

UNIDADE IX
HORMÔNIOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO

HORMÔNIOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO

PARTE I - INFORMAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As plantas são organismos multicelulares complexos, necessitando para o seu desenvolvimento ordenado um eficiente meio de comunicação entre os órgãos, tecidos e células via simplasto e/ou apoplasto. Para coordenar suas atividades, as células da planta devem ser capazes de se comunicar, frequentemente, a diferentes distâncias (entre órgãos, por exemplo). Os principais meios de comunicação intercelular são os hormônios, mensageiros químicos primários que carregam a informação entre células e, desta forma, coordenam o seu crescimento e desenvolvimento.

Estudos realizados durante o último século têm mostrado que o desenvolvimento da planta é regulado por cinco principais classes de hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (Figura 1). Moléculas receptoras específicas correspondentes para cada um dos hormônios de planta, estão presentes nas células alvo (onde o hormônio vai atuar) e a ligação hormônio-receptor parece desencadear as respostas. Dentre estas classes de hormônios, algumas promovem enquanto outras inibem vários aspectos do desenvolvimento da planta, podendo as mesmas atuar sozinhas ou em conjunto (**balanço hormonal**).

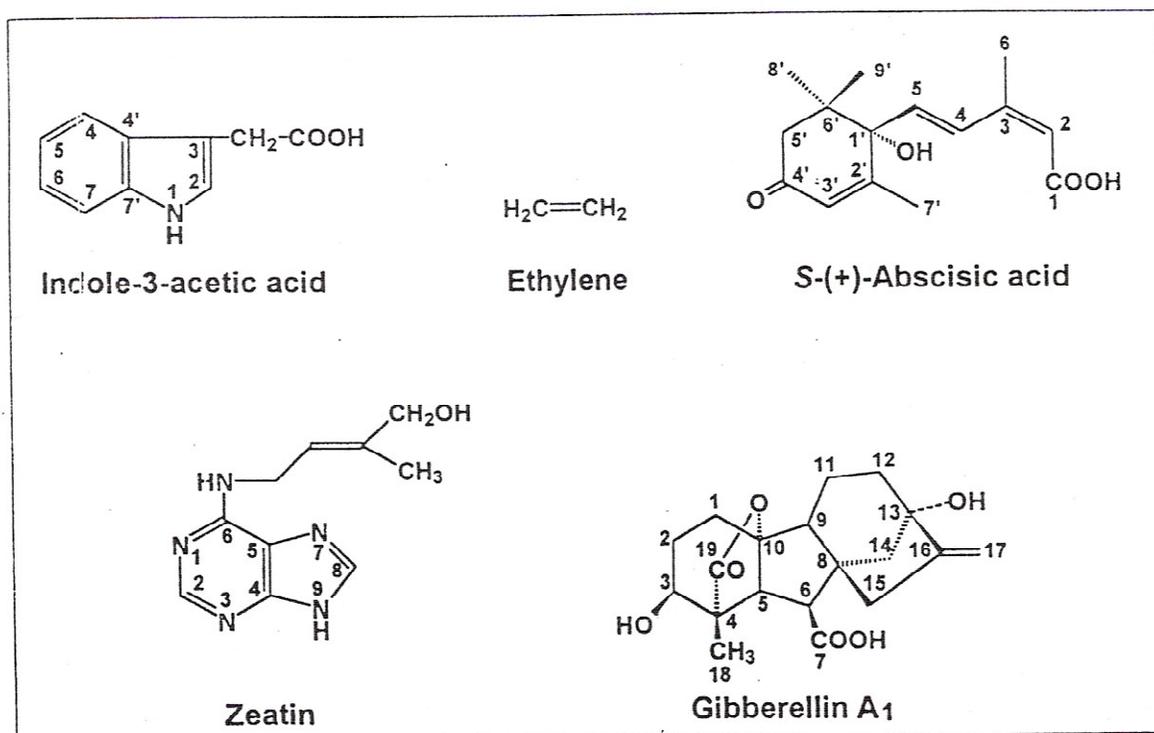


Figura 1 – Estrutura dos cinco hormônios clássicos de plantas (Kende & Zeevaart, 1997).

2. CONCEITOS DE HORMÔNIO E DE REGULADORES DE CRESCIMENTO

De acordo com a maioria dos fisiologistas de plantas, o **Hormônio** de planta (também chamado de **Fitohormônio**) é um composto orgânico sintetizado em uma parte da planta e translocado para outra parte, onde, em baixa concentração, causa uma resposta fisiológica (promoção ou inibição).

Para esclarecer esse conceito precisamos fazer as seguintes considerações.

- Como os hormônios devem ser sintetizados pelas plantas, nutrientes inorgânicos (como Ca^{2+} e K^+) que causam importantes respostas nas plantas, não são considerados hormônios;
- A definição também estabelece que o hormônio deve ser translocado na planta. No entanto, isso não significa que o hormônio não possa causar alguma resposta na célula onde ele é produzido;
- Os hormônios são geralmente efetivos em concentrações em torno de $1,0 \mu\text{M}$. Muitas outras substâncias orgânicas sintetizadas pelas plantas, como sacarose, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, etc., não se incluem no conceito de hormônio, pois são encontradas em elevadas concentrações nas plantas (1,0 a 50 mM).

O termo **Regulador de Crescimento** é normalmente empregado para compostos naturais (fitohormônio e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos (hormônio sintético e regulador sintético) que exibem atividade no controle do crescimento e desenvolvimento da planta.

3. IDENTIFICAÇÃO DE HORMÔNIOS

Os métodos utilizados para identificar os hormônios podem ser agrupados em três categorias: Bioensaios, Análise Instrumental e Imunoensaios.

a) Bioensaios

A atividade biológica de hormônios ou de extratos de plantas é comumente testada pela aplicação deles a sistemas vegetais em que se conhece a resposta para aquela classe particular de hormônio. Esses testes são conhecidos como Bioensaios. Portanto bioensaio é a medida do efeito de uma substância biologicamente ativa, conhecida ou não, em material vivo, cuja resposta é conhecida e é proporcional à concentração.

Por décadas, os bioensaios foram os principais meios, se não os únicos, para obtenção de informações quantitativas e qualitativas à cerca dos hormônios.

Para que um bioensaio seja útil ele precisa atender três principais critérios:

- O sistema deve responder especificamente àquele hormônio ou classe de hormônio.
- A resposta deve ser verificada em baixas concentrações do hormônio
- A magnitude da resposta deve oferecer um relacionamento quantitativo com a concentração do hormônio

O bioensaio precisa ser escolhido de acordo com a substância que está sendo estudada. Assim, se estivermos estudando giberelinas, precisamos utilizar um teste específico para

giberelinas. Além disso, toda vez que um extrato vegetal é testado, deve-se montar uma curva-padrão com doses conhecidas da substância padrão (por exemplo, ácido giberélico).

A figura 2 ilustra um bioensaio típico que relaciona a concentração de auxina (AIA - ácido indol acético) com o crescimento de segmentos de caule de ervilha. Note que o crescimento aumenta com o aumento da concentração de AIA, atingindo um ótimo. Concentrações acima do ótimo resultam na redução da taxa de crescimento, ou seja, se a concentração de auxina for muito alta pode ocorrer inibição do crescimento. Quando este teste é usado para determinar a quantidade de auxinas em um extrato vegetal, deve-se trabalhar na faixa em que a resposta é linear (observe no gráfico que o crescimento é linear quando as concentrações estão na faixa de zero a 0,1 mg L⁻¹ de AIA).

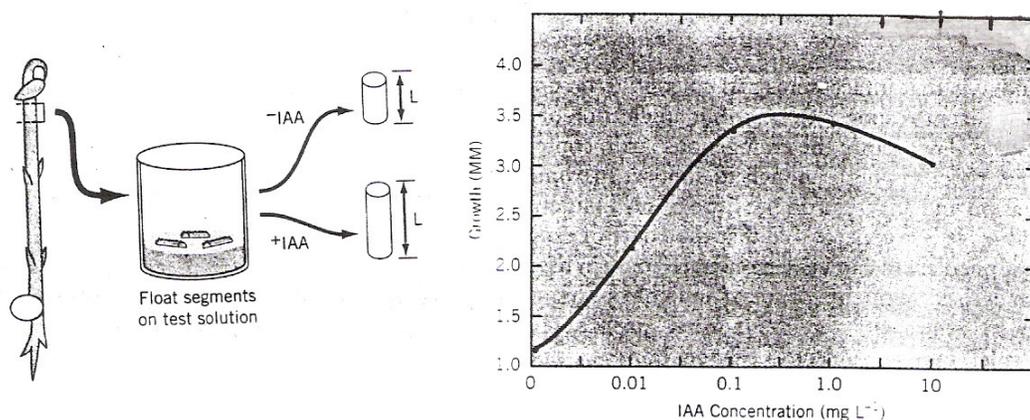


Figura 2 – Bioensaio relacionando a concentração de auxinas com o crescimento no escuro de seções de caules de ervilha (Hopkins, 2000)

Alguns outros exemplos de bioensaios: o teste da curvatura do coleópilo (auxinas), o teste do milho anão (giberelinas), o teste de preservação da clorofila (citocininas), o teste do fechamento estomático (ácido abscísico), estiolamento de plantas de ervilha (etileno), etc. Para maiores detalhes consulte o livro do FERRI (1985).

O uso de bioensaios para testar a atividade de hormônios continua sendo, ainda, uma alternativa viável. No entanto, os avanços na análise instrumental e na imunquímica têm substituído quase totalmente os bioensaios na análise de rotina.

b) Análise Instrumental

Na segunda metade do Século XX, o desenvolvimento da química analítica e da análise instrumental permitiu aos investigadores obter maiores avanços na pesquisa com hormônios de planta. Para se ter uma idéia, até o final da década de 1950 não havia técnicas seguras para quantificar o hormônio gasoso, etileno.

Técnicas físico-químicas, tais como HPLC (cromatografia líquida de alta performance) e cromatografia gasosa em conjunto com a espectrometria de massa (GC – MS), têm tornado possível a análise quantitativa de hormônios (inclusive do etileno) com velocidade, sensibilidade e precisão (Consultar Davies, 1988).

c) Imunoensaios

Outra técnica que tem ganhado considerável importância para a análise de hormônio é o imunoensaio, incluindo Radioimunoensaio e o teste ELISA. Imunoensaios, disponíveis para os quatro grupos de hormônios não gasosos (auxinas, giberelinas, citocininas e ácido abscísico), empregam anticorpos (produzidos em animais, como ratos) que reagem com o hormônio (antígeno). A quantificação pode ser feita pela diferença na radioatividade do precipitado entre um controle e a amostra desconhecida (Radioimunoensaio). No caso do teste ELISA, uma enzima, a fosfatase alcalina, é ligada ao anticorpo e, a reação da enzima é usada para quantificar o imunoprecipitado (Consultar Davies, 1988).

OBS: Os métodos de quantificação de hormônios, principalmente os mais modernos, requerem extração com solventes específicos e uma purificação parcial.

4. MECANISMO GERAL DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS

A seqüência de eventos iniciada pelos hormônios pode geralmente ser apresentada em três estágios (Figura 3): a percepção do sinal; a via de transdução e amplificação do sinal; e a resposta final.

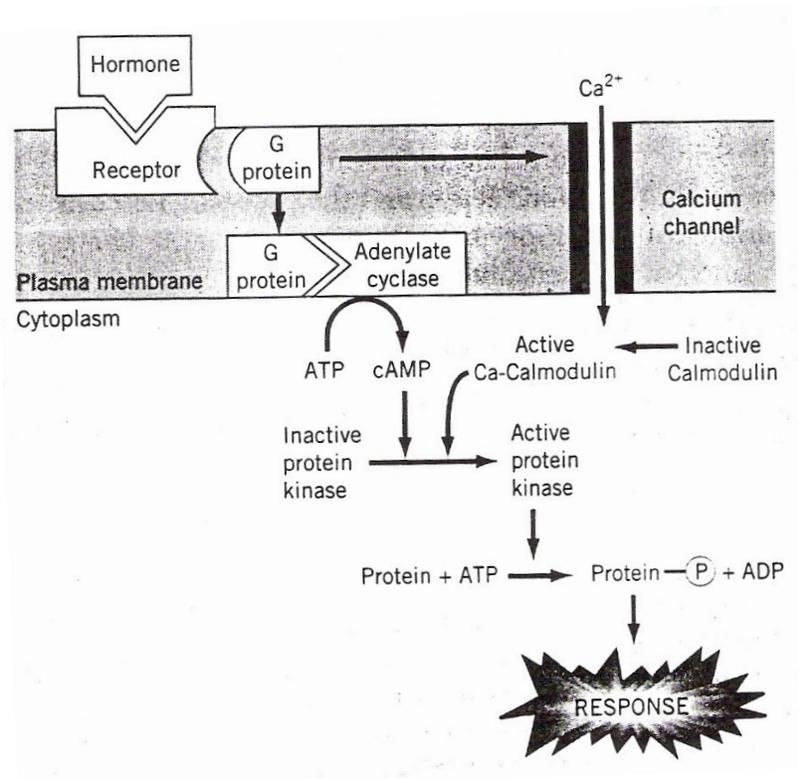


Figura 3 – Um modelo para a ação de hormônios de plantas (Hopkins, 2000)

a) A percepção do sinal

O **Sinal** a que nos referimos pode ser alguma mudança no ambiente (alteração na umidade do solo, na temperatura do ar, na concentração de íons, respostas à luz, etc.) ou no desenvolvimento da planta (germinação ou dormência, passagem do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo, formação de sementes e frutos, senescência, queda de folhas, amadurecimento de frutos, etc.). Estes sinais podem induzir a produção de hormônios.

A percepção do sinal envolve a reação do hormônio com o receptor. O hormônio de planta pode difundir-se de célula para célula através do simplasto ou do apoplasto. Em cada evento a célula destinada a responder ao hormônio, conhecida como célula alvo, deve ser capaz de detectar a presença do hormônio, o que é feito através de receptores.

A detecção é acompanhada pela interação entre o hormônio e o receptor celular, o qual é específico para o hormônio e característico da célula alvo. Estes receptores são glicoproteínas que se ligam reversivelmente com o hormônio. A formação do complexo ativo hormônio-receptor, completa o estágio de percepção do sinal.

b) Transdução e Amplificação do Sinal

Nesse estágio, o complexo ativo hormônio-receptor inicia uma cascata de eventos bioquímicos/moleculares que finalmente levam à resposta final.

Nesse ponto, é importante distinguir duas classes de mensageiros. O hormônio é considerado um **Mensageiro Primário** por que ele identifica e inicia a mensagem original na superfície celular. Outras moléculas de sinalização (Ca^{2+} , Inositol trifosfato – IP_3 , AMP cíclico, etc.) são considerados **Mensageiros Secundários**. Estes mensageiros secundários providenciam a amplificação do sinal original (identificado pelo hormônio), iniciando, assim, uma ou mais vias de transdução de sinal.

Um exemplo:

- a raiz percebe a redução na umidade no solo (SINAL) produzindo o hormônio ácido abscísico - ABA (mensageiro primário).
- ABA é translocado para as folhas, onde altera a concentração de mensageiros secundários (Ca^{2+} e IP_3) no citosol das células-guardas.
- Esses mensageiros secundários vão amplificar o sinal, através de três vias específicas, as quais produzem o fechamento estomático (Resposta Final).

c) A Resposta Final

A resposta de cada célula para sinais identificados pelos hormônios, depende de dois principais fatores: (1) seu programa de desenvolvimento, isto é, os tipos de genes que estão sendo expressos no tempo de exposição ao sinal; (2) a concentração de outras moléculas de sinalização (mensageiros secundários).

Dependendo da velocidade da resposta, as vias de transdução de sinal podem provocar ou não alterações na expressão gênica. Em alguns casos, a resposta envolve alteração na atividade de enzimas pré-existentes ou na abertura de canais de íons. Em outros casos, a resposta envolve a ativação ou inibição de fatores de transcrição, os quais alteram a expressão gênica.

Os resultados mais recentes sobre o modo de ação dos hormônios, inclusive para respostas específicas, serão descritas posteriormente.

PARTE II - INFORMAÇÕES ESPECÍFICAS SOBRE AS PRINCIPAIS CLASSES DE HORMÔNIOS

1. AUXINAS: HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

1.1A Descoberta

Os estudos desenvolvidos por Went (1926) demonstraram inequivocamente que a curvatura do **coleópilo** (folhas modificadas que cobrem a parte aérea de gramíneas na fase inicial do estabelecimento da plântula) e, conseqüentemente, o seu crescimento, em resposta à luz, era influenciado por uma substância química produzida no ápice do coleóptilo (Figura 4). Essa substância era transportada lateralmente para o lado sombreado, onde ocorria o maior crescimento. Essa substância se enquadrava perfeitamente no conceito de hormônio, visto que ela era produzida em um local e transportada em mínimas quantidades para o seu sítio de ação. Visto que essa substância promovia o alongamento do tecido do coleóptilo, F. Kölg e outros denominaram o composto de Went de AUXINA (do grego, “auxein” que significa “crescer”, “to increase”, “to growth”).

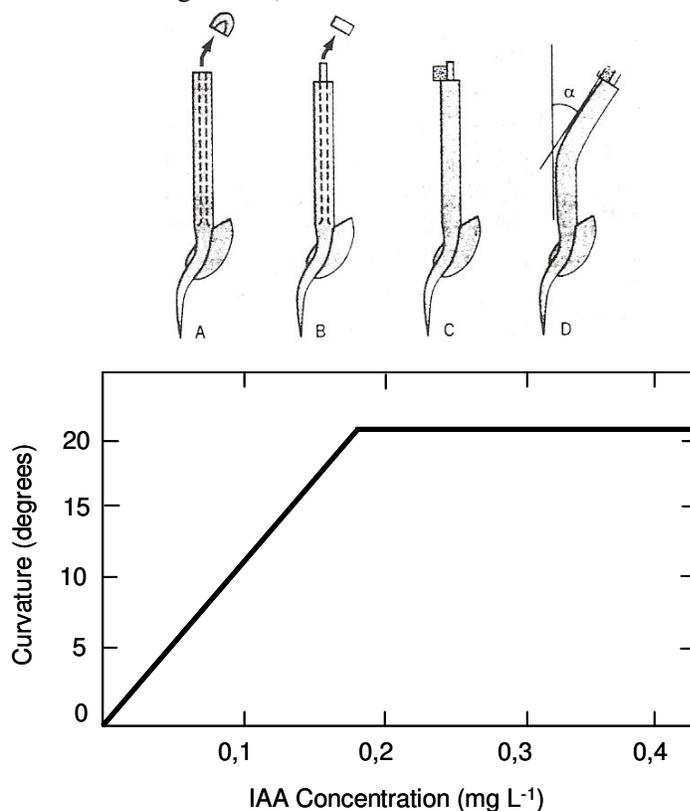


Figura 4 – Estudos realizados por Went, demonstrando a relação entre a curvatura do coleóptilo e a concentração de AIA no lado sombreado (Hopkins, 1998).

Na década de 1930 dois grupos de pesquisadores (F. Kölg e A. J. Haagen-Smith na Holanda e K. V. Thimann nos Estados Unidos) identificaram a auxina como sendo o Ácido Indol-3-Acético (AIA). Posteriormente, outras auxinas naturais foram descobertas (Ácido Fenil-Acético e Ácido 4-Cl –Indol-3-Acético), porém, o AIA é de longe a mais abundante e

mais relevante do ponto de vista fisiológico (Figura 5). Em face da estrutura relativamente simples do AIA (IAA na figura), os laboratórios foram capazes de sintetizar várias moléculas com atividade de auxina, as quais são conhecidas como auxinas sintéticas (Ácido Indol-3-Propílico – AIP ou IPA; Ácido Naftaleno Acético – ANA ou NAA; Ácido 2,4 diclorofenoxiacético – 2,4 D, dentre outros).

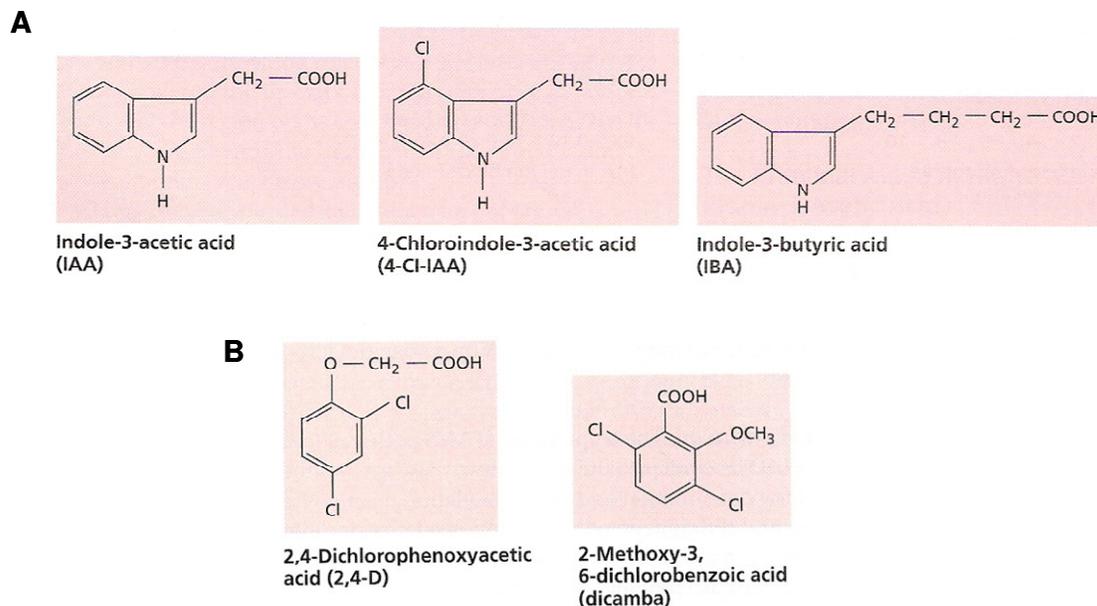


Figura 5 – Estruturas de auxinas naturais (A) e de algumas auxinas sintéticas (B) (Taiz & Zeiger, 1998).

A definição inicial de auxina incluía todas as substâncias naturais e sintéticas que estimulavam o alongamento em coleótilos e seções de caules. No entanto, sabe-se hoje que as auxinas afetam muitos outros processos na planta. Em face disso, Cleland (1996) recomendou a seguinte definição para auxinas: “Um composto que tem um espectro de atividades biológicas similar, porém, não necessariamente, idêntico àquele do AIA”. Isto inclui a habilidade para:

- ✓ Induzir o alongamento em coleótilos isolados ou seções de caules;
- ✓ Induzir divisão celular em tecidos de *callus* na presença de citocininas;
- ✓ Promover a formação de raízes laterais em superfícies cortadas de caules;
- ✓ Induzir o crescimento de frutos partenocárpico;
- ✓ Induzir a produção de etileno.

Embora a estrutura das auxinas ativas sejam quimicamente diversas, uma comparação destas em pH neutro revela que todas as estruturas possuem uma carga negativa forte no grupo carboxílico (da cadeia de carbono) e uma carga positiva fraca na estrutura do anel. Estas cargas são sempre separadas por uma distância de 0,5 nm, independente do tipo de auxina (Figura 6). Esta separação de carga pode ser um requerimento estrutural essencial para que a molécula tenha atividade de auxina.

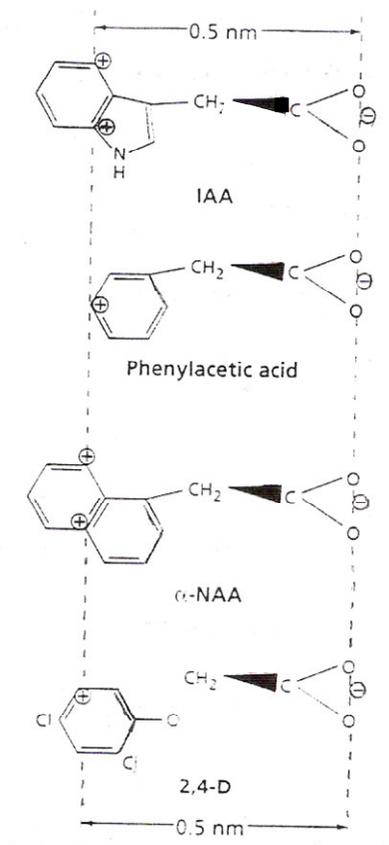


Figura 6 – Formas dissociadas de auxinas naturais e sintéticas, mostrando a separação de cargas nas moléculas (Taiz & Zeiger, 1998).

Alguns compostos sintéticos, por exemplo, o Ácido α -(p-clorofenoxi) Isobutírico (PCIB), atuam inibindo substancialmente os efeitos das auxinas. Estes compostos são conhecidos como ANTIAUXINAS e, quando aplicados à planta, podem competir com o AIA pelos sítios de ligação dos receptores específicos, inibindo a ação normal da auxina. Esta inibição pode ser corrigida pela adição de AIA em excesso, indicando que auxinas e antiauxinas competem pelos sítios de ligação aos receptores.

1.2 Ocorrência e Metabolismo do AIA.

O AIA é de ocorrência bastante ampla no reino vegetal. Ela ocorre principalmente em órgãos que estão crescendo ativamente, tais como meristemas apicais da parte aérea, folhas jovens e frutos em desenvolvimento e são os sítios primários da síntese de AIA. Embora o AIA possa ser produzido, também, em folhas maduras e nos ápices radiculares, o nível de produção nesses tecidos é usualmente baixo.

O AIA é estruturalmente relacionado ao aminoácido triptofano e estudos iniciais sobre a biossíntese de AIA foram focalizados tendo o triptofano como o provável precursor. A partir desses estudos, quatro vias de síntese de AIA dependentes de triptofano foram identificadas em plantas e bactérias. Destas, a via do Ácido Indol-3-Pirúvico (IPA) é, provavelmente, a mais comum nos vegetais. Esta via envolve a desaminação do triptofano para formar o IPA, o

qual sofre descaboxilação, produzindo o Indol-3-Acetaldeído. Este é finalmente oxidado por uma desidrogenase específica, produzindo o AIA (Figura 7).

