

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E CITOLÓGICAS DE CÉLULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) À RADIAÇÃO GAMA

MARIA APARECIDA SCHIAVUZZO

Orientador: Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: "Solos e Nutrição de Plantas".

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1986

Aos meus Pais e Irmãos

OFEREÇO

A

IGOR

TATIANA

FAUSTO

PAOLA

DEDICO

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

- . Ao Prof. Dr. *Otto Jesu Crocomo* pela orientação e apôio.
- . Ao Prof. Dr. *Jaime A. Cury* pelo auxílio às técnicas de ele
troforese.
- . Ao Prof. Dr. *Darcy M. Silva* e Colaboradores, pelas fotogra
fias ao microscôpio eletrônico.
- . Ao Prof. Dr. *Neftalí Ochoa Alejo* pelas sugestões e amizade
- . A Carlos Alberto Dorelli, Claudio Sergio Dorelli, Enio Tia
go de Oliveira e Romeu A. Rocha pela colaboração na par
te experimental.
- . Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade
de São Paulo - CENA/USP, pela oportunidade oferecida.
- . A CAPES/CNPq pelas bolsas concedidas.
- . A Maria A.C. Soares pelo trabalho datilográfico.
- . A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o de
senvolvimento desse trabalho.

Í N D I C E

	<i>Página</i>
RESUMO.....	x
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1.
2. REVISÃO DE LITERATURA	3.
2.1. CULTURA DE CALOS E SUA RELAÇÃO COM REGULADO <u>R</u> RES DE CRESCIMENTO	3.
2.2. EFEITO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES NOS ORGANIS <u>M</u> MOS VIVOS.....	6.
2.3. AÇÃO DA RADIAÇÃO SOBRE PROTEÍNAS, AMINOÁCI <u>I</u> DOS E CARBOIDRATOS	10.
2.4. UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NOS ESTUDOS BIOQUÍ <u>I</u> MICOS	16.
3. MATERIAL E MÉTODOS	20.
3.1. OBTENÇÃO DE CALOS	20.
3.1.1. IRRADIAÇÃO DOS CALOS	24.
3.1.2. CULTURA DOS CALOS IRRADIADOS.....	24.

3.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	25.
3.2.1. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES.....	25.
3.2.1.1. Extração de Carboidratos.....	25.
3.2.1.2. Quantificação de Açúcares Redutores.	26.
3.2.1.3. Quantificação de Açúcares Solúveis Totais.....	27.
3.2.2. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS.	28.
3.2.2.1. Extração de Proteína	28.
3.2.2.2. Quantificação de Proteína.....	28.
3.2.2.3. Nitrogênio Solúvel em Álcool.....	29.
3.2.2.4. Determinação do Nitrogênio Total....	29.
3.2.2.4.1. Digestão das Amostras.....	29.
3.2.2.4.2. Quantificação.....	30.
3.2.2.5. Quantificação de Aminoácidos Totais.	30.
3.2.2.5.1. Preparo das Amostras.....	30.
3.2.2.5.2. Quantificação.....	31.
3.2.2.6. Isoenzimas.....	31.
3.2.2.6.1. Preparo das Amostras.....	32.
3.2.2.6.2. Preparo dos Géis e Obtenção do Perfil Isoenzimático.....	32.
3.2.2.6.3. Determinação de Esterases.....	33.
3.2.2.6.4. Determinação de Malato Desidrogenase (MDH).....	33.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35.
4.1. ANÁLISE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO.....	39.
4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43.
4.2.1. NITROGÊNIO TOTAL E SOLÚVEL, PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS.....	43.
4.2.2. ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS.....	47.
4.2.3. DETERMINAÇÃO DE ISOENZIMAS.....	49.
5. CONCLUSÕES.....	53.
6. BIBLIOGRAFIA	55.

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Solução Nutritiva de Hoagland	21
2	Solução Salina de Murashige e Skoog (1962).....	23
3	Teor de Aminoácidos Totais nos Calos Submetidos a Três Tratamentos (zero, 5 e 15 Krads). Os Resultados Apresentados, São a Média de Cinco Amostras para Cada Tratamento.....	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Fotografia de calos de cana de açúcar com três dosagens de radiação gama após um período de 45 dias de crescimento em meio de cultura	36
2	Crescimento dos calos de cana de açúcar em relação ao período de tempo decorrido e das doses empregadas	37
3	Valores das massas de matéria fresca e matéria seca (gramas) de calos de cana de açúcar após 45 dias em meio de cultura...	38
4	Fotomicrografia de calos usados como controle (sem irradiação).....	39
5	Fotomicrografia de calos irradiados com 5 Krads.....	40
6	Fotomicrografia de calos irradiados com 15 Krads.....	41

FIGURA		PÁGINA
7	Valores relativos da concentração de Nitrogênio Total, Proteína Solúvel e Nitrogênio Solúvel na matéria seca de calos submetidos a diferentes doses de radiação.....	44
8	Valores relativos da concentração de Açúcares Redutores e Açúcares Solúveis Totais em matéria seca de calos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes doses de radiação.	48
9	Diagrama de isoenzimas de esterase (A) e malato desidrogenase (B) obtidas por eletroforese em géis de poliacrilamida 7% com três diferentes doses de radiação.....	50

RESPOSTAS AOS NÍVEIS BIOQUÍMICO E CITOLÓGICO DE CÉLULAS
DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp*) À RADIAÇÃO GAMA

MARIA APARECIDA SCHIAVUZZO

-Autora-

DR OTTO JESU CROCOMO

-Orientador-

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento bioquímico e citológico de células de cana-de-açúcar "in vitro" quando submetidas a diferentes doses de radiação gama.

Células de cana-de-açúcar cv. NA 56-79 foram irradiadas com radiação gama ^{60}Co , e cultivadas em meio de cultura condicionador de calos durante 45 dias. Findo o período determinou-se a massa de matéria fresca e a massa de matéria seca dos mesmos.

Uma amostra de cada dose de irradiação (0,5 e 15Krad) foi separada para exame citológico (Microscopia Eletrônica), e o restante do material (calos) foi liofilizado para determinação das análises bioquímicas.

A análise de crescimento mostrou que o mesmo foi inversamente proporcional à dose de radiação empregada após 45 dias. Observou-se um declínio na massa de matéria fresca enquanto que a massa de matéria seca praticamente não variou.

Com a irradiação de 5 Krads, as células ao microscópio eletrônico apresentaram áreas de necrose e granulação de material citoplasmático.

Quando o tratamento foi com 15 Krads destacaram-se mitocôndrios com formas aneladas, núcleos contorcidos e alongados distalmente e vacúolos com precipitação de material no seu interior.

Análises bioquímicas mostraram que houve um pequeno aumento no teor de Nitrogênio Total nos calos irradiados com 5 Krads, enquanto que com 15 Krads houve um pequeno decréscimo quando comparados com o controle.

O teor de N-solúvel aumentou proporcionalmente à dose empregada e o teor de proteína apresentou um pequeno decréscimo em relação ao controle, não havendo porém, grande variação desse último entre as dosagens de 5 e 15 Krads.

O nível de aminoácidos permaneceu constante para os três tratamentos.

Quanto aos carboidratos, os níveis de Açúcar

res Solúveis Totais e Açúcares Redutores apresentaram grande variação em relação ao controle.

A análise de isoenzimas de esterases mostrou variações nos padrões de bandeamento nos três tratamentos, enquanto que os padrões de malato-desidrogenase permaneceram constantes para os dois primeiros tratamentos, variando apenas para o tratamento de 15 Krads.

BIOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL RESPONSE OF SUGAR CANE
(*Saccharum* spp) CELLS TO GAMMA RADIATION

MARIA APARECIDA SCHIAVUZZO

-Author-

DR OTTO JESU CROGOMO

-Adviser-

SUMMARY

The objective of this research was to analyze the Biochemical and Cytological behavior of "*in vitro*" sugar cane cells under different doses of gamma irradiation.

Cells of sugar cane cv. NA 56-79 were irradiated with ^{60}Co gamma radiation and cultivated in callus conditioning culture media for 45 days. Fresh and dry masses were determined at the end of this period.

A sample of each irradiation dose (0,5 and 15 Krad) was separated for cytological examination (Electron Microscope) and the balance of the material (callus) was liofilized for biochemical analysis.

Growth analysis showed that it was inversely proportional to the radiation dose used after 45 days. A decrease in fresh matter was noted while the dry matter practically did not vary at 5 Krad irradiation. The cells showed necrotic areas and granulation of cytoplasmic material at the electron microscope, 15 Krad treatment showed ringed mitochondria, twisted nucleus and distally elongated vacuoles with precipitates in the interior.

Biochemical analysis showed that there was a small increase in total nitrogen content of callus irradiated at 5 Krads, while at 15 Krad there was a small decrease when compared with the control.

Soluble-N content increase in proportion to the dose used and the protein content showed a little decrease in relation to the control, however, there was no great variation between 5 and 15 Krad doses.

The aminoacid level remained constant for the three treatments.

As far as carbohydrates are concerned there was a large variation in relation to the control of Total-Soluble-Sugar and Reducing Sugar Levels.

Analysis of isoenzymes from esterase showed variation in grouping patterns in the three treatments, which

le patterns for malato-dehydrogenase remained constant for the first two treatments. varying only in the 15 Krad treatment.

1. INTRODUÇÃO

Duas abordagens simultâneas podem ser utilizadas como técnicas auxiliares para o melhoramento de plantas: a radiação ionizante e a cultura de tecidos.

Muitos estudos tem sido feitos sobre o efeito das radiações ionizantes nas plantas desde que MULLER (1927) descobriu que raio-X aumentava a frequência de mutação, abrindo um novo campo para o melhoramento genético das culturas.

STADLER (1928) foi o primeiro a trabalhar com mutações induzidas sendo que os experimentos com valor prático tiveram início entre 1929 e 1930.

De acordo com HEINZ e MEE (1969), o sucesso na diferenciação de plantas a partir de uma única célula do calo de cana-de-açúcar em cultura de tecidos, estaria em vencer a dificuldade de se isolar as células mutantes. Tec

nicas de cultura de tecidos, com ou sem o uso de agentes mutagênicos, em presença de fitohormônios e reguladores de crescimento, tornou-se recentemente um método popular de se obter variabilidade em cana-de-açúcar ou manifestação da variabilidade pré-existente no explante.

A primeira tentativa de induzir mutações em cana-de-açúcar foi pela primeira vez relatada pela Associação de Plantadores de Cana, na Estação Experimental no Hawai em 1928. A indução de mutação é considerada um meio efetivo de se conseguir novos genes ou reestabelecer a base natural de blocos genéticos para o melhoramento das culturas, e complementa as técnicas convencionais de seleção e hibridização.

A técnica de cultura de tecidos permite a regeneração de plantas inteiras a partir de uma única célula (VASIL e HILDEBRANDT, 1965) in BAJAJ (1970) e, portanto, estudos radiobiológicos poderiam fornecer um celeiro de informações na indução de mutações, acerca do crescimento das células e sua radiosensibilidade e, o mecanismo de sínteses bioquímicas a nível celular.

A fim de se determinar as consequências da radiação ionizante (radiação gama) e sua ação sobre o comportamento bioquímico e citológico ao nível de ultraestrutura de células de cana-de-açúcar é que este trabalho foi realizado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CULTURA DE CALOS E SUA RELAÇÃO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO

Calos são massas de tecido amorfo que contem células totipotentes, isto é, células com capacidade de exibir o potencial para morfogênese que pode ser considerado um processo com dois estágios: primeiro a retenção ou aquisição de um potencial morfogenético (ou competência) em resposta a um estímulo apropriado, e então, a expressão desse potencial no desenvolvimento de estruturas organizadas (CROCOMO e SHARP, 1975).

A totipotência de células de plantas tem sido demonstrada por BRAUN (1959), KATO & TAKEUCHI (1963), VASIL & HILDEBRANDT (1965), MURASHIGE & NAKANO (1966) e outros.

A grande maioria das pesquisas em organogênese em cultura de tecidos de plantas tem sido feitas com

dicotiledoneas, porém estudos similares com monocotiledoneas foram realizados por SHERIDAN (1968), WILMAR & HELLEN DOORN (1968), HEINZ & MEE (1969), BARBA & NICKELL (1969) e outros.

Dentre os fatores orgânicos de crescimento, incluem-se os reguladores de crescimento (substâncias naturais ou sintéticas). Estes influenciam a qualidade do crescimento "*in vitro*" mais que a quantidade. São importantes na indução e manutenção de calos e também na diferenciação das células e na morfogênese.

As citocininas e auxinas são os hormônios mais amplamente usados devido a sua grande efetividade em induzir o crescimento e a morfogênese.

Alguns pesquisadores afirmam que o uso de meios de cultura com extratos naturais complexos é mais vantajoso para o estabelecimento de calos e estes uma vez obtidos, podem ser cultivados num meio simples definido (WHITE, 1963).

