

**AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DO ENVELHECIMENTO DURANTE  
O CRESCIMENTO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus* spp. *in vitro***

**CANTÍDIO FERNANDO GOUVÊA**

Engenheiro Florestal

**Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciências Florestais.

**PIRACICABA**

**Estado de São Paulo - Brasil**

**Março - 2001**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP**

Gouvêa, Cantídio Fernando

Avaliação enzimática do envelhecimento durante a crescimento de brotações de  
*Eucalyptus* spp. *in vitro* / Cantídio Fernando Gouvêa. - - Piracicaba, 2001.  
92 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.  
Bibliografia.

1. Atividade enzimática 2. Brotação 3. Clone de eucalipto 4. Crescimento vegetal  
5. Eletroforese em gel 6. Envelhecimento 7. Genética florestal 8. Propagação "in vitro"  
I. Título

CDD 634.9734

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Aos meus pais, Francisco Gouvêa (*in memoriam*) e Lydia Marques Gouvêa  
pela minha formação pessoal e profissional

*DEDICO*

A DEUS

Que se manifesta a cada dia em minha vida

*OFEREÇO*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Antonio Natal Gonçalves pela amizade, orientação e apoio em todas as fases da pesquisa.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Ciências Florestais, pela possibilidade de realização do curso de mestrado.

Ao Laboratório de fisiologia das árvores (ESALQ/LCF/USP), onde foi realizado o experimento.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, do Departamento de Biofísica da UNESP/Botucatu/SP, pelas sugestões e condições para a realização das análises bioquímicas.

Ao técnico de laboratório do Departamento de Biofísica da UNESP/Botucatu/SP, Edson Marcelo Bruder e amigos Adriana, Lurdinha, Maricê, pelo convívio, colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Seizo Mori, do Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal da UNESP/Botucatu/SP, pelas sugestões valiosas e pelo apoio.

Ao Professor Dr. Marcílio de Almeida, Dr. Marcelo Carnier Dornelas e à Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez pelas correções e sugestões para o texto.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Passos, do Departamento de Matemática e Estatística da UNESP/Botucatu/SP, pela orientação estatística.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação da ESALQ, pelo convívio e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais pelo excelente tratamento e amizade.

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia das árvores da ESALQ/USP, José Roberto Romanini, pela dedicação e amizade e aos colegas, Lúcia Menegon, Angela Ferrari, Beatriz de Matteo, Flávia Capaldi, Sandra Arruda, Vanderlei Stefanuto, Gustavo Maia Souza, pela amizade e incentivo.

A minha mãe Lydia, pelo apoio, otimismo e compreensão.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Desenvolvimento.....	5
2.2 O processo de micropropagação.....	6
2.3 Caracterização do envelhecimento e da senescência.....	7
2.4 Disparadores potenciais da senescência.....	11
2.4.1 Depleção de nutrientes.....	11
2.4.2 Reguladores de crescimento de plantas.....	12
2.4.3 Controle Estomatal.....	13
2.4.4 Controle genético.....	14
2.5 Avaliação e parâmetros de envelhecimento.....	15
2.5.1 Técnicas de caracterização do envelhecimento.....	15
2.5.1.1 Atividade enzimática.....	15
2.5.1.2 Outros indicadores e técnicas para o estudo da senescência.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Cultura <i>in vitro</i> .....	23
3.1.1 Preparo do material a ser mantido <i>in vitro</i> .....	24
3.2 Parâmetros analisados.....	24
3.2.1 Determinação das curvas de crescimento e do tempo máximo de acúmulo de matéria seca.....	24
3.2.2 Dosagens de proteínas solúveis totais.....	25
3.2.3 Eletroforese de isoenzimas.....	26
3.2.3.1 Preparo das amostras.....	26
3.2.3.2 Preparo do gel de amido.....	26
3.2.3.3 Coloração das enzimas.....	27
3.2.3.4 Obtenção dos dados isoenzimáticos.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Avaliação do período de crescimento <i>in vitro</i> .....	28
4.2 Análise das atividades isoenzimáticas.....	35
4.2.1 Fosfatase ácida (ACP).....	35
4.2.2 6-Fosfogluconato desidrogenase (6GPDH).....	41
4.2.3 Isocitrato desidrogenase (IDH).....	43
4.2.4 Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	45

4.2.5 Xiquimato desidrogenase (SKDH) .....	47
4.2.6 Malato desidrogenase (MDH) .....	49
4.2.6.1 Malato desidrogenase 1.....	49
4.2.6.2 Malato desidrogenase 2.....	52
4.2.7 Fosfoglucoze isomerase (PGI) .....	54
4.2.7.1 Fosfoglucoze isomerase 1.....	54
4.2.7.2 Fosfoglucoze isomerase 2.....	56
4.2.8 Peroxidase (PO) .....	58
4.2.9 Lecina aminopeptidase (LAP) .....	61
4.2.10 Proteínas solúveis totais.....	63
5. CONCLUSÕES.....	66
6. ANEXOS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

## LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Curvas de crescimento do conjunto de brotações dos clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio de cultura JADS, durante 119 dias de cultura.....	28
2	Aparência do meio de cultura JADS e das brotações de <i>Eucalyptus</i> spp. aos 7 dias de cultivo.....	29
3	Aparência do meio de cultura JADS apresentando o escurecimento do meio de cultura e a degeneração das brotações de <i>Eucalyptus</i> spp. aos 55 dias de cultivo. ....	30
4	Diferentes tonalidades de oxidação do meio de cultura JADS, aos 119 dias de cultivo, com detalhes da rizogênese presente nos clones A e C, e a clorose acentuada nas brotações dos clones D, E e F em <i>Eucalyptus</i> spp.....	31
5	Imagens dos géis de eletroforese de isoenzimas analisadas por densitometria pelo VDS. As linhas coloridas representam as amostras. O sentido de migração está designado pela seta. Letras iguais representam repetições de um mesmo clone. P=padrão. PGI1 e PGI2 são diferentes locos analisados da enzima fosfoglucoase isomerase.....	36
6	Imagens dos géis de eletroforese de isoenzimas analisadas por densitometria pelo VDS. As linhas coloridas representam as amostras. O sentido de migração está designado pela seta. Letras iguais representam repetições de um mesmo clone. P=padrão. MDH1 e MDH2 são diferentes locos analisados da enzima fosfoglucoase isomerase.....	37

7	Imagens dos géis de eletroforese de isoenzimas analisadas por densitometria pelo VDS. As linhas coloridas representam as amostras. O sentido de migração está designado pela seta. Letras iguais representam repetições de um mesmo clone. P=padrão.....	38
8	Curvas de tendência da atividade enzimática da Fosfatase ácida durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	39
9	Curvas de tendência da atividade enzimática da 6-Fosfogluconato desidrogenase durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	41
10	Curvas de tendência da atividade enzimática da Isocitrato desidrogenase durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	43
11	Curvas de tendência da atividade enzimática da Glucose-6-fosfato desidrogenase durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	45
12	Curvas de tendência da atividade enzimática da Xiquimato desidrogenase durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	47
13	Curvas de tendência da atividade enzimática da Malato desidrogenase-1 durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	50
14	Curvas de tendência da atividade enzimática da Malato desidrogenase-2 durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	52
15	Curvas de tendência da atividade enzimática da Fosfogluucose isomerase-1 durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	55

16	Curvas de tendência da atividade enzimática da Fosfoglucose isomerase-2 durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	57
17	Curvas de tendência da atividade enzimática da Peroxidase durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	59
18	Curvas de tendência da atividade enzimática da Leucina aminopeptidase durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	61
19	Curvas de tendência da concentração de proteínas solúveis totais durante 55 dias de cultura <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio JADS.....	64

## LISTA DE TABELAS

	Página
1	Descritivo dos clones de <i>Eucalyptus</i> spp..... 23
2	Tempo máximo estimado de acúmulo de matéria seca para os clones de <i>Eucalyptus</i> spp. em meio de cultura JADS, durante 119 dias de cultura..... 32
3	Porcentagem de atividade enzimática da Fosfatase ácida no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 40
4	Porcentagem de atividade enzimática da 6-Fosfogluconato desidrogenase no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 42
5	Porcentagem de atividade enzimática da Isocitrato desidrogenase no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 44
6	Porcentagem de atividade enzimática da Glucose-6-fosfato desidrogenase no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 46
7	Porcentagem de atividade enzimática da Xiquimato desidrogenase no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 48
8	Porcentagem de atividade enzimática da Malato desidrogenase-1 no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 51
9	Porcentagem de atividade enzimática da Malato desidrogenase-2 no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> ..... 53

10	Porcentagem de atividade enzimática da Fosfoglucose isomerase-1 no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> .....	56
11	Porcentagem da atividade enzimática da Fosfoglucose isomerase-2 no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> .....	58
12	Porcentagem de atividade enzimática da Peroxidase no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> spp, cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> .....	60
13	Porcentagem de atividade enzimática da Leucina aminopeptidase no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> .....	62
14	Porcentagem de proteínas solúveis totais no TMMS dos clones de <i>Eucalyptus</i> , cultivados em meio JADS <i>in vitro</i> .....	64

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ATP	Trifosfato de adenosina
BA	Benziladenina
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ABA	Ácido abscísico
GA	Ácido giberélico
AIA	Ácido indol acético
PGRS	Reguladores de crescimento de plantas em senescência
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
JADS	Meio de cultura
CM	Tampão gel/eletrodo citrato-morfolina
TC	Tampão gel/eletrodo tris-citrato
TB	Tampão gel/eletrodo tris-borato
VDS	Visual density system
TMMS	Tempo de máximo acúmulo de matéria seca
SKDH	Xiquimato desidrogenase
MDH	Malato desidrogenase
PGI	Fosfoglucoase isomerase
PO	Peroxidase
LAP	Leucina aminopeptidase
G6PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
6GPDH	6-Fosgluconato desidrogenase
IDH	Isocitrato desidrogenase
ACP	Fosfatase ácida



SOD	Superóxido dismutase
PAL	Fenilalanina liase
CO	Citocromo oxidase
GDH	Glutamato desidrogenase
“Wick”	Pedaço de papel de filtro Whatmam nº3, utilizados na absorção das amostras colocados nos géis.

## **AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DO ENVELHECIMENTO DURANTE O CRESCIMENTO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus* spp *in vitro***

**Autor: CANTÍDIO FERNANDO GOUVÊA**

**Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES**

### **RESUMO**

O gênero *Eucalyptus* é de grande importância para a silvicultura brasileira, principalmente as espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* e seus híbridos, que são plantados em extensas áreas e sob diferentes condições edafoclimáticas. Programas de melhoramento genético têm selecionado materiais superiores que são propagados vegetativamente, sendo a cultura de tecidos uma das técnicas de propagação utilizadas. O cultivo *in vitro* do eucalipto permite promover o seu rejuvenescimento, maximizar a sua propagação, e possibilita o estudo dos fenômenos fisiológicos relacionados à ontogenia, heterocronia e necessidades nutricionais. Assim, pesquisas sobre regulação gênica e sobre as atividades de enzimas ligadas a passos metabólicos essenciais são importantes para o processo produtivo. O presente trabalho teve por objetivo monitorar a variação do número de formas alélicas e das atividades de enzimas ligadas ao envelhecimento durante um ciclo de crescimento de brotações de *Eucalyptus* spp *in vitro*.

Dez clones foram estudados por um período de 55 dias, numa única subcultura, com amostras coletadas a cada 7 dias, utilizando-se um delineamento experimental inteiramente casualizado. A eletroforese de isoenzimas utilizada no estudo foi realizada em gel de amido a 13% (p/v), sendo avaliadas as seguintes isoenzimas: fosfatase ácida, peroxidase, glucose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, leucina aminopeptidase, malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, xiquimato desidrogenase e fosfogluose isomerase. Os géis foram digitalizados após coloração e

analisados posteriormente, sendo avaliado o número e densidade das bandas em cada amostra. As curvas de crescimento dos clones e os tempos de máximo acúmulo de matéria seca foram determinados para o monitoramento do crescimento dos clones. Estes resultados mostraram um padrão diferenciado de crescimento entre os clones e uma variação no acúmulo de matéria seca. As atividades enzimáticas medidas pela densitometria de bandas, mostrou grande amplitude durante o crescimento, mas não foi observada variação quanto ao número de bandas, exceto para a enzima peroxidase.

**ENZYMATIC EVALUATION OF THE AGING OF *Eucalyptus* spp. CLONE  
SHOOT GROWTH *in vitro***

**Author: Cantídio Fernando Gouvêa**

**Adviser: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves**

**SUMMARY**

The genus *Eucalyptus* is of major importance to Brazilian commercial forestry, specially *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* and their hybrids. Large plantations are found in a range of soil and climate conditions. Breeding programs have generated superior genotypes that are propagated vegetatively. Tissue culture is one of the techniques of choice. *In vitro* culture of *Eucalyptus* allows juvenile characteristics recovery, maximization of propagation rates and a better understanding of physiological phenomena related to ontogeny, heterochrony and nutritional demands. Under this approach, studies on gene regulation and on the activity of enzymes related to essential metabolic pathways are important to the productive process. This work aimed the assessment of the number of allelic forms and the activity of enzymes related to different metabolic steps, during an *in vitro* growth cycle.

Ten *Eucalyptus* clones were studied over a period of 55 days of culture. Samples were collected every 7 days. Growth curves were determined for all clones. The following isoenzyme systems were analysed: acid phosphatase, peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, leucyl amino peptidase, malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, shikimic acid dehydrogenase and phosphoglucoisomerase. Electrophoresis were undertaken using 13% (w/v) starch gels. A positive control was used in all gels. Gel images were digitalized after staining and than analysed. Each sample was evaluated concerning the number and density of bands. The results showed a differentiated growth pattern among the clones, specially the time of maximum dry matter accumulation. The enzymatic activity measured by band

densitometry has shown a large amplitude of variation during the culture period analysed, but there was no variation concerning the number of bands, except to peroxidase enzyme.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é amplamente plantados no Brasil em florestas comerciais. Atualmente, programas de melhoramento genético e a inovação da biotecnologia, vêm fazendo com que o *Eucalyptus grandis* seja cada vez mais estudado, visando o aumento da produção, tanto no campo (volume, adaptação, qualidade da madeira), como na indústria (rendimento aliado à qualidade final de produtos).

A seleção de genótipos superiores, aliada à tecnologias recentes como a produção de transgênicos, requerem processos de propagação vegetativa eficientes que garantam a manutenção dos ganhos conseguidos pelo melhoramento ou pela transformação genética das plantas (Ferreira, 1992).

A propagação vegetativa é uma técnica promissora para o aumento da produtividade e da uniformidade do material a ser multiplicado comercialmente. As técnicas de macroestaquia (propagação via estacas), microestaquia (cultura *in vitro*) e, mais recentemente, miniestaquia (propagação de estacas rejuvenescidas) representam o universo da propagação vegetativa no Brasil (Gonçalves, 1982; Grattapaglia & Machado, 1990; Correia, 1993).

O processo de micropropagação propicia melhores condições para o estudo das interações fisiológicas e bioquímicas da planta com o ambiente. Isso se deve ao maior controle deste último no cultivo *in vitro*, permitindo que a planta manifeste sua expressão genética durante o processo de morfogênese. Uma vantagem é a capacidade de reverter a planta à condição juvenil, maximizando o processo de propagação vegetativa, além de propiciar condições para a transformação genética e obtenção de embriões somáticos (Hogberg et al. 1995).

Um dos principais fatores para o sucesso da micropropagação é a idade ontogenética das plantas, levando-se em conta a heterocronia (idade diferenciada das partes de uma planta) e os tipos de explantes utilizados para a cultura de tecidos (Trippi, 1990). Este aspecto é limitante para o sucesso na obtenção de plantas micropropagadas, principalmente em decorrência do envelhecimento e do estado de senescência dos materiais recém-introduzidos ou já em processo de multiplicação.

A senescência, juntamente com outros fatores como a vitrificação e a variação somaclonal, são os principais problemas para a manutenção de genótipos *in vitro* por longos períodos de tempo, sem comprometer a produção de mudas. O envelhecimento, que leva ao estado da senescência, é um fenômeno complexo por envolver parâmetros fisiológicos, bioquímicos e genéticos, muitas vezes controlados pelo ambiente e modulados pela ação dos hormônios da planta.

Existem poucos estudos sobre a senescência em *Eucalyptus*. Alguns indicadores bioquímicos dessa fase foram utilizados, como a produção de compostos voláteis (álcoois, cetonas e aldeídos), na caracterização da senescência em calos de *Eucalyptus polybractea* e *Eucalyptus robusta* (Benson, 1990). Outros indicadores como as poliaminas e o etileno foram utilizados para a caracterização do processo de envelhecimento e do estado geral da senescência em outras espécies (Mattoo & Aharoni, 1988). A oxidação de fenóis (Compton & Preece, 1986), a atividade de enzimas (Hirsch, 1990; Aradhya & Phillips, 1993 e 1995; Zeleneva, 1993), além da ciclagem de nutrientes (Matile, 2000) e fatores estimulantes como a temperatura, luminosidade e concentração de CO<sub>2</sub> (Herrmann & Feller, 1998), também foram apontados como indicadores do processo de senescência em vários grupos de plantas.

Na cultura de tecidos *in vitro*, a caracterização da senescência é mais complexa, uma vez que apenas partes da planta são cultivadas em meios artificiais, ricos em nutrientes e substâncias reguladoras do crescimento. Muitas vezes, o tecido vegetal em cultura é composto apenas de uma massa indiferenciada de células ou calo. A fisiologia de plantas mantidas *in vitro* torna-se diferente ao das plantas no campo, na medida em que a diferenciação e a formação de estruturas estão sob o controle de substâncias exógenas colocadas no meio de cultura. Desta forma, plantas *in vitro* podem

não passar por todas as fases do ciclo de vida, como é o caso de plantas propagadas via sementes que realizam naturalmente as fases juvenil, madura e senil em condições de campo. Partes da planta, como por exemplo as folhas, podem envelhecer e tornar-se senescentes, sem que seja necessária a indução deste processo na planta inteira.

A eletroforese de isoenzimas tem se mostrado promissora para o estudo do metabolismo nas diferentes fases do crescimento e da senescência em plantas (Torggler et al., 1995). Muitas enzimas, ligadas a passos metabólicos dessa fase, podem ser monitoradas quanto a variação do número e intensidade de formas alélicas. O autores acima, defenderam o uso das isoenzimas para estudos do metabolismo de plantas, não restringindo-o apenas ao estudo da variabilidade genética de populações.

O presente trabalho teve por objetivo monitorar o crescimento, diferenças genéticas e a atividade de enzimas, em brotações pouco desenvolvidas de *Eucalyptus* spp. *in vitro*, com ênfase ao processo de envelhecimento.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O *Eucalyptus grandis* tem sua ocorrência natural na Austrália, em povoamentos descontínuos e fragmentados, situados numa faixa estreita e costeira (Hall et alii. 1970 e Golfari et alii. 1978). No Brasil, a espécie encontrou condições ideais para o seu desenvolvimento, com grande adaptabilidade em diferentes regiões climáticas (Golfari, 1983). A espécie tem apresentado incrementos volumétricos significativos após a seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento genético.

Técnicas de macroestaquia, microestaquia e, mais recentemente, miniestaquia estão sendo utilizadas na propagação vegetativa de espécies florestais por inúmeras empresas do setor.

Um ponto crucial para a otimização do processo de propagação *in vitro* é a idade ontogenética dos materiais e, conseqüentemente, a reversão à juvenilidade, fazendo com que o material aumente a totipotência diante dos componentes nutricionais do meio de cultura, garantindo alta produção no processo de propagação (Gonçalves, 1982, Xavier & Comério, 1996). Muitas vezes, a manutenção do material *in vitro* acarreta problemas de operacionalização do sistema devido à necessidade de sucessivas transferências do material mantido *in vitro*. Esta necessidade decorre da exaustão dos nutrientes no meio de cultura, o que pode promover o envelhecimento dos tecidos e a queda na produção de mudas (Correia, 1993). A renovação do meio de cultura deve ser dimensionado de modo a permitir a produção do maior número de mudas com o menor custo.

## 2.1 Desenvolvimento

O processo de desenvolvimento de um organismo vivo inicia-se com a formação do zigoto, que através do processo de morfogênese, compreendendo o crescimento e a diferenciação, produz um indivíduo adulto (Ferri, 1985).

Definiu-se crescimento como o aumento do número e do tamanho das células de um organismo, e diferenciação como o aumento da complexidade das mudanças num organismo (Ferri, 1985). Outras definições são sugeridas para a diferenciação, como as mudanças que ocorrem na célula ou em um grupo delas, provocando uma distinção na estrutura e na função (Sussex, 1985). Esta definição tem implicações no âmbito intracelular, como no desenvolvimento de células com função especializada, e intercelular, como no desenvolvimento de órgãos, do embrião e da planta inteira. Em procedimentos de multiplicação vegetativa, o crescimento e a diferenciação continuam agindo em conjunto ou separadamente, em decorrência do resultado final desejado, ou seja, a conservação de calos indiferenciados *in vitro*, ou a manutenção de jardins clonais em viveiro ou em laboratório. A diferenciação depende, na maioria dos casos, de estímulos ambientais e genéticos, sendo, muitas vezes, os fitohormônios os responsáveis pela regulação gênica. Basicamente, as auxinas e as citocininas controlam a morfogênese *in vitro* que é modulada pelos demais hormônios como o ácido giberélico, o ácido abscísico e o etileno (Christou et al. 1989).

A avaliação do crescimento é feita por parâmetros quantitativos que variam no decorrer do ciclo de vida de um organismo. Pode-se avaliar o crescimento pelo aumento do tamanho, utilizando-se unidades de peso, volume ou área. Este aumento de tamanho pode ser decorrente do acréscimo do volume de protoplasma em uma célula ou ser o produto da multiplicação celular (Ferri, 1985).

Dias (1982) identifica seis fases que ocorrem durante o crescimento de uma cultura *in vitro*: a de indução, a de transição, a de crescimento exponencial, a de desaceleração do crescimento, a estacionária e, por fim, a de declínio do crescimento.

As plantas crescem e promovem seu desenvolvimento devido ao processo de conversão fisiológica da energia luminosa em energia química, conhecido

como fotossíntese (Hopkins, 1995). Este processo permite que a planta armazene carboidratos, lipídios e compostos de outra natureza, utilizados em várias vias metabólicas. Essas reservas, através de reações de óxido-redução, são convertidas em energia, principalmente na forma de ATP (trifosfato de adenosina), num processo conhecido como respiração. Portanto, uma planta se desenvolve graças aos processos de fotossíntese em órgãos específicos (folhas) e de respiração em todos os órgãos da planta. A relação entre esses processos é que vai permitir à planta a manifestação das diferentes fases do desenvolvimento, juntamente com a expressão da herança genética herdada dos pais (Hopkins, 1995; Ferri, 1985).