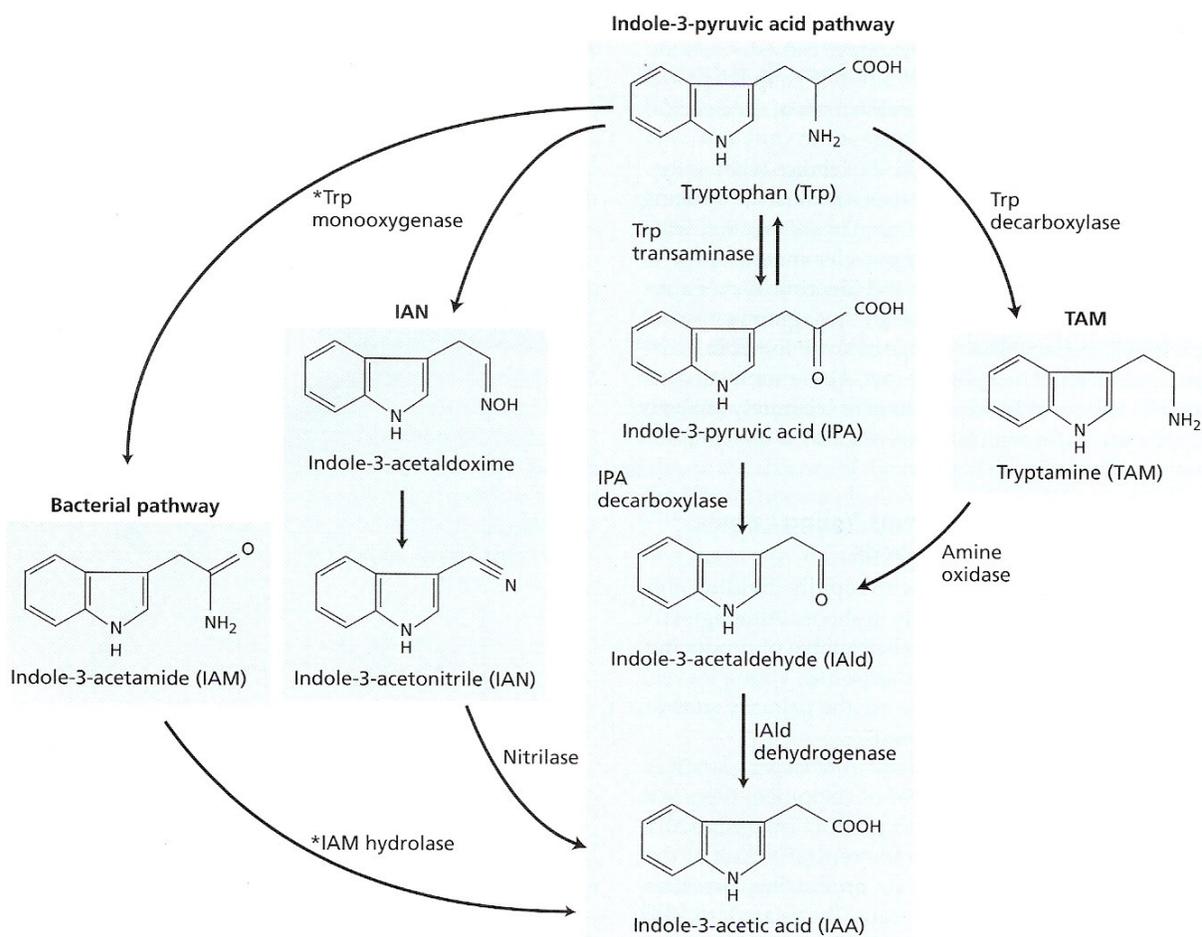


Figura 7 – Biossíntese de AIA a partir do triptofano (Taiz & Zeiger, 1998).

Em adição a estas vias dependentes de triptofano, estudos com mutantes têm evidenciado que as plantas podem, também, sintetizar AIA por uma via independente do triptofano. Um desses estudos foi conduzido com um mutante de milho (orp), o qual apresenta mutações nos genes que codificam as subunidades da enzima que catalisa a etapa final da biossíntese de triptofano, a sintase do triptofano. O mutante orp requer aplicação exógena de triptofano para sobreviver. No entanto, o mutante é incapaz de converter triptofano em AIA, mesmo quando o triptofano é oferecido em altas concentrações.

A despeito do bloqueio da biossíntese de triptofano, o mutante orp contém um montante de AIA que é cerca de 50 vezes maior do que o da planta tipo selvagem (que não sofreu mutação e, portanto sintetiza o triptofano normalmente). Essa é uma clara evidência para a existência de vias de biossíntese de AIA independentes do triptofano. Estudos posteriores com mutantes de *Arabidopsis* e de tomate (que também eram incapazes de sintetizar triptofano) estabeleceram que o ponto de ramificação para a biossíntese de AIA (sem passar pelo triptofano) é o Indol ou seu precursor, Indol-3-Glicerol Fosfato.

Embora o AIA na forma livre seja a forma biologicamente ativa do hormônio, a maioria de auxinas em plantas é encontrada na forma conjugada, em um estado covalentemente ligada. Estas auxinas conjugadas têm sido identificadas em todas as plantas superiores e são geralmente inativas. O AIA forma conjugados com compostos de baixa massa molecular (glicose, mio-inositol e amidas) e de alta massa molecular (glicoproteínas).

Como já comentamos anteriormente, a maior concentração de auxinas livre nas plantas é encontrada nos meristemas apicais da parte aérea, folhas jovens e frutos em desenvolvimento, visto que eles são os sítios primários da síntese de auxinas. No entanto, como a auxina é amplamente distribuída na planta, o metabolismo do AIA conjugado pode contribuir na regulação dos níveis de auxina livre. Por exemplo, durante a germinação de sementes de milho, o conjugado AIA-mio-inositol é translocado do endosperma para o coleóptilo, via floema, e, parte do AIA livre produzido no coleóptilo pode derivar da hidrólise desse AIA conjugado.

Como a biossíntese, a degradação enzimática de AIA parece envolver mais de uma via. Uma dessas vias pode envolver a oxidação do AIA por enzimas peroxidases, produzindo o 3-metilenooxidol, via descarboxilação. No entanto, um processo de oxidação, sem que ocorra descarboxilação, parece ser a principal via de degradação do AIA, a qual produz o Ácido Oxidol-3-Acético. Assim, o “pool” de AIA no citosol é metabolizado, tanto via conjugação como pelo catabolismo puramente oxidativo (sem descarboxilação). O “pool” de AIA nos cloroplastos é protegido desses processos, sendo regulado pela quantidade de AIA no citosol, com o qual ele está em equilíbrio.

1.3 Transporte de AIA

Há mais de 50 anos foi descoberto que, em seções de coleótilos isolados, o AIA move-se preferencialmente do ápice para a base (basipetalmente). Esse tipo de transporte tem sido chamado de TRANSPORTE POLAR BASÍPETO. A auxina é o único fitohormônio que é transportado desta forma. Visto que o ápice da parte aérea serve como a principal fonte de auxina para a planta inteira, o transporte polar contribui para a formação de um gradiente decrescente de auxina da parte aérea para as raízes. Esse gradiente longitudinal de auxina parece controlar alguns processos na planta, incluindo o alongamento do caule, a dominância apical, a cicatrização de ferimentos e a senescência de folhas.

A elucidação do mecanismo quimiosmótico para o transporte de solutos na década de 1960 (Mitchel), permitiu a criação de um modelo para explicar o transporte polar de auxinas (Figura 8). A primeira etapa no transporte polar é o **influxo da auxina (1)**. Esta absorção pode ser passiva ou ativa. Essa dupla possibilidade depende fortemente do pH do apoplasto. A forma não dissociada do AIA (AIAH), na qual o grupo carboxílico está protonado, é lipofílica e difunde-se livremente através da bicamada lipídica. Visto que a H^+ -ATPase da membrana plasmática mantém normalmente a solução na parede celular (apoplasto) com pH em torno de 5,0, cerca de metade das moléculas de AIA (que tem $pK_a = 4,75$) no apoplasto poderá estar na forma não dissociada e, portanto, poderá difundir-se passivamente para dentro da célula, a favor do seu gradiente de concentração. O restante da auxina na forma dissociada (AIA^-) é absorvida ativamente, via um transporte ativo secundário (cotransporte), mediado por um simporte $AIA^- / 2 H^+$.

Uma vez que auxina entra no citosol, o qual tem um pH em torno de 7,2, quase todo o AIA poderá estar na forma dissociada (AIA^-). Esse AIA dissociado deixa a célula, **efluxo (2)**, via um carreador que utiliza a diferença de potencial de membrana que é negativo dentro da célula. Uma feição crucial desse modelo é que o efluxo de AIA^- ocorre preferencialmente na membrana basal de cada célula, onde o carreador de efluxo de AIA parece estar localizado.

De acordo com esse modelo, a repetição da absorção (influxo) de AIA na parte apical da célula (1) e a preferencial saída (efluxo) na base de cada célula (2), garante a ocorrência do transporte polar.

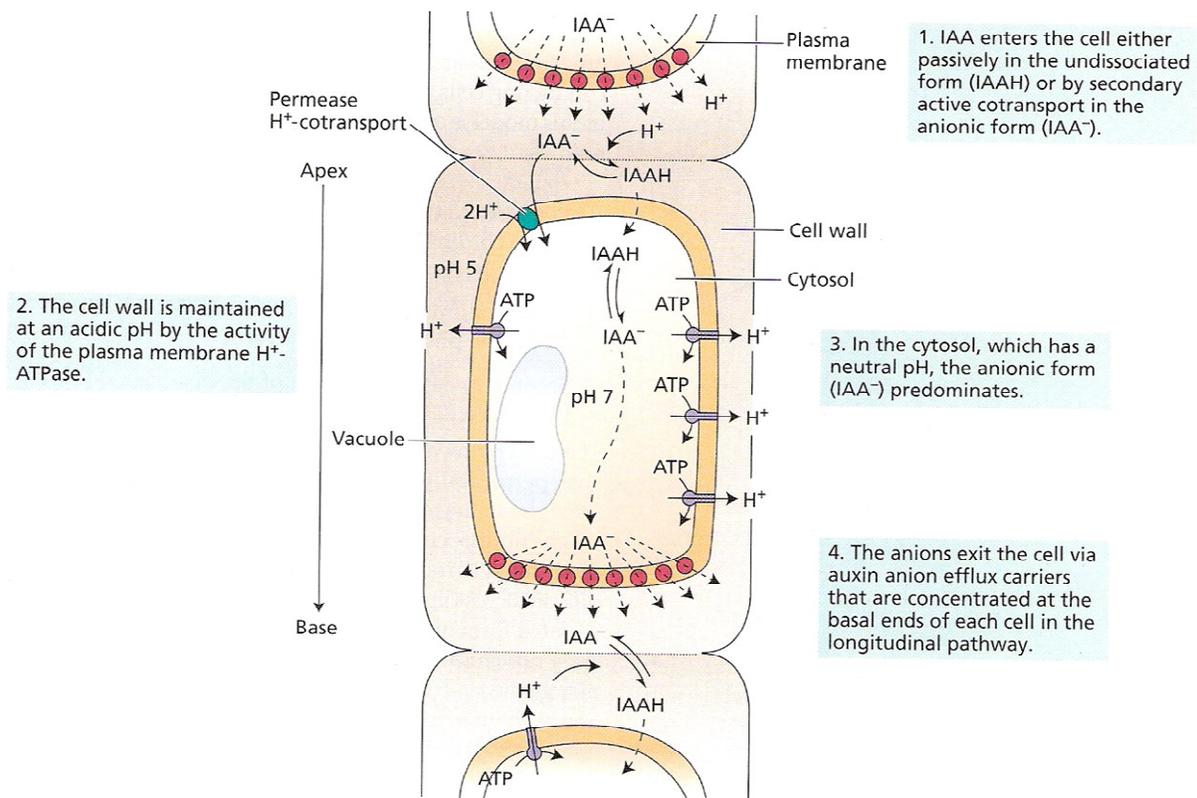


Figura 8 – Modelo quimiosmótico para o transporte polar de auxinas (Taiz & Zeiger, 1998).

Por outro lado, o AIA que é sintetizado nas folhas maduras parece ser transportado para o resto da planta, via floema. Nesse transporte, a auxina pode mover-se em diferentes direções e em velocidades muito maiores do que aquelas observadas no transporte polar. Algumas evidências sugerem que o transporte de auxinas a longa distância via floema é importante para controlar alguns processos, como a divisão nas células do câmbio vascular e a formação de raízes laterais. Em algumas situações, o AIA na forma conjugada parece ser transportado via floema, para as regiões de crescimento.

Do exposto acima, vê-se que o nível de AIA livre no citosol é determinado por alguns processos interconectados (Figura 9). A soma total desses processos em um dado local na planta determina a **quantidade** de AIA livre disponível para a célula.

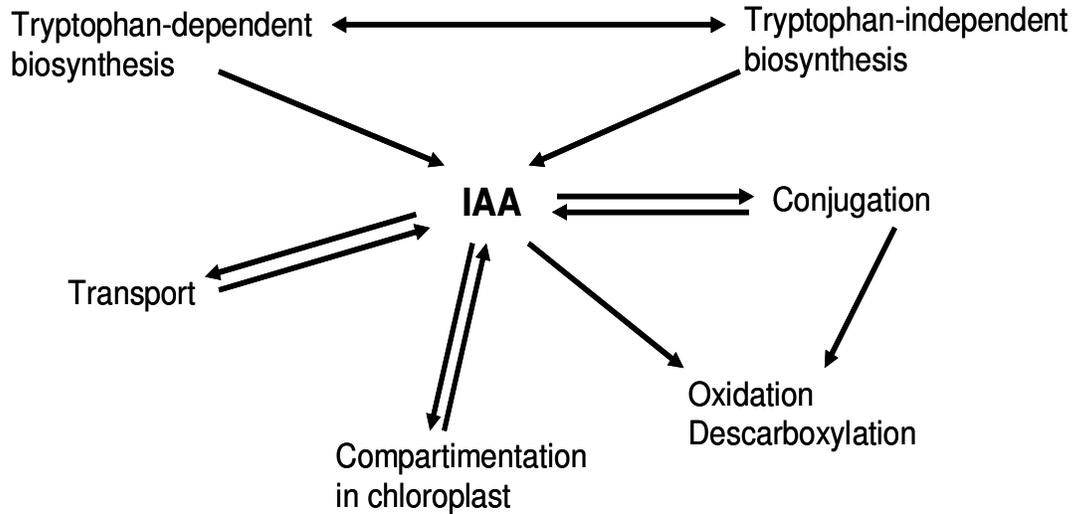


Figura 9 – Fatores que influenciam os níveis de AIA livre (representada pelo ácido indol acético - AIA ou IAA) em células de plantas (Taiz & Zeiger, 1998).

1.4 Papel Fisiológico

a) Alongamento celular

O constante suprimento de auxinas para a região subapical do caule ou do coleóptilo é requerido para o continuado alongamento das células. A relação entre auxinas e o controle do crescimento em alongamento da raiz tem sido bem mais difícil de demonstrar. Originalmente foi proposto que respostas de raízes e da parte aérea às auxinas eram similares, exceto que a concentração ótima de auxina é muito menor nas raízes. Assim, o crescimento da raiz seria fortemente inibido pela auxina em concentrações que promovem alongamento em caules e em coleóptilos. Esta inibição do crescimento pode estar associada ao estímulo na síntese de etileno, pelas altas concentrações de auxinas.

Para entendermos o papel das auxinas no alongamento celular, devemos inicialmente recordar que a expansão da célula vegetal ocorre de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de Crescimento} = m (\Psi_p - Y)$$

Em que: m = extensibilidade da parede celular; Ψ_p = potencial de turgescência; e Y = potencial de turgescência limite para que ocorra o crescimento.

Primeiramente, para que ocorra o crescimento, a célula deve absorver água através da membrana plasmática, o que é impulsionado pelo gradiente de potencial hídrico (o potencial hídrico no interior da célula é menor que no meio externo ou no apoplasto). A entrada de água

na célula produz um aumento no potencial de turgescência, que atua sobre a parede celular. Quando o valor de Ψ_p supera a pressão limite (Y), a parede se distende e a célula cresce.

Alternativamente, alterações nos valores de m (extensibilidade da parede celular) podem alterar os valores de Y . Células com paredes mais extensíveis crescem com maior facilidade. Muitas evidências indicam que a auxina causa um aumento na extensibilidade da parede (m), ou seja, na presença de auxina a parede celular se distende mais facilmente e, conseqüentemente, a célula se expande.

A hipótese aceita para explicar o efeito da auxina no alongamento celular é conhecida como **HIPÓTESE DO CRESCIMENTO ÁCIDO**. Esta hipótese estabelece que a auxina causa um aumento no efluxo de H^+ , com conseqüente queda no pH do apoplasto. Isto ativa inicialmente as expansinas (grupo de proteínas) que atuam quebrando as pontes de hidrogênio das ligações cruzadas entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses. Após, outras enzimas são ativadas (hidrolases, pectinases, celulasas e hemicelulasas) que podem atuar sobre os componentes da parede celular, provocando seu afrouxamento e aumentando sua extensibilidade.

De acordo com essa hipótese, a auxina poderia aumentar a taxa de efluxo de H^+ através da membrana plasmática agindo sobre os seguintes processos: aumentando a atividade da H^+ -ATPase ou aumentando a síntese da H^+ -ATPase. Evidências para ambos os mecanismos têm sido obtidas (Figura 10).

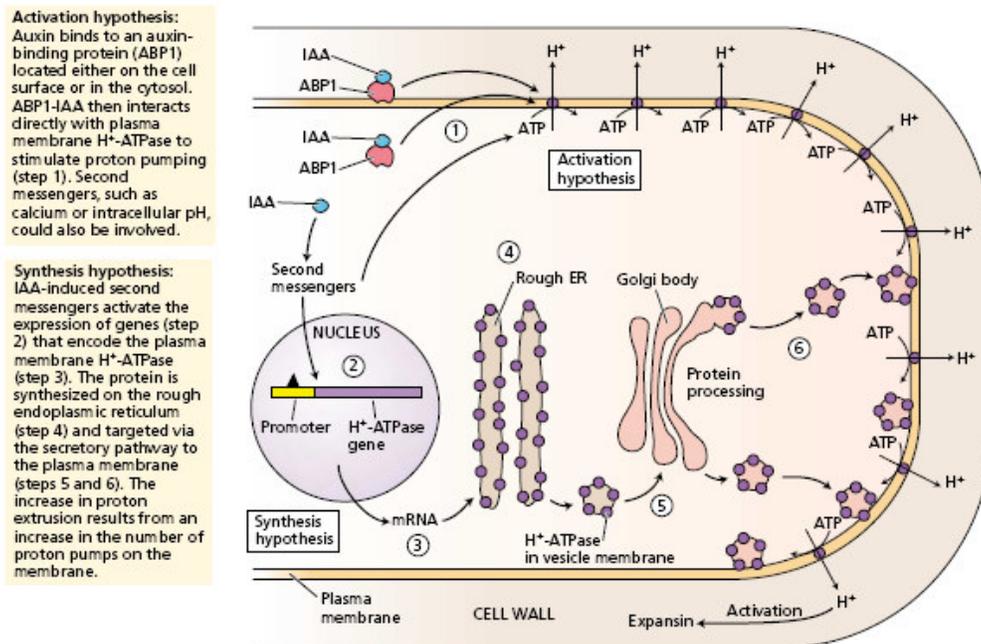


Figura 10 - Modelo atual de extrusão de H^+ induzido pelo AIA. Em muitas plantas, os dois mecanismos podem ocorrer. Independente de como o bombeamento de H^+ seja aumentado, o afrouxamento da parede induzido pela acidez é mediado pelas expansinas. (Taiz & Zeiger, 1998)

É importante destacar que a acidificação da parede celular não é a única maneira pela qual a auxina induz o alongamento de células de plantas. A auxina deve afetar outros importantes processos relacionados ao crescimento celular, tais como, absorção e produção de solutos osmóticos, além de controlar o crescimento e a manutenção da estrutura da parede

celular. A absorção de solutos, como já vimos, depende, em grande parte, da atividade da H^+ -ATPase, a qual é induzida pela auxina. A auxina também aumenta a atividade de certas enzimas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos. Esses polissacarídeos podem ser utilizados na síntese de novos materiais da parede celular, contribuindo para a continuação do crescimento celular.

b) Tropismo e Nastismos

O poder de movimento é geralmente visto como uma característica animal, não associado às plantas. O movimento em plantas superiores não envolve locomoção como nos animais e também não é muito rápido. Em plantas o movimento é geralmente lento, porém é o fator chave que determina a orientação da planta no espaço.

São reconhecidas duas categorias principais de movimento em plantas:

- ✓ Movimento de Crescimento - são irreversíveis e resultam do crescimento diferencial dentro de um órgão;
- ✓ Movimentos por variação de Turgescência - são reversíveis, resultando de mudanças de volume de certas células, mais freqüentemente associadas a um órgão especial, o **pulvino**.

Dentro destas duas categorias, podemos distinguir entre NASTISMOS E TROPISMOS.

NASTISMOS – As respostas násticas não apresentam uma direção vetorial em relação ao estímulo. A direcionalidade das respostas násticas é determinada ou depende apenas dos tecidos.

➤ **Movimentos Násticos associados ao crescimento diferencial:**

- Epinastia – É a curvatura para baixo de um órgão, comumente pecíolos e folhas, cujos ápices são inclinados para baixo. Não se trata de uma resposta à gravidade, porém, parece estar associada à distribuição diferencial de auxinas entre o lado superior e o inferior do pecíolo, o que produz o crescimento diferencial. Epinastia é uma resposta comum ao hormônio etileno ou concentrações elevadas de auxinas. Isto será mais bem discutido quando falarmos sobre o etileno.
- Hiponastia – É a curvatura de órgão, principalmente folhas, para cima. Sua ocorrência é bem menos comum do que a epinastia e parece ser induzida pela giberelinas.

➤ **Movimentos Násticos associados às mudanças na turgescência das células:**

- Nictinásticos (do grego “nyctos” = noite + nastos = fechar) – São mais típicos de folhas que apresentam uma posição diferente na noite, em relação àquela observada durante o dia. Tipicamente, folhas e folíolos permanecem na posição horizontal, ou abertos, durante o dia e assumem uma posição mais vertical, ou fechada, durante a noite. Este movimentos nictinásticos dependem de mudanças reversíveis de turgescência nas células do **pulvino**. Estes movimentos nictinásticos parecem estar sob o controle do fitocromo (veremos isto na Unidade X)
- Sismonásticos – Um limitado número de leguminosas que possuem pulvino e exibem movimento nictinástico, também exibem uma resposta a estímulos mecânicos. Este

fenômeno é conhecido como Sisonastia. Visto que respostas sisonásticas respondem ao toque, elas são algumas vezes consideradas como respostas tignonásticas (movimento em respostas ao toque, que envolve mudança de turgescência de células). No entanto, respostas sisonásticas respondem a uma variedade de estímulos incluindo, ventos, ferimentos, chuvas, calor intenso, etc. A resposta final, ou seja, o movimento da folha, envolve, também, mudanças na turgescência das células do pulvino.

O melhor exemplo de resposta sisonástica é encontrado em um arbusto tropical, a espécie *Mimosa pudica* (Figura 11). A vantagem de tal mecanismo não é clara. Alguns têm sugerido que, visto que estas plantas crescem em ambientes áridos ou semi-áridos, onde constantemente são expostas a ventos secos, o enrolamento da folha pode significar uma redução nas perdas de água. Outros sugerem que este mecanismo seria uma proteção contra herbívoros ou insetos. Apesar destas incertezas, uma coisa é certa: a resposta é muito rápida. Quando o pulvino é estimulado diretamente (por exemplo, através de um toque), o movimento começa em menos de um segundo.



Figura 11 – O movimento sisonástico de plantas de *Mimosa pudica* (Hopkins, 2000).

TROPISMOS – As respostas trópicas, ao contrário das respostas násticas, estão diretamente associadas a um estímulo, isto é, elas apresentam uma direção vetorial em relação ao estímulo. A resposta pode ocorrer na mesma direção, na direção oposta ou em ângulos específicos em relação ao estímulo.

As respostas trópicas que apresentaremos a seguir parecem estar relacionadas com a **redistribuição lateral de auxinas**.

✓ **TIGMOTROPISMO**

Um tipo de tropismo é o Tigmotropismo, ou crescimento em resposta a um toque. O tigmotropismo permite o crescimento de raízes em torno de rochas e é também responsável pela habilidade da parte aérea de plantas trepadeiras para se desenvolver em torno de estruturas de suporte.

✓ **FOTOTROPISMO**

Fototropismo, ou crescimento em relação à luz, é expresso em toda a parte aérea e em algumas raízes. Ele assegura que as folhas poderão ser supridas com a luz do sol e, portanto, serão capazes de realizar a fotossíntese.

De acordo com o clássico modelo Cholodny – Went para o fototropismo, os ápices de coleótilos de gramíneas teriam três funções especializadas:

- Produção de AIA livre;
- Percepção do estímulo de luz unilateral. Uma Flavoproteína (FMN) parece ser o fotossensor do fototropismo (ela percebe a luz azul) – **fototropina**;
- Transporte lateral de AIA em resposta ao estímulo fototrópico.

Assim, em resposta ao estímulo direcional da luz, a auxina produzida no ápice, ao invés de ser transportada basipetalmente (do ápice para a base), é transportada lateralmente para o lado sombreado. Uma vez que a auxina alcança o lado sombreado, ela é transportada basipetalmente para a zona de alongamento, onde ela estimula o crescimento da célula. A aceleração do crescimento no lado sombreado e a diminuição do crescimento no lado iluminado (Figura 12), conhecido como crescimento diferencial, produz a curvatura em direção à luz (ver Figura 4).

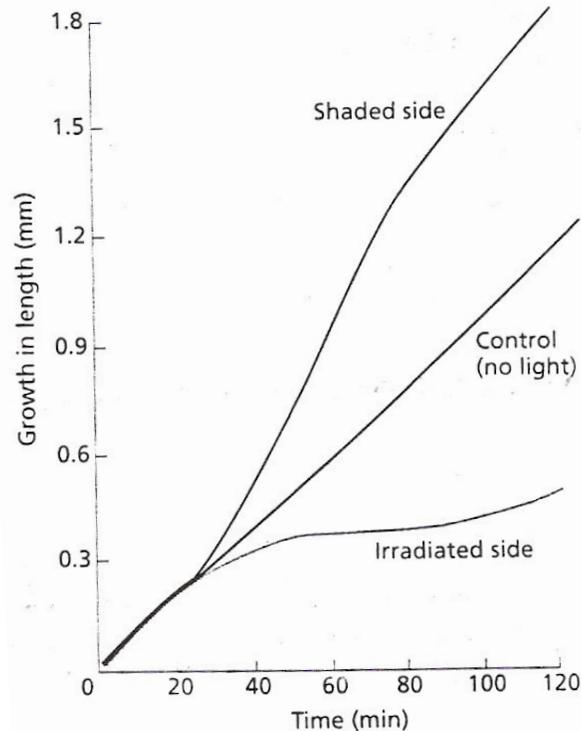


Figura 12 – O crescimento dos lados sombreado (shaded side) e iluminado (irradiated side) de coleótilos (Taiz & Zeiger, 1998).

✓ GRAVITROPISMO

Gravitropismo, crescimento em resposta à gravidade, capacita a raiz para crescer para dentro do solo e a parte aérea para crescer para cima, contra a ação da gravidade, sendo isto especialmente crítico durante os estádios iniciais de germinação e de desenvolvimento da plântula. Este alinhamento da planta é conhecido como Ortogravitropico. A raiz primária que cresce para o centro da terra, exibe Gravitropismo Positivo. A parte aérea que cresce para cima, contra a ação da gravidade, exibe Gravitropismo Negativo. Alguns órgãos, tais como estolões, rizomas e alguns ramos laterais, os quais crescem formando um ângulo reto em relação à força da gravidade, são denominados de Diagravitropicos. Órgãos orientados em ângulos intermediários (0 a 90°) em relação à força da gravidade são denominados Plagiogravitropicos. Ramos e raízes laterais são geralmente Plagiogravitropicos (Figura 13).

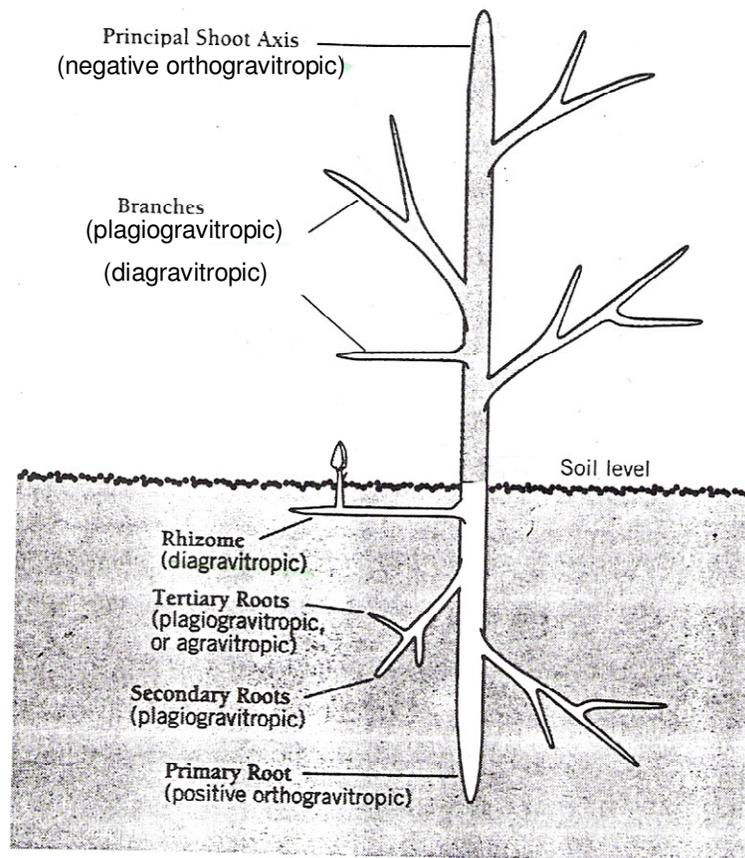


Figura 13 – Diagrama ilustrando as respostas gravitropicas de raízes e de partes aéreas (Hopkins, 2000).

