

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS
INDUZIDAS POR RADIAÇÃO GAMA E CISTEINA
EM ERVILHA [*Pisum sativum* L.]**

ANTONIO BARIONI GUSMAN
LICENCIADO EM HISTÓRIA NATURAL

Prof. Assistente do Departamento de Biologia da Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Orientador : Prof. Dr. OTTO J. CROCOMO

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor

Piracicaba - São Paulo
Brasil - 1971

Em memória de Elisa,
minha irmã, a quem
devo meus estudos.

A meus pais, e a meus
irmãos dedico.

A G R A D E C I M E N T O S

No andamento do presente trabalho, inestimáveis esforços - de colaboração foram aplicados por diversas pessoas. Agradecimentos especiais e profundos deve ao Dr. OTTO J. CROCOMO, pela orientação e estímulo nos momentos mais difíceis e decisivos da pesquisa, e pelos três longos anos de dedicação a minha formação como pesquisador.

Particularmente agradeço:

- ao Engenheiro Agrônomo João Carlos de Oliveira pela colaboração no ajustamento da técnica enzimática;
- ao Dr. Darcy M. Silva pelas discussões esclarecedoras;
- ao Dr. Roland Venkovisky e Engenheiro Agrônomo Natal A. Vello pelas sugestões e colaboração nas análises e cálculos estatísticos dos dados;
- ao Dr. Clóvis de Oliveira Santos, pela colaboração no preparo das lâminas histológicas;
- ao Dr. Akihiko Ando pelas valiosas críticas e sugestões;
- ao Engenheiro Agrônomo Virgílio F. Nascimento Filho, no tocante à dosimetria.

Agradeço ainda às seguintes instituições:

- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, que facilitou minha estadia em Piracicaba para o desenvolvimento do presente trabalho.
- ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa de seu Diretor Dr. ADMAR CERVellini, onde a maior parte do trabalho foi realizada.
- ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - através da Prof. Catarina S. Takahashi facilitando o uso dos aparêlhos óticos.

- ao Departamento de Química da ESALQ, que facilitou o uso da Centrífuga refrigerada e espectrofotômetro Carl Zeiss PQ II.
- ao Instituto Agrônomo de Campinas - Seção de Hortaliças, pela sugestão da variedade de ervilha.

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Mecanismos de proteção envolvendo compostos sulfidrí- licos	3
2.2. Influência da radiação na atividade de peroxidase e proteínas	6
2.3. Sensitividade, inativação e proteção	8
2.4. Sementes e radicais livres	9
2.5. Peroxidase e cisteína como compostos de importância biológica	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Materiais	13
3.1.1. Sementes	13
3.1.2. Reagentes	13
3.1.3. Aplicação de radiação	13
3.1.4. Instrumentos e aparêlhos	13
3.2. Métodos	14
3.2.1. Porcentagem de germinação	14
3.2.2. Conteúdo de água nas sementes	14
3.2.3. Doses de radiação	14
3.2.4. Tratamentos	15
3.2.5. Administração da radiação e de cisteína	15
3.2.6. Semeadura	16
3.2.7. Coleta das sementes	16
3.2.8. Obtenção do extrato enzimático	16
3.2.9. Determinação da atividade de peroxidase	17
3.2.10. Determinação de proteínas solúveis	17
3.2.11. Medidas histológicas	17
3.3. Testes estatísticos	18
3.3.1. Peroxidase e proteína	18
3.3.2. Medidas histológicas	18

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da sensibilidade da semente e escolha das doses de trabalho	19
4.2. Atividade de peroxidase	19
4.2.1. Efeito da radiação	19
4.2.2. Efeito da cisteína	29
4.2.3. Efeito da radiação no tratamento R_1 , em relação ao controle R_0	29
4.2.4. Efeito combinado da cisteína e radiação no tratamento $R_1 + C$, em relação a R_0	29
4.2.5. Efeito da radiação no tratamento R_2 em relação ao controle R_0	29
4.2.6. Efeito combinado da cisteína e radiação no tratamento $R_2 + C$ em relação a R_0	30
4.3. Proteínas solúveis	30
4.3.1. Efeito de cisteína no conteúdo de proteínas solúveis nos controles	30
4.3.2. Efeito da radiação no conteúdo de proteínas solúveis no tratamento R_1 em relação ao controle R_0	30
4.3.3. Efeito combinado de cisteína e radiação gama em tratamentos $R_1 + C$, e R_0 para proteínas solúveis	34
4.3.4. Efeito de radiação gama no conteúdo de proteínas solúveis no tratamento R_2 em relação ao controle	34
4.3.5. Efeito combinado de cisteína e radiação gama no tratamento $R_2 + C$ comparado ao controle R_0	34
4.4. Medidas de regiões do caule nos diversos tratamentos	34
4.4.1. Medidas histológicas	38
4.4.2. Teste F e Teste Tukey	38

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito da cisteína	44
5.1.1. Efeito da cisteína no tratamento $R_0 + C$ sobre a atividade de peroxidase, proteína, e aumento de área transversal do estelo	44

5.1.2. Efeito da cisteína e radiação na área transversal do estelo	45
5.2. Efeito da radiação e da interação radiação x cisteína em proteínas solúveis, atividade de peroxidase, e crescimento transversal do estelo	46
6. CONCLUSÕES	53
7. RESUMO	54
8. BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS INDUCED BY GAMMA IRRADIATION AND CYSTEINE IN PEA SEEDLINGS (<u>Pisum sativum</u> L.).	
SUMMARY	56
9. BIBLIOGRAFIA	58
10. ÍNDICE DAS TABELAS	
1. Valôres obtidos nas determinações da atividade de peroxidase influenciada pela dose de radiação e valôres de proteínas no tubo de reação (primeira repetição).....	24
2. Valôres obtidos nas determinações da atividade de peroxidase influenciada pela dose de radiação e valôres de proteínas no tubo de reação (repetição realizada uma semana após a primeira)	25
3. Média dos valôres da atividade de peroxidase, expressa em D.O./0,3ml extrato/min.	26
4. Valôres de F para tratamentos (incluindo R_0 , R_0+C , R_1 , R_1+C , R_2 e R_2+C) para atividade de peroxidase	26
5. Valôres de F para tratamentos, efeito das duas doses de radiação R_1R_2 , de cisteína (C), e interação: radiação x cisteína (RXC)	27
6. Valôres percentuais, em relação à média do controle R_0 do efeito da radiação sobre a atividade de peroxidase.	28
7. Valôres obtidos nas determinações do conteúdo de proteínas solúveis influenciado pela dose de radiação e cisteína (primeira repetição)	31

8. Valores obtidos nas determinações de conteúdo de proteínas solúveis, influenciado pela dose de radiação e cisteína (repetição realizada uma semana após a primeira)	31
9. Média dos valores de proteínas solúveis	32
10. Valores de F para tratamentos incluindo R_0 , $R_0 + C$, $R_1 + C$, R_2 e $R_2 + C$, para proteínas solúveis	32
11. Valores de F para tratamentos, efeito das duas doses de radiação (R_1 e R_2) da cisteína (C) e interação radiação x cisteína ($R \times C$)	33
12.. Médias dos valores das medidas histológicas de metaxilema a metaxilema no tempo de 72 horas	41
13. Médias dos valores das medidas histológicas de distância entre fibras de floema no tempo de 72 horas	41
14. Valor de F para tratamentos (incluindo R_0 , $R_0 + C$, R_1 , $R_1 + C$, R_2 e $R_2 + C$), de medidas de distância metaxilema a metaxilema no tempo de 72 horas	42
15. D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey para $n = 6$ e $n' = 120$, nos tratamentos de medidas de distância metaxilema a metaxilema	42
16. Valor de F para tratamentos (incluindo R_0 , $R_0 + C$, R_1 , $R_1 + C$, R_2 , $R_2 + C$) das medidas: distância entre fibras de floema no tempo de 72 horas	43
17. D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey para $n = 6$ e $n' = 120$ nos tratamentos de medidas: distância entre fibras de floema	43
 11. INDICE DOS GRÁFICOS	
A. Efeito de diferentes doses de radiação gama sobre o conteúdo de matéria seca e comprimento do caule dos sobreviventes 15 dias após a irradiação	20
B. Efeito da cisteína ($R_0 + C$) sobre a atividade de peroxidase e conteúdo de proteínas solúveis, comparada com o controle R_0	21

C. Efeito da dose de radiação 5 Krad (R_1), e interação R_1 x C comparadas com o controle R_0 , na atividade de peroxidase e conteúdo de proteínas solúveis em intervalos de 12 horas durante 72 horas	22
D. Efeito da dose de radiação 35 Krad (R_2) e interação R_2 x C comparadas com o controle R_0 , na atividade de peroxidase e conteúdo de proteínas solúveis em intervalos de 12 horas, durante 72 horas	23
E. Efeito de cisteína, radiação e interação RxC sobre o tamanho da região transversal do estelo: distância entre metaxilemas polares opostas	39
F. Efeito de cisteína, radiação e interação RxC sobre o tamanho da região transversal do estelo: distância entre fibras de floema laterais	40

12. INDICE DAS FIGURAS

1. Asepcto geral do caule em corte transversal mostrando o estelo e feixes corticais	35
2. Detalhe das fibras de floema dispostas lateralmente ao metaxilema	36
3. Detalhe das fibras de floema polares opostas	37
4. Esquema hipotético de como a injúria celular, induzida pela radiação gama pode interferir com a expressão da informação genética na atividade metabólica e consequentemente, na forma e função da planta	51

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria dos estudos que utilizam a radiação ionizante e substâncias protetoras como instrumento de pesquisa, tem-se centrado em organismos como fungos, bactérias e animais, enquanto em plantas superiores pouca coisa tem sido realizada, a não ser aqueles estudos voltados aos aspectos de proteção contra quebras cromossômicas, fertilidade, herdabilidade, frequência de mutações e crescimento. Nêles não se nota a preocupação com a interferência da irradiação sobre os mecanismos fenogenéticos, que de alguma maneira bloqueia reações essenciais responsáveis pela expressão fenotípica característica do vegetal. O efeito da ação indireta da radiação - no caso de sementes em germinação podem envolver alterações em síntese de RNA, proteínas, enzimas, hormônios, pigmentos, etc., cujos estudos podem auxiliar na elucidação de muitos aspectos de regulação metabólica, mormente aqueles dependentes da ação enzimática.

As informações a respeito das consequências da inativação ou ativação de enzimas, são de grande importância para se estabelecer procedimentos de controle da sensibilização ou proteção de enzimas, levando a um melhor entendimento de processos que conduzem à regulação metabólica.

Muitos trabalhos têm sido realizado usando enzimas em solução, principalmente com as enzimas-SH, obtendo-se informações a respeito das alterações (metabólicas) que a perda de atividade enzimática por irradiação pode causar, e como os compostos sulfidrílicos podem protegê-los. Porém, em plantas durante períodos curtos após irradiação das sementes, a literatura não menciona estudos.

Vários pesquisadores que estudaram a presença de radicais livres em sementes após irradiação, têm relatado que os mesmos podem se acumular nas sementes por vários dias, principalmente nos embriões (CONGER e RANDOLPH, 1959); e ZIMMER et al. citados por HABER (1961); e CALDECOTT (1961), provocando injúrias fisiológicas na reação com o meio celular.

Sabe-se, por outro lado, que enzimas como peroxidase estão relacionadas com a diferenciação celular (MÜLLER 1969), e que peroxidase além de estar estritamente envolvida com tióis no sistema peroxidase/H₂O₂ (RANDALL 1946), há relação entre o nível desta enzima com o controle genético da morfologia da planta (MATHAN e COLE 1964) e MULLER (1969).

Com base nestas informações, desenvolvemos o presente trabalho, planejado com o objetivo de verificar a influência de duas doses de radiação em presença e ausência de cisteína na atividade enzimática de peroxidase, conteúdo de proteínas solúveis e no crescimento do caule de plantas de ervilha desenvolvidas durante três dias após a irradiação das sementes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mecanismos de Proteção envolvendo compostos sulfidrílicos

Baseando-se em pesquisas radioquímicas com sistemas químicos puros, DALE, 1940 (ELDJARN, 1965), praticamente inaugurou um mecanismo ou conceito de proteção química, conhecido hoje sob o nome de "Hipótese do Radical Scavenger". Interpretava o fenômeno como competição entre dois solutos pela água "ativada". Este efeito foi ressaltando nos trabalhos de ELDJARN et al. (1956) quando verificaram que "in vitro" a concentração de cisteamina, que podia capturar radicais livres em competição com a cisteamina do sôro humano, era de $1 \times 10^3 M$; essa concentração era próxima daquela obtida "in vivo". Esses autores não foram os pioneiros em verificar a ação protetora de compostos sulfidrílicos contra radiação, pois antes deles vários pesquisadores trabalhando com enzimas sulfidrílicas de ratos sob a ação de raios x e glutathione já haviam sugerido tal proteção (veja-se FORSSBERG 1953, ELDJARN e PIHL 1960, e GOUTIER e BACQ, 1963). Utilizando glutathione, MIKAELSEN (1952); cisteína FORSSBERG e NYBON, (1953), MIKAELSEN (1954) e RILEY (1957); AET (aminoetilisotiouronio) cisteína e cisteamina DALEN e OFTEBRO (1963); cisteína, cisteamina, e cistamina MIKAELSEN e PEDERSEN (1968), mostraram o efeito protetor destes compostos contra aberrações e quebras cromossômicas provocadas pela radiação. Por outro lado, YAMAGUCHI (1962) e ANDO (1971) trabalhando com sementes de arroz e fazendo tratamento com cisteína após irradiação, conseguiram recuperação de certos caracteres como fertilidade e altura das plantas. Também foi verificado que células de rato (PATT et al., 1949), e células vegetais (ARYA e HILDEBRANDT, 1969) podiam ser protegidas contra a radiação e manter a capacidade de divisão celular quando em presença respectivamente de cisteína e AET (aminoetilisotiouronio).

Outros pesquisadores, como BACQ e ALEXANDER (1964) têm observado "in vivo" a proteção por estes compostos através de mudanças fisiológicas em que cisteína, cisteamina e glutathione podem alterar mitocôndria e proteínas durante a proteção celular, contra a radiação. Também NAGY et al. (1968) verificaram que, por processo semelhante, a cisteína diminui a radiosensitividade em E. Coli.

LIBBY et al. (1961) constataram que cisteamina impede a

formação de radicais em albumina do soro-bovina enquanto ORMEROD e ALEXANDER (1962) observaram que nucleoproteínas sofrem reparo do dano causado pela radiação. As mesmas observações foram feitas por PIHL e SAMMER (1963) e HENRIKSEN et al. (1963) para proteínas. Substâncias como AET (Aminoetilisotiuronio) e GED (Dissulfeto 2-guanidoetil) têm mostrado serem eficientes em evitar os efeitos da radiação contra proteínas-SH (KOLMAN, et al., 1967). Outros pesquisadores (HUTCHINSON, 1968, BUTLER e ROBINS, 1962 e HANDY et al., 1969) demonstraram que cisteína pode proteger a atividade de certas enzimas sulfidrílicas.

Outro fator, que tem sido motivo de muitas pesquisas em radiobiologia, é a presença ou ausência de oxigênio na ação da radiação sobre células. A radiação, interferindo com o sistema de oxidação-redução celular, forma agentes de vida efêmera como OH^\cdot , HO_2 , H_2O_2 , reduzindo o oxigênio molecular. A formação de radicais letais é favorecida pela presença do oxigênio (FORSSBERG 1953), e segundo ALPER (1960), diminuindo a tensão do oxigênio, aumenta-se a resistência da célula à radiação. Por outro lado KØLMARK (1965) estudando o efeito da radiação em fungos, mostrou que condições de anoxia protegeram conídios de Neurospora crassa, sem recorrer a protetores químicos; também YAMAGUCHI (1962) observou que em condições de anoxia a cisteína é mais eficiente contra o efeito das radiações, enquanto SCHWARTZ e RICHARDSON (1967), usando cisteamina, verificaram que o efeito protetor em bactérias e levedura não dependia inteiramente da presença ou ausência de oxigênio. Contrariamente GRAY (1956) - (cf. ELDJARN e PIHL, 1960), obteve evidências de que cisteína age como protetor porque provocou anoxia num meio com células vegetais em suspensão, removendo o oxigênio por oxidação. Porém MIKAELSEN (1968) e MIKAELSEN e PEDERSEN (1968) e AHNSTROM e MIKAELSEN (1965), trabalhando com cisteína, cistamina e cisteamina, e quebras cromossômicas provocadas por radiação em raízes vegetais, concluíram que o oxigênio pode reagir com os produtos iniciais das lesões e impedir reparos, e que os compostos sulfidrílicos podem competir com O_2 por radicais, reparando a molécula injuriada antes que reaja com oxigênio.

Esta via de proteção é comumente incluída na "Teoria do Reparo de Moléculas Vitais Ativadas", proposta por CHARLESBY e ALEXAN

DER (1965) (cf. ELDJARN e ALEXANDER, 1966), e mais tarde comprovada por HENRIKSEN et al., (1963) através do processo "electron spin resonance" (ESR), reações de transferência de hidrogênio, esclarecendo que há um intervalo de tempo definido antes que os radicais "target" se tornem estáveis por reações intramoleculares ou interações com o meio. Este intervalo entre a excitação da molécula, e a ocorrência da estabilização (destrutiva) é chamada "methionin phase", na qual os compostos sulfidrílicos exerceriam ação protetora, evitando dano molecular antes que a reação reversível ocorra).

Além da competição oxigênio/compostos - SH, ocorre ainda - nas células competição entre moléculas de água, oxigênio, e substâncias sulfidrílicas pela reação com os radicais induzidos pela radiação. (KAMRA, et al. 1960a, 1960b e NILAN et al., 1961).