A respiração se dá principalmente pelo funcionamento de dois processos conhecidos como anabolismo (produção de componentes celulares) e catabolismo (desdobramentos e utilização destes componentes celulares). A intensidade do funcionamento de ambos os processos depende da idade fisiológica da planta. Durante a senescência, o processo de catabolismo é maior do que o de anabolismo e uma vez ultrapassado um limite crítico, conduz a planta à morte (Hopkins, 1995). O processo de catabolismo compreende vias metabólicas que agem conjuntamente durante as fases do desenvolvimento. Essas vias são conhecidas como a via da glicólise, a via da pentose fosfato, a via do ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tri-carboxílicos, a via da cadeia respiratória, além das vias dos desdobramentos dos lipídios e proteínas. Tais vias têm como objetivo converter compostos, principalmente reservas, em energia para o metabolismo celular. As reservas que se originam na fotossíntese são acúmulos de amido e glicose, que são consumidas pelo metabolismo durante o processo da respiração. De forma geral, na fase de senescência, o catabolismo aumenta, e a pentose fosfato tende a aumentar sua atividade. Também as vias degenerativas de lipídios e proteínas tornam-se mais ativas, podendo chegar a limites críticos e levar a planta à morte (Ferri, 1985; Hopkins, 1995).

## **2.2. O processo de micropropagação**

O processo de micropropagação se resume no cultivo *in vitro* de fragmentos denominados explantes, oriundos de diferentes tecidos e idades

ontogenéticas de uma planta (Gonçalves, 1982). Estes explantes, em sua maioria são gemas adventícias ou material epicórmico que são colocados em meio de cultura com nutrientes e hormônios para a formação de calos e, posteriormente, o desenvolvimento de novas plantas. Para *Eucalyptus* spp, as fontes de explantes são: meristemas de raízes, gemas apicais e segmentos nodais, sendo estes últimos a principal fonte de explante para a micropropagação de *E. grandis* (Correia, 1993).

O esquema padrão para sistemas de micropropagação foi proposto por Murashige (1974), dividindo-se em :

I – Seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

II – Multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas em meio adequado;

III – Transferência das brotações para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas para substrato ou solo.

Um dos aspectos de maior importância durante a micropropagação é a manutenção da uniformidade nos regenerantes (Evans, 1989). A perda da uniformidade pode ser decorrente da instabilidade genética, que pode atuar nos níveis citológico, bioquímico e molecular, produzindo, por exemplo, células poliplóides ou aneuplóides durante as sucessivas divisões mitóticas.

Um outro problema que pode ocorrer durante o processo de propagação *in vitro* é o efeito da vitrificação, que pode afetar a multiplicação de brotos e o vigor da cultura. Este fenômeno pode ter várias causas. Entre elas estão: o tipo de agente gelificante, a concentração e o tipo de fitohormônio, velocidade de crescimento, potencial de água, temperatura, luz, etc. Ainda são necessárias novas pesquisas para melhorar a compreensão do fenômeno da vitrificação (Hammerschlag, 1986).

### **2.3. Caracterização do envelhecimento e da senescência**

O envelhecimento é decorrente de mudanças fisiológicas na planta. Estas mudanças induzem o desenvolvimento heteroblástico, que é a expressão

morfológica de mudanças progressivas durante o envelhecimento dos meristemas (Goebel, 1989). Existem ainda diferenças morfogenéticas ao longo do crescimento dos brotos, resultando num gradiente de envelhecimento, denominado topófise. (Trippi, 1990). Este mesmo fenômeno foi referido como sendo um envelhecimento fisiológico dos meristemas (Schaffalitzky, 1959). Assim, o envelhecimento de meristemas pode ser definido como as mudanças qualitativas induzidas por fatores ambientais ou internos à planta sobre o potencial morfogenético, resultando no florescimento e na perda da capacidade de proliferação, com o avanço da senescência (Trippi, 1990).

Dinkel & Kleinschmit (1990), descreveram o envelhecimento como um fenômeno complexo que leva à severas conseqüências para a reprodução vegetativa e regenerativa, especialmente para as plantas arbóreas.

O envelhecimento *in vitro* pode ser descrito como a perda da competência celular, baixa na totipotência das células para diferenciação de estruturas, além de modificações morfológicas das células como lignificação da parede celular, clorose de estruturas que contenham clorofila, além de mudanças no metabolismo, com a produção de substâncias tóxicas e degenerativas. Essas substâncias podem ser metabólicas como fenóis, radicais livres e substâncias oxidadas, que podem degenerar as estruturas celulares (Rodríguez & Tamés, 1990).

A senescência de órgãos como as folhas, pode ser considerada como uma característica pré-determinada geneticamente. Em muitos casos, a ação dos genes é dependente dos fatores endógenos hormonais e principalmente de fatores estimuladores do ambiente tais como o fotoperíodo, a temperatura e a umidade, atuando conjuntamente na regulação gênica e no processo da senescência (Rodríguez & Tamés, 1990).

De acordo com Fortanier & Jonkers (1976), três aspectos estão relacionados ao envelhecimento em plantas: cronológico, ontogenético e fisiológico. Em termos cronológicos, o envelhecimento refere-se à passagem de tempo que se inicia desde a germinação da semente. O envelhecimento fisiológico ou somático se refere à perda na vitalidade durante o ciclo de vida da planta, terminando na morte. E o envelhecimento ontogenético ou maturação, é entendido como sendo programado

geneticamente e corresponde às diferentes fases do ciclo de vida de uma planta. A base fisiológica desse tipo de envelhecimento é pouco conhecida. Os três aspectos de envelhecimento citados agem conjuntamente e as suas interações ocorrem em diferentes níveis de influência. Até o momento, não há um tipo de marcador bioquímico ou fisiológico utilizado para a caracterização dos mesmos. Nenhum marcador geral foi estabelecido para fases distintas de crescimento e que sirvam para todas as espécies de árvores (Rodríguez & Tamés, 1990). Alguns marcadores foram estudados para o entendimento da mudança da fase de crescimento juvenil para adulto, mas em muitos casos esses resultados não têm o mesmo comportamento entre espécies diferentes (Millikan & Jankiewicz, 1966; Maclean & Robertson, 1981; Von Arnold & Roomans, 1983).

Os indicadores primários da senescência incluem a perda de clorofila, a proteólise, mudanças no nível de ácidos nucléicos, respiração alterada, e mudanças anatomicamente visíveis em relação às organelas (Benson, 1990). A degradação de clorofila foi um dos principais parâmetros para a avaliação da senescência, devido à facilidade com que esta característica pode ser avaliada visualmente nos órgãos. Desta maneira, a senescência pode ser definida como os processos coletivos que resultam na desestruturação metabólica e anatômica dos órgãos fotossintéticos da planta, com o propósito final de prover nutrientes necessários para suportar o crescimento das sementes para a geração seguinte (Benson, 1991).

Sinclair & Witt (1975), chamaram a senescência de um "processo auto-destrutivo" no qual as folhas da planta sacrificam o carbono e o nitrogênio para o benefício das sementes em desenvolvimento. Atualmente, é mais apropriado usar a expressão "recuperação coordenada de materiais". Noodén et al (1990) chamaram este processo de uma retirada ordenada durante as fases iniciais da senescência, para garantir à descendência, condições de se desenvolver e assegurar a sobrevivência da espécie.

A senescência de plantas anuais começa assim que as mesmas são estimuladas a florescer. Burke et al. (1984) relataram que plantas de soja macho-estéreis (*Glycine max* L. Merrill) senesceram ao mesmo tempo que plantas macho-férteis,

embora os botões florais fossem removidos regularmente. Os autores concluíram que o sinal de senescência teria que ter sido enviado antes do florescimento. Desta forma, o fitocromo estaria implicado potencialmente como um disparador precoce do processo de senescência. Van Doorn & Van Lieburg (1993) relataram que o amarelecimento das folhas de *Alstroemeria pelegrina* L. estava sob o controle do fitocromo, mediado pela síntese de giberilina. Krizek et al. (1966) relataram que a senescência das folhas de *Xanthium pensylvanicum* Walir. não era afetada pela remoção de flores ou frutos, contanto que fosse imposto um fotoperíodo apropriado para a espécie. Este resultado também poderia indicar o envolvimento do fitocromo.

Em pepinos (*Cucumis sativus* L.; Butler, 1967), folhas de cevada (*Hordeum vulgare* L.; Atkin & Srivastava, 1970) e em brotos de couve-de-bruxelas (*Brassica oleracea* L.; Dennis et al., 1967), os cloroplastos foram as primeiras organelas a sofrer degradação visível. Em *Betula verrucosa* Ehrb., o primeiro sinal anatômico de senescência foi o desarranjo da estrutura dos cloroplastos (Dodge, 1970).

Choe et al. (1975) desenvolveram uma visão compreensiva da sucessão da degradação dos cloroplastos e da clorofila em aveia (*Avena sativa* L.). O modelo envolve o desarranjo das membranas do cloroplasto, o ataque do complexo de clorofila-proteínas através de protease(s), e a degradação enzimática da molécula de clorofila propriamente dita. No entanto, o processo de senescência é iniciado aparentemente fora do cloroplasto (Choe et al. 1975). Makovetzki & Goldschmidt (1973) trabalhando com a planta aquática *Anacharis canadensis* Planch., concluíram que a síntese de uma proteína citoplasmática era essencial para a ocorrência da senescência dos cloroplastos. Os cloroplastos são os sítios primários da degradação visível das organelas e, aparentemente, esta degeneração está sob controle genético nuclear.

Park et al. (1973) acompanharam a formação de catabólitos oriundos da degradação da clorofila de 12 espécies e verificaram que o teor médio de fitol persistiu, enquanto o de nitrogênio era alterado. Os dados foram interpretados como uma evidência de que o programa de senescência é projetado para direcionar o nitrogênio para as sementes em desenvolvimento ou para a sua translocação para folhas

mais jovens. Outras pesquisas apontaram que a degradação da clorofila não foi o primeiro passo da senescência, e outros processos de origem proteolítica poderiam continuar até mesmo se a degradação da clorofila estivesse de alguma maneira atrasada. Thomas (1977) e Thomas & Stoddart (1975) relataram que a redução nos níveis de proteína de um mutante de *Festuca pratensis* Huds. não foi diferente da perda de proteína da *Festuca* normal, embora a taxa de degradação de clorofila dos mutantes fosse muito mais baixa. Mondal et al. (1978) relataram que em plantas de soja das quais todos os frutos foram removidos, apresentaram todos os aspectos da senescência, exceto a degradação de clorofila. Jeschke & Pate (1992) observaram que o movimento do nitrogênio e o declínio fotossintético das folhas de *Ricinus communis* L. precederam a perda de clorofila. Peterson & Huffaker (1975) concluíram em seus trabalhos que a enzima Rubisco era preferencialmente degradada, comparando-se às outras proteínas do cloroplasto, durante a senescência das folhas.

A técnica de remoção dos frutos, visando atrasar a senescência de uma planta deve ser considerada uma prática não generalista quanto aos resultados. A remoção dos frutos atrasou a senescência de folhas em arroz (*Oryza sativa* L.), enquanto que a mesma remoção dos frutos da soja afetou a fotossíntese e as taxas de transpiração, acelerando o processo da senescência. (Woodward & Rawson, 1976).

Brandner (1992) afirmou que o estudo sobre a senescência de plantas deve focar a degradação do próprio aparato fotossintético, em lugar da depleção de nutrientes das folhas fornecedoras. Vários dados das pesquisas apontam para a idéia de que os passos iniciais de senescência são proteolíticos, sendo que a degradação da clorofila parece ser um resultado conseqüente e secundário.

## **2.4. Disparadores potenciais da senescência**

### **2.4.1. Depleção de nutrientes**

Em plantas anuais, as folhas entram em senescência porque as sementes exigem nutrientes para o próprio crescimento, tendo prioridade sobre a manutenção das folhas. Neste sentido, as folhas perdem nutrientes diretamente através



do redirecionamento para as sementes, ou o faz indiretamente, perdendo na competição com as sementes pelos nutrientes que são oriundos do sistema radicular da planta (Noodén & Murray, 1982). Brandner (1992) relatou que em soja, a remobilização do fósforo das folhas não foi uma parte importante da senescência das mesmas, enquanto que o trabalho de Grabau et al. (1986) com soja cultivada em hidroponia, mostrou que a nutrição inadequada de P (fósforo) durante o período de crescimento das sementes levou à senescência das folhas. Seth & Wareing (1967) concluíram que a senescência não é um fenômeno somente devido à depleção de nutrientes. Okatan et al. (1981) relataram que este é um evento secundário, pois como observaram em seu estudo, a degradação da clorofila e de proteínas da soja já estava bastante avançada antes do amarelamento das folhas ser observado. Parece ser mais apropriado descrever a depleção de nutrientes das folhas da maioria das plantas como um resultado da senescência e não sua causa.

#### **2.4.2. Reguladores de crescimento de plantas**

A maioria dos dados na literatura quanto a um papel para os reguladores de crescimento de plantas em senescência é relativo às citocininas. Noodén & Leopold (1978); Shaw et al. (1965) relataram que aplicações de cinetina retardaram a senescência das folhas de trigo. Igualmente, benziladenina (BA) aplicada à folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) retardou a senescência (Fletcher, 1969). Noodén et al. (1990) estudaram o nível endógeno de citocinina em soja e encontraram uma correlação com a progressão da senescência mas não puderam estabelecer um papel iniciador para a citocinina.

Martin & Thimann (1972) concluíram que a síntese de uma enzima proteolítica seria o primeiro passo da senescência em aveia, e relataram que a aplicação de citocininas nestas plantas retardou a senescência, suprimindo a síntese da enzima proteolítica. Osborne (1962) observou que a cinetina aumenta a síntese de RNA e de proteína, retardando os efeitos da senescência. Lindoo & Noodén (1978) mostraram que aplicações de citocinina exógena retardaram, mas não paralizaram, a senescência em soja, não podendo assim ser implicada como o agente controlador de sua iniciação.

Radley (1976) observou o papel do ácido abscísico (ABA) nos efeitos da senescência de trigo e propôs que o ABA pode agir no aumento da expressão de genes que codificam enzimas degradadoras de clorofila. O ABA pode representar um agente estimulador da senescência, induzido pela redução da condutância estomatal.

Roberts & Osborne (1981) relataram que a biossíntese do etileno é regulada pela liberação de um cofator da membrana, podendo o mesmo estar envolvido na mediação da senescência. Beevers (1966) e Beevers & Guernsey (1967) observaram que o ácido giberélico (GA) pode retardar a senescência das folhas em *Rumex obtusifolius* L., sendo possível monitorar os níveis de GA durante a senescência das folhas.

Não há um padrão geral e convincente para os efeitos do ABA, GA e do IAA (ácido indol acético) na senescência de plantas.

### **2.4.3. Controle estomatal**

Gepstein & Thimann (1980), postularam que o fechamento dos estômatos de aveia causou a formação de ABA e acelerou o processo de senescência, enquanto que Colquhoun & Hillman (1972) apontaram evidências confirmadoras sobre este fato, sugerindo que o ABA possui um papel no controle da senescência mediado pelos estômatos. Vários outros autores relatam que o fechamento dos estômatos, podem produzir ABA e acelerar a senescência de plantas, funcionando como um gatilho primário do processo (Thimann & Satler, 1979; Hall & Milthorpe, 1978; Hall & Brady, 1977; Allison & Weimann, 1970).

Adedipe et al. (1971) observaram que a aplicação exógena de ABA manteve tanto os níveis de clorofila quanto a taxa fotossintética de feijão sem afetar a condutância dos estômatos. Neste caso, a condutância estomatal poderia estar relacionada a outros fatores, tais como: umidade e temperatura.

Numerosos relatos identificaram que o ABA tanto endógeno como exógeno é um controlador da condutância estomatal sob condições de seca (Bradford, 1983; Zhang et al. 1987). Neales et al. (1989) e Robertson et al. (1990) relataram que a

condutância estomatal pode não estar relacionada somente com a condição hídrica da planta, não podendo-se afirmar que a perda de turgor e uma falta de substâncias fotosintetizadas, possa ser o resultado do processo de senescência em plantas sob condição de seca. Existem evidências de que a condutância estomatal seja uma das primeiras respostas das plantas à seca, podendo os estômatos servirem como elementos controladores iniciais das respostas fisiológicas às condições ambientais que causam ou aceleram a senescência

#### 2.4.4. Controle genético

O trabalho de Thomas & Stoddart (1975) mostrou que mutantes de *Festuca* que permaneceram verdes por mais tempo do que o normal, mostraram um retardamento na degradação da clorofila, mas a atividade fotossintética foi reduzida como nas plantas não mutantes. Os autores interpretaram este desvio do padrão normal da senescência das folhas como uma evidência do controle genético sobre diferentes partes da planta quanto ao programa geral da senescência.

Trabalhando com vários mutantes de soja, Guamet et al. (1991) concluíram que o processo de senescência é controlado por vários genes. Tetley & Thimann (1975) determinaram que a senescência em aveia exigiu a síntese de proteínas como um pré-requisito para a degradação da enzima Rubisco e da clorofila. Essas proteínas evidenciam um componente genético no processo de senescência das folhas, principalmente no que diz respeito à síntese de enzimas proteolíticas.

Parece que muitas espécies de plantas estão programadas geneticamente para a senescência. Porém, a senescência é amplamente influenciada por parâmetros ambientais, como por exemplo: a intensidade de luz, a temperatura e o fotoperíodo (Haber et al. 1969; Goldthwait & Laestch, 1967) que, na maioria dos casos, são os agentes estimuladores dos genes relacionados à senescência. Esses estímulos sobre a maquinaria genética são decorrentes da ação dos hormônios, servindo como exemplos, a redução dos níveis de citocinina (Staden, 1973; Garrison et al., 1984; Lindoo & Noodén, 1978), ou o aumento dos níveis de ABA, cuja síntese pode ser

estimulada pelo ambiente. A busca por um único gatilho fisiológico é impedida pelas diferenças entre as espécies (Krizek et al. 1966) mas também pela natureza altamente coordenada da senescência.

Os dados dos trabalhos da literatura não deixam dúvidas de que a senescência foliar de plantas é regulada pelo nível de controle genético, porém não se conhece ao certo o que ativa esses genes. Provavelmente, uma interação complexa, fisiológica e ambiental possa disparar gatilhos genéticos induzindo os genes a agir. Esforços futuros devem ser conduzidos para desvendar a base molecular da ação dos genes nos mecanismos proteolíticos como a redução da atividade da Rubisco e a degradação da clorofila. Em resumo, a senescência é um processo altamente coordenado envolvendo a mobilização de novas proteínas cuja função específica é dismantelar preferencialmente proteínas previamente existentes (Grabau, 1995).

## **2.5. Avaliação e parâmetros de envelhecimento**

A caracterização completa do processo de senescência é de extrema complexidade por envolver aspectos genéticos, mudanças fisiológicas, mudanças morfológicas além das influências das condições ambientais. A literatura aponta vários fatores envolvidos no envelhecimento.

### **2.5.1. Técnicas de caracterização do envelhecimento**

#### **2.5.1.1. Atividade enzimática**

A atividade de enzimas e sua variabilidade genética são fundamentais para os estudos de fisiologia do metabolismo. A atividade enzimática e sua variabilidade podem ser monitoradas durante o desenvolvimento através do estudo das várias formas alélicas de uma enzima (Torggler et al. 1995). Estes estudos são conduzidos com técnicas de ensaio enzimático *in vitro*, para a atividade de enzimas. A avaliação genética baseia-se na separação de proteínas e enzimas num meio inerte, por

corrente elétrica, segundo a técnica conhecida como eletroforese. Para proteínas com atividade enzimática específica, este processo é conhecido como eletroforese de isoenzimas, permitindo avaliar formas alélicas diferentes de uma mesma enzima (Alfenas et al. 1991).

As formas alélicas observadas nos géis de eletroforese, são uma expressão primária do produto dos genes que compõem o DNA e portanto sofrem grande influência ambiental quanto à sua expressão, podendo representar passos metabólicos importantes ou condições de estresse do ambiente (Alfenas et al. 1991; Torggler et al. 1995).

Existem duas hipóteses sobre o papel fisiológico do polimorfismo enzimático. Uma baseada na especificidade dos substratos, e outra, que se estrutura nos mecanismos de regulação das reações do metabolismo (Torggler et al. 1995).

Diante das influências do ambiente e das condições do metabolismo, a eletroforese de isoenzimas pode ser vista como uma ferramenta potencial para o monitoramento das etapas do desenvolvimento de um organismo.

Torggler et al. (1995) afirmam que a atividade de uma enzima é apenas um dos componentes dentro de uma rede metabólica complexa e ampla, sendo que cada variante enzimática pode explicar somente uma pequena proporção da variância genotípica. Assim, as diferentes propriedades catalíticas das aloenzimas devem resultar em conseqüências metabólicas e fisiológicas diferentes.

Devido à complexidade que envolve a regulação da expressão gênica em termos de fenótipo final, muitas das informações sobre a significância adaptativa ou funcional de isoenzimas em plantas têm surgido, basicamente, em três linhas de pesquisa. A primeira consiste na pesquisa do controle da expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação celular; a segunda, estuda aspectos da estrutura e compartimentalização das enzimas, visando determinar filogenias; e a terceira, que tem sido mais explorada, baseia-se na genética de populações ou, mais particularmente, na associação entre heterozigidade e adaptação (Dykhuizen et al. 1987).

Scandalios (1969) discutindo sobre o possível papel fisiológico das isoenzimas, relata que, por definição, todas as isoenzimas de um determinado sistema enzimático deveriam desempenhar, essencialmente, a mesma função catalítica. Contudo, parece ser um desperdício para um organismo produzir formas moleculares múltiplas de uma mesma enzima, quando uma só seria suficiente para desempenhar uma dada função. A razão para a existência das isoenzimas poderia estar associada ao desempenho de funções diferentes dentro do organismo. Consequentemente, a associação da expressão dos locos isoenzimáticos aos diferentes tecidos e organelas durante o desenvolvimento pode sugerir muitas informações sobre o papel fisiológico das isoenzimas e sobre a sua regulação gênica.

Koehn et al. (1983) citaram que uma das formas de se tentar entender a relação entre polimorfismo e função enzimática seria pelo estudo dos mecanismos moleculares da adaptação.

Inúmeros experimentos apontam o uso de enzimas e isoenzimas nos estudos fisiológicos das mudanças morfológicas do desenvolvimento, indicando que as isoenzimas podem ter uma função no organismo, mas não foi possível dizer se a mesma é definida ou não. Existem ainda diferenças funcionais entre as isoenzimas de uma mesma enzima, porém, como isto ocorre não foi explicado ainda (Torggler et al. 1995).