OBS: Algumas raízes de plantas de mangue apresentam gravitropismo negativo. Estas raízes são conhecidas como **pneumatóforos**, as quais servem para trocas gasosas nestes ambientes alagados.

Na parte aérea (gravitropismo negativo), a bainha amilífera (camada de células que circunda o tecido vascular de caules e ramos) parece perceber o estímulo da gravidade. Nas raízes (gravitropismo positivo), os sensores da gravidade são amiloplastos (compartimentos

celulares ricos em amido), que nesse caso são conhecidos como Estatólitos. Esses grandes amiloplastos (estatólitos) são localizados nos estatócitos, no cilindro central ou na coifa da raiz.

Em uma raiz colocada na posição horizontal, os estatólitos sedimentam, por ação da gravidade, no lado inferior das células da coifa e dirigem o transporte polar de auxina para o lado inferior da coifa (Figura 14). A maioria da auxina na coifa é então transportada basipetalmente (do ápice da raiz para a base) no lado inferior da raiz. A alta concentração de auxinas no lado inferior da raiz inibe o crescimento neste lado, enquanto o decréscimo na concentração de auxina no lado superior estimula o crescimento neste lado. Como resultado desse crescimento diferencial, a raiz curva para baixo.

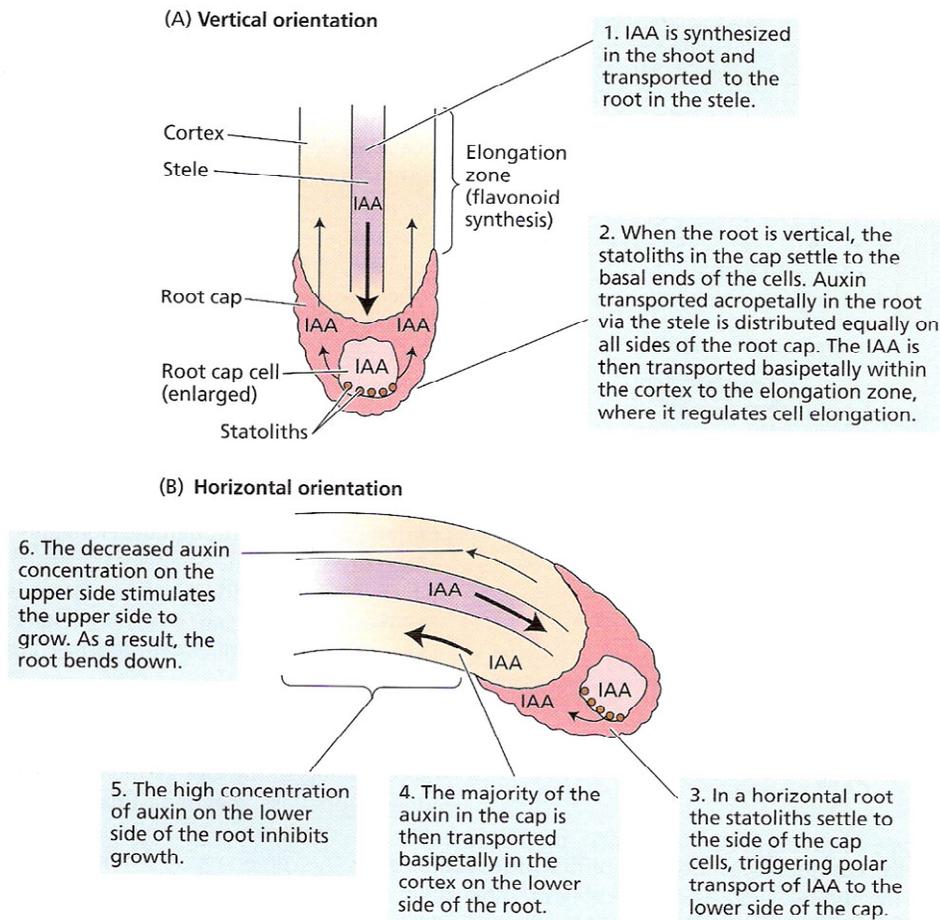


Figura 14 – Um modelo para a redistribuição de auxinas durante o gravitropismo em raízes de milho (Taiz & Zeiger, 1998).

c) Dominância apical

Na maioria das plantas superiores, o crescimento da gema apical inibe o crescimento das gemas axilares, um fenômeno conhecido como Dominância Apical. Há mais de 60 anos foi mostrado que o AIA poderia substituir a gema apical, mantendo a inibição do crescimento das gemas laterais. Este e outros resultados levaram à hipótese de que o crescimento das gemas laterais seria inibido pela auxina transportada basipetalmente desde a gema apical. No entanto, ao contrário do que se poderia esperar, a retirada do ápice e concomitante quebra da

dominância apical foi acompanhada de aumento na concentração de auxinas nas gemas laterais. Este resultado indica que a dominância apical não seria um efeito direto da auxina na inibição do crescimento da gema lateral.

Alguns resultados mostram que outros hormônios parecem estar envolvidos com a dominância apical. Por exemplo, boa correlação entre o nível de citocininas e o crescimento de gemas laterais tem sido verificada. A retirada do ápice aumenta o acúmulo de citocininas na gema axilar e aplicação de auxinas na região apical decapitada, reduz esse acúmulo. Assim, a auxina parece tornar o ápice da parte aérea um forte dreno para a citocinina proveniente das raízes, e isto poderia ser um fator envolvido na dominância apical. Além disso, remoção do ápice provoca redução nos níveis de ácido abscísico – ABA (um inibidor do crescimento da parte aérea) nas gemas laterais. Assim, altos níveis de AIA na região apical da parte aérea podem atuar mantendo altos níveis de ABA nas gemas laterais, inibindo o crescimento de tais gemas e favorecendo a dominância apical.

d) Formação de raízes laterais e adventícias

Embora o alongamento da raiz seja inibido por concentrações de auxinas maiores que 10^{-8} M, a iniciação de raízes laterais e adventícias é estimulada por altos níveis de auxinas. Com base em alguns estudos, os pesquisadores acreditam que o AIA é requerido para, pelo menos, duas etapas na formação de raízes laterais:

- ✓ AIA transportado no floema é requerido para iniciar a divisão celular nas células do câmbio vascular;
- ✓ Além disso, o AIA é requerido para promover a divisão celular e a manutenção da viabilidade celular nas raízes laterais em desenvolvimento.

Do ponto de vista prático, soluções de auxinas podem ser utilizadas para induzir a formação de raízes adventícias em pedaços de caules e de folhas. Como veremos quando estudarmos as CITOCININAS, a formação de raízes e de parte aérea em cultura de tecidos depende da relação auxinas/citocininas.

e) Abscisão foliar

A queda de folhas, flores e frutos de plantas vivas é conhecida como **ABSCISÃO**. A abscisão ocorre em uma região conhecida como **ZONA DE ABSCISÃO**, localizada próxima à base do pecíolo, pedicelo ou pedúnculo.

O AIA é conhecido como retardante do processo de abscisão nos estágios iniciais e como promotor nos estágios finais. Os níveis de auxinas são altos nas folhas jovens, decrescem progressivamente com a maturação da folha e são relativamente baixos nas folhas senescentes. Durante os estágios iniciais de abscisão foliar, aplicação de AIA inibe a queda. No entanto, aplicação de auxinas nos estágios posteriores aceleram o processo de abscisão. Esta aceleração na abscisão parece estar associada à indução na biossíntese de etileno pelo AIA, sendo o etileno o agente ativo que promove a queda de folhas. Veremos isso com mais detalhes quando estudarmos o **ETILENO**.

f) Desenvolvimento de frutos

Várias evidências sugerem que a auxina está envolvida na regulação do desenvolvimento do fruto. A auxina é produzida no pólen, no endosperma e no embrião de

sementes em desenvolvimento. Acredita-se que o estímulo inicial para o desenvolvimento do fruto resulta da polinização. Havendo sucesso na polinização, inicia-se o crescimento do óvulo, um processo conhecido como Estabelecimento do Fruto. Após a fertilização, o crescimento do fruto pode depender da auxina produzida nas sementes em desenvolvimento.

Em algumas espécies, frutos sem sementes podem ser produzidos naturalmente ou pode-se induzir a produção desses frutos nessas espécies pelo tratamento de flores não polinizadas com auxinas. Esta produção de frutos sem sementes é conhecida como **Partenocarpia**. A Auxina parece induzir primariamente o estabelecimento do fruto. O desenvolvimento do fruto parece envolver, também, outros hormônios. Por exemplo, o etileno pode influenciar o desenvolvimento de muitos frutos e, alguns efeitos da auxina na frutificação podem ser mediados pela promoção da síntese de etileno.

As auxinas também participam na regulação do desenvolvimento de gemas florais e, juntamente com as citocininas, induzem a diferenciação vascular.

d) Usos comerciais de auxinas sintéticas

As auxinas sintéticas têm sido usadas amplamente na agricultura e na horticultura há mais de 50 anos. As utilidades iniciais incluíam: enraizamento de pedaços de caules para propagação vegetativa de plantas; promoção do florescimento em abacaxi; prevenção da queda de flores e de frutos; indução da formação de frutos partenocárpicos; etc. Hoje, adicionalmente, auxinas são amplamente usadas como herbicidas (2,4 D, Dicamba).

Em geral, as auxinas sintéticas são mais eficientes do que as auxinas naturais por que elas são metabolizadas pelas plantas em uma menor taxa do que as auxinas naturais.

1.5 Mecanismo de Ação

A despeito da diversidade dos efeitos das auxinas sobre o desenvolvimento da planta, os eventos primários parecem ser similares em todos os casos, como mostrado anteriormente (Figura 3): percepção do sinal (formação do complexo auxina-receptor); transdução e amplificação do sinal (mensageiros secundários); e finalmente a resposta final.

Estudos recentes têm mostrado que uma proteína ABPI (auxin – binding protein) é uma forte candidata a ser o receptor para a auxina. Este receptor ABPI tem sido encontrado primariamente no lúmen do retículo endoplasmático, porém, acredita-se que ele seja ativo na superfície celular. Isto é, ele seria sintetizado no retículo e depois transportado para a membrana plasmática, onde seria ativo.

Estudos das vias de transdução e amplificação de sinais envolvidas na ação de auxinas na promoção da divisão celular têm implicado AMP cíclico como um possível intermediário na via de sinalização. Outros possíveis sinais intermediários envolvidos nas respostas dependentes de auxinas incluem o Ca^{2+} citosólico e o pH intracelular. Estas informações indicam que a ligação auxina-receptor (envolvida na percepção do sinal) altera as concentrações de AMP cíclico e de Ca^{2+} citosólico e o pH intracelular. Estes mensageiros secundários amplificam o sinal original, afetando a atividade de enzimas ou a própria expressão gênica.

Acredita-se que as respostas às auxinas envolve tanto mudanças na atividade de proteínas (enzimas, canais de íons, etc.) como na expressão gênica. Por exemplo, o efluxo de H^+ induzidos por auxinas parece depender da direta ativação da H^+ -ATPase e do aumento na síntese do mRNA que codifica esta proteína da membrana plasmática.

ESTUDO DIRIGIDO Nº 08

UNIDADE: HORMÔNIOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO
ASSUNTO: **INFORMAÇÕES GERAIS E AUXINAS**

- 1 – Cite as cinco principais classes de hormônios vegetais. Comente sobre suas estruturas químicas.
- 2 – Quais os conceitos de hormônios e de reguladores de crescimento?
- 3 – Cite os métodos para identificar e quantificar os hormônios de planta.
- 4 – Descreva o mecanismo geral de ação dos hormônios.
- 5 – Quais as principais auxinas naturais e sintéticas?
- 6 – Quais o requerimento estrutural essencial para que um composto tenha atividade auxínica (segundo as pesquisas atuais)?
- 7 – Descreva a biossíntese do ácido indol acético (AIA) a partir do triptofano e comente as pesquisas que mostram que o AIA pode ser formado por via independente do triptofano.
- 8 – Qual o efeito de auxinas nos seguintes processos:

Crescimento de caules e de raízes
Indução de raízes laterais
Dominância apical
Desenvolvimento de frutos
- 9 – O que você entende por tropismo e nastismo? Cite os principais tipos de respostas trópicas e násticas.
- 10 – Explique o papel das auxinas no fototropismo.
- 11 – Explique o papel das auxinas no gravitropismo

2. GIBERELINAS: REGULADORES DA ALTURA DAS PLANTAS

2.1 A Descoberta

Na década de 1930, cientistas japoneses obtiveram cristais impuros de dois compostos ativos do fungo *Giberella fujikuroi*, o qual causava uma doença em plantas de arroz caracterizada pelo crescimento excessivo do talo, responsável pelo acamamento e consequente eliminação da produção de sementes. A estes compostos foi dado o nome de giberelina A e B. Na década de 1950, pesquisadores norte-americanos e ingleses elucidaram a estrutura do material purificado do fungo, o qual foi nomeado de ácido giberélico (GA₃). No entanto, somente no final da década de 1950 é que Jake McMillan, na Inglaterra, conclusivamente identificou uma giberelina em uma planta superior.

A medida que as giberelinas de fungos e de plantas foram sendo caracterizadas, elas foram numeradas como giberelina GA_X, sendo o “X” o número de ordem de descobrimento (a primeira que foi descoberta recebeu o nome de GA₁, a segunda de GA₂, e assim por diante). Assim, o número da giberelina é simplesmente um meio para evitar o caos na nomenclatura de giberelinas, não significando nenhuma similaridade química ou relacionamento metabólico.

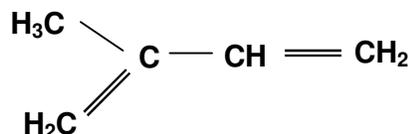
Atualmente, cerca de 125 giberelinas são conhecidas, as quais têm estrutura baseada no esqueleto ent-giberelano. Algumas giberelinas possuem 20 átomos de carbono enquanto outras possuem 19 átomos de carbono, tendo estas últimas perdido um carbono durante a sua formação. Algumas características, como a localização de um grupo hidroxila na molécula e sua estereoquímica, têm forte ligação com sua atividade metabólica. Por exemplo, hidroxilação na configuração β no carbono dois, sempre elimina a atividade biológica. Também, a despeito do grande número de giberelinas presentes em plantas, análises genéticas têm demonstrado que somente umas poucas são biologicamente ativas como hormônio. Todas as outras servem como precursores ou representam formas inativadas.

As giberelinas são associadas, mais frequentemente, com a promoção do crescimento do caule e a aplicação de GAs em plantas intactas pode induzir um marcante aumento na altura da planta. Como poderá ser visto as GAs executam importantes papéis em uma variedade de fenômenos fisiológicos.

2.2 Ocorrência, Metabolismo e Transporte

As giberelinas (GAs) são **amplamente** distribuídas no reino vegetal. Elas estão presentes em toda a planta, podendo ser detectadas em folhas, caules, sementes, embriões e pólenes.

As giberelinas constituem uma **grande** família de ácidos diterpênicos e são sintetizadas por um ramo da via dos terpenóides. Um terpenóide é um composto feito pela junção de unidades de 5 carbonos, o isopreno:



Giberelinas são diterpenóides tetracíclicos formados por quatro unidades isoprenóides. A unidade biológica ativa de isopreno é o Isopentenil Difosfato (IPP). O IPP utilizado para a biossíntese de terpenóides é formado através de duas vias distintas: uma via dependente do Ácido Mevalônico, que ocorre no citosol e está envolvida primariamente na biossíntese de

esteróis; a outra via que é independente do ácido mevalônico, é localizada nos plastídios e leva à síntese de carotenóides e compostos relacionados. No plastídio, o IPP é sintetizado a partir de piruvato e de 3-fosfoglicerato e não do ácido mevalônico. Visto que as etapas iniciais da biossíntese de GAs ocorrem nos proplastídios, o IPP usado na sua biossíntese pode ser derivado da via independente do ácido mevalônico.

Independente da origem do IPP, as próximas etapas são comuns às vias citosólica e plastídial da biossíntese de terpenos: as unidades de isopreno (IPP) são adicionadas sucessivamente para produzir Geranyl-Difosfato (10 átomos de carbono), Farnesil-Difosfato (15 átomos de carbono) e Geranyl-Geranyl-Difosfato (20 átomos de carbono).

A biossíntese de GAs ocorre a partir do composto de 20 átomos de carbono (geranyl-geranyl-difosfato) em uma via com três estágios diferentes, cada um deles residindo em um diferente compartimento celular (Figura 15):

Estágio 1 – Reação de Ciclização

Nesse estágio, o composto de 20 átomos de carbono, Geranyl-Geranyl-Difosfato, sofre uma reação de ciclização para formar o ent-caureno (Figura 14). Esta, na realidade, é a primeira etapa que é específica para formação de GAs. A conversão se processa em duas etapas catalisadas por duas enzimas localizadas nos próplastídios de tecidos meristemáticos da parte aérea. Estas enzimas não estão presentes em cloroplastos maduros.

Compostos tais como AMO-1618, Cicocel e Fosfon D, são inibidores específicos desse estágio da biossíntese de GAs.

Estágio 2 – Oxidação do ent-caureno para formar o GA₁₂-aldeído

No segundo estágio da biossíntese de GAs, um grupo metil do ent-caureno é oxidado para ácido carboxílico ($\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CHO} \rightarrow \text{COOH}$). Em seguida, o anel B de seis átomos de carbono, muda sua conformação ficando, então, com cinco carbonos para formar o GA₁₂-aldeído (Figura 14). Esta é a primeira giberelina formada em todas as plantas, sendo, desta forma, a precursora de todas as GAs. Todas as enzimas envolvidas nesse estágio são monooxigenases que utilizam o citocromo P₄₅₀ em suas reações. Estas monooxigenases estão localizadas no retículo endoplasmático (RE), sugerindo que o substrato (ent-caureno) é transportado do pró-plastídio para o RE, onde ele é convertido para GA₁₂-aldeído.

Compostos como o Paclobutrazol e outros inibidores do citocromo P₄₅₀ inibem especificamente esse estágio da biossíntese de GAs.

Estágio 3 – Formação das outras GAs a partir da GA₁₂

Na primeira etapa desse estágio, GA₁₂-aldeído é oxidado para GA₁₂ (o grupo CHO é oxidado para COOH), a primeira giberelina formada nesse estágio (Figura 14). Esta reação pode ser catalisada por uma monooxigenase no RE ou por dioxigenases solúveis no citosol. Todas as etapas subsequentes são catalisadas por dioxigenases solúveis no citosol. Estas enzimas requerem α -cetoglutarato e O₂ como co-substratos e elas usam Fe²⁺ e ascorbato como cofatores.

Nas reações subsequentes, duas mudanças químicas ocorrem na maioria das plantas:

- (1) A hidroxilação do carbono 13 ou 3;
- (2) A sucessiva oxidação do carbono 20 ($\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CHO} \rightarrow \text{COOH}$), seguida pela perda deste carbono como CO₂.

A hidroxilação do carbono 13 converte a GA₁₂ para GA₅₃. A GA₅₃ é, então, convertida para GA₁₉ pela sucessiva oxidação do carbono 20 ($\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CHO} \rightarrow \text{COOH}$), seguida pela perda do carbono 20 como CO₂ para formar a GA₂₀. A GA₂₀ é, então, convertida para a forma biologicamente ativa, GA₁, pela β hidroxilação do carbono 3 (enzima β -

hidroxilase). Finalmente, a β hidroxilação do carbono 2, inativa a GA_1 , produzindo a GA_8 . Esta hidroxilação pode ocorrer diretamente na GA_{20} , produzindo a GA_{29} .

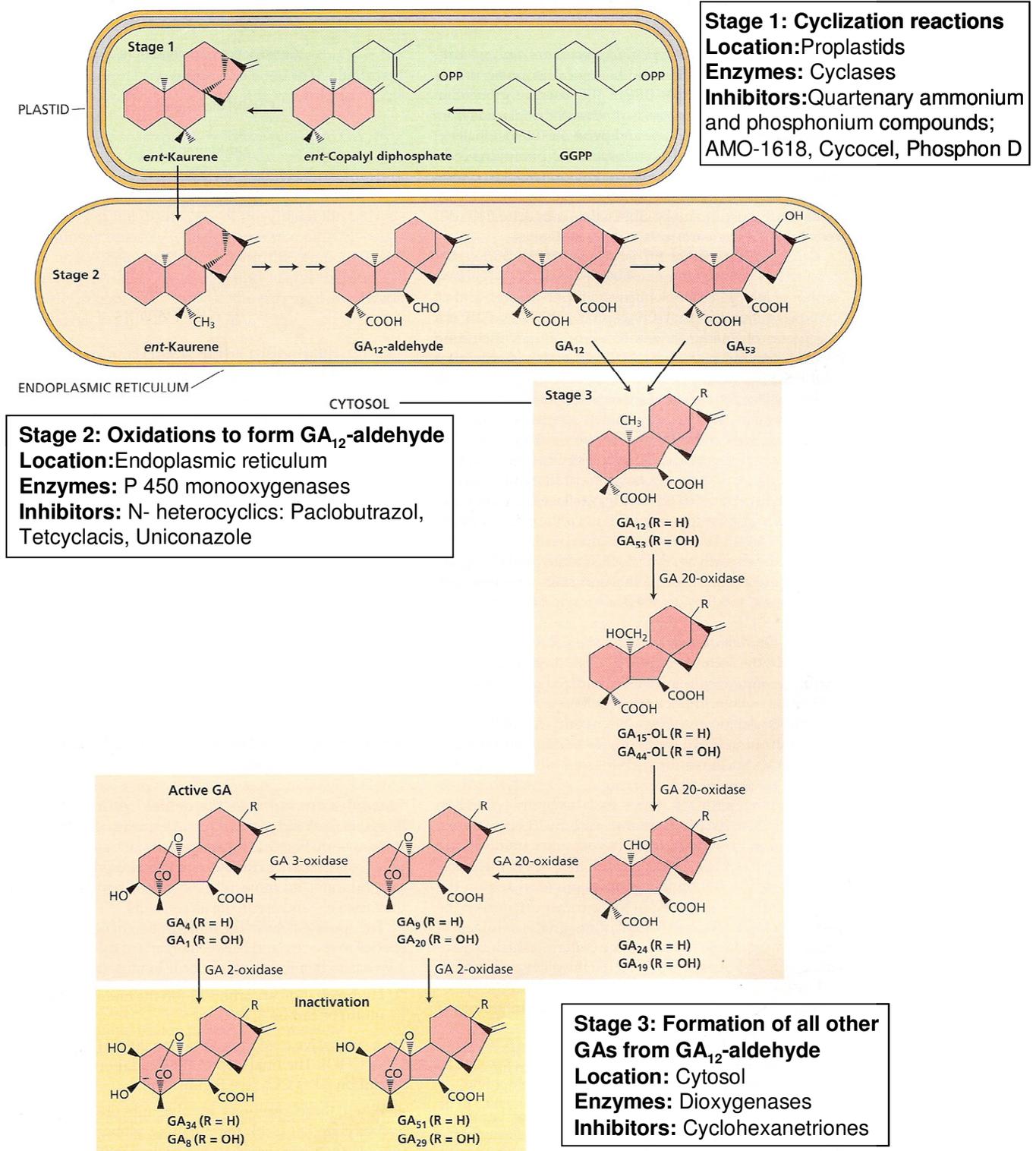


Figura 15 – Os três estágios da biossíntese de giberelinas (Taiz & Zeiger, 1998)

Inibidores desse terceiro estágio interferem com as enzimas que utilizam o α -cetogluturato como co-substrato. Um desses inibidores, o composto pró-hexadiona (BX -112) é especialmente útil, pois inibe especificamente a 3β -hidroxilase, a enzima que converte a forma inativa, GA_{20} , para a forma ativa, GA_1 .

Diversas observações têm confirmado que, dentre as muitas giberelinas (cerca de 125), a GA_1 é a forma ativa que controla o crescimento do caule. No entanto, há possibilidade que outras poucas GAs tenham também participações nesse controle. Por exemplo, a GA_3 , a qual difere da GA_1 somente por ter uma dupla ligação, é relativamente rara nas plantas, porém, parece ser capaz de substituir a GA_1 em muitos bioensaios. Outras giberelinas, como a GA_4 , têm mostrado atividade em *Arabidopsis* e *Curcubitáceae*, por exemplo.

As giberelinas executam um importante papel na mediação dos efeitos de estímulos ambientais sobre o desenvolvimento da planta. Fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura, podem alterar os níveis de giberelinas ativas, afetando etapas específicas nas suas biossínteses. Em adição, evidências recentes indicam que GAs podem regular sua própria biossíntese (Feedback).

Quando as plantas que requerem dias longos para crescer e florescer, são transferidas para dias curtos, alterações no metabolismo de GAs são observadas. Por exemplo, plantas de espinafre (*Spinacea oleracea*) mantidas sob dias curtos (SD – short days) permanecem na forma de roseta (Figura 15) e, paralelamente, os níveis de GAs ativas são muito baixos. Em resposta ao aumento do comprimento do dia (LD – long days), observa-se, após 12 dias, um aumento considerável nos níveis de giberelinas ativas e, após 14 dias, a parte aérea destas plantas começa a alongar. Aplicação exógena de giberelinas ativas em plantas mantidas em dias curtos (SD + GA_3), pode também promover o crescimento da parte aérea, indicando que a giberelina substitui o estímulo ambiental (dias longos).

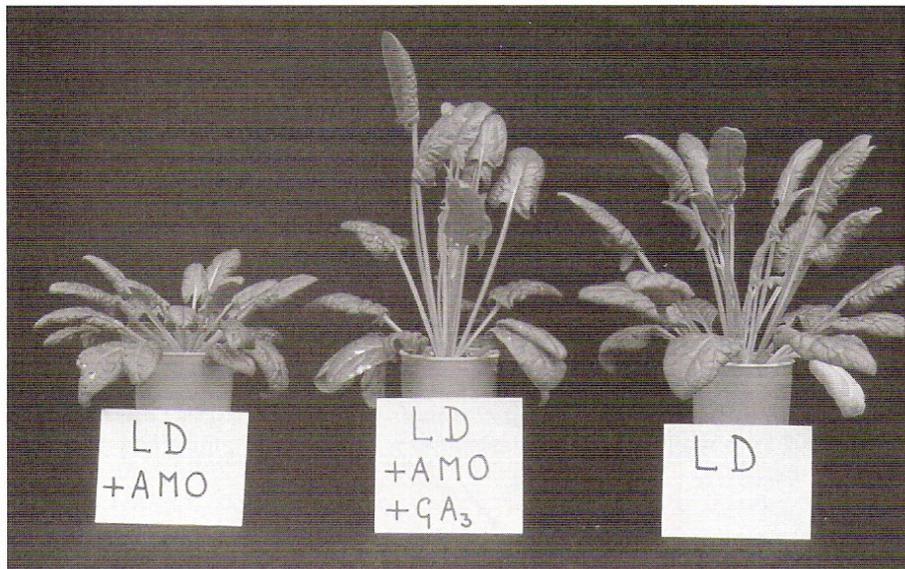


Figura 16 – Crescimento da parte aérea de plantas de espinafre mantidas em dias curtos (SD), em dias curtos e tratadas com GA_3 (SD + GA_3) e em dias longos (LD) (Taiz & Zeiger, 1998).

