de inibidores (Co^{2+} 1,0 e 2,0 mol m^{-3} e *n*-PG 0,5 e 1,0 mol m^{-3}) por 24 h, após o que foram transferidas para soluções puras ou contendo ACC (0,1 e 1,0 mol m^{-3}). O etileno foi quantificado 15 e 24 h após a transferência das sementes do primeiro meio. A inibição foi estimada em relação ao nível do ACC no meio sem inibidor

Extintores de radicais livres como *n*-PG são bons inibidores da produção de etileno por fragmentos de frutos, flores e tecidos vegetativos (Apelbaum *et al* 1981b). Quando o *n*-PG foi aplicado a sementes dormentes de estilante provocou inibição de mais de 90 % da produção de etileno com 15 h de incubação (Tab 3.1). No entanto, o efeito inibitório foi pouco menor com 24 h de incubação, nas sementes tratadas inicialmente com concentração de 0,5 mol m^{-3} de *n*-PG. Para as sementes tratadas inicialmente com 1,0 mol m^{-3} , a inibição de 90 % persistiu (Tab 3.2).

O efeito inibitório do Co^{2+} persistiu por mais tempo do que o efeito do *n*-PG, principalmente à concentração $0,5 \text{ mol m}^{-3}$, sem ACC; a inibição redziu-se levemente de 92 % com 15 h (Tab 3.1), para 86 % com 24 h (Tab 3.2). A diminuição dos efeitos inibitórios com o aumento do tempo de incubação em *n*-PG também foi observada por Leslie e Romani (1988), em culturas de células de pêra cv Passe Crassane. Já com o Co^{2+} , não foram encontrados relatos de perda do poder inibitório com o tempo de incubação do material.

Tabela 3.2. Efeito da inibição da atividade *in vivo* da oxidase do ACC em sementes dormentes de 75 dias de idade pós-colheita, pelos inibidores cobalto e *n*-propil galato, 24 h após a transferência das sementes do primeiro para o segundo meio, indicada após a seta. Média de 5 repetições \pm erro da média

Tratamento	Etileno ($\text{nmol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	Inibição (%)	Etileno ($\text{pmol sem}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Inibição (%)
HCl-KOH → HCl-KOH	$0,28 \pm 0,03$	-	$1,14 \pm 0,10$	-
HCl-KOH → ACC (0,1)	$0,46 \pm 0,05$	-	$2,55 \pm 0,27$	-
HCl-KOH → ACC (1,0)	$5,64 \pm 0,11$	-	$34,45 \pm 0,68$	-
Co^{2+} (1,0) → Co^{2+} (1,0)	$0,01 \pm 0,00$	97,12	$0,03 \pm 0,00$	97,27
Co^{2+} (1,0) → ACC (0,1) + Co^{2+} (1,0)	$0,01 \pm 0,00$	97,63	$0,04 \pm 0,00$	98,56
Co^{2+} (2,0) → Co^{2+} (2,0)	$0,03 \pm 0,00$	88,32	$0,12 \pm 0,01$	89,02
Co^{2+} (2,0) → ACC (1,0) + Co^{2+} (2,0)	$0,11 \pm 0,01$	97,96	$0,45 \pm 0,04$	98,69
<i>n</i> -PG (0,5) → <i>n</i> -PG (0,5)	$0,04 \pm 0,01$	84,96	$0,16 \pm 0,02$	85,86
<i>n</i> -PG (0,5) → ACC (0,1) + <i>n</i> -PG (0,5)	$0,10 \pm 0,01$	78,59	$0,37 \pm 0,04$	85,41
<i>n</i> -PG (1,0) → <i>n</i> -PG (1,0)	$0,04 \pm 0,00$	87,67	$0,13 \pm 0,01$	88,70
<i>n</i> -PG (1,0) → ACC (1,0) + <i>n</i> -PG (1,0)	$0,04 \pm 0,00$	99,22	$0,16 \pm 0,01$	99,54

Ver tabela 3.1

4.18 Efeito do ACC na solução de germinação sobre a atividade da oxidase do ACC *in vitro*

Devido a falta de atividade da oxidase do ACC em sementes dormentes não tratadas, avaliou-se o efeito da aplicação de ACC na atividade da oxidase do ACC. As sementes foram tratadas com ACC em doses crescentes na solução de germinação, por um período de 24 h. Observou-se um aumento na atividade da oxidase do ACC, a partir da concentração $10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$, que se mostrou crescente com o aumento do ACC na solução de germinação (Fig 19). Essa concentração de $10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ situa-se na faixa dos níveis endógenos de ACC livre encontrados nas sementes tratadas com selênio e necessários para promover a produção de etileno e a germinação (Fig 13.1 e 13.2); mostrou-se correlacionado com o aumento da atividade da oxidase do ACC nas sementes tratadas com selênio (Fig 21.1, 21.2 e 21.3).

A germinação em estilozante e *Amaranthus caudatus* certamente ocorreu em resposta ao aumento da produção de etileno, devido ao aumento na atividade da oxidase do ACC (Abeles *et al* 1992), em função da maior disponibilidade de substrato. Nas sementes dormentes de estilozante, a oxidase do ACC apresentou baixa atividade, como pode ser verificado sob nível

zero de ACC (Fig 13.1, 13.2 e 19). À medida que o nível de ACC no meio de germinação aumentou, também ocorreu aumento da atividade da enzima, sugerindo que a disponibilidade de ACC é o fator limitante para a produção de etileno, que promove a germinação.

O nível de ACC livre nas sementes dormentes não-tratadas, durante todo o período de embebição, era muito baixo (Fig 13.1 e 13.2). Por isso, a atividade da oxidase do ACC mostrou-se limitada, necessitando de ACC exógeno, como foi demonstrado neste experimento, a partir da concentração 10^{-3} mol m^{-3} (Fig 19). O mesmo também foi verificado pelos níveis de ACC obtidos em resposta aos compostos selênicos, em que as sementes só germinaram quando o teor de ACC era suficiente para a produção de etileno (Fig 10.1 e 10.2).

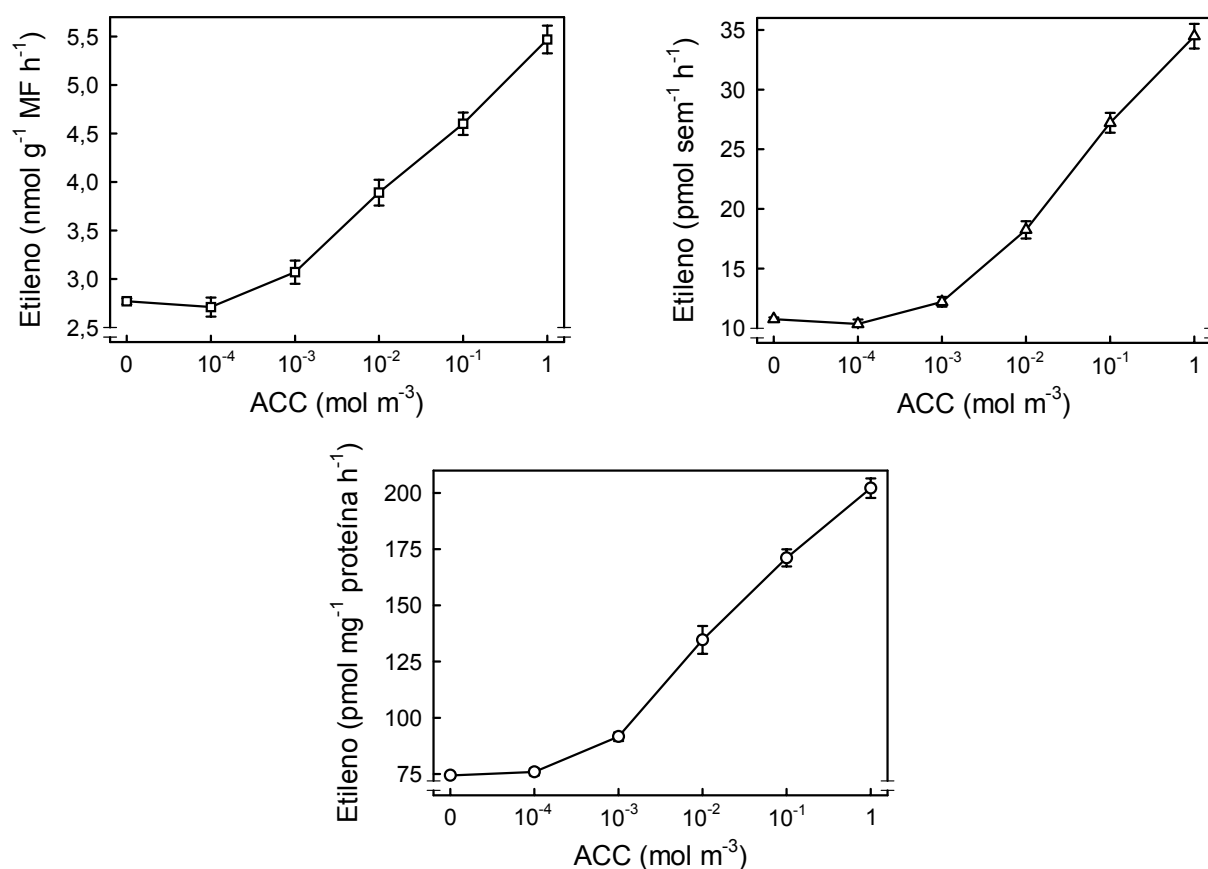


Figura 19 - Efeito do ACC na solução de embebição das sementes sobre a atividade *in vitro* da oxidase do ACC, em extrato de sementes dormentes de 85 dias de idade pós-colheita, incubadas por 24 h. Média de 5 repetições \pm erro da média