O conteúdo de água nas sementes é fator de importância nos efeitos radiobiológicos, além do oxigênio. Pesquisas nêsse sentido têm mostrado as interrelações entre umidade e desenvolvimento de efeitos posteriores em sementes irradiadas. NYBON et al., (1952), - EBRENBURG et al. (1954) (in NYLAN, 1961), e PATT et al. (1953) verificaram que a radioresistência em sementes diminui com o aumento do seu conteúdo aquoso, mas não levaram em conta o efeito do oxigênio além dos efeitos provocados pela radiação. Porém CURTIS (1958), e CALDECOTT et al. (1957) verificaram que sementes sêcas com 4 a 5% - do conteúdo de água se tornaram mais radiosensíveis que aquelas contendo 6 a 20%, quando hidratadas em presença de oxigênio após a irradiação, interpretando-se que nos níveis 6-20% há água suficiente na semente para facilitar a hidratação dos radicais livres e intervir na ação do oxigênio, enquanto em níveis de 4-5% de conteúdo de água, embora haja água necessária para dissolver o oxigênio nas células, não ocorrem radicais suficientemente hidratados, ficando os mesmos disponíveis para a reação com o oxigênio provocando danos. - Dessa maneira, em sementes com alto teor de água (6-20%), o oxigênio está presente durante a irradiação, levando a efeitos facilmente observáveis, enquanto em sementes muito sêcas (abaixo de 3%) o efeito do oxigênio não se manifesta por não haver água para sua difusão; os radicais livres ficam então em "estado sólido", até que pela hidratação da semente na presença de oxigênio ocorra a reação O_2 - radicais e efeitos injuriosos (NILAN et al., 1961).

Dêsse modo, nas sementes que sofrem ação das radiações ionizantes há competição entre as moléculas de água, oxigênio, e substância sulfidrílica pela reação com os radicais induzidos. Os compostos -SH e água impedem o dano biológico pela irradiação (devido a formação de combinações estabilizadoras), enquanto o oxigênio aumenta a injúria celular.

Outra importante prova de que os compostos SH são radioprotetores foi dada pelos trabalhos de KAMRA et al., (1960a) e KAMRA et al. (1960b), mostrando que sementes embebidas por longos períodos são muito injuriadas pela radiação, sugerindo assim acontecer - devido à lavagem de compostos -SH e aminoácidos sofrida pela semente, além do aumento da concorrência pelo oxigênio. Ao lado de todas as vias de ação dos radioprotetores sulfidrílicos anteriormente discutidos, está a hipótese do "bissulfeto misto" proposta por ELDJARN and PIHL (1960). Segundo essa hipótese, após a irradiação, grupos -SH e -SS das proteínas do meio celular são afetados e se convertem à forma de "dissulfeto misto" na presença de agentes protetores sulfidrílicos ou dissulfídicos, como cisteamina (CSH) e cistamina (CSSC), forma particular de concentração dissulfídica que daria à estrutura química das moléculas do meio, uma capacidade de proteção "in vivo". Porém, segundo observações in BACQ e ALEXANDER (1966a) em condições "in vitro", os protetores SH têm-se mostrado excelentes removedores de radicais, reparadores por transferência de H, protegendo DNA e proteínas que não apresentam grupo -SS e -SH. Essas observações são confirmadas por GINSBERG e WESTER (1969) para DNA.

2.2. Influência da radiação na atividade de peroxidase e proteínas

A literatura não apresenta especificamente dados sobre a influência da radiação na atividade de peroxidase em plantas, particularmente no que se refere a sementes ou "seedlings" irradiados. Porém, de maneira geral a inativação de moléculas biológicas, como a atividade de uma enzima, pelas radiações ionizantes pode ser conseguida:

- a. por alterações provocadas por absorção de energia pela própria molécula que se torna excitada ou ionizada (ação direta), ou

b. recebendo energia por transferência através de outras moléculas (ação indireta).

A energia absorvida por constituintes do meio celular, como a água, pode levar à formação de radicais reativos que interagem com os compostos celulares.

A contribuição dêste dois mecanismos ao dano celular está ligada não só ao tipo de proteína como também a sua geometria de posição na célula e ambiente microscópico (SANNER e PIHL, 1969); HUTCHINSON, 1968). A ação direta das radiações ionizantes têm sido estudada principalmente por POLLARD et al. (1955) os quais através de preparações enzimáticas em estado sêco, acompanharam a atividade enzimática após irradiações sem interferência dos efeitos da ação indireta. Nestas condições, a perda da atividade biológica das enzimas, está relacionada com ruptura de pontes de hidrogênio, quebras de moléculas, as quais podem novamente se unir ou se dissociar em unidades menores ou ser fragmentadas por cisão de ligações polipeptídicas. Porém, relativamente pouco se conhece sôbre o dano específico responsável pela inativação de enzimas irradiadas em estado sêco (SANNER e PIHL, 1969).

BACQ e ALEXANDER (1966a), SANNER e PIHL (1969) e HUTCHINSON (1968) afirmam que a inativação de enzimas, seja no estado sêco ou em solução, é em grande número, e seria desnecessário citá-las, uma vez que são enzimas não correlatas com aquela de nosso trabalho. Podemos generalizar entretanto que do ponto de vista da inativação de enzimas em soluções aquosas, considera-se que os radicais OH^\cdot parecem ser os mais envolvidos, e que a maioria das alterações que levam às inativações, como destruição do lugar ativo, desnaturação, ou ambos, estão associadas com mudanças na constante de MICKAELES e MENTEN (SANNER e PIHL, 1969). Podemos pois acrescentar que consequentemente poderia resultar efeitos em sistemas enzimáticos responsáveis pela coordenação do crescimento, como aquêles ligados a oxi-redução, e inibição de hormônios como citaremos mais adiante.

Quanto aos estudos referentes à análise de alteração do conteúdo de proteínas de "seedlings" em desenvolvimento a partir de sementes irradiadas, não se tem muita informação bibliográfica. Alguns casos esparsos como aquêles de JOSHI e LEDOUX (1970), que estu-

dando o dano da radiação em "seedlings" com 8 dias de idade, verificaram que o conteúdo de proteínas é inversamente influenciado pela dose de radiação enquanto que MIKAELSEN (1967)(cf. JOSHI e LEDOUX, 1970) encontrou uma redução no conteúdo de DNA e síntese de proteínas em "seedlings" de cevada, de quatro dias de idade como resposta à irradiação de sementes por neutrons.

BAJAJ (1970) em experimentos realizados com callus de Phaseolus vulgaris L. submetido a várias doses de radiação revelaram que em baixas doses (0,5 Krad) o crescimento da cultura foi estimulado como também o conteúdo de proteínas solúveis e RNA. Ainda afirma o mesmo autor que muitos autores trabalhando com embriões não mostraram dados consistentes sobre o efeito da irradiação em DNA, proteínas e nitrogênio, observando por outro lado, que todos encontraram seja diminuição muito pequena seja aumento no nível destes compostos.

Do ponto de vista de crescimento celular, CHERRY (1962) - trabalhando com sementes de milho irradiadas com raios x, verificou inibição de divisão celular em raízes e aparentemente nenhum efeito na expansão celular, afirmando que o crescimento dos "seedlings" foi devido primariamente à expansão de células pré-existentes no embrião. Por outro lado, observou que as raízes desenvolvidas após irradiação se tornaram mais grossas, e com maior número de células por secção transversal que as normais.

2.3. Sensitividade, inativação e proteção

A alteração intrínseca da radiosensitividade por modificação química tem sido demonstrada em enzimas sulfidrílicas onde à destruição de grupos SH conduz a inativação da enzima, ou à destruição do sitio ativo.

A intensidade desta inativação está ligada entretanto a - sensitividade dos diferentes grupos SH que atacam os radicais da gua, e ao número de grupos sulfidrílicos que devem ser destruídos antes da inibição da atividade (como por exemplo papaina perde atividade se um grupo SH é destruído, enquanto desidrogenase de 3 fosfo-gliceraldeído exige destruição de três (SAMMER e PIHL, 1969). Porém, como já vimos em 2.1. ELDJARN e PIHL (1960), revelam que exis-

te uma ação protetiva dos compostos SH em sistemas biológicos, devido à formação de "dissulfeto misto".

Os protetores sulfidrílicos apresentam certa universalidade de ação, mostrando-se eficientes tanto "in vitro" como "in vivo", e não só em enzimas sulfidrílicas. Cisteamina (GINOZÁ e NORMAN, 1957). ALEXANDER (1962), e cisteína (NAGY et al., 1968), protegem DNA, e cisteamina JUNG (1967) (cf. SANNER e PIHL, 1969) protege ribonuclease, embora DNA e RNase não contenham grupos SH. É conhecido também que albumina do sorobovina, embora tenha grupo SH, é bem protegida por cisteamina, e no entanto não se detectou ligação - SS - (BACQ e ALEXANDER, 1961 e 1966b).

Além disso, muitas enzimas apresentam grupo prostético que são essenciais para sua atividade, como é o caso de catalase, peroxidase, hemoglobina, e citocromo que apresentam como grupo prostético estrutura do grupo porfirina, as quais podem ser alteradas por raios x em soluções aquosas (BACQ e ALEXANDER, 1966c). Radicais livres da água por exemplo, quando atingem o sitio ativo de enzimas - como catalase provocam inativação (SUTTON, 1956).

Explicação definitiva para os processos que conduzem à recuperação ou reparo das macromoléculas pelos compostos SH, ainda não está bem estabelecida.

2.4. Sementes e radicais livres

É conhecido que a radiosensitividade de sementes atinge máximos em altos teores (14-20%) e baixos teores (1-3%) de umidade, sendo mínima em níveis intermediários (NOTANI et al., 1962). Os trabalhos de ZIMMER et al., 1957 (cf. MALCOM et al., 1961), e de CALDECOTT, 1961, e de CONGER e RANDOLPH, 1959, mostram que radicais livres foram detectados em embriões de sementes irradiadas, os quais podem persistir por vários dias. Por outro lado, MALCOM et al., (1961), verificaram que 85% dos radicais livres originados pela radiação se encontravam nos embriões.

Também verificou-se que sementes com conteúdo d'água de 16% quando comparada com sementes de 4% mostravam maior exigência de oxigênio (CALDECOTT, 1954) demonstrando atividade metabólica alta, e conseqüentemente mais sujeitas à injúria pela radiação. Aliás

NYBON et al., (1952) e EHRENBERG e NYBON, (1954) (cf. ANDO, 1971), observaram que sementes com maiores teores de água são mais radio--sensíveis, apresentando maiores danos fisiológicos após a irradia--ção.

Assim, pelo que já foi discutido em 2.1. sôbre os mecanis--mos de proteção e ação de radiação no meio celular, podemos depreen--der que os radicais formados como consequência da irradiação em em--briões, podem atuar sôbre moléculas biológicamente ativas como pro--teínas ou reagirem com substâncias protetoras, ou H_2O , ou ainda ori--ginando compostos secundários mais reativos, como peróxidos, em pre--sença de oxigênio. Sem dúvida, a consequência será a alteração da dinâmica metabólica normal do embrião em desenvolvimento.

2.5. Peroxidase e cisteína como compostos de importância biolo--gica

A função e significância fisiológica das isoenzimas de pe--roxidases não são ainda conhecidas. Vários trabalhos se referem à importância da peroxidase na ação dos hormônios vegetais como AIA (SHANNON, 1968), estando implicada na regulação do crescimento e di--ferenciação celular (GALSTON e DALBERG, 1954); EVANS e MATHAN, 1962, MATHAN, 1965 (cf. MULLER, 1969); SHANNON 1968). Por outro lado - OCKERSE et al. (1966), aplicando AIA (ácido indolacético) em plan--tas de ervilha, reprimiram a atividade de peroxidase (cf. SHANNON, 1968). A alteração do nível de peroxidase parece regular o nível de AIA na planta (MULLER, 1969) e ser controlada pelo uso de Gibere--linas (MACCUNE e GALSTON, 1959). Ainda SIELGEL e GALSTON (1967) ve--rificaram que a remoção do grupo heme da peroxidase de rabano sil--vestre resulta em uma apoenzima que possui atividade de oxidase do AIA. Além disso, conforme refere MULLER, (1969) as peroxidases pa--recem estar envolvidas no processo respiratório e oxidação de áci--dos graxos.

É conhecida também a ação inativadora da peroxidase sôbre outras enzimas como amilase e invertase se no meio não existir -- grupos SH (amilase não é influenciada pela presença de grupos SH no meio). Considera-se o processo de inativação como um provável meca--nismo de contrôle da atividade de proteínas (SIZER, 1953).

Por outro lado, em caso de fatores ambientais, a peroxidase está estritamente ligada à resistência, aumentando em muitos casos sua atividade enzimática em situação intracelular patológica (FERHMANN et al., 1967).

Nêstes processos de regulação metabólica que envolvem várias atividades enzimáticas inclusive a de peroxidase, a presença de tióis no meio celular é de grande importância no destino dos acontecimentos biológicos como veremos a seguir.

Na revisão feita por GUZMAN BARRON (1951) encontra-se que tanto os tióis solúveis (principalmente glutathione) como os que fazem parte de proteínas (enzimas sulfidrílicas), são de importância nos processos catabólicos e anabólicos celulares. Os tióis solúveis são, considerados sistemas de oxi-redução reversíveis de potencial muito negativo, têm papel importante na manutenção do "steady state" e regulação dos processos energéticos celulares. Por outro lado grande número de enzimas hidrolíticas como amilase, de oxiredução como oxidase do piruvato, de transferência de energia como fosforilase, tôdas essenciais ao metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos, contém grupos SH. Particularmente podemos citar as hexoquinases e desidrogenases, cujas atividades na transformação de açúcares na respiração dependem do grupo SH; como também o caso de COA cuja ação sobre o metabolismo que leva à oxidação de ácidos graxos e biossíntese de proteínas a partir de aminoácidos depende do grupo sulfidrílico na molécula (cf. MALAVOLTA, 1971). É sabido que tanto os tióis solúveis como os fixos tomam parte em processos que levam à divisão e crescimento celular. Embora o mecanismo de ação dos tióis neste particular seja desconhecido, verificou-se que "seedlings" durante a germinação, aumentavam o conteúdo de glutathione, e que em ovos de ouriço do mar, logo depois da divisão celular ter sido bloqueada a adição de cisteína reativava a mitose. Os tióis podem ser oxidados por grande número de oxidantes. H_2O_2 é um dos oxidantes mais conhecidos e tem sido utilizado nos métodos para a determinação da velocidade de oxidação de cisteína. Quando se irradia um meio aquoso, a redução do oxigênio molecular pode originar três poderosos agentes oxidantes: os radicais OH, HO_2 e H_2O_2 . Os tióis podem facilmente ser oxidados por êsses radicais, principalmente os tióis ligados a proteínas (enzimas sulfidrílicas) tais como: desi-

drogenase do gliceraldeído, desidrogenase succinica, e ATPase, as quais são inibidas. Esta inibição pode ser impedida quando se adiciona glutathione. (BARRON, 1949, 1954, in GOUTIER e BACQ (1963). PATT et al., (1949) verificaram que injetando ratos com cisteína e glutathione podiam protegê-los contra ação letal de raios x reforçando então a afirmação de BARRON sobre o efeito protetivo encontrado para aquêles compostos.

Outro fato interessante que liga os tióis com enzimas, é a propriedade que os compostos sulfidrílicos como glutathione, cisteína e tiourea possuem, de reduzir compostos que produzem cor pela ação de peroxidase e peróxido de hidrogênio sobre substratos como - pirogalol, guaicol, benzidina e p-fenilenediamina. Baseado nisso RANDALL(1946) verificou que a inibição provocada pelos tióis sobre a atividade de peroxidase, que se sabia existir, era apenas aparente, pois demonstrou que aos compostos acima citados eram oxidados - pelo peróxido de hidrogênio, removendo-os como reagentes do sistema peroxidase, ou seja podiam reduzir os compostos que iriam produzir cor do sistema; funcionando como substratos para o sistema peroxidase/H₂O₂.

Por outro lado BETZ, (1960) (cf. STONIER et al., 1970), verificou que a capacidade redutora de cisteína conduz a inibição da ação oxidativa catalizada por peroxidase sobre ácido indolacético - STONIER et al., (1970) observam que os antioxidantes protetores de auxina são na realidade reguladores fenólicos que estão relacionados com o aumento de tióis que participam na inibição do processo - de oxidação do AIA. Acrescentam baseados no que foi relatado, que êste tipo de regulação que envolve compostos SH, peroxidase e oxidação de AIA, provavelmente constitui um pré-requisito no processo da divisão e crescimento celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Sementes: (Pisum sativum var. Perfectah IAC-170)

Foram usados sementes morfológica e geneticamente uniformes de ervilha (Pisum sativum var. Perfectah IAC-170) cujos caracteres mais importantes, dentro dos padrões para sementes no Boletim da CATI-1970, são os seguintes: pureza (% mínima) 98%, germinação (% mínima) 85% umidade (% mínima) 12%.

3.1.2. Reagentes

- a. Substâncias sulfidrílicas - cloridrato de DL-Lis-teína H_2O (Nutritional Biochemical corporation).
- b. Ensaio enzimático - para as determinações da atividade enzimática foram usados: pirogalol, H_2O_2 , tampão fosfato.
- c. Proteínas solúveis - $CaSO_4 \cdot 5H_2O$, K_2CO_3 , NaOH, ácido tricloroacético, sero-albumina bovina.

Todos os reagentes utilizados eram produtos analíticos E. Merck G ou J.T. Baker.

3.1.3. Aplicação de radiação

Para os tratamentos com radiação foi utilizada uma fonte de Cobalto (^{60}Co) como fonte de raios gama, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), ESALQ-USP - Piracicaba.