Trabalhos com plantas de ervilha indicam que as GAs ocorrem primariamente nas folhas jovens, gemas ativas e entrenós da parte aérea da planta. Estes sítios parecem ser, também, os locais de síntese da GAs. Na realidade, as GAs sintetizadas na parte aérea podem ser transportadas para o resto da planta, via floema. De fato, as etapas iniciais da biossíntese de GAs podem ocorrer em um tecido e a conversão para a forma ativa, em outro. Cloroplastos maduros, por exemplo, não podem realizar as reações do estágio 1 da biossíntese de GAs. Assim, células do mesofilo de folhas maduras (que contêm cloroplastos maduros) são também incapazes de realizar as reações do estágio 1, embora elas sejam capazes de realizar as reações do estágio 3. Estas diferenças sugerem que intermediários da biossíntese de GAs podem ser transportados dos tecidos meristemáticos da parte aérea para as folhas verdes, onde são convertidas para formas ativas de GAs. As giberelinas têm sido identificadas, também, em exsudatos do xilema e extratos de raízes, sugerindo que as raízes podem, também, sintetizar GAs. No entanto, evidências conclusivas para a síntese de GAs pela raízes ainda estão faltando.

Muitas sementes e frutos em desenvolvimento mostram, também, altos níveis de giberelinas. Na realidade, o nível de giberelinas ativas decresce para valores próximos de zero nas sementes maduras. Por outro lado, estas sementes maduras contêm GA₁₂-aldeído, precursora de todas as GAs, a qual pode ser convertida para as formas ativas de GAs, durante os estágios iniciais de germinação.

Uma variedade de glicosídeos de giberelinas é formada pela ligação covalente entre a GA e um monossacarídeo. Estas GAs conjugadas ocorrem particularmente em algumas sementes. O açúcar é usualmente a glucose que pode se ligar a giberelina via o grupo carboxílico (formando um éster) ou via um grupo hidroxila (formando um éter de glucosil). De fato, quando GAs são aplicadas às plantas, uma certa proporção torna-se glicosilada (conjugada). A conjugação pode, todavia, representar outra forma de inativação das giberelinas. Por outro lado, Glicosídeos de giberelinas aplicados às plantas podem ser metabolizados para formar GAs livres. Neste caso, os conjugados constituem uma fonte de estoque de GAs.

Os vários fatores que regulam o nível de giberelinas ativas na planta são sumariados na figura abaixo (Figura 17).

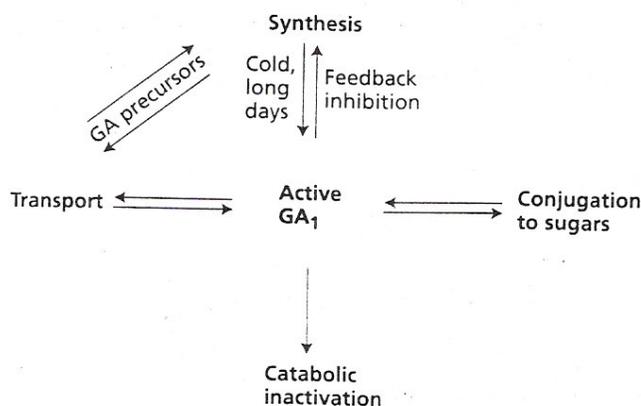


Figura 17 – Os processos que regulam o nível de giberelinas nos tecidos de plantas (Taiz & Zeiger, 1998).

A síntese da giberelina ativa, GA₁, é promovida por fatores ambientais, tais como frio e dias longos, e ela pode inibir a sua própria síntese via *feedback* (Figura 16). O nível de GA ativa

pode ser reduzido pelo catabolismo (inativação) ou pela conjugação com açúcares. Em alguns casos, a GA ativa pode ser gerada pela liberação a partir da forma conjugada. Finalmente, o transporte de GAs (ou precursores de GAs) para o tecido (ou desde o tecido), pode também afetar o nível da giberelina ativa, GA₁.

2.3 Papel Fisiológico

a) Iniciação floral e determinação do sexo

As GAs podem substituir dias longos ou frio, que são fatores requeridos por muitas plantas, especialmente as de hábito de crescimento em roseta, para a promoção do florescimento. Assim, as GAs podem substituir os estímulos ambientais para o florescimento em algumas espécies.

As flores de angiospermas consistem, usualmente, de quatro partes (verticilos): sépalas, pétalas, estames e pistilo. Quando as partes feminina (pistilo) e masculina (estame) são encontradas na mesma flor, ela é denominada hermafrodita ou perfeita. Certas espécies, no entanto, produzem flores unissexuais ou imperfeitas. O processo no qual as flores unissexuais são formadas é denominado de “determinação do sexo”. Em plantas monóicas, tais como pepino e milho, flores macho e fêmea são encontradas na mesma planta. Já nas plantas dióicas, como espinafre e *Cannabis sativa*, estas flores estão em indivíduos separados.

O processo de determinação do sexo é geneticamente regulado, porém pode sofrer influência de fatores ambientais, tais como fotoperíodo, temperatura e estado nutricional e, estes efeitos ambientais podem ser mediados pelas GAs. Em milho, por exemplo, flores masculinas são restritas ao pendão e as femininas às espigas. No entanto, exposição destas plantas a dias curtos ou frio durante a noite aumenta o nível de GA endógena e, simultaneamente, isto causa a feminilização das folhas do pendão. Essa formação de flores unissexuais depende do aborto de uma das partes no estágio inicial de desenvolvimento. Assim, o papel primário da GA na determinação do sexo em milho, parece ser a supressão do desenvolvimento do estame. No entanto, as giberelinas parecem interagir com outros hormônios (por exemplo, o etileno), na regulação da determinação do sexo.

b) Crescimento do caule

A aplicação de GAs promove o crescimento internodal em um grande número de espécies vegetais. Os estímulos mais evidentes são vistos em variedades anãs ou de hábito de crescimento em roseta, bem como em membros de Gramínea. Aplicação exógena de GA₃ causa um aumento tão drástico no crescimento do caule de variedades anãs que elas tornam-se semelhantes às variedades de crescimento normal (Figura 18). Acompanhando o alongamento do caule ocorre um decréscimo na espessura do caule, um decréscimo no tamanho da folha e as folhas ficam com coloração verde-claro.

Um ponto interessante é que as giberelinas produzem grandes efeitos em plantas intactas e muito pouco em segmentos. De modo contrário, as auxinas produzem seus efeitos principalmente em segmentos (pedaços de caules, folhas, etc.).



Figura 18 – Efeito da aplicação de giberelinas sobre o crescimento do milho normal e de um mutante anão (Taiz & Zeiger, 1998).

O interessante é que, embora o crescimento do caule possa ser dramaticamente aumentado pelas GAs, elas têm pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento das raízes. Acredita-se, nesse caso, que a via de transdução de sinal requerida para induzir o crescimento associado às giberelinas, não seja expressa nas raízes. Além disso, o caule pode tornar-se um forte dreno por nutrientes da planta.

c) Transição da fase juvenil para a adulta

Muitas plantas perenes não florescem até que elas alcancem um certo estágio de maturidade. Os estádios juvenil e maduro destas plantas possuem, freqüentemente, diferentes formas de folhas. Aplicação de GAs parece regular a mudança de juvenil para adulto e vice-

versa, dependendo da espécie. Em algumas coníferas, aplicação de uma mistura de GA₄ + GA₇ promove a passagem do estágio juvenil para o maduro. Em *Hedera helix*, aplicação de GA₃ promove a passagem do estágio maduro para o juvenil.

d) Estabelecimento do fruto

Aplicações de giberelinas podem favorecer o estabelecimento do fruto (crescimento inicial do fruto seguindo a polinização) e o crescimento de alguns frutos, particularmente nos casos em que a auxina não parece afetar. O estímulo do estabelecimento do fruto pelas giberelinas tem sido observado em maçã.

e) Germinação de sementes

A germinação de sementes pode requerer GAs em algumas etapas:

- Ativação do crescimento do embrião;
- Hidrólise e mobilização de reservas do endosperma (ver mecanismo de ação);
- Quebra de dormência em algumas espécies.

f) Aplicação comercial de GAs e de inibidores da sua síntese

- Produção de Frutos → O principal uso de giberelinas (relacionado com a produção de frutos) é para aumentar o comprimento da haste do cacho de videiras. Quando essa haste é muito curta, os cachos são muito compactos e o crescimento dos frutos é restringido. As giberelinas estimulam o crescimento da haste e, conseqüentemente, favorecem o crescimento dos frutos (mais espaço);
Além disso, aplicação de uma mistura de Benziladenina (uma citocinina) e GAs (GA₄ + GA₇) provoca o alongamento do fruto de maçã, melhorando a sua forma;
Em frutos de *Citrus*, aplicação de giberelinas provoca o retardamento da senescência.
- Produção de Cerveja → Durante a produção de malte a partir de sementes de cevada, giberelinas podem ser usadas para acelerar a hidrólise de reservas da semente, pela indução da produção de enzimas hidrolíticas na camada de aleurona (ver mecanismo de ação).
- Aumento na produção de cana-de-açúcar → Nessa espécie, a sacarose é armazenada no vacúolo central das células do parênquima internodal. A aplicação de GA (pulverização) estimula o alongamento do entrenó e isto resulta em maior produção de biomassa da cana e, também, de açúcares. Alguns resultados mostraram que aplicação de giberelinas pode promover um aumento de 50 toneladas por hectare na produção de biomassa total e de 5 toneladas na produção de açúcar.
- Inibidores da Síntese de GA → Os compostos conhecidos como retardantes de crescimento, fazem parte de um grupo de biorreguladores que modificam o crescimento e desenvolvimento das plantas, sem, contudo, induzir efeitos fitotóxicos ou de má formação. Quando utilizados em dosagens adequadas, os retardantes de crescimento modificam a arquitetura da planta, inibindo o crescimento do ápice caulinar, reduzindo o crescimento em altura, além de intensificar a pigmentação verde das folhas e aumentar o

crescimento radicular. Essas alterações levam à modificação da relação raiz/parte aérea em favor do crescimento das raízes.

Os retardantes de crescimento têm aplicações bastantes práticas em termos agronômicos, bem como no melhoramento genético, podendo, por exemplo, ser utilizados na redução do acamamento de plantas, na redução do crescimento de árvores, na tolerância a estresses ambientais e na indução do florescimento.

Diversos retardantes de crescimento que têm sido utilizados comercialmente atuam inibindo, de algum modo, a síntese de giberelinas (Ancimidol, Paclobutrazol, fosfon D, etc.). O paclobutrazol bem como os demais triazóis interagem com o citocromo P - 450. A interação faz com que essas proteínas transportadoras de elétrons, que catalisa diversas reações oxidativas do metabolismo vegetal, seja inativada, interrompendo diversas rotas metabólicas, especialmente o metabolismo dos terpenóides (como as giberelinas). O paclobutrazol bloqueia, especificamente, as reações de oxidação entre o ent-caureno e o ácido ent-caurenóico (ver Figura 15, estágio 2 da biossíntese de giberelinas).

A aplicação do paclobutrazol reduz drasticamente o alongamento do caule e a pulverização com GA₃ reverte tal efeito (Figura 19) De acordo com dados técnicos da ICI (Imperial Chemical Industries), o paclobutrazol pode ser aplicado em injeções no tronco de árvores e arbustos, diretamente no solo ou por meio de pulverizações diretas nas folhas. Esta última forma permite que o paclobutrazol atinja diretamente os meristemas apicais e entrenós, reduzindo o crescimento da planta. Quando aplicado no solo, o paclobutrazol é absorvido pelas raízes e, via corrente xilemática, é transportado para a parte aérea das plantas.

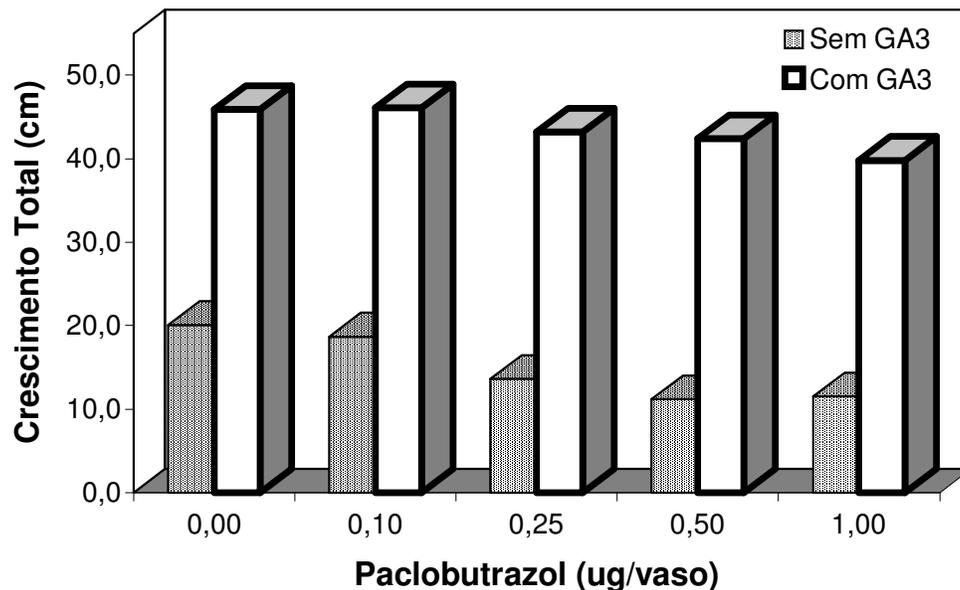


Figura 19 – Efeitos do paclobutrazol e do GA₃ sobre o crescimento da parte aérea de girassol

OBS: O paclobutrazol tem sido utilizado para promover o florescimento em mangueira.

2.4 Mecanismo de Ação

a) Promoção do crescimento do caule

As giberelinas são moléculas extremamente ativas no alongamento do caule. Em plantas de arroz e alfaca, as respostas para GA₃ podem ser vistas em níveis muito baixos (10⁻¹⁰ g). Para as giberelinas serem ativas em tão baixas concentrações, mecanismos eficientes para amplificar o sinal hormonal devem estar presentes nas células alvo. De acordo com o modelo inicial (Figura 3), estas respostas devem envolver: formação do complexo giberelina-receptor; ativação de uma ou mais vias de transdução e amplificação de sinal; e a resposta final (crescimento).

Os estudos têm mostrado que a aplicação de giberelinas provoca aumento no tamanho da célula e no número de células, indicando que as giberelinas atuam tanto na expansão da célula como na divisão celular. De modo semelhante às auxinas, as GAs parecem favorecer o alongamento celular alterando as propriedades da parede celular. Porém, diferente das auxinas, nenhuma acidificação do apoplasto tem sido estimulada por ação das GAs, indicando que o mecanismo de crescimento induzido pelas GAs é diferente do crescimento ácido induzido pelas auxinas.

Estudos recentes, realizados em muitos tecidos vegetais, revelaram a existência de uma correlação positiva entre o crescimento estimulado pelas GAs e a atividade da enzima Xiloglucana Endotransglicosilase (XET). A XET hidrolisa xiloglucana e parece causar um rearranjo molecular na matriz da parede celular que poderia promover o afrouxamento da parede, favorecendo o crescimento. Vale salientar que o crescimento induzido pelas auxinas não está associado ao aumento na atividade da XET. Isto indica que o efeito parece ser específico para giberelinas.

b) Mobilização de reservas do endosperma durante a germinação

Certos grãos (os conhecidos cariopses de cereais, como milho, trigo, cevada, sorgo, etc.), podem ser divididos em três partes: o tegumento, o embrião diplóide e o endosperma triplóide. O embrião se associa a um órgão especializado para a absorção, o Escutelo. Já o endosperma amiláceo é tipicamente não vivo na maturidade e consiste de células ricas em grânulos de amido. Este tecido é circundado pela Camada de Aleurona, uma camada de células citológica e bioquimicamente distintas das células do endosperma. Esta camada de células vivas contém corpos protéicos e oleossomos.

Durante a germinação e o estágio inicial de crescimento da plântula, amido e proteínas são degradados por uma série de enzimas hidrolíticas, produzindo açúcares solúveis, aminoácidos e outros produtos, os quais são transportados para o eixo embrionário em crescimento (Figura 20). Uma das principais enzimas responsáveis pela degradação do amido é a α -amilase. A camada de aleurona é o principal sítio de síntese desta enzima hidrolítica.

Estudos realizados na década de 1960 mostraram que a secreção de enzimas hidrolíticas pela camada de aleurona, dependia da presença do embrião. O embrião produzia uma substância difusível que estimulava a produção de α -amilase na camada de aleurona. Posteriormente foi descoberto que a GA₃ poderia substituir o embrião no estímulo da degradação de amido. Estes e outros estudos levaram à conclusão que a substância produzida pelo embrião que estimulava a função digestiva da camada de aleurona, seria a giberelina (Figura 20).

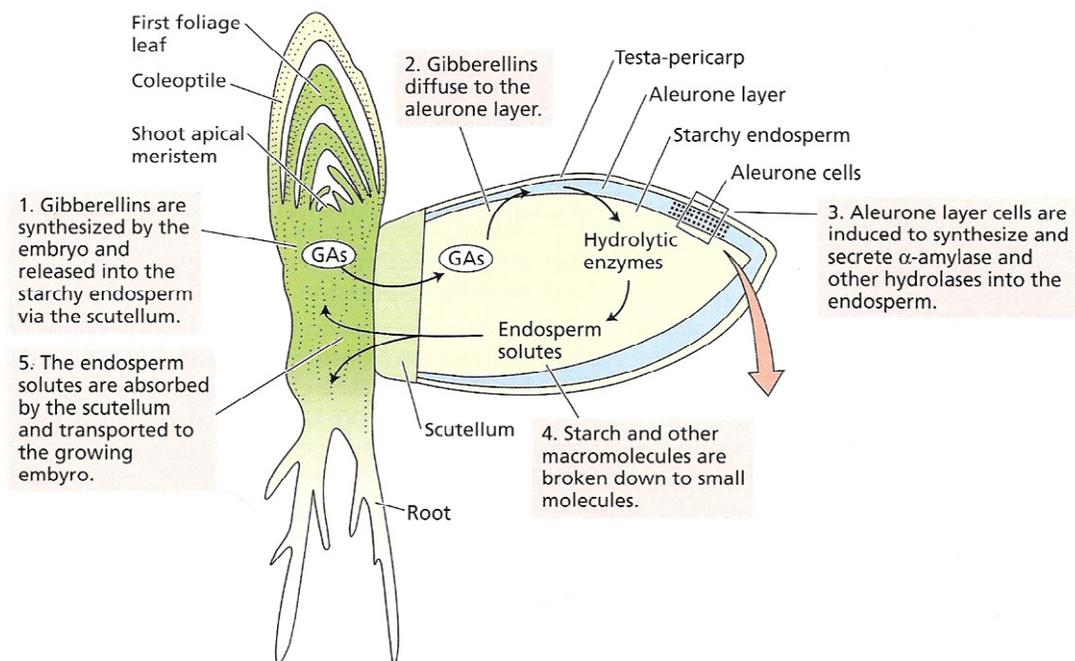


Figura 20 – A estrutura da semente de cevada e as funções dos vários tecidos durante a germinação (Taiz & Zeiger, 1998): (1) As giberelinas são sintetizadas no embrião e transportadas para o endosperma; (2) No endosperma as giberelinas se difundem para a camada de aleurona; (3) A camada de aleurona é induzida para sintetizar e secretar α -amilase e outras enzimas hidrolíticas; (4) Amido e outros compostos são degradados para substâncias solúveis de baixa massa molecular (açúcares, aminoácidos, etc.); (5) Finalmente, estas substâncias solúveis são transportadas para o eixo embrionário em crescimento

A indução da enzima α -amilase nas células da camada de aleurona de grãos de cereais (durante a germinação), pelas giberelinas, está agora bem elucidada (Figura 21). A giberelina produzida no embrião é transportada para a camada de aleurona. O receptor da giberelina está localizado na membrana plasmática das células da camada de aleurona (1). O complexo GA-Receptor interage com uma proteína G heterotrimerica (2), iniciando duas vias de transdução de sinal:

- ✓ Uma das vias envolve GMP-cíclico (3) e resulta na produção de uma molécula de sinalização (4) que inativa um repressor GAI (5). A inativação deste repressor permite a expressão do gen MYB (6). Isto leva à produção de uma proteína regulatória (GA – MYB), a qual retorna para o núcleo (7) e liga-se a uma seqüência regulatória do gen da α -amilase (8), de modo que a transcrição do gen (9) e a síntese da enzima α -amilase (10), são estimuladas.
- ✓ A outra via envolve alterações nos níveis de Ca^{2+} e a formação do complexo regulatório Ca-Calmodulina (11). Esta via parece estimular a secreção da enzima α -amilase para o endosperma (12).

OBS: MYBs são fatores de transcrição que regulam o crescimento e desenvolvimento da planta.

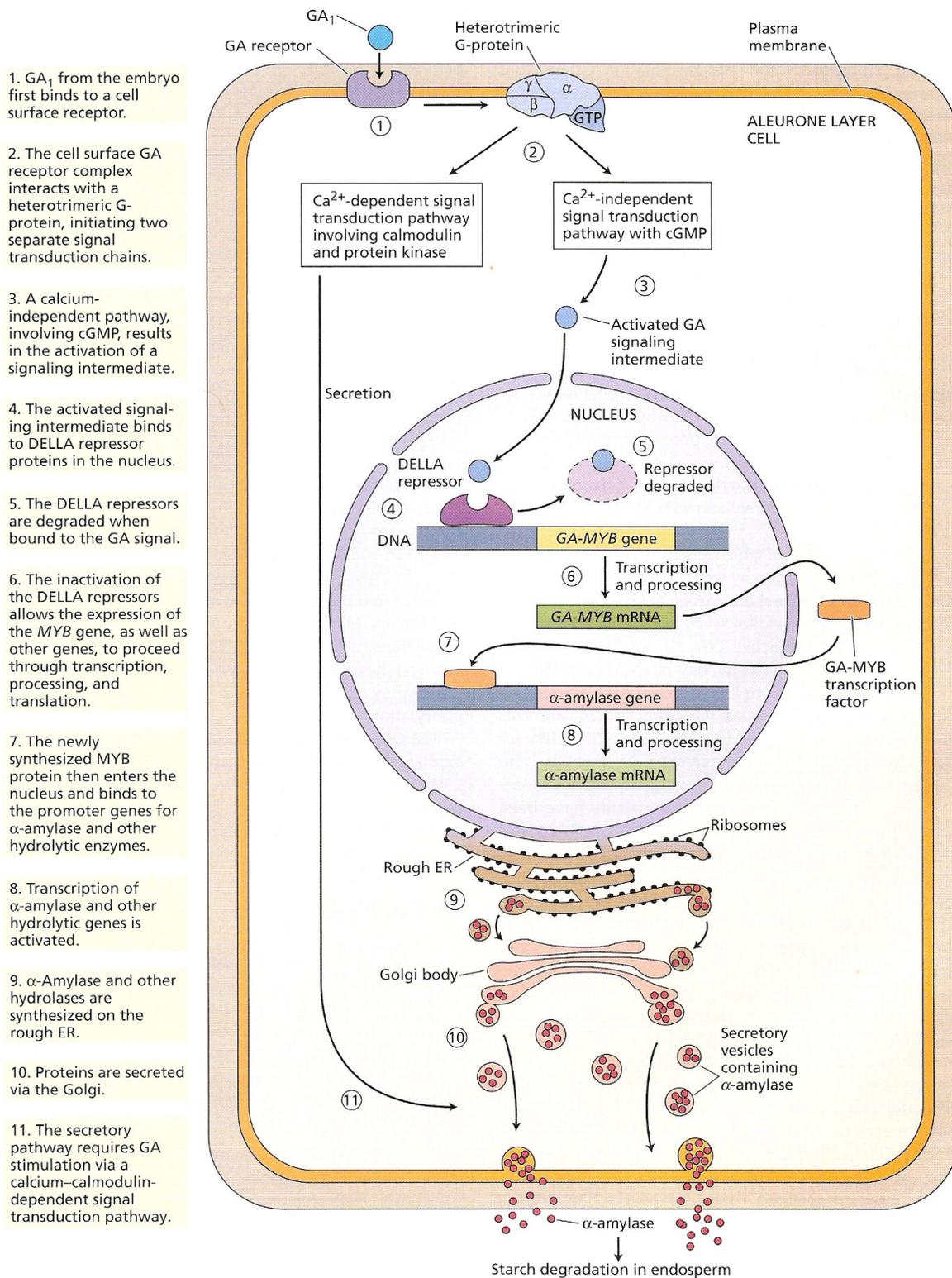


Figura 21 – Mecanismo de ação das giberelinas na produção e secreção da enzima α -amilase, durante o processo de germinação. Observe a numeração na figura e compare com o que está escrito no texto (Taiz & Zeiger, 1998).

ESTUDO DIRIGIDO Nº 09

UNIDADE: HORMÔNIOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO

ASSUNTO: **GIBERELINAS**

- 1 – Como ocorreu a descoberta das giberelinas? Quantas giberelinas são conhecidas atualmente e quais as que são ativas nas plantas?
- 2 – Qual a distribuição de giberelinas nas plantas? E quais as regiões de síntese?
- 3 – Quais os locais na célula onde ocorrem os três estágios da biossíntese de giberelinas?
- 4 – Qual a modificação química que inativa a GA₁?
- 5 – Como e por onde as giberelinas são translocadas na planta?
- 6 – O que são substâncias retardantes de crescimento? O que elas podem causar na planta?
- 7 – Qual o efeito das giberelinas nos seguintes processos:
 - Determinação do sexo
 - Crescimento do caule e de raízes
 - Germinação de sementes
- 8 – Aplicação de auxinas e giberelinas estimula a divisão e a expansão celular. Qual a diferença básica entre o crescimento induzido por auxinas e por giberelinas?
- 9 – Explique o mecanismo de ação de giberelinas durante a germinação de sementes de cereais.

3. CITOCININAS: REGULADORES DA DIVISÃO CELULAR

3.1 Descoberta, Identificação e Propriedades

Muitos estudos têm mostrado que as citocininas controlam vários aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo: divisão celular, retardamento da senescência de folhas, através da mobilização de nutrientes, dominância apical, quebra de dormência de gemas, desenvolvimento de flores, etc. Dentre estes, o controle da divisão celular é de considerável significância para o crescimento e desenvolvimento da planta e foi graças a este efeito que se identificou esta classe de fitohormônios.

Nas décadas de 1940 e 1950, Folke Skoog testou muitas substâncias que tinham habilidade para iniciar e promover a proliferação de células de fumo em cultura de tecidos. Ele tinha observado que a adenina (base nitrogenada que participa da molécula de DNA) tinha um efeito promotor da divisão celular, o que o levou a testar a hipótese de que o DNA poderia estimular a divisão. Após um difícil e demorado fracionamento do DNA tratado com calor, Skoog e colaboradores identificaram uma pequena molécula que, na presença de auxinas, estimulava a proliferação de células em cultura de tecidos. Esta molécula foi denominada de cinetina, uma molécula derivada da adenina (Figura 22).

