

34.072723



BR0343052



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**AÇÃO DA SACAROSE NA MANUTENÇÃO DE
INFLORESCÊNCIAS CORTADAS DE CRISÂNTEMO,
Dendranthema grandiflorum Kitamura, APÓS
EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO-GAMA**

OLIVIA KIMIKO KIKUCHI

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicação.

Orientador:

Dr. Frederico Maximiliano Wiendl

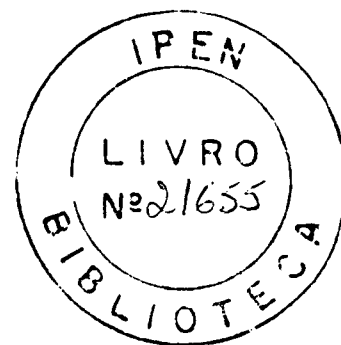
São Paulo

1998

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AÇÃO DA SACAROSE NA MANUTENÇÃO DE
INFLORESCÊNCIAS CORTADAS DE CRISÂNTEMO,
Dendranthema grandiflorum Kitamura, APÓS EXPOSIÇÃO
A RADIAÇÃO-GAMA**

OLIVIA KIMIKO KIKUCHI



**Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicação**

Orientador: Frederico Maximiliano Wiendl

SÃO PAULO

1998

Meu nome de família,
Kikuchi, significa em
japonês terra de crisântemos.

菊地



E, com um ano de idade,
na mais pura intuição
infantil, eu já havia
escolhido o material de
estudo para a minha tese.

AGRADECIMENTOS

Ao **Fritz**, Dr. Frederico Maximiliano Wiendl, que além de orientador se tornou um grande amigo sempre me impulsionando para frente, dando oportunidades e confiando até demais na minha capacidade;

Ao Dr. **Toru Hayashi**, chefe do Radiation Utilization Laboratory do National Food Research Institute (NFRI), que me abriu as portas do seu laboratório e foi um exemplo de entusiasmo também um grande incentivador para o meu crescimento profissional;

À Dra. **Setsuko Todoriki**, pesquisadora do Radiation Utilization Laboratory do NFRI, que me transferiu as técnicas bioquímicas e foi outro exemplo de dedicação ao trabalho;

À Sra. **Etsuko Hyodo**, funcionária do Radiation Utilization Laboratory do NFRI, sempre solícita e atenciosa;

À Japan International Cooperation Agency (**JICA**), pela concessão da bolsa para pesquisador *nikkey*, com a qual pude viajar para a Terra do Sol Nascente, de volta às minhas origens;

Ao **CNPq**, pela bolsa RHAE, com a qual pude retornar ao Japão e terminar a parte experimental do trabalho e rever os tão queridos amigos do NFRI;

À Agência Internacional de Energia Atômica (**AIEA**), pelo Contrato de Pesquisa (Research Contract num. 6936/RB) da FAO/IAEA no "Uso da Irradiação como um Tratamento Quarentenário de Ácaros, Nematoides e Insetos, Exceto as Moscas-das-frutas", com o qual realizei as primeiras avaliações de radio-tolerância das flores cortadas.

Aos **colegas** do IPEN, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho que têm me acompanhado nesta caminhada diária;

Às **chefias** do Departamento de Aplicações na Engenharia e Indústria do IPEN e às **direções** da CNEN e do IPEN, pela autorização de afastamento do país para aperfeiçoar a pesquisa que desenvolvemos com tanto carinho no Brasil.

**AÇÃO DA SACAROSE NA MANUTENÇÃO DE INFLORESCÊNCIAS
CORTADAS DE CRISÂNTEMO, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura,
APÓS EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO-GAMA**

OLIVIA KIMIKO KIKUCHI

RESUMO

A floricultura brasileira tem se destacado nos últimos anos, vindo a ocupar um papel importante na economia nacional. O potencial para a expansão do cultivo e comércio de flores e plantas ornamentais é muito grande, pois o território brasileiro possui várias regiões com climas favoráveis ao desenvolvimento de culturas de interesse comercial. A exportação ainda não se destaca no mercado internacional, mas, o país pode vir a ser um grande exportador, inclusive de plantas exóticas tropicais. Entretanto, a inspeção fitossanitária dos países desenvolvidos, como EUA e Japão, é bastante rigorosa com relação à introdução de novas pragas e doenças através de produtos frescos, principalmente as provenientes de países tropicais.

A radiação ionizante é considerada um método seguro para o controle de inúmeras pragas e doenças de frutas e flores. Este trabalho teve como objetivo verificar a tolerância de algumas flores ornamentais da família Compositae à radiação ionizante, considerando a irradiação como um método de desinfestação de produtos frescos. A ação da sacarose na proteção das flores após a irradiação foi considerada o objetivo mais importante, uma vez que os crisântemos foram sensíveis à radiação gama; entretanto, a manutenção das inflorescências cortadas, após a irradiação, em solução preservativa contendo 2% de sacarose foi altamente eficiente na proteção das flores contra os danos causados pela radiação. A dose de 750Gy, suficiente para ser utilizada com propósito de desinfestação, não chegou a alterar os níveis de proteínas e lipídeos nem as atividades das ATPases das membranas plasmáticas, do tonoplasto, da mitocôndria ou da citocromo-*c* oxidase da mitocôndria. A taxa de produção de etileno e gás carbônico aumentou consideravelmente logo após a irradiação, mas, diminuiu após um dia. A diminuição da fluidez das membranas microsomais e o aumento da impedância dos capítulos foram os parâmetros mais sensíveis para se medirem as alterações iniciais causadas pelo tratamento por irradiação. O suprimento de sacarose manteve o nível de fluidez das membranas das flores irradiadas próximo ao do controle não irradiado. As espécies *Rhodante manglesii* Lindl e *Helichrysum bracteatum* Andr. foram tolerantes até 1kGy, sendo, portanto, adequadas para desinfestação por radiação gama.

**SUCROSE ACTION ON CHRYSANTHEMUM CUT INFLORESCENCES,
Dendranthema grandiflorum Kitamura,
AFTER EXPOSITION TO GAMMA-RADIATION**

OLIVIA KIMIKO KIKUCHI

ABSTRACT

During the last years the Brazilian floriculture expanded quickly and it is expected to achieve a prominent role in a near future. The national territory has many favorable regions, with adequate climate for the development of commercially important cultures. Flower exportation is not expressive yet, but the country has conditions to become a great exotic tropical plants exporter. On the other hand, developed countries, as USA and Japan, have a rigorous phytosanitary inspection to prevent the introduction of new plagues and diseases through fresh products.

Ionizing radiation is considered a reliable disinfestation method to control numerous fruit and flower plagues. The aim of this work was to verify the tolerance of some Compositae family flowers to ionizing radiation and the effects of sucrose action in protecting the flowers against the gamma-radiation induced damages. This was done by measuring biochemical and physiological parameters as a function of time after irradiation. The chrysanthemum flowers were sensitive to gamma radiation, but, when the inflorescences were supplied after irradiation with preservative solution containing 2% sucrose, protection against the damaging effects of radiation was achieved. The dose of 750Gy, considered appropriate for disinfestation purpose, did not modify the protein and lipid levels, nor plasma, tonoplast and mitochondria membrane ATPase or mitochondria cytochrome-*c* oxidase activities. The ethylene and carbonic gas rate production increased soon after the irradiation, but decreased one day later. The decrease of the microsomal membrane fluidity and the increase of the chrysanthemum head impedance were the most sensitive parameters to measure the irradiation treatment changes. The sucrose supply was able to maintain the irradiated flowers membrane fluidity level close to the unirradiated control. *Rhodante manglesii* Lindl and *Helichrysum bracteatum* Andr. were tolerant up to 1kGy, thus being adequate to be disinfested by gamma radiation.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	
1.1 A floricultura e seus problemas.....	1
1.2 Objetivos.....	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 A floricultura no Brasil.....	6
2.2 Descrição das flores utilizadas.....	8
2.3 O processo de florescimento.....	13
2.4 Diferenças entre senescência e envelhecimento nas plantas....	14
2.5 Senescência de flores.....	15
2.6 Senescência de folhas.....	17
2.7 Estresse por radiação ionizante.....	19
2.8 Radicais livres e senescência.....	20
2.9 Membranas biológicas.....	23
2.10 Efeitos das radiações ionizantes nas membranas lipídicas.....	27
2.11 Outros métodos para medidas de senescência vegetal.....	29
2.12 Prolongamento da vida útil de flores cortadas.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Primeira etapa.....	33
3.1.1 Flores utilizadas.....	33
3.1.2 Soluções de manutenção utilizadas.....	34
3.2 Segunda etapa.....	35
3.2.1 Flor utilizada e tratamento.....	35
3.2.2 Irradiação e amostragem.....	36
3.2.3 Medidas de produção de etileno e gás carbônico das flores de crisântemo.....	36

3.2.4	Medidas de impedância dos capítulos de crisântemos..	37
3.2.5	Medidas de condutividade dos capítulos e folhas de crisântemos.....	37
3.2.6	Processamento das flores de crisântemo para obtenção das frações microsomal e mitocondrial.....	37
3.2.6.1	Homogeneização das flores.....	37
3.2.6.2	Obtenção das membranas microsomais e mitocondriais.....	39
3.2.6.3	Medidas de microviscosidade das membranas microsomais.....	40
3.2.7	Determinação da concentração de proteínas.....	41
3.2.7.1	Soluções.....	42
3.2.7.2	Procedimento para o ensaio.....	42
3.2.8	Determinação da atividade específica de ATPase.....	43
3.2.8.1	ATPase sensível ao vanadato.....	43
3.2.8.2	ATPase sensível ao nitrato.....	44
3.2.8.3	ATPase sensível a azida.....	44
3.2.9	Determinação da atividade específica da citocromo- <i>c</i> oxidase.....	45
3.2.10	Extração lipídica das membranas microsomais.....	46
3.2.11	Determinação de fosfolipídeos.....	47
3.2.12	Determinação de esteróis.....	48
3.2.13	Análise estatística.....	49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1	Tolerância das flores à radiação gama.....	50
4.2	Produção de etileno e gás carbônico das inflorescências de crisântemo.....	52
4.3	Impedância dos capítulos de crisântemo.....	54