3.1.4. Instrumentos e aparêlhos

Câmara de germinação e crescimento: Growth Lab., PW. 132 - Perával, USA., do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) - ESALQ-USP - Piracicaba, munida de controle de temperatura e umidade.

As centrifugações foram feitas em centrífuga refrigerada: - International Refrigerated Centrifuge, modelo PR-2 do Departamento de Química, ESALQ-USP - Piracicaba.

Os cortes histológicos foram obtidos em micrótomo para parafina, pertencente ao Departamento de Botânica, ESALQ-USP - Piracicaba.

Nas medidas dos cortes histológicos foi usado microscópio

Zeiss Winkel, e lente graduada, ambos do Departamento de Genética - da Faculdade de Medicina, USP-Ribeirão Preto.

Foram utilizados fotomicroscópio, e câmara clara para obtenção respectivamente de fotografia e desenhos, do Departamento de Genética de Medicina, USP-Ribeirão Preto.

3.2. Métodos

3.2.1. Porcentagem de germinação

A determinação da % de germinação foi feita com quatro repetições, em placas de Petri contendo vinte sementes cada uma, mantidas à temperatura de 25,5°C. Foi encontrado 78,5% de germinação em 15.04.70. Foi adotado como critério de germinação o rompimento da testa com ereção do caulículo após 3 dias. As sementes adquiridas para nosso trabalho sempre foram acondicionadas em sacos plásticos e conservadas à temperatura de 22°C.

3.2.2. Conteúdo de água nas sementes

Em 15.04.70 as sementes após serem pesadas foram colocadas em estufa a 100°C e pesadas diariamente até peso constante. Foram usadas 6 (seis) repetições com trinta sementes cada uma. O conteúdo em água foi de 13,68%.

3.2.3. Doses de radiação

Foram selecionadas sementes quanto à uniformidade de aspecto, vigor e tamanho. 25 sementes foram colocadas em um disco de isopor e distribuídas em um círculo, distando 30 cm. do centro de radiação e adaptado coaxialmente à abertura circular de onde emerge o cilindro irradiador da bomba de ^{60}Co . A intensidade de dose nesta distância foi de 10,5 Krad/hora para cada dose empregada. As doses irradiadas foram 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 Krad.

Após a irradiação, as sementes foram deixadas em embebição durante quatro horas em um volume de água pré-estabelecido. Vinte e cinco sementes de cada dose convenientemente semeadas em areia grossa, em nove caixas de madeira, permaneceram em câmara de germinação e crescimento à temperatura de 25,5°C e regadas com água durante quinze dias.

Foram seguidos dois critérios para a determinação do efeito das diferentes doses de radiação sobre as plantas.

- a. medidas do comprimento do caule a partir do ponto de inserção dos cotilédones ao primeiro nó, nas plantas sobreviventes em todas as doses.
- b. determinação do peso seco de todas as plantas sobreviventes nas nove doses, com exceção dos cotilédones.

Justificamos o uso deste critério, e não o da porcentagem de sobreviventes pelo fato de que, em doses baixas, o número de indivíduos pode diminuir, embora a elongação e massa se desviem deste comportamento fisiológico.

As curvas demonstrativas do efeito das doses encontram-se no gráfico A.

Escolhemos as doses 5 Krad e 35 Krad que estimularam e depressiram o desenvolvimento, respectivamente.

3.2.4. Tratamentos

Foram estabelecidas as seguintes combinações entre as doses de 5 Krad, 35 Krad e cisteína na concentração de $1 \times 10^{-3}M$:

R_0 : (contrôle) - sementes não irradiadas e não tratadas com cisteína.

$R_0 + C$: (contrôle) - sementes não irradiadas e tratadas com cisteína

R_1 : - sementes irradiadas 5 Krad e não tratadas com cisteína

$R_1 + C$ - sementes irradiadas 5 Krad e tratadas com cisteína.

R_2 : - sementes irradiadas 35 Krad e não tratadas com cisteína.

$R_2 + C$: - sementes irradiadas 35 Krad e tratadas com cisteína.

3.2.5. Administração da radiação e de cisteína

a. Radiação

Para os ensaios de atividade enzimática, determinação de proteínas solúveis, e cortes histológicos as sementes foram selecionadas individualmente, utilizando-se das seguintes características -

macroscópicas: vigor, aparência e tamanho, a fim de se obter uniformidade. Este instrumento qualitativo foi escolhido a fim de se evitar possíveis diferenças de massa na absorção de energia, e eventuais contrastes de respostas nos níveis fisiológico e bioquímico.

As sementes de tratamentos R_1 e R_2 foram colocadas em frascos especiais de plástico, que em suportes rotatórios a 25 cm da fonte receberam 5 Krad e 35 Krad, sendo a intensidade de dose igual a 10,5 Krad/hora. Terminada a exposição à radiação, eram imediatamente imersas em água ou solução de cisteína $1 \times 10^{-3}M$, e mantidas nestas condições durante 4:00 horas.

b. Cisteína

720 sementes irradiadas e não irradiadas foram distribuídas uniformemente, em 2 lotes de 320 sementes para cada tratamento, em placas de Petri, recebendo 35 ml. de água ou 35 ml. de solução de cisteína $1 \times 10^{-3}M$. Após quatro horas de embebição toda água ou solução havia sido absorvida com entumescimento ideal para a semeadura.

3.2.6. Semeadura

As sementes foram em seguida semeadas em areia grossa umida, contida em caixas de madeira e mantidas em câmara de crescimento à temperatura de $25,5^{\circ}C$. A rega era feita sistematicamente às 20 horas, 0 horas, 8 horas e 12 horas.

3.2.7. Coleta das Sementes

Para todos os tratamentos, colheram-se as sementes em intervalos de 12 horas após a semeadura, durante três dias. Em cada colheita as sementes eram rapidamente lavadas, os embriões extirpados secos em papel de filtro, pesados e mantidos dentro de beakers imersos meio corpo em cubas de isopor contendo gelo moído, até o momento da extração.

3.2.8. Obtenção do extrato enzimático

1,0g de material grêscó foi extraído com areia e 10,0 ml. de tampão fosfato 0,67M, pH 6,8, durante 2 minutos em almofariz mantido em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 10 000 r.p.m., 20 min., a $4^{\circ}C$. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de

ensaio previamente imersos em gelo. Cada tratamento, na concentração inicial de 1:10 foi transferido para sala mantida a 22°C, diluído à 1:50, esperando-se 5 minutos para estabilização da temperatura.

3.2.9. Determinação da atividade de peroxidase

Baseados em MC CUNE e GALSTON (1959) e ensaios preliminares, foram utilizados 0,3 ml. do extrato enzimático (diluição de 1:50), 0,2 ml de pirogalol (0,2M) e tampão fosfato suficiente para completar o volume de 9,0 ml. No tempo zero adicionou-se 1,0 ml de H_2O_2 $1 \times 10^{-3}M$ ao tubo de ensaio, agitando-se rapidamente e transferindo-se para o tubo de fotocolorímetro.

A formação progressiva da cor foi acompanhada em intervalos de 15 segundos até 2 minutos, lendo-se as transmitâncias.

A atividade enzimática foi calculada tomando-se a diferença entre a leitura a 15 segundos e 45 segundos, e multiplicando-se o valor por dois. Essa atividade foi expressa em D.O./0,3 ml. extrato/min. Os substratos H_2O_2 e pirogalol foram preparados no momento do ensaio em tampão fosfato gelado, e deixados para equilíbrio a 22°C. As concentrações utilizadas foram ensaiadas previamente com sementes e "seedlings" a fim de se verificar a região linear de trabalho.

3.2.10. Determinação de proteínas solúveis

A técnica utilizada foi a do microbiureto modificada de ITZHAKI e GILL (1964) por CALDAS (1970). 0,1 ml. do extrato 1:10 foi precipitada em 3,0 ml. de TGA 5%, a 4°C em geladeira, durante 1 hora, seguida por centrifugação a 3 000 r.p.m. 5 min. O sobrenadante foi decantado e os tubos permaneceram emborcados sobre papel de filtro na geladeira até secagem completa do precipitado, o qual então foi dissolvido em 1,0 ml. de K_2CO_3 5,6%, e 2,0 ml. do reagente de microbiureto. Os tubos foram tapados e deixado à noite mantidos a 4°C durante uma noite.

As medidas foram feitas em espectrofotômetro Carl Zeiss a 310nm, e a quantidade de proteína calculada em função de reta padrão feita com soro-albumina bovina.

3.2.11. Medidas histológicas

Em cada tratamento de plantas, com 72 horas de idade consi

derando-se a distância de 0,5 cm acima do ponto de inserção dos cotiledões, foram colhidas três amostras de 0,5cm do caulículo de cada repetição. Cada amostra foi fixada, incluída em parafina e cortadas em micrótomo na espessura de 12 u, utilizando-se a técnica convencional. Dos cortes, obtidos das três repetições por tratamento, desprezamos aqueles das extremidades das fitas de parafina, aproveitando-se os mais centrais, que foram distribuídos em número de 40 em cada lâmina de uma série de 12 lâminas.

Dos cortes aumentados 125x tomamos medidas no cilindro central, nas seguintes regiões:

- a. distância entre fibras de floema laterais ao metaxilema e Figura 1, letra B.
- b. distância do meta a metaxilema conforme ilustrado na Figura 1, letra A, tomando como ponto de referência o pacote de fibras corticais mais afastado do estelo.

As medidas foram representadas pelos valores absolutos da escala graduada da ocular.

As Figuras 2 e 3 e detalhes das regiões A e B (da Figura 1) medidas, foram obtidas em câmara clara acoplada a microscópio Zeiss.

Na Figura 1 está representado o corte transversal do caule, indicando as regiões utilizadas para as medidas e detalhes destas regiões, a fim de facilitar a compreensão e localização das regiões do estelo, medidas nos cortes histológicos de todos os tratamentos.

3.3. Testes estatísticos

3.3.1. Peroxidase e Proteína

Com a finalidade de se verificar o efeito geral nos tratamentos, e as possíveis interações foi feito o teste F para verificar a significância da ação da irradiação, e de cisteína nos diversos tratamentos para cada tempo, e as significâncias do efeito de cisteína (C), e irradiação (R) isoladamente, e interação (RxC) para cada tempo. Para o cálculo do valor de F desta análise foi utilizado o quadrado médio do resíduo do primeiro teste.

3.3.2. Medidas histológicas

Foi aplicado o teste F comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste Tukey (PIMENTEL GOMES, 1963).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente experimento serão apresentados a seguir. Inicialmente apresentaremos o gráfico obtido para a escolha das doses de trabalho, em seguida, os dados relativos à proteínas solúveis e finalmente aqueles relacionados com os cortes histológicos do caule.

4.1. Determinação da sensibilidade da semente e escolha das doses de trabalho

No gráfico A estão representadas duas curvas que expressam o efeito do aumento de dose no decréscimo de matéria sêca, e altura a partir do ponto de inserção dos cotiledones ao primeiro nó das plantas sobreviventes.

Pelo gráfico A verifica-se que as doses 5 Krad, e 35 Krad são respectivamente estimulantes e depressoras do crescimento (sobrevivência), 15 dias após a irradiação.

4.2. Atividade de peroxidase

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores obtidos nas determinações da atividade de peroxidase, influenciada pela dose de radiação e cisteína e o conteúdo de proteína no tubo de reação. As repetições foram realizadas com um intervalo de uma semana. Na Tabela 3 estão as médias desses valores, com os quais se fez a análise estatística. Os valores de F para tratamentos estão na Tabela 4, enquanto que a Tabela 5 apresenta os valores de F para tratamentos, e efeito das duas doses de radiação ($R_1 R_2$), de cisteína (C), e interação $R \times C$.

4.2.1. Efeito da radiação

A Tabela 5 mostra que de maneira geral houve efeito significativo nos tratamentos com cisteína e interações $R \times C$. Estatisticamente não houve significância para o efeito da radiação isoladamente nas duas doses. Porém, como pode ser visto no gráfico B (contrôle) e curvas 2 e 3 (R_1 e R_2 respectivamente) dos gráficos C e D realmente ocorreram variações como resposta às irradiações. Aliás dados da Tabela 6, mostram a veracidade dessa assertiva. Essa tabela foi calculada, considerando-se a média do controle R_0 como nível 100%.

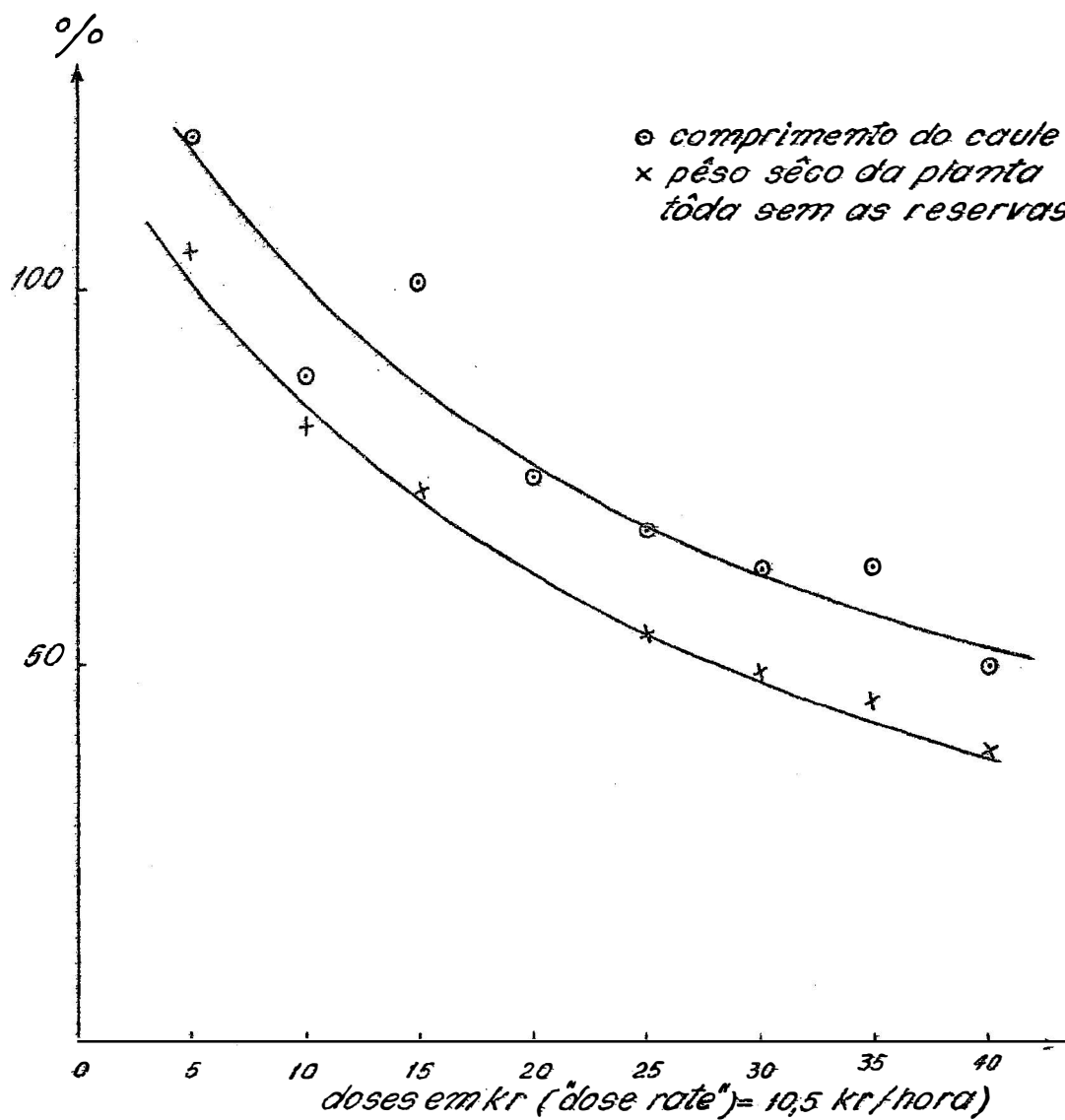


Gráfico A -

Efeito de diferentes doses de radiação
 gama sobre o conteúdo de matéria seca e
 comprimento do caule das sobreviventes,
 15 dias após a irradiação.