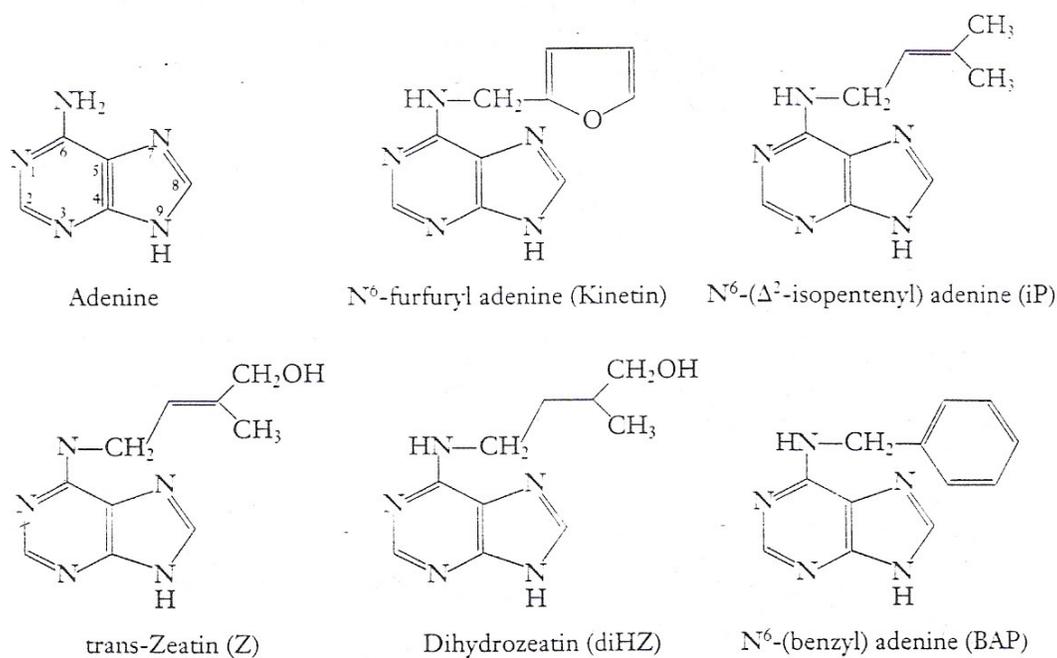


Figura 22 – A estrutura química da adenina e de cinco derivados da adenina que apresentam atividade de citocinina. Cinetina e BAP (ou BA) são citocininas sintéticas. Zeatina, dihidrozeatina e isopentenil adenina são citocininas naturais (Hopkins, 2000).

A cinetina não é um hormônio de plantas de ocorrência natural e, também, não é constituinte da molécula de DNA. No entanto, alguns anos após a descoberta da cinetina, pesquisadores demonstraram que extrato de endosperma imaturo de milho continha uma substância que causava os mesmos efeitos biológicos da cinetina. Esta molécula foi identificada como 6-(4-hidroxi-3metilbut-2-enilamino) purina, e recebeu o nome de Zeatina.

A estrutura molecular da zeatina é similar à da cinetina (Figura 21). Ambas são derivadas da adenina (aminopurina). No entanto, elas possuem diferentes cadeias laterais que se encontram ligadas ao nitrogênio 6 da adenina. Devido a cadeia lateral da zeatina ter uma dupla ligação, ela pode existir nas configurações cis e trans. A zeatina natural, que ocorre nas plantas superiores, é a que apresenta configuração trans, embora as duas formas possuam atividade biológica. A atividade de uma isomerase tem sido demonstrada em tecidos de plantas, de modo que a cis-zeatina, quando aplicada a tecidos, pode ser convertida para a forma trans.

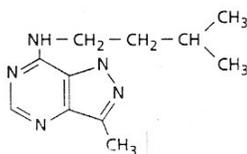
Outras citocininas de ocorrência natural são a Dihidrozeatina e a Isopentenil Adenina. As citocinas naturais (zeatina, dihidrozeatina e isopentenil adenina) podem ser encontradas na forma livre, como ribosídeo (uma molécula de ribose ligada ao nitrogênio 9 da adenina), como ribotídeo (a ribose ligada ao N-9 é esterificada com ácido fosfórico) ou como glicosídeo (uma molécula de glicose é ligada ao N-7 ou N-9 da adenina ou ainda, ao oxigênio da zeatina ou dihidrozeatina).

As citocininas são definidas como compostos que possuem atividades similares àquelas da trans-zeatina. Estas atividades incluem:

- Induzir a divisão celular em callus, na presença de auxinas;
- Promover a formação de parte aérea ou raízes em cultura de tecidos, quando aplicada em proporção adequada com auxinas;
- Retardar a senescência de folhas;
- Promover a expansão de cotilédones em dicotiledôneas;

Muitos compostos químicos têm sido sintetizados e testados em relação à sua capacidade de atuar como citocininas. Análises destes compostos permitiram estabelecer alguns requerimentos estruturais para a atividade. Em geral, todos os compostos ativos como citocininas possuem uma cadeia lateral ligada ao N-6 da adenina e todas as citocininas naturais são derivadas da adenina. As moléculas de cinetina e benziladenina (BA) são exemplos de citocininas sintéticas que possuem a cadeia lateral ligada ao N-6 da adenina (Figura 21). As únicas exceções a esta generalização são certos derivados da difeniluréia. Estes compostos possuem fraca atividade de citocininas e não possuem a cadeia lateral referida anteriormente.

No curso da determinação do requerimento estrutural para a atividade de citocinina, os investigadores encontraram algumas moléculas que agiam como antagonistas da citocinina (Figura 23). Estes compostos resultam de modificações químicas no anel da purina e parecem bloquear a atividade de citocininas pela competição com o seu receptor. Este efeito pode ser sobrepujado pela adição de mais citocininas.

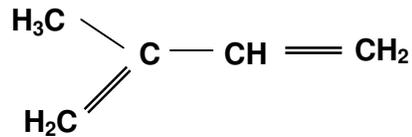


3-Methyl-7-(3-methylbutylamino)pyrazolo[4,3-D]pyrimidine

Figura 23 – Estrutura de um composto sintético que atua como antagonista das citocininas. Note as modificações no anel da adenina (Taiz & Zeiger, 1998).

3.2 Ocorrência, Metabolismo e Transporte

As cadeias laterais das citocininas naturais são quimicamente relacionadas com as estruturas de pigmentos carotenóides, dos hormônios giberelinas e ácido abscísico e de alguns compostos de defesa de plantas conhecidos como fitoalexinas. Todos esses compostos são formados, pelo menos em parte, através da junção de unidades de isopreno.



A estrutura do isopreno é similar à da cadeia lateral da zeatina e de outras citocininas. Os precursores para a formação das unidades de isopreno são o ácido mevalônico ou o piruvato + 3-fosfoglicerato, dependendo da via envolvida. Estes precursores produzem a unidade biológica de isopreno, ou seja, o Isopentenil-Difosfato (IPP).

Na primeira etapa da biossíntese de citocininas, uma enzima conhecida como **transferase do isopentenil (IPT)** catalisa a transferência do grupo isopentenil do IPP para o AMP, ADP E ATP. O produto da reação é o ribotídeo isopentenil adenina (a citocinina isopentenil adenina contendo uma ribose e um, dois ou três grupos fosfato). Este conjugado é, em seguida, convertido para trans-zeatina ou para outras citocininas naturais, dihidrozeatina e isopentenil adenina (Figura 24).

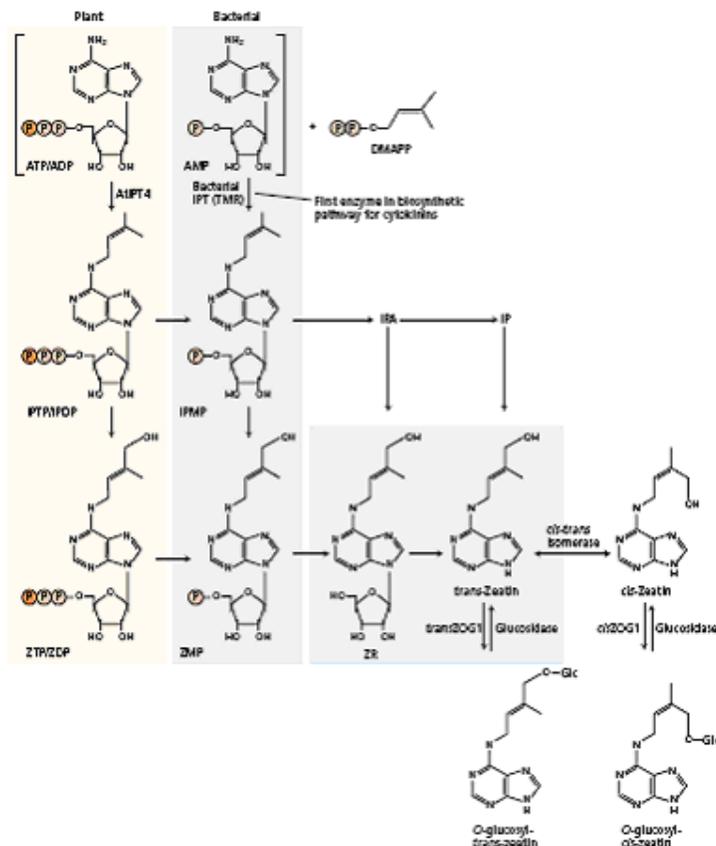


Figura 24 – Esquema mostrando as etapas da biossíntese de citocininas (Taiz & Zeiger, 1998).

Os meristemas apicais das raízes são os principais sítios de síntese de citocininas livres na planta. As citocininas sintetizadas nas raízes parecem que são transportadas para a parte aérea via xilema. Algumas evidências confirmam este tipo de transporte:

- ✓ Quando a parte aérea é cortada próximo à superfície do solo, a seiva do xilema pode continuar fluindo na região do corte. Este exsudato do xilema contém citocininas;
- ✓ Se o solo é mantido úmido, o fluxo do xilema na região cortada pode continuar por alguns dias. Alguns resultados mostram que, mesmo nesse caso, o conteúdo de citocininas no exsudato não diminui, indicando que a mesma está sendo sintetizada nas raízes;
- ✓ Além disso, alguns fatores ambientais que afetam o funcionamento das raízes, como estresse hídrico e salino, reduzem o conteúdo de citocininas no exsudato do xilema.

É necessário destacar, no entanto, que as citocininas não são sintetizadas exclusivamente nas raízes. Sementes em desenvolvimento e folhas jovens, também sintetizam citocininas. Porém, a produção de citocininas na parte aérea parece ser distribuída na própria parte aérea, via floema, enquanto a citocinina produzida nas raízes é distribuída para toda planta via xilema. Essas citocininas no exsudato do xilema estão principalmente na forma de ribosídeo de zeatina. Uma vez nas folhas, uma parte desses nucleosídeos é convertida para a forma livre (trans-zeatina) ou para a forma de glicosídeos.

Muitas das diferentes formas químicas de citocininas são rapidamente interconvertidas pelos tecidos vegetais. As citocininas quando aplicadas na forma livre, podem ser convertidas para seus respectivos nucleotídeos ou glicosídeos e vice versa. Estas citocininas conjugadas podem ser consideradas formas de estoque de citocinina em um estado metabolicamente inativo. Por exemplo, em algumas sementes dormentes são encontrados altos níveis de glicosídeos (forma inativa) e baixos níveis de citocinina livre (forma ativa). De modo contrário, durante o processo de germinação dessas sementes, observa-se uma nítida queda nos níveis de glicosídeos e aumento nos níveis de citocininas livres. Assim, é possível que algumas glicosídeses (enzimas) atuem na liberação de citocininas livres (como a trans-zeatina) a partir das citocininas conjugadas (observe na Figura 24 que as passagens das formas conjugadas para as formas de citocininas livres, são reversíveis).

Além da conjugação, as citocininas livres podem ser catabolisadas, produzindo compostos inativos. Em muitos tecidos de plantas, por exemplo, foi encontrada a enzima citocinina oxidase, a qual degrada zeatina, ribotídeo de zeatina e isopentenil adenina, produzindo adenina e seus derivados (Figura 25). Esta enzima inativa o hormônio e pode ser importante na regulação ou limitação dos efeitos das citocininas.

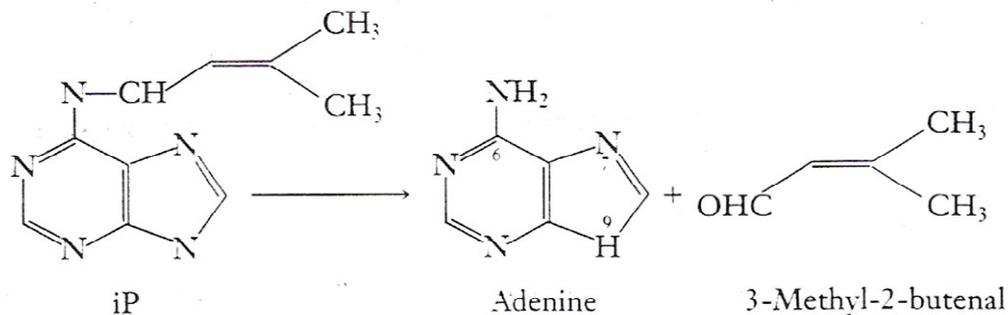


Figura 25 – Oxidação da isopentenil adenina pela citocinina oxidase (Hopkins, 2000).

A figura 26 mostra os diversos fatores que controlam os níveis de citocinas na forma ativa. Lembre-se que as formas ativas das citocininas naturais são: trans-zeatina, dihidrozeatina e isopentenil adenina.

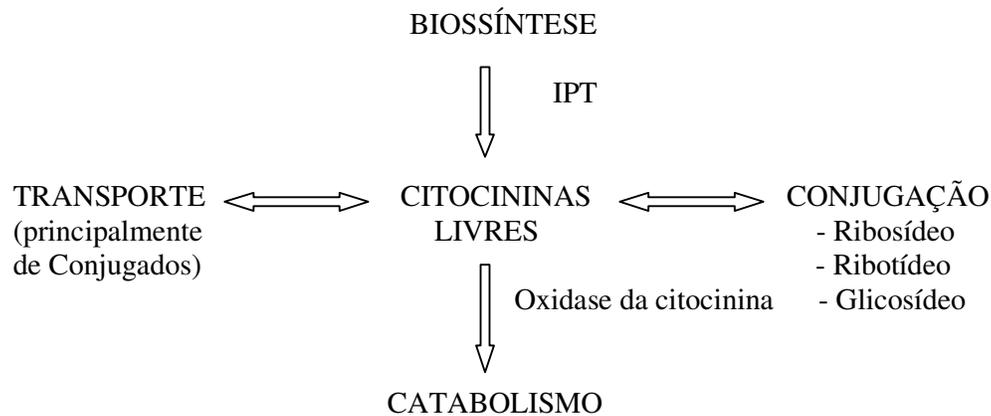


Figura 26 – Fatores que controlam os níveis de citocininas livres.

3.3 Papel Fisiológico

Os hormônios vegetais raramente, ou nunca, trabalham isoladamente. Mesmo nos casos em que a resposta se dá pela aplicação de um único hormônio, o tecido pode conter hormônios endógenos que contribuem para a resposta final. Em alguns casos a resposta está associada a dois ou mais hormônios, ou um hormônio pode induzir a síntese de um outro. Estas observações indicam que a resposta final está quase sempre associada ao **Balanco Hormonal**. Independente dessa visão, as citocininas podem estimular ou inibir uma variedade de processos fisiológicos e aspectos do desenvolvimento da planta.

Muitos dos processos regulados pelas citocininas têm sido revelados em plantas transgênicas que superexpressam essa classe de hormônio. Estas plantas superprodutoras de citocininas exibem algumas características que indicam o papel executado pelas citocininas na fisiologia e no desenvolvimento da planta. Algumas características dessas plantas são:

- O meristema apical da parte aérea produz maior quantidade de folhas;
- As folhas são mais ricas em clorofila e, como conseqüência, são mais verdes;
- Retardamento da senescência;
- Redução nítida na dominância apical;
- Em casos extremos pode ocorrer encurtamento dos entrenós e redução na taxa de crescimento das raízes.

A seguir serão descritos alguns papéis fisiológicos atribuídos, pelo menos em parte, às citocininas:

a) A relação auxina/citocinina regula a morfogênese em cultura de tecidos

De modo geral, na ausência de citocinina praticamente não se observa a ocorrência de divisão celular (Figura 27A). Altos níveis de auxina em relação aos de citocinina promovem a formação de raízes (Figura 27B), enquanto altos níveis de citocinina em relação aos de auxina estimulam a formação da parte aérea (Figura 27D). Uma relação intermediária favorece o crescimento do tecido não diferenciado, comumente referido como *callus* (Figura 27C).

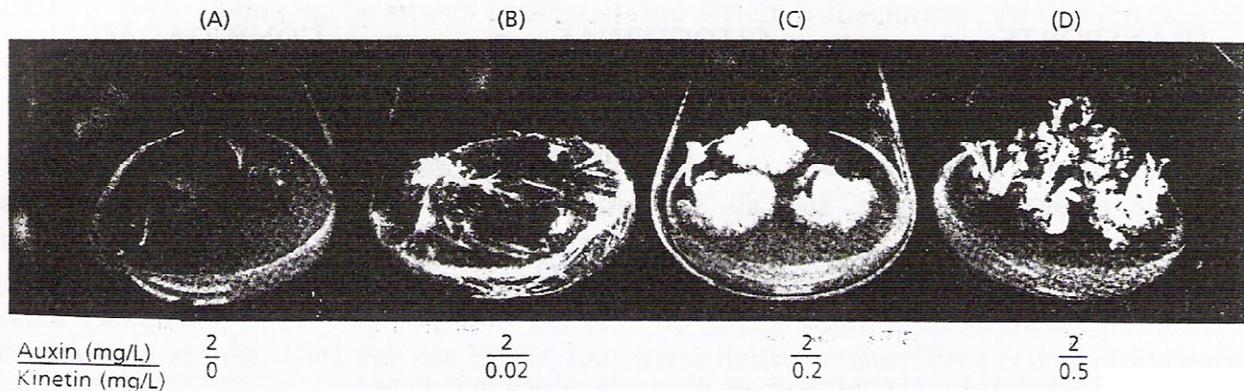


Figura 27 – A relação auxina/citocininas regulam o crescimento e a formação de órgãos em cultivo de *callus* de fumo (Taiz & Zeiger, 1998).

Muitos pesquisadores têm usado, também, a genética molecular para investigar o significado da relação auxina/citocinina na regulação da morfogênese. Eles utilizaram a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, a qual infecta os tecidos de plantas e provoca a formação de tumores. Os genes do plasmídeo da bactéria foram, em seguida, incorporados ao genoma da célula hospedeira (da planta), produzindo novas células geneticamente modificadas (mutantes ou transgênicos). Nestes estudos, foram obtidos três mutantes: um mutante provocava a formação de tumores com anormal proliferação de raízes (tmr); outro provocava a formação de tumores com anormal proliferação de parte aérea (tms); e o terceiro provocava a formação de tumores não diferenciados, conhecidos como galhas (crown gall) (Figura 28). No mutante tms foi observada a inativação de dois genes necessários para a biossíntese de AIA, o que proporcionou uma baixa relação auxina/citocinina e, como consequência, a anormal proliferação de parte aérea. No mutante tmr, ao contrário, encontrou-se mutações no gen requerido para a biossíntese de zeatina. Este mutante, portanto, apresentou alta relação auxina/citocinina, o que justifica a anormal proliferação de raízes. O terceiro mutante superexpressava a síntese de auxinas e de citocininas, o que justifica a formação de *callus* (neste caso, o ciclo celular é acelerado e nenhuma célula se diferencia). Estes resultados demonstraram a importância da relação auxina/citocinina na regulação da morfogênese.



Figura 28 – Galhas produzidas sobre o caule de plantas de *Bryophyllum*. O tumor é consequência da infecção com *Agrobacterium tumefaciens*. As células da planta hospedeira foram geneticamente modificadas, isto é, os gens que causam a superprodução de auxinas e citocininas foram incorporados no genoma da célula hospedeira (Hopkins, 2000).

b) Citocinina e auxina regulam o ciclo celular em plantas

As citocininas foram descobertas devido à sua capacidade para estimular a divisão celular em tecidos supridos com um nível adequado de auxinas. Evidências experimentais sugerem que tanto a auxina como a citocinina participam na regulação do ciclo celular e elas atuam controlando a atividade de quinases dependentes de ciclina.

As proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs) são enzimas que regulam o ciclo celular em eucariotos. A expressão do gen que codifica a principal CDK, a CDC₂ (Cell Division Cycle, 2), é regulada pela auxina. No entanto, a CDK induzida pela auxina é enzimaticamente inativa e altos níveis dessa enzima não são suficientes para que ocorra a divisão celular. A citocinina parece ativar uma proteína ciclina tipo G₁, a qual se liga à CDK e produz um complexo ativo (CDK-G₁). A ativação da CDK, então, permite a realização do ciclo celular e, conseqüentemente, a divisão da célula.

Em mutantes que superexpressam a biossíntese de citocininas e de auxinas, o ciclo celular é acelerado e pode ocorrer a formação de *callus*.

c) Quebra da dominância apical e indução do crescimento de gemas (ver auxinas e ABA)

Na maioria das plantas superiores, o crescimento da gema apical inibe o crescimento das gemas laterais, um fenômeno conhecido como Dominância Apical. Plantas com forte dominância apical, tais como milho, têm um único eixo de crescimento com poucas ramificações laterais. Em contraste, muitas gemas laterais crescem em muitos arbustos.

Embora a dominância apical possa ser determinada primariamente pelas auxinas, estudos fisiológicos indicam que citocininas executam um papel importante em iniciar o crescimento de gemas laterais. Por exemplo, aplicação direta de citocininas em gemas axilares de muitas espécies, estimula a divisão celular e o crescimento da gema.

O fenótipo de mutantes superprodutores de citocininas é consistente com o papel desta classe de hormônios na dominância apical. Por exemplo, plantas de fumo e de *Arabidopsis* do tipo selvagem (não mutante) mostram forte dominância apical durante o crescimento, enquanto que nos mutantes superprodutores de citocininas as gemas laterais crescem vigorosamente e competem com o ápice da parte aérea por nutrientes (Figura 29). Conseqüentemente, as plantas mutantes mostram-se bastante ramificadas.

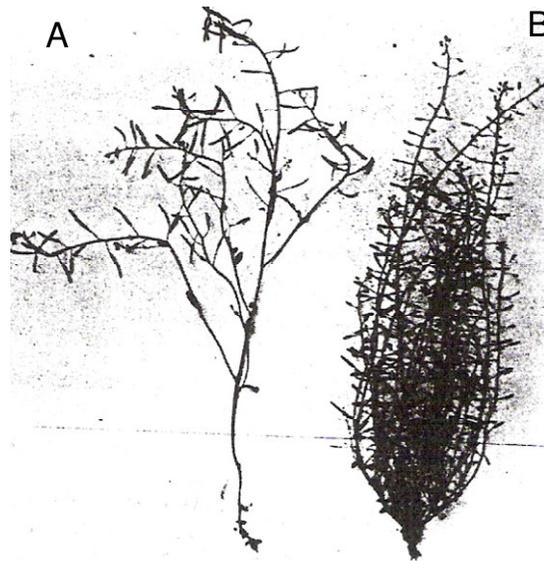


Figura 29 – Figura comparando um mutante de *Arabidopsis* superprodutor de citocininas (B) com um tipo selvagem (A). O mutante mostra reduzida dominância apical, resultante do desenvolvimento de muitas inflorescências (Taiz & Zeiger, 1998).

Apesar desses estudos bastante esclarecedores, relacionados aos papéis das auxinas (ver auxinas) e das citocininas no controle da dominância apical, outros estudos ainda são necessários. Acredita-se que outros sinais, promotores ou inibidores, podem estar envolvidos no desenvolvimento das gemas laterais e, portanto, no controle da dominância apical.

d) Retardamento da senescência de folhas e mobilização de nutrientes

Folhas destacadas de plantas lentamente perdem clorofila, RNA, lipídios e proteínas, mesmo que elas sejam mantidas úmidas e providas de nutrientes minerais. Estas mudanças também ocorrem normalmente nas folhas de plantas, constituindo-se na fase final da vida das

folhas. Este processo de envelhecimento programado que leva à morte recebe o nome de senescência. Este processo parece estar sob o controle das citocininas.

O tratamento de folhas isoladas de muitas espécies com citocininas retarda o processo de senescência. Este efeito pode ser marcante, particularmente quando a citocinina é aplicada diretamente sobre a planta intacta. Os efeitos podem também ser localizado dentro de uma mesma folha, se a aplicação for feita de forma localizada (aplicando-se citocinina apenas em uma das metades da folha, observa-se o retardamento da senescência somente na região tratada).

Embora evidências sugiram que folhas jovens podem produzir citocininas, as folhas maduras não podem. As folhas maduras dependem da citocinina proveniente das raízes, via xilema. A produção de citocininas nas raízes e o seu transporte para a parte aérea podem ser influenciados por fatores ambientais e pelo próprio estágio de desenvolvimento da planta. Por exemplo, estresses hídrico e salino afetam a produção de citocininas nas raízes e aceleram a senescência de folhas. Já em folhas de soja, a senescência é iniciada pela maturação da semente, um fenômeno conhecido como **Senescência Monocárpica**. Esta senescência pode ser retardada pela remoção da semente no início do seu desenvolvimento. Neste caso, a retirada da semente controla o transporte de citocininas das raízes para as folhas. As citocininas envolvidas no retardamento da senescência são primariamente os ribosídeos de zeatina e de dihidrozeatina, os quais são transportados das raízes para as folhas pela corrente transpiratória (via xilema). Nas folhas, essas formas conjugadas são convertidas para as formas livres, que são ativas.

As evidências mais convincentes sobre os papéis das citocininas no controle da senescência têm sido obtidas com a utilização de transgênicos (Figura 30). Por exemplo, a senescência de folhas é retardada em plantas transgênicas de fumo que possuem um gen que controla a biossíntese de citocininas.



Figura 30 – Retardamento na senescência em transgênicos que regulam a biossíntese de citocininas nas folhas maduras (esquerda). O genótipo que não autoregula a produção de citocininas nas folhas (à direita) apresenta-se em fase avançada de senescência (Taiz & Zeiger, 1998).

O mecanismo pelo qual as citocininas são capazes de retardar a senescência não é claro, porém, algumas evidências indicam que as citocininas exercem importante papel na mobilização de nutrientes. As citocininas influenciam o movimento de nutrientes (orgânicos e inorgânicos) de outras partes da planta para as folhas, um fenômeno conhecido como mobilização de nutrientes induzido pelas citocininas.

A participação das citocininas na mobilização de nutrientes tem sido revelada quando nutrientes marcados radioativamente são fornecidos às plantas, após o tratamento de uma folha ou parte dela com citocininas (Figura 31). As plantas são, posteriormente, autorradiografadas para verificar a mobilização dos nutrientes. Os resultados destes estudos mostram que os nutrientes são preferencialmente transportados para os tecidos tratados com citocininas, onde eles se acumulam.