Dentre as citocininas a mais conhecida é a cinetina, descoberta por MILLER *et alii* (1955) amplamente usada para iniciar e manter o crescimento em cultura de calos e é particularmente ativa quando interage com ácido indoleacético (AIA) ou ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D).

A efetividade das auxinas varia para as diferentes espécies vegetais (CROCOMO e SHARP, 1975). SKOOG & MILLER (1957), demonstraram que variações nos níveis de auxinas e citocininas, conduziam a diferentes resultados no crescimento e desenvolvimento das células de fumo (*Nicotiana tabacum*), sugerindo a necessidade de um balanceamento nas quantidades de ambos para a indução de certos processos morfogenéticos. A base molecular para o sistema de controle citocinina/auxina é desconhecido. Não está ainda totalmente elucidado o mecanismo de ação desses hormônios e faltam informações na organização e processos metabólicos do desenvolvimento (HALPERIN, 1973). Sabe-se que o AIA e as citocininas também atuam no controle de processos básicos no ciclo celular (PATAU *et alii*, 1954), bem como no crescimento celular, processos que não são necessariamente relacionados com as funções que estes hormônios tem na citodiferenciação e organogênese. Assim é difícil distinguir se um hormônio está influenciando alguns processos de desenvolvimento indiretamente por afetar, por exemplo, a taxa de divisão celular, ou se tem alguma influência direta por outra via. Esse problema tem sido parcialmente resolvido para citocininas com a recente demonstração por YAMADA *et alii* (1972), que as citocininas *levo* e *dextro-rotatórias* causam proliferação celular em fumo, sendo que apenas a *levo* causa a formação de gemas.

JABLONSKI & SKOOG (1954) demonstraram que para o cultivo de medula do caule de *Nicotiana tabacum* cv Wisconsin 38, havia necessidade da presença simultânea de AIA e uma outra substância desconhecida encontrada no leite de côco, no malte ou ainda em extratos aquosos de tecidos vasculares. Observava-se a ocorrência de alongamento celular, chegando as células a atingir um tamanho dez vezes superior ao inicial quando apenas AIA era adicionado ao meio. Para ocorrer a divisão celular *in vitro* era necessária a presença dos extratos citados anteriormente e AIA conjuntamente.

De acordo com HALPERIN (1973) inúmeros trabalhos vem confirmando a necessidade de um balanço sinérgico entre citocininas e auxinas para a indução de certos processos morfogênicos.

2.2. EFEITO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES NOS ORGANISMOS VIVOS

As informações disponíveis sobre efeitos das radiações ionizantes em plantas tem estado intimamente ligadas ao desenvolvimento das ciências físicas (GUNCKEL & SPARROW, 1961). A descoberta do raio-X por Roentgen em 1895; da radiatividade induzida por Curie e Juliot em 1934, e mais recentemente por muitos estudos associados com programas de energia nuclear tem todos contribuído e estimulado a inves

tigação dos efeitos biológicos das radiações ionizantes.

Segundo SPARROW (1957), para os primeiros 25 anos após a descoberta de Roentgen, uma média de 10 (dez) trabalhos por ano foram publicados quando comparados com a média de 200 (duzentos) trabalhos por ano entre 1950 e 1955.

De acordo com KLEIN & KLEIN (1971) as radiações ionizantes incluem frequências eletromagnéticas que podem causar a ionização da água, ou seja com comprimentos de onda abaixo de 100 nm e, todos estes comprimentos parecem induzir alterações qualitativamente idênticas nos seres vivos (ALEXANDER & LETT, 1967).

A ação das radiações ionizantes nas células pode ter efeitos diretos e indiretos (EBERT, 1960). GRAY (1959), estimou que cada ionização direta afeta uma ligação química para cada 10^5 ligações e, dependendo do alvo atingido, o dano é agravado, reparado ou transitório (LAMARQUE, 1952).

O modo indireto de ação das radiações é devido a ionizações da água da célula, causada pela passagem dos elétrons através da célula criando íons os quais então reagem com moléculas ou estruturas alvo. Essas entidades são substâncias altamente reativas (PATT & BRUES, 1954) principalmente oxidantes (BELOKONSKII e RUSEU, 1959) que se formam ao acaso ou ao longo da trajetória da água da célula ou

por excitação de proteínas, ácidos nucleicos ou outras ma
cromoléculas (CALDECOTT, 1961). Em adição a radicais |H| e
|OH| outras partículas carregadas podem ser formadas a par
tir da água e de moléculas orgânicas e inorgânicas (WOOD,
1958; DAITON, 1959; ALEXANDER & LETT, 1967).

Para avaliar a importância relativa dos mo
dos direto e indireto de ação das radiações tem-se realizado
do experimentos paralelos no material biológico, no seu es
tado hidratado. Desse modo, assegura-se a quantidade de
água adequada para difusão dos produtos reativos a partir
do curso da ionização. Alternativamente utiliza-se o esta
do seco onde os níveis de água são presumivelmente inade
quados para propagar radiação.

A classificação em efeitos direto ou indireto
to, tem valor na interpretação da modulação da resposta pós
-irradiação. A energia de um fóton de raio gama ou frequência
do raio-X é suficientemente grande para que sítios al
vos sensíveis e especialmente críticos possam ser permanentemen
temente danificados (EVANS, 1968).

De acordo com GUNCKEL & SPARROW (1961), os
efeitos usualmente ocorrem durante a irradiação ou pouco de
pois. No entanto, efeitos secundários ou terciários fre
quentemente seguem-se de imediato e são considerados como
uma alteração da taxa normal ou cessação de alguns proces

tos fisiológicos vitais. MEISSEL (1956), afirma que a dimi
nuição na síntese de compostos orgânicos mais complexos for
mados pelas células provavelmente ocorre devido a distúr
bios na fonte de energia (ATP). Além disso, as células po
dem estar protegidas por certos fatores como a quantidade
de água e a diluição de materiais competidores, metabóli
tos, pH, temperatura, inibidores de enzimas e outros.

Estudos radiobiológicos com vegetais, tem sii
do feitos principalmente com plantas intactas (BAJAJ, 1971),
e mais recentemente tem sido utilizada a técnica de cultura
de tecidos (OPTRANY, 1974) onde os efeitos das radiações po
dem ser alterados por variações nas condições experimentais
(QUASTLER & BAER, 1950).

BAJAJ (1970), fez estudos comparativos sobre
o efeito da radiação gama em sementes, plântulas e culturas
de calos de *Phaseolus vulgaris* L., concluindo que as célu
las dos calos toleram doses maiores de radiação. Esse au
tor atribuiu a maior radiorresistência ao estado indiferen
ciado das células, simplicidade estrutural, diversos níveis
de ploidia e menor interdependência celular.

OPTRANY (1974) pesquisou o efeito da radia
ção gama (1 a 150 Krads) em explantes medulares de *Nicotia*
tabacum cv Wisconsin 38 e verificou que os mesmos eram
mais sensíveis à radiação do que os calos provenientes do

mesmo tipo de tecido de um outro cultivar, Virginia Bright Italia mantidos em cultura durante três anos. Atribuiu a maior radiorresistência dos calos à maior mixoploidia e ao estado fisiológico.

Em 1983 FERREIRA pesquisou a possível reversão, por hormônios de crescimento, dos efeitos deletérios causados pela radiação gama em tecidos foliares internodais e calos de cana-de-açúcar. Os resultados sugeriram que houve a recuperação de danos causados pela radiação permitindo o desenvolvimento da cultura de calos na razão cinetina/ AIA (1 mg/l:1 mg/l).

2.3. AÇÃO DA RADIAÇÃO SOBRE PROTEÍNAS, AMINOÁCIDOS E CARBOIDRATOS

A síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes que iriam constituir um reparo ou restituição da estrutura e função normal de um sistema requer ATP, precursores e outros fatores metabólicos (KLEIN & KLEIN 1971).

Radicais livres são produzidos em materiais de plantas por radiações (EHRENBERG & EHRENBERG, 1958) e há proporcionalidade direta entre a concentração desses radi

cais e o grau de injúrias produzidos num sistema. Estimou-se que 50% dos danos em macromoléculas é causado por radicais livres (JOHANSEN & HOWARD-FLANDERS, 1965). BOTLER em 1959 , determinou que pode haver um dano extensivo nas bases de nucleotídeos por rompimento das pontes de hidrogênio.

Os efeitos de radiações ionizantes sobre ma cromoléculas são de considerável interesse em radiobiologia por diversas razões. Não apenas são muitas as macromoléculas necessárias, nos processos fisiológicos (por exemplo : ácidos nucleicos e enzimas) como também são muitas as que mantem a continuidade estrutural dos vários componentes do protoplasma (GUNCKEL & SPARROW, 1961).

Os efeitos químicos de radiações ionizantes em proteínas podem ser: oxidação (notadamente grupos sulfidril e hidroxil), liberação de grupos amino, ruptura das pontes de hidrogênio, ruptura de ligações peptídicas, liberação de cadeias laterais devido ao rompimento das ligações e formação de novas pontes. Essas mudanças químicas englobariam também mudanças nas propriedades das proteínas, como mudanças no peso molecular (polimerização e despolimerização), viscosidade, ponto isoelétrico, espectro de absorção , rotação ótica, condutividade elétrica, cor e odor ou sabor .

Enquanto há mudanças físicas e biológicas em proteínas irradiadas não há maiores perdas no conteúdo de

aminoácidos (SCHWEIGERT, 1959). Em geral, o tamanho da molécula está relacionado com a dose requerida para inativação, mas há muitos fatores interferentes como por exemplo, ordem e posição dos aminoácidos (BELAMY & LAWTON, 1954).

Para certas moléculas com atividade fisiológica a natureza química ou sítio específico de inativação é conhecido mas em muitos casos não (BACQ & ALEXANDER, 1955). Em proteínas, o sítio de danos pode ser uma porcentagem relativamente pequena da molécula toda (POLLARD *et alii*, 1955) e em geral altas doses de radiação são requeridas para detectar mudanças químicas ou físico-químicas.

CONSTANTIN & LOVE (1967), observaram um forte decréscimo no conteúdo de proteína em plântulas de *Vigna unguiculata* gama-irradiadas. POLLARD em 1964, postulou que a radiação bloqueia a transcrição de DNA e leva a um decréscimo na síntese de proteína e no crescimento. PONSER (1965) relatou por outro lado, que em *Chlorella pyrenoidosa* as células expostas à radiação gama na dose de 7.200 r/dia durante três dias, aumentaram em volume e também nas quantidades de DNA e proteína (por célula) o mesmo ocorrendo com RNA. Contudo, há indicações de que a síntese pode ser inibida (CHERRY, 1961), não afetada ou até aumentada (CAMARANO, 1963; CLARK e FERNANDES, 1961).

BAJAJ (1970), encontrou que a baixas doses

(0,5 a 1 Krads) não houve diferenças significativas para culturas de calos de feijão irradiados, entretanto a partir de 2 Krads houve um aumento gradual no nitrogênio total com o aumento da dose. Com o tempo o crescimento dos calos diminuiu. O aumento no N total foi considerado como devido às mudanças quantitativas no nitrogênio não proteico ou acúmulo de produtos do catabolismo.

Da mesma forma, enquanto KUZIN (1956) e HAGEN & GUNCKEL (1958) observaram uma depressão na síntese de proteína causada pela radiação, VASIL'EV *et alii* (1962) notaram um aumento poucos dias após a irradiação.

GIACOMELLI *et alii* (1967), encontraram variação na síntese de proteína em folhas de cevada irradiadas. Mediante o tratamento com cinetina o decréscimo no conteúdo de proteína foi menor nas folhas irradiadas particularmente para as mais altas exposições. A irradiação determinaria um aumento na permeabilidade dos tecidos, o que promoveria a penetração da cinetina aumentando sua efetividade ou então, a irradiação modificaria algumas vias metabólicas essenciais para a ação da cinetina na síntese de proteína.

IQBAL *et alii* (1973) observaram um aumento de aminoácidos livres em raízes de plântulas de milho após dez dias obtidas de sementes irradiadas com doses de 10 e

15 Krads. Nas folhas houve um decréscimo em todas as exposições sendo que houve um pequeno aumento quando a dose foi de 20 Krads. Ocorreu um aumento significativo nas concentrações de lisina e valina com 5 Krads.

Os mesmos autores observaram que o nitrogênio α -amínico em folhas, diminuiu em todos os tratamentos (exceto a 20 Krads) enquanto o Nitrogênio proteico aumentou significativamente em todas as doses.

Embora considerável atenção tenha sido dada aos efeitos induzidos pela radiação sob o aspecto citológico e da mutação, comparativamente poucos estudos tem sido relatados com respeito a fisiologia, considerando-se a respiração e metabolismo de carboidratos, (HABER, 1959; JORDAN, 1974, LEE, 1971).

WOODSTOCK *et alii* (1967), demonstraram que em milho, trigo, sorgo e rábano, as diferenças na respiração entre sementes gama-irradiadas e não irradiadas podem ser detectadas no período inicial da germinação.