A produção de etileno nas sementes dormentes foi limitada pelo conteúdo de ACC (Fig 10.1 e 10.2), pois o aumento da atividade da oxidase do ACC mostrou-se uma consequência do aumento no nível do substrato. Isso foi demonstrado pelo tratamento das sementes dormentes com os compostos selênicos, em que a atividade da oxidase do ACC só aumentou (Fig 21.1, 21.2 e 21.3), quando os níveis de ACC livre também aumentaram (Fig 13.1 e 13.2). Isso sugere que a limitação para a quebra da dormência das sementes de estiolante ocorre na conversão do SAM

para ACC, passo metabólico controlado pela sintase do ACC. Essa enzima parece desempenhar papel regulatório chave na biossíntese de etileno (Yang e Hoffman 1984, Kende 1993).

4.19 Efeito do tempo de exposição ao ACC na solução de germinação sobre a atividade da oxidase do ACC *in vitro*

Para avaliar-se o efeito do tempo de exposição ao ACC na solução de germinação sobre a atividade da oxidase do ACC durante a quebra da dormência das sementes de estilósante, as sementes foram expostas ao ACC ($1,0 \text{ mol m}^{-3}$), por períodos de 0 a 72 h. Observou-se aumento na atividade da oxidase do ACC correspondente ao aumento do tempo de disponibilidade até 24 h, quando a atividade foi expressa por MF, depois observou-se uma queda devida provavelmente, ao acréscimo na MF. Com base em semente e proteínas, a atividade mostrou-se crescente até 48 h, seguida de uma pequena redução até 72 h (Fig 20). Notou-se grande diferença, ao longo do tempo de exposição, entre a atividade da oxidase do ACC das sementes tratadas e as não tratadas com ACC já a partir de 12 h, quando também se intensificou a germinação. Esses resultados correlacionaram-se com a falta de ACC nas sementes dormentes, como é mostrado na Fig 19. Neste experimento, mostrou-se o efeito do tempo de exposição ao ACC na solução de germinação, sob uma concentração bastante elevada para promover o aumento da atividade da oxidase do ACC. Com 12 h de embebição, a atividade já era bastante expressiva, e a germinação

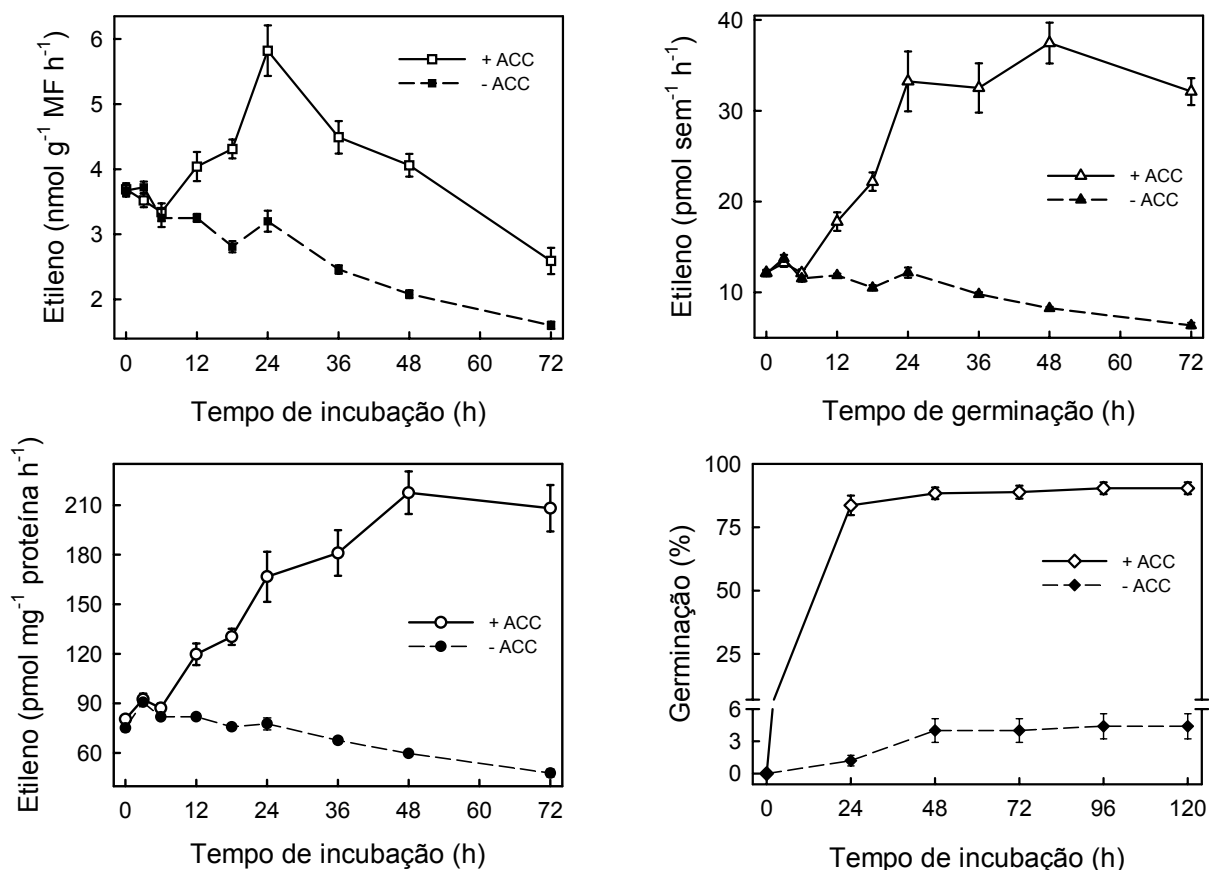


Figura 20 - Efeito do tempo de exposição ao ACC ($1,0 \text{ mol m}^{-3}$) na solução de germinação sobre a germinação e atividade da oxidase do ACC, em extrato de sementes dormentes de 65 dias de idade pós-colheita. Média de 5 repetições \pm erro da média já alcançava valores da ordem de 50 %. E, mais uma vez, confirma os resultados da Fig 13.1 e 13.2, pois demandou tempo para a síntese de ACC, e neste experimento, a concentração elevada do substrato resultou em rápido aumento da atividade da oxidase do ACC.

Os resultados obtidos corroboram com o aumento da produção de etileno por tecidos vegetais tratados com ACC (Cameron *et al* 1979, Apelbaum *et al* 1981a e Yoshii e Imaseki 1981), pois o aumento da produção de etileno é uma consequência do aumento da atividade da oxidase do ACC, como foi demonstrado pelo tratamento de sementes dormentes de estilosante com selênio, nas quais houve aumento da atividade da oxidase do ACC (Fig 21.1, 21.2 e 21.3). O tratamento de sementes não-dormentes de amendoim cv Natal comum, com ACC $1,0 \text{ mol m}^{-3}$, também resultou em grande estímulo da síntese de etileno e germinação (Whitehead e Nelson 1992), mostrando ser a disponibilidade de ACC limitante para a germinação.

4.20 Atividade da oxidase do ACC *in vitro* em sementes dormentes tratadas com compostos selênicos

Para quebrar a dormência fisiológica e promover a germinação das sementes de estilosante, os compostos selênicos ativaram a rota biossintética do etileno, aumentando a

produção de etileno (Fig 10.1 e 10.2). A ativação da oxidase do ACC dependeu do aumento do teor de ACC livre (Fig 13.1 e 13.2), indicando que primeiro deve ocorrer aumento na atividade da sintase do ACC, para depois aumentar a atividade da oxidase do ACC (Fig 21.1, 21.2 e 21.3), já que esta é a última enzima da rota biossintética de produção do etileno. O aumento de atividade da oxidase do ACC e, conseqüentemente, o aumento da produção de etileno nas sementes tratadas com compostos selênicos correlacionou-se com o aumento da produção de ACC durante o período de germinação, mostrado na Fig 13.1 e 13.2. A aparente diminuição de atividade observada no tempo 72 h expressa em função da MF (Fig 21.1) justificou-se pelo rápido crescimento das plântulas nesse período, diferentemente do parâmetro constante número de sementes (Fig 21.2) e teor de proteínas que sofreu apenas pequeno acréscimo (Fig 21.3).