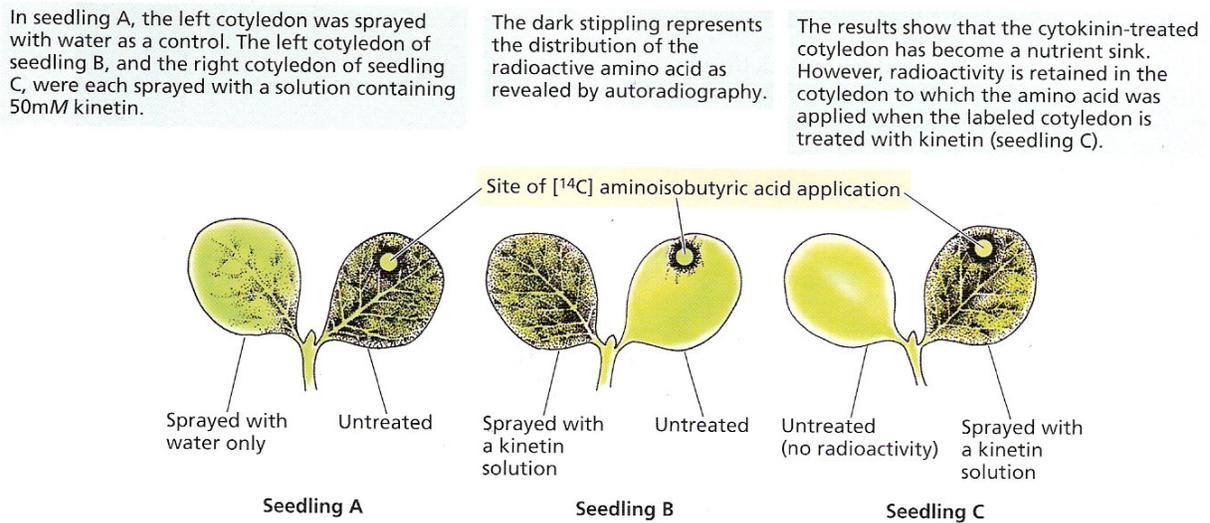


Figura 31 – Diagrama de um experimento clássico, desenvolvido por K. Mothes, mostrando o papel das citocininas na mobilização de nutrientes. A aplicação de composto marcado radioativamente foi feita na área indicada pela mancha preta. A radioatividade se acumula no lado tratado com a citocinina sintética, cinetina. Note que no controle a distribuição da radioatividade ocorre de maneira uniforme através das nervuras (Taiz & Zeiger, 1998)

Como sabemos, os nutrientes são translocados via floema, do sítio de produção (fonte) para o sítio de utilização (dreno). Assim, é possível que a citocinina provoque alguma alteração no relacionamento fonte-dreno. Algumas linhas de evidências também mostram que as citocininas estimulam o metabolismo nas áreas tratadas, ou seja, as citocininas aumentam a atividade do dreno e conseqüentemente, a força do dreno (ver partição de assimilados, na Unidade VI).

Lembre-se: Força do dreno = tamanho do dreno x atividade do dreno

e) Maturação de cloroplastos

Embora a maioria das sementes de plantas possam germinar no escuro, a morfologia das plântulas crescendo no escuro é muito diferente daquelas que crescem na luz. As plantas no escuro são estioladas, tendo hipocótilo e entrenós alongados, cotilédones e folhas não expandidos, e cloroplastos não maduros.

Ao invés de maturar como cloroplastos, os proplastídios de plântulas crescendo no escuro desenvolvem-se em etioplastos. Nos etioplastos, a membrana interna forma um **treliça** compacta e altamente regular, conhecido como corpo prolamelar. Os etioplastos também possuem alguns carotenóides, sendo esta a razão para a coloração amarelada das plantas estioladas. Porém, os etioplastos não possuem clorofila nem as enzimas e as proteínas estruturais requeridas para a formação da maquinaria fotossintética. Quando as plantas germinam na luz, os cloroplastos maturam diretamente dos proplastídios presentes no embrião, porém, etioplastos podem também gerar cloroplastos quando as plantas estioladas são iluminadas.

Quando as folhas estioladas são tratadas com citocininas, antes de serem iluminadas, elas formam cloroplastos com extenso sistema de membrana interna e com maiores taxas de biossíntese de clorofila e de enzimas fotossintéticas. Também, plântulas de *Arabidopsis* (não mutantes) germinando no escuro e na presença de citocininas, desenvolvem características de plântulas que germinam na luz (Figura 32).

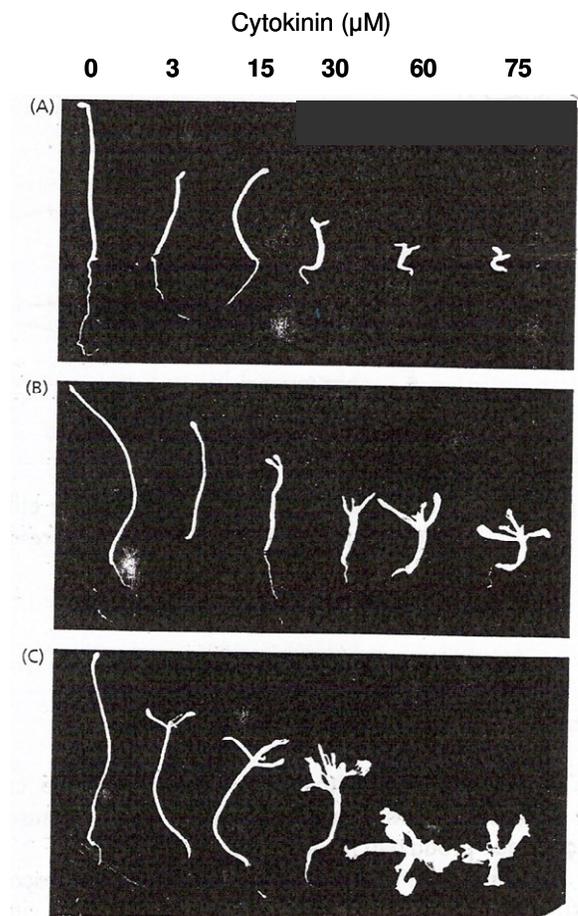


Figura 32 – O efeito de citocininas sobre plântulas de *Arabidopsis* crescendo no escuro (Taiz & Zeiger, 1998).

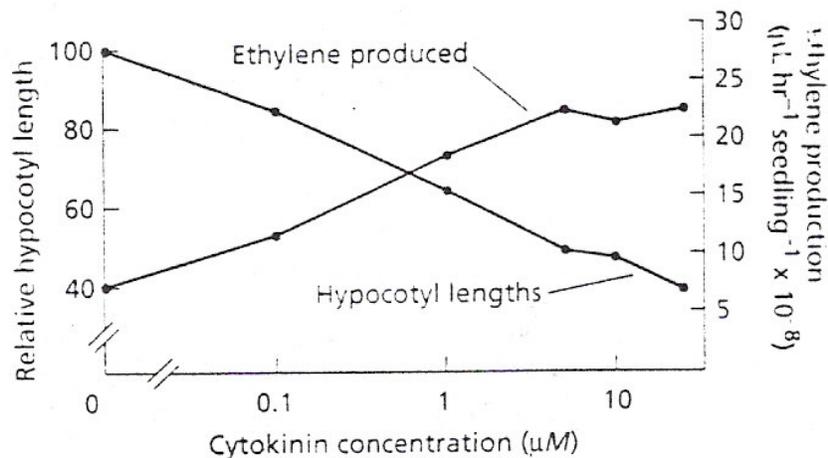
As características das plantas tratadas com citocininas e mostradas na figura 32 são:

- Encurtamento do caule;
- Expansão dos cotilédones;
- Iniciação de folhas no meristema apical;
- E, também, se observa parcial desenvolvimento dos cloroplastos, incluindo a síntese de algumas enzimas da fotossíntese.

Estes resultados indicam que as citocininas participam da regulação da síntese de pigmentos e de proteínas associadas com o processo fotossintético, juntamente com outros fatores ambientais, tais como luz e nutrição.

f) Outros efeitos relacionados às citocininas

As citocininas podem promover ou inibir a expansão celular. A promoção da expansão celular pelas citocininas é mais claramente demonstrada nos cotilédones de algumas dicotiledôneas que possuem folhas cotiledonares. De modo contrário, as citocininas podem inibir o alongamento celular em caules e raízes. Neste caso, é provável que a inibição do alongamento do caule pelas citocininas, esteja associada à produção do hormônio gasoso etileno (Figura 33).



Figuras 33 – Citocininas estimulam a produção de etileno e redução no crescimento do caule em plântulas de *Arabidopsis* crescendo no escuro (Taiz & Zeiger, 1998).

3.4 Mecanismo de Ação

A diversidade dos efeitos de citocininas sobre o crescimento e desenvolvimento da planta é consistente com o envolvimento de vias de transdução de sinais, as quais possuem ramificações que produzem respostas específicas.

O mecanismo de ação das citocininas não é totalmente conhecido. No entanto, algum progresso tem sido obtido. Um possível receptor para citocininas tem sido identificado em *Arabidopsis*. Trata-se de uma proteína transmembranar relacionada com o receptor de etileno (ETR1). O gene de resposta ao etileno EIN2, fator de transcrição, foi também identificado em

um “screen” de mutantes resistentes à citocinina, sugerindo que etileno e citocininas têm em comum alguns componentes de suas vias de transdução de sinais.

As citocininas têm profundo efeito sobre a de síntese de proteínas e sobre os tipos de proteínas feitas pela planta. Em particular, a citocinina estimula a síntese de proteínas específicas do cloroplasto que são codificadas por genes nucleares.

De modo geral, o aumento na síntese de uma proteína significa um aumento na expressão do gen que codifica tal proteína. As citocininas aumentam a estabilidade de alguns mRNAs específicos, mediante aumento na transcrição ou através de efeitos pós-transcricionais. Por exemplo, o aumento da expressão de proteínas do complexo coletor de luz em *Lemna gibba* (pequena planta aquática), parece estar associado a um controle pós-transcricional, possivelmente um aumento na estabilidade do mRNA.

4. ETILENO: O HORMÔNIO GASOSO

4.1 A Descoberta

Durante o século XIX, quando um gás, produzido pelo carvão era utilizado na iluminação de ruas, observou-se que árvores nas vizinhanças das lâmpadas desfolhavam-se mais extensivamente do que as que se encontravam mais distantes. Tornou-se aparente que o gás e poluentes do ar danificavam o tecido vegetal e, em 1901, o etileno foi identificado como o componente ativo do gás que provocava tal efeito. Posteriormente, observou-se que plântulas de ervilha crescendo no escuro, no laboratório, mostrava reduzido alongamento do caule, aumento no crescimento lateral e um anormal crescimento horizontal, o que ficou conhecido como “tripla resposta”. Quando o ar do laboratório era purificado, as plantas voltavam a crescer em taxas normais. O etileno, o qual estava presente no ar contaminado do laboratório, foi identificado como a molécula causadora da resposta.

A primeira indicação que o etileno era um produto natural de tecidos vegetais foi reportada por H. H. Cousins, em 1910. Ele mostrou que emanções de laranjas estocadas em uma câmara provocavam o amadurecimento prematuro de bananas. No entanto, visto que nós sabemos agora que frutos de laranja sintetizam relativamente pouco etileno, comparado com outros frutos (maçã, por exemplo), é provável que as laranjas utilizadas por Cousins estivessem contaminadas com o fungo *Penicillium*, o qual produz copiosos montantes de etileno.

Em 1934, R. Gane e colaboradores identificaram quimicamente o etileno como um produto natural do metabolismo da planta e, devido aos seus efeitos sobre as plantas, ele foi classificado como um hormônio.

Apesar da sua descoberta, a maioria dos fisiologistas não reconheceu o etileno como um hormônio vegetal, principalmente por que se acreditava que os efeitos do etileno poderiam ser mediados pela auxina. Assim, acreditava-se que a auxina era o principal hormônio de plantas e que o etileno tinha somente um insignificante e indireto papel fisiológico. Trabalhos com etileno eram, também, difíceis de serem feitos pela falta de técnicas para sua quantificação. No entanto, em 1959, quando a cromatografia gasosa foi introduzida nas pesquisas, o etileno foi re-descoberto como hormônio e a sua importância no desenvolvimento da planta foi reconhecida.

4.2 Ocorrência, Metabolismo e Transporte

O etileno é uma molécula simples (Figura 34) que é mais leve do que o ar sob condições fisiológicas. Ele é inflamável e pode ser facilmente oxidado. O etileno pode ser oxidado para óxido de etileno e este pode ser hidrolisado para etileno glicol. Em muitos tecidos de plantas, o etileno pode ser completamente oxidado até CO₂ (Figura 34).

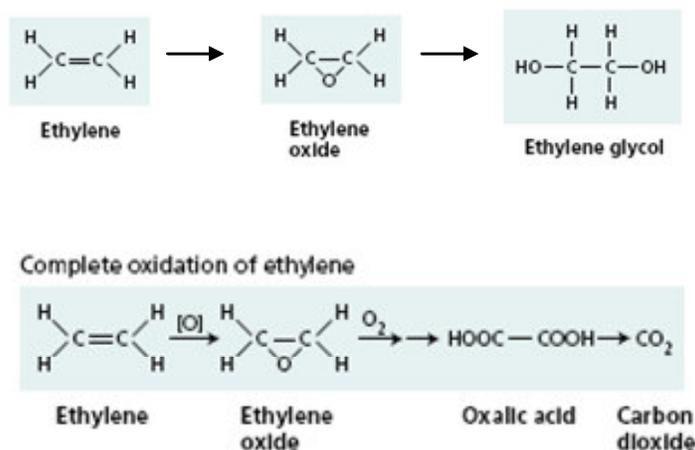


Figura 34 – Estrutura e processos de oxidação do etileno (Taiz & Zeiger, 1998).

O etileno é liberado facilmente do tecido que o produz, difundindo-se na fase gasosa, através dos espaços intercelulares, podendo ser perdido para a atmosfera externa ou atingir outros órgãos da planta. Em função dessa rápida difusão, sistemas que absorvem o etileno são usados durante o estoque de frutos e flores. Por exemplo, o permanganato de potássio (KMnO₄) é um forte adsorvente de etileno que pode reduzir a concentração desse gás em áreas de estoque de maçã, aumentando o tempo de armazenamento dos frutos.

O etileno pode ser produzido por quase todas as partes das plantas superiores, embora a taxa de produção dependa do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento. Em geral, regiões meristemáticas e regiões nodais são mais ativas na sua biossíntese. Embora, a produção de etileno também aumente durante a abscisão foliar e a senescência de flores, bem como durante o amadurecimento de frutos. Além disso, escuro, danos mecânicos (ferimentos), algumas doenças e estresses fisiológicos (congelamento, altas temperaturas e estresse hídrico) podem induzir a biossíntese de etileno.

Nos estudos sobre a biossíntese de etileno, M. Lieberman e colaboradores mostraram que vários tecidos de plantas podiam converter [¹⁴C]-Metionina para [¹⁴C]-Etileno e que o etileno era derivado dos carbonos 3 e 4 da metionina. Outros resultados experimentais mostraram que o grupo CH₃-S da metionina (o que restava da molécula de metionina) era reciclado no tecido (ver Ciclo de Yang, na Figura 34). Sem essa reciclagem, o montante de enxofre reduzido presente na célula poderia se tornar limitante, influenciando o nível de metionina disponível para a biossíntese de etileno. Subseqüentemente, outros trabalhos mostraram que o composto S-Adenosilmetionina (AdoMet), sintetizado a partir de metionina e ATP, era um intermediário na via biossintética do etileno (Figura 35).

Quatorze anos após a metionina ter sido descoberta como precursor do etileno nas plantas, a etapa final da via foi descoberta. O precursor imediato do etileno foi identificado como ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC). O papel do ACC ficou evidente em outros experimentos, nos quais as plantas eram tratadas com metionina marcada radiotativamente [¹⁴C Met.]. Sob condições anaeróbicas, não houve produção de etileno e o ACC marcado acumulou no tecido. Quando o tecido era transferido para um meio aeróbico, ocorria produção de etileno. Outros estudos, com vários tipos de tecidos vegetais mostraram que o ACC marcado radioativamente era rapidamente convertido para etileno, sugerindo que o ACC era o precursor imediato do etileno em plantas (Figura 35). Resultados semelhantes

foram obtidos com aplicação exógena de ACC (aplicação de ACC aumentava substancialmente a síntese de etileno).

A Sintase do ACC, a enzima que catalisa a conversão de S-adenosilmetionina para ACC, tem sido caracterizada em muitos tecidos de várias plantas. A sintase do ACC é uma enzima citosólica e sua síntese é regulada por fatores internos (como auxinas, senescência de flores, amadurecimento de frutos, etc.) ou fatores externos (ferimentos, injúrias pelo frio, estresse hídrico, encharcamento, etc.). Todos estes fatores promovem a síntese de etileno (Figura 35). Alguns compostos, como o aminoetoxivinil glicina (AVG), inibem a atividade dessa enzima e, portanto, a síntese de etileno.

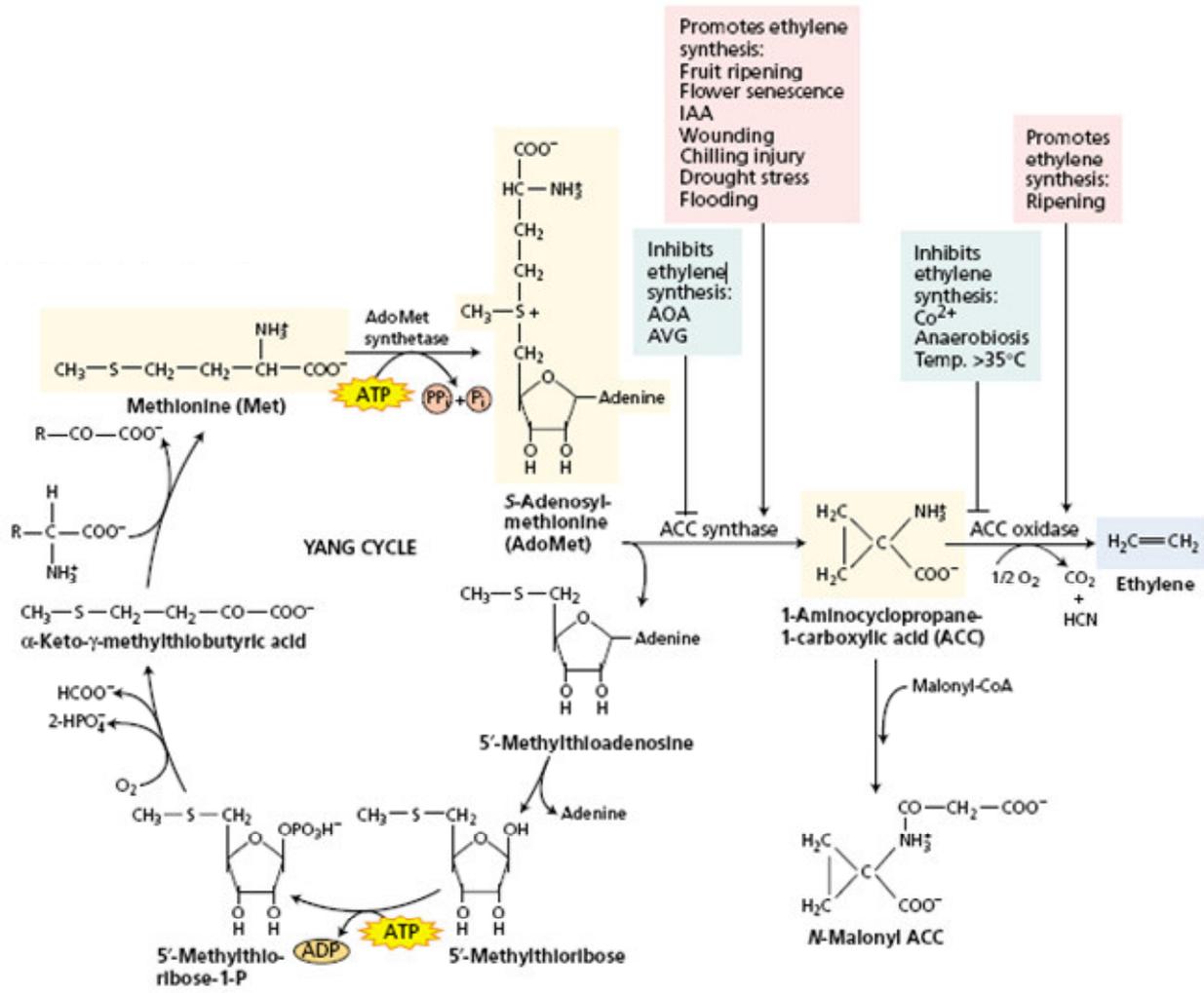


Figura 35 – Etapas da biossíntese de etileno e o ciclo de Yang (Taiz & Zeiger, 1998).

Fruits ripening = amadurecimento de frutos; Flowers senescence = senescência de flores; IAA = auxinas; Wounding = Ferimento; Chilling injury = injúria provocada por frio; Drought stress = estresse hídrico; Flooding = encharcamento, inundação.

A última etapa na biossíntese de etileno, a conversão de ACC para etileno, é catalisada pela enzima Oxidase do ACC, uma enzima que requer Fe^{2+} e ascorbato como cofatores. Esta enzima não é, geralmente, o ponto limitante da biossíntese de etileno, embora tecidos que mostram altas taxas de produção de etileno (como frutos em amadurecimento e flores senescentes), mostram aumento na atividade da oxidase do ACC e de seu mRNA.

O aminoácido metionina é encontrado em concentrações muito baixas nos tecidos vegetais, em valores mais ou menos constantes, inclusive naqueles tecidos que produzem copiosos montantes de etileno (alguns frutos amadurecendo, por exemplo). Visto que a metionina é o único precursor do etileno nas plantas superiores, pode-se afirmar que os tecidos que produzem etileno requerem um contínuo suprimento deste aminoácido. Este suprimento é assegurado pela reciclagem da metionina via o Ciclo de Yang (Figura 35). Na reação catalisada pela sintase do ACC, S-adenosilmetionina é convertido para ACC e 5'-metiltio-adenosina. Este último composto é convertido para metionina através de 4 reações que completam o Ciclo de Yang.

O ACC produzido no tecido não é convertido totalmente para etileno (Figura 35). O ACC pode ser convertido, também, para uma forma conjugada não volátil, N-malonil-ACC, a qual não é degradada e parece se acumular no tecido. Uma segunda forma de conjugação de ACC, o ácido 1-(L-glutamil-amino) ciclopropano carboxílico (GACC), tem sido também identificada. A conjugação de ACC pode ter um importante papel no controle da biossíntese de etileno, em uma maneira análoga à conjugação de auxinas e citocininas.

Os pesquisadores têm estudado, também, o catabolismo do etileno, suprimindo $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$ (etileno) aos tecidos de plantas e acompanhando os compostos radioativos produzidos. Estes estudos mostraram que CO_2 , óxido de etileno e etileno glicol (este último livre ou conjugado com glicose) são produtos do catabolismo do etileno (ver Figura 34).

Em alguns sistemas, auxina e etileno podem causar respostas similares em plantas, tais como a indução do florescimento em abacaxi e a inibição do alongamento do caule. Estas respostas similares se devem à capacidade das auxinas (em altas concentrações) de promover a biossíntese de etileno, pelo aumento na conversão de S-adenosilmetionina para ACC. Alguns estudos têm mostrado que os níveis do mRNA que codifica a sintase do ACC aumentam em resposta à aplicação de AIA, sugerindo que um aumento na transcrição do gen é responsável, pelo menos em parte, pelo aumento na produção de etileno em resposta à auxina. Estas observações indicam que algumas respostas previamente atribuídas às auxinas (AIA), são de fato mediadas pelo etileno produzido em resposta à auxina.

A utilização de alguns inibidores da biossíntese e da ação do etileno permite discriminar entre a ação da auxina e do etileno. Por exemplo, aminoetoxivinil glicina (AVG) e aminoxiacetato (AOA) bloqueiam a conversão de S-adenosilmetionina para ACC, ou seja, a reação catalisada pela sintase do ACC. O cobalto (Co^{2+}) é também um inibidor da biossíntese de etileno, bloqueando a conversão de ACC para etileno, na última etapa da biossíntese catalisada pela oxidase do ACC (anaerobiose age de modo similar). Íons prata (Ag^+), aplicados como nitrato de prata (AgNO_3) ou como tiosulfato de prata [$\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{-3}$], são potentes inibidores da ação do etileno. O gás carbônico (CO_2) em altas concentrações (5 a 10%) também inibe muitos efeitos do etileno (por exemplo, amadurecimento do fruto), embora seja menos eficiente que os íons Ag^+ . O transocteno, um composto volátil, é um forte inibidor competitivo da ligação do etileno. E, recentemente foi descoberto um novo inibidor da ação do etileno, o MCP (1-metilciclopropeno), que age ligando-se irreversivelmente ao receptor de etileno. O MCP apresenta um extraordinário potencial de uso comercial.

Estudos com esses compostos mostraram que, em alguns casos, o etileno é o efector primário e que a auxina age indiretamente, promovendo a produção de etileno. Nestes casos, a aplicação de auxinas não promove a resposta se, ao mesmo tempo, forem aplicados inibidores da síntese ou da ação do etileno.

4.3 Papel Fisiológico

a) Amadurecimento de frutos

No uso popular, o termo amadurecimento de frutos se refere às mudanças metabólicas que o tornam o fruto próprio para o consumo. Tais mudanças incluem o amolecimento devido a quebra enzimática da parede celular, hidrólise de amido e de outras macromoléculas, acúmulo de açúcares solúveis e redução nos teores de ácidos orgânicos e compostos fenólicos, incluindo tanino. Também se observa acúmulo dos pigmentos antocianina e carotenóides na epiderme desses frutos.

Por muitos anos, o etileno tem sido reconhecido como o hormônio que acelera o amadurecimento de **muitos** frutos comestíveis. No entanto, nem todos os frutos respondem ao etileno. Os frutos que amadurecem em resposta ao etileno exibem um aumento característico na respiração antes da fase de amadurecimento, conhecido como **Climatério** (Figura 36). Tais frutos mostram um pico de produção de etileno imediatamente antes do aumento na respiração. Visto que, um tratamento com etileno induz o fruto a produzir uma adicional quantidade de etileno, sua ação pode ser descrita como autocatalítica.

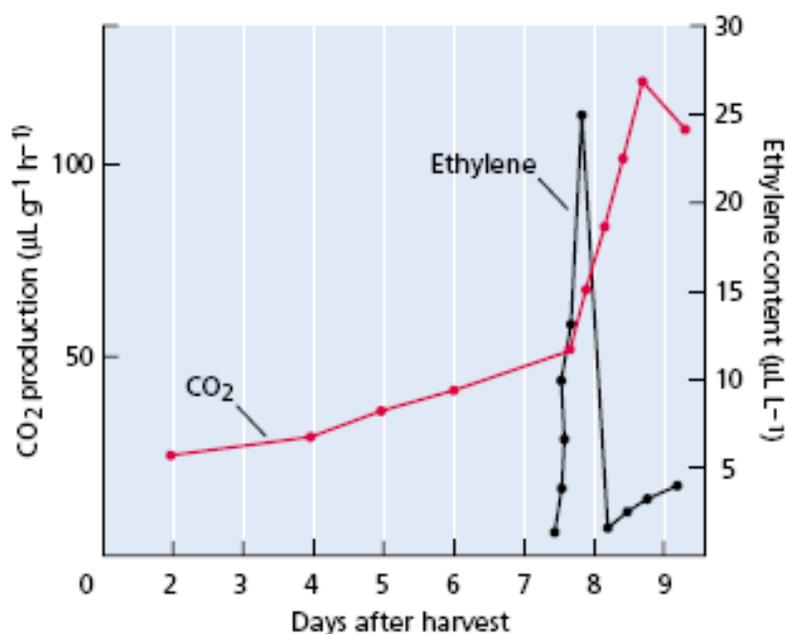


Figura 36 – Relação entre a produção de etileno e a taxa de respiração em frutos de banana após a colheita (Taiz & Zeiger, 1998).