INOWE *et alii* (1979) mostraram que a irradiação de 30 Krads em sementes de arroz, causou marcante inibição no crescimento de plântulas e levou a uma liberação de açúcares redutores. A razão C_6/C_1 continuou a decrescer por um período de 76 horas, enquanto a do controle não irradiado aumentou. A porcentagem de ^{14}C recuperado como dióxido de

carbono a partir de glicose-1-¹⁴C foi menor que nas sementes do controle indicando que a gama radiação reduziu a participação da via pentose-fosfato no catabolismo da glicose.

Estudando a germinação de sementes de cevada em água, KUROBANE *et alii* (1979), demonstraram que a radiação gama de 500 Krads aumentou a liberação de açúcares redutores em quatro vezes quando comparada com o controle não irradiado, particularmente da maltose e glicose. A radiação também estimulou a liberação de fosfato inorgânico a partir dessas sementes.

BAJAJ (1970), conduziu experimentos sobre o efeito da radiação gama no crescimento, conteúdo de RNA, proteína e nitrogênio em culturas de calos de feijão, onde encontrou que o crescimento dos tecidos foi estimulado por baixas doses (0,5 Krads). A partir de 1 a 10 Krads houve um decréscimo gradual e linear no crescimento. As células exibiram ampla variedade de formas e tamanhos, inibição mitótica, degeneração do citoplasma e reduzida eficiência de cultivo. De 20 a 30 Krads, o crescimento foi drasticamente reduzido seguido por morte e cessação do crescimento a 40 Krads. Com aumento na dosimetria, o conteúdo de proteína solúvel e RNA também aumentou. A doses baixas (0,5 - 1 Krad) não houve diferença significativa no N total, mas a partir de 2 Krads, ocorreu um aumento gradual no nitrogênio em termos de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco de calos.

2.4. UTILIZAÇÃO DE ISOENZIMAS NOS ESTUDOS BIOQUÍMICOS

O metabolismo de plantas superiores é regulado em parte pelo compartimento subcelular (KELLY *et alii* 1976, OAKS, 1970). Existem evidências de que a duplicação das vias metabólicas diferem na sua localização subcelular e na expressão durante os vários estágios metabólicos. Um exemplo dessa duplicação metabólica é encontrado nos tecidos fotossintéticos onde certas enzimas das vias glicolítica e pentose-fosfato estão presentes tanto no citossol quanto nos cloroplastos (SINCOX & DENNIS, 1978).

Assim que a diferenciação celular progride, há uma contínua síntese e/ou degradação de enzimas específicas e proteínas estruturais.

Duas alterações principais encontradas na maioria dos organismos são as mudanças qualitativas e quantitativas na atividade enzimática das células (CURY, 1977).

O aparecimento de uma nova atividade enzimática ou o seu aumento no organismo pode ser resultado da síntese recente da nova molécula enzimática, ou da ativação de um precursor pré-existente da enzima.

Um grande número de enzimas exibindo formas

múltiplas é conhecido (SHANNON, 1968) e, as formas eletroforeticamente diferentes de uma enzima com idêntica função são conhecidas como isoenzimas (SHAW, 1969; SCANDALIOS, 1974; LEHNINGER, 1976 e WHITE, 1976).

Os fatores genéticos e fisiológicos que determinam a existência das várias isoenzimas de um tecido ou organismo não são conhecidos, mas representam um aspecto maior da questão do significado dos polimorfismos na evolução. O que se sabe é que o nível de regulação pode estar no gene ou numa via entre o gene e seu produto final - a enzima.

A determinação de padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas tem demonstrado ser um método útil para taxonomia de plantas (BOUTLER *et alii*, 1967; CLARE *et alii*, 1968; VAUGHAN & DENFORD, 1968).

WALDRON & GLASZIOU (1971), investigaram a herança de bandas de esterase em cruzamentos entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum* e os padrões dos híbridos de F₁ revelaram a presença de algumas ou de todas as bandas de isoenzimas de ambos os pais. Encontraram também uma consistência qualitativa nos padrões da enzima sendo que as primeiras sete bandas apareceram em todas as variedades de *Saccharum* estudadas.

THOM & MARETZKI (1970), também identificaram

com sucesso clones de cana-de-açúcar usando as enzimas peroxidase e esterase.

Em 1974 LIU *et alii*, encontraram que menos de 5% das plantas derivadas de cultura de tecidos apresentaram padrões de peroxidase que diferiam do clone original. Para plantas obtidas após a radiação gama, o número foi de 8%. Quanto aos padrões de esterase, o resultado foi similar àqueles do clone original.

De acordo com SHANNON (1968), as diferenças estruturais entre isoenzimas são devido a alterações na estrutura secundária, terciária ou quaternária dessas proteínas: a sequência de aminoácidos em essência é a mesma, e modificações nessa sequência não envolvem aminoácidos do sítio ativo, portanto não alteram a especificidade das enzimas pelo substrato.

A ocorrência de isoenzimas segundo SCANDALIOS (1974), é um fenômeno geral em todos os organismos e elas fornecem um sistema de marcador natural para se investigar uma variedade de problemas em genética, bioquímica e da biologia do desenvolvimento de plantas.

CROCOMO e CURY (1980) demonstraram com sucesso que duas isoenzimas: desidrogenase alcoólica (ADH) e desidrogenase málica (MDH) fornecem material útil para identificação de cana-de-açúcar uma vez que, ambas apresentaram

densidade e mobilidade relativa diferentes para um mesmo gel.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DOS CALOS

Toletes de aproximadamente 5 cm de comprimento foram lavados com água e detergente e, mantidos em banho a 50,5°C durante duas horas. A seguir foram imersos em solução de Qboa 10%, lavados com água estéril e plantados em bandejas contendo vermiculita esterilizada, umedecida com solução nutritiva de Hoagland (Tabela 1). Esse material permaneceu em câmara de crescimento Conviron a 28°C com fotoperíodo de doze horas, durante dezoito dias.

TABELA 1. Solução Nutritiva de Hoagland

Macronutrientes		Concentração (ml/l)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1M	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1M	2
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1M	6
KNO_3	1M	4
*Fe EDTA		1
Micronutrientes**		g/1000 ml
H_3BO_3		2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$		1,81
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0,08
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,22
H_2MoO_4		0,02

*Fe EDTA = 33,2 g de EDTA dissolvidos em 89,2 ml de NaOH 1N foram adicionados em 24,9 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em H_2O e completou-se o volume para: 1000 ml.

** = Utilizou-se 1 ml da solução de micronutrientes para: 1 litro de solução nutritiva.

Para induzir os calos as plântulas foram cortadas na base e as folhas descartadas, tanto quanto possível. Os caules foram seccionados e colocados num bêquer com água, lavados com água e detergente e imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial diluído à 20% (v/v) durante vinte minutos com agitação contínua. Após a lavagem com água destilada estéril foram colocados em solução de polivinilpirrolidona (PVP-1g/l) onde permaneceram durante três horas. Findo o período os explantes foram inoculados em meio condicionador de calos (M.C.) na presença de luz a 25°C e fotoperíodo de doze horas.

O meio condicionador (M.C.) de calos apresenta a seguinte composição:

- . Solução salina de Murashige e Skoog (1962)
- . Sacarose - 20g/l
- . Tiamina - 0,001 g/l
- . Inositol - 0,1 g/l
- . Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético - 0,003 g/l
- . Água de côco - 100 ml/l
- . Ágar - 8 g/l

O pH do meio de cultura foi 5,8.

Os calos utilizados nos experimentos do presente trabalho foram subcultivados pelo menos um ano (trans

ferências mensais no meio M.C.).

TABELA 2. Solução Salina de Murashige e Skoog (1962)

Sais	Concentração em g/l
1. NH_4NO_3	32,5
2. KNO_3	95
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37
5. KH_2PO_4	17
6. Na_2 EDTA	3,73
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78
H_3BO_3	0,62
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,23
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,86
7. KI	0,083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025

Foram utilizados 20 ml/l das soluções 1 e 2 e, 10 ml/l das soluções 3 a 7.

3.1.1. IRRADIAÇÃO DOS CALOS

A irradiação dos calos foi realizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba-SP, utilizando-se a fonte de ^{60}Co (Gamma Cell).

Para a irradiação, os calos foram distribuídos em placas de Petri estéreis, em número de cinco calos por placa. Foram empregadas três dosagens distintas de radiação gama: 0 Krads (usado como controle); 5 Krads e 15 Krads, sendo que a taxa de dose empregada foi de 110 Krads / hora; a distância entre as fontes 44 cms; o número de fontes 6, e o tempo de 2,7 e 8 minutos respectivamente para as doses de 5 e 15 Krads.

3.1.2. CULTURA DOS CALOS IRRADIADOS

Após serem irradiados os calos foram transferidos para frascos contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura com a seguinte composição:

. Solução Salina de Murashige e Skoog	
. Sacarose	20 g/l
. Tiamina	0,001 g/l
. Inositol	0,1 g/l
. 2,4-D	0,003 g/l

. Arginina	0,060 g/l
. AIA	0,001 g/l
. Cinetina	0,001 g/l
. Água de côco	100 m/l
. Ágar	8,0 g/l
. pH	5,8

Os frascos contendo os calos permaneceram em sala de crescimento a 27°C com fotoperíodo de doze horas/dia durante 45 dias, sendo que a cada quinze dias, os calos eram transferidos para meio recém-preparado.

No final do período de crescimento foi determinado o peso da matéria fresca. Algumas amostras foram separadas para a realização da análise citológica (microscopia eletrônica) e, as demais foram liofilizadas para determinação do peso da matéria seca. A seguir, o material foi triturado em moinho ciclone tipo Al015 para posterior realização das análises bioquímicas.

3.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

3.2.1.1. *Extração de Carboidratos*

Os açúcares redutores foram extraídos pelo

método descrito por OCHOA-ALEJO (1980). Amostras de 100 mg de material liofilizado e pulverizado foram aquecidos em banho-maria a 85°C por quinze minutos com 4 ml de etanol a 80% e, logo após o resfriamento, centrifugado a 6000 rpm durante dez minutos. O sobrenadante foi coletado e reextraído por mais duas vezes com 3 ml de etanol, juntando-se no final os três extratos e completando-se ao volume de 10 ml com etaanol 80%. O sedimento foi reservado para posterior extração de proteína.

Os açúcares solúveis totais foram extraídos submetendo-se o extrato alcoólico (2 ml) à ação de 4 ml de HCl 0,75 N que hidrolisou os oligossacarídeos nele contidos à temperatura de 65°C durante trinta minutos. A seguir, esse hidrolisado foi neutralizado com 4 ml de NaOH 0,75 N e completou-se um volume de 10 ml com água destilada conforme modificações ao método de AMORIM e ZAGO (1978).

3.2.1.2. *Quantificação de Açúcares Redutores*

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado pelo método de NELSON (1944). Aliquotas de 0,2 ml do extrato foram colocadas em tubos de ensaio completando-se o volume a 0,8 ml com água destilada. Foram adicionados a cada tubo 1 ml do reagente cuproalcalino de SOMOGY (1945), agitando-se as misturas e aquecendo-se em banho-maria a 100°C

durante dez minutos. Após o resfriamento foi adicionado em cada tubo 1 ml do reagente de NELSON, agitando-se bem e juntando 4 ml de água destilada. A leitura foi feita a 530 nm em espectrofotômetro contra um branco preparado com água destilada em lugar da amostra. Os valores foram comparados com uma curva padrão de glicose.

3.2.1.3. *Quantificação de Açúcares Solúveis Totais*

A quantificação de Açúcares Solúveis Totais foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS *et alii* (1956). Aliquotas de 0,1 ml do extrato de açúcares solúveis em álcool foram colocadas em tubos de ensaio e completou-se o volume a 0,5 ml com água destilada. Juntou-se 0,5 ml de solução de fenol a 5% com agitação e, a seguir, acrescentou-se 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado. Após vinte minutos, as soluções foram lidas em espectrofotômetro a 490 nm contra um branco preparado com água destilada e os outros reagentes (fenol 5% e H₂SO₄).

Os valores da absorbância foram comparados (interpolados) com uma curva padrão de glicose.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS

3.2.2.1. Extração de Proteína

A proteína foi extraída com solução de NaOH 1 N, a partir do sedimento restante da preparação do extrato alcoólico para determinação de Açúcares Redutores e Nitrogênio Solúvel. Depois de separados por centrifugação a 6000 rpm, durante dez minutos, o sobrenadante foi coletado e o sedimento foi retomado em NaOH 1 N e, novamente centrifugado. Os líquidos resultantes das duas extrações foram colocados em balão de 10 ml completando-se o volume com NaOH 1 N, de acordo com OCHOA- ALEJO (1980).