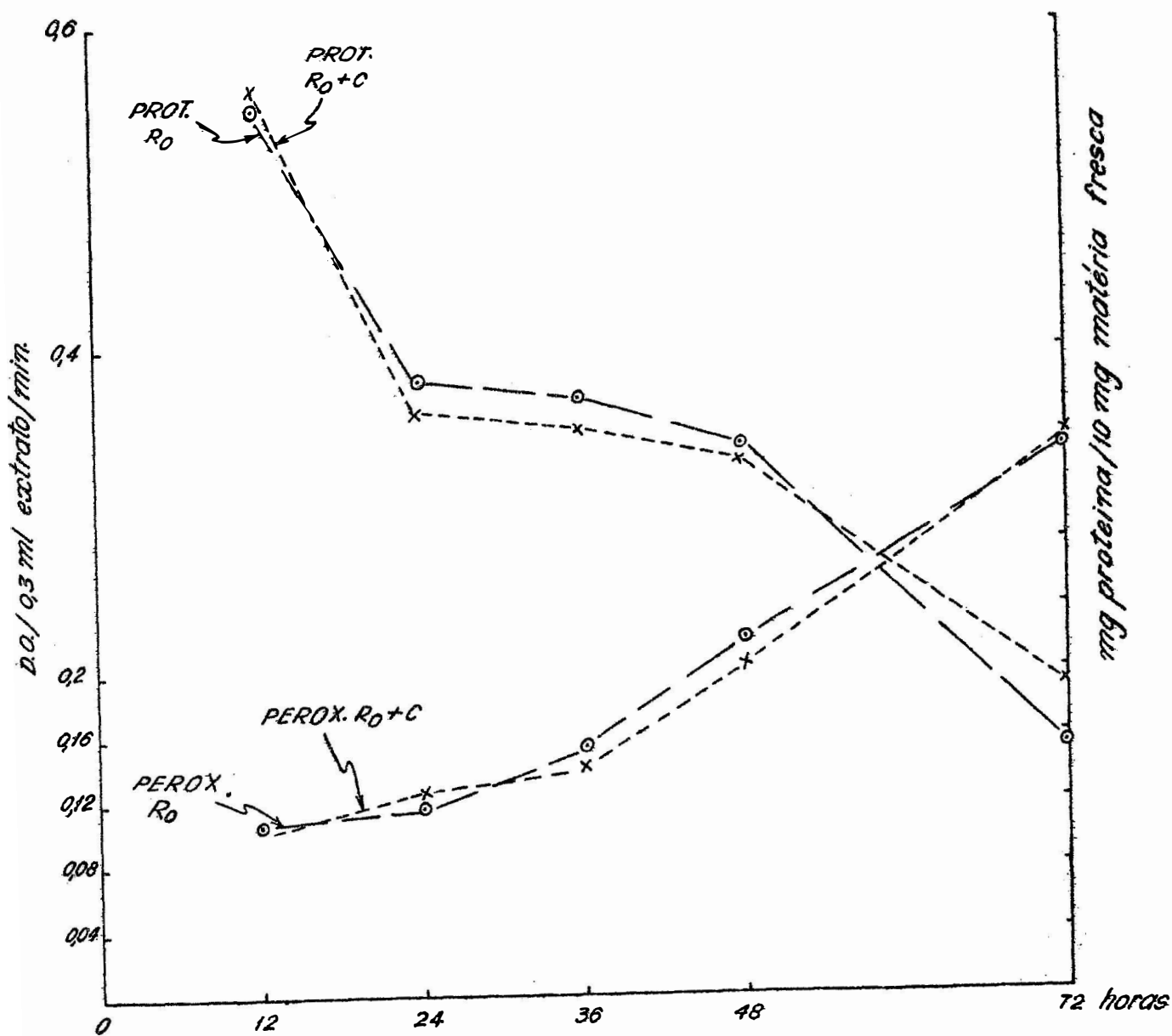


Gráfico B- Efeito da cisteína (R_0+C) sobre a atividade de peroxidase e conteúdo de proteínas solúveis comparado com o controle R_0 .

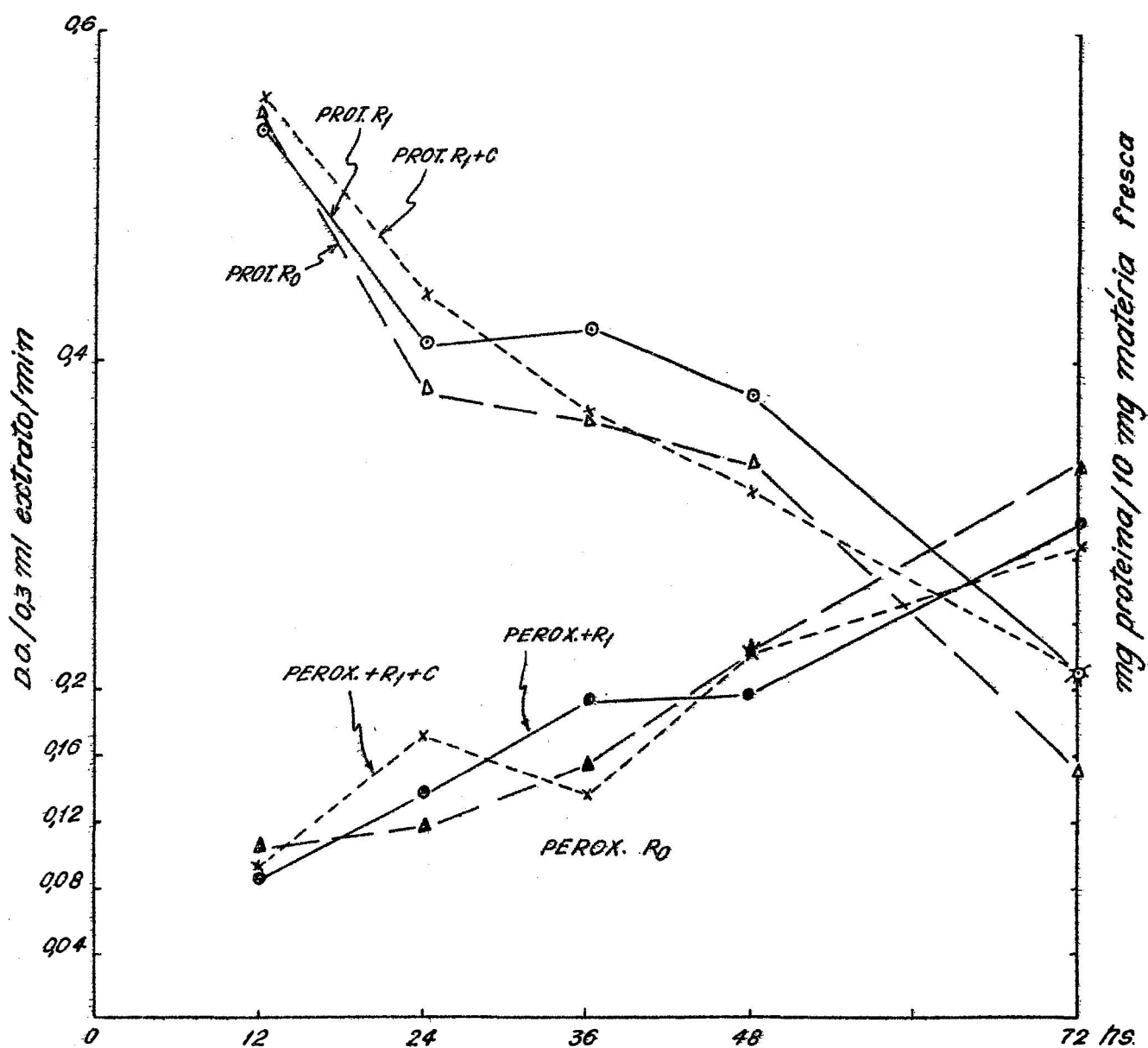


Gráfico C- Efeito da dose de radiação 5 krad (R_1) e interação $R_1 \times C$ comparadas com o controle R_0 , na atividade de peroxidase e conteúdo de proteínas solúveis, em intervalos de 12 horas durante 72 horas.

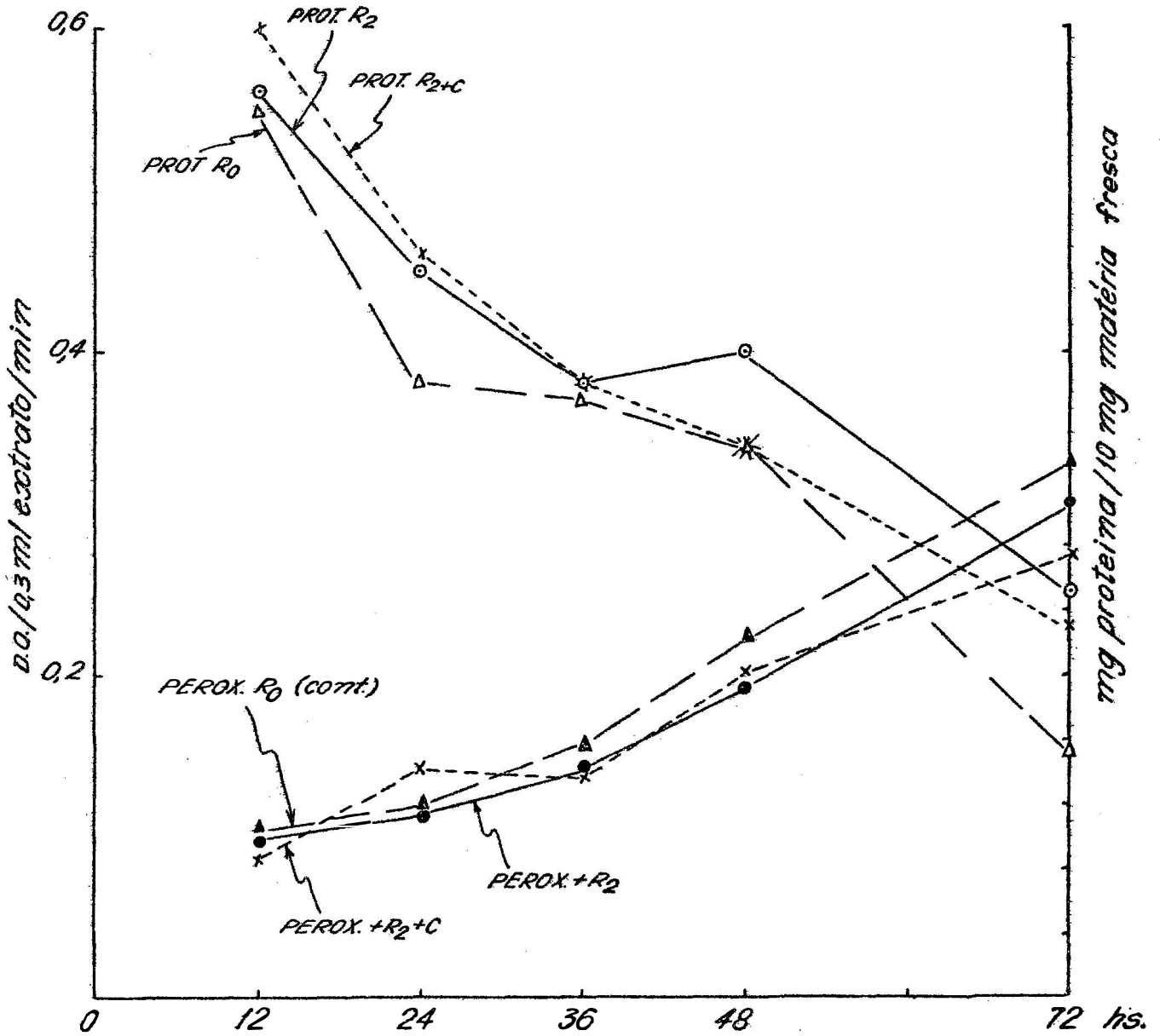


Gráfico D - Efeito da dose de radiação 35 krad (R_2) e interação $R_2 \times C$ comparadas com o controle R_0 , na atividade de peroxidase e conteúdo de proteínas solúveis em intervalos de 12 horas, durante 72 horas.

TABELA 1: Valores obtidos nas determinações da atividade de peroxidase, influenciada pela dose de radiação, e valores de proteínas no tubo de reação. (primeira repetição)

TRATAMENTOS HORAS	R ₀		R ₀ + C		R ₁		R ₁ + C		R ₂		R ₂ + C	
	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.	ATP.	PR.
12	0,080	0,296	0,084	0,306	0,076	0,289	0,060	0,287	0,076	0,304	0,056	0,326
24	0,108	0,194	0,112	0,185	0,112	0,216	0,156	0,237	0,100	0,239	0,160	0,243
36	0,164	0,188	0,160	0,183	0,252	0,223	0,152	0,194	0,164	0,184	0,164	0,191
48	0,228	0,170	0,236	0,166	0,224	0,202	0,212	0,160	0,200	0,208	0,228	0,167
72	0,360	0,087	0,332	0,107	0,276	0,098	0,308	0,109	0,300	0,116	0,264	0,115

A.P. = Atividade de Peroxidase = D.O./0,3 ml extrato/min.

PR. = Proteína = mg/6,0 mg matéria fresca.

TABELA 2 : Valores obtidos nas determinações da atividade de peroxidase, influenciada pela radiação e valores de proteína no tubo de reação. (repetição realizada uma semana após a primeira)

TRATAMENTOS HORAS	R ₀		R ₀ +C		R ₁		R ₁ +C		R ₂		R ₂ +C	
	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.	A.P.	PR.
12	0,130	0,359	0,124	0,369	0,100	0,360	0,122	0,388	0,122	0,371	0,128	0,390
24	0,124	0,258	0,136	0,254	0,144	0,282	0,188	0,296	0,124	0,304	0,120	0,305
36	0,140	0,251	0,120	0,235	0,136	0,283	0,120	0,251	0,121	0,244	0,108	0,242
48	0,216	0,242	0,188	0,231	0,162	0,251	0,228	0,224	0,184	0,271	0,176	0,240
72	0,312	0,091	0,352	0,124	0,304	0,151	0,268	0,146	0,312	0,185	0,288	0,158

A.P. = Atividade de Peroxidase = D.O./0,3 ml de extrato/min.

PR. = Proteína = mg/ 6 mg de matéria fresca.

TABELA 3 = Média dos valores da atividade de peroxidase, expressa em D.O./0,3 ml extrato/min.

TRATAMENTOS	R_0	R_0+C	R_1	R_1+C	R_2	R_2+C
HORAS						
12	0,105	0,104	0,088	0,091	0,099	0,092
24	0,116	0,124	0,128	0,172	0,113	0,140
36	0,152	0,140	0,194	0,136	0,142	0,136
48	0,222	0,212	0,193	0,220	0,192	0,202
72	0,336	0,342	0,306	0,288	0,306	0,276

TABELA 4 = Valores de F para tratamentos (incluindo R_0 , R_0+C , R_1 , R_1+C , R_2 e R_2+C) para atividade de peroxidase.

	HORAS	12	24	36	48	72
	G.L.					
TRATAMENTOS	5	0,7305 ^{ns}	2,625 ^{ns}	1,803 ^{ns}	0,776 ^{ns}	2,534 ^{ns}
Q.M.R.	5	141×10^{-4}	376×10^{-4}	552×10^{-4}	446×10^{-4}	580×10^{-4}

F

1% = 10,97

5% = 5,05

TABELA 5 : Valôres de F para tratamentos, efeito das duas doses de irradiação R_1R_2 , da cisteína (C), e interação: irradiação x cisteína (RXC).

FATOR DE VARIAÇÃO	HORAS	12	24	36	48	72
	G.L.					
TRATAMENTOS (1)	5	0,25 ^{ns}	2,36 ^{ns}	2,37 ^{ns}	0,83 ^{ns}	3,51 ^{ns}
IRRADIAÇÃO (R_1R_2)	2	0,46 ^{ns}	2,41 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,95 ^{ns}	7,65 ^{**}
CISTEÍNA (C)	1	14,51 ^{**}	5,35 [*]	4,58 [*]	6,37 [*]	0,45 ^{ns}
(R_1, R_2) x C	2	2,34 ^{ns}	5,64 [*]	13,54 ^{**}	3,60 [*]	4,15 [*]
RESÍDUO MÉDIO ⁽²⁾	25	QM = 0,000419				

F (tratamentos)

1% = 3,85

5% = 2,60

F (irradiação)

1% = 5,57

5% = 3,39

F (cisteína e RXC)

1% = 7,70

5% = 4,24

n.s. = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

(1) - Os valôres para tratamentos neste caso foram calculados através do resíduo médio obtidos dos Q.M.R. da tabela 4, cujo valor é aquêle em (2).

TABELA 6 : Valôres percentuais, em relação à média do controle R_0 , do efeito da radiação sôbre a atividade de peroxidase.

HORAS	12	24	36	48	72
TRATAMENTOS					
R_1	83,91	110,34	127,63	86,84	91,07
R_2	94,29	94,82	93,42	86,47	91,07

4.2.2. Efeito da cisteína

As curvas 1 do gráfico B (contrôle), mostram que no tratamento $R_0 + C$ há uma influência da cisteína diminuindo a atividade enzimática nos diferentes tempos estudados em relação a R_0 . O teste estatístico da Tabela 5 revela que de maneira geral o tratamento com cisteína afeta a atividade de peroxidase.

4.2.3. Efeito da radiação no tratamento R_1 , em relação ao controle R_0 .

Embora na Tabela 5 observa-se que o teste estatístico conjunto (para as duas doses) não tenha detectado diferença significativa para o efeito da radiação, mas sim para interações $R \times C$, nota-se pelas curvas 2 (R_1 , em relação ao controle R_0) do gráfico C, que nos tempos 12 e 48 horas, a atividade de peroxidase é menor, enquanto que nos tempos 24, 36 e 72 horas ocorreu um aumento nessa atividade. Os valores percentuais dessas variações são encontrados na Tabela 6.

4.2.4. Efeito combinado da cisteína e radiação no tratamento $R_1 + C$, em relação a R_0

A Tabela 5 mostra que o efeito da combinação dos tratamentos: radiação gama e cisteína foi em geral estatisticamente significativa; pelas curvas 2 gráfico B observa-se, que, com exceção do tempo 24 horas, a tendência é diminuir a atividade enzimática quando se compara com o controle R_0 .

4.2.5. Efeito da radiação no tratamento R_2 em relação ao controle R_0 .

As curvas 3 (R_2 em relação ao controle R_0) do gráfico D mostram que houve diminuição da atividade de peroxidase em todos os tempos estudados em relação ao controle R_0 . Os valores percentuais desses decréscimos estão representados na Tabela 6. Embora o teste estatístico da Tabela 5 só mostre que houve diferença significativa para as interações $R \times C$, baseando-se nesse mesmo fato, pode-se inferir que a radiação realmente influenciou a atividade da enzima. Deve-se lembrar que a análise estatística foi feita para as duas doses R_1 e R_2 conjuntamente.

4.2.6. Efeito combinado da cisteína e radiação no tratamento $R_2 + C$ em relação a R_0

O teste F da Tabela 5 revela que a variação devida à interação, é estatisticamente significativa. Pelo gráfico D, curvas 3 o tratamento $R_2 + C$, comparado com o controle R_0 mostra que a atividade da enzima é menor. Porém em todos os tempos com exceção do tempo 24 horas, conforme as mesmas curvas, verifica-se um efeito ou tendência próxima ao comportamento da curva controle $R_0 + C$ (ver também gráfico B curva 1).