As primeiras observações sobre os efeitos de seleno-aminoácidos na biossíntese de etileno foram realizadas por Konze *et al* (1978), com o propósito inicial de inibir-se a rota biossintética de etileno, via produção de radicais livres, desde que os seleno-aminoácidos são protetores contra o ataque de radicais livre (Tappel 1965). No entanto, a seleno-metionina e a seleno-etionina estimularam a produção de etileno em tecidos senescentes de flores de *Ipomoea tricolor* Cav e em seções do talo de ervilha tratados com auxina, via a rota do ACC. E, também importante, foi a descoberta de que os seleno-aminoácidos serviam como precursores do etileno e eram convertidos em etileno, com maior eficiência que o precursor natural metionina (Konze *et al* 1978). Em seguida, foram realizados alguns experimentos sobre os efeitos de seleno-aminoácidos estimulando a produção de etileno (Konze e Kende 1979, Jones e Kende 1979), estimulando também a germinação (Carlson *et al* 1989, Sreekala e Lalitha 1998) e, mais recentemente, foi avaliado o efeito de seleno-metionina na promoção da quebra da dormência de sementes de estíloso, concluindo-se pelo envolvimento do etileno no processo (Barros e Freitas 2001).

Todos os compostos selênicos testados fizeram aumentar a atividade da oxidase do ACC a partir de 24 h (Fig 21.1, 21.2 e 21.3), exibindo essa um retardamento de aproximadamente 18 h, no tempo de incubação, em relação às sementes do controle não-dormente, para que a atividade da enzima fosse aumentada. Mas, em todos os tipos de sementes dormentes tratadas com selênio ou não-dormentes, a germinação sempre esteve associada aos eventos que levam ao aumento da produção de etileno. A atividade foi baixa e praticamente constante, em quase todas as sementes tratadas com selênio até 24 h; a partir desse período de embebição, foi crescente até 48 h, quando começou a haver uma pequena redução até o final do experimento (72 h), com base na MF. Com base no número de sementes e em proteína, a atividade foi crescente a partir de 48 h até o final do experimento.

Efeitos benéficos de ativação de enzimas por selênio também foram observados em sementes de *Trigonella foenum-graecum*, germinadas em meio contendo selenito de sódio 0,5 ppm, em que a atividade das enzimas hidrolíticas β -galactosidase aumentou em 40 % e β -glicosidase em 15 %. Sob níveis mais altos, porém, o selênio mostrou-se tóxico (Sreekala e Lalitha (1998). A embebição de sementes de cabaça-amarga cv Special Six e Moon Shine, por 48 h, com solução de selenito de sódio ($0,01 \text{ mol m}^{-3}$), também fez aumentar a atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPX) (Chen e Sung 2001).

De forma geral, o aumento da atividade *in vitro* da oxidase do ACC em sementes de estilosante foi semelhante para os oito compostos, embora hajam diferenças nas concentrações ótimas de cada produto para promover a quebra da dormência (Fig 3). O selenito de sódio foi, aparentemente, o mais eficaz em promover aumento de atividade da enzima. No entanto, a germinação das sementes estimuladas por selenito de sódio não diferiu muito da germinação estimulada pelos outros compostos. A selenouréia, que sempre promoveu as maiores porcentagens de germinação (Fig 3, 4, 7, 8, 11 e 13.1), promoveu um menor aumento na atividade da enzima. A seleno-L-metionina, que estimulou maior produção de ACC livre (Fig 13.1 e 13.2), mas as sementes exibiram menor germinação (Fig 3, 4, 7, 8, 11 e 13.1), não promoveu aumento excepcional de atividade, comportando-se na média dos oito compostos. Essas diferenças não permitiram uma correlação perfeita entre o grau de atividade da enzima e

a

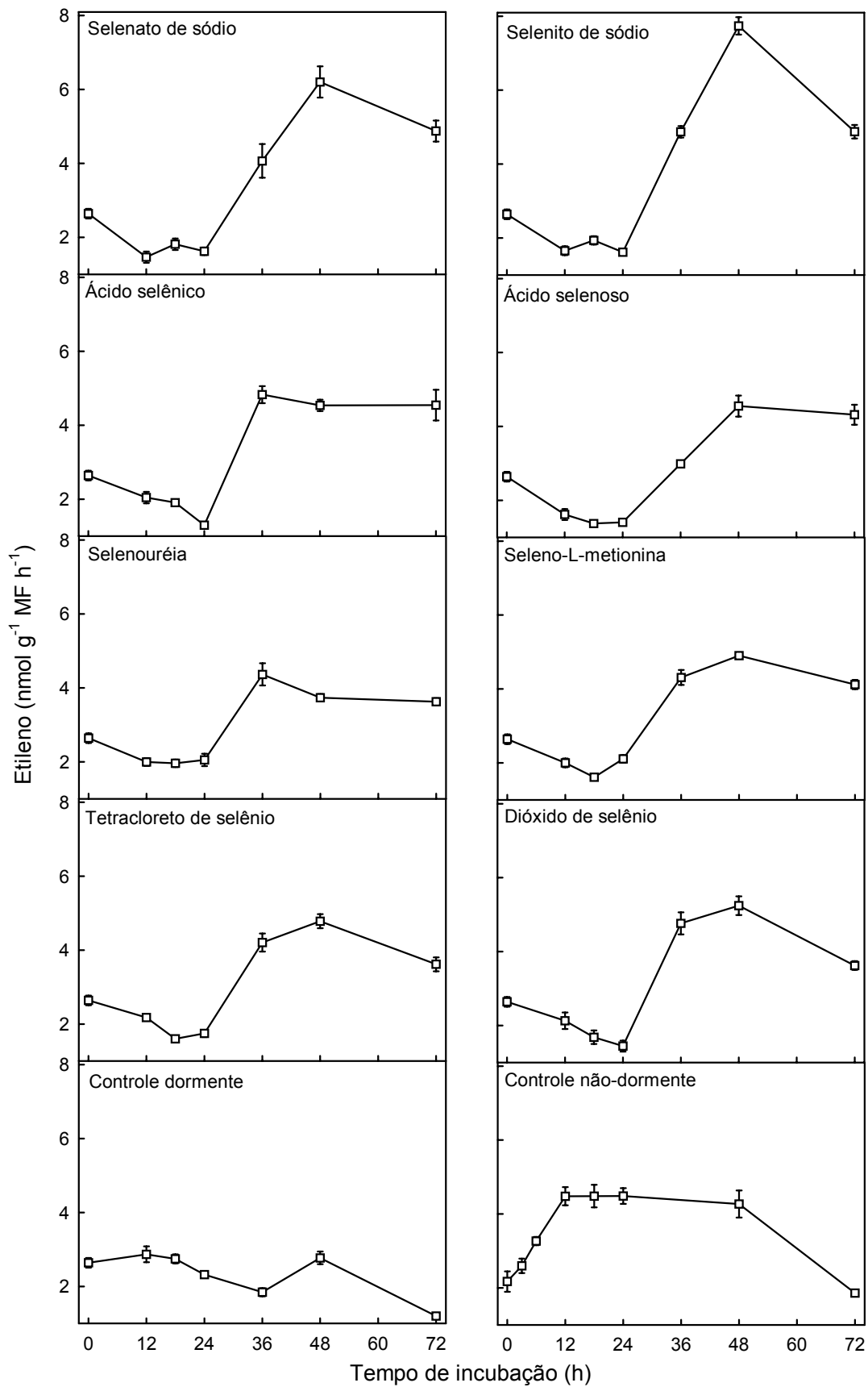


Figura 21.1 - Atividade da oxidase do ACC em extrato de sementes dormentes de 25 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 300 dias de idade pós-colheita. Média de 4 repetições para os tratamentos com compostos selênicos e controle dormente e de 5 repetições para o controle não-dormente \pm erro da média