Em relação ao metabolismo, há necessidade crescente de estudos que mostrem a relação entre heterozigidade e valor adaptativo. Estes estudos poderiam demonstrar que os heterozigotos para um loco enzimático deveriam ou não, ser mais capazes de se desenvolver e de se adaptar à ambientes variáveis em detrimento aos homozigotos, devido ao número reduzido de formas alélicas da enzima (Torggler et al. 1995).

Allemand et al. (1988) descreveram a caracterização enzimática de híbridos de nogueira maduros e rejuvenescidos. Seus resultados indicaram que o envelhecimento está relacionado a um funcionamento acelerado e assincrônico da enzima GDH e da enzima fenil alanina liase (PAL) sobre as enzimas G6PDH e 6GPDH, da via da pentose fosfato. Materiais rejuvenescidos modificaram este padrão pela

indução de uma sincronização entre a GDH, as enzimas da via da pentose fosfato e PAL, no período de máximo crescimento.

Fukasawa (1966), caracterizou materiais juvenis e adultos de *Hedera helix* pelo número de bandas obtidas com a utilização da eletroforese de polipeptídeos, onde se observou um número maior de bandas no material jovem.

Aradhya & Phillips (1995) procuraram estabelecer uma correlação entre a heteroziguidade alozímica e parâmetros de crescimento como o diâmetro basal, a altura e a biomassa em mudas de quatro espécies de *Eucalyptus*: *E. grandis*, *E. saligna*, *E. camaldulensis* e *E. urophylla*. Seus objetivos foram de caracterizar genótipos em diferentes fases de crescimento, mas seus resultados demonstraram ausência de correlação entre heteroziguidade alozímica e estágio de crescimento. A ausência de correlação pode ter como causa o tempo curto de análise do crescimento medido no experimento. Em contrapartida, Ledig et al. (1983) encontraram alta correlação entre heteroziguidade e aumento da idade em *Pinus rigida* Mill. Seus resultados apontaram que o crescimento pode estar associado com a heteroziguidade e demonstram a superioridade dos heterozigotos sobre os genótipos homozigotos em relação ao crescimento. O crescimento foi também relacionado com a heteroziguidade em moluscos, salamandras e plantas herbáceas (Schaal & Levin, 1976; Singh & Zouros, 1978; Zouros et al. 1980; Pierce & Mitton, 1982). O trabalho de Ledig et al. (1983) indicou que a relação entre a heteroziguidade e crescimento pode ser explicada com referência à idade, estrutura de "stands" e variação climática.

Uma das enzimas mais utilizadas para estudos do metabolismo, do estresse e da senescência em plantas, é a peroxidase, mas sua fisiologia e expressão gênica não é totalmente conhecida. O número de bandas presentes numa eletroforese de peroxidase é muito dependente da idade dos tecidos da planta. Estas variações das isoperoxidasas demonstram uma ação diferencial dos genes durante as fases de desenvolvimento (Hirsch, 1990), parecendo ser as isoperoxidasas as moléculas-chave para uma rápida adaptação da planta inteira às mudanças ambientais. Essas mudanças podem estar relacionadas à alterações na plasticidade da parede celular, à formação do

câmbio, ao enraizamento, ao brotamento, a processos de florescimento e, principalmente, às condições ambientais que provoquem o estresse das plantas.

O'Farrell (1975) estudou mudanças nos padrões de proteínas totais durante o desenvolvimento *in vitro* de muitos estágios da organogênese de *Nicotiana tabacum* através de eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional. Muitas modificações nos padrões das proteínas nos géis foram verificadas durante as fases de desenvolvimento. Uma variação diferenciada da mobilidade eletroforética da enzima álcool desidrogenase foi detectada em plantas de milho derivadas da cultura de tecidos (Brettell et al. 1988).

Baker & Takeo (1973) estudaram isoformas da enzima fosfatase ácida (E.C. 3.1.3.2.) em folhas jovens, maduras e velhas (senescentes) de chá (*Camellia sinensis* L.). Seus resultados mostraram que o número de bandas aumentou com a idade, porém a atividade das bandas não variou com a senescência. Os autores relataram que para um número elevado de espécies, a fosfatase ácida tende a aumentar a atividade e o número de bandas, provavelmente para solubilizar o fósforo indisponível ou excasso no meio.

A enzima superóxido dismutase (SOD), foi apresentada como um bom parâmetro fisiológico no estudo da senescência em folhas (Xuebao et al. 1995). Isoformas da enzima glutamina sintetase 1 (E.C. 6.3.1.2) também foram utilizadas para a caracterização fisiológica de folhas jovens e senescentes de *Beta vulgaris* L. Brechlin et al. (1999) observaram uma variação no número de isoformas nos dois tipos de materiais.

Zeleneva (1993) estudou as mudanças na atividade enzimática durante o envelhecimento de uma cultura de células de milho em suspensão, durante um período de 122 repicagens e comparou os dados com os resultados das enzimas obtidas em segmentos de raízes de plântulas jovens. As enzimas GDH (Glutamato desidrogenase) e CO (Citocromo oxidase), indicaram serem bons marcadores na caracterização do envelhecimento ocorrido na cultura de suspensão celular.

Schlattner et al. (1994) estudaram a atividade enzimática e os padrões de isoformas da enzima adenilato quinase em cultura de tecidos de tabaco. A variação de isoformas e sua compartimentação na célula foram monitoradas em relação



ao envelhecimento fisiológico progressivo. Os resultados obtidos indicaram que a variação de isoformas é uma condição de adaptação da planta durante o crescimento e o envelhecimento da cultura.

#### **2.5.1.2. Outros indicadores e técnicas para o estudo da senescência**

O etileno parece ser o maior responsável por acelerar a senescência de órgãos ou da planta inteira. Em contrapartida, poliaminas retardam o processo senescente, sendo a espermina o inibidor mais efetivo da produção de etileno (Mattoo & Aharoni, 1988). No entanto, a dosagem de diferentes poliaminas e de etileno pode caracterizar o estado de senescência de tecidos ou órgãos de plantas.

As vias do estresse oxidativo tais como; as da oxidação de fenóis e a peroxidação de lipídios, são responsáveis por provocar e acelerar o processo de senescência. O estudo dessas vias também pode caracterizar o estado da senescência. A oxidação de fenóis pode inibir o crescimento *in vitro* e pode ser a causa da morte dos tecidos, embora estes fenóis tenham uma importância no processo de lignificação e na proteção das plantas (Compton & Preece, 1986). A peroxidação de lipídios pode acontecer pela atividade de lipoxigenases ou pelo ataque direto de radicais livres sobre lipídios da membrana.

Benson, (1990) detectou ácidos graxos livres, aldeídos, álcoois e cetonas em extratos voláteis de calos de *Eucalyptus polybractea*, *Pinus radiata* e *Eucalyptus robusta*. Estes produtos foram utilizados como indicadores do estresse e do envelhecimento *in vitro*.

O grau de senescência depende do balanço entre os danos causados pelos radicais livres, mediados pela peroxidação de lipídios, podendo este grau ser mensurado através da determinação do consumo de oxigênio residual, em relação ao total de oxigênio consumido pelas células. Quando o consumo de oxigênio residual aumenta no tempo, as células envelhecem. Düggelein et al. (1988) relataram que compostos ligados à lipofuscina acumularam durante a senescência de tecidos de plantas e que este acúmulo é estimulado pela indução de hormônios e pelo ambiente. Esta

lipofuscina é acumulada pela ligação de vários tipos de moléculas orgânicas com, por exemplo, a do malondialdeído, ao DNA. Os autores afirmaram que o envelhecimento pode ser relacionados à danos no DNA, resultando numa causa genética para a senescência.

Matile (2000) relatou que a senescência foliar é decorrente de um processo de ciclagem de nutrientes para partes perenes da árvore, servindo como reservas para o desenvolvimento de novas folhas nos períodos adequados. Esta reciclagem se concentra na remobilização de proteínas na senescência dos cloroplastos requerendo o desmantelamento do complexo proteico do pigmento e, concomitantemente, na inativação fotodinâmica da clorofila.

Herrmann & Feller (1998) analisaram o efeito da temperatura, luminosidade e concentração de CO<sub>2</sub>, sobre a senescência e degradação de proteínas de segmentos de folhas de trigo. Seus resultados mostraram que as condições ambientais influem na fotossíntese e, conseqüentemente, interferem no processo de catabolismo de proteínas e na senescência. Para este estudo, os autores utilizaram a técnica de SDS-PAGE com detecção dos fragmentos das enzimas fosfoglicolato fosfatase, glutamina sintase, glutamato sintase dependente de ferredoxina, fosforibuloquinase e enzimas peroxisomais, através da reação com anticorpo específico.

Muitas são as técnicas para o estudo do processo de envelhecimento e estado da senescência em plantas. No entanto, não foi descrito um indicador geral e eficiente deste fenômeno.

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos nesta dissertação foram realizados no Laboratório de Fisiologia das Árvores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo/Piracicaba/SP/Brasil.

Foram utilizados 10 clones de *Eucalyptus* spp. que receberam a denominação de A a J. A relação dos clones e os respectivos números de repicagens, são listados na tabela 01. Estes clones já se encontravam em fase de multiplicação no laboratório antes do início dos experimentos descritos nesta dissertação.

Estudou-se o processo de senescência ao qual foram submetidos estes clones durante 55 dias de cultura *in vitro*, compreendendo um único período de repicagem. Foram planejadas 8 coletas, com intervalo de 7 dias entre elas, sendo amostrados 2 recipientes para cada clone. Uma coleta adicional foi realizada aos 119 dias. Cada recipiente representou uma repetição, onde foram colocados 4 conjuntos de brotações pouco desenvolvidas.

Tabela 01. Descritivo dos clones de *Eucalyptus* spp. utilizados.

CLONE	REPICAGENS*	DESCRITIVO
A	28	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
B	24	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
C	28	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
D	24	<i>E. grandis</i>
E	24	<i>E. grandis</i>
F	24	<i>E. grandis</i>
G	24	<i>E. grandis</i>
H	24	<i>E. grandis</i>
I	24	<i>E. grandis</i>
J	28	<i>E. grandis</i>

(\*) – Correspondente ao número de repicagens realizadas antes do início dos experimentos.

### 3.1 Cultura *in vitro*

Visando uma maior resposta em função do tempo de crescimento e produção de matéria seca, foi adotado o meio JADS, descrito por Correia (1993), sem a adição de arginina e glutamina, conforme descrito no Anexo A.

As soluções estoques dos macronutrientes e micronutrientes foram preparadas e armazenadas em geladeira a 4° C. O restante das substâncias foram pesadas e acrescentadas ao meio, no momento do preparo do mesmo. Ajustou-se o pH final da solução em  $5,8 \pm 0,1$  utilizando-se KOH a 1N, antes da adição do ágar a 0,6% (p/v) (“Difco Bactor Sigma”).

Após o acréscimo do ágar, o meio de cultura foi aquecido, tendo como ponto ótimo de homogeneização 90° C. Nesta temperatura, 40ml de meio de cultura foram colocados em recipientes de vidro de 250 ml e vedados com tampa de polipropileno. Os recipientes contendo o meio de cultura foram autoclavados à temperatura de 121° C e à pressão de 1atm, durante 20 minutos.

### **3.1.1 Preparo do material a ser mantido *in vitro***

O experimento foi realizado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, com todos os instrumentos de trabalho esterilizados. Foi utilizado um conjunto de brotações pouco desenvolvidas, com aproximadamente 1 cm de diâmetro e 9 mg, como unidade de material cultivado.

Em cada recipiente, foram colocados quatro conjuntos de brotações, que foram cultivados com o seguinte propósito:

- Um conjunto para a avaliação do crescimento;
- Três conjuntos misturados para a eletroforese de isoenzimas;

No início da cultura *in vitro*, um lote de brotações do clone E foi utilizado como controle nos experimentos de eletroforese de isoenzimas. Estas brotações foram preparados de acordo com o descrito no item 3.2.3.1.

## **3.2 Parâmetros analisados**

Para a caracterização do fenômeno de senescência durante a cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp., foram utilizados parâmetros de crescimento e de atividade isoenzimática. Para os cálculos estatísticos, considerou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado.

### **3.2.1. Determinação das curvas de crescimento e do tempo máximo de acúmulo de matéria seca.**

As curvas de crescimento foram obtidas para cada clone pela pesagem das brotações a cada coleta, realizada como descrito no início do item 3. Os explantes foram secos em estufa a 60°C, até peso constante.

Para a modelagem dos dados, foi utilizado o modelo de regressão não linear (Draper, 1981):

$$Y_i = \beta X_i \gamma^{X_i} + e_i$$

onde:  $Y_i$  = Massa (g);  $X_i$  = Tempo (dias);  $\beta$  e  $\gamma$  são os parâmetros de forma;  $e_i$  = componente aleatório;  $i$  = índice relativo à  $i$ -ésima observação.

O ponto máximo de acúmulo de matéria seca foi obtido através do modelo  $W(X) = \beta X_i \gamma^{X_i}$ , igualando-se a zero a derivada desta última expressão em relação a  $X$ , assim:

$$X = \frac{1}{\ln\left(\frac{1}{\gamma}\right)}$$

A partir dos resultados obtidos foram gerados gráficos, nos quais estão representados, no eixo das abscissas, o tempo de crescimento e no eixo das ordenadas, os valores de matéria seca .

### 3.2.2. Dosagens de proteínas solúveis totais

A concentração de proteínas solúveis totais das amostras utilizadas nos ensaios isoenzimáticos foi determinada pelo método do Biureto de Weichselbaum (1946). Obteve-se uma curva padrão de concentrações crescentes da proteína albumina de soro bovino, nas proporções de 0,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/ml de H<sub>2</sub>O deionizada.

As amostras foram preparadas seguindo o protocolo descrito no Anexo B e as leituras foram feitas em espectrofotômetro, à 545nm. A concentração final de proteínas foi obtida pela equação da curva padrão.

### **3.2.3. Eletroforese de isoenzimas**

#### **3.2.3.1 Preparo das amostras**

A diluição das amostras foi padronizada em 1g de matéria fresca diluída em 2 ml de solução extratora nº 1 de Alfenas (Alfenas et al., 1991), conforme descrito no Anexo C.

As amostras foram maceradas em almofariz gelado em torno de 4°C, e os extratos centrifugados a 4°C e 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para tubos tipo “Eppendorff” e armazenado em Freezer a -80°C.

Alíquotas de 35 µl do sobrenadante foram pipetadas em “Wicks” de papel de filtro “Whatman nº 3” de 0,5 x 1,8 mm, suficientes para a absorção da amostra.

#### **3.2.3.2. Preparo do gel de amido**

A metodologia adotada foi a descrita por Alfenas et al. (1991). Testes preliminares realizados no laboratório demonstraram que os géis de amido foram superiores aos géis de poliacrilamida quanto à resolução de bandas, para as plantas utilizadas.

Utilizou-se uma concentração de 13% de penetrose de milho em géis de 15,0 x 20,0 x 1,6 cm. Na preparação do gel, parte da solução tampão foi aquecida até fervura e outra, em temperatura ambiente, foi utilizada para dissolver o amido. As duas partes foram reunidas e homogeneizadas. Esta mistura foi despejada em placas-gabarito e resfriada até temperatura ambiente. Os géis resfriados, foram armazenados em geladeira. A superfície do gel foi protegida com filme plástico, para evitar o ressecamento.

Para acompanhar a frente de migração durante a eletroforese, utilizou-se uma solução de azul de bromofenol a 0,1% (p/v).

As corridas de eletroforese foram realizadas a 4°C. As soluções do sistema tampão gel/eletrodo e condições de corrida são especificadas no Anexo D.

Após os 30 minutos iniciais de migração, os “Wicks” foram retirados. O tempo adicional de migração variou com o tipo de tampão utilizado: para o tampão CM, 11 horas; TC, 10 horas e TB, 9 horas.

#### **3.2.3.3. - Coloração das enzimas**

Os protocolos de coloração dos géis foram descritos por Alfenas et al. (1991) e estão apresentados no Anexo E.

#### **3.2.3.4 - Obtenção dos dados isoenzimáticos**

Após a coloração, os géis foram fotodocumentados e a interpretação dos resultados foi baseada na presença, nitidez e localização das bandas. Os picos de atividade isoenzimática foram medidos, utilizando-se a técnica de densitometria, com o Software Image Master VDS (1995-1996), versão 2.0 da Amersham Pharmacia Biotech.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação do período de crescimento *in vitro*.

Curvas de crescimento foram obtidas para cada clone, levando-se em conta o acúmulo do peso de matéria seca durante o tempo de cultura *in vitro*. Estas curvas de crescimento para os clones estudados são apresentadas na figura 01.

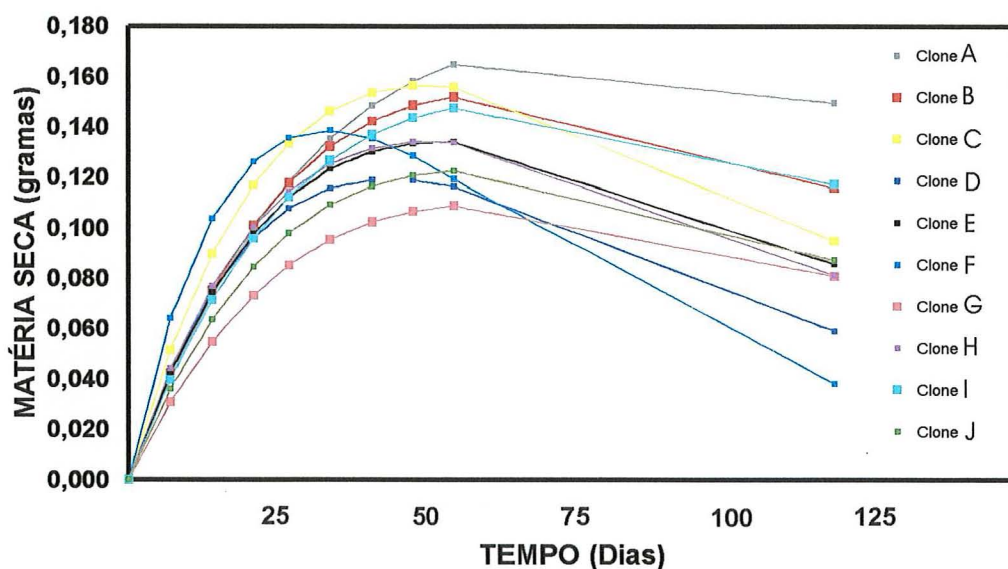


Figura 01. Curvas de crescimento do conjunto de brotações dos clones de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura JADS, durante 119 dias de cultura.

As curvas de crescimento dos clones foram ajustadas através do modelo de regressão (Draper, 1981), descrito no item 3.2.1.

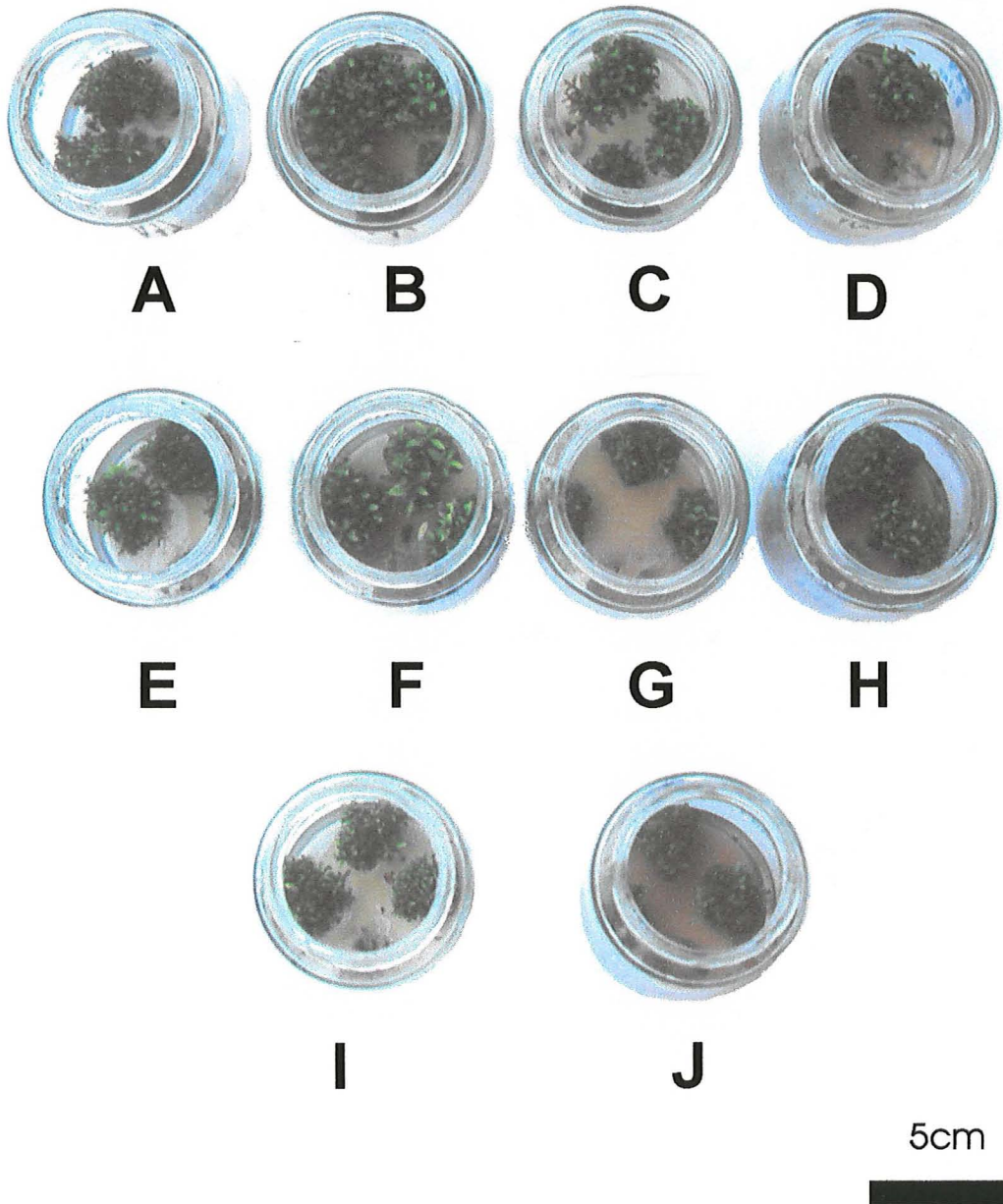


Figura 02: Aparência do meio de cultura JADS e das gemas com brotações de *Eucalyptus* aos 07 dias de cultivo.