3.2.2.2. Quantificação de proteína

A proteína foi determinada pelo reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com LOWRY *et alii* (1951). Em tubos de ensaio contendo 0,2 ml de extrato diluído cinco vezes (0,5 ml : 2 ml de H₂O) adicionou-se 2 ml do reagente tartarato cuproalcalino e 0,2 ml de água destilada, agitando-se rapidamente. Após dez minutos, acrescentou-se 0,2 ml do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N. Decorridos trinta minutos fez-se a leitura a 660 nm contra um branco substituindo-se o volume da amostra por água destilada.

A concentração de proteína foi calculada utilizando uma curva padrão feita com a fração V da albumina de soro bovino (BSA-Sigma Chemical Company).

3.2.2.3. Nitrogênio Solúvel em Álcool

O Nitrogênio Solúvel foi determinado pelo método de KABAT e MAYER (1967) no extrato alcoólico (item 3.2.). A mistura de reação consistiu em aquecer a 85°C por cinco minutos, 0,2 ml do extrato alcoólico com 0,4 ml do reagente de ninhidrina. Após o resfriamento acrescentou-se 2ml de etanol a 5% e procedeu-se a leitura a 570 nm em espectrofotômetro contra um branco preparado com água destilada em lugar da amostra.

Os valores da absorbância foram comparados com os valores de uma curva padrão de glicina.

3.2.2.4. Determinação do Nitrogênio Total

3.2.2.4.1. Digestão das Amostras

Amostras de 50 mg de material seco e pulverizado foram transferidas para balões Kjeldahl contendo 7 ml de solução digestora e submetidas à digestão até se obter uma solução incolor. A solução digestora continha: 1 g de selenito de sódio anidro; 21,39 g de Na₂SO₄; 4 g de CuSO₄.5H₂O

200 ml de H_2SO_4 concentrado e 175 ml de água (JORGENSEN, 1977).

3.2.2.4.2. Quantificação

O amônio de cada solução foi separado por destilação em presença de NaOH 12 N. A amônia foi coletada em um erlenmeyer contendo 10 ml da solução de ácido bórico e verde de bromocresol e vermelho de metila como indicadores. A seguir titulou-se a amônia com H_2SO_4 0,1 N até o indicador da solução mudar de cor.

A porcentagem de nitrogênio foi calculada a partir do volume de H_2SO_4 0,1 N necessário para titular o NH_3 da amostra.

3.2.2.5. *Quantificação de Aminoácidos Totais*

3.2.2.5.1. Preparo das Amostras

Amostras de material seco contendo 1,5 e 3,5 mg de proteína, foram hidrolisadas em 10 ml de HCl a $110^{\circ}C$ por vinte e quatro horas em ampolas à vácuo. Os hidrolisados foram passados por um filtro "Millipore" e o líquido obtido foi seco em evaporador rotatório a $50^{\circ}C$. O resíduo foi retomado em tampão citrato de sódio 0,2 N pH 2,2 (o tampão contém também 5 ml de tiodiglicol concentrado mais 0,1ml

de ácido caprílico por litro).

3.2.2.5.2. Quantificação

Aliquotas de 0,5 ml de cada amostra foram injetadas em um analisador de aminoácidos da Beckman mod. 120C equipado com uma coluna de resina P.A. 35 (23 x 0,9 cm) para aminoácidos básicos, e outra resina A.A. 15 (69 x 0,9 cm) para aminoácidos neutros e ácidos. A eluição de aminoácidos, da coluna P.A. 35, foi executada com tampão de citrato de sôdio 0,35 N pH 5,25, a um fluxo de 70 ml/h durante uma hora. Já para eluir os aminoácidos da coluna A.A. 15 usou-se inicialmente um tampão de citrato de sódio 0,2 N pH 3,25, por 85 minutos e, posteriormente, uma solução do mesmo sal e da mesma concentração mas com pH 4,25, durante 110 minutos. O fluxo de ambas as soluções foi de 70 ml/h. Cada aminoácido eluido se fez reagir automaticamente com a solução de ninhdrina a 70°C, e a cor desenvolvida foi registrada em papel, na forma de picos. A concentração de cada aminoácido foi calculada por comparação da área dos picos correspondentes com a dos padrões aplicados no analisador.

3.2.2.6. Isoenzimas

O método eletroforético utilizado para o es

tudo de isoenzimas foi descrito por ORSTEIN e DAVIS (1964) , que consiste na eletroforese em géis de poliacrilamida a 7%.

3.2.2.6.1. Preparo das Amostras

Cerca de 100 mg de material pulverizado (ca los com diferentes doses de irradiação) foram triturados com almofariz gelado com 1 ml de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e 10 µl de 2-mercaptoetanol 0,05%. Centrifugou-se a seguir à 7000 rpm durante trinta minutos em câmara fria e o sobrena dante foi transferido para frascos de vidro os quais foram mantidos a baixa temperatura.

3.2.2.6.2. Preparo dos Géis e Obtenção do Perfil Isoenzimático

A matriz eletroforética foi preparada imedia tamente antes do uso e, constituiu-se de dois géis com dife rentes concentrações de acrilamida: *uma superior de concen tração mais baixa (3%) sobreposto ao gel principal e de maior concentração (7%)*.

Os géis foram preparados em tubos de vidro cilíndricos com 0,5 cm de diâmetro e 8 cm de comprimento e, colocados numa cuba para eletroforese.

Foram utilizadas amostras de 20, 30 e 40 µl

do extrato proteico e como indicador da migração eletroforética usou-se uma gota de azul de bromofenol 1%.

A eletroforese foi realizada em câmara fria durante duas horas e a amperagem aplicada foi 1 mA/tubo durante trinta minutos e a seguir 3 mA/tubo durante uma hora e trinta minutos.

Terminada a eletroforese, os géis foram retirados dos tubinhos e incubados em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,0 durante cinco minutos e submetidos aos substratos específicos.

3.2.2.6.3. Determinação de Esterases

Para se determinar esterases os géis foram incubados numa solução corante contendo: α - naftil - acetato (0,2 mg/ml), "Fast Blue RR Salt" (0,5 mg/ml) e tampão fosfato 0,1 M pH 6,0.

3.2.2.6.4. Determinação de Malato Desidrogenase (MDH)

A seguinte solução foi utilizada para determinar-se a MDH:

- . malato de sódio (25 mM)
- . nitrotetrazolio azul (NBT - 0,2 mg/ml)
- . metassulfato de fenazina (PMS - 0,2 mg/ml)
- . Cianeto de potássio (0,5 mM)
- . Tampão fosfato de sódio (0,5 M, pH 7,0)

Para ambas as isoenzimas o tempo de incuba
ção no corante foi de vinte minutos na ausência de luz, após
o que os géis foram lavados em água corrente e colocados em
solução descorante contendo água, etanol e ácido acético na
proporção 5:5:1 (v/v/v).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 45 dias de incubação em meio de cultura com transferências quinzenais, as células dos calos com e sem irradiação apresentaram diferenças quanto ao crescimento e comportamento bioquímico.

No que diz respeito ao aspecto exterior, após os primeiros quinze dias de crescimento, surgiram nos calos irradiados pequenas pontuações escuras indicando áreas de necrose que se acentuaram com o decorrer do tempo, principalmente naqueles irradiados com a dose maior (15 Krads).

O escurecimento de calos em meio de cultura também foi observado por BAJAJ (1970) quando utilizou diferentes doses de radiação gama em calos de *Phaseolus vulgari*s L. O autor observou que os calos continuaram a escrecer com aumento da dose (0-40 Krads), sendo que o crescimento dos mesmos foi drasticamente reduzido entre 20-30 Krads e cessou completamente com 40 Krads.

Para avaliar o crescimento dos calos foram atribuídas notas individuais para cada calo (notas 1, 2 e 3) sendo que a nota três determina o calo que obteve maior crescimento em cada tratamento.

A Figura 1 mostra um calo de cada dose empregada ao qual foi atribuída a nota máxima após 45 dias de crescimento.

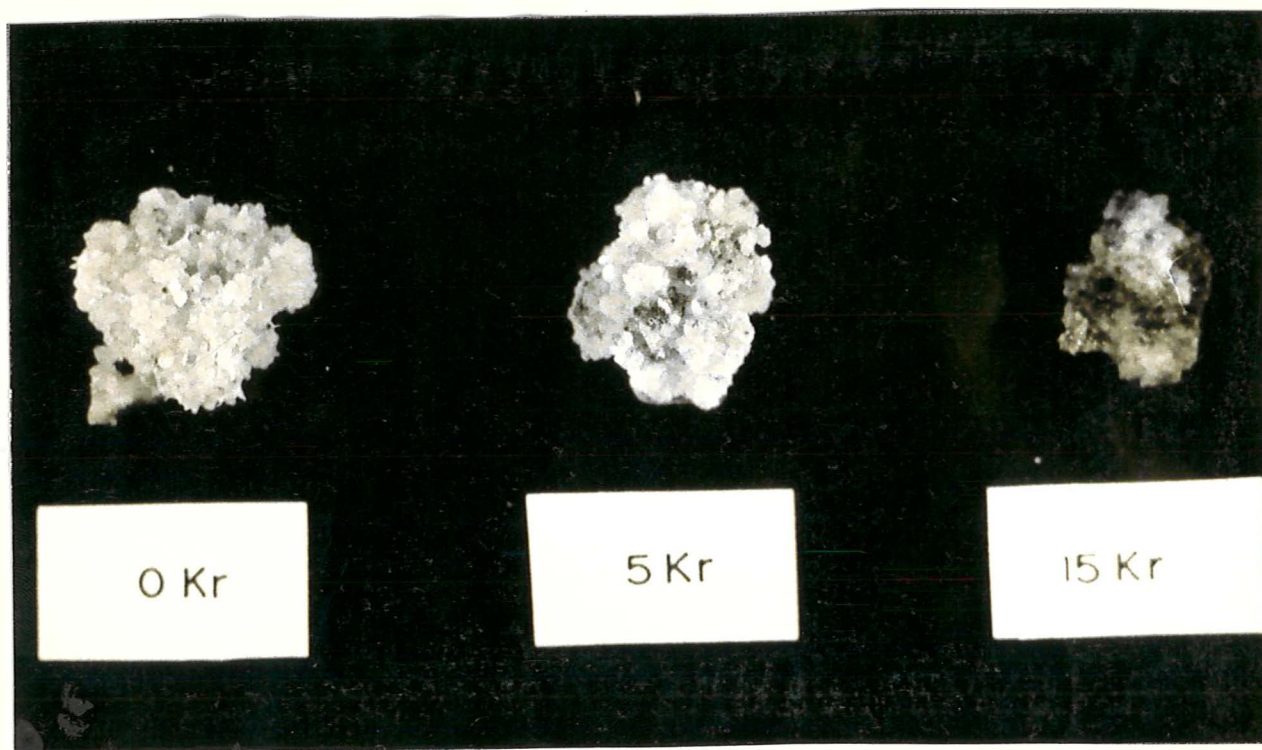


FIGURA 1. Fotografia de calos de cana-de-açúcar com três dosagens de radiação gama após um período de 45 dias de crescimento em meio de cultura. Os pontos escuros nos calos tratados com 5 e 15 Krads, indicam áreas de necrose.

A média ponderada das notas atribuídas aos três tratamentos em função da dose empregada e do período de tempo decorrido, está ilustrada na Figura 2.