4.3. Proteínas solúveis

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentados os valores de proteínas solúveis, influenciados pela dose de radiação e cisteína. Aqui também as repetições foram realizadas com um intervalo de uma semana. Na Tabela 9 estão as médias desses valores, com os quais se fez a análise estatística. A Tabela 10 apresenta os valores F para tratamentos; na Tabela 11 estão os valores F para tratamentos, efeito das duas doses de radiação ($R_1 R_2$), de cisteína (C) e interação $R \times C$.

A Tabela 10 indica que os tratamentos diferem entre si significativamente pelo menos nos tempos 24, 36 e 48 horas. Pela Tabela 11 nos mesmos tempos verifica-se que a radiação (R_1 e R_2) isoladamente, e cisteína e interação $R \times C$ mostram diferenças significativas. Os resíduos para 12 horas e 72 horas não podem ser consideradas uma vez que não se enquadram dentro das normas da análise estatística (PIMENTEL GOMES, 1963).

4.3.1. Efeito de cisteína no conteúdo de proteínas solúveis nos controles

Da maneira geral, a cisteína no tratamento R_0 diminui o conteúdo de proteínas solúveis, principalmente nos tempos 24, 36 e 48 horas (Tabela 10), o que também pode ser visto pelas Curvas I Gráfico B.

4.3.2. Efeito da radiação no conteúdo de proteínas solúveis no tratamento R_1 em relação ao controle R_0 .

Os valores de F na Tabela 11 revelam no teste estatístico conjunto (para duas doses de radiação R_1 e R_2) que a radiação tem -

TABELA 7 : Valores obtidos nas determinações do conteúdo de proteínas solúveis, influenciado pela dose de radiação e cisteína. (primeira repetição).

TRATAMENTOS HORAS	R ₀	R ₀ +C	R ₁	R ₁ +C	R ₂	R ₂ +C
12	0,494	0,510	0,481	0,479	0,506	0,544
24	0,324	0,308	0,360	0,395	0,398	0,405
36	0,313	0,305	0,371	0,323	0,307	0,318
48	0,284	0,277	0,337	0,266	0,346	0,279
72	0,145	0,179	0,163	0,181	0,194	0,192

mg/10mg de matéria fresca

TABELA 8 : Valores obtidos nas determinações do conteúdo de proteínas solúveis influenciado pela dose de radiação e cisteína (repetição realizada uma semana após a primeira).

TRATAMENTOS HORAS	R ₀	R ₀ +C	R ₁	R ₁ +C	R ₂	R ₂ +C
12	0,599	0,615	0,600	0,646	0,619	0,649
24	0,430	0,423	0,470	0,494	0,506	0,508
36	0,418	0,391	0,471	0,419	0,407	0,403
48	0,404	0,385	0,419	0,374	0,452	0,400
72	0,151	0,206	0,251	0,244	0,308	0,263

mg/ 10 mg de matéria fresca

TABELA 9 : Média dos valores de Proteínas solúveis.

TRATAMENTOS	R ₀	R ₀ +C	R ₁	R ₁ +C	R ₂	R ₂ +C
HORAS						
12	0,55	0,56	0,54	0,56	0,56	0,60
24	0,38	0,36	0,41	0,44	0,45	0,46
36	0,37	0,35	0,42	0,37	0,36	0,36
48	0,34	0,33	0,38	0,32	0,40	0,34
72	0,15	0,19	0,21	0,21	0,25	0,23

mg Proteína/10 mg. matéria fresca

TABELA 10 : Valores de F para tratamentos incluindo R₀, R₀+C, R₁, R₁+C, R₂, R₂+C, para proteínas solúveis.

HORAS	G.L.	12	24	36	48	72
TRATAMENTOS	5	2,59 ^{n.s.}	207,60 ^{**}	40,76 ^{**}	18,46 ^{**}	3,1074 ^{n.s.}
Q.M.R.	5	(1) 0,000292	0,000015	0,000033	0,000099	(2) 0,00782

1% = 10,97

5% = 5,05

TABELA 11 : Valôres de F para tratamentos, efeito das duas doses de irradiação (R_1 e R_2), de cisteína (C) e interação irradiação x cisteína (RXC).

HORAS		12	24	36	48	72
FATOR DE VARIACÃO	G.L.					
IRRADIAÇÃO (R_1 e R_2)	2	3,24 ^{ns}	488,13 ^{**}	59,24 ^{**}	10,44 [*]	6,14 [*]
CISTEINA (C)	1	5,92 ^{ns}	11,27 [*]	41,36 ^{**}	57,34 ^{**}	0,29 ^{ns}
(R_1 R_2) x C	2	0,29 ^{ns}	25,27 ^{**}	22,03 ^{**}	7,05 [*]	1,47 [*]
RESÍDUO	5	(1) 0,000292	0,000015	0,000033	0,000099	(2) 0,00782

F Irradiação e interação

1% = 13,27

5% = 5,79

F Cisteína

1% = 16,26

5% = 6,61

n.s. = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

1 e 2 = Q.M. do resíduo que escapam do domínio da regra normal para análise estatística.

efeito significativo nos tempos 24, 36 e 48 horas. As curvas II do gráfico C mostram de fato que no tratamento R_1 o nível de proteínas solúveis é maior que o tratamento R_0 , em todos os tempos com exceção de 12 horas.

4.3.3. Efeito combinado de cisteína e radiação gama em tratamentos $R_1 + C$ e R_0 para proteínas solúveis

Verificamos pela Tabella 11 que o efeito da combinação de tratamentos, radiação x cisteína (RxC), em cada tempo é de maneira geral, significativo. Pelas curvas II, Gráfico C, nota-se que no intermediário entre os tratamentos R_0 e R_1 , parecendo diminuir o efeito provocado pela radiação.

4.3.4. Efeito de radiação gama no conteúdo de proteínas solúveis no tratamento R_2 em relação ao controle R_0 .

O nível de proteínas solúveis mantém-se acima daquele apresentado pelo Controle R_0 em todos os tempos (Curvas III, R_2 , Gráfico D). Esta diferença é, em geral, significativa estatisticamente (Tabella 11).

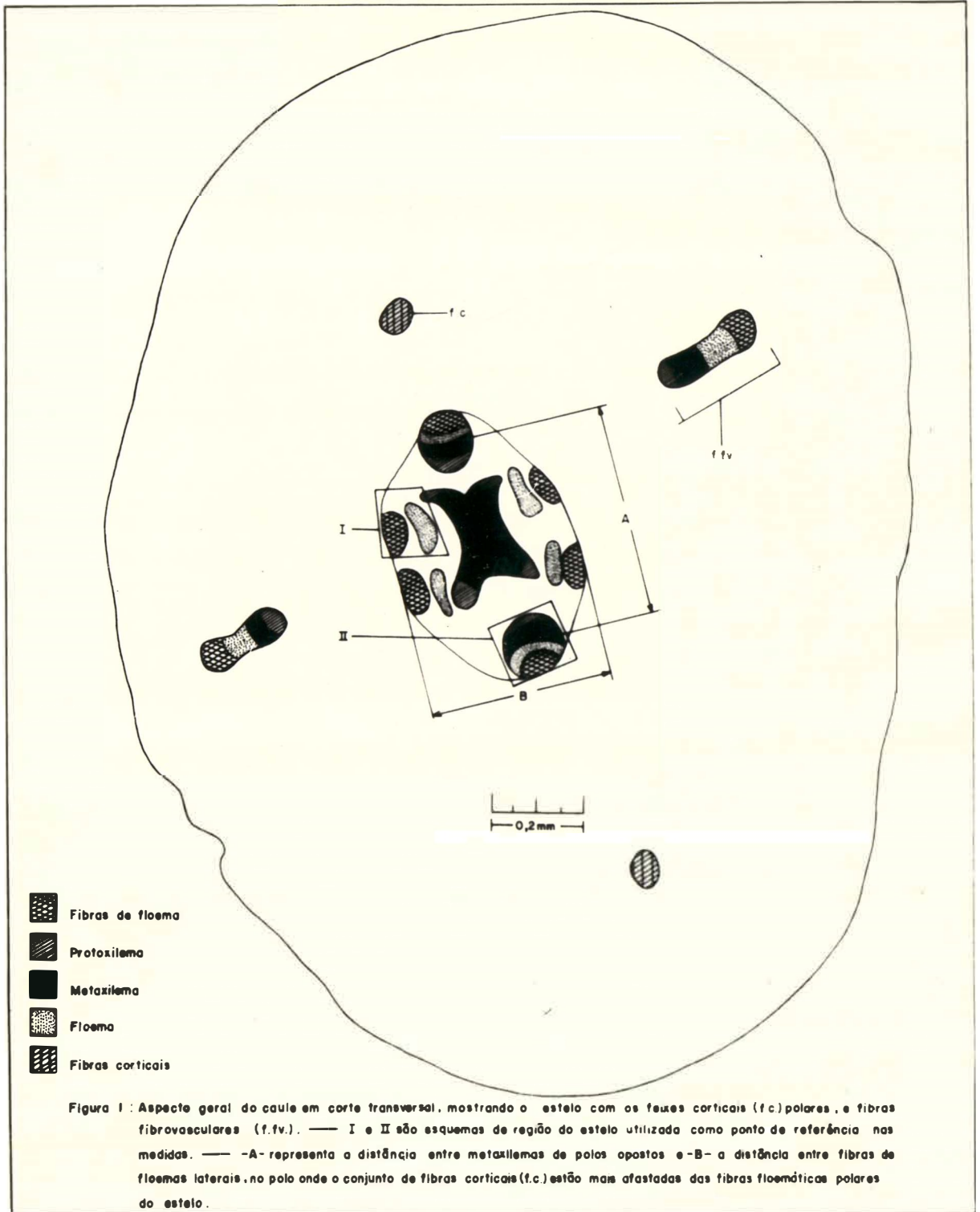
4.3.5. Efeito combinado de cisteína e radiação gama no tratamento $R_2 + C$ comparado ao controle R_0

A análise da tabela 11 nos revela que a variação devido a interação RxC é estatisticamente significativa nos tempos 24, 36, 48 e 72 horas.

Isto pode ser verificado pelo exame das curvas III, Gráfico D, onde se observa que, praticamente a partir de 24 horas, o efeito da cisteína (tratamento $R_2 + C$) tende a mudar o conteúdo de proteínas solúveis.

4.4. Medidas de regiões do caule nos diversos tratamentos

Na Figura 1, encontramos um esquema demonstrativo das regiões envolvidas, para as medidas das variações provocadas pelos diferentes tratamentos após 72 horas. Detalhes das regiões I e II dessa Figura 1, encontram-se representados pelas Figuras 2 e 3. Todas essas figuras são desenhos obtidos em câmara clara, para efeito de ilustração, a partir do corte transversal de caule do controle R_0 .



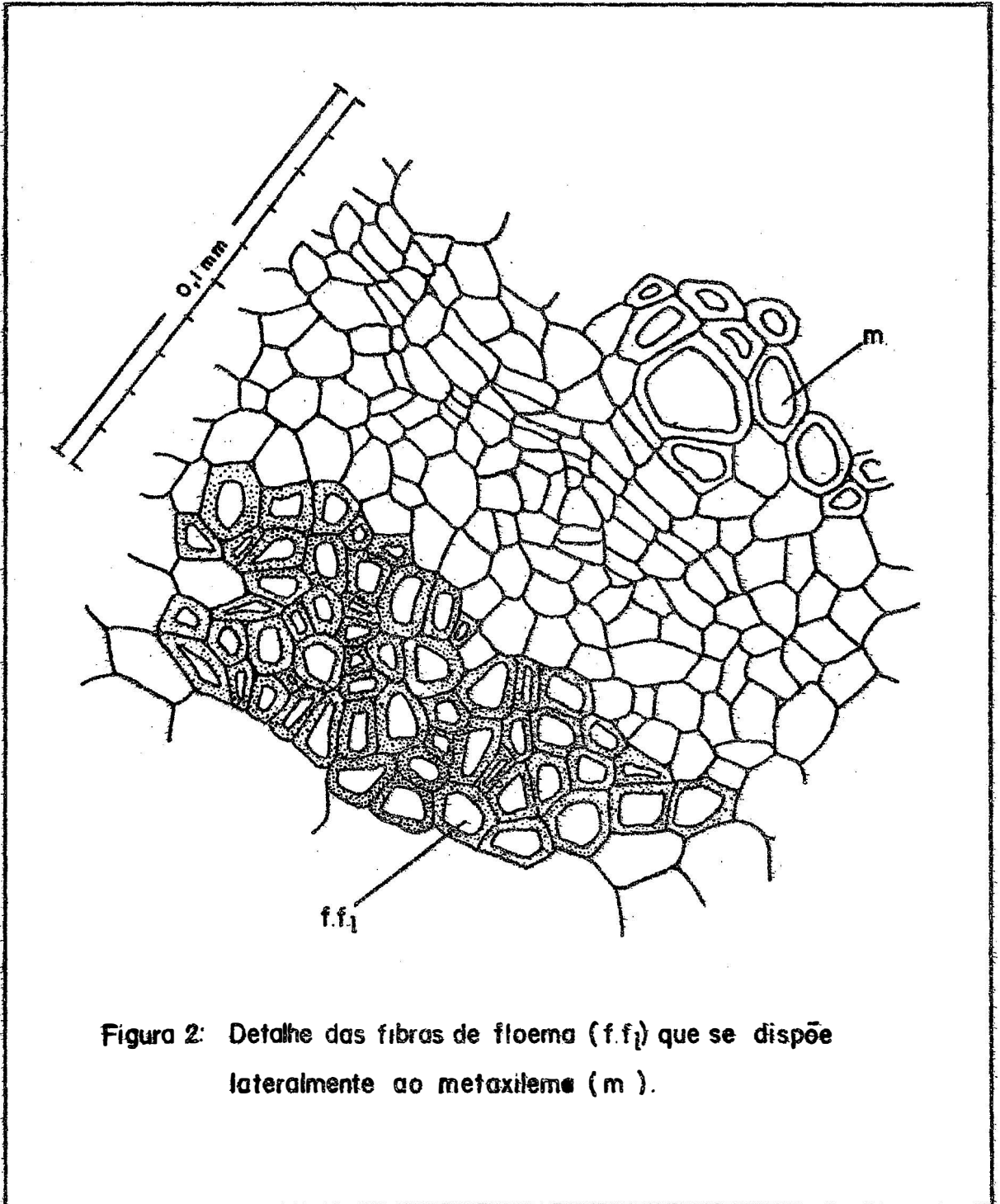


Figura 2: Detalhe das fibras de floema (f.f.) que se dispõe lateralmente ao metaxilema (m).

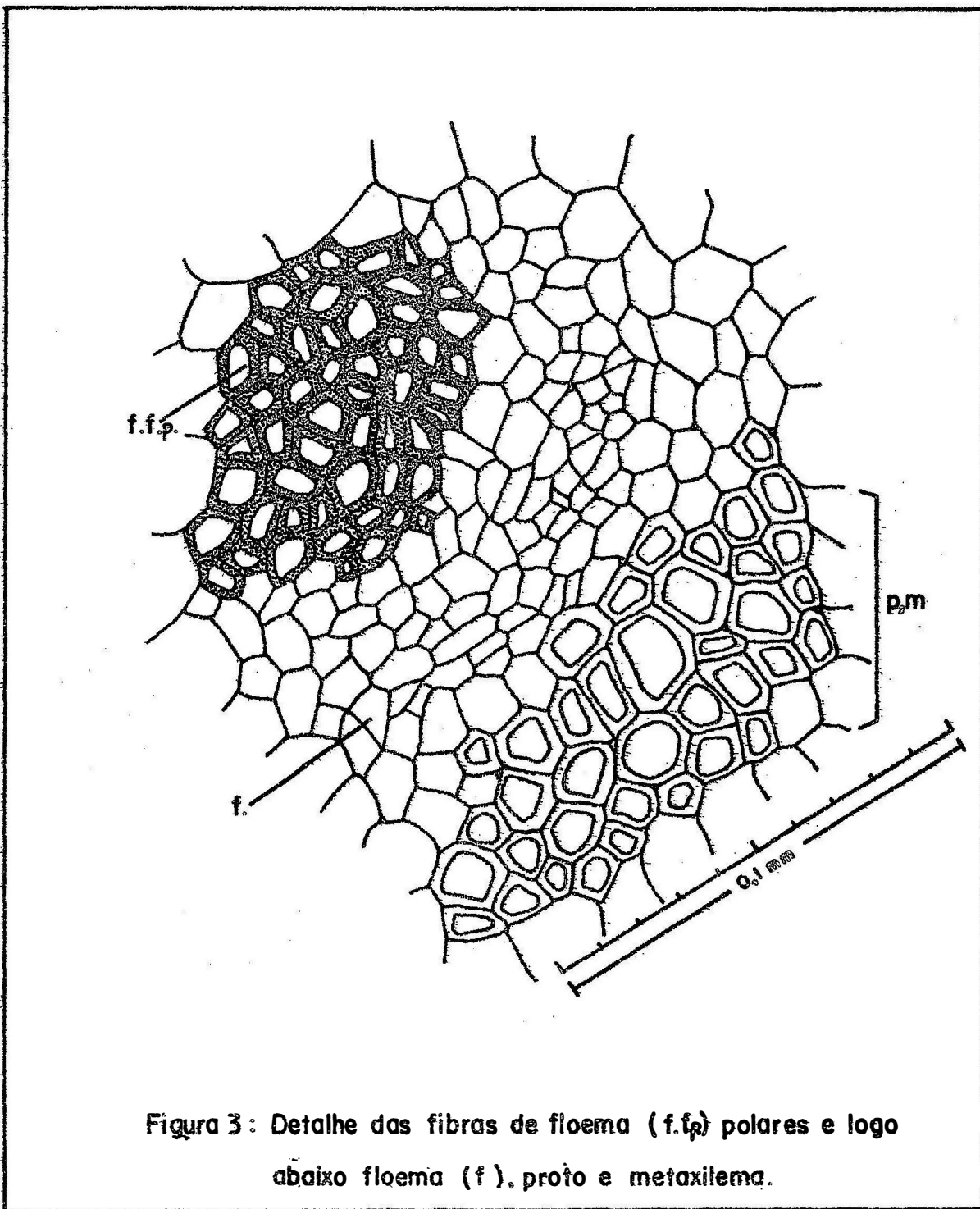


Figura 3: Detalhe das fibras de floema (f.f.p) polares e logo abaixo floema (f), proto e metaxilema.