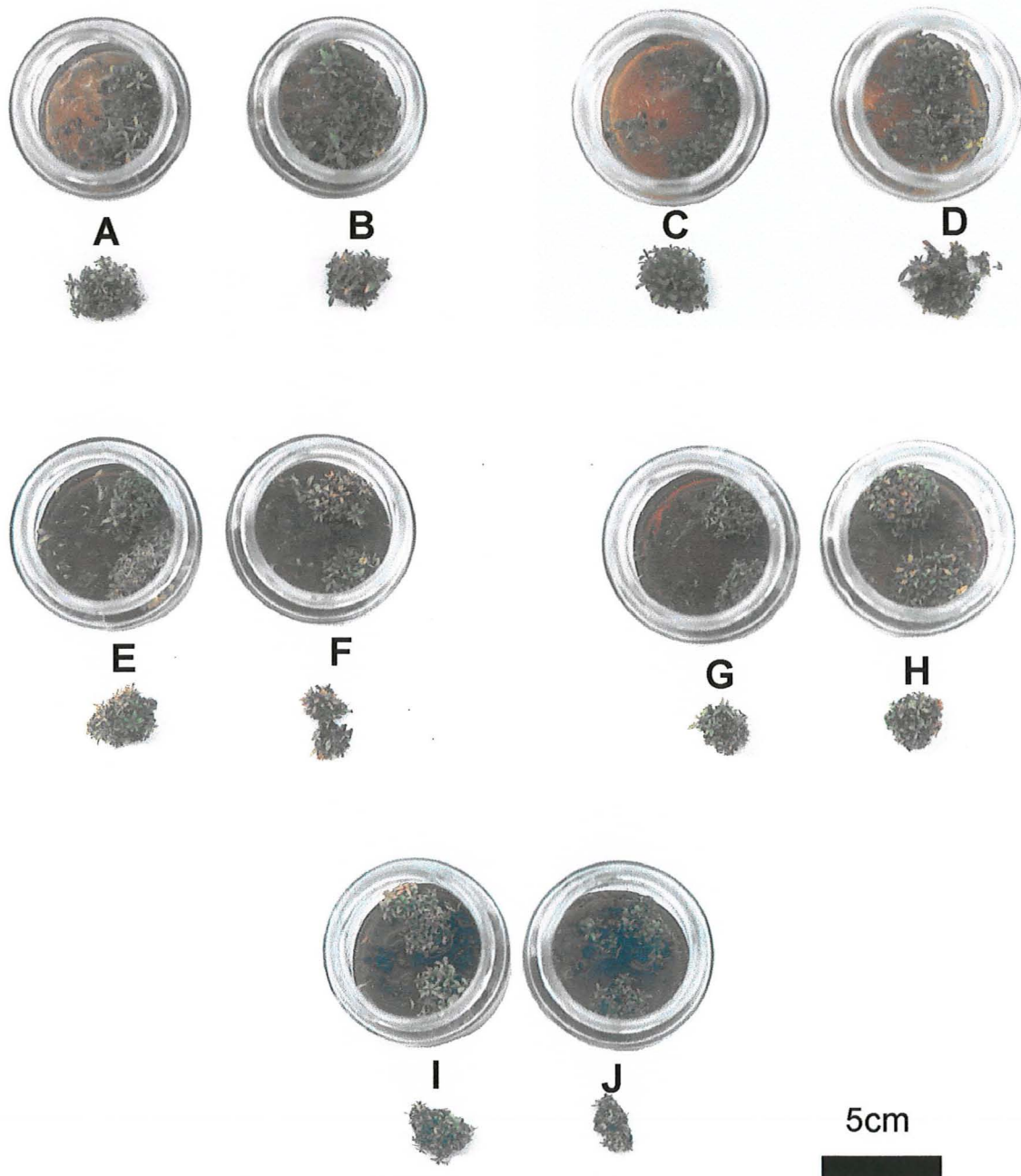


Figura 03: Aparência do meio de cultura JADS apresentando o escurecimento do meio e a degeneração das brotações de *Eucalyptus spp.* aos 55 dias de cultivo.



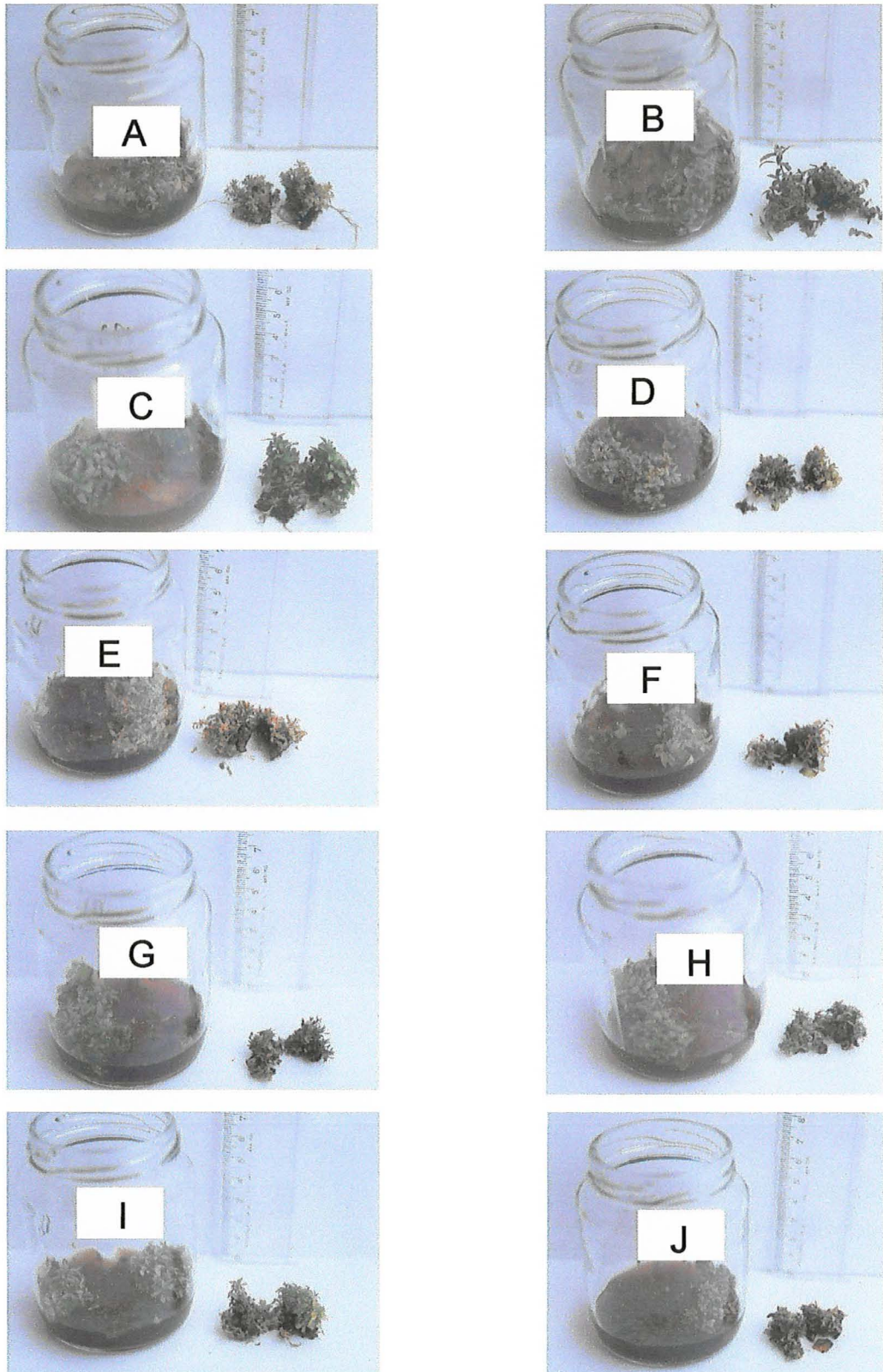


Figura 04: Diferentes tonalidades de oxidação do meio de cultura JADS, aos 119 dias de cultivo, com detalhes da rizogênese presente nos clones A e C, e a clorose acentuada nas brotações dos clones D, E e F em *Eucalyptus* spp.

Observou-se o início da desaceleração do crescimento após a quarta coleta, aos 27 dias, para todos os clones, exceto para o clone F, que apresentou esta desaceleração logo após a segunda coleta, aos 14 dias de cultura.

Os tempos máximos de acúmulo de matéria seca observados para cada clone são apresentados na tabela 06. Estes valores foram estimados através das médias das duas repetições para cada clone.

Tabela 02: Tempo máximo estimado de acúmulo de matéria seca para os clones de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura JADS, durante 119 dias de cultura.

Clone	Tempo máximo de acúmulo de matéria seca (TMMS) em dias
A	73,69
B	61,37
C	50,39
D	44,14
E	52,55
F	33,39
G	59,97
H	50,39
I	63,94
J	57,56

Os resultados dos tempos máximos de acúmulo de matéria seca indicaram uma heterogeneidade no crescimento dos clones. Uma amplitude grande foi verificada entre alguns materiais, como o clone F que apresentou um TMMS de 33,39 dias, representando menos da metade do tempo observado para o clone A, que é de 73,69 dias. O clone D também apresentou um TMMS curto de 44,14 dias em relação aos demais clones, exceto ao clone F. Estes resultados podem ser decorrentes da própria variabilidade genética ou adaptabilidade fisiológica e bioquímica do material ao meio de cultura. Estas observações têm implicações diretas na tentativa de padronização dos tempos de cultura *in vitro* realizados comercialmente para diferentes materiais genéticos. Assim, a tentativa de estabelecer tempos de cultura padronizados, pode comprometer os rendimentos do processo e etapas da formação das mudas. Os clones D e F teriam sua micropropagação prejudicada se fosse pré-estabelecido um tempo em torno de 40 dias

para a mudança de meio de cultura. O estresse e o envelhecimento estariam atuando nesses materiais em função de seus baixos valores de TMMS. A determinação da velocidade de crescimento em cultura e, portanto a otimização do tempo de repicagem, poderia diminuir o número de recipientes para uma necessidade de produção pré-estabelecida, maximizando a utilização das instalações e os procedimentos operacionais de laboratório. O baixo valor do TMMS verificado para o clone F (33,39 dias) não representaria necessariamente uma maior produção em gemas por unidade de material iniciada na cultura. O número de gemas formadas e a qualidade das mesmas teriam que ser considerados, bem como o tamanho e capacidade para o enraizamento. Um laboratório de cultura de tecidos não deveria utilizar um único protocolo para o cultivo *in vitro*, devido a variação do TMMS apresentado por diferentes materiais genéticos. O necessário seria que fossem realizados estudos preliminares para a viabilidade da utilização de um tempo de repicagem baseado no TMMS de cada clone, evitando os efeitos do estresse e do envelhecimento.

A variabilidade genética pode ser um componente dos mais importantes no processo de cultura *in vitro*. Nas condições desse estudo, os materiais que apresentaram visualmente um menor efeito do estresse e do envelhecimento *in vitro*, foram os clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, descritos como clones A, B e C. Os conjuntos com as brotações pouco desenvolvidas desses clones, mostraram ser maiores e mais vigorosos que as dos demais clones não híbridos. Este fato pode ser atribuído à melhor adaptação de híbridos ao ambiente, possuindo melhores condições de conversão enzimática (Torggler et al.,1995). Além dessas características, o efeito da heterose pode estar envolvida no processo, aumentando os ganhos na produção final.

Uma coloração marrom clara foi verificada no meio de cultura, onde foram cultivados os clones híbridos A, B e C, podendo representar a presença de exudados das brotações e/ou a oxidação de substâncias no meio, prejudicando o desenvolvimento e aumentando o estresse e o envelhecimento do material. Esta coloração foi mais acentuada nos clones D, E, F, G, H, I e J, apresentando tons mais escuros nos clones E, F, I e J, indicando maior oxidação do meio e/ou maior produção de exudados. A oxidação pode ser o principal agente envelhecedor, que aliado aos

exudados da planta podem comprometer todo o desenvolvimento, ativando vias de enzimas proteolíticas e de lise de membranas celulares e de organelas (Compton & Preece, 1986).

Observou-se uma clorose superficial das brotações dos clones a partir dos 40 dias de cultura. Esta clorose foi de menor intensidade nos clones híbridos A, B e C. Esta característica pode ser decorrente do processo de peroxidação de membranas e aumento da concentração de etileno nos recipientes com o avanço do tempo de cultura (Benson, 1990). Esses indicadores são apontados como os principais agentes do estresse oxidativo e do envelhecimento que ocorrem *in vitro* (Compton & Preece, 1986, Benson, 1990).

Observou-se a perda da consistência e estrutura dos conjuntos de brotações, simultaneamente à clorose. O interior do conjunto de brotações apresentou uma consistência endurecida e lignificada na maioria dos clones, exceto para os clones D, F e J, que apresentaram uma consistência gelificada, com pequenos grumos endurecidos.

Na abertura dos frascos para o processamento das amostras, um odor etílico foi notado, variando de intensidade nos clones, sendo mais forte este odor nos clones D, E, F, G, I e J, não híbridos, que apresentavam maiores degradações. Essas substâncias possivelmente poderiam ser cetonas, álcoois ou aldeídos, originários do processo de peroxidação de lipídios pela atividade de lipoxigenases ou ataque direto de radicais livres sobre os lipídios das membranas celulares. Estes produtos podem ser marcadores de envelhecimento, como verificado por Benson (1990) que detectou essas substâncias voláteis em calos de *Eucalyptus polybractea*, *Pinus radiata* e *Eucalyptus robusta*, e utilizou-os como indicadores do estresse e do envelhecimento *in vitro*. Este efeito de produção de compostos voláteis, começou a ser notado por volta da quinta coleta, aos 34 dias após a montagem do ensaio.

De um modo geral, todos os clones mostraram características de plantas senescentes aos 55 dias de cultura. As características visuais desta senescência foram a clorose, a lignificação de paredes, o declínio de crescimento, a desestruturação das brotações e produção de compostos voláteis característicos do processo de

envelhecimento, conforme verificado também por (Rodríguez e Tamés, 1990, Benson, 1990). É difícil estabelecer a fronteira entre o estresse e a senescência, que provavelmente estão juntamente presentes, podendo o estresse ter começado primeiro por inúmeros efeitos como a exaustão do meio de cultura, a produção de exudados, etc, contribuindo para a ativação do processo de envelhecimento e conseqüentemente para a senescência das plantas.

#### **4.2. Análise das atividades isoenzimáticas**

As atividades enzimáticas variaram muito em relação aos clones analisados durante o tempo em cultura. Estas variações das atividades enzimáticas, estão relacionadas à condição de produção de fenótipos fisiológicos detectáveis em géis de eletroforese nos diferentes momentos do desenvolvimento das plantas (Torggler et al. 1995).

Os sistemas isoenzimáticos não demonstraram variação do número de isoformas nas diferentes coletas, com exceção da enzima peroxidase. Algumas isoformas apresentaram sobreposição de bandas, visualizadas apenas com a densitometria no VDS.

A seguir, será detalhado o comportamento de cada enzima estudada no decorrer do tempo de cultura.

##### **4.2.1. Fosfatase ácida (ACP)**

Os zimogramas da ACP não demonstraram variação no número de isoformas durante o crescimento das plantas, porém as atividades dessas isoformas foram diferentes no decorrer das coletas realizadas.

A figura 05 mostra o loco analisado da ACP e o sentido de migração.

A figura 08 mostra as curvas de tendências das atividades enzimáticas totais lidas no VDS em cada momento de coleta.

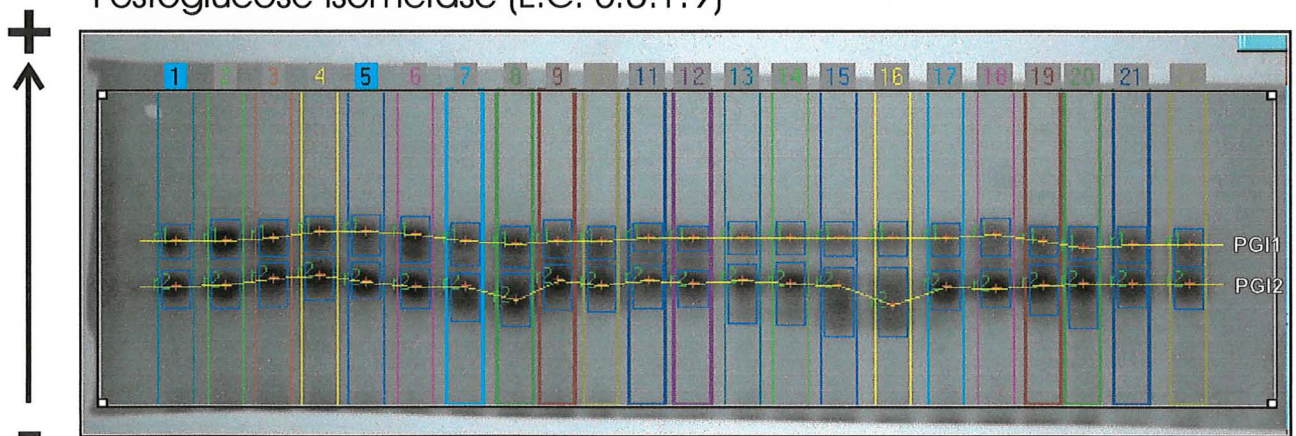


Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)



A<sub>1</sub> A<sub>2</sub> B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> C<sub>1</sub> C<sub>2</sub> D<sub>1</sub> D<sub>2</sub> E<sub>1</sub> E<sub>2</sub> F<sub>1</sub> F<sub>2</sub> G<sub>1</sub> G<sub>2</sub> H<sub>1</sub> H<sub>2</sub> I<sub>1</sub> I<sub>2</sub> J<sub>1</sub> J<sub>2</sub> P P

Fosfoglucoase Isomerase (E.C. 5.3.1.9)



A<sub>1</sub> A<sub>2</sub> B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> C<sub>1</sub> C<sub>2</sub> D<sub>1</sub> D<sub>2</sub> E<sub>1</sub> E<sub>2</sub> F<sub>1</sub> F<sub>2</sub> G<sub>1</sub> G<sub>2</sub> H<sub>1</sub> H<sub>2</sub> I<sub>1</sub> I<sub>2</sub> J<sub>1</sub> J<sub>2</sub> P P

Fosfatase Ácida (E.C. 3.1.3.2)

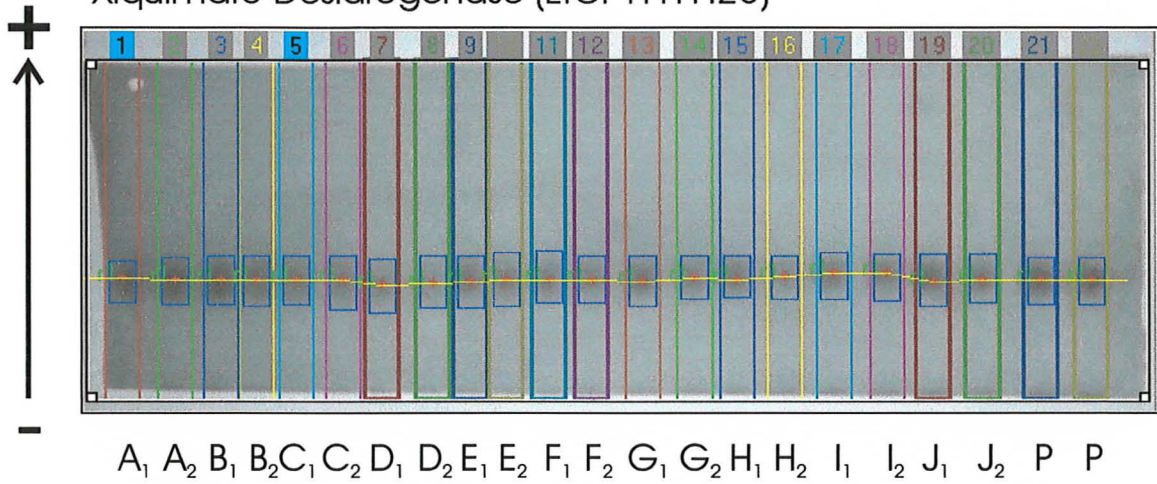


A<sub>1</sub> A<sub>2</sub> B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> C<sub>1</sub> C<sub>2</sub> D<sub>1</sub> D<sub>2</sub> E<sub>1</sub> E<sub>2</sub> F<sub>1</sub> F<sub>2</sub> G<sub>1</sub> G<sub>2</sub> H<sub>1</sub> H<sub>2</sub> I<sub>1</sub> I<sub>2</sub> J<sub>1</sub> J<sub>2</sub> P P

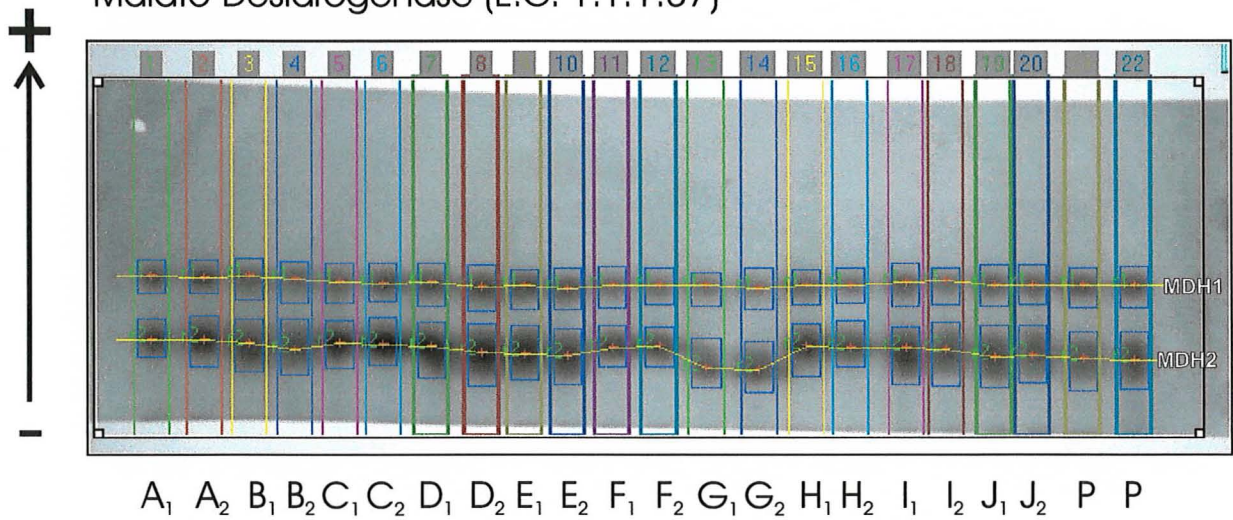
Figura 05: Imagens dos géis de eletroforese de isoenzimas analisadas por densitometria pelo VDS. As linhas coloridas representam as amostras. O sentido da migração está designado pela seta. Letras iguais representam repetições de um mesmo clone. P=padrão. PGI1 e PGI2 são diferentes locos analisados da enzima fosfoglucoase isomerase.