4.4	Condutividade dos capítulos e das folhas de crisântemo.....	55
4.5	Fluidez das membranas microsossomais das flores de crisântemo.....	56
4.6	Taxa de esterol fosfolipideo das membranas microsossomais das flores de crisântemo.....	59
4.7	Peso fresco e concentração de proteínas microsossomais e mitocondriais das flores de crisântemo.....	61
4.8	Atividades das enzimas microsossomais e mitocondriais das flores de crisântemo.....	63
4.9	Resumo dos resultados.....	66
5	CONCLUSÕES	67
	Apêndice 1 - Reagentes utilizados.....	68
	Apêndice 2 - Produção de gás carbônico.....	69
	Apêndice 3 - Produção de etileno.....	70
	Apêndice 4 - Impedância.....	71
	Apêndice 5 - Condutividade dos capítulos.....	72
	Apêndice 6 - Condutividade das folhas.....	73
	Apêndice 7 - Fluidez.....	74
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	75

7 LISTA DE TABELAS

2.2 Tabela 1. Espécies da família Compositae cultivadas no Brasil.....	9
4.1 Tabela 2. Tolerância à radiação gama de algumas flores da família Compositae.....	51
4.5 Tabela 3. Tempo de vida útil em vaso das inflorescências de crisântemos, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/hora).....	59
4.6 Tabela 4. Taxa de esterol/fosfolípideo das membranas microssomais (mol/mol).....	60
4.6 Tabela 5. Conteúdo de esterol das membranas microssomais ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína).....	61
4.6 Tabela 6. Conteúdo de fosfolípideo das membranas microssomais ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína).....	61
4.7 Tabela 7. Peso fresco (g) de flores de crisântemo por inflorescência.....	62
4.7 Tabela 8. Conteúdo de proteína da membrana microssomal por peso fresco das flores (mg/g).....	62
4.7 Tabela 9. Conteúdo de proteína da membrana mitocondrial por peso fresco das flores (mg/g).....	63
4.8 Tabela 10. Atividade específica da ATPase sensível ao vanadato ($\mu\text{mole/min./mg}$ de proteína) - membrana plasmática.....	63
4.8 Tabela 11. Atividade específica da ATPase sensível ao nitrato ($\mu\text{mole/min./mg}$ de proteína) – tonoplasto.....	64
4.8 Tabela 12. Atividade específica da ATPase sensível a azida ($\mu\text{mole/min./mg}$ de proteína) - membrana da mitocôndria.....	64
4.8 Tabela 13. Atividade específica da citocromo- <i>c</i> oxidase ($\mu\text{mole/min./mg}$ de proteína) – mitocôndria.....	64

8 LISTA DE FIGURAS

2.2 Figura 1. Esquema de uma inflorescência da família Compositae.....	8
2.9 Figura 2. Esquema descritivo para a deterioração das membranas em plantas, em decorrência da senescência ou estresse pós-colheita	25
4.2 Figura 3. Produção de gás carbônico de inflorescências de crisântemo, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h).....	52
4.2 Figura 4. Produção de etileno de inflorescências de crisântemo, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h).....	53
4.3 Figura 5. Impedância dos capítulos de crisântemo, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h).....	54
4.4 Figura 6. Condutividade de capítulos de crisântemo, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h).....	55
4.4 Figura 7. Condutividade de folhas de crisântemo, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h).....	56
4.5 Figura 8. Fluidez das membranas microssomais de flores de crisântemo, <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h).....	57
4.5 Figura 9. Inflorescências de <i>Dendranthema grandiflorum</i> Kitamura, 15 dias após a irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h)...	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 A floricultura e seus problemas

O comércio intercontinental de flores e plantas ornamentais tem crescido significativamente nas últimas décadas, tendo como maiores consumidores mundiais os EUA, o Japão e os países desenvolvidos da Europa. Coincidentemente, a maioria destes países se encontra em regiões de clima temperado ou no Mediterrâneo. A expansão da floricultura se deve, em grande parte, à diminuição das barreiras tecnológicas e políticas, ao melhoramento da infra-estrutura e ao reconhecimento, por parte de muitos países em desenvolvimento, do valor comercial das flores e plantas ornamentais. Por sua vez, esses países em desenvolvimento, em maioria, estão localizados em regiões de clima tropical, onde muitas plantas exóticas se desenvolvem, as quais exercem grande atração e interesse sobre os consumidores exigentes e de alto poder aquisitivo dos países ricos. Na América do Sul a Colômbia é o país que mais exporta flores tropicais, principalmente para os EUA, com crescimento paulatino em direção ao Japão, cujo maior fornecedor de plantas tropicais, atualmente, é a Tailândia. A Europa, por sua vez tem como maiores fornecedores de flores e plantas ornamentais tropicais a Colômbia, a Costa Rica, o Quênia, as Ilhas Canárias e a Tailândia (Gorsel, 1994).

A fiscalização fitossanitária para controlar a introdução de pragas e doenças é uma prática adotada no mundo inteiro, principalmente pelos países desenvolvidos que importam produtos frescos em geral, como frutas e flores. A Europa, os EUA e o Japão possuem critérios bastante rigorosos com relação aos procedimentos quarentenários para a entrada desses produtos frescos em seus territórios.

Os países em desenvolvimento, como o Brasil, em sua maioria situados em regiões de clima tropical, são favorecidos por uma imensa diversidade de espécies biológicas. A comercialização de muitas frutas, cereais, verduras, ervas, flores e folhagens ornamentais de origem tropical está se intensificando cada vez mais no mundo todo. No entanto, juntamente com esses produtos novos, muitas pragas e doenças acabam sendo introduzidas, ocorrendo a possibilidade delas se adaptarem ao novo ambiente e até causarem desequilíbrios ecológicos. Infelizmente, o inverso também tem ocorrido, pois algumas pragas já se estabeleceram em nosso território, trazidas de outros países.

As perdas causadas por insetos na floricultura são consideravelmente altas, não somente devido à alta ocorrência de inúmeras pragas em nosso território, mas, também, por

causa da inspeção quarentenária rigorosa dos países importadores, que, em presença de alguma praga desconhecida, tomam como medida a destruição de toda a carga. Os exportadores brasileiros do setor enfrentam também outros problemas como a inadequação da infra-estrutura dos aeroportos, dos quais apenas o de Cumbica, em São Paulo, possui câmara fria para a armazenagem de flores de corte. Além disso, os trâmites burocráticos no Brasil continuam morosos (Gatti, 1992).

O Brasil é um país altamente favorável, sob diversos aspectos, à expansão da floricultura, pois temos uma amplitude de climas e solos que permitem a implantação de diversas culturas, o que não acontece, por exemplo, em países da Europa, onde o inverno é rigoroso, o que exige a utilização de estufas climatizadas que encarecem o produto final. As espécies de flores exóticas tipicamente tropicais são cobiçadas pelo mercado externo e aqui podem ser cultivadas com maior facilidade e menor custo. Sendo um país em desenvolvimento, ainda contamos com uma grande disponibilidade de mão-de-obra que emprega inclusive mulheres e adolescentes, o que contribui para a fixação do homem no meio rural (Castro, 1992). Entretanto, essa amplitude de climas favoráveis, que permite o cultivo diversificado de plantas ornamentais, propicia também a disseminação de pragas, cuja introdução nos países importadores, principalmente do hemisfério norte, é impedida mediante uma rígida fiscalização fitossanitária, como foi mencionado anteriormente. A utilização de métodos químicos para o controle de pragas ocorre normalmente durante o cultivo das plantas, mas, as flores de corte destinadas à exportação necessitam, em alguns casos, de um tratamento adicional pós-colheita para garantir a fitossanidade do produto. No entanto, os inseticidas, acaricidas, moluquicidas, fungicidas e bactericidas são produtos altamente tóxicos ao homem e a outros animais não nocivos às culturas. Alguns desses animais podem até ser úteis ao equilíbrio do ecossistema. Além disso, o uso contínuo dos mesmos produtos químicos confere maior resistência às pragas, sendo necessária a modificação periódica dos seus princípios ativos.

Como na fruticultura, a floricultura tem como desafios para entrar no mercado mundial competitivo o emprego de tecnologias avançadas, conhecimentos e capacitação específica e profissionalismo gerencial e comercial (FRUPEX, 1994). A utilização da radiação ionizante para a desinfestação de grãos armazenados, frutas e legumes, já é conhecida de longa data, contando com um grande apoio e incentivo da Agência Internacional de Energia Atômica. A irradiação de flores e de plantas ornamentais com a

finalidade de eliminar pragas começou a receber maior atenção a partir da década de 1980, com pesquisas realizadas na Holanda (Wit e van de Vrie, 1985), Tailândia (Piriyathamrong e col., 1985), China (Chiu, 1986), Equador (Munoz, 1990), Japão (Tanabe e Dohino, 1993), Bangladesh (FAO/IAEA, 1994), Filipinas (FAO/IAEA, 1994), Cuba (comunicação pessoal, 1994), Argentina (comunicação pessoal) e Brasil (Kikuchi e col., 1993).

A eliminação e/ou esterilização de insetos adultos, larvas e ovos pode ser feita pela radiação ionizante, dependendo da dose administrada. A radiosensibilidade dos insetos varia conforme a espécie, o sexo e o seu estado de desenvolvimento. Por outro lado, as plantas também são sensíveis às radiações ionizantes, dependendo da espécie/variedade e da sua fase de desenvolvimento, como nos insetos.