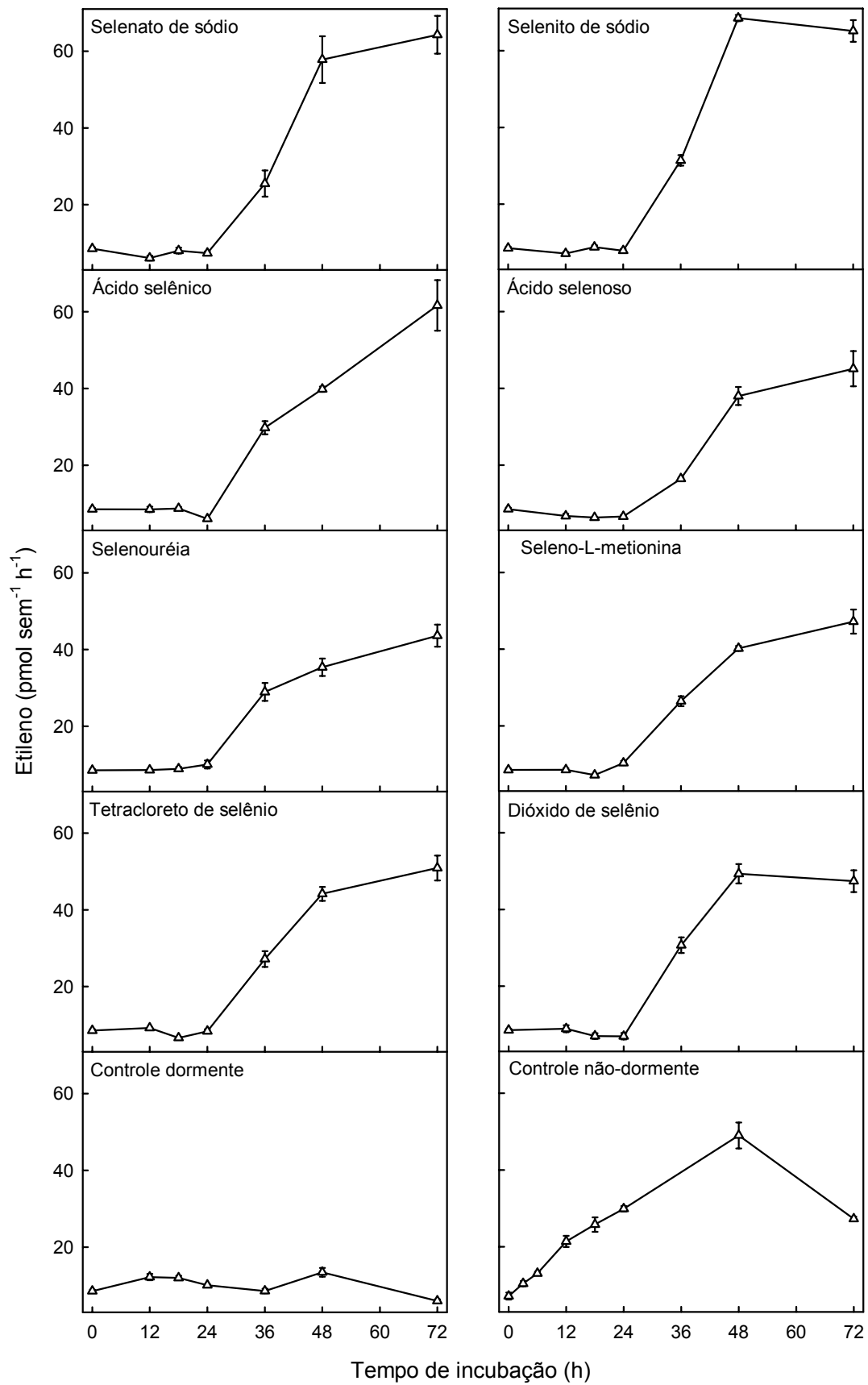


Figura 21.2 - Atividade da oxidase do ACC em extrato de sementes dormentes de 25 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 300 dias de idade pós-colheita. Média de 4 repetições para os tratamentos com compostos selênicos e controle dormente e de 5 repetições para o controle não-dormente \pm erro da média

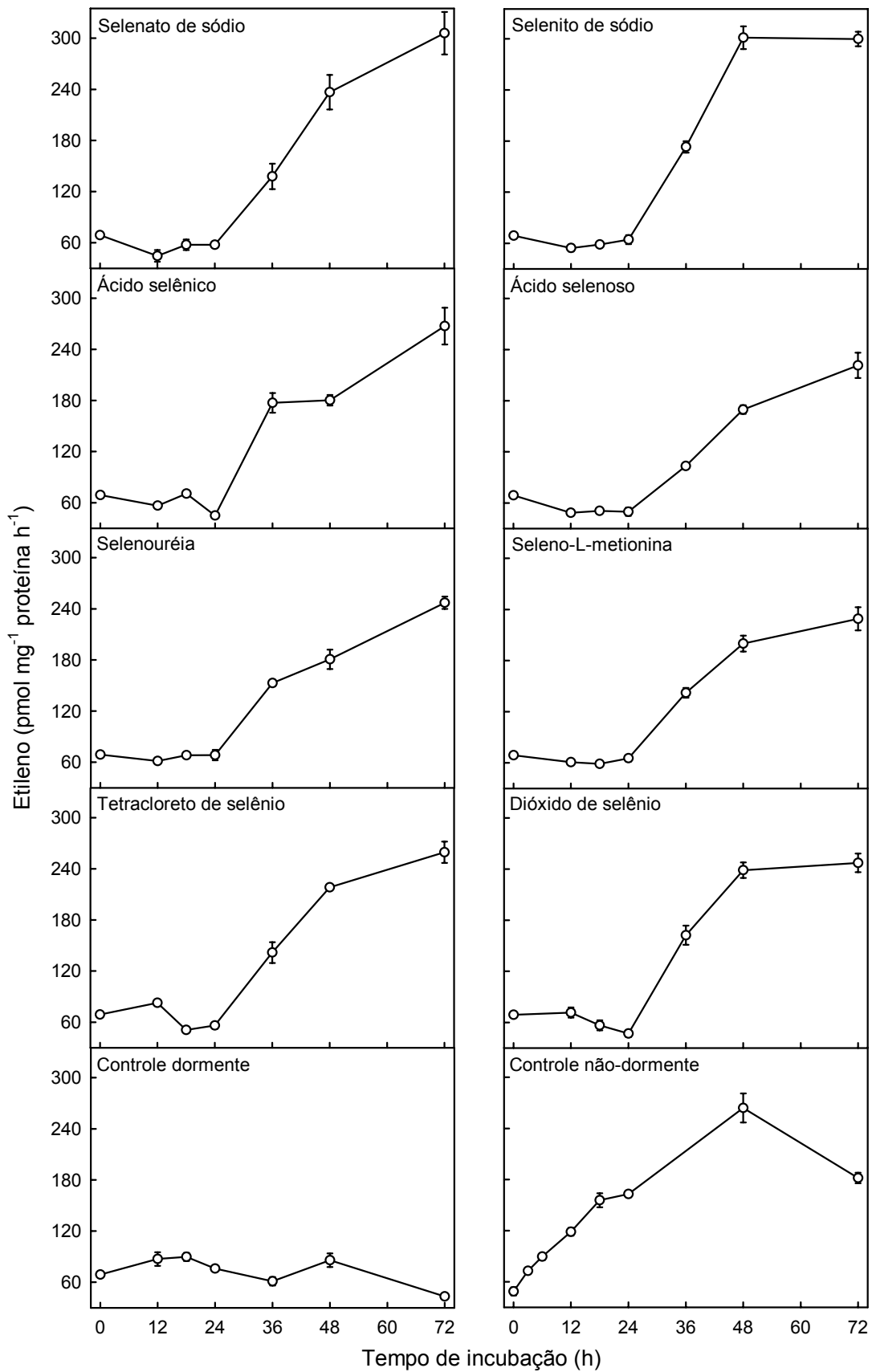


Figura 21.3 - Atividade da oxidase do ACC em extrato de sementes dormentes de 25 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 300 dias de idade pós-colheita. Média de 4 repetições para os tratamentos com compostos selênicos e controle dormente e de 5 repetições para o controle não-dormente \pm erro da média

germinação, possivelmente explicada pela toxicidade diferencial de cada composto selênico (Severi 2001). Os resultados, no entanto, demonstram que as sementes dormentes tratadas com selênio tiveram a atividade da enzima aumentada (Fig 21.1, 21.2 e 21.3), pois nas sementes do controle dormente a atividade foi muito baixa e praticamente constante, a germinação foi muito baixa e nas sementes do controle não-dormente, a atividade foi crescente já a partir das primeiras horas de embebição, mostrando-se correlacionada com a germinação.

Comparando-se a atividade da enzima, em sementes dormentes tratadas com ACC (Fig 19 e 20), com os resultados desse experimento, em que as sementes foram expostas aos compostos selênicos, observa-se que a variação de atividade foi semelhante tanto no fornecimento direto de ACC como no tratamento das sementes com selênio. Houve, no entanto, um atraso no início do aumento da atividade da oxidase do ACC nas sementes tratadas com selênio, correlacionado com o aumento da germinação em placa de Petri (Fig 6.1, 13.1 e 13.2).

O aumento da atividade da oxidase do ACC em sementes tratadas com compostos selênicos correlacionou-se com a produção de etileno (Fig 10.1 e 10.2), com o nível de ACC livre e com a germinação (Fig 13.1 e 13.2). A correlação foi temporal e o aumento da atividade da oxidase do ACC sofreu um atraso em relação às sementes não-dormentes embebidas em solução-controle, quer as sementes fossem incubadas em placa de Petri (Fig 6.1, 13.1 e 13.2) ou em frasco Erlenmeyer (Fig 11).