Xiquimato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.25)



Malato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.37)



Isocitrato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.42)

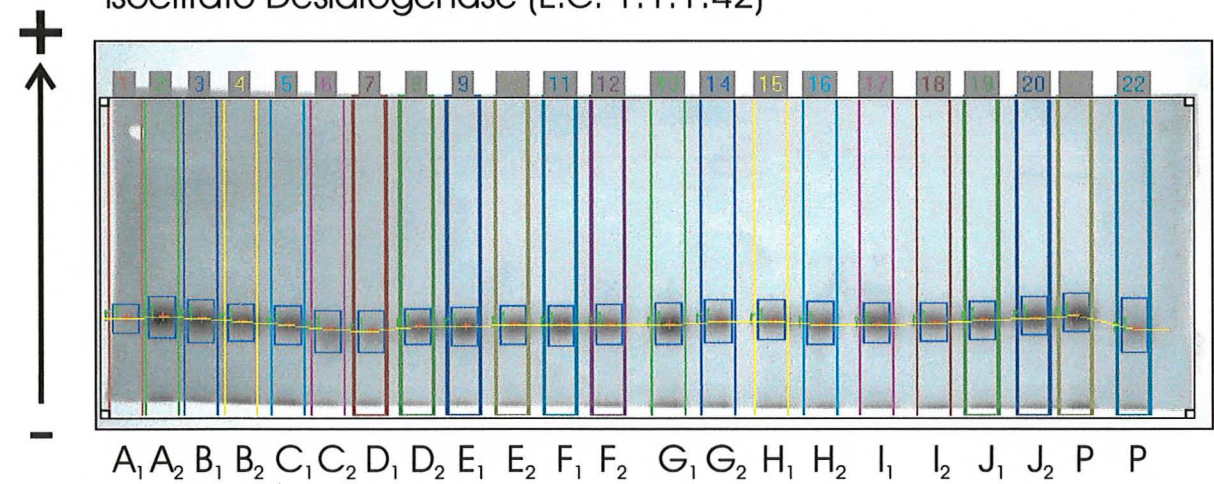
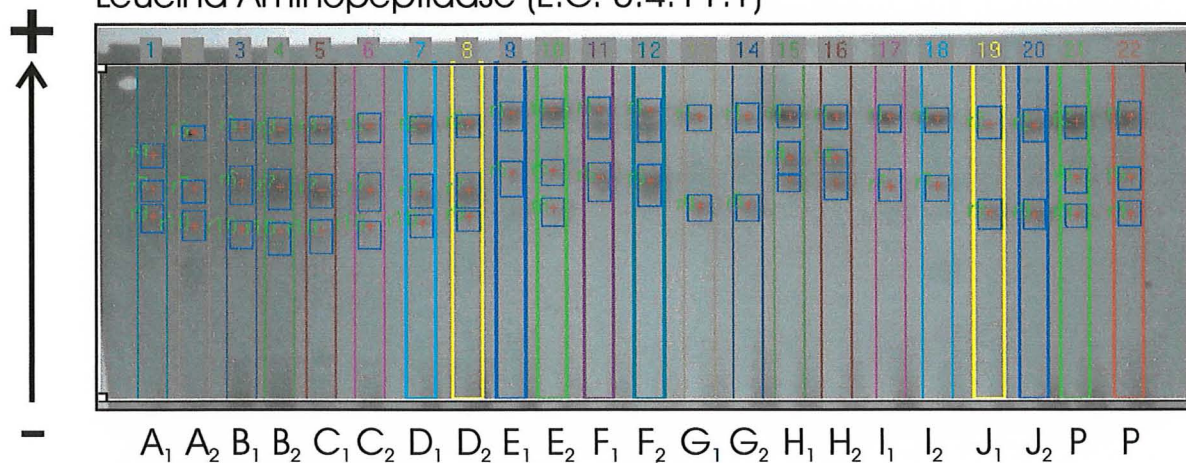


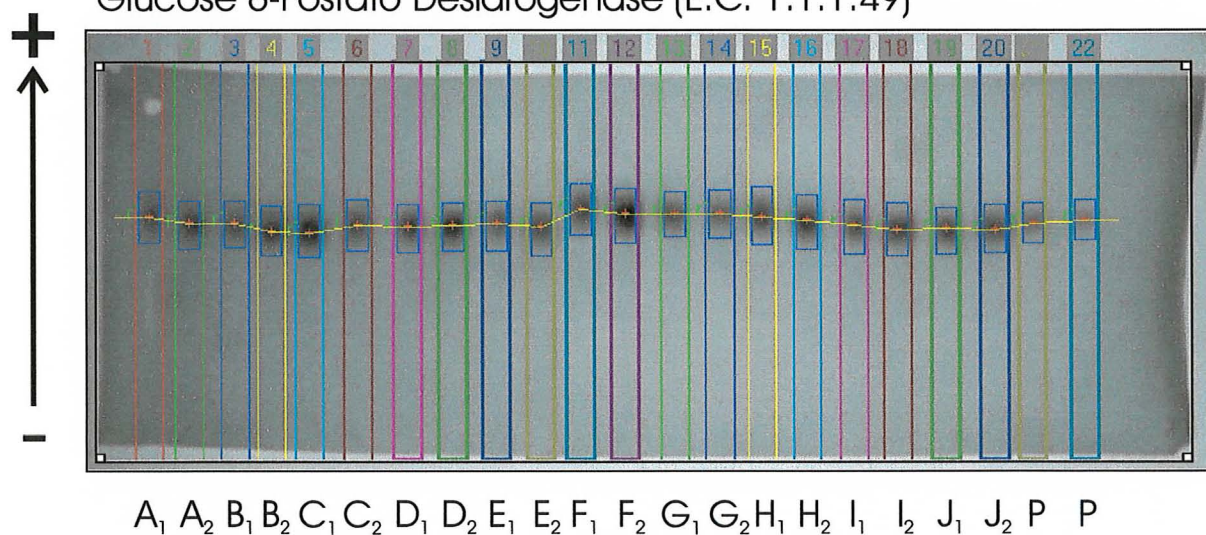
Figura 06: Imagens dos géis de eletroforese de isoenzimas analisadas por densitometria pelo VDS. As linhas coloridas representam as amostras. O sentido da migração está designado pela seta. Letras iguais representam repetições de um mesmo clone. P=padrão. MDH1 e MDH2 são diferentes locos analisados da enzima malato desidrogenase.



Leucina Aminopeptidase (E.C. 3.4.11.1)



Glucose 6-Fosfato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)



6-Fosfogluconato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.44)

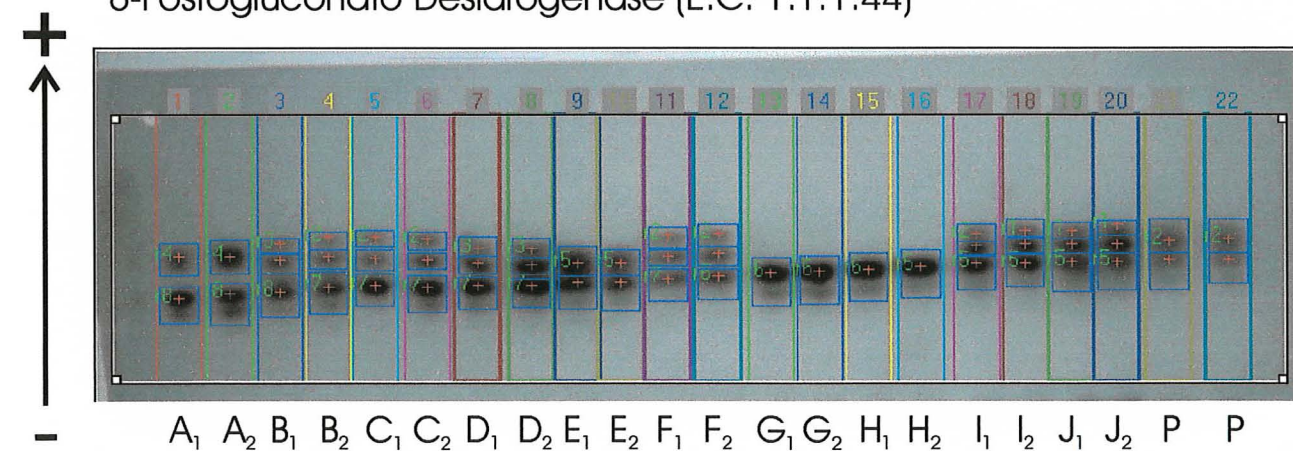


Figura 07: Imagens dos géis de eletroforese de isoenzimas analisadas por densitometria pelo VDS. As linhas coloridas representam as amostras. O sentido da migração está designado pela seta. Letras iguais representam repetições de um mesmo clone. P=padrão.

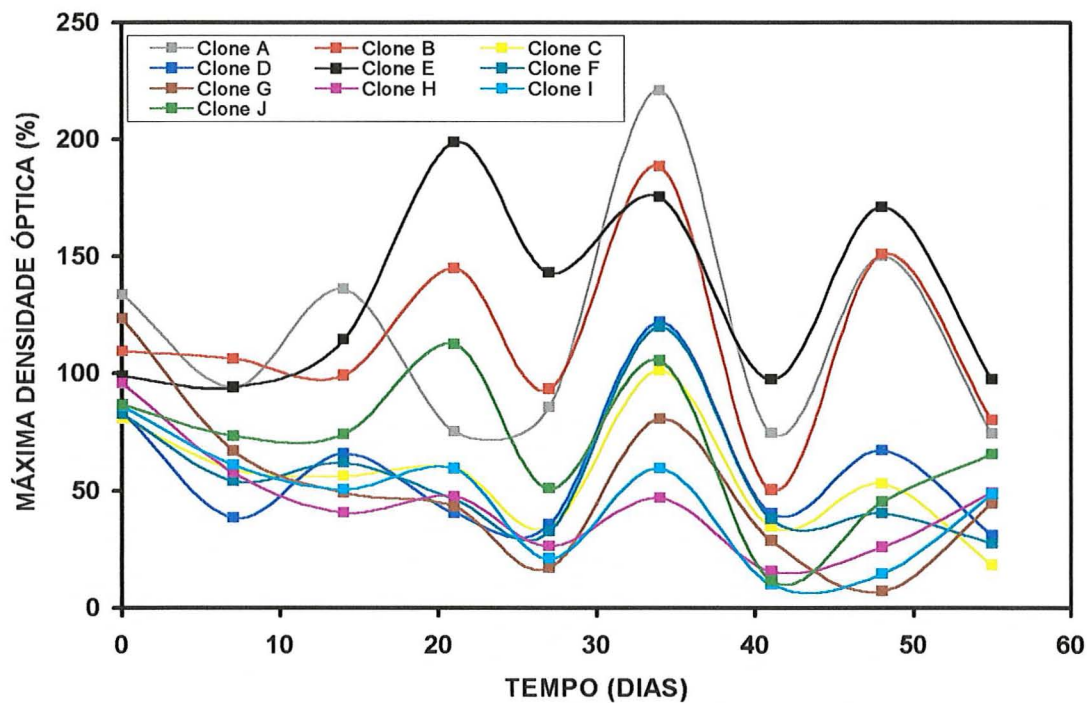


Figura 08: Curvas de tendência da atividade enzimática da Fosfatase ácida durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

Foi estimada a atividade enzimática no tempo máximo de acúmulo de matéria seca (TMMS), para os clones onde este tempo não ultrapassou os 55 dias de coleta de dados enzimáticos, (Tabela 03).

Tabela 03. Porcentagem de atividade enzimática da Fosfatase ácida no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	40,87
D	44,14	52,43
E	52,55	123,25
F	33,39	112,14
G	59,97	**
H	50,38	33,86
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Esta enzima é responsável pela hidrólise do éster fosfato e pela disponibilização deste elemento à planta. Sua estrutura é considerada monomérica, mas podem ocorrer locos diméricos e é encontrada em vários compartimentos celulares (Torggler et al. 1995).

A atividade desta enzima apresentou comportamento cíclicos, com picos aos 21, 34 e 48 dias de cultura.

A variação observada pode ser atribuída aos diferentes locais de atuação enzimática em decorrência do metabolismo de cada clone. A atividade da fosfatase ácida é fundamental para o desenvolvimento celular, considerando-se que o fósforo é fortemente indisponibilizado à planta por ligação a outros compostos e conseqüentemente imobilização.

Uma pequena similaridade de comportamento enzimático entre os clones, pode ser verificada em cada momento de coleta.

Uma grande variação na porcentagem de atividade da ACP pode ser verificada no TMMS dos clones, onde foi possível estimar estes valores. Este comportamento não evidencia uma similaridade das atividades da enzima em relação ao envelhecimento da cultura. Era de se esperar um aumento na atividade da ACP com o



aumento do estresse e do envelhecimento, pois esta enzima tende a aumentar sua atividade com relação a deficiência mineral, principalmente do elemento fósforo (Menck, 1996).

#### 4.2.2. 6-Fosfogluconato desidrogenase (6GPDH)

A figura 09 mostra as curvas de tendências das atividades enzimáticas lidas no VDS em cada momento de coleta, possuindo uma grande amplitude de variação quanto a atividade enzimática e uma similaridade no comportamento entre os clones.

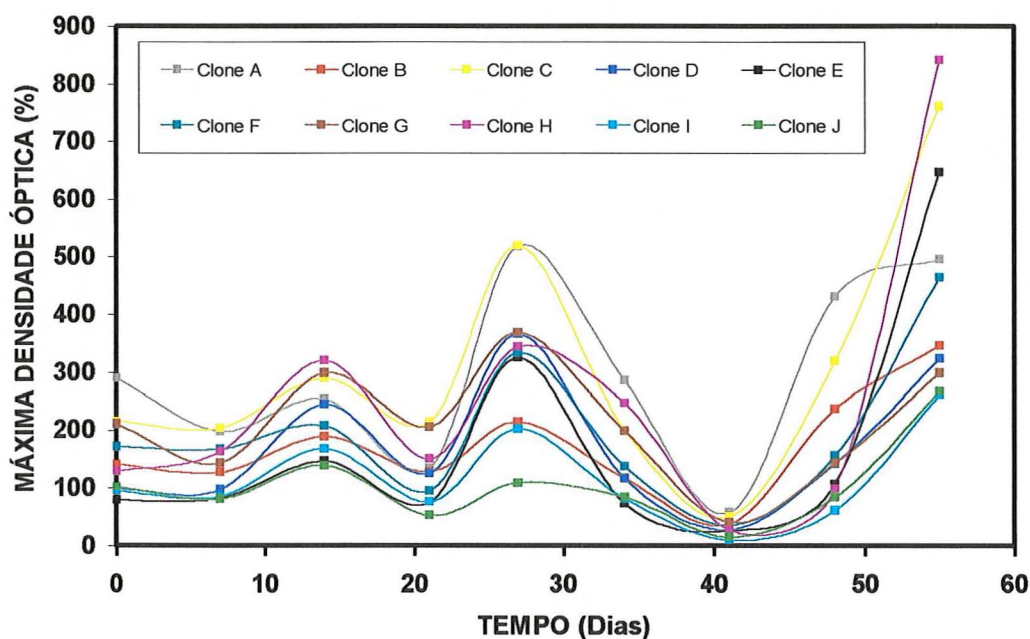


Figura 09: Curvas de tendência da atividade enzimática da 6-Fosfogluconato desidrogenase durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

Os géis dessa enzima demonstraram um número grande de isoformas. Sua atividade variaram no decorrer das diferentes coletas realizadas. Em algumas coletas, certas isoformas se apresentaram agrupadas, podendo ser detectadas somente com a densitometria das imagens.

A figura 07 mostra o zimograma com as diferentes áreas de leituras das amostras.

A oscilação dos valores medidos da atividade enzimática foi menor durante as fases de intenso crescimento, aumentando esta amplitude após a fase de desaceleração do crescimento, após a quarta coleta (27 dias) para todos os clones, exceto para o clone F, que apresentou uma desaceleração logo após a segunda coleta (14 dias).

Na sexta coleta, aos 41 dias de cultura, a amplitude dos valores obtidos foi pequena, quando comparado às outras coletas, havendo um comportamento similar entre todos os clones. Nas próximas coletas, aos 48 e 55 dias, estes valores se distanciaram, apresentando uma maior amplitude. Na última coleta, aos 55 dias, todos os clones apresentaram maiores atividades em relação as primeiras coletas (7,14 e 21 dias). Mesmo o clone F que apresentou um tempo menor para a desaceleração do crescimento, manteve a mesma tendência dos demais clones.

A tabela 04 mostra os valores da atividade enzimática no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 04. Porcentagem de atividade enzimática da 6-Fosfogluconato desidrogenase no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	469,92
D	44,14	78,91
E	52,55	457,49
F	33,39	154,51
G	59,97	**
H	50,38	351,20
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Esta enzima faz parte da via pentose fosfato e é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo energético da planta. Sua estrutura é considerada dimérica e encontrada no citosol e plastídios (Kephart, 1990).

### 4.2.3. Isocitrato desidrogenase (IDH)

A figura 10 mostra as curvas de tendências das atividades enzimáticas da IDH, lidas no VDS em cada momento de coleta, mostrando grande variação nas atividades enzimáticas entre os clones em cada momento de coleta.

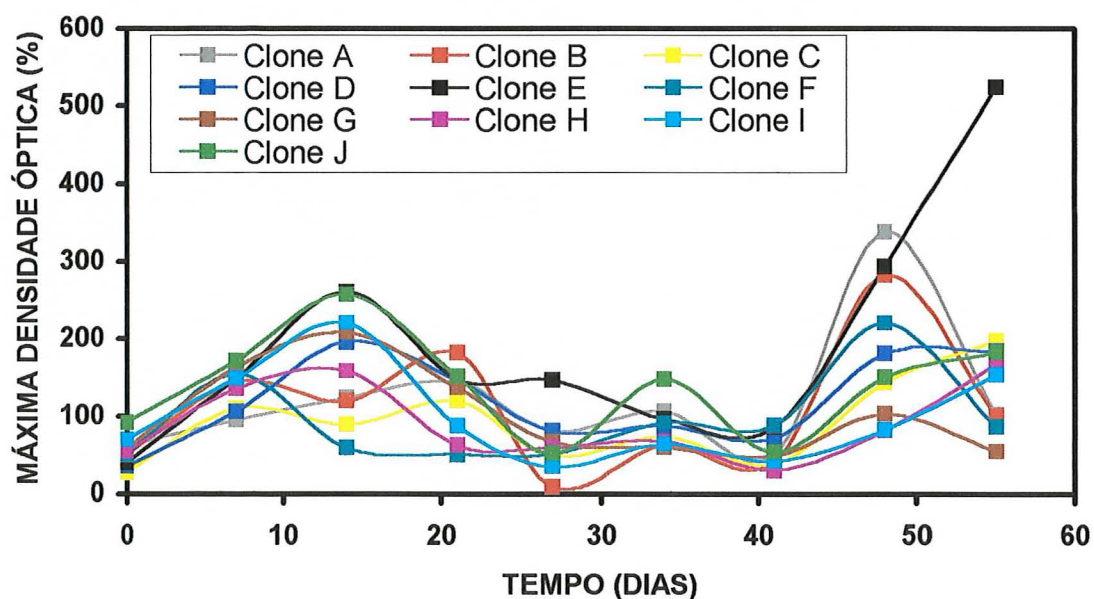


Figura 10: Curvas de tendência da atividade enzimática da Isocitrato desidrogenase durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A figura 06 mostra o zimograma da IDH com as diferentes áreas de leituras das amostras.

A tabela 05 mostra os valores da atividade enzimática da IDH no TMMS dos clones C, D, E, F, H.



Tabela 05. Porcentagem de atividade enzimática da Isocitrato desidrogenase no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	161,59
D	44,14	120,50
E	52,55	443,41
F	33,39	87,60
G	59,97	**
H	50,38	110,91
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

No início da cultura, até a primeira coleta (7 dias), o comportamento entre os clones foi semelhante, observando-se um aumento da variação da atividade enzimática dos dados nas demais coletas. De modo geral, os clones não obedeceram um padrão de atividade enzimática para todas as coletas. Houve um declínio das atividades enzimáticas e uma menor amplitude dos valores nos momentos de máximo crescimento e início da desaceleração do crescimento (entre coletas 27 e 41). O clone E, com um TMMS de 52,55 dias, apresentou uma atividade enzimática alta em relação aos demais, com um pico elevado na última coleta aos 55 dias. Em contrapartida, o clone F apresentou valores da atividade enzimática baixos, apesar de possuir um TMMS de 33,39 dias. Este clone, provavelmente sofreu maiores efeitos que os demais em termos de senescência e estresse, sem apresentar um comportamento irregular aos demais, quanto à atividade da IDH.

A IDH atua no ciclo do ácido cítrico, possuindo uma estrutura dimérica e localizada em grande parte no citosol, podendo também ser encontrada nos plástidios (Weeden & Wendell, 1989).

#### 4.2.4. Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A figura 11 mostra as curvas de tendências das atividades enzimáticas lidas no VDS em cada momento de coleta. Uma grande variação no comportamento entre os clones foi verificada em cada coleta.

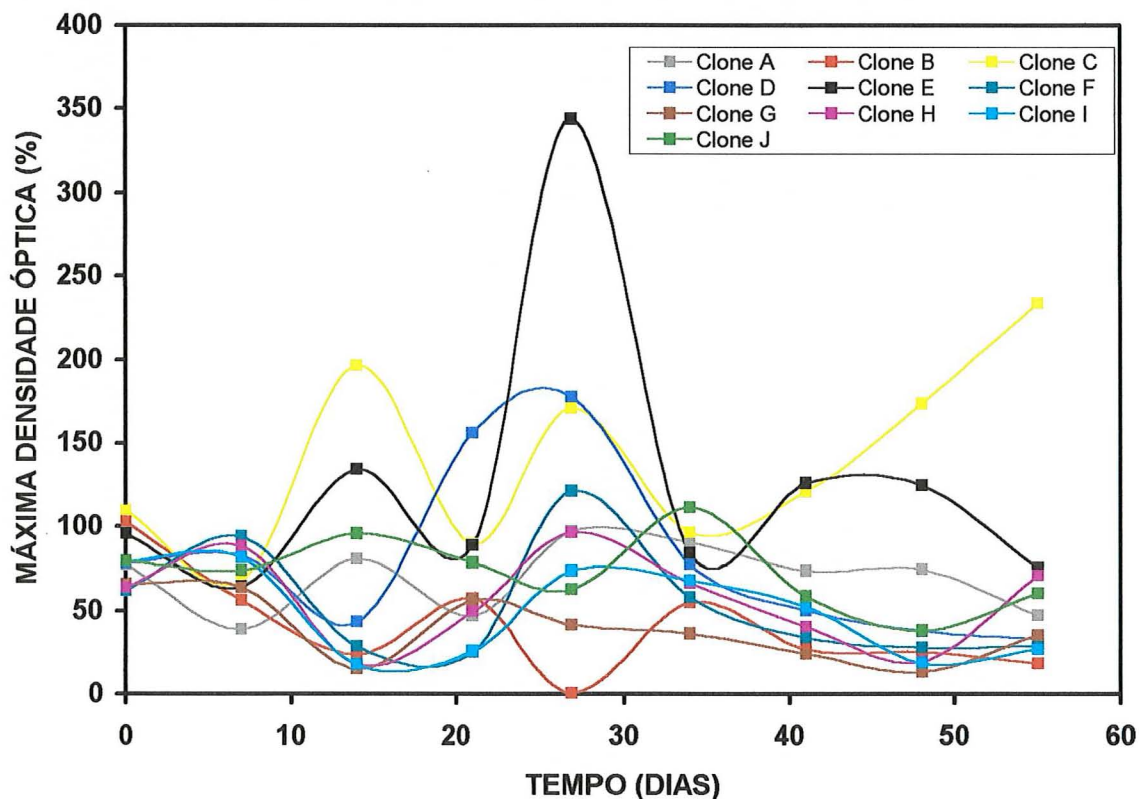


Figura 11: Curvas de tendência da atividade enzimática da Glucose-6-fosfato desidrogenase durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A figura 07 mostra o zimograma da G6PDH com as diferentes áreas de leituras das amostras. A enzima apresentou sobreposição de bandas, sendo detectadas somente com a densitometria no VDS.