4.4.1. Medidas histológicas

As médias de 25 medidas de cada tratamento tomadas ao acaso estão representadas pelas Tabelas 12 e 13.

4.4.2. Teste F, e teste Tukey

Os resultados da Tabela 14 revelam que todos os tratamentos diferem entre si significativamente; o que também é observado no Gráfico E. O teste de Tukey mostra que todos os tratamentos com exceção de $R_2 + C$, diferem significativamente do tratamento controle R_0 (Tabela 15). Este teste ainda indica que existe diferença significativa entre as médias dos tratamentos R_1 e R_2 . Porém entre R_1 e $R_1 + C$, e R_2 e $R_2 + C$, foram registradas diferenças não significativa e significativa, respectivamente. Pelo exame do gráfico E, pode-se dizer que tanto a radiação gama, como a cisteína isoladamente, provocam maior crescimento da região medida quando comparadas com o controle, enquanto que combinados (R+C) tendem a diminuir os efeitos que induzem.

As Tabelas 16 e 17 mostram os testes F e Tukey respectivamente para as distâncias entre fibras do floema.

A Tabela 16 mostra diferença altamente significativa entre os tratamentos. Os resultados encontrados na Tabela 17, revelam que os valores médios de todos os tratamentos e o controle são significativamente diferentes (ver também gráfico F). O teste de Tukey ainda mostra que a comparação entre os valores médios dos tratamentos R_1 e R_2 apresentam diferença significativa, enquanto que para as comparações R_1 e $R_2 + C$ e $R_2 + C$ ocorrem diferenças significativa e não significativa, respectivamente.

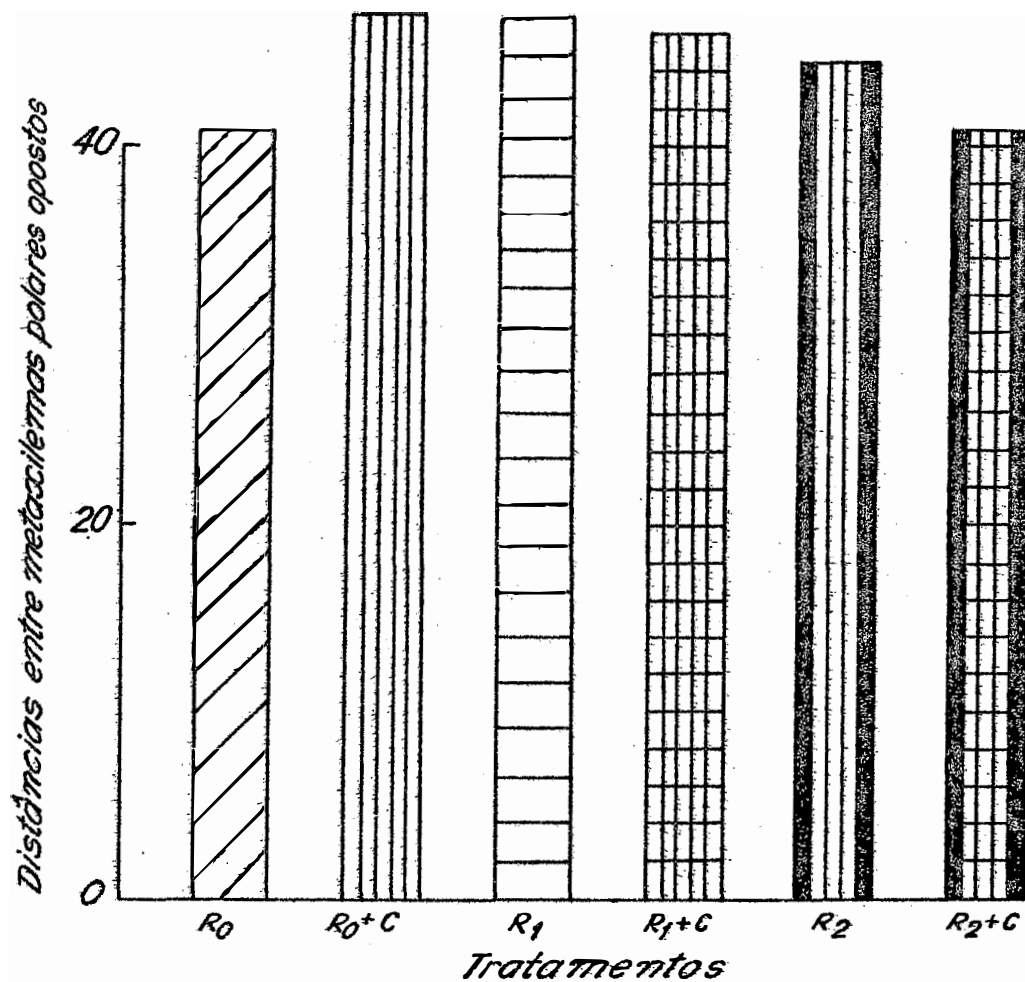


Gráfico E- Efeito de cisteima, radiação e interação $R \times C$ sôbre o tamanho da região transversal do estelo: distância entre metacilemas polares opostos.

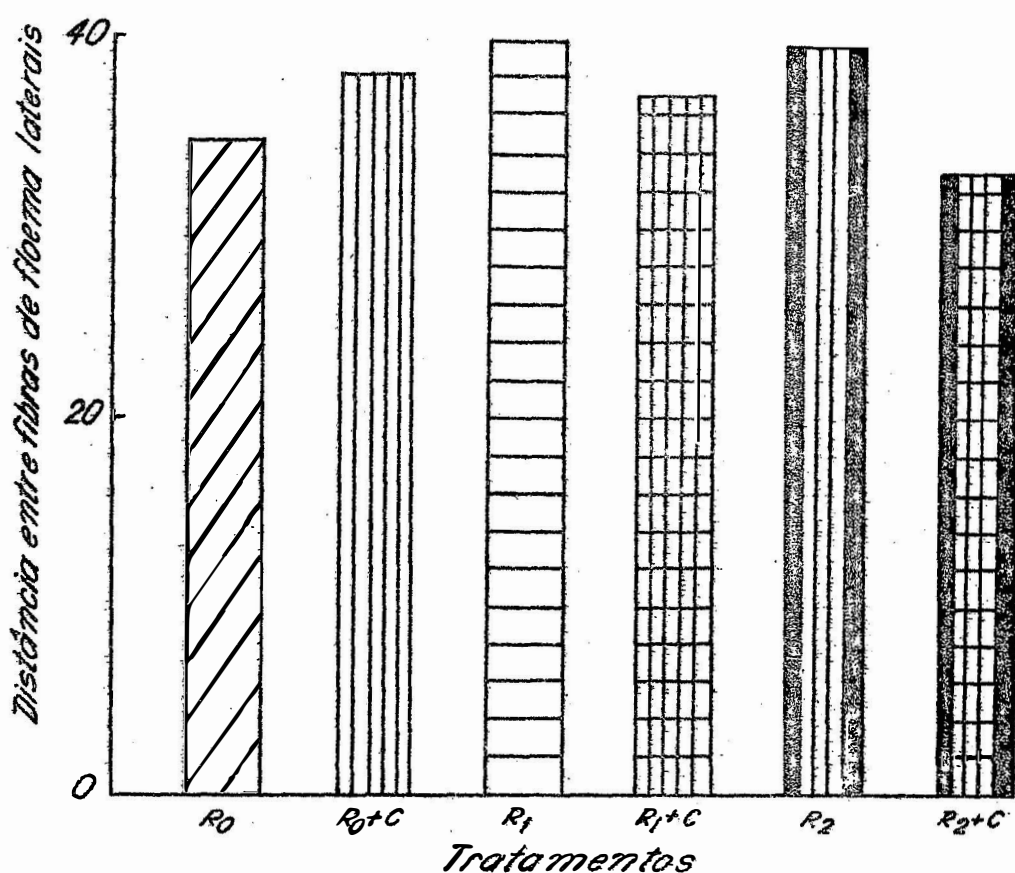


Gráfico F- Efeito de cisteína, radiação e interação R x C sobre o tamanho da região transversal do estelo: distância entre fibras de floema laterais.

TABELA 12 : Médias dos valores das medidas histológicas de metaxilema a me taxilema no tempo de 72 horas.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
R_0	41,24
R_0+C	47,36
R_1	47,48
R_1+C	45,88
R_2	44,52
R_2+C	41,04

TABELA 13 : Médias dos valores das medidas histológicas de distância entre fibras de floema laterais ao me taxilema, no tempo de 72 horas.

TRATAMENTOS	MÉDIAS
R_0	34,68
R_0+C	38,00
R_1	39,96
R_1+C	37,32
R_2	39,56
R_2+C	33,40

TABELA 14: Valôr de F para tratamentos (incluindo R_0 , R_0+C , R_1 , R_1+C , R_2 , R_2+C), de medidas de distância metaxilema a metaxilema polares opostos, no tempo de 72 horas.

VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5	1037,9734	0,6683	458,26
RESÍDUO	120	54,3599	0,4530	-----

F {
 • 1% = 3,17
 5% = 2,29

TABELA 15 : D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey para $n=6$, e $n'=120$, nos tratamentos de medidas de: distância metaxilema a metaxilema polares opostos, no tempo de 72 horas.

	R_0	R_0+C	R_1	R_1+C	R_2	R_2+C
R_0	-----	6,12**	6,14**	4,64**	3,28**	0,20 ^{n.s.}
R_1	-----	-----	-----	0,12 ^{n.s.}	2,96**	-----
R_2	-----	-----	-----	-----	-----	3,48**
R_1+C	-----	-----	-----	-----	-----	4,84**

n' = nº de graus de liberdade do resíduo.
 n = nº de tratamentos.

{
 1% = 0,65
 5% = 0,55

TABELA 16 : Valor de F para tratamentos (incluindo R_0 , R_0+C , R_1 , R_1+C , R_2 , R_2+C) das medidas: Distância entre fibras de floema laterais ao metaxilema, no tempo de 72 hs.

VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTOS	5	865,473	173,0946	157,73**
RESÍDUO	120	131,693	1,0974	-----

$$F \begin{cases} 1\% = 3,17 \\ 5\% = 2,29 \end{cases}$$

TABELA 17 : D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey para $n = 6$, $n' = 120$ nos tratamentos de medida de: distância - entre fibras de floema laterais ao metaxilema.

	R_0	R_0+C	R_1	R_1+C	R_2	R_2+C
R_0	-----	3,32**	5,28**	2,64**	4,88**	1,28**
R_1	-----	-----	-----	2,64**	0,40 ^{n.s.}	-----
R_2	-----	-----	-----	-----	-----	6,14**
R_1+C	-----	-----	-----	-----	-----	3,92**

n' = nº de graus de liberdade do resíduo.

n = nº de tratamentos.

$$1\% = 0,66$$

$$5\% = 0,55$$

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito da cisteína

5.1.1. Efeito da cisteína no tratamento $R_0 + C$ sobre a atividade de peroxidase, proteína e aumento de área transversal do estelo.

Observamos pelas Tabela 5 e 11, e Gráfico B curvas I e II apresentadas em Resultados, que a cisteína influi significativamente na atividade enzimática e conteúdo de proteínas para ambos os casos, o efeito da cisteína em geral é depressor.

Embora as curvas I mostrem que a tendência geral do efeito da cisteína seja diminuir a atividade, fato corroborado pelo teste estatístico, alguns resultados da literatura nos levam a crer que esta observação é apenas aparente. RANDALL (1946), estudando o efeito de tióis sobre peroxidase e H_2O_2 chegou a conclusão de que estes compostos não inibem a enzima, e sim agem como agentes redutores capazes de reagirem como substrato para o sistema peróxido/peroxidase. Nos nossos ensaios contrôles, os extratos obtidos de embriões e "seedlings" tratados previamente com cisteína, possuíam um teor elevado desse composto, o qual teria reagido com o peróxido de hidrogênio, reduzindo-o, e desse modo retirando-o do sistema peróxido/peroxidase. Essa ação da cisteína induziria a uma falsa idéia de que teria ocorrido inibição da enzima.

Com relação à diminuição de proteínas solúveis, pode-se considerar de um lado um comportamento estranho da cisteína, pois, compostos tiólicos solúveis ou constituintes de moléculas proteicas (enzimas), têm papel importante na manutenção do "steady state" e regulação dos processos energéticos celulares. Grande número de enzimas que atuam em processos de hidrólises, transferência de energia, oxidação de ácidos graxos, biossíntese de proteínas, transformação de açúcares na respiração, dependem da presença de grupos SH na molécula para suas atividades normais (cf. GUZMAN BARRON, 1951 e cf. MALAVOLTA, 1971). Portanto, se deveria esperar maior conteúdo de proteínas solúveis como consequência da adição de cisteína às sementes. Por outro lado STONIER et al., 1970, relata que o nível de tióis está relacionado com antioxidantes fenólicos e ambos com a proteção de auxinas contra a ação oxidante catalizada por peroxida-

se, e que podem agir reversivelmente. Segundo o mesmo autor, a auxina tem protetoras que inibem a oxidação do AIA pela peroxidase sõmente quando a substância protetora se oxidou, é que a oxidação do AIA se inicia. NADH imita o protetor. Na presença de NADH a oxidação do AIA pela peroxidase não se inicia até que todo o NADH tenha sido oxidado. Na presença de peroxidase a oxidação dos protetores - (NADH) se torna mais lenta, mas na sua ausência acelera espontaneamente a oxidação de NADH (promovendo portanto a destruição do AIA). Este papel reversível de redox dos protetores de auxinas implica - que êles podem atuar como venenos celulares. Assim, podemos crer - que cisteína em excesso na semente causaria diminuição no nível de hormônios, provocando distúrbios nos processos de síntese, o que explicaria os dados obtidos para proteínas solúveis no tratamento - R + C da curva contrôlo I (Gráfico B). Discussões mais amplas nêste aspecto, embora não se disponha de muitos informes correlatos, - serão feitas com os dados de interações radiação x cisteína com implicações na interferência de hormônios no contrôlo genético e enzimático da função e forma da planta.

5.1.2. Efeito da cisteína e radiação na área transversal - do estelo.

Com relação aos dados apresentados nas Tabelas 8 e 9 respectivamente referentes às medidas histológicas: distância metaxilema a metaxilema, e distância entre fibras de floema, representados na Figura 1, e pelos seus valores médios nos gráficos E e F, verificamos que estatisticamente houve diferença significativa ao nível - de 1% para tratamentos R_0 e $R_0 + C$ conforme revelam as Tabelas 10 e 12. Os valores médios nos dois tipos de medidas consideradas para os tratamentos R_0 e $R_0 + C$, e representados nos gráficos E e F, mostram o efeito da cisteína provocando o crescimento das áreas de tecidos medidos. O teste de Tukey das Tabelas 11 e 13 mostram que êste efeito é altamente significante ao nível de 1%.

A análise estatística mostrou conforme as tabelas citadas que os valores F pelo teste Tukey para os efeitos de radiação (R), - combinação radiação x cisteína (RxC) diferenças altamente significativas, sendo que pela observação dos gráficos E e F tanto a cisteina como radiação influem aumentando a área dos tecidos medidos, quando se compara com o contrôlo R_0 . O exame dos Gráficos E e F, e da-

dos das Tabelas 8 e 9 nos revelam que cisteína e radiação aplicados isoladamente provocam o crescimento em relação ao controle (R_0) com diferença significativa, conforme valores de F pelo teste de Tukey das Tabelas 11 e 13; a ação combinada (RxC), por outro lado tende a diminuir os efeitos que induzem quando aplicados isoladamente. O gráfico A nos mostra que a dose 5 Krad aumentou o crescimento do caule em comprimento enquanto 35 Krad diminuiu. Ora, as medidas transversais estão mostrando que para as duas doses há incremento. Ao que parece então o efeito tanto da radiação como de cisteína, neste particular incremento, se deve à causas de aumento de plasticidade e alongação celular, e não ao aumento do número de células. A possível explicação para estes resultados será considerada conjuntamente na discussão com referência ao efeito combinado radiação e cisteína (RxC), uma vez que a mesma implica na atividade de peroxidase e interpretações mais complexas e detalhadas.

5.2. Efeitos da radiação e da interação radiação x cisteína em proteínas solúveis, atividade de peroxidase e aumento da área transversal do estelo.

Os resultados apresentados para o efeito das duas doses de radiação conjuntamente não mostraram significância para os valores de F. (Tabela 5). Esta não detecção de diferenças pelo teste estatístico pode ser explicado não somente pelo pequeno número de repetições, como também devido a que as duas doses de radiação foram associadas para os cálculos estatísticos, o que poderia ter mascarado o efeito de cada dose de radiação. No Gráfico C, curvas 2, pode-se notar que nos tempos 24 e 36 horas, a dose de radiação 5 Krad provocou efeito diferente daqueles apresentados no Gráfico C, curvas 3, nos mesmos tempos para a dose 35 Krad, em relação ao tratamento controle R_0 . A Tabela 6 mostra, porém, em porcentagem, as variações na atividade de peroxidase, devidas às doses de radiação aplicadas, quando comparadas ao controle. Este efeito radiobiológico admitido, embora não estatisticamente detectado, recebe apoio dos dados obtidos para a combinação da radiação gama e cisteína (RxC), cuja interação foi estatisticamente significante em todos os tempos (conforme Tabela 5).