4.21 Atividade *in vivo* da oxidase do ACC em sementes dormentes tratadas com compostos selênicos

A atividade da oxidase do ACC *in vivo* é mostrada na Fig 22. Apesar de haverem-se lavado as sementes e proceder-se a troca da solução de compostos selênicos, após 18 h de embebição, por solução-controle, observou-se inibição da atividade da oxidase do ACC em relação ao controle. *In vitro* essa situação foi certamente minorada pela dessalinização do extrato. Tentativas de quantificar-se o etileno emanado das sementes, após exposição aos compostos selênicos, simplesmente fazendo-se a substituição das soluções-teste por solução-controle, no mesmo frasco, não foram bem sucedidas, provavelmente pelo mesmo motivo, ou seja, os resíduos de selênio estariam inibindo a atividade da enzima. Isso pode ser verificado comparando-se a atividade da enzima nas sementes tratadas com compostos selênicos, com a atividade nas sementes não-tratadas dos controles dormente e não-dormente, que também receberam ACC (+ ACC) e, portanto, estas sementes apresentaram maior atividade da enzima (Fig 22), enquanto nas sementes tratadas com selênio, a atividade mostrou-se bem menor. E nos dois tipos de controle, com sementes dormentes e não-dormentes, a produção de etileno foi aproximadamente 10 vezes maior quando receberam ACC do que os pares que não receberam

ACC (- ACC). Essa situação foi bem variada para as sementes tratadas com os compostos selênicos, principalmente para as sementes tratadas com selenato de sódio e ácido selenoso, em que a diferença de atividade entre as sementes que receberam ACC (+ ACC), após o tratamento com selênio, e as que não receberam ACC (- ACC) foi muito pequena. No entanto, a produção de etileno das sementes que receberam ACC (+ ACC), tratadas com selenato de sódio e ácido selenoso, foi significativamente maior (teste t $p \leq 0,05$) do que nas sementes que não receberam ACC (-ACC).

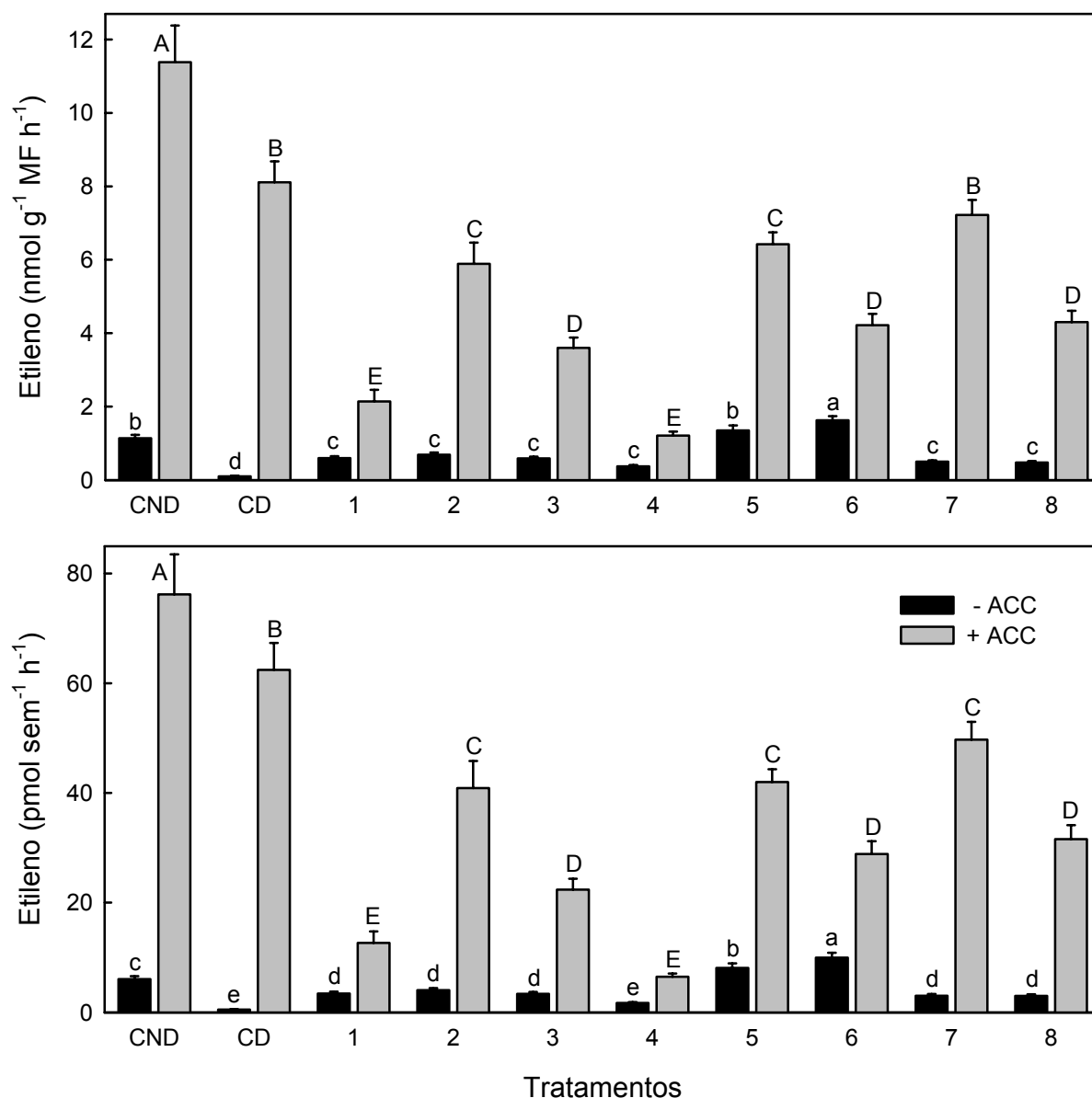


Figura 22 - Atividade *in vivo* da oxidase do ACC em sementes dormentes de 135 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 360 dias de idade pós-colheita. Média de 10 repetições \pm erro da média. Médias seguidas de mesma letra minúscula (-ACC) e maiúscula (+ACC) não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. CND - Controle não-dormente, CD - Controle dormente, 1 - Selenato de sódio, 2 - Selenito de sódio, 3 - Ácido selênico, 4 - Ácido selenoso, 5 - Selenouréia, 6 - Seleno-L-metionina, 7 - Tetracloreto de selênio, 8 - Dióxido de selênio

Um outro aspecto observado foi que nas sementes do controle dormente que foram tratadas com ACC, a atividade da oxidase do ACC foi maior que nas sementes tratadas com selênio e que também receberam ACC (+ ACC) (Fig 22), já que se esperava um efeito contrário, pois, nesse caso, as sementes receberam o estímulo devido ao selênio e também tiveram grande disponibilidade de substrato. No tratamento de sementes dormentes com ACC também observou-se considerável aumento na emissão de etileno que chegaram a produzir 10 vezes mais etileno que sementes não-dormentes germinadas apenas em solução-controle (Fig 9). O tratamento com ACC em sementes de *Amaranthus caudatus* (Kępczyński e Karssen 1985) e amendoim cv Natal Comum (Whitehead e Nelson 1992), também estimulou a produção de etileno, promovendo a germinação em quase 100 %. Esses resultados indicam que a disponibilidade de ACC livre nas sementes dormentes de estilósante seria o fator limitante para a promoção da germinação. Por isso, as sementes dormentes não produzem etileno quando embebidas em solução-controle, enquanto as não-dormentes possivelmente biossintetizam ACC após a embebição, devendo apresentar alto teor de ACC após 16 h de incubação (Fig 13.1 e 13.2).

Entre as sementes tratadas com selênio, aquelas expostas ao tetracloreto de selênio apresentaram maior atividade, enquanto as sementes tratadas com ácido selenoso apresentaram menor atividade, parecendo ser este o composto mais tóxico, seguido pelo selenato de sódio (ver Fig 5). Em tentativas de avaliar-se a atividade *in vivo* em sementes não-dormentes com selenato de sódio, ácido selenoso e seleno-L-metionina, também se observou inibição da atividade em torno de 30 % nas sementes tratadas com selenato de sódio e seleno-L-metionina e 50 % nas tratadas com ácido selenoso. Mas a atividade *in vivo* da oxidase do ACC nas sementes tratadas com selênio foi significativamente maior (teste $F p \leq 0,05$) que nas sementes não-tratadas, sem o suprimento de ACC.

Quando sementes dormentes são tratadas com selênio possivelmente ocorre aumento da atividade da sintase do ACC, como foi demonstrado pelo aumento do teor de ACC livre (Fig 13.1 e 13.2) e ACC conjugado (Fig 14.1 e 14.2). Portanto, é possível que a toxidez do selênio cause um estresse estimulando a sintase do ACC, ainda que seja tóxico para a oxidase do ACC. Assim, a germinação seria o resultado do balanço entre o efeito estimulatório à biossíntese de etileno e a toxidez promovida pelos compostos selênicos.

5 CONCLUSÕES

A dormência fisiológica de sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. foi quebrada com compostos selênicos. A exposição das sementes dormentes, por 18 h, às soluções dos compostos selênicos, foi suficiente para promover a germinação; tempos maiores aparentemente causaram danos ao embrião. Observou-se um atraso médio de aproximadamente 18 h para o início da germinação das sementes dormentes tratadas com os compostos selênicos, em relação às sementes não-dormentes mantidas em solução-controle, devido, provavelmente, a problemas de penetrabilidade, transporte e metabolização, até que o selênio pudesse atingir as células-alvo e desencadeasse a biossíntese de etileno.

A germinação de sementes dormentes estimuladas por compostos selênicos foi diminuída por Co^{2+} , ácido abscísico e aminoetoxivinilglicina, inibidores da biossíntese de etileno, e por Ag^+ , inibidor da ação do regulador. O ácido 2-cloroetilfosfônico e o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), compostos associados à produção de etileno, reverteram os efeitos dos inibidores da biossíntese de etileno, estimulando também a germinação. Soluções de HCl pH 2,0, que possivelmente precipitam a Ag^+ na forma de AgCl, reverteram os efeitos inibitórios do íon.