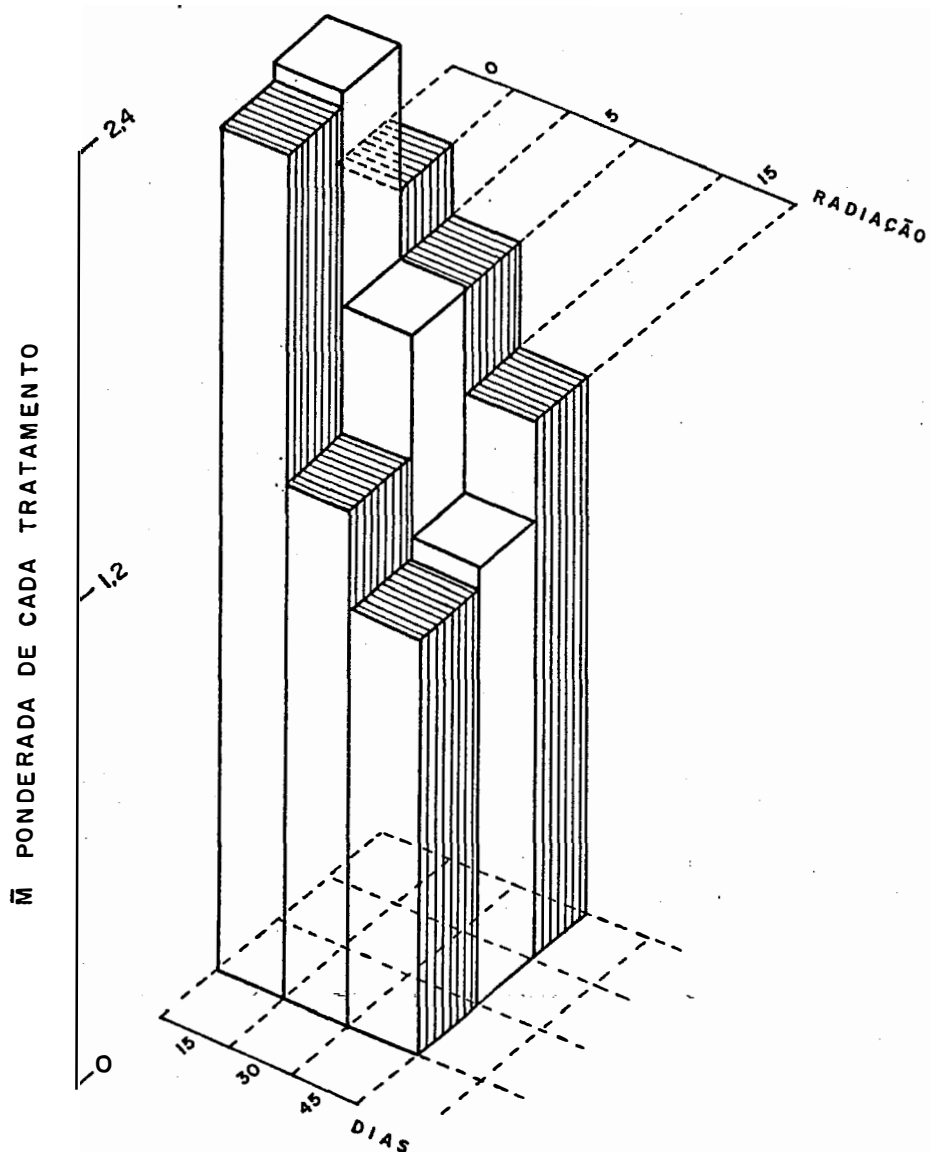


FIGURA 2. Crescimento dos calos de cana-de-açúcar em relação ao período de tempo decorrido e das doses de radiação gama empregadas (0, 5 e 15 Krads). Cada grupo de calos com diferentes doses foi dividido em subgrupos para melhor avaliação.

Quando se determinou a massa de matéria fresca dos calos observou-se que houve uma diminuição no peso dos calos irradiados quando comparados com o controle. O valor da massa de matéria seca, porém, praticamente não se alterou, conforme ilustrado na Figura 3.

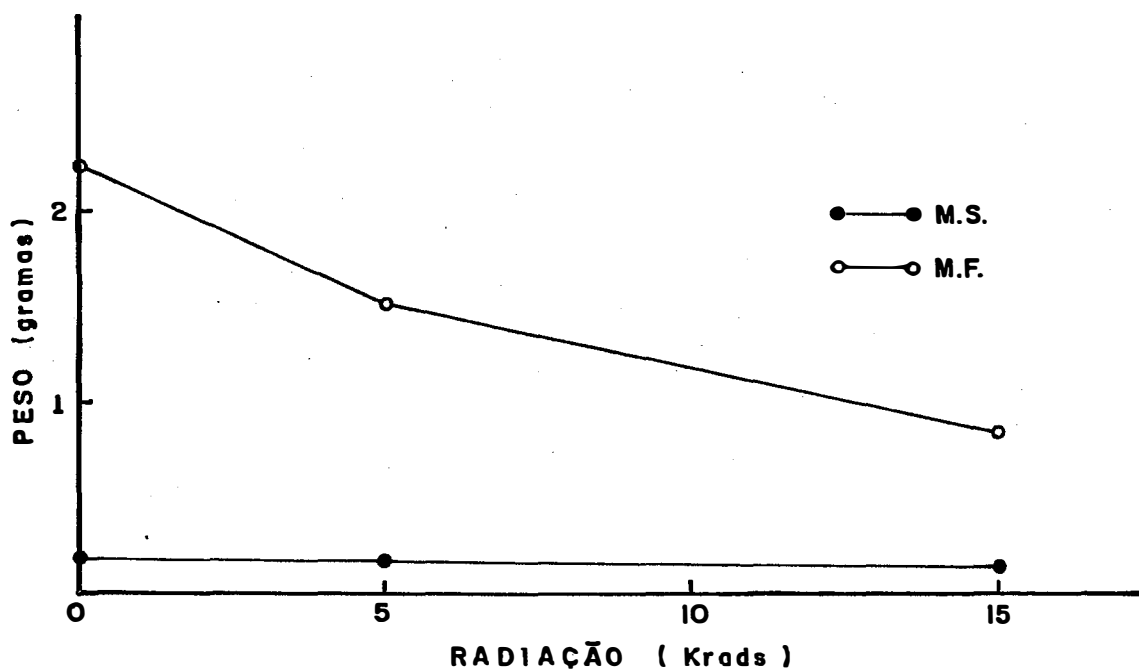


FIGURA 3. Valores da massa de matéria fresca e matéria seca (gramas) de calos de cana-de-açúcar após 45 dias em meio de cultura. (-o- = matéria fresca; -●- = matéria seca).

4.1. ANÁLISE AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO

As fotomicrografias de calos usados como controle (sem irradiação) mostram células com parede celular espessa, núcleo bem desenvolvido com presença de nucléolo e material nuclear denso. O citoplasma apresentou poucas inclusões e algumas mitocôndrias (Figura 4).

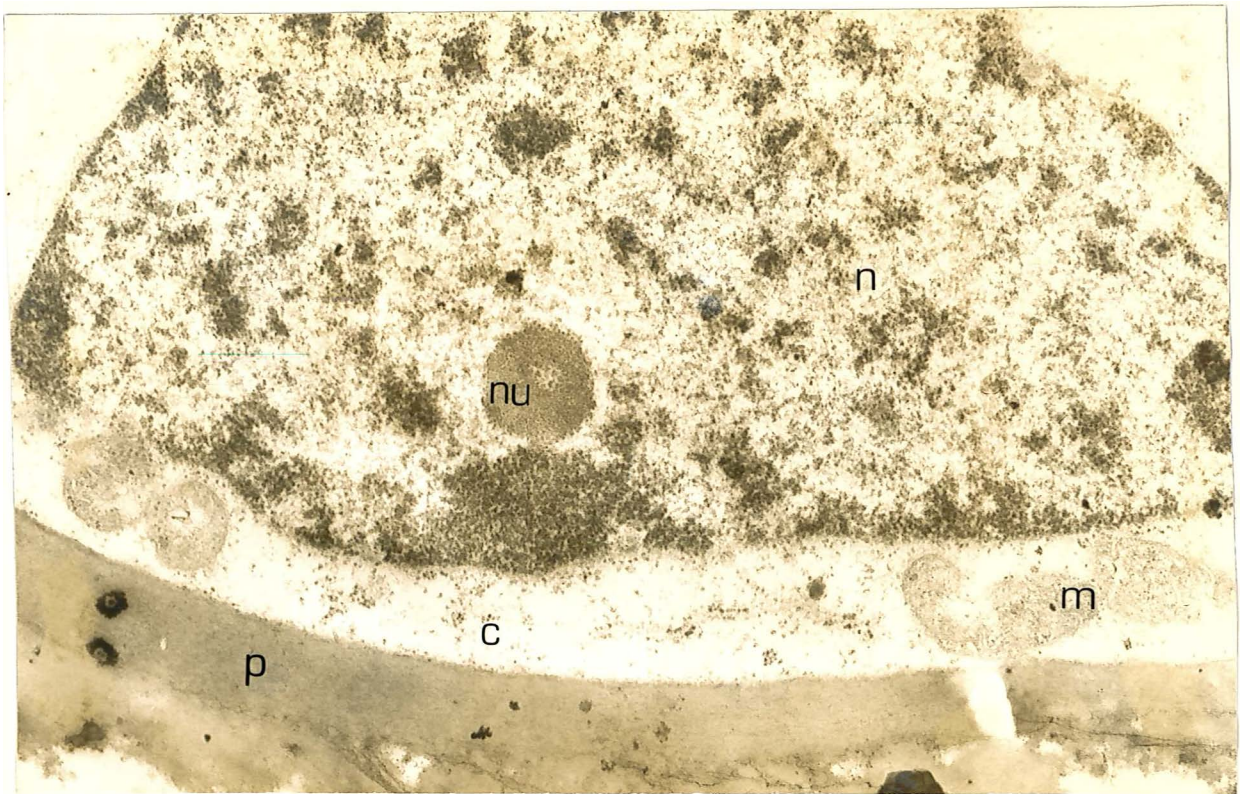


FIGURA 4. Fotomicrografia de calos de cana-de-açúcar como controle (sem irradiação). Aumento 15.956 vezes. N= núcleo; Nu= nucléolo; p= parede celular; m= mitocôndrias; c= citoplasma.

Naqueles calos irradiados com 5 Krads destaca-se no citoplasma uma grande aglomeração (granulação) de ribossomos acompanhado da presença de muitos vacúolos (áreas brancas), dando idéia de uma senilidade precoce. O núcleo apresenta-se binucleolado, de formato regular com material nuclear denso. Muitos mitocôndrios apresentam-se vazios (Figura 5).

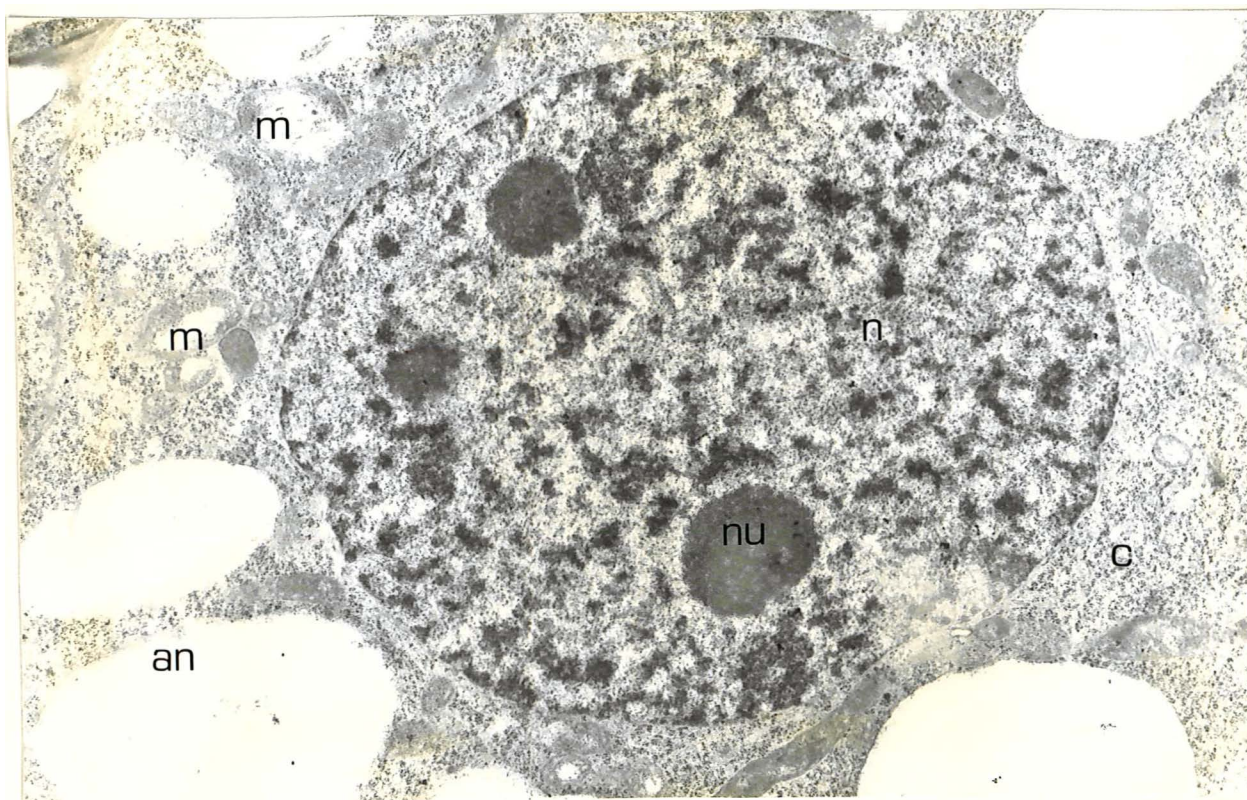


FIGURA 5. Fotomicrografia de calos irradiados com 5 Krads. Aumento 6.838 vezes.
an= áreas de necrose; n= núcleo; nu (nucléolos);
c= citoplasma e m= mitocôndrios.

Nos calos tratados com 15 Krads algumas características são relevantes. O citoplasma apresenta-se granuloso. A maioria dos núcleos mostram-se contorcidos e alongados (ou bizarros), sem nucléolos e situados mais próximos a uma das paredes celulares. Os mitocôndrios aparecem em número elevado em relação as outras dosagens e alguns deles apresentam forma anelada. Nota-se também a presença de vacúolos grandes com precipitações no seu interior. A Figura 6 nos dá uma visão parcial de quatro células separadas por paredes não muito espessas e sinuosas em algumas regiões o que caracteriza células em desenvolvimento.