A significância obtida para esta interação nos permite deduzir que a cisteína, nos diferentes tempos, não se comportou de

maneira idêntica na ausência e presença da radiação, o mesmo ocorrendo para as doses de radiação. Além disso os efeitos de cisteína e radiação, quando combinados, agem entre si e tendem à inibição mútua. Para o conteúdo de proteínas solúveis, estas afirmações são da mesma maneira aplicáveis na simples observação da Tabella 11, onde para interação $R \times C$ temos valores de F significativos, com exceção do tempo 12 horas. A variação no conteúdo de proteínas solúveis e na atividade de peroxidase devido à interação, são mostradas nos gráficos C e D e comparadas com o controle R_0 . Nestas representações gráficas pode-se observar como o comportamento das curvas $R_1 + C$ (2) e $R_2 + C$ (3) é diferente em relação às curvas obtidas para os efeitos isolados mostrando uma tendência de efeito intermediário entre os mesmos.

Também bastante comprovantes d'êste efeitos isolados da radiação e cisteína, e combinados, são os resultados obtidos para medidas transversais do estelo em duas regiões, em caules de 72 horas de idade. A variação de vida a cada tratamento foi altamente significante conforme as Tabelas 14 e 15, e Tabelas 16 e 17 quando comparadas com o controle R_0 . Os Gráficos E e F ilustram essas diferenças.

As curvas 2 do Gráfico 6 (tratamento R_1 , 5 Krad) apresentam comportamento dual, quando comparadas com as curvas 3 do Gráfico D (tratamento R_2 , 35 Krad), ambas em relação ao controle R_0 . Isto é, para os tempos 24 e 36 horas, a dose 5 Krad induz aumento de atividade enzimática, enquanto que nos tempos 12, 48 e 72 horas provoca decréscimo em relação ao controle R_0 . A explicação para êste ffato será ligada com a ação da peroxidase no meio celular, correlacionando-se com os dados das medidas do estelo e conteúdo de proteínas solúveis.

Sabe-se da literatura que embriões normais de milho, o conteúdo de proteínas solúveis aumenta com o aumento progressivo da germinação, o mesmo acontecendo com o conteúdo de carboidratos solúveis no embrião no período de 72 horas (INGLE et al., 1964). Por outro lado, sabe-se que hormônios como giberelinas existentes no embrião aceleram a atividade de amilase e protease no endosperma (cf. PRICE, 1970). A radiação como vimos (ambas as doses, R_1 e R_2) provocam aumento de proteínas solúveis em relação a R_0 (Gráficos C e D)

em plantinhas de ervilha mostrando que os processos acima citados - são acelerados, levando conseqüentemente a um aumento na matéria - prima necessária à construção celular.

Considerando-se que em dose R_1 o comportamento da curva 2 (Gráfico C), é dual em relação à curva 3 (dose R_2 , Gráfico D) quando ambas são comparadas ao controle R_0 , podemos afirmar que o aumento da atividade de peroxidase (tempos 24 e 36 horas) provoca desecontrôle e diminuição da divisão celular (que está ligado ao controle genético). KUZIN, 1961, irradiando folhas de Vicia faba com 40 Krad verificou que o efeito foi o de diminuir o conteúdo de DNA, e a divisão celular nas regiões meristemáticas. Por outro lado, sabe-se que a irradiação pode também aumentar a atividade de hormônios após irradiação de sementes de aveia (PICCIURO et alia, 1964), e em batatas nas primeiras 48 horas (USSUF, et alia, 1971). o que provavelmente induz aceleração daqueles processos metabólicos descritos por PRICE (1970), e INGLE et alia, (1964) para embriões normais. Verifica-se, portanto, que os hormônios estão implicados e têm seu papel importante nêstes processos que levam ao crescimento e desenvolvimento do embrião.

O outro comportamento das curvas 2 (Gráfico C), para dose 5 Krad (R_1) nos tempos 12, 48 e 72 horas, mostra que a atividade de peroxidase decresce enquanto há aumento no conteúdo de proteínas solúveis (em todos os tempos). É o que se nota no Gráfico D, dose R_2 também para todos os tempos. Em ambas as doses, considerando o comportamento dual da curva 2 (Gráfico C) em resposta à dose R_1 e através das informações de USSUF et alia, 1971; e PICCIURO et al. 1964, - pode-se dizer que a atividade dos hormônios aumentou.

Com relação a ação isolada de cisteína, os dados mostram - que os efeitos produzidos são similares aos das doses de radiação - sôbre o aumento das regiões medidas do estelo (Gráfico E e F). Por outro lado, como já foi dito, na combinação RxC , os efeitos isolados tendem, numa interação intracelular, a se anular tanto para o conteúdo de proteínas, como atividade de peroxidase, e aumento das regiões transversais medidas no caule:

A cisteína, sendo um composto sulfidrílico, pode atuar contra o efeito da radiação nos seguintes níveis:

1. Físico-químico

- a. como removedores de radicais através da captura de radicais livres;
- b. através de reparo de moléculas vitais ativadas, por reações de transferência de energia antes que radicais "target" se tornem estáveis;
- c. por combinações com substâncias sensíveis à radiação que contenham -SH, ou -SS-, formando dissulfetos mistos, foram particular de concentração dissulfídica - que dá à estrutura química das moléculas do meio, - maior proteção contra a radiação (cf. ELDJARN e PIHL, 1960);
- d. diminuindo a tensão de oxigênio, provocando anoxia e reduzindo o dano celular.

2. Metabólico

Alterações estruturais das proteínas e mitocôndria, são consequências do efeito reparador por substâncias sulfidrílicas (BACQ e ALEXANDER, 1964; e NAGY et. al., 1968)

Além da propriedade de inativação que compostos sulfidrílicos como cisteína possuem, a interação radiação x cisteína no meio celular, e seus efeitos na regulação metabólica, podem ser correlacionados com as seguintes ações biológicas:

- a. cisteína tem a propriedade de interferir no sistema peroxidase/ H_2O_2 (RANDALL, 1946), além de seu papel importante na divisão celular (GUZMAN BARRON, 1951).
- b. compostos tiólicos, graças à sua capacidade redutora, - podem inibir a ação oxidativa catalizada por peroxidase sobre AIA.
- c. antioxidantes protetores de auxina, que são compostos - fenólicos, estão relacionados com o aumento de tióis - que participam da inibição dos processos de oxidação do AIA (STONIER et al., 1970)
- d. a alteração do nível de peroxidase parece regular o nível de AIA na planta (MULLER, 1969, e GALSTON e DALBERG 1964). Por outro lado, a aplicação de giberelinas, em plantas de ervilhas reprimem a atividade de peroxidase (cf. SHANNON, 1968).

De posse destes dados pode-se esquematizar a ação metabólica de cisteína e radiação gama e a interação RxC, na tentativa de explicar as interrelações destes efeitos com as reações metabólicas na regulação celular (ver esquema hipotético na figura 4).

Setas de linha contínua representam a célula normal cuja forma e função são determinadas pela interação entre fatores genéticos e externos.

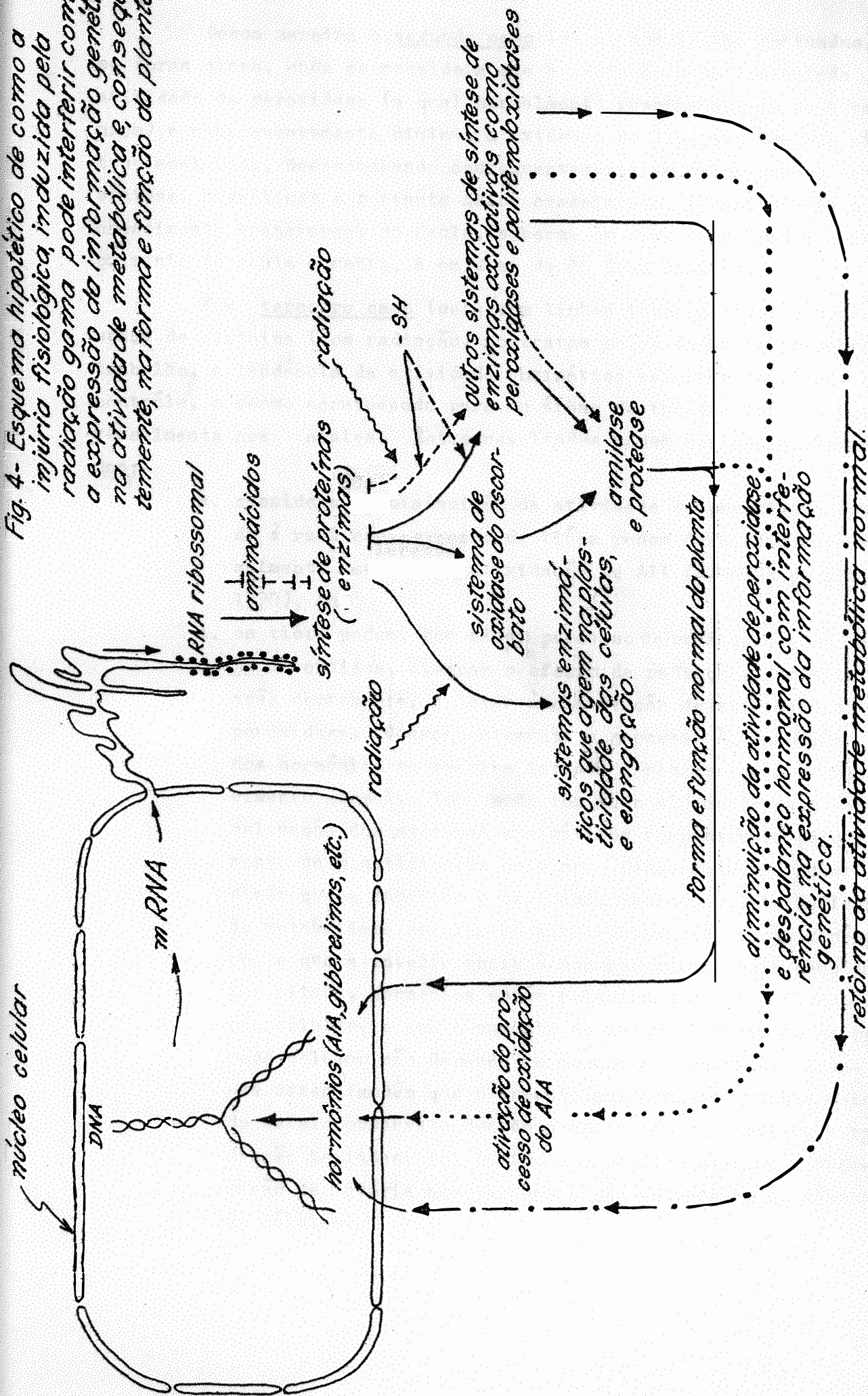
As setas de linhas pontuadas e interrompidas representam a ação de fatores externos (radiação e cisteína) influenciando no equipamento enzimático e por conseguinte na expressão da informação genética que determina forma e função da célula.

No primeiro caso verifica-se que os hormônios podem atuar na atividade de "template", de transcrição e proteínas específicas (MASUDA e KAMISAKA, 1969; cf. PRICE, 1970). Tem sido mostrado que os hormônios têm ação tanto no nível genético (síntese), como metabólico (na função das enzimas. Assim, KEY e SHANNON (1964) verificaram que tratamento com auxina leva à produção de RNA que é transferido do núcleo à fração ribossomal, sendo que muitos autores estão de acordo que a mesma concentração que leva à elongação celular promove igualmente a síntese de RNA no núcleo (NOODEN e THIMANN, 1965; 1966; SACHER, 1965; SHANNON et al., 1964; KEY, 1964; e ROYCHOUDHURY e SEN, 1964).

Por outro lado embora actinomicina D e cloranfenicol iniba a síntese de RNA e proteína respectivamente sabe-se também que o fenômeno de inserção de material plástico na parede celular, facilitando a elongação, não se dá através de ação genética, pois os inibidores acima citados não agem na repressão desse fenômeno. Essa repressão ocorre sob ação de substâncias como oxigênio, que atuam ao nível enzimático e não genético (CLELAND, 1965).

Outro fato que também mostra a ação hormonal ao nível enzimático, é a dependência que existe entre o embrião e o endosperma na hidrólise de carboidratos a qual é controlada pelas giberelinas. Foi demonstrado que as giberelinas do embrião aceleram a atividade de amilase e protease do endosperma (cf. PRICE, 1970). O mesmo se pode dizer da ação de peroxidase sobre o controle do nível de AIA "in vivo" (RAY, 1958).

Fig. 4- Esquema hipotético de como a injúria fisiológica, induzida pela radiação gama pode interferir com a expressão da informação genética na atividade metabólica e, conseqüentemente, na forma e função da planta.



— atividade metabólica normal sem interferência na expressão da informação genética.
 alteração da expressão da informação genética
 - - - - - balanço da atividade metabólica na interação RxC (radiação x cisteína)

Dessa maneira o segundo caso (setas com linhas pontuadas), se torna claro, onde se considera que a radiação atua diminuindo a atividade de peroxidase (a qual normalmente reprime a ação de hormônios) e conseqüentemente diminui a oxidação de AIA, que tem sua síntese acelerada, desencadeando conseqüentemente um maior número de síntese, hidrólises e portanto maior crescimento. (Considere-se o crescimento transversal do caule, embora, em dose de 5 Krad o comprimento do caule aumente, e em dose de 35 Krad diminua).

Num terceiro caso (seta com linhas interrompidas), a presença de cisteína (com radiação) mostraram pelos dados do presente trabalho, a tendência da atividade enzimática retornar ao nível do controle, o mesmo acontecendo para as áreas de tecidos medidos transversalmente nos caules. Estes resultados podem ser assim explicados:

- a. considerando diminuição da atividade de peroxidase devido à radiação, excesso de tióis podem funcionar reversivelmente acelerando a oxidação de AIA (STONIER et alia, 1970), ou
- a. os tióis podem, por algum processo de proteção, como os já discutidos, atenuar o efeito da radiação, diminuir a ação depressora, e levar à reativação da atividade de peroxidase. Conseqüentemente o processo de oxidação dos hormônios se reativa levando a restabelecer o crescimento normal. Isso pode ter sido alcançado pela normalização dos sistemas enzimáticos responsáveis pelo aumento da plastificação celular. Dêsse modo, se poderia dizer que a radiação e cisteína, isolados, interferiram no metabolismo celular ao nível enzimático e não genético, e que a interferência é nos hormônios, pois como já foi citado, hormônios estão relacionados com a elongação celular, e que o aumento de material plástico na parede celular não depende de mecanismo genético. Pode-se dizer também que o aumento nas medidas transversais do estelo observado devido à aplicação de cisteína e radiação isoladas, foi devido a alongação celular e deposição de matéria nas paredes e não ao aumento do número de células.

6. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões gerais podem ser aduzidas:

- 6.1. O efeito da dose 5 Krad foi dual em relação ao controle, aumentando a atividade de peroxidase nos tempos 24 e 36 horas e diminuindo nos tempos 12, 48 e 72 horas.
- 6.2. A dose 35 Krad diminuiu a atividade de peroxidase com o transcorrer do tempo, em relação ao controle.
- 6.3. Cisteína adicionada ao controle provocou distúrbios na síntese de proteínas solúveis diminuindo o conteúdo das mesmas nos "seedlings" em relação ao controle.
- 6.4. A diminuição da atividade de peroxidase, com o tempo, provocada por cisteína no controle foi aparente.
- 6.5. O conteúdo em proteínas solúveis aumentou com o tempo nos tratamentos com 5 Krad e 35 Krad.
- 6.6. A interação radiação x cisteína de maneira geral mostrou que para conteúdo de proteínas solúveis, e atividade de peroxidase, o efeito foi intermediário entre aqueles isolados de dose 5 Krad e 35 Krad e cisteína.
- 6.7. A cisteína e radiação aplicadas isoladamente aumentaram as áreas de tecidos medidos transversalmente no estelo em relação ao controle, e a interação radiação x cisteína reduziu a intensidade daqueles efeitos isolados.
- 6.8. Os aumentos a que nos referimos no parágrafo anterior seriam devidos à expansão celular e deposição de material plástico nas paredes, em consequência das alterações em processos enzimáticos, e não no aumento do número de células.

7. RESUMO

7.1. O presente trabalho teve como objetivo o estudo do efeito biológico da combinação de radiação gama (doses de 5 a 35 Krad) e cisteína na concentração de $10^{-3}M$ sobre a atividade de peroxidase, conteúdo de proteínas solúveis e alteração em regiões transversais de tecidos do estelo de "seedlings" de Pisum sativum L. var. Perfectah - IAC-170, As observações foram feitas durante 3 dias em intervalos de 12 horas após a irradiação e embebição das sementes, que receberam os seguintes tratamentos.

7.2 R_0 (contrôle)

$R_0 + C$ (ausência de radiação e presença de cisteína)

R_1 (dose de radiação - 5 Krad)

$R_1 + C$ (combinação de radiação e cisteína)

R_2 (dose de radiação - 35 Krad)

$R_2 + C$ (combinação de radiação e cisteína)

7.3. Os dados revelaram que:

7.3.1. A dose 5 Krad induziu efeito dual sobre a atividade de peroxidase, a qual aumentou nos tempos 24 e 36 horas, e diminuiu nos tempos 12, 48 e 72 horas em relação ao controle. Por sua vez, a atividade enzimática diminuiu em todos os tempos estudados quando se aplicou a dose 35 Krad.