O estudo da desinfestação de flores de corte e de plantas ornamentais pela radiação ionizante envolve três aspectos importantes a serem considerados: a) os procedimentos que devem ser tomados para a aplicação da técnica de irradiação do material; b) os efeitos biológicos das radiações sobre os insetos/pragas que devem ser eliminados e; c) a tolerância das plantas ao tratamento com radiação.

As flores cortadas, assim como as folhagens, mudas e bulbos de plantas ornamentais são produtos frescos que requerem tratamento quarentenário para a eliminação de pestes. Muitos insetos e ácaros que infestam os produtos agrícolas destinados à alimentação também atacam as plantas ornamentais e vice-versa, sendo que os procedimentos utilizados para a desinfestação são basicamente os mesmos.

A fumigação de frutas e vegetais frescos com brometo de metila é uma prática quarentenária bastante difundida no mundo como sendo altamente efetiva e rápida para eliminar pragas após a colheita. Entretanto, o brometo de metila é um agente químico destruidor da camada de ozônio da estratosfera e tem sido recomendado que se encontrem outras alternativas menos danosas ao meio ambiente. O brometo de metila foi incluído em 1992 na lista de substâncias destruidoras da camada de ozônio, pelo Protocolo de Montreal, que consiste em um tratado internacional para o regulamento dessas substâncias (ICGFI, 1994).

A irradiação de alimentos como método de desinfestação é uma prática adotada em alguns países, sendo que entre os produtos frescos as frutas e verduras têm recebido, até o momento, maior enfoque do que as flores e ervas. Organizações como a FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), IAEA (International Atomic Energy

Agency) e WHO (World Health Organization) estão empenhadas na pesquisa e divulgação da utilização das radiações para o tratamento de produtos agrícolas. Com o aumento da exportação de flores e plantas ornamentais, essas organizações também começaram a se interessar por averiguar a factibilidade de se irradiarem flores, plantas ornamentais e ervas destinadas à exportação.

A radiação, como outros métodos físicos e químicos, pode afetar tanto o organismo infestante como a planta infestada, dependendo da dose; portanto, é preciso encontrar as doses necessárias para, pelo menos, esterilizar os insetos, mas, sem inviabilizar o produto a ser comercializado. No caso das flores cortadas o requisito é que elas, pelo menos, permaneçam viáveis externamente e não tenham o seu tempo de vida útil em vaso diminuído pelo tratamento.

Para propósitos quarentenários a dose de 150Gy tem sido recomendada para moscas-das-frutas e 300Gy tem sido considerada como suficiente para outros insetos e ácaros. Na prática, entretanto, o produto fresco deve tolerar doses duas a três vezes mais elevadas do que a dose mínima requerida para esterilizar os insetos (ICGFI, 1994), por causa dos sistemas de embalagem dos produtos e do alcance das radiações.

A tolerância das flores cortadas às radiações varia dependendo da espécie/variedade, da forma de cultivo, do estado de desenvolvimento e da manutenção pós-colheita da planta. O estresse provocado pela radiação ionizante pode ser amenizado mediante suprimento exógeno de açúcar no caso de algumas flores de corte radiosensíveis, como o crisântemo (Hayashi e Todoriki, 1996; Nakahara e col., 1998; Kikuchi e col., 1998).

A importância de se estudarem e pesquisarem os mecanismos envolvidos na senescência vegetal se deve ao fato de que produtos agrícolas de valor econômico como flores, frutas e outros vegetais sofrem degeneração pós-colheita, principalmente quando em estado fresco, acarretando perdas que, às vezes, poderiam ser evitadas. O controle e a manutenção da qualidade desses produtos perecíveis constituem medidas econômicas para diminuir o desperdício, no caso dos alimentos.

1.2 Objetivos

Diante da grande variedade de flores destinadas ao corte que são comercializadas, foi preciso realizar uma triagem inicial para a seleção das flores mais indicadas para o trabalho a ser desenvolvido. O material deveria ser de fácil obtenção e, de preferência, que já fosse bem conhecido e amplamente comercializado, além de possuir um certo destaque na

floricultura mundial. A família Compositae foi, então, escolhida por ter ampla distribuição no mercado; no caso dos crisântemos, por não dependerem de época de floração, uma vez que podem ser obtidos durante o ano todo por controle de luminosidade artificial, em estufas apropriadas.

Neste trabalho foram realizados, previamente, testes de tolerância a radiação gama de diversas flores cortadas da família Compositae ou Asteraceae, comercializadas no Brasil. As flores responderam de maneiras diversas à radiação gama. Os crisântemos foram os que apresentaram radiosensibilidade nítida, com inibição do desenvolvimento das inflorescências e aceleração do amarelecimento e definhamento das folhas.

A efetividade das soluções preservativas foi também investigada nessa primeira etapa. Os melhores resultados quanto à extensão do tempo de vida útil, em vaso, das flores cortadas e manutenção da viabilidade foram obtidos com a solução contendo sulfato de 8-hidroxiquinolina, outros germicidas e 2% de sacarose.

O crisântemo, apesar de ser bastante radiosensível, foi altamente beneficiado pela sacarose administrada exogenamente, sendo, então, escolhido para se investigar em que nível a sacarose agiria efetivamente para proteger e manter a viabilidade das flores irradiadas. Como trabalhos publicados recentemente indicaram que as atividades das enzimas ATPase das membranas celulares das plantas superiores foram moduladas pelos lipídeos e esteróis circundantes (Kasamo e Sakakibara, 1995; Grandmougin-Ferjani e col., 1997), foi de interesse verificar se o mesmo ocorreria com as membranas das flores de crisântemo após a irradiação. Os parâmetros para as medidas dos efeitos da radiação foram aqueles normalmente utilizados para estudos de senescência vegetal. Mas, em crisântemos, algumas das medidas do próprio controle já representariam resultados inéditos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A floricultura no Brasil

O cultivo de flores e plantas ornamentais em escala comercial no Brasil foi iniciado pela colônia portuguesa, mas manteve-se inexpressivo até meados de 1950. A atividade começou a se destacar com os fluxos migratórios, cabendo aos japoneses, holandeses, alemães e italianos a tarefa de dar um novo impulso ao setor. A fundação da Cooperativa Agropecuária Holambra, por imigrantes holandeses, foi decisiva para o desenvolvimento organizado da floricultura no Brasil. Em 1969 foi inaugurado o Mercado de Flores na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), na cidade de São Paulo, que continua sendo o maior terminal de distribuição de flores, plantas ornamentais, mudas e acessórios de floricultura do país, funcionando todas as terças e sextas-feiras. Em 1991 foi aberto o Veiling, na Cooperativa Agropecuária Holambra, que consiste em um sistema de comercialização moderno e transparente que veio a contribuir para o desenvolvimento atual da floricultura brasileira. Em 1995 foi inaugurado o Mercado Permanente de Flores no Ceasa de Campinas, funcionando de segunda a sexta-feira. Nesse mesmo ano começou também a funcionar o Mercado Livre do Produtor de Flores, no Ceasa de Belo Horizonte, atendendo à região Centro-Oeste, que, até então, tinha que abastecer-se em São Paulo.

Os estados produtores de plantas ornamentais, em ordem decrescente, compreendem: São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Pernambuco, Paraná e Goiás. Em São Paulo, a maioria dos produtores se concentra em regiões próximas a capital, mas, aos poucos, agricultores de cidades distantes também têm-se dedicado ao ramo.

As espécies de flores e plantas ornamentais cultivadas no Brasil são bastante diversificadas, compreendendo principalmente crisântemos, rosas, gipsofilas, gladiolos, lírios, estrelicias, boca-de-leão e outras. Apesar da introdução de novas espécies, principalmente européias e japonesas (em decorrência da origem dos produtores que são, na maioria, descendentes de holandeses e japoneses), as flores tropicais brasileiras estão recebendo atenção cada vez maior, pois representam um produto exótico, de interesse para os países da Europa, América do Norte e Japão.

As pesquisas na área da floricultura estão sendo realizadas, em grande parte, no estado de São Paulo, em alguns institutos de pesquisa e em universidades. Nos outros

estados as pesquisas se restringem quase que totalmente às universidades. Dentro da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo destacam-se o Instituto Agrônomo de Campinas e o Instituto Biológico, onde são desenvolvidas pesquisas nas áreas de introdução, seleção e melhoramento vegetal, técnica culturais, fisiologia vegetal, tecnologia pós-colheita, utilização de plantas ornamentais em paisagismo e fitossanidade. O instituto de Botânica se dedica ao estudo de espécies nativas com potencial ornamental, com destaque para as orquídeas, além de espécies das famílias das Gesneriáceas, Cactáceas, Palmáceas, Bromeliáceas, Aráceas, Amarilidáceas e outras.

A disciplina Floricultura foi incluída no currículo mínimo das Faculdades de Agronomia do país, desde 1986, por meio de Portaria do Ministério da Educação. As seguintes universidades oferecem disciplinas e cursos de pós-graduação: USP - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; UNESP - Campus de Jaboticabal; UNESP - Campus de Botucatu; UNESP - Campus de Ilha Solteira, UNICAMP e Universidade Federal de Viçosa.

Em 1992 foi criada a Câmara Setorial de Flores e Plantas Ornamentais pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento de São Paulo, reunindo a iniciativa privada, representantes das instituições oficiais de ensino e pesquisa e representantes de agências financeiras. A Câmara Setorial tem como função viabilizar o desenvolvimento da floricultura no estado por meio da produção, comercialização interna, exportação, pesquisa, assistência técnica, serviços e insumos. A criação de Câmaras Setoriais em outros estados está ocorrendo aos poucos, o que possibilitará trabalhar-se de forma harmoniosa para atender-se aos interesses coletivos do Setor da Floricultura. A floricultura também foi incorporada ao FRUPEX, que passou a se denominar Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais, ligado ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. O FRUPEX está apoiando o sub-programa Fitossanidade, que tem, como objetivos, o controle de pragas e doenças de flores, frutas e hortaliças, o monitoramento, o treinamento de pessoal, a sistematização de informações e a formação de redes de laboratório para diagnóstico e edições de manuais fitossanitários. O sub-programa inclui, ainda, a formação de um Grupo de Trabalho em Manejo Integrado e a revisão da Legislação Fitossanitária.