FIGURA 6. Fotomicrografia de calos irradiados com 15 Krads. Aumento 11.397 vezes.
 p= parede celular; n= núcleos; c= citoplasma;
 v= vacúolo; m= mitocôndrios; rer= retículo endo-
 plasmático rugoso.

Quando se analisa as fotografias ao microscópio eletrônico, o que se observa é que a disposição do material celular nos tecidos irradiados (posição e formato do núcleo, organelas, espessura e forma das paredes celulares) sugere que aqueles tecidos tem um aspecto mais juvenil do que o do controle (0 Krads).

A fotografia do tecido irradiado com 15 Krads mostra três células aparentemente jovens, em franco desenvolvimento, com paredes e formação (pouco espessas e sinuosas), presença de retículo endoplasmático rugoso ativo e núcleo com formato a caracterizar esse estágio.

A célula irradiada com 5 Krads apresenta núcleo com formato regular e disposta no centro da célula com muitas organelas citoplasmáticas.

Por outro lado, naquele tecido usado como controle a célula parece estar em estágio de desenvolvimento avançado, com parede espessa, sem sinuosidades, retículo endoplasmático rugoso em estágio de degeneração e poucas inclusões citoplasmáticas.

Apesar desse aspecto mais jovem dos tecidos irradiados, a presença de mitocôndrios vazios e áreas de necrose (em 5 Krads) e a forma anelada dos mitocôndrios e vacúolos grandes com precipitações no seu interior (15 Krads),

indicam efeitos danosos da radiação.

O escurecimento observado nos calos ao final do período de 45 dias, principalmente naqueles irradiados com 15 Krads pode ter ocorrido devido a efeitos diretos da radiação sobre auxinas resultando na sua oxidação ou pela ação de polifenóis, ou mesmo pela ação da radiação inibindo algumas etapas do metabolismo de auxinas.

4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1. NITROGÊNIO TOTAL E SOLÚVEL, PROTEÍNA E AMI NOÁCIDOS

O teor de nitrogênio total nos calos irradiados com 5 Krads apresentou um aumento em relação ao controle, enquanto que com a dosagem maior (15 Krads) ocorreu um pequeno decréscimo.

Por outro lado houve um aumento no teor de Nitrogênio Solúvel, sendo esse aumento proporcional à dose de radiação empregada.

Quando se analisou o teor de proteína, verificou-se que houve um pequeno decréscimo em ambos os tratamentos com irradiação quando comparados ao controle, não havendo porém diferenças significantes entre os tratamentos

com 5 e 15 Krads.

Os resultados das análises de Nitrogênio Total e Nitrogênio Solúvel e proteínas estão ilustrados na Figura 7.

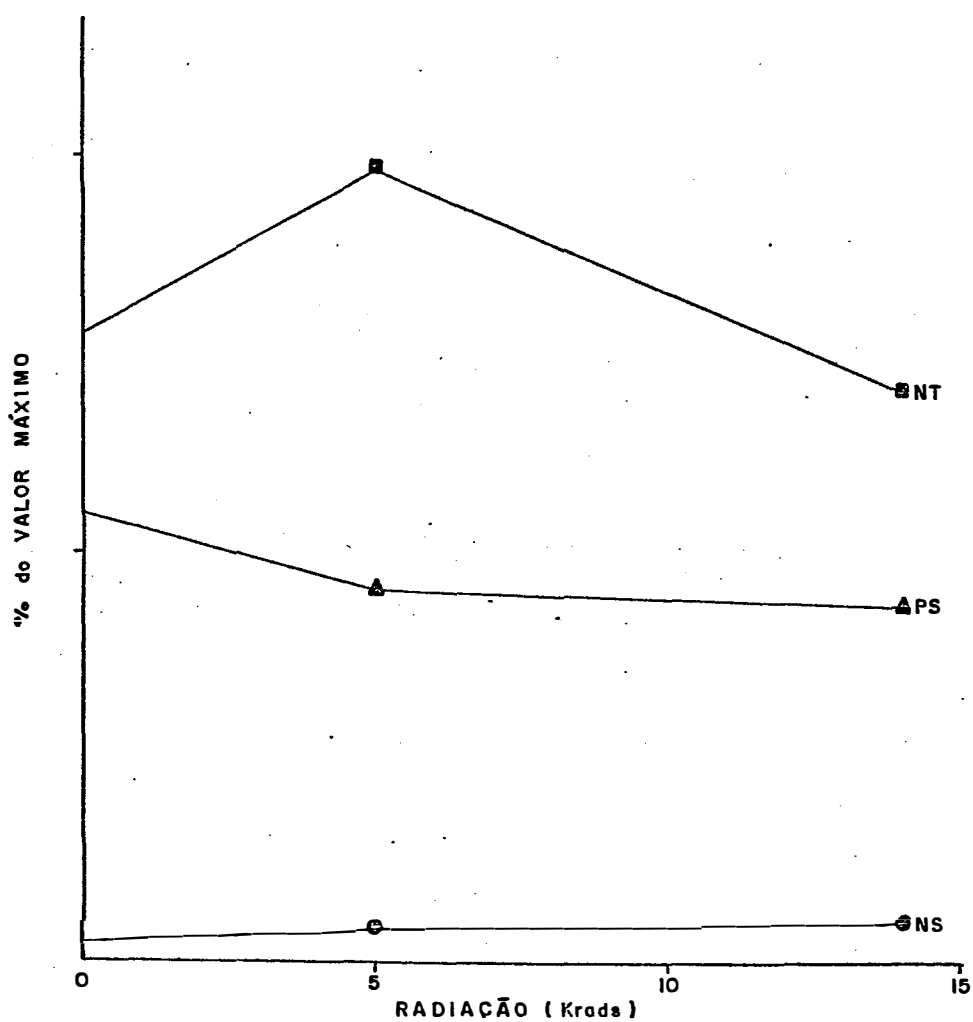


FIGURA 7. Valores relativos da concentração de Nitrogênio Total, Proteína Solúvel e Nitrogênio Solúvel na matéria seca de calos submetidos a diferentes doses de radiação.

Em 1970 BAJAJ demonstrou que não houve diferenças significantes no Nitrogênio Total a baixas doses de radiação gama (0,5 e 1 Krad) em cultura de calos de feijão, mas a partir de 2 Krads houve um aumento gradual com aumento na dosimetria. O autor observou ainda um decrêscimo no teor de proteína nas mesmas condições. Por outro lado, FOWLER e Mac QUEEN (1972), verificaram que não ocorreu nenhuma alteração no conteúdo de proteína em plântulas de trigo originadas a partir de sementes irradiadas. HAGEN e GUNCKEL (1958) também observaram que nenhuma alteração ocorreu no nível de proteína em fumo, mas o nível de aminoácidos sofreu aumentos significantes.

Os efeitos da radiação sobre a síntese de proteínas em plantas não estão ainda claramente definidos e GUNCKEL e SPARROW (1961), afirmam que há pouca razão para suspeitar que a síntese de proteína seja um processo crítico quando se considera danos causados pela radiação.

De acordo com IQBAL (1974), há resultados contraditórios quando se analisa o efeito da radiação em plantas com relação à síntese de proteínas e o mecanismo específico desse efeito não está claramente definido.

Quanto aos aminoácidos, como se pode verificar pela Tabela 3, os níveis dos mesmos mostraram-se praticamente inalterados.

TABELA 3. Teor de aminoácidos totais nos calos submetidos a três tratamentos (zero, 5 e 15 Krads). Os resultados apresentados, são a média de cinco amostras para cada tratamento.

Aminoácidos	Tratamentos g/100 g proteína		
	0 Krads	5 Krads	15 Krads
Lisina	4,47	4,34	4,30
Histidina	2,41	2,30	2,42
Arginina	2,23	2,28	2,53
Ac. Aspártico	12,91	12,03	10,28
Treonina	2,29	2,06	2,39
Serina	2,43	3,01	2,77
Ac. Glutâmico	7,76	6,90	8,62
Prolina	2,32	2,07	2,40
Glicina	6,97	7,89	7,69
Alanina	3,98	4,59	6,33
Valina	2,50	4,14	3,03
Metionina	0,30	0,39	0,31
Isoleucina	2,02	2,39	1,92
Leucina	3,6	4,54	4,07
Tirosina	2,23	2,24	2,06
Fenilalanina	1,88	1,91	2,16
Amônia	5,79	5,34	5,44

Respostas similares àquelas observadas para o efeito da radiação sobre a síntese de proteínas também são encontradas para o teor de nitrogênio e aminoácidos (BAJAJ, 1970).

4.2.2. ANÁLISE DOS CARBOIDRATOS

A análise dos níveis de açúcares tanto de Açúcares Solúveis Totais como Açúcares Redutores nos tratamentos com 5 e 15 Krads mostrou variações em relação ao controle.

O teor de Açúcares Redutores nos tratamentos com irradiação aumentou, principalmente quando os calos foram irradiados com 15 Krads, como pode-se verificar na Figura 8. Provavelmente isso tenha ocorrido devido a uma degradação de polissacarídeos estruturais provocados pela dose de radiação empregada. Aliás, como citado no item 2.2., WOODSTOCK (1967), notou diferenças na respiração entre sementes de diversas plantas irradiadas e não irradiadas; INOWE (1939) também observou liberação de Açúcares Redutores em sementes e plântulas de arroz em crescimento e KUROBANE (1979) notou uma liberação quatro vezes maior de Açúcares Redutores quando sementes de cevada foram submetidas a 500 Krads de radiação gama. Além disso, o número de mitocôndrios aumentou com o aumento na dose de radiação empregada.

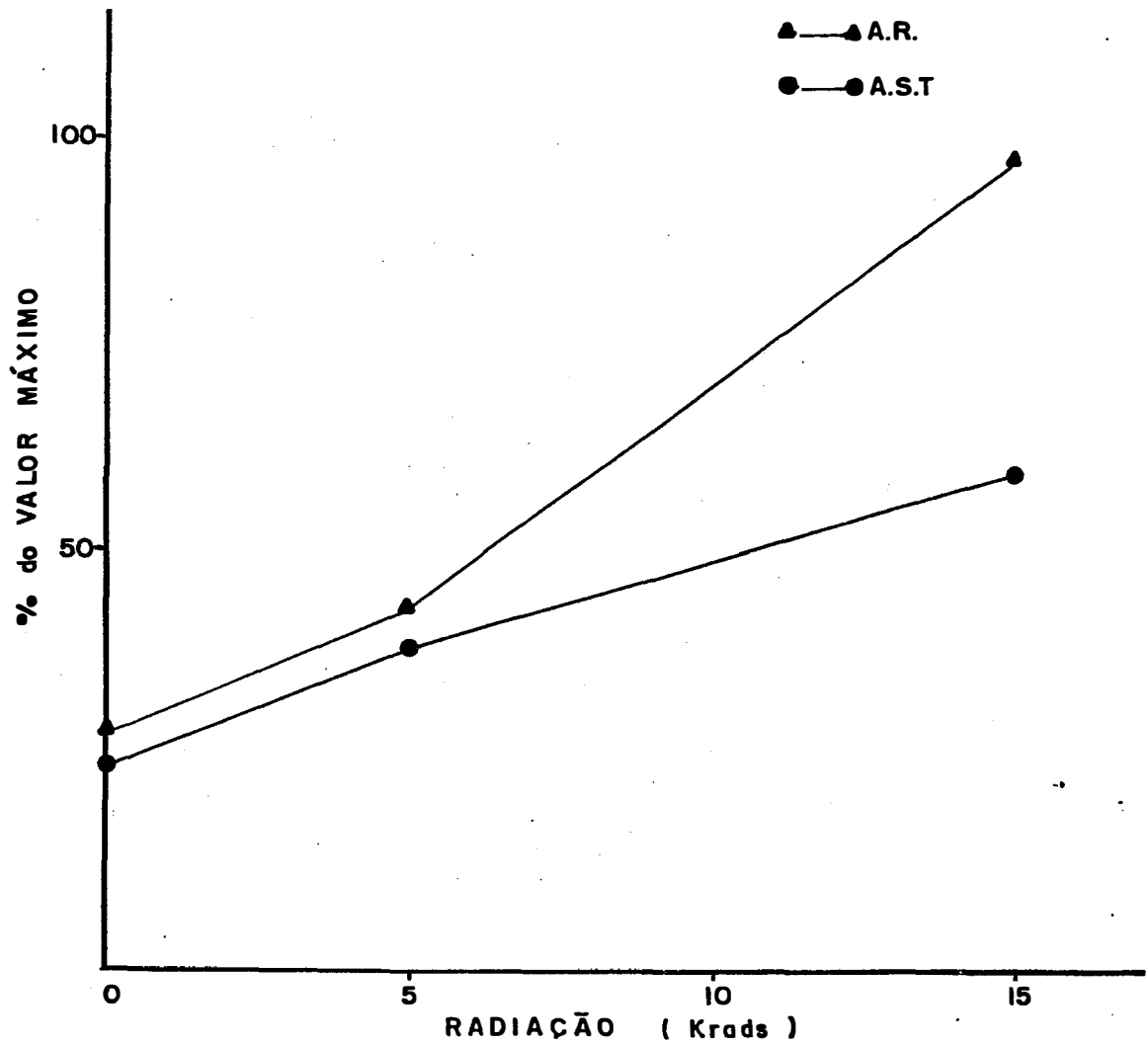


FIGURA 8. Valores relativos da concentração de Açúcares Redutores e Açúcares Solúveis Totais em matéria seca de calos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes doses de radiação.