Observou-se uma oscilação maior entre os valores da atividade da G6PDH na quarta coleta (27 dias). O clone E apresentou um pico de atividade alto em

relação aos demais clones e, posteriormente, os valores retornam a patamares iniciais de atividade.

O clone C apresentou uma maior atividade da enzima nas últimas coletas, após a quinta coleta (34 dias). Os demais clones apresentaram valores similares ou menores na última coleta (55 dias) do que nas fases iniciais da cultura.

A tabela 06 mostra os valores da atividade enzimática da G6PDH no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 06. Porcentagem de atividade enzimática da Glucose-6-fosfato desidrogenase no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	193,96
D	44,14	44,43
E	52,55	76,67
F	33,39	63,36
G	59,97	**
H	50,38	36,95
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

A G6PDH atua no ciclo de Calvin e na via da pentose fosfato, possuindo uma estrutura dimérica e localizada em grande parte no citosol e plástidios (Kephart, 1990).

A enzima têm grande importância para o metabolismo energético da planta, não apresentando um padrão geral de declínio da atividade com as fases finais do crescimento, período de maior ação do estresse e do envelhecimento das plantas.

Deve-se ampliar o estudo para um maior número de subculturas, a fim de verificar se os valores iniciais da concentração da G6PDH são similares aos das fases finais do crescimento *in vitro*.

#### 4.2.5. Xiquimato desidrogenase (SKDH)

A figura 12 mostra as curvas de tendências das atividades enzimáticas lidas no VDS em cada momento de coleta. As curvas apresentaram uma grande variação das atividades enzimáticas em cada coleta, com uma similaridade geral no comportamento enzimático entre os clones.

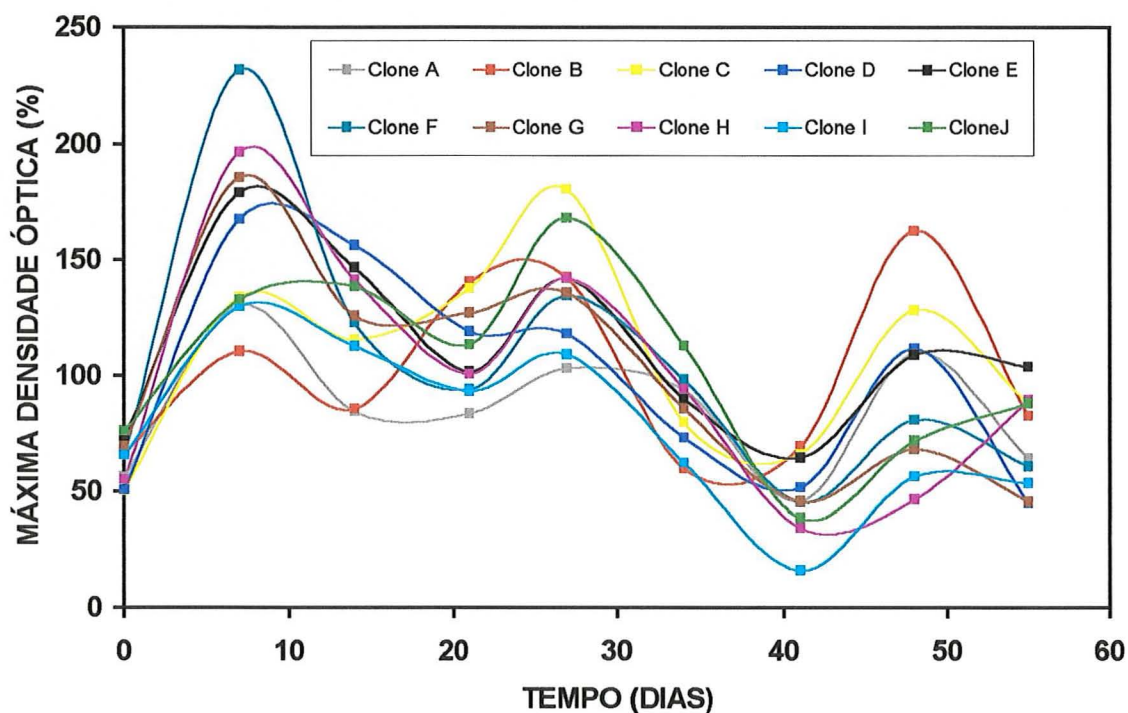


Figura 12: Curvas de tendência da atividade enzimática da Xiquimato desidrogenase durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

De maneira geral, observou-se um aumento da atividade enzimática no início da cultura e um retorno às atividades iniciais, após 55 dias de cultura.

Na primeira coleta aos 7 dias, uma alta na atividade da enzima SKDH foi verificada em todos os clones, com uma queda na próxima coleta, aos 14 dias. Os clones B, C e J, apresentaram uma pequena variação no padrão geral dos demais clones. Na terceira coleta aos 21 dias, os clones B e C mostraram uma alta na atividade da enzima em

relação aos demais clones. Os clones B e C são híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, e apresentaram melhores condições do estado final com relação a degeneração do material. O clone J, apresentou uma tendência de aumento da atividade juntamente com o clone H, na última coleta, aos 55 dias.

A figura 06 mostra o zimograma da SKDH com as diferentes áreas de leitura das amostras. A enzima mostrou um agrupamento das bandas detectadas somente com a densitometria no VDS.

A tabela 07 mostra os valores da atividade enzimática da SKDH no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 07. Porcentagem de atividade enzimática da Xiquimato desidrogenase no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE(%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	118,21
D	44,14	92,36
E	52,55	88,29
F	33,39	84,51
G	59,97	**
H	50,38	84,64
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

A amplitude dos valores da atividade da SKDH no TMMS não foi grande para os clones que permitiram esta estimacão, apesar do valor de TMMS variar em muitos dias, como o clone F (33,39) e o clone E (52,55).

Esta enzima atua na síntese de compostos aromáticos, possuindo uma estrutura monomérica e localizada no citosol e plástidios (Torggler et al. 1995; Alfenal et al. 1990). Ela atua na à lignificação das paredes celulares, sendo uma das enzimas mais importantes deste processo. A enzima apresenta uma alta atividade nas fases de intensa lignificação da células e durante as fases finais do crescimento da planta. A enzima, atua no metabolismo secundário com o aumento da síntese de substâncias aromáticas, que uma vez oxidadas, aumentam o efeito do estresse, e consequentemente do envelhecimento.

#### **4.2.6. Malato desidrogenase (MDH)**

Dois locos da enzima foram estudados, em duas regiões do gel, considerando-se MDH-1 e MDH-2. Estes locos, são mostrados na figura 06, com as áreas de leitura das amostras. Os dois locos apresentaram um comportamento similar quanto à atividade da enzima no decorrer do crescimento para todos os clones. Uma variação deste padrão foi verificada no início do crescimento, aos 7 dias, e na última coleta, aos 55 dias, para os dois locos estudados. O loco MDH-1, apresentou uma única banda, enquanto o loco da MDH-2 apresentou um fenótipo dimérico, com várias bandas.

##### **4.2.6.1. Malato desidrogenase 1**

A figura 13 mostra as curvas de tendência das atividades enzimáticas da MDH-1, lidas no VDS em cada momento de coleta. As atividades apresentaram grande oscilação de valores nas diferentes coletas e no comportamento dos clones.

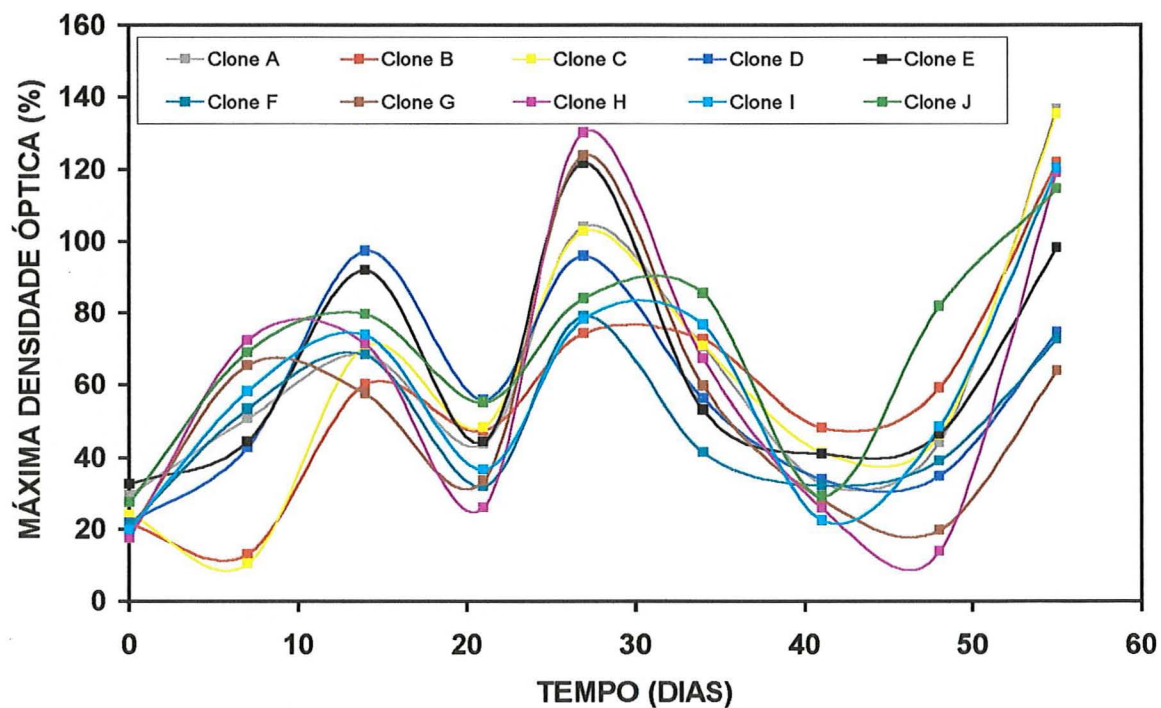


Figura 13: Curvas de tendência da atividade enzimática da Malato desidrogenase-1 durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A tabela 08 mostra as atividades de enzimas em porcentagem no tempo máximo de acúmulo de massa seca (TMMS) dos clones C, D, E, F, H.



Tabela 08. Porcentagem de atividade enzimática da Malato desidrogenase-1 no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	76,86
D	44,14	34,24
E	52,55	80,11
F	33,39	44,68
G	59,97	**
H	50,38	49,61
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

De maneira geral, foram observados três picos de atividade enzimática para esta enzima, respectivamente aos 14, 27 e 55 dias de cultura.

Dentre os clones C, D, E, F e H, as maiores porcentagens foram verificadas para clones com menor valor de TMMS, como os clones D e F.

A concentração final da isoforma MDH-1, aos 55 dias, foi maior que a inicial para todos os clones. O mesmo não sendo verificado para a MDH-2. Para a MDH-2, os clones F e G mostraram valores menores da atividade enzimática aos 55 dias do que no início do experimento, porém o TMMS do clone F foi o menor dentre todos os clones, mas o clone G apresentou um TMMS superior ao do clone F e a de vários outros.

Esta enzima atua no ciclo do ácido cítrico, na fotorespiração e na fotossíntese de plantas  $C_4$ , possuindo uma estrutura dimérica, podendo apresentar até três locos de atividade. Ela possui uma localização variada nas células, estando em grande parte no citosol e nas mitocôndrias (Weeden & Wendel, 1989). As enzimas malato desidrogenase 1 e 2 realizam a mesma conversão enzimática.



#### 4.2.6.2. Malato desidrogenase 2

A figura 14 mostra as curvas de tendências da atividades enzimática da isoforma MDH-2 lidas no VDS nos diferentes momento de coleta, possuindo um comportamento gráfico semelhante às atividades medidas na MDH-1.

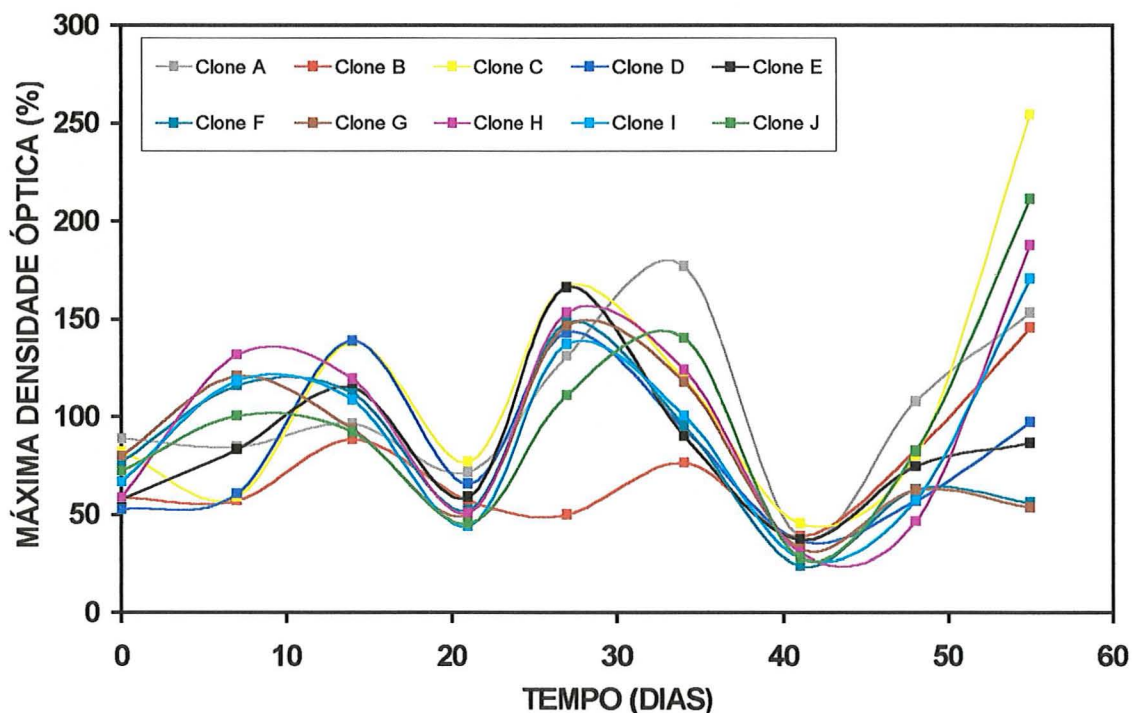


Figura 14: Curvas de tendência da atividade enzimática da Malato desidrogenase-2 durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A figura 06 mostra o zimograma com as áreas de leituras das amostras para a isoforma MDH-2. Houve um maior número de bandas nesse loco, com um agrupamento sendo detectadas apenas com a densitometria das bandas no VDS.

A tabela 09 mostra as quantidades da enzima MDH-2 em porcentagem no tempo máximo de acúmulo de massa seca (TMMS) dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 09. Porcentagem de atividade enzimática da Malato desidrogenase-2 no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	139,46
D	44,14	45,44
E	52,55	82,38
F	33,39	99,65
G	59,97	**
H	50,38	94,40
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Não houve uma similaridade no comportamento entre as porcentagens de atividade da MDH-2 no TMMS dos clones com o avanço do estresse e do envelhecimento. Clones como o F e o D, apesar de menores valores de TMMS e sujeitos a um maior efeito do envelhecimento, tiveram grandes variações nas porcentagens de atividade da MDH-2 entre si e os demais clones com maior valor de TMMS.

#### **4.2.7. Fosfoglucoase isomerase (PGI)**

Esta enzima foi a que demonstrou um comportamento mais homogêneo quanto à atividade em cada coleta para os locos PGI-1 e PGI-2. Uma considerada alta na atividade foi verificada na última coleta, aos 55 dias, em todos os clones analisados. O clone F, com menor valor de TMMS, apresentou uma menor porcentagem de atividade enzimática, para os dois locos, aos 55 dias, mostrando um declínio mais rápido do crescimento com maiores efeitos do estresse e do envelhecimento.

##### **4.2.7.1. Fosfoglucoase isomerase 1**

A figura 15 mostra as curvas de tendência das atividades enzimáticas lidas no VDS em cada momento de coleta. A amplitude dos dados entre os clones em cada coleta foi maior para PGI-1 do que para a PGI - 2. Comparar figura 13 com a figura 14.

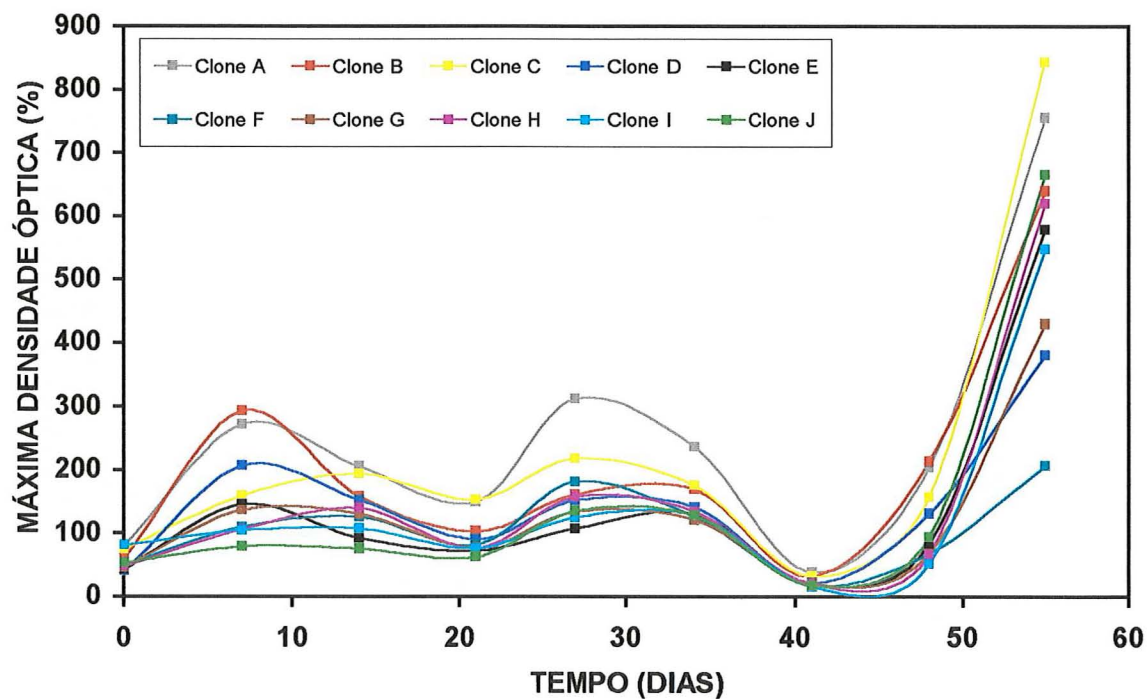


Figura 15: Curvas de tendência da atividade enzimática da Fosfoglucose isomerase-1 durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A figura 05 mostra o zimograma com as áreas de leitura das amostras. Houve um agrupamento de bandas, como já mencionado para outras enzimas. A visualização das bandas foi possível somente com a densitometria no VDS.

A tabela 10 mostra as atividades enzimáticas da PGI-1, em porcentagem, no tempo máximo de acúmulo de massa seca (TMMS) dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 10. Porcentagem de atividade enzimática da Fosfoglucoase isomerase-1 no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	98,09
D	44,14	70,13
E	52,55	405,65
F	33,39	130,30
G	59,97	**
H	50,38	254,32
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Esta enzima atua na via da glicólise e na síntese de amido, possuindo uma estrutura dimérica. Ela está localizada no citosol e nos plastídios (Kephart, 1990). O comportamento da atividade enzimática variou no decorrer do crescimento, com uma alta da atividade na primeira coleta (7 dias) e em torno da quarta coleta (27 dias). Nestes períodos, a maioria dos materiais se encontraram em desenvolvimento, exceto os clones F e D que desaceleraram seu crescimento e diminuíram o acúmulo de massa seca.

Observou-se um aumento de atividade enzimática com o aumento do crescimento, tanto para a PGI-1 e PGI-2.

#### 4.2.7.2. Fosfoglucoase isomerase 2

A figura 16 mostra as curvas de tendência da atividade enzimática da PGI-2 lidas no VDS em cada momento de coleta. O comportamento foi similar às curvas de tendência, obtidas para o loco PGI-1.

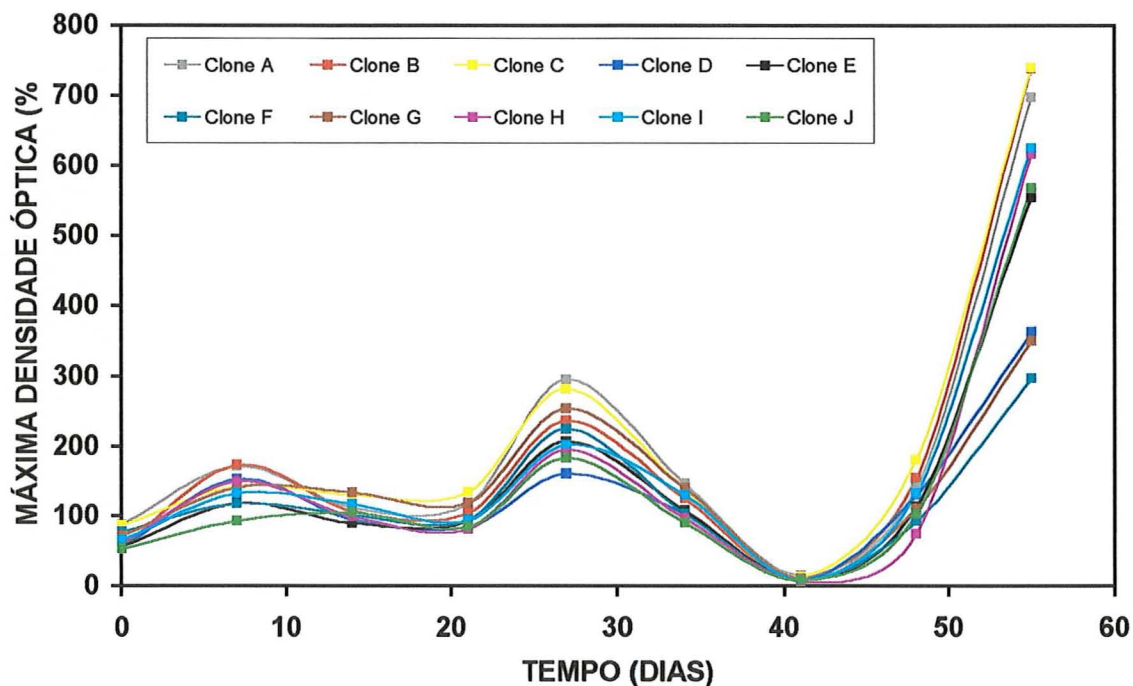


Figura 16: Curvas de tendência da atividade enzimática da Fosfoglucose isomerase-2 durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A figura 05 mostra o zimograma com as diferentes áreas de leituras das amostras. A enzima apresentou sobreposição de bandas, sendo detectadas com a densitometria no VDS.