A floricultura no Brasil tem um grande potencial para participar de forma mais intensa do mercado externo. Existem atualmente, em nosso país, mais de 5.000 produtores,

principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Goiás, que respondem anualmente por cerca de US\$150 milhões (FRUPEX, 1994). Em 1992, a exportação chegou a US\$16 milhões (FRUPEX, 1994), ocupando o 20º lugar no mercado mundial de exportação de flores e plantas ornamentais. O crescimento anual na última década foi de 12% (Gatti, 1992). Entre 1988-90, contribuíram para a exportação brasileira as seguintes flores e plantas ornamentais: rosas cortadas (19,1%), flores secas (19,1%), folhagens (10,2%), bulbos (8,9%), outras flores (3,0%), mudas de orquídeas (2,9%), gladiolos (2,0%), mudas de dracenas (1,0%) e outras mudas (33,8%) (Gatti, 1992).

2.2 Descrição das flores utilizadas

A família Compositae ou Asteraceae é a mais abundante dentro da divisão Angiospermae, existindo mais de 20.000 espécies em 1.100 gêneros espalhadas pelo mundo todo (Harris, 1995). A maioria dos gêneros, 98%, é constituída por plantas de pequeno porte e a característica marcante da família Compositae é que as flores são sempre reunidas em inflorescências típicas denominadas capítulos (Joly, 1976). Frequentemente possuem mais de um tipo de flor na inflorescência e anteras unidas em forma de tubo. Todas as flores são epíginas e a dispersão das sementes se dá por meio de uma estrutura conhecida como pappus (Harris, 1995).

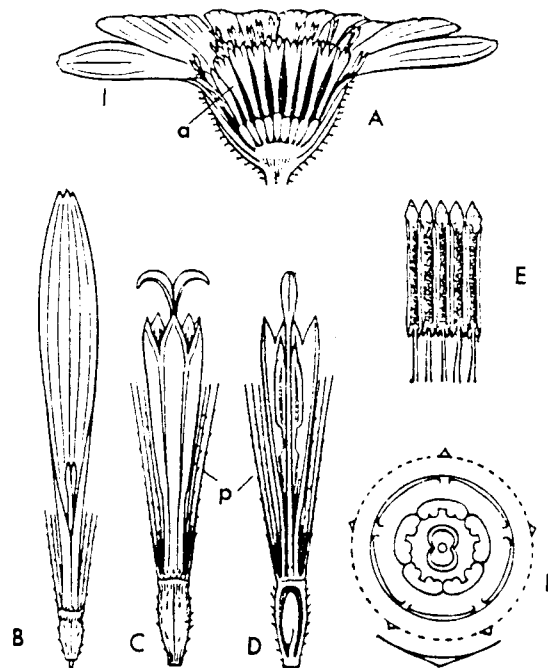


Figura 1. Esquema de uma inflorescência da família Compositae. A, capítulo; B, flor ligulada; C e D, flor actinomorfa, inteira e cortada (D, estigmas ainda fechados e C, já abertos); E, tubo formada pelas anteras, aberto, mostrando a deiscência para o interior; F, diagrama: a, flor actinomorfa; l, flor ligulada; p, "pappus" (Rawitscher, 1972).

As ornamentais da família Compositae cultivadas no Brasil compreendem as espécies da Tabela 1, segundo Lorenzi e Souza (1995).

Tabela 1. Espécies da família Compositae cultivadas no Brasil~

<i>Nome científico</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Origem</i>
<i>Ageratum houstonianum</i> Mill.	celestina, agerato	México
<i>Aster amellus</i> L.	áster-italiana	Europa e Ásia
<i>Aster tradescantii</i> L.	áster-arbustiva, monte-cassino	América do Norte
<i>Bellis perenis</i> L.	margarida-inglesa, bonina, margaridinha, bela-margarida	Europa e Ásia Menor
<i>Bidens bipinnata</i> Bail.	beijo-de-moça, cósmea, cosmos-de-jardim	México
<i>Bidens sulphurea</i> Sch.Bip.	cosmos-amarelo, picão grande, áster-do-méxico	México
<i>Bidens tinctoria</i> Baill.	margaridinha-escura	Estados Unidos
<i>Calendula officinalis</i> L.	calêndula, mal-me-quer, maravilha-do-jardim	Ilhas Canárias e Mediterrâneo
<i>Callistephus chinensis</i> Nees*	rainha-margarida, áster-da-china	China e Japão
<i>Centaurea gymnocarpa</i> Mor. & DeNot	centáurea-veludo	Ilha de Capri
<i>Chrysanthemum anethifolium</i> Brouss.	céu-estrelado, margarida-glauc, paquerete	Ilhas Canárias
<i>Chrysanthemum frutescens</i> L.	margarida-de-paris, margarida, margarida-dos-floristas	Ilhas Canárias
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i> L.	margarida, margarida-olga	Europa e Cáucaso
<i>Chrysanthemum segetum</i> L.	margaridinha-folha-de-ervilha	Ásia

<i>Nome científico</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Origem</i>
<i>Coreopsis lanceolata</i> L.	coreópsis, margaridinha-amarela	Estados Unidos
<i>Dahlia</i> x <i>pinnata</i> Cav.	dália, dália-de-jardim	México
<i>Dendranthema grandiflora</i> (Ram.) Tzv.*	crisântemo-da-china, crisântemo-do-japão, monsenhor	China e Japão
<i>Gaillardia</i> x <i>grandiflora</i> Hort.	gailárdia, laço-espanhol	América do Norte
<i>Gazania rigens</i> Moench.	Gazânia	África do Sul
<i>Gerbera jamensonii</i> Bolus*	gébera, gebra, margarida-da-áfrica, margarida-do-transvaal	África
<i>Helianthus laetiflorus</i> Pers.	girassol-de-jardim, girassol-vistoso	Estados Unidos
<i>Helychrysum bracteatum</i> Andr.*	sempre-viva, flor-de-palha	Austrália
<i>Helychrysum petiolatum</i> D. Don.	gnafálio	África do Sul
<i>Montanoa bipinnatifida</i> Koch	margarida-de-maio, flor-de-maio	México
<i>Rhodanthe manglesii</i> Lindl.*	rodante, flor-seca	Austrália
<i>Rudbeckia hirta</i> L.	margarida-amarela	Estados Unidos
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	santolina, lavanda-algodão	Mediterrâneo
<i>Sanvitalia procubens</i> Lam.	sanvítalia, margaridinha	México
<i>Senecio confusus</i> Britten	jalisco, flama-do-méxico, senécio-confuso	México
<i>Senecio</i> x <i>cruentus</i> DC.	cinerária-dos-floristas, cinerária	Ilhas Canárias
<i>Senecio douglasii</i> DC.	cinerária	Estados Unidos

<i>Nome científico</i>	<i>Nome popular</i>	<i>Origem</i>
<i>Senecio macroglossus</i> DC.	hera-do-cabo	África do Sul
<i>Senecio mikanooides</i> Otto ex Walp.	trepadeira-senécio, hera-alemã	África do Sul
<i>Solidago canadensis</i> L.	vara-dourada, tango	América do Norte
<i>Spilanthes repens</i> Michx.	margaridinha-rasteira	Brasil
<i>Tagetes erecta</i> L.	tagetes, cravo-de-defunto, cravo-amarelo, cravo-africano	México
<i>Tagetes patula</i> L.	tagetes-anão, cravo-francês, flor-de-estudante	México
<i>Tithonia diversifolia</i> A. Gray	girassol-mexicano	México
<i>Tithonia speciosa</i> Hook ex Gris	margarida-mexicana	México
<i>Unxia kubitzkii</i> H. Robinson	botão-de-ouro	Brasil
<i>Wedelia paludosa</i> DC.	mal-me-quer, vedélia, picão-da-praia	Brasil
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	capitão, moça-e-velha, canela-de-velho, zínia	México

*Espécies utilizadas no trabalho.

Nos crisântemos, as flores marginais ou radiais do capítulo são femininas, liguladas e zigomorfas, enquanto que as flores centrais ou do disco são hermafroditas, tubulares e actinomorfas (Kinet e col., 1985). Os crisântemos de importância na floricultura dividem-se em três tipos: inflorescência grande numa haste, inflorescência média numa haste e “sprayü (várias inflorescências na mesma haste). As variedades são classificadas quanto ao tipo da inflorescência em: a) simples - margarida; b) anêmona - girassol; c) decorativo; d) tubular - spider; e) pompom; f) comum - bola; g) repicado, e; h) fuji (Okuyama e Saito, 1992).

Essas flores têm sido cultivadas há mais de 1.400 anos (Harris, 1995) e são muito apreciadas na China, Japão e Coréia. O crisântemo é a flor símbolo do Japão, sendo usado no emblema imperial desde o século XII. Nos meses de outubro e novembro são realizadas

exposições exclusivas de crisântemos em diversas províncias japonesas, onde é possível apreciar novas variedades cada vez mais exuberantes e com tonalidades diversas.

Os crisântemos podem ser cultivados durante o ano todo, pois podem ter a sua floração controlada pelo fotoperíodo mediante utilização de luz artificial (lâmpadas de 75 a 100W a cada 10m² - mínimo de 100 lux). Durante o verão, de outubro a março, deve ser utilizada uma cobertura para se terem, no mínimo, 12 horas de escuridão, até que os botões florais apresentem coloração. Depois disso, a planta não deve ficar no escuro por mais de 8 horas, para se evitar o desenvolvimento de flores defeituosas. Após 21 ou 28 dias sob luz artificial, quando a planta atingir aproximadamente 25cm de altura, a iluminação artificial pode ser suspensa.