A liberação de açúcares redutores nos tratamentos com radiação, pode indicar que, num esforço de sobrevivência, as vias de produção de energia aceleraram a hidrólise de carboidratos complexos até monossacarídeos mas estes não puderam ser aproveitados por outras vias devido a danos causados no material celular.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DE ISOENZIMAS

A análise eletroforética de isoenzimas mostrou que houve variações nos padrões de bandejamento de acordo com a dose de radiação empregada.

Para os dois primeiros tratamentos (0 e 5 Krads) a análise de desidrogenase málica (MDH) apresentou uma pequena faixa de coloração na parte mediana do gel, enquanto que para 15 Krads a faixa isoenzimática apresentou-se mais desenvolvida.

Os padrões de esterase variam nos três tratamentos como mostra o diagrama da Figura 9. Nos três tratamentos as bandas localizam-se em regiões definidas do gel e o número de bandas variou: 8 para o controle, 7 para 5 Krads e 5 bandas para 15 Krads.

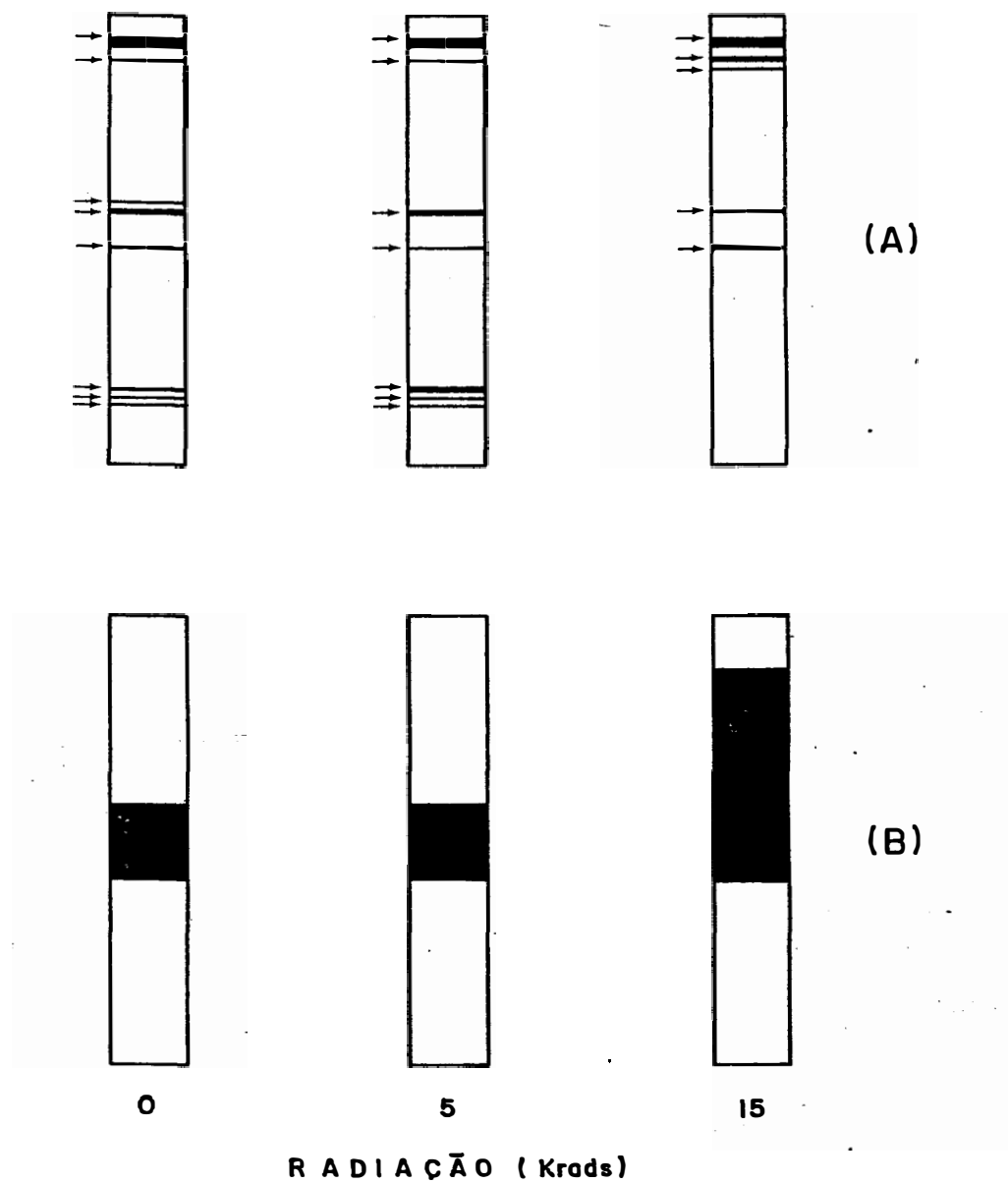


FIGURA 9. Diagrama de isoenzimas de esterase (A) e malato desidrogenase (B) obtidas por eletroforese em géis de poliacrilamida 7% (ORSTEIN e DAVIS, 1964) com três diferentes doses de radiação.

Esses resultados qualitativos e semi-quantitativos estão indicando que as doses de radiação gama empregadas tiveram um efeito sobre o perfil isoenzimático das células dos calos de cana-de-açúcar.

No caso de esterase as atividades das enzimas de maior peso molecular não foram afetadas pela dose de radiação, sendo que inclusive uma terceira faixa proteica foi observada no tratamento com 15 Krads. Entretanto, as isoenzimas de menor peso molecular foram afetadas, uma vez que as faixas correspondentes a elas não foram detectadas no material tratado com 15 Krads.

Essas observações sugerem que a ação de doses elevadas de radiação gama, possivelmente seja ao nível de síntese proteica, na transcrição, na tradução ou em ambos.

Como mostram as fotografias de células irradiadas com 15 Krads, as mesmas não apresentam aspecto de células com desenvolvimento normal e os núcleos aparecem distorcidos.

Dessa forma a radiação gama estaria interferindo no desenvolvimento fisiológico das células de cana-de-açúcar "*in vitro*", afetando o crescimento das mesmas.

Como se sabe as esterases são enzimas que

cindem ligações de éster de seu substrato em reações bioquímicas importantes no desenvolvimento celular, liberando grupos acetato que são o produto natural para a construção de esqueletos carbônicos.

Por outro lado, a atividade das isoenzimas de desidrogenase málica parece não ter sido afetada negativamente pelas doses de radiação gama empregadas, inclusive detectou-se uma faixa bem maior das mesmas, quando o tratamento foi com 15 Krads.

Como se sabe a malato desidrogenase tem função no metabolismo respiratório das células para a produção principalmente de oxaloacetato o qual condensa-se com Acetil-Coenzima-A e dá início ao Ciclo de Krebs. Os dados do presente trabalho, entretanto, não permitem especulações maiores referentes a ação da radiação gama no comportamento das isoenzimas de malato desidrogenase, apesar de que a larga faixa obtida com 15 Krads, possa estar indicando um efeito positivo. Além disso as fotografias ao microscópio eletrônico de calos irradiados com 15 Krads, mostram um grande número de mitocôndrios presentes, indicando uma atividade respiratória intensa.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitiu concluir que das doses de 5 e 15 Krads de radiação gama, às quais foram submetidas células de calos de cana-de-açúcar a dose de 15 Krads alterou o material celular ao nível de ultraestrutura, bem como o metabolismo de carboidratos e de proteínas inclusive o desempenho das isoenzimas de esterase e malato-desidrogenase.

A necrose e morte das células irradiadas com 15 Krads mostra que a síntese de compostos celulares importantes foi afetada.

A deformidade encontrada nos núcleos dessas células sugere que a síntese de proteínas não ocorreu de maneira normal como nas células não irradiadas. Por outro lado, organelas citoplasmáticas tais como mitocôndrios tem capacidade de se autoduplicar e observa-se então um grande nū

mero desta no citoplasma, o que justificaria a não diminuição no teor total de proteínas.

Apesar desses fatos, estudos mais detalhados são necessários com relação a influência da radiação sobre os diferentes componentes celulares ou mesmo sobre diferentes enzimas ou metabólitos importantes para o desenvolvimento das células.

6. BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, P. e J.T. LETT, 1967. Effects of Ionizing Radiation on Biological Macromolecules. In: *Comp.Biochem.* 27: 267-365.

AMORIM, H.V. e E.A. ZAGO, 1978. Análises para o Controle da Fermentação. Apostila do Departamento de Química. ESALQ/USP. Piracicaba, S.P. 26p.

BACQ, Z.M. e P. ALEXANDER, 1955. Fundamentals of Radiobiology. In: GUNCKELL, M. e A.H. SPARROW, 1961. Ionizing Radiations. *Encic. of Plant Physiol.* 16:555-611.

BAJAJ, Y.P.S.; A.S. SAETTLER e M.D. ADAMS, 1970. Gamma Irradiation Studies on Seeds, Seedlings and Callus Tissue Cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Radiation Botany* 10:119 - 124.

- BAJAJ, Y.P.S., 1970. Effects of Gamma Irradiation of Growth RNA, Protein and Nitrogen Contents of Bean Callus Cultures. *Ann. Bot.* 34:1089-96.
- BAJAJ, Y.P.S., 1971. Direct and Indirect Effects of Gamma Irradiation on Plant Tissue Cultures. Reprinted from: *International Symposium on Use of Isotopes and Radiation in Agriculture and Animal Husband Research*. New Delhi. p.830-839.
- BARBA, R. e L.G. NICKELL, 1969. Nutrition and Organ Differentiation in Tissue Cultures of Sugarcane, a Monocotyledon. *Planta.* 89:299-302.
- BELLAMY, W.D. e E.J. LAWTON, 1954. Problems in Using High Voltage Electrons for Sterilization. *Encic. of Plant Physiology.* 16:555-611.
- BELOKONSKII, I. e G. RUSEU, 1959. Significance of Oxidizing Process for Early Radiation Reactions. *Biophysica.* 4: 204-208.
- BOTLER, J.A.V., 1959. Changes Induced in Nucleic Acids by Ionizing Radiations and Chemicals. *Rad. Res.* (Supplemento). 1:403-416.

BOUTLER, D.; D.A. THURMAN e E. DERBYSHIRE, 1967. A Disc Electrophoretic Study of Globulin Proteins of Legume Seeds With Reference to their Systematics. *New Phytol.* 66:27 - 56.

BRAUN, A.C., 1959. A Demonstration of the Recovery of the Crown-Gall Tumor Cell With the Use of Complex Tumors of Single Cell. *Planta.* 89:299-302.

CALDECOTT, R.S., 1961. Seedling Height, Oxygen Availability Storage and Temperature: Their Relation to Radiation Induced Genetic and Seedling Damage. In: *Effects of Ionizing Radiation on Seeds.* IAEA. Austria.

CAMARANO, P., 1963. Effects of Ionizing Radiation on Protein Synthesis. *Atti Cong. Nazl. Radiobiolmed.* Trieste. 26-8pp.

CHERRY, J.H.; R.H. HAGEMAN; F.I. COLLINS e D. FLESHER, 1961. Effects of X-Irradiation on Corn Seeds. *Plant Physiol* 36:566-572.

CLARE, B.G.; N.J. FLENTJE e M.R. ATKINSON., 1968. Electrophoretic Patterns of Oxidoreductases and Others Proteins as Criteria in Fungal Taxonomy. *Austr. J. Biol. Sci.* 21:275-295.

- CLARK, T.D. e S.J.FERNANDES, 1961. The Effects of γ -Irradiation of the Protein Content of Apples and Peas. *Int. J. Appl. Radiation Isotopes*. 2:186-9.
- CONSTANTIN, M.J. e J.E.LOVE, 1967. Seedling Responses of *Vigna sinensis* (L.). Savi to Gamma and Neutron Seed Irradiation. *Rad. Bot.* 7:497-506.
- CROCOMO, O.J.; W.R.SHARP e L.S.CALDAS, 1975. Application of Nuclear Energy to the Study of Cellular and Developmental Biology. A Series. Vol.I. CENA-USP. p.181.
- CROCOMO, O.J. e J.A.CURY, 1980. Simultaneous Determination of the Isoenzymes of Alcohol Dehydrogenase and Malic Dehydrogenase in Sugarcane (*Saccharum* spp). *Energ. Nucl. Agric.* 2(1):74-77.
- DAITON, F.S., 1959. Chemicals Effects of Radiation. *Rad. Res. Suppl.* 1:1-25.
- DUBOIS, M.; K.A.GILLES; J.K.HAMILTON; P.A.REBES e F.SMITH, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- EBERT, M., 1960. Direct and Indirect Initial Effects on Biological Systems. In: *Comparatives Effects of Irradiation*. John Wiley & Sons, N.Y. 214-226pp.