A tabela 11 mostra as atividades da enzima PGI-2 em porcentagem no tempo máximo de acúmulo de massa seca (TMMS) dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 11. Porcentagem da atividade enzimática da Fosfoglucose isomerase-2 no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	371,67
D	44,14	63,11
E	52,55	400,28
F	33,39	114,27
G	59,97	**
H	50,38	258,41
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

As atividades enzimáticas estimadas para os clones C, D, E, F e H, mostraram uma grande variação da amplitude dos valores, com o aumento da atividade enzimática nas coletas finais, onde o crescimento e o envelhecimento se intensificaram.

#### 4.2.8. Peroxidase (PO)

A enzima apresentou uma grande variação no comportamento em cada momento de coleta. Uma tendência de alta na atividade foi verificada nas primeiras coletas, quando o crescimento dos clones foi maior. A partir da quarta coleta (27 dias), a atividade da enzima retornou aos patamares iniciais da cultura, mantendo-os, até os 55 dias. A atividade da peroxidase é extremamente variada quanto a fisiologia da planta nas diferentes fases do crescimento. Ela atua em todas as partes da célula, principalmente junto às membranas (Hirsh, 1990). O aumento da atividade nos primeiros estágios da cultura, pode indicar uma relação da peroxidase com a multiplicação e diferenciação celular (Hirsh, 1990), reduzindo esta atividade nos períodos de baixo ou nenhum crescimento. Não é possível afirmar qual a causa da queda da atividade nas fases finais de crescimento para as condições estudadas, demonstrando um comportamento contrário a outros estudos, que mostraram um aumento na atividade da peroxidase com o aumento do estresse e do envelhecimento.



Nas últimas coletas, a perda de estrutura na parte central conjuntos de brotações foi grande para os clones com menor valor de TMMS. Nesta região foi observada a maioria das células de calos, que durante as fases de crescimento intenso, sofreram uma ação da peroxidase, devido à expansão e ao processo de peroxidação da parede celular. Isto poderia ser uma das causas da maior atividade durante o crescimento.

A figura 17 mostra as curvas de tendência da atividade enzimática da PO lidas no VDS em cada momento de coleta, com uma maior variação no comportamento entre os clones nas fases iniciais de crescimento.

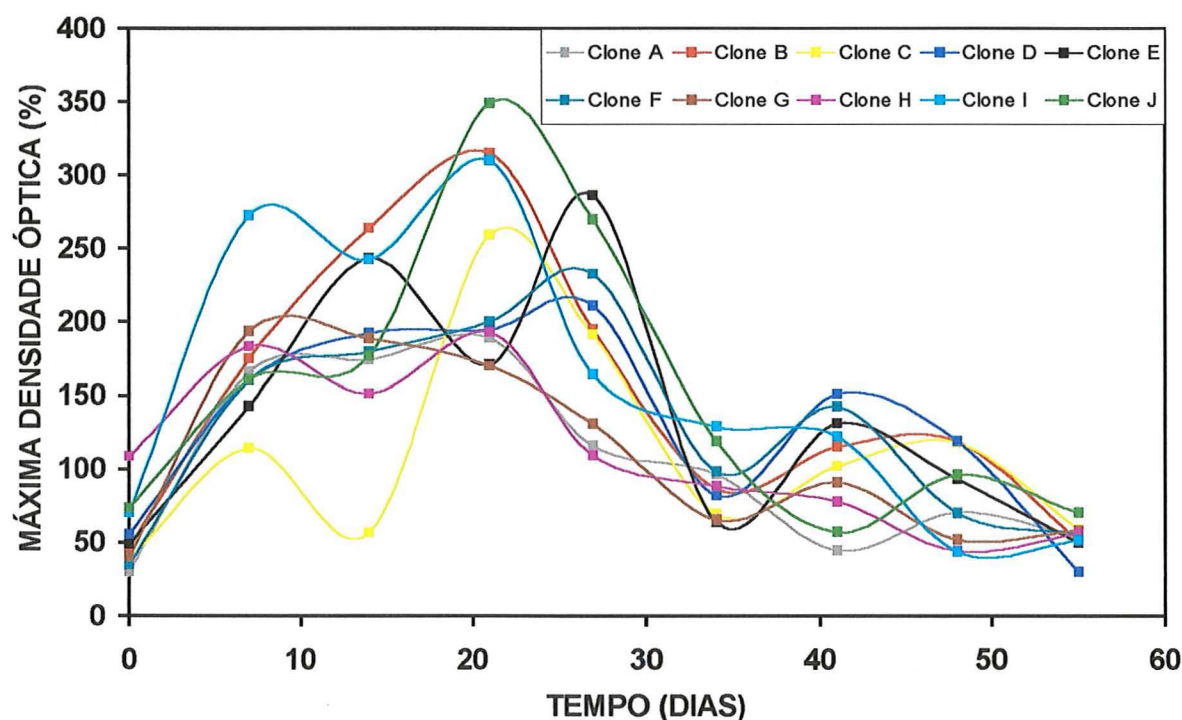


Figura 17: Curvas de tendência da atividade enzimática da Peroxidase durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

Observou-se um acúmulo da atividade enzimática durante a primeira metade do período de cultura estudado, com pico aos 21 dias. Durante a segunda metade do



período de cultura, verificou-se uma sensível queda da atividade da enzima, que regressou aos níveis observados no início da cultura.

A figura 05 mostra o zimograma com as diferentes áreas de leituras das amostras. A enzima apresentou uma pequena variação do número de bandas durante o crescimento dos clones. As variações nas isoformas dessa enzima são decorrentes da atuação em muitas regiões da célula, sendo sua síntese estimulada, em grande parte, pelas condições do meio ambiente (Kephart, 1990).

A tabela 12 mostra os valores da concentração da peroxidase no tempo de máximo acúmulo de matéria seca (TMMS) dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 12. Porcentagem de atividade enzimática da Peroxidase no TMMS dos clones de *Eucalyptus* spp, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	97,17
D	44,14	136,40
E	52,55	64,99
F	33,39	109,92
G	59,97	**
H	50,38	48,09
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Esta enzima atua nas via oxidativas da planta, podendo possuir uma estrutura monomérica e/ou dimérica, apresentando muitos locos com grandes variações de isoformas nos zimogramas. Ela está localizada no citosol e junto à parede celular e às membranas dos componentes celulares (Kephart, 1990).

#### 4.2.9. Leucina aminopeptidase (LAP)

A figura 18 mostra as curvas de tendência da atividade enzimática da LAP lidas no VDS em cada momento de coleta. Uma grande variação no comportamento entre os clones foi verificada, apresentando uma alta na atividade da enzima nas fases iniciais de crescimento. Um pico de atividade foi observado entre a coleta 2 (14 dias) e coleta 3 (21 dias) para a maioria dos clones, sendo que a atividade enzimática retornou à patamares iniciais na coleta 5 (34 dias), mantendo esses valores até as coleta finais, aos 55 dias de cultura.

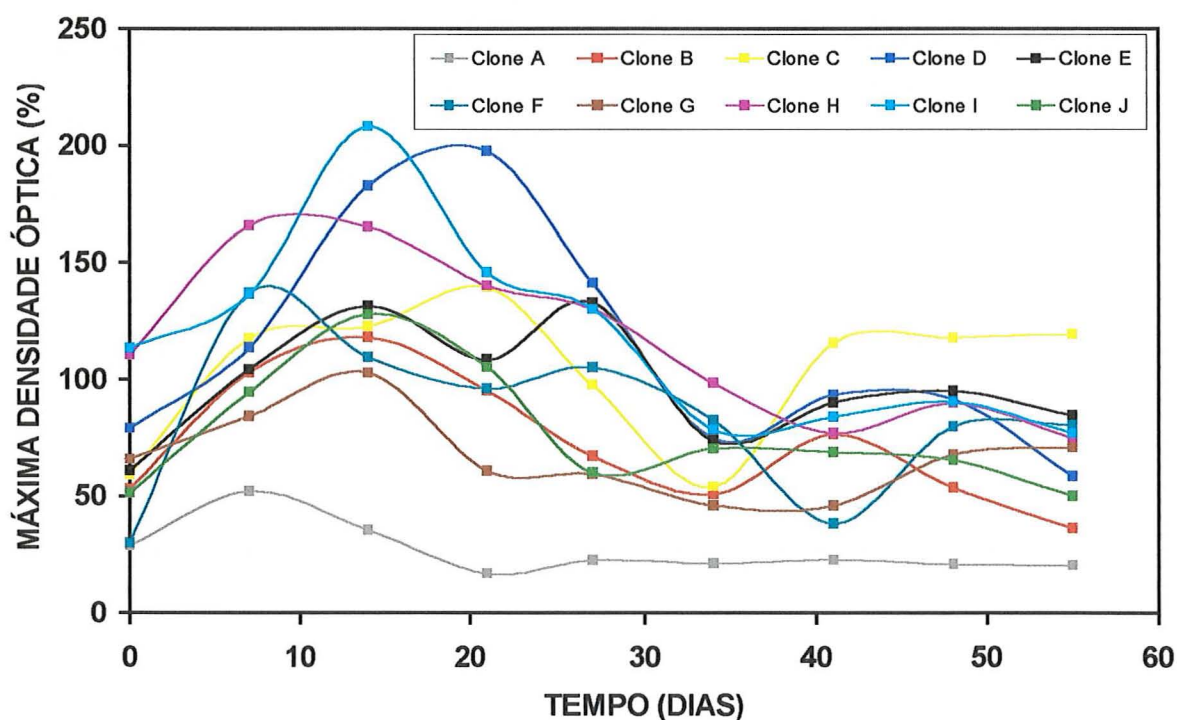


Figura 18: Curvas de tendência da atividade enzimática da Leucina aminopeptidase durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

O clone A apresentou um comportamento diferente dos demais, com uma atividade menor, porém com uma pequena alta na atividade no início da cultura. Este clone corresponde ao híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e apresentou um valor de TMMS de 73,69 dias, superior a todos os outros clones. Este clone mostrou boas condições de crescimento, com um menor efeito do estresse e do envelhecimento em relação à maioria dos demais clones.

A figura 07, mostra o zimograma da LAP com as diferentes áreas de leitura das amostras.

A tabela 13, mostra os valores da atividade enzimática da LAP no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 13. Porcentagem de atividade enzimática da Leucina aminopeptidase no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	ATIVIDADE (%)
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	118,21
D	44,14	92,36
E	52,55	88,29
F	33,39	845,14
G	59,97	**
H	50,38	84,64
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Verificou-se uma pequena variação das atividades da enzima no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Esta enzima está localizada no citosol das células e atua no catabolismo de proteínas, possuindo uma estrutura monomérica, apresentando de dois a três locos. (Torggler et al. 1995).

Assim, esperava-se uma atividade mais alta dessa enzima nos clones de menor valor de TMMS. Isto não se confirmou, pois os clones F e D, com

valores de TMMS de 33,39 dias e 44,14 dias respectivamente, não apresentaram este padrão. O clone I, com TMMS de 63,94 dias, mostrou uma das maiores atividades dessa enzima nas primeiras fases do crescimento, apesar de apresentar um dos maiores valores de TMMS. O catabolismo de proteínas é mais intenso nas fases finais de crescimento e de estresse. O aumento da atividade da LAP nas primeiras fases de crescimento, contraria esta idéia. Esse comportamento poderia refletir uma ação enzimática sobre proteínas na formação e re-mobilização para outras estruturas. Esta afirmação não pode ser confirmada neste estudo. A maioria dos clones mostraram valores semelhantes de atividades da LAP nas fases iniciais e finais do crescimento, mantendo esses níveis nos períodos onde o crescimento era desacelerado, como nos clones D e E.

#### **4.2.10. Proteínas solúveis totais**

A figura 19 mostra as curvas de tendência das quantidades de proteínas solúveis totais pelo método do Biureto. Uma grande oscilação foi verificada nas concentrações de proteínas em cada momento de coleta. O clones C, D e E apresentaram concentrações finais maiores que as quantidades iniciais após 55 dias de cultura. Os demais clones mantiveram valores finais e iniciais semelhantes. O clone I apresentou um valor superior da concentração de proteínas solúveis totais no material da subcultura anterior do que na última coleta do experimento.

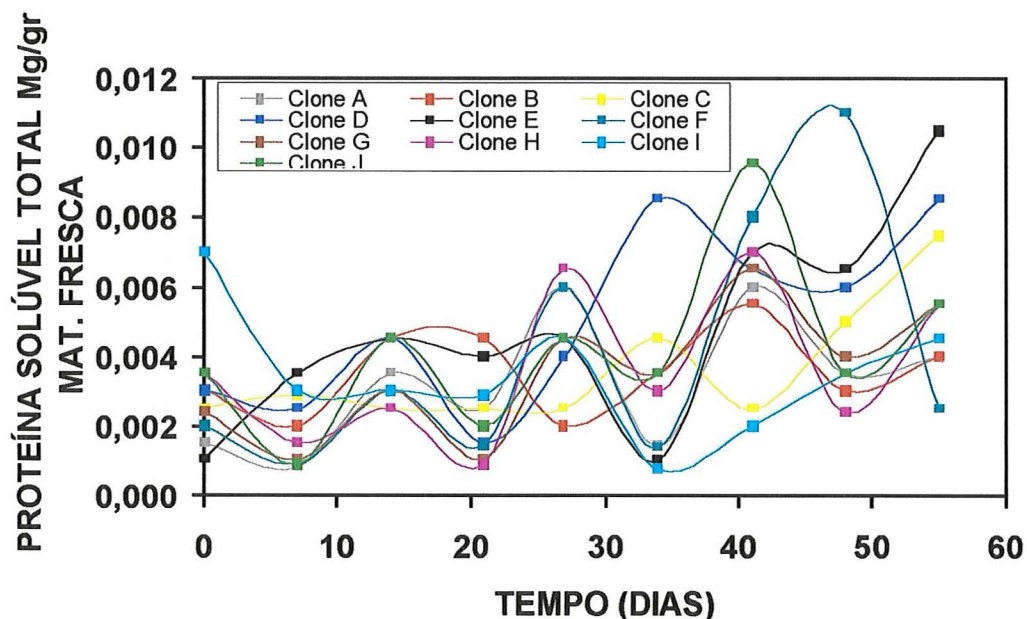


Figura 19: Curvas de tendência da concentração de proteínas solúveis totais durante 55 dias de cultura *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp. em meio JADS.

A tabela 14, mostra os valores da concentração de proteínas solúveis totais em mg/gr de matéria fresca no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Tabela 14. Porcentagem de proteínas solúveis totais no TMMS dos clones de *Eucalyptus*, cultivados em meio JADS *in vitro*.

CLONE	TMMS	QUANTIDADE mg/gr
A	73,69	**
B	61,37	**
C	50,39	0,0080
D	44,14	0,0063
E	52,55	0,0091
F	33,39	0,0018
G	59,97	**
H	50,38	0,0035
I	63,94	**
J	57,56	**

Onde: TMMS - Tempo máximo de acúmulo de matéria seca em dias.

\*\* - Valores não estimados.

Observou-se uma grande variação das concentrações de proteínas solúveis totais no TMMS dos clones C, D, E, F, H.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração de proteínas totais dos clones durante as fases de crescimento (Dias, 1982) e os momentos de maior ação do estresse e do envelhecimento.

Os clones não mostraram um padrão de comportamento entre os tempos de máximo acúmulo de matéria seca (TMMS) e as porcentagens de atividades para a maioria das enzimas estudadas. Os valores das porcentagens das atividades enzimáticas variaram independentemente do maior ou menor valor de TMMS dos clones. Desta forma, devem-se intensificar os estudos da atividade de enzimas para o monitoramento do crescimento *in vitro* no sentido de indicação dos melhores momentos para as repicagens de diferentes materiais genéticos em caráter comercial.

A utilização do tempo de máximo acúmulo de matéria seca (TMMS) na indicação do momento ideal para a repicagem, mostrou-se mais eficiente que a utilização de parâmetros bioquímicos como a utilização de enzimas, por estes sofrerem grandes influências do ambiente e atuarem em vias metabólicas complexas de difícil compreensão.

## 5. CONCLUSÕES

Uma amplitude superior ao dobro do tempo entre o maior valor (Clone A:73,69 dias) e o menor (Clone F: 33,39 dias) foi verificada entre as estimativas de tempo máximo de acúmulo de matéria seca (TMMS). Esta variação é decorrente da variabilidade genética entre os clones.

Não é aconselhável a utilização de um único protocolo de propagação *in vitro* devido a grande variação no TMMS que ocorre em diferentes materiais genéticos.

Clones com TMMS similares apresentaram grandes variações nas atividades enzimáticas, mostrando que o crescimento das brotações de *Eucalyptus* spp. não depende diretamente da atividade de uma única enzima.

As enzimas analisadas demonstraram grande variação quanto ao comportamento das atividades enzimáticas nos diferentes momentos de coleta e fases do crescimento *in vitro* de *Eucalyptus* spp.

Houve um aumento da atividade para a maioria das enzimas, principalmente ACP, G6PDH, MDH-1 e MDH-2. As enzimas PO, LAP e SKDH apresentaram maiores atividades nas primeiras fases do crescimento *in vitro*, decaindo sua atividade a patamares iniciais com o aumento do tempo de cultura e conseqüente envelhecimento.

A enzima PGI apresentou uma similaridade nos padrões de atividade para os dois locos analisados, PGI-1 e PGI-2. Uma considerável alta da atividade enzimática foi verificada para os dois locos nas duas últimas coletas (48 e 55 dias), período em que a ação do estresse e do envelhecimento se intensificaram.

Apenas a enzima Peroxidase (PO) apresentou variação do número de bandas. As demais isoenzimas não apresentaram variação no número de bandas durante as diferentes coletas, verificando-se apenas alterações das atividades das mesmas no decorrer do crescimento.



## **6. ANEXOS**

RELAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS  
SOLÚVEIS TOTAIS (MÉTODO DO BIURETO) E PARA A ELETROFORESE DE  
ISOENZIMAS

## ANEXO A

Composição do meio JADS, descrito por Correia (1993), sem a adição de arginina e glutamina.

## Composição do meio de cultura JADS.

Substância	mg/l
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	324.0
$\text{KNO}_3$	809.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	408.0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1181.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	739.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.6
$\text{Na}_2$ EDTA	74.5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.32
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3.1
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina - HCl	0.5
Tiamina - HCl	5.0
Mionositol	100.0
L - cisteína	2.50
Pantotenato de Cálcio	2.40
Sacarose	30000.0

## ANEXO B

Protocolo para o método do Biureto de determinação de proteínas solúveis totais  
(Weichselbaum, 1946).

### 1. Solução estoque de biureto

Composição de solução estoque para dosagem de proteínas pelo método do biureto.

Substância	Quantidade
Tartarato de sódio e potássio (sal de Rochelle)	45 g
NaOH 0,2 N	400 ml
Dissolver e juntar $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15 g
Iodeto de potássio	5 g
Dissolver todo o reagente em 1 litro com NaOH 0,2 N	

### 2. Reagente de Biureto

Diluir 20ml da solução estoque para 100 ml com NaOH 0,2 N contendo 5g de iodeto de potássio. A solução de soda e iodeto de potássio deve ser livre de carbonato.

3. Utilizar uma alíquota de 0,1 ml de amostra para 5ml do reagente do biureto, deixando em banho-maria a 32° C durante 10 minutos. Utilizar 0,1 ml de água e 5ml de biureto como o padrão branco.

### ANEXO C

Composição da solução extratora nº1 de Alfenas et al. (1991), sem a presença da substância  $\beta$ -mercaptoetanol.

Composição da solução extratora nº 1 de Alfenas (Alfenas et al., 1991).

Substância	Quantidade
Fosfato de sódio bibásico (0,034M)	0,6 g
Sacarose (0.2M)	7 g
PVP - 40 (2,56%)	2.56 g
DTT (3mM)	50 mg
L - Ácido ascórbico (5,7 mM)	100 mg
DIECA (5,8 mM)	100 mg
Bissulfito de sódio (2,6 mM)	50 mg
Borato de sódio ( Boráx ) (2,5 mM)	50 mg
Polietilenoglicol - 6000 (1%)	1 g
Água deionizada ( ou destilada q. s. p. )	100 ml

## ANEXO D

Composição dos sistemas tampão gel/eletrodo para eletroforese e condições de corrida.

SISTEMA	TAMPÃO		CONDIÇÕES DE CORRIDA
	GEL	ELETRODO	
Citrato Morfolina (CM) <sup>1</sup>	Diluição 1:20 do tampão eletrodo	Ác. cítrico (0,04M) 8,40 g/l. N-(3 aminopropil) Morfolina: titular até pH 6.1	9mA/cm de gel
Tris citrato (TC) <sup>2</sup>	Diluição a 3,5% do tampão eletrodo	Tris 27.01 g/l Ác. cítrico 16,52 g/l (pH 7,5)	20 V/cm de gel
Tris borato (TB) <sup>3</sup>	Alíquotas de 2,5% das soluções Tris 0,015M e Ác. cítrico 0,036M acertado pH 8.3 com cristais de trizma base.	Ác. bórico 0,3M, acertado pH8,3 com NaOH 4N	início: 150V (30min.) e em seguida aumentar para 300V

1. Cheliak & Pitel (1984)

2. Alfenas et al. (1991)

3. Ballve et al. (1991)

## ANEXO E

Protocolos para coloração enzimática em gel de amido das enzimas estudadas.

### **Fosfatase ácida. ACP - E. C. 3.1.3.2**

$\alpha$ - naftil fosfato ácido de sódio	0,04g
Fast Garnet GBC salt	0,04g
MgCl <sub>2</sub> (1%)	2ml
Tampão acetato de Na 0,1M	40ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 1,5 horas foi padronizado para a ACP,.