A produção de etileno mostrou-se maior em sementes não-dormentes embebidas do que em sementes dormentes. O tratamento destas com compostos selênicos fez aumentar não só a emissão de etileno, em níveis comparáveis com os de sementes não-dormentes em solução-controle, como também o acúmulo de ACC livre em níveis maiores que nas não-dormentes. Assim, parece que os compostos selênicos estimularam a sintase do ACC. Esses eventos mantiveram-se sempre correlacionados com o aumento da germinação.

A atividade da oxidase do ACC *in vitro* foi inibida por ácido α -aminoisobutírico, ácido salicílico e ácido acetil-salicílico (inibidores da biossíntese de etileno) e por *n*-propil galato (*n*-PG) (extintor de radicais livres). *In vivo*, a atividade dessa enzima foi inibida por Co^{2+} e *n*-PG. A atividade da oxidase do ACC *in vitro* nas sementes dormentes aumentou em resposta aos compostos selênicos, mostrando-se correlacionada com a produção de etileno e aumento do ACC livre.

Desde que os compostos selênicos exibiram efeitos temporalmente idênticos, inclusive a seleno-metionina que poderia funcionar como precursora do etileno, é possível que a condição de estresse por eles promovida, devido à toxidez, tenha desencadeado a biossíntese de etileno, levando à germinação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles FB (1986) Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv 'Grand Rapids' seed germination. **Plant Physiol** 81: 780-787
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit-Jr ME (1992) **Ethylene in plant biology**. 2nd ed, California, Academic Press, Inc, 414 p
- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD, Solomos T, Lieberman M (1981a) Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. **Plant Physiol** 67: 80-84
- Apelbaum A, Wang SY, Burgoon AC, Baker JE T, Lieberman M (1981b) Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. **Plant Physiol** 67: 74-79
- Araújo EF, Araújo RF, Silva RF, Gomes JM (2000) Avaliação de diferentes métodos de escarificação das sementes e dos frutos de *Stylosanthes viscosa* Sw. **Rev Bras Sementes** 22: 18-22
- Argel PJ, Humphreys LR (1983) Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano I. Temperature. **Aust J Agr Res** 34: 261-270
- Babiker AGT, Cai T, Ejeta G, Butler LG, Woodson WR (1994) Enhancement of ethylene biosynthesis and germination with thidiazuron and some selected auxins in *Striga asiatica* seeds. **Physiol Plant** 91: 529-536
- Ballard LAT, Buchwald T (1971) A viability test for seeds of Townsville stylo using thiourea. **Aust J Exp Agric Anim Husb** 11: 207-210
- Barros RS, Delatorre CA (1998) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid-stimulated germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* is inhibited by abscisic acid. **Seed Sci Technol** 26: 319-324
- Barros RS, Freitas AWP (2000) Stimulation of germination of dormant seeds of Townsville stylo by selenomethionine. **Seed Sci Technol** 28: 201-207
- Barros RS, Freitas AWP (2001) Selenomethionine as a dormancy-breaking agent in seeds of *Stylosanthes humilis*. **Acta Physiol Plant** 23: 279-284
- Bewley JD, Black M (1994) **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York, Plenum Press. 445p
- Beyer Jr EM (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Plant Physiol** 58: 268-271

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254
- Brown TA, Shrift A (1981) Exclusion of selenium from proteins of selenium-tolerant *Astragalus* species. **Plant Physiol** 67: 1051-1053
- Burin ME, Barros RS, Rena AB (1987) Chemical regulation of endogenous dormancy in seeds of *Stylosanthes humilis* H.B.K. **Turrialba** 37: 281-285
- Burnell JN (1981) Selenium metabolism in *Neptunia amplexicaulis*. **Plant Physiol** 67: 316-324
- Calbo AG, Silva WLC, Torres AC (1989) Ajuste de funções não lineares de crescimento. **Rev Bras Fisiol Veg** 1: 9-18
- Cameron AC, Fenton CAL, Yu Y, Adams DO, Yang SF (1979) Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **HortScience** 14: 178-180
- Cameron DF, 't Mannetje L (1977) Effects of photoperiod and temperature on flowering of twelve *Stylosanthes* species. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 17: 417-424
- Carlson CL, Kaplan DI, Adriano DC (1989) Effects of selenium on germination and radicle elongation of selected agronomic species. **Environ Exp Bot** 29: 493-498
- Carvalho LJCB, Mosquim PR, Rena AB (1988) Resposta ao alumínio e fósforo por plantas de *Stylosanthes humilis* Sw coletadas em solos de cerrado com diferentes características químicas. In: EMBRAPA-CPAC (ed), **VI Simpósio sobre cerrado e savanas: alimento e energia**, Planaltina, DF, EMBRAPA, p 423-443
- Causton DR (1983) **A biologist's basic mathematics**. London, Edward Arnold, 216 p
- Chen CC, Sung JM (2001) Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. **Physiol Plant** 111: 9-16
- De Rueda PM, Gallardo M, Matilla AJ, Sánchez-Calle IM (1995) Preliminary characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase properties from embryonic axes of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **J Exp Bot** 46: 695-700
- Delatorre CA, Barros RS (1996) Germination of dormant seeds of *Stylosanthes humilis* as related to heavy metal ions. **Biol Plant** 38: 269-274
- Delatorre CA, Barros RS, Vieira HD (1997) Germinação de sementes de *Stylosanthes humilis* em resposta a tiouréia. **Rev Bras Fisiol Veg** 9: 49-53
- Dunkley HM, Golden KD (1998) ACC oxidase from *Carica papaya*: Isolation and characterization. **Physiol Plant** 103: 225-232
- Eustice DC, Kull FJ, Shrift A (1981a) Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. **Plant Physiol** 67: 1054-1058

- Eustice DC, Kull FJ, Shrift A (1981b) In vitro incorporation of selenomethionine into protein by *Astragalus* polysomes. **Plant Physiol** 67: 1059-1060
- Fan X, Mattheis JP, Fellman JK (1996) Inhibition of apple fruit 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity and respiration by acetylsalicylic acid. **J Plant Physiol** 149: 469-471
- Fernández-Maculet JC, Dong JG, Yang SF (1993) Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. **Biochem Biophys Res Commun** 193: 1168-1173
- Fernández-Maculet JC, Yang SF (1992) Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. **Plant Physiol** 99: 751-754
- Fluhr R, Mattoo AK (1996) Ethylene - biosynthesis and perception. **Crit Rev Plant Sci** 15: 479-523
- Frigeri RBC (1998) **Efeito do pH na germinação de sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa, UFV, 56 p (Tese de Mestrado)
- Gallardo M, De Rueda PM, Matilla AJ, Sánchez-Calle IM (1994) The relationships between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds. **Biol Plant** 36: 201-207
- 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 Physiol** 97: 122-127
- Gallardo M, Matilla AJ, Sánchez-Calle IM (1992) Effects of spermine, abscisic acid and temperature upon ethylene production in *Cicer arietinum* seeds. **Plant Physiol Biochem** 30: 19-27
- Gardener CJ (1975) Mechanisms regulating germination in seeds of *Stylosanthes*. **Aust J Agr Res** 26: 281-294
- Hanley KM, Meir S, Bramlage WJ (1989) Activity of ageing carnation flower parts and the effects of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid-induced ethylene. **Plant Physiol** 91: 1126-1130
- Hanson B, Garifullina GF, Lindblom SD, Wangeline A, Ackley A, Kramer K, Norton AP, Lawrence CB, Pilon-Smits EAH (2003) Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from invertebrate herbivory and fungal infection. **New Phytologist** 159: 461-469
- Hoffman NE, Fu J-R, Yang SF (1983) Identification and metabolism of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds. **Plant Physiol** 71: 197-199
- Hoffman NE, Yang SF (1982) Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. **Biochem Biophys Res Commun** 104: 765-770