EHRENBERG, L. e A. EHRENBERG, 1958. The Decay of X-Ray Induced Free Radicals in Plant Seeds and Starch. *Arch. Phys.* 14:133-141.

EVANS, H.J., 1968. Repair and Recovery at Chromosome and Cellular Levels: Similarities and Differences. *Brookhaven Sympos. Biol.* 20:111-133.

FERREIRA, J.H., 1983. Interação Radiação Gama x Reguladores de Crescimento no Desenvolvimento de Células e Tecidos de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp) "in vitro". (Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP).

FOWLER, D.B. e K.F. Mac-QUEEN, 1972. Effect of Low Doses of Gamma Radiation on Yield and Other Agronomic Characters of Spring Wheat (*Triticum aestivum*). *Rad. Bot.* 12:349 - 353.

GIACOMELI, M.; M.L. BELLI-DONINI e T. CERVIGNI, 1967. Effects of Kinetin on Chlorophyll Breakdown and Protein Levels in Irradiated Barley Leaves. *Rad. Bot.* 7:375-384.

GRAY, L.H., 1959. Conditions Which Affect the Biological Damage Resulting from Exposure to Ionizing Radiation. *Acta Radiol.* 41:63-83.

- EHRENBERG, L. e A. EHRENBERG, 1958. The Decay of X-Ray Induced Free Radicals in Plant Seeds and Starch. *Arch. Phys.* 14:133-141.
- EVANS, H.J., 1968. Repair and Recovery at Chromosome and Cellular Levels: Similarities and Differences. *Brookhaven Sympos. Biol.* 20:111-133.
- FERREIRA, J.H., 1983. Interação Radiação Gama x Reguladores de Crescimento no Desenvolvimento de Células e Tecidos de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp) "in vitro". (Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP).
- FOWLER, D.B. e K.F. Mac-QUEEN, 1972. Effect of Low Doses of Gamma Radiation on Yield and Other Agronomic Characters of Spring Wheat (*Triticum aestivum*). *Rad. Bot.* 12:349 - 353.
- GIACOMELI, M.; M.L. BELLI-DONINI e T. CERVIGNI, 1967. Effects of Kinetin on Chlorophyll Breakdown and Protein Levels in Irradiated Barley Leaves. *Rad. Bot.* 7:375-384.
- GRAY, L.H., 1959. Conditions Which Affect the Biological Damage Resulting from Exposure to Ionizing Radiation. *Acta Radiol.* 41:63-83.

- GUNCKEL, J.E. e A.H. SPARROW, 1961. Ionizing Radiations: Biochemical, Physiological and Morphological Aspects of their Effects on Plants. *Enc. of Plant Physiol.* 16:555-611.
- HABER, A.H. e H.J. LUIPPOLD, 1959. Dormancy Resulting from Gamma-Irradiation of Lettuce Seed. *Int. J. Rad. Biol.* 1: 317-327.
- HAGEN, J.L. e J.E. GUNCKEL, 1958. Free Aminoacids Levels Following Gamma Irradiation of *Nicotiana glauca*, *N. longsdorffii* and their Interspecific Hybrid. *Plant Physiol.* 33: 439-443.
- HALPERIN, W., 1973. The Use of Cultured Tissue in Studying Developmental Problems. *Can. J. Botany*, 51:1801-1806.
- HEINZ, D.J. e G.W.P. MEE, 1969. Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum* Species. *Crop. Sci.* 9:346 - 348.
- INOWE, M.; H. HASEGAWA e S. HORI, 1979. Glucose Metabolism in Gamma-Irradiated Rices Seeds. *Env. and Experim. Bot.* 20:27-30.

- IQBAL, J.; M. KUTAVEK e V. JIRAVEK, 1973. Effects of Acute Gamma Irradiation on the Concentration of Aminoacids and Protein-Nitrogen in *Zea mays*. *Rad. Bot.* 14:165-172.
- JABLONSKI, J.R. e F. SKOOG, 1954. Cell Elargement and Cell Division in Excised Tobacco Pith Tissue. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 7:16-24.
- JOHANSEN, I. e P. HOWARD-FLANDERS, 1965. Macromolecular Repair and Free-Radical Scavengering in the Protection of Bacteria Against X-Rays. *Rad. Res.* 24:184-200.
- JORDAN, W.R. e A.H. HABER, 1974. Cytokinins and Mitotic Inhibition in "Gamma-Plantets". *Radiation Botany.* 14:219-222.
- JØRGENSEN, S.S., 1977. Guia Analítico. Metodologia Utilizada para Análises Químicas de Rotina. Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP - Piracicaba, SP. 23p.
- KABAT, E.A. e M.M. MAYER, 1967. Experimental Immunochemistry. 2^a Ed. Charles C. Thomas Spring Field. p.506-563.
- KATO, H. e M. TAJEUCHI, 1963. Morphogenesis *in vitro* Starting From Single Cells of Carrot Root. *Plant Cell Physiology.* 4:243-245.

- KELLY, G.J.; E. LATZKO e M. GIBBS, 1976. Regulatory Aspects of Photossintetic Carbon Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:181-205.
- KLEIN, R.M. e D.T. KLEIN, 1971. Post-Irradiation Modulation of Ionizing Radiation Damage to Plants. *Bot. Rev.* 37 : 397-436.
- KUROBANE, I. e H. YAMAGUSHI, 1979. The Aspects of Gamma Irradiation on the Leaching of Reducing Sugars, Inorganic phosphate and Enzymes from Barley Seeds During Germination in Water. *Env. and Exp. Bot.* 19:41-47.
- KUZIN, A.M., 1956. Biochemical Fundamentals of the Biological Action of Ionizing Radiations. In: Reviews on Radiobiology. pp.4-125.
- LAMARQUE, P., 1952. La Restauration en Radiobiologie. *Presse Med.* 60:1039-1041.
- LEE, T.H.; W.B. McGLASSON e A.R. EDWARDS, 1971. Physiology of Discs of Irradiated Tomato Fruit. II. Incorporation of ^{14}C Labelled Respiratory Internediate. *Rad. Bot.* 11:137-142.

- LEHNINGER, A.L., 1976. Bioquímica. 2^a Ed. S. Paulo. *Editora Edgard Blücher Ltda.* Volume 1.
- LIU, Y.T.; S.S. CHEN; S. LEE; H.C. LEE, 1974. Detection of Isoenzymes in Sugarcane Leaves by Disc Electrophoresis *Proc. 15.th. Congress ISSCT* 2:1048-1057.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR e R.J. RANDALL, 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- MEISSEL, M.N., 1956. The Biological Effect on Ionizing Radiations on Microorganisms. In: Proc. of Int. Conf. of the Peaceful Uses of Atomic Energy. 11:227-243.
- MILLER, C.O.; F. SKOOG; F.S. OKUMURA; M.H. VON SALTZA e M. STRONG, 1955. Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division. *J. Amer. Chem. Soc.* 78:1375-1380.
- MULLER, H.J., 1927. Artificial Transmutation of the Gene. *Science.* 66:84-87.
- MURASHIGE, T. e F. SKOOG, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Phy*siol. Plant. 15:473-497.

- MURASHIGE, T. e R. NAKANO, 1966. Tissue Culture as a Potential Tool in Obtaining Polyploid Plants. *J. Hered.* 57:114-118.
- NELSON, N., 1944. A Photometric Adaptation of the Somogy Method for Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.
- OAKS, A. e R.G.S. BIDWELL, 1970. Compartmentation of Intermediary Metabolites. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:43-66.
- OCHOA-ALEJO, N., 1980. Efeito do Nitrogênio Nítrico, Amônia e de Uréia Sobre o Crescimento, Carboidratos e Compostos Nitrogenados em Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp ou NA 5679) Cultivada em Solução Nutritiva. (Dissertação de Mestrado - ESALQ/USP).
- OPTRANY, Z., 1974. Effect of Gamma-Radiation of the Growth of Primary and "Long-Term" Tissues Cultures (*N. tabacum* L.). *Biologia Plantarum*, 16:418-425.
- ORSTEIN, L. e B.J. DAVIS, 1964. Disc Electrophoresis. *Ann. N.Y. Ac. of Sci.* 121:321-40.
- PATAU, K.; N.K. DAS e F. SKOOG, 1954. Induction of DNA Syn

thesis by Kinetin and Indolacetic Acid in Excised Tobacco Pith Culture. *Physiol. Plant.* 10:949-966.

PATT, H.M. e A.M. BRUES, 1954. The Pathological Physiology of Irradiation Injury in the Mammal. I. Physical and Biological Factors in Radiation Action. In: *Rad. Biol.* I: 919-958.

POLLARD, E.C.; W.R. GUILD; F. HUTCHINSON e R.B. STELOW, 1955. The Direct Action of Ionizing Radiation on Enzyme and Antigens. In: *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry.* 5:72-108.

POLLARD, E.C., 1964. Ionizing Radiations: Effect on Genetic Transcription. *Science, N.Y.*, 146:927-929.

PONSER, H.B., 1965. Effect of Gamma Radiation on Growth, Colony-Forming Ability and Some Cellular Constituents of *Chlorella pyrenoidosa*. *Rad. Bot.* 5:129-141.

QUASTLER, H.M.D. e M. BAER, 1950. Inhibition of Plant Growth by Irradiation. V. Radiation Effects on Initiation and Completion of Growth. *Cancer Research.* 10:604-612.

SCANDALIOS, J.G., 1974. Isoenzymes in Development and Differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:225-58.

- SHANNON, L.M., 1968. Plant Isoenzymes. *Ann.Rev. Plant Physiol.* 15:187-210.
- SHAW, R.S., 1969. Isoenzymes: Classification Frequency and Significance. *Int. Rev. Citol.* 25:297-329.
- SHERIDAN, W.F., 1968. Tissue Culture of the Monocot. *Lillium Planta.* 82:189-192.
- SHEWEIGERT, B.S., 1959. The Effects on Radiation on Proteins. In: GUNCKEL, J.E. e A.H. SPARROW, 1961. *Ionizing Radiations. Enc. of Plant Physiol.* 16:555-611.
- SINCOX, P.D. e D.T. DENNIS, 1978. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Isoenzymes from the Developing Endosperm of *Ri*cinus communis L. *Plant Physiol.* 62:287-290.
- SKOOG, F. e C.O. MILLER, 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured *in v*tro. *Simposia of the Society for Experimental Biology* . 11:118-130.
- SOMOGY, N.A., 1945. A New Reagent for the Determination of Sugars. *Journal of Biological Chemistry.* Baltimore, N. Y., 160:61-68.

- SPARROW, A.H., 1957. Symposium on the Effects of Ionizing, Radiation on Plants. *Quart. Rev. Biol.* 32:1-2.
- STADLER, L.J., 1928. Genetics Effects of X-Rays in Maize . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 14:69.
- THOM, M. e A. MARETZKI, 1970. Peroxidase and Esterase Isozymes in Hawaiian Sugarcane. *Hawaiian Planters Record.* 58:81-94.
- VASIL, V. e A.C. HILDEBRANDT, 1965. Differentiation of Tobacco Plants from Single Isolated Cells in Microculture. *Science*, 150:889-892.
- VASI'LEV, I.M., 1962. Effect of Ionizing Radiation on Plants. AEC-tr-5836. Biology and Medicine 40-46. United States Atomic Energy Commission.
- VAUGHAN, J.G. e K.E. DENFORD, 1968. An Acrylamid Gel Electrophoretic Study on the Seed Proteins in *Brassica* and *Sinapis* Species With Special Reference to their Taxonomic Value. *J. Exptl. Bot.* 19:724-732.
- YAMADA, Y.; I. SEKIYA e K. KOSHIMIZU, 1972. Cytokinina -Induced Shoot Formation. *Phytochemistry.* 11:1019-1021.

WALDRON, J.C. e K.T. GLASZIOU, 1971. Isoenzymes as a Method of Varietal Identification in Sugarcane Proceedings of ISSCT - 249-256.

WILMAR, C. e M. HALLEENDOORN, 1968. Growth and Morphogenesis of Asparagus Cells Cultured *in vitro*. *Nature*. 217:369 - 370.

WHITE, A.; P. HANDLER e E.L. SMITH, 1963. Principles of Biochemistry.

WHITE, A.; P. HANDLER e E.L. SMITH, 1976. Principios de Bioquímica. 5^a Edição. Guanabara Koogan, R.J. 1070pp.

WOOD, T.H., 1958. Cellular Radiobiology. *Ann. Nuclear Sci.* 8:343-386.

WOODSTOCK, I.W. e O.L. JUSTICE, 1967. Radiation Induced Change in Respiration of Corn, Wheat Sorghum, and Radish Seeds During Initial Stages of Germination in Relation to Subsequent Seedling Growth. *Rad. Bot.* 7:129-136.