7.3.2. O conteúdo de proteínas solúveis aumentou em todos os tempos estudados nas duas doses de radiação aplicadas.

7.3.3. A combinação de radiação gama e cisteína mostrou interação estatisticamente significativa. Verificou-se uma tendência a diminuir os efeitos provocados pela radiação e cisteína isoladamente, tanto em atividade de peroxidase como no conteúdo em proteínas solúveis, e regiões transversais de tecidos do estelo.

- 7.3.4. Tanto as doses de radiação como cisteína aplicadas isoladamente provocaram aumento de regiões transversais de tecidos do estelo, enquanto a combinação de tratamentos RxC levou à diminuição daqueles efeitos isolados.
- 7.3.5. Estes resultados são discutidos em termos de implicações enzimáticas envolvendo peroxidase, nível de auxinas, e aumento do material plástico das paredes celulares.

8. BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL ALTERATIONS INDUCED BY GAMMA IRRADIATION AND CYSTEINE IN PEA SEEDLINGS (PISUM SATIVUM L.)

SUMMARY

8.1. The aim of this work to study the combined biological effects of two doses of gamma irradiation (5 and 35 Krad) and 10^{-3} M cysteine concentration on peroxidase activity, soluble protein content, and the morphology transverse sections of stem tissue of Pea seedlings (Pisum Sativum - L. var. Perfectah - IAC-170). The measurements were made during 3 days at intervals of 12 hours after irradiation and soaking of the seeds. The seeds received the following treatments :

- 8.2. R_0 (control)
 R_0+C (without radiation and cysteine present)
 R_1 (radiation dose - 5 Krad)
 R_1+C (radiation and cysteine combined)
 R_2 (radiation dose - 35 Krad)
 R_2+C (radiation and cysteine combined)

8.3. The data revealed :

8.3.1. The dose of 5 Krad induced a dual effect on the peroxidase activity which decreased in the first 12 hours, increased between 24 and 36 hours and then decreased again between 48 and 72 hours, in relation to the control. On the other hand, the peroxidase activity decreased throughout the experiment, When a dose of 35 Krad was applied.

8.3.2. Soluble protein content increased throughout the experiment at both doses of irradiation studied.

8.3.3. The combination of irradiation and cysteine showed a statistically significant interaction. When combined, there was a tendency to diminish the effects of irradiation on and cysteine alone, as measured by the activity of peroxidase soluble protein content, and morphology in transverse sections.

- 8.3.4. Cysteine alone was just as effective as the two irradiation doses cysteine induced an increase in the area of the stele, while in combination with irradiation (RXC) brought about its reduction.
- 8.3.5. The results are discussed reference to enzymatic implications, which involve peroxidase, auxin level and the increase of material in cellular walls.

9. BIBLIOGRAFIA

- AHNSTROM, G., & MIKAELSEN, K., 1968. Life-times of radiation induced sensitive centers in barley embryos soaked at different temperatures. In : Mutation in plant breeding II. Proc. a Joint - FAO/IAEA Panel Vienna.
- ALEXANDER, P., 1962. Repair of radiation damage in a nucleoprotein - by cysteamine. Nature, 193 : 290-291
- ALPER, L., 1960. Effects on subcellular units and free-living cells In : Mechanisms in radiobiology (M. Errera & A. Forssberg, eds) Vol. I, p. 353-367, Academic Press, New York
- ANDO, A., 1971. Efeito biológico da combinação de tratamentos com raios gama, cisteína e algumas substâncias alquilantes sobre sementes de arroz. Tse de Doutorado - ESALQ-USP - Piracicaba, SP - BRASIL.
- ARYA, H.C. & HILDEBRANDT, A.G., 1969. Differential sensitivities - to gamma radiation of Phylloxera gall and normal grape stem cells in tissue culture. Can. J. Bot. 47 : 1623-1627
- BACQ, Z.M., & ALEXANDER, P., 1966a. Chemical protection against x rays and gamma rays. In Fundamentals of radiobiology (P. Alexander e Z.M. BACQ eds), Vol. V, Chapter 19, p. 457-477, Pergamon - Press, London
- _____, & _____, 1966b. Effect of radiation on macromolecules. In Fundamentals of radiobiology. (P. Alexander e Z.M. BACQ eds). Vol. V, Chapter 7, p. 157-215, Pergamon Press, London.
- _____, & _____, 1964. Importance in radioprotection - of the reaction of cells to sulphhydryl and disulfide compounds. Nature, 203 : 162-164.
- _____, & _____, 1961. Mechanisms of Chemical radiation protection. In The effects of ionizing radiation on cells. (R.J. C. Harris eds), p. 301-314, Academic Press, London
- BAJAJ, Y.P.S., 1970. Efect of gamma irradiation on growth, RNA, - protein, and nitrogen contents of bean callus cultures. Ann. Bot. 34 : 1089-1096

- BUTLER, J.A.V. & ROBINS, A.B., 1962. Effects of oxygen on the inactivation of enzymes by ionizing radiations. II. Solid trypsin - and deoxyribonuclease. Rad. Res. 17 : 63-73
- CALDAS, R.A., 1970. Purification and characterization of glutamine synthetase from suspension culture of wild carrot (Daucus carota, L.). Dissertation Thesis, Ohio University - Ohio.
- CALDECOTT, R.S., 1954. Inverse relationship between the water content of seeds and their sensibility to x-rays. Science 120 - : 809-810.
- _____, 1961. Seedling height, oxygen availability, storage and temperature: Their relation to radiation - induced genetic and seedling injury in barley. In Effects of ionizing irradiation on seeds, 3-32 p., Proc. of a Symp. 1960 - IAEA/FAO.
- CHEERRY, J.H., 1962. Modification in roots of Zea mays seedlings induced by x-irradiation of dry seed. Rad. Res. 17 : 718-723
- CLELAND, R., 1965. Auxin-induced cell wall loosening in the presence of actinomycin D. Plant Physiol. 40 : 596-600.
- CONGER, A.D. & RANDOLPH, M.L., 1959. Magnetic centers (free radicals) produced in cereal embryos by ionizing radiation. Rad. Res. 11 : 54-56
- CURTIS, H.J. DELIHAS, N., CALDECOTT, R.S. & KONZAK, C.F., 1958. Modification of radiation damage in dormant seeds by storage. Rad. Res. 8 : 526-534.
- DALEN, H., & OFTEBRO, R., 1963. The radioprotective effect of cysteine, AET and cystamine on chromosome damage in Allium cepa root tips. Rad. Res. 3 : 59-65.
- ELDJARN, L., PIHL, A. & SHAPIRO, B., 1956. Cysteamine-cystamine: On the mechanism for the protective action against ionizing radiation. Proc. of the International Conference on the Peacefull uses of Atomic Energy, Vol. XI. p. 335-342, New York, U.N. Publ. New York.

- _____, & PIHL, A., 1960. Mechanisms of protective and sensitizing action. In mechanisms in radiobiology (Maurice Errera & Arne Forssberg eds), Vol. II, p. 231-296, Academic Press - New York.
- _____, 1965. Sulphydril - disulfide protection mechanisms and the isolation of a possible target structure from mammalian - cell nuclei. In cellular radiation biology, p. 303-328, Eighteenth Ann. Symp. on Fundamental Cancer Research at the University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute.
- FERHRMANN, H. & DIAMOND, A.E., 1967. Peroxidase activity and Phytophthora resistance in different organs of the potato plant. Phytopathology. 57 : 69-72 .
- FORSSBERG, A. & NYBON, N., 1953. Combined effects of cysteine and irradiation on growth and cytology of Allium cepa. Physiol. Plantar. 6 : 78-95.
- GALSTON, A.W. & DALBERG, L.Y., 1954. The adaptative formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. Amer. - J. Bot. 40 : 373-380
- GINOZA, W. & NORMAN, A., 1957. Radiosensitivity molecular weight - of Tobacco mosaic virus nucleic acid. Nature, 179 : 520-521.
- GINSBERG, D.M. & WESTER, H.K., 1969. Chemical protection against - single - strand breaks in DNA of gama irradiated E. Coli. Rad. Res. 39 : 421-435
- GOUTIER, R. & BACQ, Z.M., 1963. Inhibition due to radiation. In Metabolic Inhibitors (R.M. Rochester & J.M. Quastel, eds), Vol. II, p. 631-650, Academic Press, N. York.
- GUZMAN BARRON, E.S., 1951. Thiol groups of biological importance. In advances in Enzymology, Vol. XI, p. 201-206, Interscience Publishers Inc. N. York.
- HANDY, M.K., NOAMAN, M. & CASTER, W.O., 1969. Effect of cysteine - and 4-amino-1-naphthol on solution of lysosomal enzymes exposed to high doses of radiation. Rad. Res. 38 : 114-222.
- HENRIKSEN, T., SANNER, T. & PIHL, A., 1963. Secondary process in protein irradiated in the dry state. Rad. Res. 18 : 147-162

HUTCHINSON, F., 1968. Effects of ionizing radiations on molecules - in cells. In : Actions chimiques et biologiques des radiations. (Masson et cil, eds), sixième série, chapter III, p. 107-128. Paris.

INGLE, J., BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.M., 1964. Metabolic changes as associated with the germination of Corn I. Changes in weight and - metabolites and their redistribution in the embryos axis, scutellum, and endosperm. Plant Physiol. 39 : 735-740

ITZHAKI, R.F. & GILL, D.M., 1964. A biuret method for estimating - proteins. Analyt. Bioch. 9 : 401-410

JOSHI, R.K. & LEDOUX, L., 1970. Influence of x irradiation and seed moisture on nucleic acid and protein metabolism in barley. Rad.- Bot. 10 : 437-443

KAMRA, O.P., KAMRA, S.K., NILAN, R.A. & KONZAK, G.F., 1960a. Radiation response of soaped barley seeds. I. Substances lost by leaching. II. Leaching. Experiments With 1958 seeds. Hereditas 46 : 152-170.

_____, 1960b. Radiation response of soaked barley seeds. III. Relation of radiobiological damage to substances last by leaching. Hereditas 46 : 261-273.

KEY, J.L. & SHANNON, J.C., 1964. Enhancement by auxin of ribonucleic acid synthesis in excised soybean hypocotyl tissue. Plant Physiol. 39, 360-364.

_____, 1964. Ribonucleic acid and protein synthesis as essential processes for cell elongation. Plant Physiol. 39, 365-370

KOLLMANN, G. & SHAPIRO, B., 1967. The mechanism of action of AET. VI. Protection of proteins against ionizing radiation by GED. - Rad. Res. 27 : 474-486

KØLMARK, K.G., 1965. Protection by endogenous anoxia against the mutagenic and lethal effects of x-rays in neurospora crassa. Rad.- Res. 2 : 222-228

- KUZIN, A.M., 1961. The biochemical mechanism on the disturbance of cell division by radiation. In The initial effects of ionizing radiations on cells (R.J.C.Harris ed). p. 223-235, Academic Press New York.
- LITBY, D., ORMEROD, M.G. & CHARLESBY, A., 1961. Prevention by cysteamine of radical formation in bovine serum albumine by gamma rays. Nature 190 : 998-999
- MALAVOLTA, E., 1971. Macronutrientes no solo e na planta. In Nutrição mineral de plantas - LQI - 420, p. 137-141. Mimeografado - ESALQ-USP - Piracicaba, Brasil.
- MALCOLM, L.R., & HABER, H., 1961. Production and decay of free radicals induced by irradiation of dry lettuce seeds. In Effects of ionizing irradiation on seeds. p. 58-65. Proc. of a Symp., 1960, IAEA/FAO.
- MATHAN, D.S. & COLE, R.D., 1964 - Comparative biochemical study of two allelic forms of a gene affecting leaf-shape in the tomato. Am. J. Botany 51, 560-566
- MIKAELSEN, K., 1952. The protective effect of glutathione against radiation induced chromosome aberration. Science 116 : 172-174
- _____, 1954. Protective properties of cysteine, sodium hydrosulfite and sodium cyanid against radiation induced chromosome aberrations. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 40, 171-182.
- _____, K.S. PERDERSEN, K., 1968. Protective effectiveness of cysteine, cysteamine and cysteamine against x-ray induced chromosome aberrations at different stages of mitosis. Hereditas 60 : 399-406.
- MULLER, H.P., 1969. Enzyme distribution in some radiation induced mutants of Pisum sativum with different internode lengths. Phytoch. 8 : 1867-1877.
- MC CUNE, D.C. & GALSTON, A.W., 1959. Inverse effects of gibberellein on peroxidase activity and growth in dwarf strains of peas and corn. Plant Physiol. 34, 416-418.
- NAGY, Z.S., HERNADI F., KOVACS, P. & VALYI, N., 1968. Radiosensitivity of Escherichia coli 15T and the metabolic effect of cysteine. Rad. Res. 36 : 652-660

- NILAN, R.A., KONZAK, C.F. LEGAULT, R.R. & HARLE, J.R., 1961. The oxygen effect in barley seeds. In Effects of ionizing radiations on seeds, p. 139-159, Proc. of a Symp. 1960, IAEA/FAO.
- NOODEN, L.D. & THIMANN, K.V., 1965. Action of inhibitors of RNA - and protein synthesis on cell enlargement. Plant Physiol. 41 : 157-164.
- _____, 1966. Inhibition of protein synthesis of auxin induced growth by chloramphenicol. Plant Physiol. 40 : 193-201
- NOTANI, N.K., & GURR, B.K., 1962. Paradoxal modifications in radio sensitivity. In Biological effects of ionizing radiation at the molecular level, p. 444-453, Proc. of a Symp., 1966, IAEA/FAO.
- OCKERSE, R., SIEGEL, B.Z., & GALSTON, A.W., 1966. Hormone induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. Science: 51 : 452-2.
- ORMEROD, M.G., & ALEXANDER, P., 1962. Repair of radiation damage - in a nucleoprotein by cysteamine. Nature: 193 : 290-291
- PATT, H.M., MAYER, S.H., STRAUBE, R.L. & JACKSON, E.M., 1953. Radiation dose reduction by cysteine. J. Cell. Compl. Physiol. 42 : 327-341.
- _____, TYREE, E.B., STRAUBE, H.L. & SMITH, D.E., 1949. Cysteine protection against x - irradiation. Science 110 : 213-214
- PICCIURRO, G. & CERVIGNI, T., 1964. Biosintesi delle indolauxine - acide in plantule di orzo marcato con C¹⁴. Effetti dell'irraggiamento sui semi. Giorn. Bot. Ital. 71 : 420-422.
- PIHL, A. & SANNER, T., 1963. x ray inactivation of papain in solution. Rad. Res. 19 : 27-41
- PIMENTEL GOMES, F., 1963. Curso de Estatística Experimental, 584p. ESALQ-USP - Piracicaba- Brasil.
- POLLARD, E.C., GUILD, W.R., HUTCHINSON, & SETLOW, K.B., 1955. The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens. Progress in Bioph. and Bioph. Chem. 5 : 72-108.

- PRICE, C.A., 1970. Growth and development. In Molecular approaches to plant physiology, p. 267-364, Mac Graw-Hill Book Comp. N.York
- RANDALL, L.O., 1946. Reaction of thiol compounds with peroxidase - and hydrogen peroxide. J. Biol. chem. 164 : 521-527
- RAY, P.M., 1958. Destruction of auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. 9 : 81-118
- RILEY, H.P., 1957. Chemical protection against x-ray damage to chromosomes. Genetics 42 : 593-600
- ROYCHOUDHURY, R., DATTA, A. & SEN, S.P., 1964. Studies on the mechanism of auxin action: auxin regulation of nucleic acid metabolism in pea internodes and coconut milk nuclei. Physiol. Plantar. 17 : 352-362.
- SACHER, J.A., 1965. Senescence: hormonal control of RNA and protein synthesis in excised bean pod tissue. Amer. J. Bot. 52 : 841-848
- SANNER, T. & PIHL, A., 1969. Fundamentals of enzyme inactivation - by ionizing radiation. In Enzymological aspects of food irradiation. Proc. of a Panel - Vienna - Division of. A.E. in F. Agric.
- SCHWARTZ, H.S. & RICHARDSON, E., 1967. A correlation between radiation - induced free radicals and survival in microorganisms - expressed to beta-mercaptoethyl-amine under oxygen and nitrogen. Int. J. Rad. Biol. 12 : 75-88.
- SHANNON, J.C., HANSON, J.B., & WILSON, C.M., 1964. Ribonuclease levels in the mesocotyl tissue of Zea mays as a function of 2,4 - dichlorophenoxy-acetic application. Plant Physiol. 39 : 804-809.
- SHANNON, J.C. & LELAND, M., 1968. Plant isoenzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 19 : 187-210.
- SIZER, I.W., 1953. Oxidations of proteinases by tyrosinase and peroxidase. Ad. in Enzym. 14 : 129-162.
- STONIER, T., & YONEDA, Y., 1970. Studies of auxin protectors. VIII Evidence that auxin protectors act as cellular poisons. Physiol. Plantar. 23 : 775-783

SUTTON, H.C., 1955. Effects of radiations on catalase solution.

I - Kinetics studies of inactivation. Biochem. J. 64 : 447-450

USSUF, K.K. & NAIR, P.M., 1971. Effect of gamma irradiation on indole acetic synthesizing system in potatoes. Phytoch. 10 : 929-937.

YAMAGUCHI, H., 1962. Modification of radiation - induced damage in dormant seeds. Gamma Field Symp. (1), 9-16

ZIEGEL, B.Z., & GALSTON, A.W., 1967. The isoperoxidases of Pisum sativum. Plant Physiol. 42 : 221-226