- Holm AM (1973) The effect of high temperature pretreatments on germination of Townsville stylo seed material. **Aust J Exp Agr Anim Husb** 13: 190-192
- Hopkinson JM, Walker B (1984) Seed production of *Stylosanthes* cultivars in Australia. In: Stace HM, Edye LA (eds) **The biology and agronomy of Stylosanthes**. Sydney, Academic, p 433-450
- Hyodo H, Hashimoto C, Morozumi S, Hu W, Tanaka K (1993) Characterization and induction of the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. **Plant Cell Physiol** 34: 667-671
- Hyodo H, Uritani I (1984) Ethylene production in sweet potato root tissue infected by *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Cell Physiol** 25: 1147-1152
- Jiao X-Z, Philosoph-Hadas S, Su L-Y, Yang SF (1986) The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. **Plant Physiol** 81: 637-641
- John P (1997) Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. **Physiol Plant** 100: 583-592
- Jones JF, Kende H (1979) Auxin-induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. **Planta** 146: 649-656
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 44: 283-307
- Kępczyński J (1986) Inhibition of *Amaranthus caudatus* seed germination by polyethylene glycol-6000 and abscisic acid and its reversal by ethephon or 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Physiol Plant** 67: 588-591
- Kępczyński J, Karssen CM (1985) Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*. **Physiol Plant** 63: 49-52
- Kępczyński J, Kępczyńska E (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. **Physiol Plant** 101: 720-726
- Ketring DL, Morgan PW (1970) Physiology of oil seeds I. Regulation of dormancy in Virginia-type peanut seeds. **Plant Physiol** 45: 268-273
- Kluge RA, Jacomino AP, Ojeda RM, Brackmann A (2002) Inibição do amadurecimento de abacate com 1-metilciclopropeno. **Pesq Agropec Bras** 37: 895-901
- Knee M (1992) Sensitivity of ATPases to silver ions suggests that silver acts outside the plasma membrane to block ethylene action. **Phytochemistry** 31: 1093-1096
- Konze JR, Jones JF, Boller T, Kende H (1980) Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on the production of ethylene in senescing flowers of *Ipomoea tricolor* Cav. **Plant Physiol** 66: 566-571

- Konze JR, Kende H (1979) Interactions of methionine and selenomethionine with methionine adenosyltransferase and ethylene-generating systems. **Plant Physiol** 63: 507-510
- Konze JR, Schilling N, Kende H (1978) Enhancement of ethylene formation by selenoaminoacids. **Plant Physiol** 62: 397-401
- Kruzmane D, Ievinsh G (1999) Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings and pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. **Plant Sci** 142: 13-19
- Lalitha K, Easwari K (1995) Kinetic analysis of ⁷⁵selenium uptake by mitochondria of germinating *Vigna radiata* of different selenium status. **Biol Trace Elem Res** 48: 67-89
- Läuchli A (1993) Selenium in plants: uptake, functions, and environmental toxicity. **Bot Acta** 106: 455-468
- Leslie CA, Romani RJ (1986) Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. **Plant Cell Rep** 5: 144-146.
- Leslie CA, Romani RJ (1988) Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. **Plant Physiol** 88: 833-837
- Lizada MCC, Yang SF (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Anal Biochem** 100: 140-145
- Lovato MB, Lemos Filho JP, Martins PS (1999) Growth responses of *Stylosanthes humilis* (Fabaceae) populations to saline stress. **Environ Exp Bot** 41: 145-153
- Lovato MB, Martins PS, Lemos Filho JP (1994) Germination in *Stylosanthes humilis* populations in the presence of NaCl. **Aust J Bot** 42: 717-723
- Machabée S, Saini HS (1991) Differences in the requirement for endogenous ethylene during germination of dormant and non-dormant seeds of *Chenopodium album* L. **J Plant Physiol** 138: 97-101
- Malerba M, Crosti P, Bianchetti R (1996) 2-Aminoisobutyric acid prevents the substrate-induced inactivation of ACC-synthase without inhibiting the enzyme. **Plant Sci** 113: 131-138
- Mansour R, Latché A, Vaillant V, Pech J-C, Reid MS (1986) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits. **Physiol Plant** 66: 495-502
- Martin-Remesal C, Gómez-Jiménez MC, Matilla AJ (2000) ACC-N-Malonyltransferase activity during zygotic embryogenesis and germination of chick-pea seeds. **Seed Sci Res** 10: 71-76
- Matilla AJ (2000) Ethylene in seed formation and germination. **Seed Sci Res** 10: 111-126
- Mattoo AK, Baker JE, Moline HE (1986) Induction by copper ions of ethylene production in *Spirodela oligorrhiza*: Evidence for a pathway independent of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **J Plant Physiol** 123: 193-202

- Mattoo AK, Mehta RA, Baker JE (1992) Copper-induced ethylene biosynthesis in terrestrial (*Nicotiana tabacum*) and aquatic (*Spirodela oligorrhiza*) higher plants. **Phytochemistry** 31: 405-409
- McGarvey DJ, Christoffersen RE (1992) Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. **J Biol Chem** 267:5964-5967
- McIvor JG, Gardener CJ (1987) Effect of boiling water treatment on hardseededness and germination in some *Stylosanthes* species. **Aust J Exp Agric** 27: 857-862
- Miller ER, Lei X, Ullrey DE (1991) Trece elements in animal nutrition. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Schuman LM, Welch RM (eds) **Micronutrients in agriculture**. N 4, Book Series, Madison, Soil Science Society of America, p 593-662
- Morgan PW, Drew MC (1997) Ethylene and plant responses to stress. **Physiol Plant** 100: 620-630
- Mott JJ, McKeon GM (1979) Effect of heat treatments in breaking hardseededness in four species of *Stylosanthes*. **Seed Sci Technol** 7: 15-25
- Mott JJ, McKeon GM, Moore CJ (1976) Effects of seed bed conditions on the germination of four *Stylosanthes* species in the Northern Territory. **Aust J Agr Res** 27: 811-823
- Moya-Leon M, John P (1995) Purification and biochemical characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from banana fruit. **Phytochemistry** 39: 15-20
- Neuhierl B, Böck A (1996) On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants. Purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisculatus*. **Eur J Biochem** 239: 235-238
- Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Böck A (1999) A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. **J Biol Chem** 274: 5407-5414
- Nijenhuis-De Vries MA, Woltering EJ, Vrije T (1994) Partial characterization of petal 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. **J Plant Physiol** 144: 549-554
- Osborne DJ (1984) Ethylene and plants of aquatic and semi-aquatic environments: A review. **Plant Growth Reg** 2: 167-185
- Osborne DJ, Walters J, Milborrow BV, Norville A, Stange LMC (1996) Evidence for a non-ACC ethylene biosynthesis pathway in lower plants. **Phytochemistry** 42: 51-60
- Ouannès C, Wilson T (1968) Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines. Effect of DABCO. **J Amer Chem Soc** 90: 6527-6528
- Pelacani CR (2001) **Relações entre o pH do meio de germinação e a produção de etileno em sementes de *Stylosanthes humilis* H.B.K.** Viçosa, UFV, 140 p (Tese de Doutorado)
- Prusinski J, Khan AA (1990) Relationship of ethylene production to stress alleviation in seeds of lettuce cultivars. **J Amer Soc Hort Sci** 115: 294-298

- Reid MS, Paul JL, Farhoomand MB, Kofranek AM, Staby GL (1980) Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **J Amer Soc Hort Sci** 105: 25-27
- Reynolds EA, John P (2000) ACC Oxidase is found in seedlings of two (Coniferales, Gnetales) of the four gymnosperm orders. **Physiol Plant** 110: 38-41
- Ribeiro DM (2003) **Germinação de sementes dormentes de *Stylosanthes humilis* H.B.K. promovida pelo acúmulo de etileno em ambiente fechado**. Viçosa, UFV, 43 p (Tese de Mestrado)
- Rodriguez-Gacio MDC, Matilla AJ (2001) The last step of the ethylene biosynthesis pathway in turnip tops (*Brassica rapa*) seeds: Alterations related to development and germination and its inhibition during desiccation. **Physiol Plant** 112: 273-279
- Satoh S, Esashi Y (1980) α -Aminoisobutyric acid: A probable competitive inhibitor of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. **Plant Cell Physiol** 21: 939-949
- Satoh S, Esashi Y (1983) α -Aminoisobutyric acid, propyl gallate and cobalt ion and the mode of inhibition of ethylene production by cotyledonary segments of cocklebur seeds. **Physiol Plant** 57: 521-526
- Satoh S, Esashi Y (1984) Changes in ethylene production and in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and malonyl-ACC contents of cocklebur seeds during their development. **Plant Cell Physiol** 25: 1277-1283
- Scott AJ, Knott M (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30: 507-512
- Severi A (2001) Toxicity of selenium to *Lemna minor* in relation to sulfate concentration. **Physiol Plant** 113: 523-532
- Shrift A (1969) Aspects of selenium metabolism in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol** 20: 475-494
- Sińska I, Gladon RJ (1989) Effects of inhibitors of synthesis and action of ethylene on apple seed stratification and embryo germination. **Acta Physiol Plant** 11:307-315
- Sisler EC, Serek M (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiol Plant** 100: 577-582
- Smith J, Shrift A (1979) Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. **Comp Biochem Physiol** 63B: 39-44
- Smith JJ, John P (1993) Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate/carbon dioxide. **Phytochemistry** 32: 1381-1386