### **Glucose-6-fosfato desidrogenase. G6PDH - E.C. 1.1.1.49**

Glucose-6-fosfato	200mg
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	20mg
MTT ou NBT	20mg
PMS	2mg
MgCl <sub>2</sub> (1%)	1ml
Tris-HCl 0,2M pH8,0	100ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 50 minutos foi padronizado para a G6PDH.

## Continuação do Anexo E

**6-fosfogluconato desidrogenase. 6PGDH - E.C. 1.1.1.44**

Ác. 6-fosfogluconico, Na <sub>3</sub>	40mg
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	20mg
MTT ou NBT	20mg
PMS	2m
MgCl <sub>2</sub> (1%)	2ml
Tris-HCl 0,1M pH8,0	100ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 1 hora e 50 minutos, foi padronizado para a 6GPDH.

**Isocitrato desidrogenase. IDH - E. C. 1.1.1.42**

DL-Ác. isocítrico, Na <sub>3</sub>	200mg
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	20m
MTT ou NBT	20mg
PMS	2mg
MgCl <sub>2</sub> (1%)	2ml
Tris-HCl 0,1M pH8,0	100ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 1 hora foi padronizado para a IDH.

## Continuação do Anexo E

**Leucina aminopeptidase. LAP - E. C. 3.4.11.1**

## Preparação da solução A

Tris	24,2g
Ác. maléico	24,2g
Água destilada	1000ml

## Preparação da solução B

NaOH	0,8g
Água destilada	1000ml

Misturar 50ml da solução A e 20ml da solução B com 200ml de água destilada. Terá pH 6.0.

## Solução para a coloração:

L-Leucina- $\beta$ -naftilamida	10mg
Fast Black K salt	20mg
Água destilada	30ml
Mistura A + B	70ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 1 hora e 10 minutos, foi padronizado para a LAP.



## Continuação do Anexo E

**Malato desidrogenase. MDH - E. C. 1.1.1.37**

Ác. málico 0.5M pH 8.0	4ml
NAD <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	20mg
MTT ou NBT	20mg
PMS	2mg
Tris-HCl 0,1M, pH 8,5	100ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 40 minutos, foi padronizado para a MDH.

**Peroxidase. PO - E. C. 1.11.1.7**

O-dianizidina bi-HCl	32mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	2ml
Tampão acetato de sódio 0,1M pH4,5	100ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C com a solução contendo somente O-dianizidina bi-HCl por 30 minutos e adicionar em seguida a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% v/v), permitindo a coloração imediata, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 2 minutos foi padronizado para a PO após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% v/v).

Continuação do Anexo E

**Fosfoglucoase isomerase. PGI - E. C. 5.3.1.9**

Frutose-6-fosfato, Na <sub>2</sub>	75mg
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	20mg
MTT ou NBT	20mg
PMS	2ml
MgCl <sub>2</sub> (1%)	2ml
Tris-HCl 0,1M pH8,0	100ml
Glucose-6-fosfato desidrogenase	0,02ml ou 20 un

Adicionar G6PDH por último e manter o gel no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 50 minutos foi padronizado para a PGI.

**Xiquimato desidrogenase. SKDH - E. C. 1.1.1.25**

Ác. xiquímico	100mg
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	20mg
MTT ou NBT	20mg
PMS	2mg
Tris-HCl 0,1M pH8,5	100ml

O gel foi mantido no escuro à 30 - 37° C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%.

Um tempo de coloração de 50 minutos foi padronizado para a SKDH.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEDIPE, N. O.; HUNT, L. A.; FLETCHER, R. A. Effects of benzyladenine on photosynthesis, growth and senescence of the bean plant. **Physiologia Plantarum**, v. 25, n.1/7, p. 151-153, 1971.
- ALFENAS, A C.; PETERS, I.; BRUNE, W. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Editora Universitária, 1991. 242p.
- ALLEMAND, J. C.; CORNU, D.; MACHEIX, J.J. Biochemical attributes associated with rejuvenation of walnut tree. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.26, n. 2, p. 139-144, 1988.
- ALLISON J. C. S.; WEIMMANN, H. Effect of absence of developing grain on carbohydrate content and senescence of maize leaves. **Plant Physiology**, v. 46, n. 1/5, p. 435-436, 1970.
- ARADHYA, K. M.; PHILLIPS, V. D. Genetic variability in fourteen provenances of *Eucalyptus* species in Hawaii. **Silvae Genetica**, v. 42, p. 9-15, 1993.
- ARADHYA, K. M.; PHILLIPS, V. D. Lack of association between allozyme heterozygosity and juvenile traits in *Eucalyptus*. **New Forests**, v. 9, n. 2, p. 97-110, 1995.

- ATKIN, R. K.; SRIVASTAVA, B. I. S. Studies on protein synthesis by senescing and kinetin-treated barley leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 23, n. 2, p. 304-315, 1970.
- BAKER, E. J.; TAKEO, T. Acid phosphatase in plant tissues I. Changes in activity and multiple forms in tea leaves and tomato fruit during maturation and senescence. **Plant Cell Physiology**, v. 14, p.459-471, 1973.
- BALLVE, R. M. L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FLHO, H. P.; SIQUEIRA, W. J.; SOBRINHO, L. T.; POMPEU, J. J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos nucelares no melhoramento de citros. **Bragantia**, v.50, n.1, p.57-76, 1991.
- BEEVERS, L. Effect of gibberellic acid on the senescence of leaf discs of *Nasturtium* (*Tropalolum majus*). **Plant Physiology**, v. 41, n. 6, p. 1074-1076, 1966.
- BEEVERS, L.; GUERNSEY, F. S. Interaction of growth regulators in the senescence of *Nasturtium* leaf disks. **Nature**, v. 214, p. 941-942, 1967.
- BENSON, E. E. Free radicals in stressed and aging plant tissue culture. In: RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S. **Plant aging basic and applied approaches**. New York: Plenum Press, 1990. section 4, p. 169-275.
- BRADFORD, K. J. Relations and growth of the *Flacca* tomato mutant in relation to abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 72, n. 1, p. 251-255, 1983.
- BRANDNER, S. J. C. Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean. **Plant Physiology**, v. 98, n. 3, p. 1128-1132, 1992.

- BRECHLIN, P.; MAECK, G.; BURBA, M.; TISCHENER, R. Changes in the isoform pattern and subunit composition of GS-1 in sugar beet leaves dependent on leaf age. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, n. 4/5, p. 497-502, 1999.
- BRETTELL, R. S., DENNIS, E., SCOWCROFT, W. R.; PEACOCK, W. J. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. **Molecular and General Genetics**, v. 202, p. 235-239, 1988.
- BURKE, J. J.; TORRES, W. K.; SWAFFORD, J. R.; BURTON, J. W.; WILSON, R. F. Studies on genetic male-sterile soybeans. III. The initiation of monocarpic senescence. **Plant Physiology**, v. 75, n. 4, p. 1058-1063, 1984.
- BUTLER, R. D. The fine structure of senescing cotyledons of *Cucumber*. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n. 15, p. 535-543, 1967.
- CHELIAK, W. M; PITEL, J. A **Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species**. Ottawa: Patawana National Forestry Institute, 1984. 49 p. (Canadian Forestry Service Information Report, PI – X –42).
- CHRISTOU, P.; SWAIN, W. F.; YANG, N. S.; McCABE, D. E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 86, n. 19, p.7500-7501, 1989.
- CHOE, H. T.; THIMANN, K. V.; KENNETH, V. The metabolism of Oat leaves during senescence. III. The senescence of isolated chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 55, n. 4/6, p. 828-834, 1975.

- COLQUHOUN, A. J.; HILLMAN, J. R. The effects of abscisic acid on senescence in leaf discs of radish, *Raphanus sativus* L. **Planta**, v. 105, p. 213-224, 1972.
- COMPTON, M. E.; PREECE, J. E. Exudation and plant establishment. **IAPTC Newsletter**, v. 50, p. 9-18, 1986.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DENNIS, D. T.; STUBBS, M.; COULTATE, T. P. The inhibition of brussels sprouts leaf senescence by kinins. **Canadian Journal of Botany**, v. 45, n. 7, p. 1019-1024, 1967.
- DIAS, J. M. C. S. Aplicação do método dinâmico de medida da velocidade específica máxima de crescimento celular à fermentação alcoólica contínua de mosto de melão. São Paulo, 1982. 225p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- DINKEL, A. M.; KLEINSCHMIT, J. Aging in tree species: present knowledge. In: RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S. **Plant aging**. New York: Plenum Press, 1990. section 1, p. 51-63.
- DODGE, J. D. Change in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of betula leaves. **Annals of Botany**, v. 34, p. 817-824, 1970.
- DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: John Wiley, 1981, 709 p.

- DÜGGELIN, T.; BORTLIK, K.; GUT, H.; MATILE, P.; THOMAS, H. Leaf senescence in *Festuca pratensis*: accumulation of lipofuscinlike compounds. **Physiologia Plantarum**, v.74, n. 1, p. 131-136, 1988.
- DYKHUIZEN, D. E.; DEAN, A. M.; HARTL, D. L. Metabolic flux and fitness. **Genetics**, v. 115, p. 25 - 31, 1987.
- EVANS, D. A. Somaclonal variation. Genetic basis and breeding applications. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 46-50, 1989.
- FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, v.45, p. 22-30, 1992.
- FERRI, M. G. (Ed.) **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. 2v.
- FLETCHER, R. A. Retardation of leaf senescence by benzyladenine in intact bean plants. **Planta**, v. 89, p. 1-8, 1969.
- FORTANIER, E. J.; JONKERS, H. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetical and physiological aging. **Acta Horticulturae**, n. 56, p. 37-44, 1976.
- FUKAZAWA, H. Disc electrophoresis of proteins from juvenile and adult specimens of ivy. **Nature**, v. 212, p. 516-517, 1966.
- GARRISON, F. R.; BRINKER, A. M.; NOODÉN L. D. Relative activities of xylem-supplied cytokinins in retarding soybean leaf senescence and sustaining pod development. **Plant & Cell Physiology**, v. 25, n. 3, p. 213-224, 1984.

- GEPSTEIN, S.; THIMANN, K. V. Changes in the abscisic acid content of oat leaves during senescence. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 77, n. 4, p. 2050-2053, 1980.
- GOEBEL, K. Ueber die Jugendzuständer der Pflanzen. **Flora**, v. 72, p. 1, 1989.
- GOLDTHWAIT, J. J.; LAETSCH, W. M. Regulation of senescence in bean leaf discs by light and chemical growth regulators. **Plant Physiology**, v. 42, n. 7, p. 1757-1762, 1967.
- GOLFARI, L. Comparações de locais entre Austrália e Brasil visando ao plantio de *Eucalyptus grandis*. **Silvicultura**, v. 31, p. 407-409, 1983.
- GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil: 2º aproximação**. Belo Horizonte: IBDF, 1978. 66p. ( Série Técnica, 11).
- GONÇALVES, A. M. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S. T. Black "in vitro". Piracicaba, 1982. 97 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GRABAU, L. J. Physiological mechanisms of plant senescence. In: PESSARAKLI, M. (Ed.) **Handbook of plant and crop physiology**. New York: University of Arizona, 1995. cap. 22, p. 483- 495.
- GRABAU, L. J.; BLEVINS, D. O.; MINOR, H. C. P. Nutrition during seed development, leaf senescence, pod retention, and seed weight of soybean. **Plant Physiology**, v. 82, n. 4, p. 1008-1012, 1986.



- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990. p. 99-200.
- GUIAMÉT, J. J.; SCHWARTZ, E.; PICHERSKY, E.; NOODÉN, L. D. Characterization of cytoplasmic and nuclear mutations affecting chlorophyll and chlorophyll-binding protein during senescence in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, n. 1, p. 227-231, 1991.
- HABER, A. H.; THOMPSON, P. J.; WALNE, P. L.; TRIPLETT, L. L. Nonphotosynthetic retardation of chloroplast senescence by light. **Plant Physiology**, v. 44, n. 7, p. 1619-1628, 1969.
- HALL A. J.; BRADY, C. J. Assimilate source-sink relationships in *Capsicum annuum* L. II. Effects of fruiting and defloration on the photosynthetic capacity and senescence of the leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 4, n. 5, p. 771-783, 1977.
- HALL, A. J.; MILTHORPE, F. L. Assimilate source-sink relationships in *Capsicum annuum* L. III. The effects of fruits excision on photosynthesis and leaf and stem carbohydrates. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.5, n.1, p. 1-13, 1978.
- HALL, N.; JOHNSON, R. D.; CHIPPENDALE, G. M. **Forest trees of Australian**, Canberra, Australian Government, 1970. 535p.
- HAMMERSCHLAG, F. A. Temperate fruits and nuts. In: ZIMMERMAN, R. H.; GRIESBACH, R. J.; HAMMERSCHLAG, F. A.; E LAWSON, R. H. (Ed.) **Tissue culture as a plant production system for horticultural crops**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. cap. 22, p. 236.

- HERRMANN, B.; FELLER, U. CO<sub>2</sub>, light and temperature influence senescence and protein degradation in wheat leaf segments. **Physiologia Plantarum**, v. 103, n. 3, p. 320-326, 1998.
- HIRSH, A. M. Interactions between genotype and developmental factors modifying peroxidase expression. In RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S. **Plant aging**. New York: Plenum Press, 1990. section 3, p. 183-190.
- HOGBERG, K. A.; ERIKSSON, U.; WERNER, M. Vegetative propagation and clonal forestry-focus on Norway spruce. **Redogorelse SkogForsk**, v. 2, n. 38, p. 5, 1995.
- HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley, 1995. 464p.
- JESCHKE, W. D.; PATE, J. S. Temporal patterns of uptake, flow and utilization of nitrate reduced nitrogen and carbon in a leaf of salt treated castor bean (*Ricinus communis* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n.248, p. 393-402, 1992.
- KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozyme: a comparative analysis of techniques. **American Journal Botany**, v. 77, n.5, p. 693-712, 1990.
- KOEHN, R. K.; ZERA, A. J.; HALL, J. G. Enzyme polymorphisms and natural selection. In: NEI, M.; KOEHN, R. K. (Ed.) **Evolution of genes and proteins**. Sunderland: Sinauer Associates, 1983. p. 115 - 136.
- KRIZEK, D. T.; MCILRATH, W. J.; VERGARA, B. S. Photoperiodic induction of senescence in *Xanthium* plants. **Science**, v. 151, n.3706, p. 95-96, 1966.

LEDIG, F.D.; GURIES, R. P.; BONEFELD, B. A. The relation of growth to heterozygosity in pitch pine. **Evolution**, v. 37, n. 6, p. 1227- 238, 1983.

LINDOO, S. J.; NOODÉN, L. D. Correlation of cytokinins and abscisic acid with monocarpic senescence in soybeans. **Plant & Cell Physiology**, v. 19, n. 6, p. 997-1006, 1978.

MACLEAN, K. S.; ROBERTSON , R. G. Trace element levels in red spruce and the effects of age, crown and seasonal changes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 12, n. 5, p. 483-493, 1981.

MAKOVETZKI, S.; GOLDSCHMIDT, E. E. A requirement for cytoplasmic protein synthesis during chloroplast senescence in the aquatic plant *Anacharis canadensis*. **Plant & Cell Physiology**, v.17, n.4, p 859-862, 1976.

MARTIN, C.; THIMANN, K. V. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. **Plant Physiology**, v. 49, n.1/6, p. 64-71, 1972.

MATILE, P. Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration. **Experimental-Gerontology**, v. 35, n. 2. p. 145-158, 2000.

MATTOO, A K.; AHARONI, N. Ethylene and plant senescence. In: NOODÉN, L. D.; LEOPOLD, A C. **Senescence and aging in plants**. London: Academic Press, 1988. p. 242-269.

- MENCK, A. L. M. Crescimento e atividade da fosfatase ácida de plântulas de progênies de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em diferentes doses de fósforo *in vitro*. Piracicaba, 1996, 100p. Dissertação (M. S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.
- MILLIKAN, D. F.; JANKIEWICZ, L. S. Mineral and protein changes associated with juvenile and adult forms of *Hedera helix*. **Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.** XIV, v. 11/12, p. 801-803, 1966.
- MONDAL, M. H.; BRUN, W. A.; BRENNER, M. L. Effects of sink removal on photosynthesis and senescence in leaves of soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiology**, v. 61, n. 1, p. 394-397, 1978.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review Plant Physiology**, v. 25, p. 249-251, 1974.
- NEALES, T. T.; MASIA, A.; ZHANG, J.; DAVIES, W. J. The effects of partially drying part of the root system of *Helianthus annuus* on the abscisic acid content of the roots, xylem and leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 219, p. 1113-1120, 1989.
- NOODÉN, L. D.; LEOPOLD, A. C. In: LETHAM D. S.; GOODWIN, HIGGINS, P. B. T. I. V. (Ed.) **Phytochromes and the endogenous regulation of senescence and abscission**. Amsterdam: Elsevier, 1978. 329p.
- NOODÉN, L. D.; MURRAY, B. J. Transmission of the monocarpic senescence signal via the xylem in soybean. **Plant Physiology**, v. 69, n. 4, p. 754-756, 1982.

- NOODÉN, L. D.; SINGH, S.; LETHAM, D. S. Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. **Plant Physiology**, v. 93, n. 1, p. 33-39, 1990.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007, 1975.
- OKATAN, Y.; KAHANAK, G. M.; NOODÉN, L. D. Characterization and kinetics of soybean maturation and monocarpic senescence. **Physiologia Plantarum**, v. 52, n. 2, p. 330-338, 1981.
- OSBORNE, D. J. Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in Xanthium leaves during senescence. **Plant Physiology**, v. 37, n. 1, p. 595-602, 1962.
- PARK, Y.; MORRIS, M. M.; MACKINNEY, G. On chlorophyll breakdown in senescence leaves. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 279-281, 1973.
- PETERSON, L. W.; HUFFAKER, R. C. Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. **Plant Physiology**, v. 55, n. 4/6, p. 1009-1015, 1975.
- PIERCE, B. A.; MITTON, J. B. Allozyme heterozygosity and growth in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Journal of Heredity**, v. 73, p. 250 - 253, 1982.
- RADLEY, M. The development of wheat grain in relation to endogenous growth substances. **Journal of Experimental Botany**, v. 27, n. 100, p. 1009-1021, 1976.

- ROBERTS, J. A.; OSBOME, D. J. Auxin and the control of ethylene production during the development and senescence of leaves and fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 32, n. 130, p. 875-887, 1981.
- ROBERTSON, J. M.; HUBICK, K. T.; YEUNG, E. C.; REID, D. M. Development responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 224, p. 325-337, 1990.
- RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S. **Plant aging**. New York: Plenum Press, 1990. 450p.
- SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics**, v. 3, n. 1, p. 37 – 79, 1969.
- SCHAAL, B. A.; LEVIN, D. A. The demographics genetics of *Liatris cylinaracea* Mirchx. (Compositae) **American Naturalist**, v. 110, p. 191-206, 1976.
- SCHAFFALITZKY, M. M. Investigations on aging of apical meristems in woody plants and its importance in silviculture. **Det Forstlige Forsogsv. Danmark**, n. 25, p. 309-455, 1959.
- SCHLATTNER, U.; WAGNER, E.; GREPPIN, H.; BONZON, M. Adenylate Kinase in tobacco cell cultures. II. Variability and regulation of isoform activity patterns in different cell lines. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 400-409, 1994.
- SETH, A. K.; WAREING, P. F. Hormone-directed transport of metabolites and its possible role in plant senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 18, n. 54, p. 65-77, 1967.

- SHAW, M.; BHATTACHARYA, P. K.; QUICK, W. A. Chlorophyll, protein, and nucleic acid levels in detached, senescing wheat leaves. **Canadian Journal of Botany**, v. 43, n. 6, p. 739-746, 1965.
- SINCLAIR, T. R.; WIT, C. T. Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. **Science**, v. 189, n.4202, p. 565-567, 1975.
- SINGH, S. M.; ZOUROS, E. Genetic variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). **Evolution**, v. 32, p. 342-353, 1978.
- STADEN, J. V. Changes in endogenous cytokinin levels during abscission and senescence of *Streptocarpus* leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 24, n.81, p.667-673, 1973.
- SUSSEX, I. **Plant cell/cell interactions**. New York: Cold Springs Harbor Laboratory, 1985. p. 47-51:
- TETLEY, R. M.; THIMANN, K. V. The metabolism de oat leaves during senescence. **Plant Physiology**, v. 54, p. 294-303, 1974.
- THIMANN, K. V.; SATLER, S. O. Relation between senescence and stomatal opening: senescence in darkness (seedling oat leaves). **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 76, n. 6, p.2770-2773, 1979.
- THOMAS, H. Ultrastructure, polypeptide composition and photochemical activity of chloroplasts during foliar senescence of a non-yellowing mutant genotype of *Festuca pratensis* Hubs. **Planta**, v. 137. p 53-60, 1977.

- THOMAS, H.; STODDART, J. L. Separation of chlorophyll degradation from other senescence process in leaves of a mutant genotype of meadow fescue (*Festuca pratensis* L.). **Plant Physiology**, v. 56, n. 1/3, p. 438-441, 1975.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 175p. (Série Monografias, 1)
- TRIPPI, V. S. Maturation and senescence: types of aging. In: RODRÍGUEZ, R.; TAMÉS, R. S. **Plant aging**. New York: Plenum Press, 1990. cap. 2, p. 10-17.
- VAN DOOM, W. G.; VAN LIEBURG, M. J. Interaction between the effects of phytochrome and gibberellic acid on the senescence of *Alstroemeria pelegrina* leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 1, p. 182-186, 1993.
- VON ARNOLD, S.; ROOMANS, G. M. Analyses of mineral elements in vegetative buds and needles from young and old trees of *Picea abies*, **Canadian Journal of Forestry Research**, v. 13, p. 669-693, 1983.
- WEEDEN, N.; WENDEN, J. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: SOLTIS, D. and SOLTIS, P.(eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland:Dioscorides Press, 1989, 2v.
- WEICHSELBAUM, T. E. Determinação de proteínas solúveis totais pelo método do biureto. In: VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A., 1972, 552p.



- WOODWARD, R. G.; RAWSON, H. M. Photosynthesis and transpiration in dicotyledonous plants. II. Expanding and senescence leaves of soybean. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 3, n. 2, p. 257-267, 1976.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.
- XUEBAO, L.; ZHENBIN, W.; GUANGYUAN, H. Effects of low temperature and physiology age on superoxide dismutase in water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Solms). **Aquatic Botany**, v. 50, n. 2, p. 193-2000, 1995.
- ZELENEVA, I. V. Change in enzyme activities in a maize cell suspension culture as influenced by increasing the number of transfers: Are they caused by aging or by further metabolic adaptation? **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 40, n. 5, p. 696-699, 1993.
- ZHANG, J.; SCHURR, U.; DAVIES, W. J. Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in the roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, n. 192, p. 1174-1181, 1987.
- ZOUROS, E.; SINGH S. M.; MILES, H. E. Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations. **Evolution** v. 34, p. 856 - 867, 1980.