Os crisântemos são resistentes durante o transporte e têm excelente durabilidade em vasos. As variedades cultivadas no Brasil são provenientes do Japão, EUA e Europa.

As pragas comumente encontradas em crisântemos são: mosca-minadora (Ordem Díptera), pulgão (Ordem Hemíptera-Homóptera), vaquinha (Ordem Coleóptera), lagartas (Ordem Lepdóptera) e ácaros (Ordem Acari) (Okuyama e Saito, 1992). Além dessas pragas, a planta pode contrair doenças provocadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus (McCain, 1997). O *Dendrathera grandiflorum* Tevelev. pode ser alvo das seguintes bactérias: *Erwinia chrysanthemi* Burkholder et al., *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn, *Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow e *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. As doenças por fungos podem ocorrer por: *Alternaria* sp., *Bipolaris setaria* (Sawada) Shoemaker, *Cercospora chrysanthemi*, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanichi, *Cylindrosporium chrysanthemi* Ellis &77 Spot Dearn., *Fusarium oxysporum* Schlechtend., *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, *Itersonilia perpexans* Derx, *Erysiphe cichoracearum* DC., *Pythium* spp., *P. ultimum* Trow, *Didymella ligulicola* (K. Baker et al.) Arx in E. Müller & Arx, *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamamoto, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phoma chrysanthemicola* Hollos, *Puccinia tanacetii* DC., *P. horiana* Henn., *Septoria chrysanthemi* Halst. in Seym & Earle, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthier e *V. dhaliae* Kleb.. Os nematóides que podem parasitar o *D. grandiflorum* são: *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz & Buhner), *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev e *Meloidogyne* spp. Os vírus que podem causar doenças no *D. grandiflorum* são: vírus do tomate ("tomato aspermy

virus” e “tomato spotted wilt virus”), organismos semelhantes a micoplasma (MLO), vírus causador da mancha clorótica, vírus do mosaico e vírus da atrofia (McCain, 1997).

2.3 O processo de florescimento

O processo de florescimento nas Angiospermae compreende várias etapas sucessivas e pode ser considerado como um padrão (Kinet, 1985). A primeira etapa reprodutiva do ápice do broto da planta ocorre pela indução floral, que compreende várias sequências múltiplas e paralelas de eventos. No início, as sequências são independentes, mas, no decorrer do processo, elas vão interagindo. Essa interação parece ser importante para se atingir um ponto em que não pode mais haver um retorno, pois o meristema inicia obrigatoriamente o desenvolvimento de estruturas reprodutivas.

A indução floral é seguida pela determinação, em que a potencialidade de desenvolvimento de um grupo de células se restringe a uma direção particular (Kinet, 1985). A partir das etapas de indução/determinação ocorre uma grande diversidade de etapas em número e natureza, que constituem o processo de florescimento, dependendo do tipo de estrutura reprodutiva que deve ser formada. Assim, existem as fases de indução de sépalas, de pétalas-estames e de carpelos, em que cada fase é constituída por proteínas específicas. Entretanto, a via de desenvolvimento que resulta na formação desses órgãos não é rigidamente fixa e o destino final pode ser alterado por fatores ambientais, químicos ou mecânicos. No caso de uma inflorescência, as etapas ocorrem em cada flor, mas, constituem um processo mais complexo, pois podem ocorrer de forma sucessiva e/ou simultânea em diferentes partes da inflorescência. Além disso, cada etapa do florescimento parece estar controlada por promotores e inibidores.

O desenvolvimento das flores na família Compositae ocorre da margem para o centro do capítulo. Em geral, os apêndices florais se originam na seguinte sequência: sépalas → pétalas → estames → carpelos. A diferenciação na flor primitiva começa com a formação de uma coroa anelar resultante do alargamento e divisões periclinais das células subepidérmicas laterais (Kinet, 1985). A coroa se desenvolve para dar origem à corola tubular. Logo em seguida, os estames (órgãos masculinos) se originam próximo ao centro do meristema, enquanto que os pappus primitivos se formam por divisão mitótica periclinal na subepiderme. O carpelo primitivo (órgão feminino) surge, então, na base da corola tubular, mais próximo ainda ao centro do meristema do que os estames. A cavidade do ovário é originada por um crescimento ativo, para cima, de uma zona anelar ao redor da

margem basal do meristema reprodutivo amplamente expandido. O óvulo é centrado no fundo da flor primitiva. As flores centrais, ou do disco, possuem corola actinomorfa tubular, enquanto que as flores marginais ou do raio desenvolvem uma corola ligulada (Figura 1).

A flor representa uma fase do desenvolvimento da planta que antecede a formação do fruto. Porém, uma vez destacada da planta original, ela tem o seu desenvolvimento bloqueado ou alterado drasticamente, não podendo mais gerar o fruto e as sementes que iriam garantir a perpetuação da espécie. As flores cortadas têm, então, seu destino encurtado para morrerem na fase mais fértil da planta. Ao serem cortadas, é desencadeado um processo de degeneração, que os humanos tentam retardar mantendo as hastes imersas em água. Mas, este é somente um método paliativo, que não impede o senescimento mais rápido da flor.

2.4 Diferenças entre senescência e envelhecimento nas plantas

A senescência e o envelhecimento nas plantas têm sido abordados minuciosamente por Noodén e Leopold (1988). A senescência é um processo celular degenerativo natural, controlado por fatores endógenos, enquanto que o envelhecimento ocorre em consequência de uma série de processos degenerativos passivos ou não regulados, dirigidos por fatores exógenos. As lesões como desgastes e rompimentos, que vão se acumulando com o tempo, são típicas do envelhecimento. Essas lesões não são necessariamente a causa da morte, mas, ao diminuir a resistência do organismo aos estresses, podem indiretamente aumentar a probabilidade da morte. A senescência, ao contrário, está associada diretamente à morte da célula, tecido, órgão ou organismo. A síndrome da senescência compreende a perda ordenada das funções normais e parece ser um processo ativo. Independentemente da planta ser jovem ou velha, ocorre uma contínua renovação celular representada pela formação, crescimento e morte das células pelo processo natural de senescência (Marangoni e col., 1996).

A morte celular pode ocorrer segundo uma programação pré-estabelecida, por necrose ou por degeneração crônica (Marangoni e col., 1996). A senescência corresponde a morte celular programada, a necrose ocorre em consequência de estresses agudos externos e o envelhecimento corresponde a degeneração crônica. A inibição da produção de ATP (adenosina trifosfato) pode causar necrose, ao contrário da senescência, que requer ATP para se manifestar.

Os processos degenerativos relacionados à deterioração das membranas são ocorrências de grande importância nos danos causados por estresse, senescência e envelhecimento. As quebras dos ácidos nucleicos e das proteínas desempenham papéis importantes na senescência, embora não esteja claro, ainda, como elas se encaixam no processo central do fenômeno (Marangoni e col., 1996).

2.5 Senescência de flores

Sem dúvida, a principal e mais importante característica para a comercialização das flores de corte é o seu visual agradável, que inclui a flor e as folhas. A flor é constituída pelo cálice, que é mais velho que a corola, e pelos estames e/ou pistilo, que podem ser mais novos (Noodén e Leopold, 1988). A flor cortada é uma estrutura bastante complexa, que sofreu um estresse ao ser separada da planta original, mas, que continua viva, e, às vezes, se desenvolvendo, com crescimento das pétalas e dos órgãos sexuais. A senescência e o processo de envelhecimento ocorrem de formas distintas nas flores e nas folhas. Mayak e Halevy (1986) descreveram os processos de senescência das pétalas a níveis ultraestrutural, bioquímico e biofísico, citando como os dois maiores eventos metabólicos o aumento na respiração e a hidrólise dos componentes celulares, em que há uma elevada atividade das peroxidases e dos radicais livres, que reagem com os elementos da célula, provocando finalmente a perda de peso fresco, ressecamento e definhamento, que não são eficientemente impedidos só pelo suprimento de água nas flores cortadas. A descoloração das pétalas é outro indicativo do envelhecimento da flor, na qual os carotenóides sofrem oxidação durante o processo degenerativo e as antocianinas tanto podem se manter estáveis, diminuir drasticamente ou aumentar a sua síntese, dependendo da flor. Uma ligeira variação no pH vacuolar pode alterar a cor das pétalas, como no caso do tom púrpura adquirido por flores vermelhas em decorrência do aumento do pH, que é causado pela quebra de proteínas e liberação de amônia. Por outro lado, as flores azuis, púrpura e violeta se tornam avermelhadas com o envelhecimento, em decorrência da diminuição do pH, devido ao aumento do conteúdo de ácidos orgânicos.

O principal hormônio vegetal envolvido na senescência é o etileno, responsável pelo enrolamento e definhamento das pétalas e entumescimento do ovário. A produção do etileno segue um padrão que se inicia com uma taxa baixa e constante, seguida por um aumento acelerado, até atingir um pico e finalizando com um declínio. No entanto, o etileno nem sempre atua efetivamente como indutor da senescência. Algumas plantas da família

Compositae, como o crisântemo, são insensíveis ao hormônio (Noodén e Leopold, 1988), tendo outros processos como causa da senescência. Segundo Mayak e Halevy (1986), vários eventos associados à senescência podem ser estudados nas diferentes fases de produção do etileno. Por exemplo, na fase intermediária ocorre um aumento na produção de CO_2 , concomitantemente com o aparecimento dos sintomas visuais. Conhecendo-se bem o que acontece em cada fase, é possível estimulá-la ou inibi-la mediante a administração de hormônios, que podem ser o próprio etileno ou o ácido abscísico, ou modificando-se a atmosfera com CO_2 ou O_2 .