- Smith JJ, Ververidis P, John P (1992) Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon. **Phytochemistry** 31: 1485-1494
- Sreekala M, Lalitha K (1998) Selenium-mediated differential response of β -glucosidase and β -galactosidase of germinating *Trigonella foenum-graecum*. **Biol Trace Elem Res** 64: 247-258
- Srivastava LM (2002) **Plant Growth and development: Hormones and environment**. California, Academic Press, Inc, 772 p
- Stadtman TC (1979) Some selenium-dependent biochemical processes. **Adv Enzymol Related Areas Mol Biol** 48: 1-28
- Stadtman TC (1990) Selenium biochemistry. **Annu Rev Biochem** 59: 111-127
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA (1997) **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3rd ed, New York, McGraw-Hill, Inc, 666 p
- Tappel AL (1965) Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. **Fed Proc** 24:73-78
- Terry N, Zayed AM, Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 51: 401-432
- Thomas D, Sumberg JE (1995) A review of the evaluation and use of tropical forage legumes in sub-Saharan Africa. **Agr Ecosyst Environ** 54: 151-163
- Ververidis P, John P (1991) Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. **Phytochemistry** 30: 725-727
- Vieira HD, Barros RS (1994) Responses of seed of *Stylosanthes humilis* to germination regulators. **Physiol Plant** 92: 17-20
- Vioque B, Castellano JM (1994) Extraction and biochemical characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from pear. **Physiol Plant** 90: 334-338
- Virupaksha TK, Shrift A (1965) Biochemical differences between selenium accumulator and non-accumulator *Astragalus* species. **Biochim Biophys Acta** 107: 69-80
- Wang H, Woodson WR (1989) Reversible inhibition of ethylene action and interruption of petal senescence in carnation flowers by norbornadiene. **Plant Physiol** 89: 434-438
- Welch RM, Allaway WH, House WA, Kubota J (1991) Geographic distribution of trace element problems. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Schuman LM, Welch RM (eds) **Micronutrients in agriculture**. N 4 Book series. Madison, Soil Science Society of America, p 31-57
- Whanger PD, Weswig PH, Schmitz JA, Oldfield JE (1977) Effects of selenium and vitamin E on blood selenium levels, tissue glutathione peroxidase activities and white muscle disease in sheep fed purified or hay diets. **J Nutr** 107: 1298-1307
- Whitehead CS, Nelson RM (1992) Ethylene sensitivity in germinating peanut seeds: the effect of short-chain saturated fatty acids. **J Plant Physiol** 139: 479-483

- Whitehead CS, Sutcliffe MA (1995) Effect of low temperatures and different growth regulators on seed germination in *Cyclopia* spp. **J Plant Physiol** 147: 107-112
- Williams MC, Mayland HF (1992) Selenium absorption by two-grooved milkvetch and western wheatgrass from selenomethionine, selenocystine, and selenite. **J Range Manag** 45: 374-378
- Williams OJ, Golden KD (2002) Purification and characterization of ACC oxidase from *Artocarpus altilis*. **Plant Physiol Biochem** 40: 273-279
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol** 35: 155-189
- Yip W-K, Jiao X-Z, Yang SF (1988) Dependence of in vivo ethylene production rate on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and oxygen concentrations. **Plant Physiol** 88: 553-558
- Yoshii H., Imaseki H (1981) Biosynthesis of auxin-induced ethylene. Effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. **Plant Cell Physiol** 22: 369-379
- Yu Y-B, Yang SF (1979) Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. **Plant Physiol** 84: 1074-1077
- Zayed AM, Terry N (1992) Selenium volatilization in broccoli as influenced by sulfate supply. **J Plant Physiol** 140:646-652

ANEXO

Tabela 1A. Modelo descritivo da germinação de sementes dormentes de estilósante tratadas com compostos selênicos, em função do tempo (Fig 6.1 e 6.2)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$				$t_{\text{taxa max}} \text{ (h)}$ $Y''=0, t = \ln b/k$
	a	b	k	R^2	
Selenato de sódio	77,2	1109,323	0,32368	0,9682	21,66
Selenito de sódio	75,0	502,167	0,33588	0,9702	18,52
Ácido selênico	76,5	123,406	0,24696	0,9761	19,50
Ácido selenoso	86,6	105,602	0,22063	0,9900	21,12
Selenouréia	86,4	625,501	0,39963	0,9216	16,11
Seleno-L-Metionina	39,7	62,566	0,20211	0,9670	20,46
Tetracloreto de selênio	71,2	106,870	0,28294	0,9742	16,51
Dióxido de selênio	65,8	161,624	0,29279	0,9781	17,37
Semente dormente (controle)	8,8	485,048	0,27832	0,9801	22,22
Semente dormente (ET + BA)	98,1	10,258	0,31228	0,9565	7,46
Semente não-dormente	91,2	8,103	0,30054	0,9565	6,96

$$\text{Taxa de germinação: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{be^{-kt}}$$

Tabela 2A. Modelo descritivo da produção de etileno por sementes não-dormentes de estilósante de 300 dias de idade pós-colheita, em função do tempo (Fig 9)

Parâmetro	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$				$t_{\text{taxa max}} \text{ (h)}$ $Y''=0, t = \ln b/k$
	a	b	k	R^2	
Produção de etileno - MF	33,47	4,3903	0,091887	0,9428	16,10
Produção de etileno - semente	249,25	5,1483	0,078843	0,9545	20,78

$$\text{Taxa de produção de etileno: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{be^{-kt}}$$

Tabela 3A. Modelo descritivo do efeito do ACC sobre a produção de etileno em sementes dormentes de estilósante de 65 dias de idade pós-colheita, em função do tempo (Fig 10)

Parâmetro	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$				$t_{\text{taxa max}} \text{ (h)}$ $Y''=0, t = \ln b/k$
	a	b	k	R^2	
Produção de etileno - MF (+ACC)	350,21	6,0908	0,080861	0,9980	22,34
Produção de etileno - MF (-ACC)	5,26	9,3077	0,078700	0,9781	28,35
Produção de etileno - sem (+ACC)	2565,52	6,7342	0,070916	0,9980	26,89
Produção de etileno - sem (-ACC)	20,54	9,3955	0,078378	0,9801	28,58

$$\text{Taxa de produção de etileno: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{be^{-kt}}$$

Tabela 4A. Modelo descritivo da produção de etileno por sementes dormentes de 8 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita, em função do tempo, determinada com base na MF (Fig10.1)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$				$t_{\text{taxa max}} \text{ (h)}$ $Y''=0, t = \ln b/k$
	a	b	k	R^2	
Selenato de sódio	22,25	34,2941	0,10045	0,9940	35,19
Selenito de sódio	19,36	22,7622	0,09331	0,9980	33,49
Ácido selênico	23,41	29,3448	0,09417	0,9900	35,88
Ácido selenoso	15,94	18,5317	0,07691	0,9960	37,96
Selenouréia	27,78	13,5298	0,09637	0,9960	27,03
Seleno-L-metionina	31,31	9,2051	0,07817	0,9960	28,39
Tetracloro de selênio	22,30	25,0021	0,09610	0,9960	33,50
Dióxido de selênio	20,39	24,4925	0,09549	0,9920	33,50
Controle dormente	7,18	14,4172	0,07008	0,9960	38,08
Controle não-dormente	30,12	2,8531	0,07963	0,8519	13,16

$$\text{Taxa de produção de etileno: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{be^{-kt}}$$

Tabela 5A. Modelo descritivo da produção de etileno por sementes dormentes de 8 dias tratadas com compostos selênicos e não-dormentes de 330 dias de idade pós-colheita, em função do tempo, determinada por semente (Fig10.2)

Tratamentos	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$				$t_{\text{taxa max}} \text{ (h)}$ $Y''=0, t = \ln b/k$
	a	b	k	R^2	
Selenato de sódio	215,27	27,7386	0,08403	0,9960	39,54
Selenito de sódio	194,10	19,9850	0,07882	0,9980	38,00
Ácido selênico	217,46	24,5544	0,08018	0,9920	39,92
Ácido selenoso	143,56	17,6276	0,06792	0,9960	42,24
Selenouréia	260,46	13,1412	0,08164	0,9960	31,55
Seleno-L-Metionina	285,60	9,5816	0,06679	0,9980	33,83
Tetracloro de selênio	214,47	20,7038	0,07868	0,9960	38,51
Dióxido de selênio	195,97	20,4808	0,07857	0,9940	38,43
Controle dormente	43,54	14,0899	0,06582	0,9960	40,19
Controle não-dormente	242,85	3,7988	0,06546	0,8892	20,38

$$\text{Taxa de produção de etileno: } Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{be^{-kt}}$$

Tabela 6A. Modelo descritivo da produção de etileno por sementes dormentes de estilosante de 14 dias de idade pós-colheita, tratadas com seleno-L-metionina e seleno-DL-etionina, em função do tempo (Fig12.1)

Tratamento	Coeficientes da função: $Y = ae^{-be^{-kt}}$				$t_{\text{taxa max}} \text{ (h)}$
	a	b	k	R^2	$Y''=0, t = \ln b/k$
Seleno-L-metionina - MF	54,67	9,9364	0,08181	0,9998	28,07
Seleno-DL-etionina - MF	42,02	6,0929	0,08223	0,9940	21,98
Controle dormente - MF	7,78	13,6826	0,08070	0,9565	32,42
Seleno-L-metionina - sem	490,65	10,1254	0,06951	0,9998	33,30
Seleno-DL-etionina - sem	327,78	6,3732	0,06766	0,9920	27,37
Controle dormente - sem	44,78	13,3010	0,07550	0,9584	34,28

Taxa de produção de etileno: $Y' = (abk)/e^{kt} \cdot e^{-be^{-kt}}$