Frutos como, maçã, banana, abacate e tomate, são exemplos de frutos climatéricos. Em contraste, frutos como *Citrus*, abacaxi e uva, não exibem aumento nem na produção de etileno nem na respiração, e são conhecidos como frutos não climatéricos. Quando frutos climatéricos não maduros são tratados com etileno, a iniciação do aumento no climatério é acelerada. Por outro lado, quando frutos não climatéricos são tratados da mesma maneira, o aumento na taxa respiratória é proporcional à concentração de etileno. No entanto, o tratamento não induz a produção de etileno endógeno e também não acelera o amadurecimento.

A relação causal entre o nível endógeno de etileno e o amadurecimento do fruto tem sido estudada através da aplicação de inibidores da biossíntese (AVG e AOA) ou da ação (Ag^+ e CO_2) do etileno. O uso destes inibidores retarda ou evita o amadurecimento de frutos climatéricos. Estudos com mutantes também confirmam o papel do etileno no amadurecimento de frutos. Por exemplo, estudos com plantas transgênicas de tomate deficientes em etileno (esses mutantes são incapazes de produzir etileno devido alterações na expressão das enzimas sintase do ACC e oxidase do ACC), mostraram completo bloqueio no amadurecimento do fruto e, o amadurecimento foi promovido pela aplicação exógena de etileno. Estes experimentos mostraram, inequivocamente, o papel do etileno no amadurecimento do fruto.

A elucidação do papel do etileno no amadurecimento de frutos climatéricos tem resultado em muitas aplicações práticas que objetivam uniformizar, acelerar ou retardar o amadurecimento.

b) Epinastia de folhas

A curvatura para baixo de folhas, que ocorre quando o lado superior (adaxial) do pecíolo cresce mais rápido do que o lado inferior (abaxial), é denominada epinastia. O etileno e altas concentrações de auxinas induzem epinastia (Figura 37) e, sabe-se agora, que a auxina age indiretamente, promovendo a síntese de etileno.



Figura 37 – Epinastia em folhas de tomate provocada por tratamento com etileno. As plantas controle estão à esquerda e as tratadas com etileno à direita (Taiz & Zeiger, 1998).

Algumas condições ambientais, como encharcamento ou anaerobiose nas raízes (dados obtidos com tomate), provocam aumento na síntese de etileno na parte aérea, produzindo a resposta epinástica. Visto que estas condições ambientais são sentidas pelas raízes e a resposta ocorre na parte aérea, acredita-se que um sinal da raiz deve ser transportado para a parte aérea. Este sinal parece ser o ACC, o precursor imediato do etileno. Acredita-se que, as condições anaeróbicas nas raízes, as quais inibem a enzima ACC oxidase, provocam o acúmulo do composto ACC. Este ACC é transportado para a parte aérea, via xilema. Na parte aérea ele é convertido para etileno, o qual induz a epinastia de folhas.

c) Expansão celular horizontal e o crescimento lateral do caule

Em concentrações acima de $0,1 \mu\text{L L}^{-1}$, o etileno muda o padrão de crescimento de plântulas, reduzindo a taxa de alongamento e aumentando a expansão lateral (Figura 38). A direção da expansão celular é determinada pela orientação das microfibrilas de celulose da parede celular. Acredita-se que o etileno induz uma gradual mudança no alinhamento das microfibrilas.



Figura 38 – Redução no alongamento do caule, aumento na expansão lateral e aumento no crescimento horizontal de raízes de ervilha, tratadas com etileno. As plantas controle estão à esquerda e as tratadas com etileno à direita (Taiz & Zeiger, 1998).

O tipo de crescimento horizontal, que ocorre após exposição ao etileno, pode executar importante papel durante a germinação, particularmente sob determinadas condições de solo. Por exemplo, quando barreira física impede a emergência da plântula, ocorre um aumento na produção de etileno, induzindo então o crescimento horizontal, o que permite à plântula encontrar condições no solo para propiciar a sua emergência.

d) Promoção do crescimento do caule e de pecíolos de espécies submersas

Embora o etileno seja associado com a inibição do alongamento do caule e a promoção da expansão lateral, ele promove o alongamento do caule e pecíolos em várias espécies submersas em água (arroz, por exemplo). Nestas espécies, as partes submersas são induzidas a um rápido alongamento dos entrenós, permitindo que as folhas fiquem acima da água. Tratamento com etileno mimetiza os efeitos da submersão. Nas plantas submersas, o crescimento é estimulado por que o etileno acumula-se nos tecidos. É interessante notar que, na ausência de O_2 a síntese de etileno é diminuída. No entanto, a difusão do etileno é também diminuída no meio aquoso, o que provoca o acúmulo de etileno.

No caso de plântulas de arroz, os estudos têm mostrado que o etileno estimula o alongamento dos entrenós, aumentando, primariamente, a sensibilidade das células do meristema intercalar às giberelinas endógenas. Assim, o efeito estimulante do etileno em plantas submersas pode ser mediado pelas giberelinas.

e) Florescimento em abacaxi

Embora o etileno iniba o florescimento na maioria das espécies, ele induz florescimento em abacaxi (e em outras espécies taxonomicamente relacionadas ao abacaxi), sendo usado comercialmente no cultivo de abacaxi para a sincronização da floração e estabelecimento do fruto.

O etileno pode mudar o sexo de flores em espécies que apresentam flores unisexuais. A promoção de flores fêmeas em pepino é um exemplo. Este processo de determinação do sexo está associado principalmente às giberelinas (ver giberelinas)

f) Senescência de folhas e de flores

A senescência é um processo de desenvolvimento geneticamente programado, que afeta todos os tecidos da planta. Algumas linhas de evidências, baseadas em estudos fisiológicos, sugerem papéis para etileno e citocininas no controle da senescência de folhas. Veja as principais evidências:

- Aplicações de etileno ou de ACC aceleram a senescência de folhas, enquanto tratamento com citocininas retarda;
- Aumento na produção de etileno é associado à perda da clorofila. De modo contrário, altos níveis de citocininas estão associados ao acúmulo de clorofila;
- Inibidores da síntese (AVG, AOA e Co^{2+}) e da ação (Ag^+ e CO_2) do etileno, retardam a senescência de folhas, de flores e de frutos (amadurecimento). Por exemplo, aplicação de tiosulfato de prata (STS) retarda a senescência de flores (Figura 39)
- Plantas transgênicas superprodutoras de citocininas são mais ricas em clorofila e têm sua senescência retardada;

As evidências descritas acima sugerem que a senescência é regulada pelo balanço entre citocininas e etileno. Em adição, o ácido abscísico (ABA) tem sido implicado, também, no controle da senescência foliar.



Figura 39 – Inibição da senescência de flores provocada pela aplicação de tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação do etileno. As plantas tratadas com STS estão à esquerda e as não tratadas à direita (Taiz & Zeiger, 1998).

g) Abscisão

A queda de folhas, de flores, de frutos e de outras partes da planta é denominada abscisão. O processo de abscisão ocorre numa camada específica de células, conhecida como zona de abscisão (localizada na base dos pecíolos, pedicelo e pedúnculo), a qual torna-se morfológica e bioquimicamente diferenciada durante o desenvolvimento do órgão. O enfraquecimento das paredes celulares na camada de abscisão depende da atividade de enzimas degradantes da parede celular, tais como celulases, hemicelulose e poligalacturonases. O etileno parece ser o regulador primário do processo de abscisão, com a auxina agindo como um supressor do efeito do etileno.

É interessante que, concentrações supraótimas de auxinas estimulam a produção de etileno e, conseqüentemente, a queda de folhas. Este é o princípio para o uso de substâncias análogas às auxinas como agentes desfolhantes. Por exemplo, o 2,4,5-T, o ingrediente ativo do “agente laranja”, foi usado como desfolhante pelos Estados Unidos, durante a Guerra do Vietnã (o produto era aplicado por aviões sobre as florestas). Esta substância atua aumentando a síntese de etileno, estimulando, desta forma, a abscisão foliar.

Um modelo de controle hormonal da abscisão foliar descreve o processo em três fases distintas e seqüenciais (Figura 40):

- Fase de manutenção da folha → Esta fase é anterior à percepção do sinal que inicia a abscisão da folha. Nessa situação, se observa um gradiente decrescente de auxina da folha para o caule, a qual mantém a zona de abscisão em um estado não sensível;
- Fase de indução da queda → A redução ou reversão do gradiente de auxina da folha para o caule, normalmente associada com a senescência, torna a zona de abscisão sensível ao etileno;
- Fase de queda → As células sensibilizadas da zona de abscisão respondem às baixas concentrações de etileno endógeno pela produção e secreção de celulases e outras enzimas degradantes da parede celular, resultando na queda da folha.

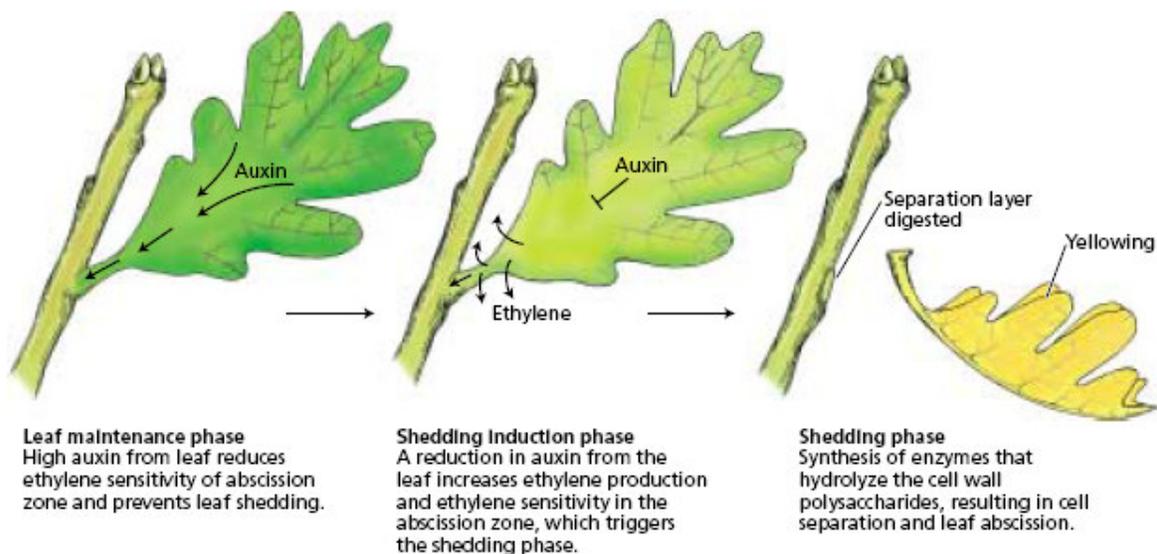


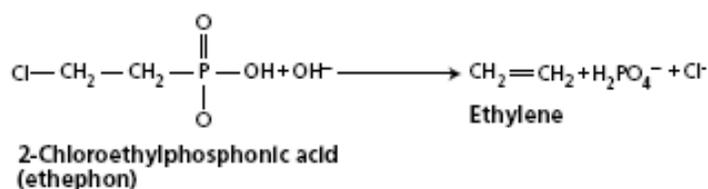
Figura 40 – Um esquema mostrando os papéis de auxinas e etileno durante a abscisão foliar (Taiz & Zeiger, 1998).

h) Uso comercial do etileno

Visto que o etileno regula muitos processos fisiológicos no desenvolvimento da planta, ele é um dos hormônios de plantas mais amplamente usados na agricultura. Auxinas e ACC podem estimular a biossíntese natural de etileno e são usados em alguns casos.

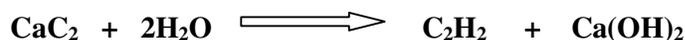
Devido a sua alta taxa de difusão (hormônio gasoso), torna-se difícil a aplicação de etileno. No entanto, esta limitação pode ser sobrepujada pelo uso de compostos que liberam o etileno. O mais amplamente usado é o etefon (ácido 2-cloroetilfosfônico), o qual foi descoberto na década de 1960 (este composto é conhecido como ethrel).

O etefon, pulverizado na forma de solução aquosa, é prontamente absorvido e transportado dentro da planta. Ele libera o etileno lentamente, em ambiente alcalino, de acordo com a reação:



O etefon acelera o amadurecimento de frutos climatéricos, sincroniza o florescimento e o estabelecimento do fruto em abacaxi, acelera a abscisão de flores e frutos e promove a formação de flores femininas em pepino.

OBS: Na prática é comum o uso do Carbeto de Cálcio (conhecido vulgarmente como “Carbureto”). Esse composto reage com a água e produz acetileno, de acordo com a seguinte reação:



O acetileno (C_2H_2) em **altas concentrações** pode atuar de forma semelhante ao etileno (C_2H_4). O uso do carbeto de cálcio é comum no amadurecimento de frutos (por exemplo, bananas) e no florescimento de abacaxi. Uma vantagem do “carbureto” é o seu baixo custo, quando comparado ao etrel.

A preservação de frutos climatéricos, estocados, também está associado ao etileno. Um maior tempo de estoque pode ser obtido, controlando-se a atmosfera com baixas concentrações de O_2 e baixas temperaturas, fatores que inibem a biossíntese de etileno pelos frutos armazenados, ou com o uso de altas concentrações de CO_2 , que inibe a ação do etileno. Íons prata (Ag^+) podem também ser utilizado no aumento da longevidade de flores, inibindo a ação do etileno (ver Figura 39).

4.4 Mecanismo de Ação

A despeito da diversidade dos efeitos do etileno sobre o desenvolvimento das plantas, as etapas primárias que definem o mecanismo de ação do etileno são aparentemente similares em todos os casos. Elas envolvem a ligação do etileno a um receptor, seguida da ativação de uma ou mais vias de transdução de sinal que resultam em respostas fisiológicas específicas (Acredita-se que o mecanismo é semelhante para todos os hormônios, como apresentado no início desta unidade, na Figura 3).

Nos últimos anos, muitas das descobertas à cerca do mecanismo de ação do etileno têm sido obtidas através de estudos com mutantes de *Arabidopsis*. De acordo com esses estudos, um modelo de sinalização celular envolvendo o etileno pode ser proposto (Figura 41):

- Algum fator estimula a síntese de etileno e ele liga-se ao receptor ETR1 (receptor de etileno), o qual é uma proteína integral de membrana;
- A ligação do etileno ao receptor ETR1, resulta na inativação de um regulador negativo, CTR1 (constitutive triple response);
- A inativação de CTR1 permite que a proteína transmembranar EIN2 torne-se ativa. Essa proteína transmembranar pode agir como um poro ou canal;
- Uma substância, possivelmente um íon, pode difundir-se através do canal (EIN2) e ativar um fator de transcrição (EIN3). Este EIN3 é uma proteína reguladora.
- O fator de transcrição EIN3 age na regulação da expressão de genes nucleares que vão especificar uma determinada resposta fisiológica.

**OBS: ETR: receptor do etileno; EIN: fator de transcrição;
CTR: regulador negativo da tríplice resposta.**

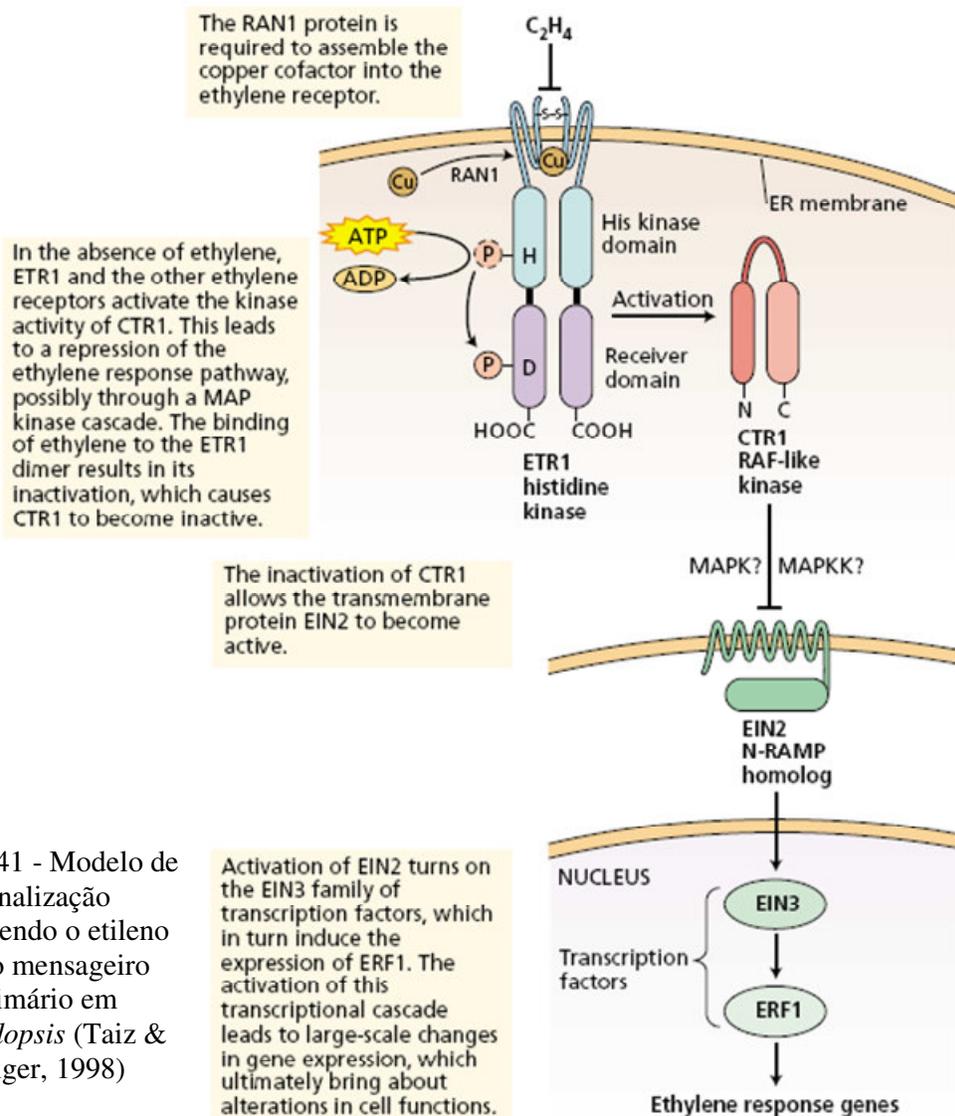


Figura 41 - Modelo de sinalização envolvendo o etileno como mensageiro primário em *Arabidopsis* (Taiz & Zeiger, 1998)

5. ÁCIDO ABCSCÍICO: UM SINAL PARA A MATURAÇÃO DE SEMENTES E ANTIESTRESSE

5.1 Descoberta

Por muitos anos, fisiologistas de plantas suspeitaram que o fenômeno de dormência de semente e de gemas era regulado por um composto inibidor de crescimento, e eles tentaram extrair e isolar tal composto. Os experimentos realizados levaram à identificação de um grupo de compostos inibidores que diferiam quimicamente das auxinas. Posteriormente, uma substância que promovia a abscisão de frutos de algodão foi purificada e cristalizada, tendo recebido o nome de Abscisina II. Ao mesmo tempo, uma substância que promovia dormência de gemas foi purificada e ficou conhecida como Dormina. Quando esta última substância foi quimicamente identificada, observou-se que ela era idêntica à Abscisina II. A partir de então o composto foi renomeado como ácido abscísico (ABA), devido ao seu suposto envolvimento no processo de abscisão.

Atualmente, sabe-se que o etileno é o hormônio que promove a abscisão e que a abscisão de frutos de algodão induzida por ABA era devida a sua capacidade para estimular a síntese de etileno. Apesar disso, o ABA é reconhecido com um importante hormônio vegetal. Ele age como regulador negativo do crescimento da parte aérea e do movimento estomático, particularmente quando a planta está submetida a estresse ambiental. Outra importante função do ABA é observada na regulação da dormência de sementes. Neste aspecto, dormina poderia ter sido um nome mais apropriado para este hormônio. Porém, o nome ácido abscísico (ABA) é ampla e firmemente colocado na literatura.

5.2 Ocorrência, Metabolismo e Transporte

O ABA tem sido detectado amplamente nas plantas vasculares e em musgos (menos em hepáticas). Dentro da planta, o ABA tem sido detectado em todos os órgãos e tecidos vivos, desde a coifa da raiz até a gema apical da parte aérea. Ele é sintetizado em quase todas as células que possuem cloroplastos ou amiloplastos. O ABA pode ser encontrado na forma livre ou conjugado com monossacarídeos. Essa forma conjugada se acumula principalmente nos vacúolos. O ABA na forma livre é encontrado no citosol, podendo uma parte ficar localizada nos plastídios.

A estrutura química do ABA assemelha-se à porção terminal de algumas moléculas de carotenóides. Os 15 átomos de carbono do ABA formam (Figura 42):

- Um anel alifático com uma dupla ligação e três grupos metil;
- Uma cadeia lateral insaturada que possui um grupo carboxílico.

A orientação do grupo carboxílico no carbono 2, determina os isômeros cis e trans do ABA (Figura 42). O ABA de ocorrência natural está na forma cis e, por convenção, o nome ácido abscísico refere-se a este isômero. A forma trans é inativa, porém, pode ser convertida para a forma cis (ativa).

O ABA também possui um átomo de carbono assimétrico na posição 1' do anel, o qual é responsável pelos enantiômeros S e R (Figura 42). O enantiômero S é forma natural de ABA encontrada nos vegetais. Em geral, as formas comerciais de ABA possuem uma mistura com concentrações praticamente iguais dos enantiômeros S e R. O enantiômero S é o único que é ativo em respostas de curto prazo ao ABA, como o fechamento estomático. Em respostas de

longo prazo, tal como mudanças na síntese de proteínas, ambos enantiômeros são ativos. É importante destacar que, ao contrário dos isômeros *cis* e *trans*, as formas *S* e *R* não são interconvertidas no tecido vegetal. Isto significa dizer que em trabalhos com respostas de curto prazo ao ABA (como, fechamento estomático), deve-se aplicar o dobro da concentração do ABA comercial para se ter a concentração desejada de ABA ativo (*S*).

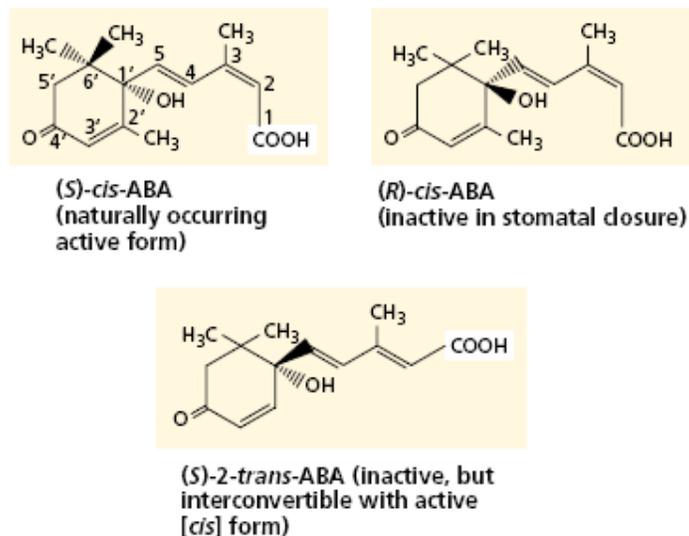


Figura 42 – A estrutura química dos enantiômeros *S* e *R* do *cis*-ABA e o enantiômero *S* do *trans*-ABA (Taiz & Zeiger, 1998).

Estudos de requerimento estrutural para a atividade biológica do ABA, têm mostrado que algumas mudanças na molécula resultam na perda da atividade. As características da molécula que parecem essenciais para a atividade biológica são:

- ✓ O grupo carboxílico;
- ✓ O grupo hidroxila terciário (1'-OH);
- ✓ A cadeia lateral (2*cis*-4-*trans*-pentadienóica);
- ✓ O grupo cetona (4'-cetona);
- ✓ E a dupla ligação no anel ciclohexano.

Os produtos do catabolismo do ABA, presentes no tecido, que representam as perdas desses grupos, são biologicamente inativos.

O ABA é sintetizado a partir de um intermediário da biossíntese de xantofilas (pigmentos). A etapa inicial da biossíntese de ABA ocorre no cloroplasto de tecidos fotossintetizantes ou em outros plastídios, no caso de tecidos que não fotossintetizam. A via começa com isopentenil difosfato (IPP), a unidade biológica de isopreno, o qual serve como precursor de uma xantofila com 40 átomos de carbono, a zeaxantina (Figura 42). O IPP é precursor de todos os terpenóides (incluindo outros hormônios vegetais), sendo, neste caso, sintetizado por uma via independente do ácido mevalônico, localizada nos plastídios (neste caso o IPP é derivado do piruvato + 3-fosfoglicerato).

A zeaxantina (C40) é convertida para violaxantina. Esta é convertida para 9'-*cis*-neoxantina, o qual é clivado para formar o xantoxal (C15), um composto formado por 15 átomos de carbono com propriedades químicas similares às do ABA. A localização da clivagem da 9'-*cis*-neoxantina não é conhecida (pode ocorrer no cloroplasto). Finalmente, o xantoxal é convertido para ABA, via um intermediário ABA-aldeído, no citosol (Figura 43)

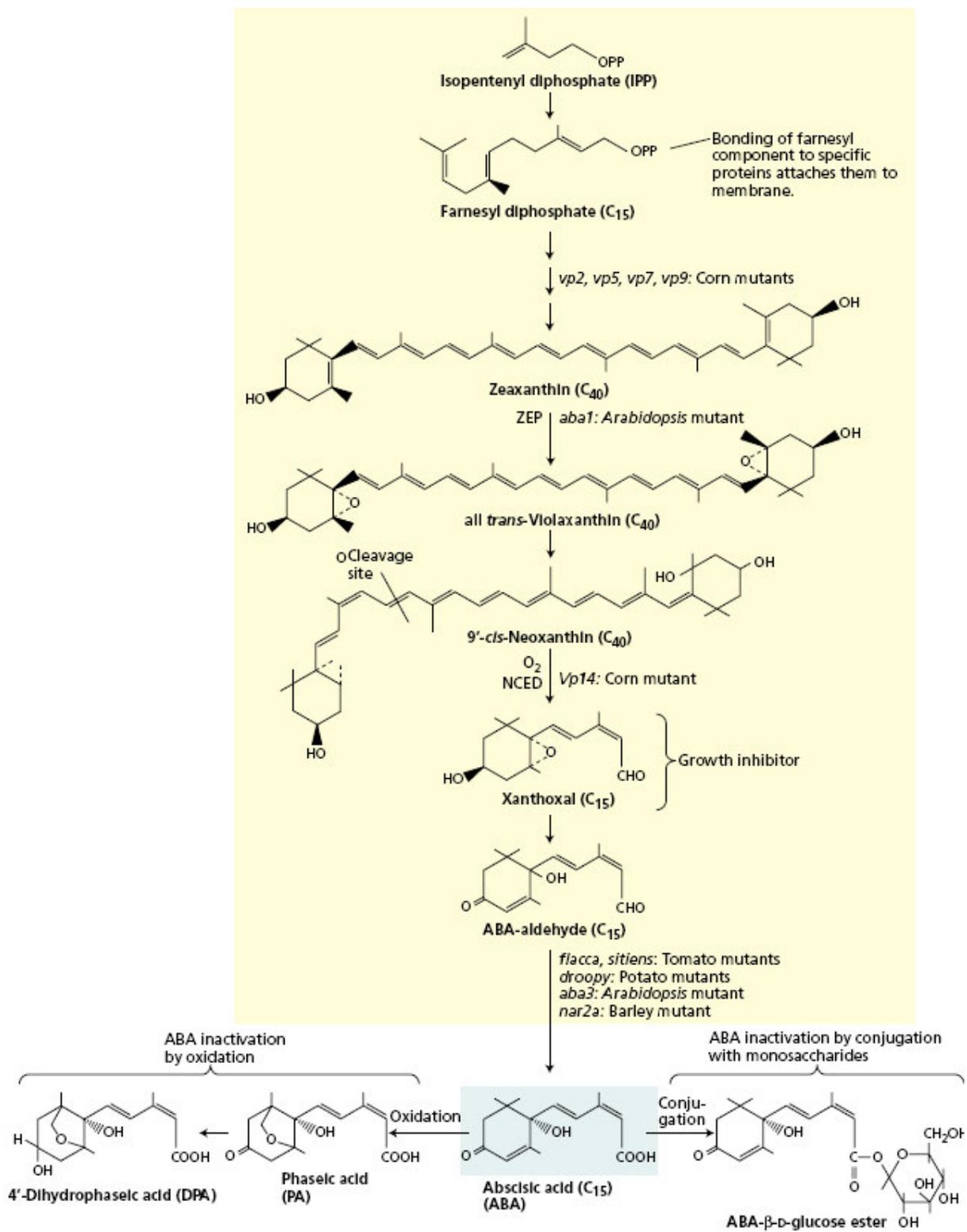


Figura 43 – Metabolismo do ABA em plantas superiores (Taiz & Zeiger, 1998).