Outros hormônios importantes no processo de senescência das flores são: as citocininas, que diminuem conforme a flor envelhece; o ácido abscísico, que aumenta com o envelhecimento da flor, e as giberelinas e auxinas. Como todos esses hormônios atuam interagindo, a alteração no nível de um deles deve provocar mudanças, também, nos demais. A etapa final da senescência da flor ocorre com o seu desprendimento, total ou somente das pétalas.

A taxa de respiração nas flores cortadas também segue cinco etapas mais ou menos definidas, como tem sido observado em rosas e cravos: 1ª fase - taxa de respiração alta, no primeiro dia após a colheita; 2ª fase - rápido declínio; 3ª fase - taxa mínima, correspondente ao terceiro ou quarto dia; 4ª fase - aumento, no sexto ou sétimo dia; 5ª fase - declínio da produção, e ; provável existência de uma sexta fase (Coorts, 1973). Nos estados finais, a respiração das flores pode aumentar em até 250-300% (Noodén e Leopold, 1988).

Um fato interessante é que o gás carbônico pode inibir a produção de etileno, mas, somente quando presente em concentração alta (Burg e Burg, 1967). Entretanto, assim que o CO_2 é removido, a produção de etileno volta a ocorrer imediatamente (Mayak e Dilley, 1976).

Droillard e col. (1987) têm verificado que pétalas de flores de cravo apresentam um aumento no nível de radicais livres durante o envelhecimento. Esse aumento corresponde a uma diminuição no conteúdo de lipídeos polares e também ao aumento dos níveis de catalase e peroxidase no início e durante o murchamento das pétalas, seguido de uma diminuição no final do processo. A catalase é uma enzima encontrada nos peroxissomos, mas não nas mitocôndrias e cloroplastos, e converte H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Outros estudos indicam que o nível de catalase tende a diminuir durante a senescência (Thompson e col., 1987). A peroxidase também reduz o H_2O_2 em água na presença de um

substrato apropriado, que possa ser oxidado, mas, aumenta com a senescência (Thompson e col., 1987).

2.6 Senescência de folhas

Durante a senescência das folhas ocorrem profundas alterações morfológicas, metabólicas e fisiológicas. O sinal mais evidente detectável é o amarelecimento por causa da perda de clorofila cujo mecanismo ainda não foi totalmente desvendado. O processo de fotossíntese fica comprometido na ausência da clorofila, mas, a taxa de declínio fotossintético não ocorre simultaneamente à queda do nível de clorofila (Thimann, 1986).

Thimann (1986), em uma extensa revisão relacionada ao processo de senescência das folhas, destaca as principais mudanças e aponta os prováveis mecanismos envolvidos no fenômeno. Durante o envelhecimento foliar ocorrem quebras de proteínas e consequente liberação de aminoácidos, que passam a ser uma importante fonte de substrato respiratório. Dessas proteínas, a ribulose-bifosfato carboxilase e as RNases (ribonucleases) são enzimas importantes, sujeitas a uma intensa hidrólise durante a senescência. Os aminoácidos liberados são convertidos em asparagina e/ou glutamina e são parcialmente deaminados, liberando amônia. São, então, transportados para a haste, provavelmente em forma de amidas, e aproveitados por outros órgãos da planta em desenvolvimento como as flores, frutos, brotos e folhas jovens. Por outro lado, o desenvolvimento das folhas e a sua etapa terminal, representada pela senescência, são controlados geneticamente pelos ácidos nucléicos, sendo que, durante a senescência, há um declínio geral nos conteúdos de RNA (ácido ribonucleico) e de DNA (ácido desoxi-ribonucleico). A perda de RNA parece estar relacionada ao decréscimo na sua taxa de síntese ou a um aumento na atividade das RNases. Novas enzimas envolvidas na degradação dos ácidos nucléicos das folhas em fase de senescência continuam sendo descobertas (Blank e Mckeon, 1991a, b). Por sua vez, a taxa de respiração na senescência sofre um abrupto aumento inicial, declinando no fim do processo. A diminuição da taxa pode ser explicada pela presença dos aminoácidos liberados em consequência da proteólise, que passam a ser os principais substratos respiratórios disponíveis, ou por uma retenção do CO_2 . Já em nível ultraestrutural, há um desaparecimento inicial de amido, que pode ser encontrado em depósitos nos cloroplastos; algumas organelas podem inchar, indicando perda de energia; os tilacóides se tornam menos densos e surgem grânulos osmiofílicos; as cristas das mitocôndrias se distorcem e podem até desaparecer ou enrugar; os tonoplastos e plasmalemas desaparecem; as hidrolases dos

vacuolos são liberadas, atacando o citoplasma, e as membranas se enfraquecem e se dissolvem, causando mudanças na permeabilidade. Todas essas alterações parecem ser mais resultados do que causas da senescência.

Os hormônios, por sua vez, influem de forma diversa sobre a senescência da folha (Thimann, 1986). A auxina retarda muito pouco o processo; as citocininas retardam a proteólise e a perda de clorofila no escuro, atuando da mesma forma que nas flores, sendo que a cinetina é capaz de manter baixo o nível de respiração; o ácido giberélico também atua, em alguns casos, no retardo da senescência; o ácido abscísico acelera o envelhecimento, inibindo a síntese de proteínas e de RNA, sendo considerado um verdadeiro agente endógeno acelerador da senescência; o etileno, entretanto, no caso das folhas, parece não ser um agente causador desse fenômeno.

Além dos hormônios, os aminoácidos serina e cisteína também são promotores da senescência foliar, enquanto que a arginina, a ornitina, a lisina, a espermina e a espermidina atuam como inibidores.

Os cloroplastos das plantas superiores são especialmente sensíveis aos efeitos tóxicos do oxigênio, apresentando dificuldades para se protegerem contra os danos provocados pelos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1989). Isso ocorre por que o conteúdo de oxigênio interno, na luz, é sempre maior do que na atmosfera circundante. Além disso, há uma susceptibilidade muito grande à peroxidação, pois o envoltório do cloroplasto é rico em lipídeos e os tilacóides são ricos em ácidos graxos poli-insaturados. Como foi mencionado anteriormente, existem vários mecanismos de proteção contra os radicais livres, superóxidos, peróxidos de hidrogênio, radicais hidroxila, oxigênio "singlete" e lipoperóxidos. As principais substâncias atuantes nesses processos de proteção são:

- a) a superóxido dismutase (SOD), que remove o O_2^- , prevenindo a formação de OH^\bullet , mas, tem sua concentração diminuída com a senescência;
- b) o ácido ascórbico, ou vitamina C, que é solúvel em água e reage rapidamente com o O_2^- , o OH^\bullet e o oxigênio "singlete", além de remover o H_2O_2 pela reação ascorbato peroxidase, sendo encontrado em grande quantidade nos cloroplastos;
- c) a glutatona reduzida, que reage rapidamente com o OH^\bullet e o oxigênio "singlete", protegendo as enzimas com grupo -SH e auxiliando na regeneração do ascorbato originado do dehidroascorbato, mas, cuja concentração diminui com a senescência;

- d) o α -tocoferol, ou vitamina E, que é hidrofóbica e está associada às membranas, inibe a reação em cadeia da peroxidação lipídica e elimina rapidamente o oxigênio "singlete", e;
- e) os carotenóides, que absorvem o excesso de energia de excitação da clorofila por transferência direta, além de eliminar o oxigênio "singlete".

Segundo Thimann (1986), os mecanismos envolvidos na senescência foliar não foram totalmente esclarecidos, ainda, e as hipóteses mais prováveis são que: a) a síndrome envolvida na senescência seja um fenômeno de carência de energia química, em que as fotofosforilações cíclica e não-cíclica, que produzem ATP, são afetadas; b) a senescência ocorre por causa do fechamento dos estômatos, impedindo as trocas gasosas com o meio externo, ou; c) a síndrome envolve os dois fenômenos anteriores.

A senescência vegetal pode ser induzida por diversos estresses como o frio, o congelamento, a falta de água, a presença de sais, a radiação e outros. Em geral, os processos degenerativos causados por todos esses estresses são comuns, atuando sobre os mesmos componentes da planta.

2.7 Estresse por radiação ionizante

Segundo Levitt (1980), os danos causados pelos diversos estresses ambientais físicos nas plantas podem ser classificados como injúrias primárias diretas, primárias indiretas e decorrentes do aparecimento de um estresse secundário causado pelo estresse primário. No caso da radiação ionizante (estresse primário), o estresse secundário possível de ocorrer é o aumento da temperatura, mas, para que isso se manifeste, é necessária uma dose de radiação muito alta. As injúrias primárias diretas são os danos que aparecem logo após a irradiação e que geralmente requerem doses altas e estão associadas à perda de semipermeabilidade das membranas celulares. Este distúrbio nas membranas lipídicas é o mais comum dos efeitos diretos e ocorre também com os outros estresses físicos, com exceção do estresse por excesso de água. As injúrias primárias indiretas compreendem a inibição do crescimento e os danos metabólicos, que se manifestam igualmente com muitos outros estresses. Nos danos metabólicos podem ocorrer: interação da radiação com a água e o oxigênio, que vai provocar um aumento no potencial de oxido-redução e o efeito OER (oxygen enhancement ratio); interação direta da radiação com os metabólitos da planta; mudanças na fotossíntese e na respiração; alteração no balanço de carboidratos; alterações

nas proteínas e atividades das enzimas; alterações nos ácidos nucleicos, e; produção de radiotoxinas.

Não é possível generalizarem-se os efeitos acima mencionados, afirmando-se que sempre ocorre diminuição de proteínas, inativação de enzimas ou diminuição na taxa metabólica. As plantas reagem diferentemente, dependendo da dose de radiação, e efeitos opostos podem ocorrer com doses baixas e altas, dependendo também da taxa da dose. Além disso, o estado fisiológico da planta, ao ser irradiada, também é fundamental para a manifestação dos efeitos e os dados obtidos até o momento, no caso da radiação ionizante, são quase que exclusivamente de origem experimental ou de acidentes em que o homem utilizou a tecnologia nuclear. Embora existam no globo terrestre regiões com níveis elevados de radioatividade ambiental, não há provas de que os organismos biológicos desses locais sofram de estresse por radiação ionizante, ou que tenham algum mecanismo para evitar ou reagir contra os possíveis danos que possam ocorrer nos níveis de doses a que se encontram expostos. Sabe-se experimentalmente que, nos vegetais, o processo mitótico é mais radiossensível que a fotossíntese, que, por sua vez, é mais sensível que a respiração.

O etileno foi objeto de estudo no início das pesquisas de preservação de frutas e outros vegetais por meio da radiação gama (Abeles e col., 1992). Aumento na produção de etileno tem sido observado no abacate, no limão, na laranja, na pera, no tomate e no epicótilo de ervilha irradiados. A produção é dependente da dose e ocorre por causa do aumento de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-tricarboxílico), precursor do etileno. No tomate é possível detectar um estímulo na atividade da ACC sintetase 15 minutos após a irradiação. A irradiação de alguns componentes químicos das frutas, como o álcool, os ácidos do ciclo de Krebs e o ácido linolênico também resultam em produção de etileno (Abeles e col., 1992). Entretanto, existem registros de que a radiação pode inibir a produção de etileno em flores cortadas de cravos e rosas (Tanabe e col., 1994).

Quando nos referimos aos efeitos biológicos das radiações costumamos fazer uma associação quase imediata à produção de radicais livres. Mas, a maioria dos estresses causam sintomas semelhantes, que não nos permitem afirmar se a causa foi, ou não, a radiação ou outro estresse.

2.8 Radicais livres e senescência

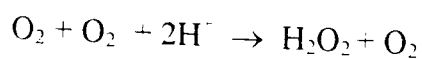
A produção de radicais livres nas plantas ocorre normalmente como resultado do processo natural de senescência, distúrbios provocados por estresses físicos ambientais ou.

ainda, por ferimentos sofridos pelo vegetal. Nos tecidos vegetais, os radicais livres do oxigênio podem aumentar por causa de um descontrole na sua produção ou por ineficiência no processo de captura. Além disso, uma variedade de enzimas como lipoxigenase, peroxidase, NADHoxidase e xantina oxidase, também produzem radicais livres nas plantas. Os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos são os alvos mais atingidos pelos radicais livres. Os ácidos graxos insaturados, por exemplo, são especialmente susceptíveis ao ataque do oxigênio ativado. Entretanto, todo organismo aeróbico, para se proteger, possui um sistema de defesa constituído por "scavengers" de radicais livres (Monk e col., 1989).

Thompson e col. (1987) relacionaram as reações envolvendo os radicais livres ao processo de senescência e aos danos provocados por ferimentos nas plantas. Os prováveis sítios de produção de radicais livres nas plantas, durante esses dois processos, são apresentados a seguir:

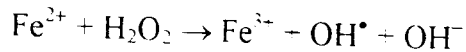
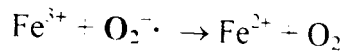
- a) O ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, que é reativo em ambientes hidrofóbicos como o interior da bicamada das membranas, pode ser produzido pelos cloroplastos através da reação de Mehler ou pela ferredoxina reduzida. Durante a senescência as membranas microsossomais de pétalas de cravo também produzem grande quantidade de $O_2^{\cdot-}$ que deve estar envolvido na conversão de ACC em etileno (Paulin e col., 1986);
- b) A dismutação do ânion superóxido leva à formação do peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , por reação espontânea ou catalizada pela superóxido dismutase, que pode ser encontrada nos tecidos de plantas superiores associadas ao Cu, Zn, Mn ou Fe. As flavoproteína oxidases, como a monoamino oxidase da membrana externa das mitocôndrias, a glicolato oxidase e a urato oxidase dos peroxissomos também produzem H_2O_2 .

Reação catalizada pela superóxido dismutase:



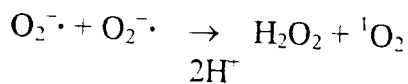
- c) O H_2O_2 , por sua vez, pode formar o radical hidroxila OH^{\cdot} pela reação de Haber-Weiss catalizada pelo ferro, onde o ânion superóxido reduz o Fe^{3+} para Fe^{2+} , que, então, reage com o H_2O_2 e forma o OH^{\cdot} . Como o ferro é um metal que pode estar livremente ligado a várias biomoléculas como ATP, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos das membranas, o dano causado pelo OH^{\cdot} pode ser sítio-específico, dependendo de onde e em que molécula na célula o ferro esteja ligado.

Reação de Haber-Weiss:

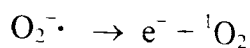


d) O oxigênio "singleto", $^1\text{O}_2$, apesar de não ser um radical livre por ter todos os elétrons pareados, é altamente reativo por possuir um orbital molecular livre. O oxigênio "singleto", que possui ambos os elétrons ocupando o mesmo orbital, é a forma predominante em soluções e deve ser, portanto, a única forma reativa nos sistemas biológicos. A maior fonte nos sistemas biológicos parece ser o radical superóxido, que reage espontaneamente, por transferência direta de um elétron, pela reação com o H_2O_2 ou o OH^{\cdot} ou por dismutação espontânea do H_2O_2 . A clorofila das plantas, em presença da luz, pode ser uma fonte primária de $^1\text{O}_2$, envolvendo a transferência de energia de excitação. Existem, ainda, evidências de que as peroxidases são capazes de catalizar a formação de oxigênio "singleto".

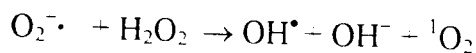
Reação espontânea para a formação de $^1\text{O}_2$:



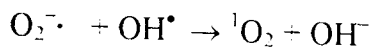
Reação por transferência direta de elétron:



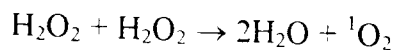
Reação com H_2O_2 :



Reação com OH^{\cdot} :



Reação por dismutação espontânea de H_2O_2 :



e) A peroxidação lipídica é a reação de lipídeos com o oxigênio e pode ser ativada pelo OH^{\cdot} resultante das reações sequenciais descritas em a), b) e c), sendo que o ferro livremente ligado a alguma biomolécula também é capaz de catalizar essa reação, resultando na formação de radicais alcoxi RO^{\cdot} e peroxi ROO^{\cdot} . Enzimas como a lipoxigenase podem catalizar a co-oxidação de outros substratos como carotenóides e clorofila, enquanto que a NADPH-citocromo P_{450} redutase dos microsossomos e a NADH oxidase das mitocôndrias também são capazes de induzir a peroxidação lipídica. No caso das duas últimas enzimas isso ocorre por que elas reduzem o Fe^{3+} para Fe^{2+} (que

vai participar da reação c) ou reagir com o oxigênio para formar o íon perferril $Fe_2(O_2)$, que participa não enzimaticamente da peroxidação lipídica. A reação entre dois radicais peróxi também pode levar à formação de oxigênio "singleto", que, por sua vez atua como um iniciador, que vai provocar uma cadeia de reações de peroxidação lipídica.

Ainda segundo o trabalho de Thompson e col. (1987), a peroxidação lipídica é uma característica inerente ao processo de senescência vegetal, havendo então a formação de radicais alcoxi e peroxi, além do oxigênio "singleto". As enzimas fosfolipase e lipoxigenase estão envolvidas na produção de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, também contribuem para a produção de radicais livres.

O transporte de elétrons na fotossíntese sofre um desequilíbrio durante a senescência, com a liberação de elétrons para o oxigênio e a formação de espécies ativas de oxigênio. Nesse processo, parece que há a formação de oxigênio "singleto" na clorofila, dependente da luz. Por outro lado, a degradação das metaloproteínas durante a senescência aumenta a quantidade de ferro que vai participar da formação de radical hidroxila.

Um dos alvos preferidos pelos radicais livres são as membranas celulares, que são bastante sensíveis a quase todos os tipos de estresses.

2.9 Membranas biológicas

A simples observação visual ou, mesmo, a sensação tátil, nos permite distinguir um animal de um vegetal. No entanto, em nível celular as diferenças se tornam bem pouco evidentes, requerendo métodos sofisticados para identificar, por exemplo, algumas organelas, como mitocôndrias e ribossomos, ou, mesmo, o núcleo característico de cada reino. As plantas se diferenciaram durante o processo evolutivo de tal forma que adquiriram a capacidade de fixar o gás carbônico pela fotossíntese, além de produzir uma parede celular rígida. A maioria das diferenças entre vegetais e animais pode ser caracterizada, em nível de parede celular, pelos processos de nutrição, digestão, osmorregulação, crescimento, reprodução, comunicação intercelular, mecanismos de defesa e morfologia (Alberts e col., 1983).

Todas as membranas biológicas têm uma estrutura comum (Alberts e col., 1983). Elas são constituídas por moléculas de proteínas e fosfolípidos, mantidas por ligações não-covalentes. A estrutura básica da membrana consiste em uma bicamada de fosfolípidos, que serve como uma barreira impermeável ao fluxo da maioria das moléculas solúveis em água. As moléculas de proteínas ficam inseridas na bicamada fosfolipídica e são mediadoras

de diversas funções da membrana: umas servem para o transporte de moléculas específicas para dentro e para fora da célula; outras, são enzimas que catalizam reações associadas à membrana; algumas servem, ainda, como estruturas de ligação entre o citoesqueleto das células e a matriz extra-celular ou como receptores para captar e traduzir sinais químicos do ambiente celular. A bicamada é um fluido e as moléculas de fosfolípideo são anfipáticas, com uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica. Nas membranas vegetais, a bicamada de fosfolípidos é embebida por proteínas e esteróis, cujos grupos polares se associam aos grupos polares dos fosfolípidos (Marangoni e col., 1996). Isso faz com que a estrutura hidrofóbica plana fique imersa na matriz hidrofóbica da membrana. O esqueleto esteróide é rígido e plano e provoca um aumento na microviscosidade da matriz fosfolípídica circundante. Por outro lado, a cadeia alifática do esterol é móvel e pode apresentar um efeito fluido, o que permite aos esteróis atuarem como estabilizantes da fluidez das membranas.