O metabolismo do ABA é particularmente interessante por que seus níveis são alterados de forma abrupta em determinados tecidos, durante o desenvolvimento ou em resposta às mudanças nas condições ambientais. Em sementes em desenvolvimento, por exemplo, os níveis de ABA podem aumentar cerca de 100 vezes em poucos minutos e, depois declinam para níveis baixos quando a maturação ocorre. Já em plantas submetidas a estresse hídrico, os níveis de ABA nas folhas podem aumentar cerca de 50 vezes após 4 a 8 horas de estresse. Após 4 a 8 horas do retorno da irrigação se observa um declínio nos níveis de ABA para valores iniciais.

A biossíntese não é o único fator que regula a concentração de ABA no tecido. Como ocorre com outros hormônios, a concentração de ABA livre no citosol é também regulada pela degradação, transporte e compartimentalização. Por exemplo, o aumento na concentração de ABA nas células-guarda durante o estresse hídrico ocorre como resultado da síntese na folha, redistribuição dentro do mesofilo e importação do ABA produzido nas raízes. Já o declínio nos níveis de ABA após a re-irrigação é consequência da degradação e do transporte para outras partes da planta, bem como de um decréscimo na taxa de síntese.

A principal causa de inativação de ABA livre é a oxidação (Figura 43), produzindo um intermediário instável (6-hidroximetil-ABA), o qual é rapidamente convertido para ácido faséico (PA) e ácido dihidrofaséico (DPA). O ácido faséico é usualmente inativo. No entanto, ele pode induzir fechamento estomático em algumas espécies e atua na inibição da produção da enzima α -amilase (induzida por giberelinas) na camada de aleurona de sementes de cereais, durante a germinação.

O ABA livre pode também ser inativado pela conjugação covalente com outras moléculas, principalmente monossacarídeos (Figura 43). A conjugação inativa o ABA como hormônio e altera sua polaridade e distribuição na célula. Um exemplo comum de conjugado é o do Éster ABA- β -D-glicosil (ABA-GE). O ABA na forma livre é encontrado principalmente no citosol, enquanto o ABA-GE se acumula no vacúolo, podendo servir como uma forma de estoque de ABA.

O transporte de ABA pode ocorrer tanto via xilema como via floema, porém, ele é normalmente mais abundante no floema. Quando ABA marcado radioativamente é aplicado em folhas, ele é transportado para caules e raízes via floema. Já o ABA produzido nas raízes parece ser transportado principalmente via xilema. Isto ocorre quando as plantas são submetidas a estresse hídrico (Figura 44). Acredita-se que as raízes percebem a falta de água e sintetizam o ABA que é transportado para as folhas. É provável que o ABA funcione como um sinal enviado pelas raízes, que reduz a taxa de transpiração (perda de água) promovendo o fechamento estomático.

O interessante é que, embora a concentração de apenas 3 μ M de ABA no apoplasto das folhas seja suficiente para fechar o estômato, nem todo o ABA no xilema realmente alcança as células-guarda. Boa parte do ABA do xilema é absorvido e metabolizado nas células do mesofilo. No entanto, durante o estágio inicial de estresse hídrico, o pH da seiva do xilema aumenta de 6,3 para 7,2. Essa alcalinização do apoplasto favorece a formação do ABA dissociado (representado como ABA-COO⁻ ou ABA⁻), o qual não atravessa facilmente a membrana celular. Com isso, menos ABA penetra nas células do mesofilo e, conseqüentemente, mais ABA alcança as células-guardas (Figura 44). Assim, o aumento no pH do apoplasto funciona como um sinal que provoca a redistribuição do ABA nas folhas, favorecendo o acúmulo desse hormônio nas células-guarda e, conseqüentemente, o fechamento estomático.

Os fatores que afetam os níveis de ABA citosólico de plantas são os seguintes:

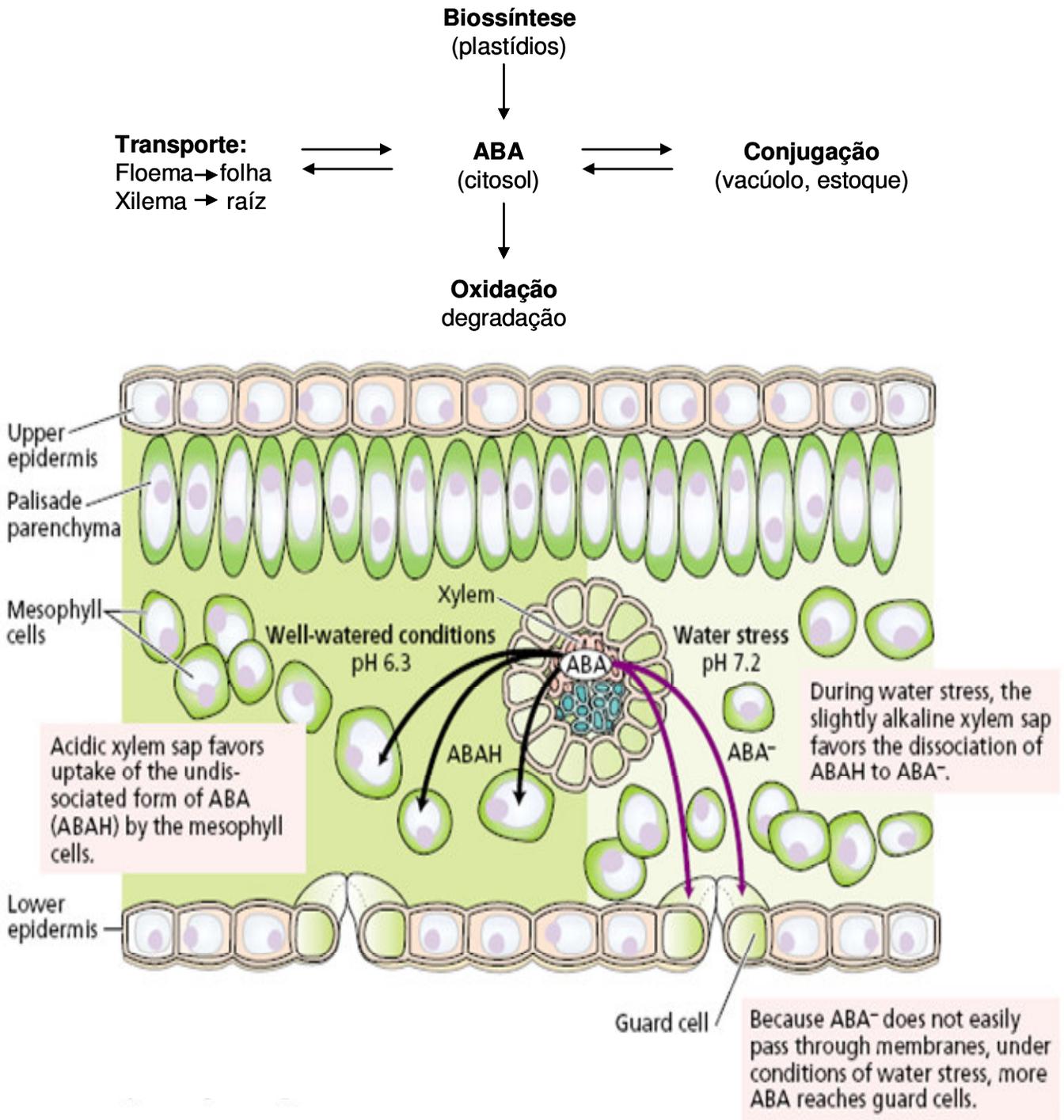


Figura 44 – Redistribuição de ABA na folha resultante da alcalinização da seiva do xilema durante o estresse hídrico. Note à esquerda (pH 6,3 sob condições normais), que boa parte do ABA do xilema é absorvido no mesofilo; À direita, o pH de 7,2 sob estresse hídrico, promove a formação do ABA⁻, o qual é direcionado para as células-guardas (Taiz & Zeiger, 1998).

5.3 Papel Fisiológico

O ABA atua como regulador primário na iniciação e na manutenção da dormência de sementes e de gemas e nas respostas de plantas ao estresse, particularmente estresse hídrico (estresse por frio e salinidade também provocam aumento nos níveis de ABA). Em adição, o ABA influencia muitos aspectos do desenvolvimento da planta atuando como antagonista, de auxinas, citocininas e giberelinas.

a) Desenvolvimento de sementes

O desenvolvimento da semente pode ser dividido em três fases de aproximadamente igual duração. Durante a primeira fase, a qual é caracterizada pelas divisões celulares, o zigoto sofre embriogênese e o tecido do endosperma prolifera (no caso de sementes endospermicas). A segunda fase começa com a cessação da divisão celular e termina com a desidratação e o final do desenvolvimento. Durante a segunda fase, ocorre o acúmulo de compostos de estoque, o embrião torna-se tolerante à desidratação e a semente se desidrata, perdendo acima de 90% do seu conteúdo de água.

Tipicamente, o conteúdo de ABA é muito baixo no início da embriogênese, alcança um valor máximo num ponto intermediário e, então, decresce gradualmente, ficando o conteúdo de ABA muito baixo quando a semente alcança a maturidade. Coincidente com o período em que os níveis endógenos de ABA são altos, observa-se o acúmulo de mRNAs específicos no embrião, que codificam as proteínas LEA (late embryogenesis abundant – proteínas abundantes no final da embriogênese), as quais parecem estar envolvidas na tolerância do embrião à dessecação. Assim, a síntese das proteínas LEA está sob o controle do ABA, indicando que ele promove a tolerância dos embriões à dessecação. Além disso, o ABA parece ser requerido para a expressão de genes que codificam proteínas de estoque durante a embriogênese.

b) Dormência de sementes

Durante a maturação da semente, o embrião entra em uma fase quiescente (latência) em resposta à dessecação. A germinação pode ser definida como o retorno do crescimento do embrião da semente madura. Ela depende das mesmas condições ambientais necessárias para o crescimento vegetativo da planta. Água e oxigênio devem estar disponíveis e a temperatura e demais condições ambientais devem ser adequadas. No entanto, em muitos casos uma semente viável poderá não germinar, mesmo que todas as condições ambientais necessárias para o crescimento sejam adequadas. Este fenômeno é denominado dormência de sementes.

Existem dois tipos de dormência de sementes:

- A dormência imposta pela casca ou outros tecidos que circundam o embrião;
- A dormência inerente ao embrião.

A dormência imposta pela casca (tegumento) ou por outros tecidos, pode ocorrer por alguns mecanismos:

- ✓ Impedimento da absorção de água;
- ✓ Dureza mecânica;
- ✓ Interferência nas trocas gasosas;
- ✓ Retenção de inibidores;

- ✓ Produção de inibidores – Alguns tegumentos de sementes podem conter concentrações relativamente altas de inibidores de crescimento (como o ABA), os quais podem suprimir a germinação do embrião.

O segundo tipo de dormência de sementes é a dormência do embrião, ou seja, ela é inerente ao embrião e não é devida a alguma influência do tegumento ou de outro tecido da semente. Este tipo de dormência é devido, provavelmente, à presença de inibidores, especialmente o ABA, bem como da ausência de promotores, tal como as giberelinas. A perda da dormência é freqüentemente associada com uma nítida queda na relação ABA/GAs. O ABA parece inibir a síntese de enzimas hidrolíticas dependentes de GAs, como por exemplo, a enzima α -amilase.

c) Fechamento estomático

A elucidação dos papéis do ABA nos estresses por frio, salinidade e hídrico, levaram à caracterização do ABA como o hormônio do estresse. Como já comentamos anteriormente, a concentração de ABA nas folhas pode aumentar cerca de 50 vezes em plantas submetidas a estresse hídrico. O ABA é muito efetivo no fechamento estomático e sua acumulação nas folhas de plantas estressadas executa um importante papel na redução das perdas de água pela transpiração, sob condições de seca (Figura 45). Por outro lado, alguns estudos têm mostrado decréscimo na abertura estomatal antes que ocorra um aumento no conteúdo total de ABA na folha. Esta aparente inconsistência é explicada por estudos que mostram que a resposta inicial do fechamento estomático é causada pela redistribuição de ABA dentro da folha (Figura 44).

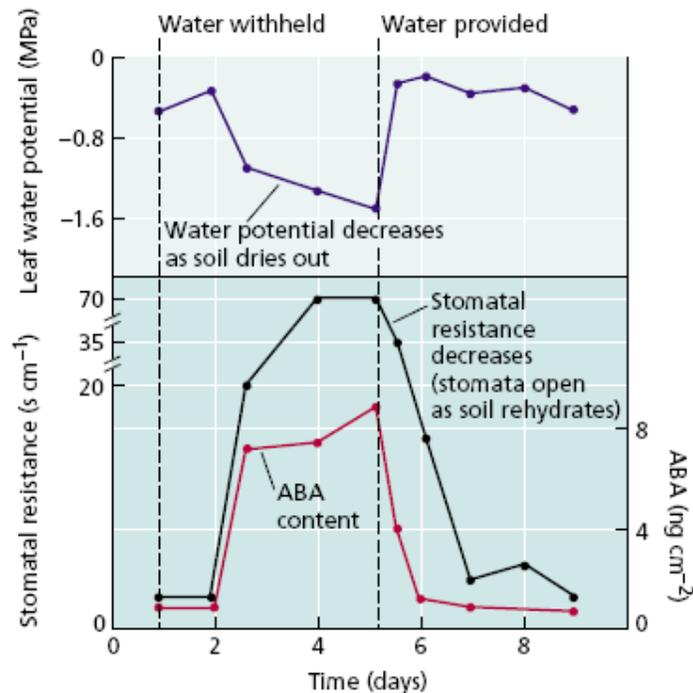


Figura 45 – Mudanças no potencial hídrico do solo, na resistência estomática e no conteúdo de ABA nas folhas de milho, em resposta ao estresse hídrico. (Taiz & Zeiger, 1998).

Note, na figura 45, que a interrupção da aplicação de água provocou uma queda no potencial hídrico do solo a partir do dia 2, com conseqüente acúmulo de ABA e fechamento estomático. Com o retorno da irrigação, no dia 5, o potencial hídrico do solo aumentou, os níveis de ABA decresceram e os estômatos se abriram (a menor resistência estomática indica maior abertura).

d) Condutividade hidráulica e fluxo de íons

A aplicação de ABA a tecidos radiculares estimula os fluxos de água e de íons, sugerindo que o ABA regula a turgescência das células da folha não somente pelo decréscimo na transpiração (promovendo o fechamento do estômato), mas, também, favorecendo o influxo de água nas raízes. O ABA parece aumentar o fluxo de água, aumentando a condutividade hidráulica das células das raízes.

e) Crescimento da raiz e da parte aérea

O ABA tem diferentes efeitos sobre o crescimento da raiz e da parte aérea, e os efeitos dependem fortemente do “status” hídrico da planta. Sob condições de baixo potencial hídrico (estresse hídrico), quando os níveis de ABA são altos, o hormônio endógeno exerce um efeito positivo sobre o crescimento da raiz e inibe o crescimento da parte aérea. O resultado é que plantas estressadas apresentam um aumento na relação raiz/parte aérea.

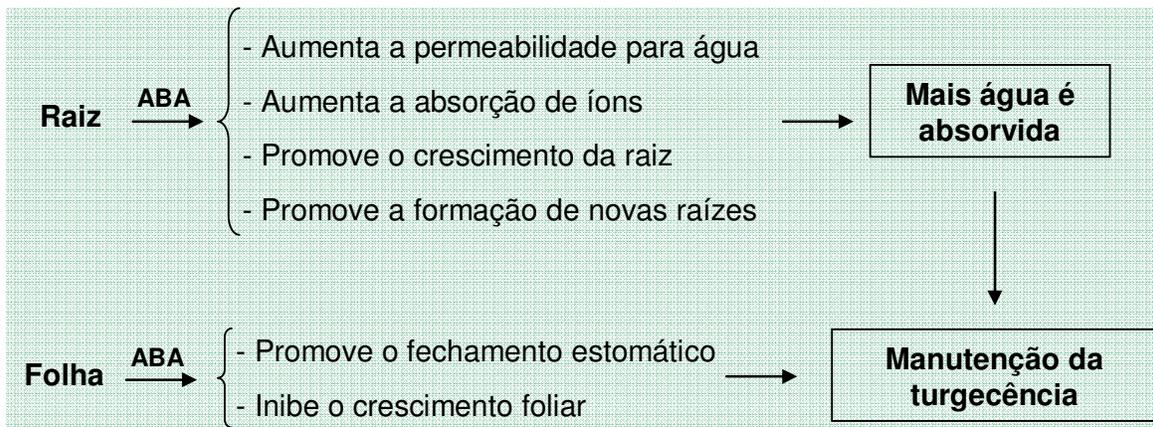


Figura 46 - A ação do ABA na manutenção da turgescência da planta.

f) Senescência de folhas (ver também citocininas e etileno)

O ABA está claramente envolvido na senescência de folhas, e acreditava-se que esta promoção da senescência poderia estar relacionada com o estímulo na produção de etileno. No entanto, experimentos com mutantes de *Arabidopsis* indicaram que o efeito do ABA sobre a senescência de folhas não é mediado pelo etileno. Aparentemente, o ABA é o agente iniciante da senescência, enquanto o etileno parece exercer seus efeitos em estágio posterior.

g) Dormência de gemas

Como já comentamos anteriormente (ver auxinas), a remoção do ápice da parte aérea provoca a redução nos níveis de ABA nas gemas laterais e isto provoca o crescimento dessa gemas. Altos níveis de AIA (auxina) no ápice da parte aérea podem manter altos níveis de ABA na gema lateral, causando inibição do seu crescimento.

5.4 Mecanismo de Ação

O ABA está envolvido em processos de desenvolvimento de respostas lentas (ex: maturação de sementes) bem como efeitos fisiológicos de respostas rápidas (ex: fechamento estomático). Os processos de respostas lentas inevitavelmente envolvem mudanças no padrão da expressão gênica. O ABA atua induzindo os genes do tipo ABRE (elementos de resposta ao ácido abscísico) e reprimindo os genes do tipo GARE (elementos de resposta às giberelinas) Enquanto as respostas fisiológicas rápidas envolvem, freqüentemente, alterações no fluxo de íons através das membranas da célula. As vias de transdução de sinal, as quais amplificam o sinal primário gerado quando o hormônio se liga ao receptor, são requeridas em todas as respostas relacionadas com o ABA, tanto as lentas como as rápidas.

Embora o ABA possa interagir diretamente com fosfolipídios de membrana, é amplamente aceito que o receptor de ABA é uma proteína. No entanto, até o momento a proteína receptora do ABA não foi identificada. Alguns experimentos têm sido realizados para determinar se o hormônio deve entrar na célula para ser efetivo ou se ele pode agir externamente ligando-se ao receptor na superfície externa da célula (plasmalema). Alguns resultados indicam que o receptor se encontra na superfície externa da célula, mais ainda existem controvérsias.

O efeito mais bem conhecido do ABA é a promoção do fechamento estomático. Em geral, a resposta das células-guarda ao ABA parece ser regulada por mais de uma via de transdução de sinal. Uma vez ligado ao receptor, o complexo ABA/receptor aciona três sinais distintos: aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico, aumento na concentração de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e variação do pH do citosol (Figura 47).

Observe a seguinte seqüência (Figura 47):

- O complexo do ABA/receptor (1) ativa canais de Ca^{2+} na membrana celular (2), favorecendo a absorção de cálcio pelas células-guardas;
- O complexo do ABA/receptor ativa canais de efluxo de cloreto (3), promovendo sua saída das células-guardas;
- O complexo do ABA/receptor também ativa uma proteína G, a qual provoca um aumento nos níveis de IP_3 (4). O aumento nos níveis de IP_3 provoca a liberação do Ca^{2+} do vacúolo (5), mediante a ativação de canais de cálcio no tonoplasto (membrana do vacúolo);
- Assim, o aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico deve-se à absorção via canais ativados por ABA (na membrana plasmática) e da liberação de Ca^{2+} dos compartimentos internos (vacúolos, RE e mitocôndrias);
- O aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico estimula a abertura de canais de efluxo de ânions (Cl^-) e inibe a abertura de canais de influxo de K^+ (6);
- O complexo do ABA/receptor também provoca o aumento no pH citosólico (7), o qual ativa os canais de efluxo de K^+ (8), que promovem a saída de K^+ das células-guardas para as células epidérmicas adjacentes e inibem a atividade ATPásica da membrana plasmática;

- O íon K^+ também deixa a célula em resposta à despolarização da membrana causada pelo efluxo de Cl^- ;
- A saída dos íons leva a um aumento no Ψ_s e, conseqüentemente, no Ψ_w das células-guardas. Com isso, a célula-guarda perde água para a sua vizinhança e, conseqüentemente, ocorre diminuição da sua turgescência e, finalmente, o **estômato fecha**.

1. O ABA liga-se ao seu receptor.

2. A ligação do ABA induz a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais ativam canais de Ca^{2+} da membrana plasmática.

3. O ABA aumenta os níveis do ADP-ribose cíclico e do IP_3 , os quais ativam canais de cálcio adicionais no tonoplasto.

4. O influxo do cálcio inicia oscilações de cálcio intracelular e promove a posterior liberação do cálcio dos vacúolos.

5. O aumento do cálcio intracelular bloqueia os canais K^+_{in} .

6. O aumento do cálcio intracelular promove a abertura do canal (ânion) Cl^-_{out} na membrana plasmática, causando a despolarização da membrana.

7. A bomba de próton da membrana plasmática é inibida pelo aumento do cálcio citosólico induzido pelo ABA e por um aumento intracelular do pH, despolarizando posteriormente a membrana.

8. A despolarização da membrana ativa canais K^+_{out} .

9. Para que o K^+ e as ânions saiam através da membrana plasmática, é necessário que sejam primeiro liberados dos vacúolos para o citosol.

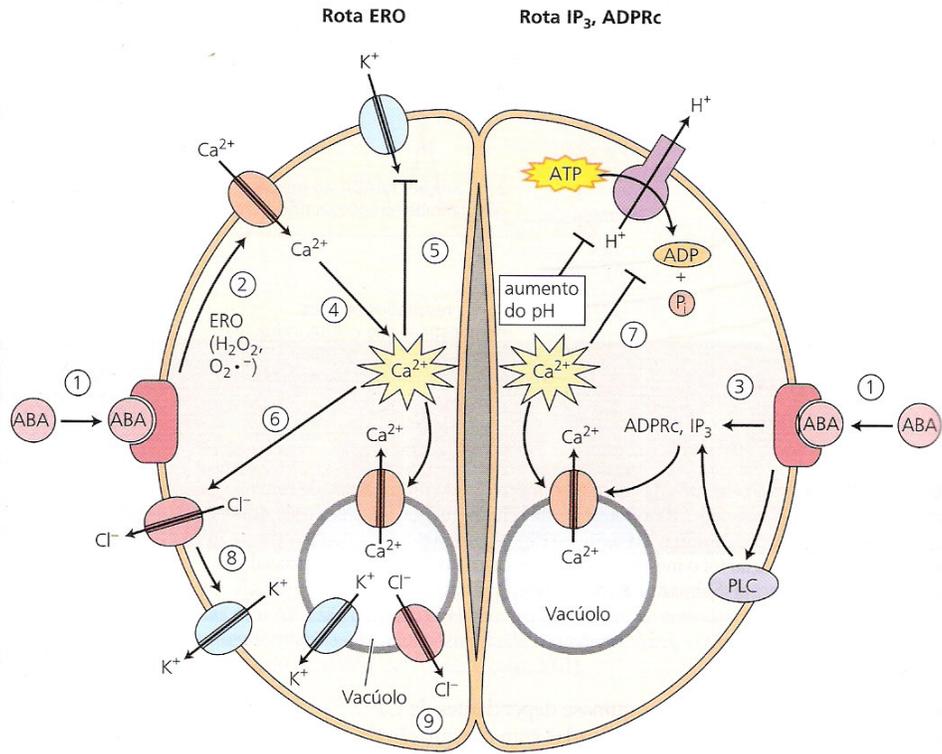


Figura 47- Modelo simplificado da sinalização do ABA nas células-guarda do estômato. O efeito resultante é a perda do potássio e de seu ânion (Cl^- ou $malato^{2-}$) da célula.

(R=receptor; ERO=espécies reativas de oxigênio; ADPRc = ADP-ribose cíclico; Proteína G= proteína que liga ao GTP; PLC = fosfolipase C.)

BIBLIOGRAFIA

- FERRI, M. G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal, volumes 1. e 2.** 2nd ed. São Paulo: EPU, 1985, 361p.
- HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology.** 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000, 512p.
- KENDE, H., ZEEVAART, J. A. D. The five “classical” plant hormones. **The Plant Cell**, **9**:1197-1210, 1997.
- SALISBURY, F. B., ROSS, C. W. **Plant Physiology.** 4th ed. California: Wadsworth Publishing Company, Inc., 1991, 682p.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology.** 1st ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1991, 559p.

ESTUDO DIRIGIDO Nº 10

UNIDADE: HORMÔNIOS E REGULADORES DE CRESCIMENTO
ASSUNTO: **CITOCININAS, ETILENO E ÁCIDO ABCÍSIKO.**

- 1 – A citocinina é uma substância reguladora do crescimento vegetal. Qual o seu papel no processo de divisão celular? Descreva.
- 2 – Quais as principais citocininas naturais e sintéticas? Qual a característica estrutural comum às citocininas e que parece ser determinante para a sua atividade hormonal?
- 3 – Quais os locais de síntese de citocininas nas plantas? Como elas são transportadas?
- 4 – Descreva o papel das citocininas nos seguintes processos:
 - Morfogênese em cultura de tecidos
 - Dominância apical
 - Senescência de folhas
- 5 – Como ocorreu a descoberta do Etileno?
- 6 – Qual o composto precursor do etileno em plantas superiores? Indique as etapas principais da sua biossíntese.
- 7 – Indique algumas alternativas para aumentar ou diminuir a biossíntese de etileno em órgãos vegetais.
- 8 – Qual o papel do Etileno nos seguintes processos:
 - Amadurecimento de frutos
 - Epinastia de folhas
 - Senescência de folhas e flores
 - Abscisão foliar
- 9 – Explique a utilização do etefon e do carbeto de cálcio (CaC_2) no florescimento de abacaxi e no amadurecimento de frutos de banana.
- 10 – Descreva resumidamente a respeito da química, metabolismo e transporte de ácido abscísico (ABA).
- 11 – Qual o papel do ABA nos seguintes processos?
 - Desenvolvimento de sementes;
 - Dormência de sementes;
 - Fechamento estomático.
- 12 – Explique o mecanismo de ação do ABA no fechamento estomático induzido pelo estresse hídrico.