Os esteróis vegetais são representados, principalmente, pelo estigmasterol, pelo sitosterol e pelo campesterol. Eles são menos solúveis nos fosfolípidos do que o colesterol, o que diminui a efetividade de modulação da permeabilidade da bicamada de lípidos (McKersie e Thompson, 1979). Normalmente, cada esterol se associa a duas moléculas de fosfolípideo, sendo que, acima de 33%, os esteróis não são mais solvatados pelos fosfolípidos, ocorrendo interação esterol-esterol, que pode resultar em um arranjo cristalino nos vegetais, visível por difração de raio-X.

Nas plantas, a membrana plasmática de uma célula é contínua em relação às das células vizinhas na região dos plasmodesmata (canais citoplasmáticos). A membrana plasmática vegetal que envolve todas as células é responsável por 90% da resistência ao fluxo de água entre o citoplasma e o meio externo (Alberts e col., 1983). O turgor aparente das células vegetais é mantido pelo desequilíbrio entre os fluidos intra e extracelular e é vital para a planta. O turgor é a principal força diretriz para a expansão celular durante o crescimento e é responsável por boa parte da rigidez mecânica dos tecidos vegetais. É possível que a resposta rápida de entrada ou saída do soluto das células diante da diminuição ou aumento do turgor seja reflexo das mudanças nas proteínas específicas de transporte localizadas na membrana plasmática. A ação rápida dos hormônios vegetais também ocorre de forma efetiva devido às modificações da permeabilidade da membrana plasmática.

A deterioração das membranas é uma das principais características da senescência, e, segundo Marangoni e col. (1996), os eventos envolvidos no processo podem ser esquematizados segundo a Figura 2.

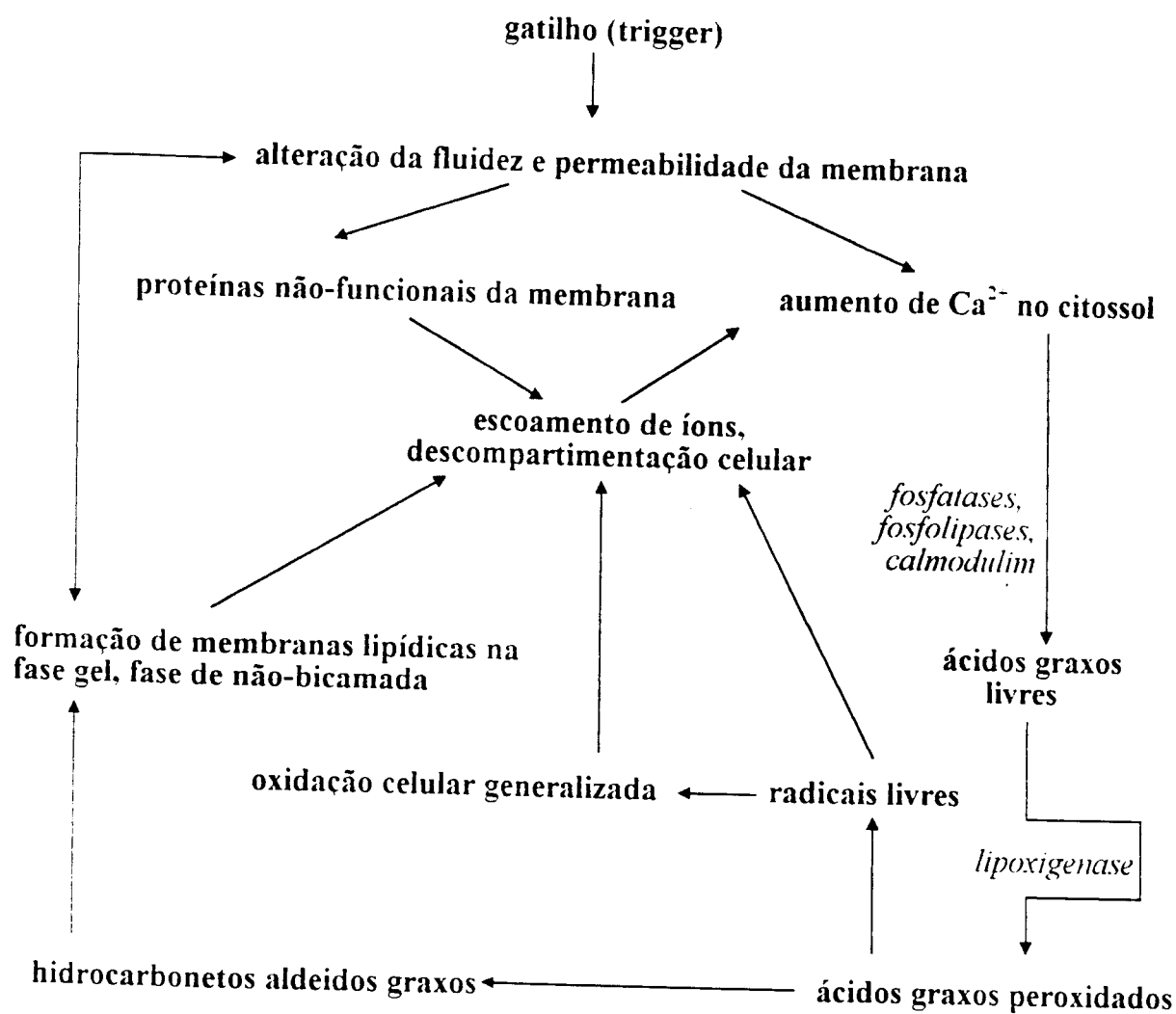


Figura 2. Esquema descritivo para a deterioração das membranas em plantas, em decorrência da senescência ou estresse pós-colheita (Marangoni e col., 1996).

Os processos de senescência e de envelhecimento são caracterizados pela rigidez das membranas e perda de fosfolípidos, sendo que os esteróis parecem atuar como estabilizadores da fluidez das membranas, contribuindo para a manutenção das funções normais (Marangoni e col., 1996). A fluidez ou microviscosidade das membranas é um conceito que descreve o movimento livre dos lípidos nas membranas (Edwards e col., 1984). Assim, os lípidos contendo ácidos graxos insaturados são mais fluidos do que os que tem ácidos graxos saturados. Entretanto, o acúmulo de ácidos graxos livres ocorre de forma significativa somente no processo de envelhecimento e, não, na senescência, característica que serve para diferenciar um fenômeno do outro (Voisine e col., 1991).

Alguns sistemas biológicos apresentam alterações na fluidez das membranas durante o ciclo celular, sendo difícil descrever de forma generalizada essas mudanças em todos os diferentes organismos (Shinitzky, 1984). Na maturação e diferenciação celular parece que a taxa de proliferação celular é inversamente proporcional à microviscosidade das membranas. O agrupamento celular e o envelhecimento conferem maior grau de microviscosidade às membranas. Entretanto, se o envelhecimento ainda estiver no início, existe a possibilidade de uma reversão do quadro, o que não ocorre em estado avançado do processo.

A microviscosidade das biomembranas pode ser medida experimentalmente por meio do grau de polarização da fluorescência de uma "sonda" química, que é introduzida na bicamada lipídica das membranas isoladas. O DPH (1,6-diphenyl hexatriene) é uma das sondas químicas mais utilizadas para medidas de polarização de fluorescência. Como ele não é fluorescente em ambiente aquoso, o sinal só se origina do núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica que não foi desestruturada pelos produtos de oxidação gerados pela radiação (Parasassi e col., 1995). Quando a viscosidade aumenta, indica que a membrana apresenta maior rigidez. Os tecidos jovens possuem membranas com fluidez maior (viscosidade menor) que os tecidos mais velhos (Borochoy e col., 1978). Portanto, o aumento da microviscosidade é um indicativo de senescência ou envelhecimento.

O aumento da permeabilidade das biomembranas é outra característica da senescência, decorrente da diminuição da funcionalidade das membranas que tiveram sua fluidez diminuída (Marangoni e col., 1996). Existem, além disso, evidências correlacionando a liberação de íons na senescência com as seguintes funções bioquímicas: modificações das atividades das ATPases associadas às membranas; peroxidação de ácidos graxos, que resulta na formação de radicais livres e atuação do Ca^{2+} ligado a ATPases, que também pode se apresentar na forma de complexo calmodulim- Ca^{2+} (Marangoni e col., 1996). Na Figura 2 muitas enzimas degradadoras de lipídeos são ativadas pelo cálcio, ou complexo calmodulim-cálcio, que é requerido, também, para a fosforilação de proteínas, que, por sua vez, são importante para ativar enzimas que estimulam as atividades fisiológicas das plantas.

As enzimas H^+ -ATPases das membranas plasmáticas estão envolvidas em muitas funções fisiológicas das plantas, como na ativação do transporte secundário, turgor celular, movimento dos estômatos, crescimento, desenvolvimento, ação hormonal, patogênese e

regulação do pH intracelular (Michelet e Boutry, 1995; Kasamo e Sakakibara, 1995). A distribuição das H^+ -ATPases nas plantas é específica, sendo que nos órgãos reprodutivos ela é encontrada no meristema floral, na antera, na parênquima da sépala, no mesocarpo do ovário e no pólen. A atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática é modulada pelos esteróis vegetais, sitosterol, estigmasterol e 24-metilcolesterol, mas, depende da concentração e da espécie molecular do esterol (Grandmuougin-Ferjani e col., 1997). A enzima também é regulada pelo comprimento e grau de saturação das cadeias de ácidos graxos com radicais acila nos fosfolípidos, que, ao sofrerem modificações estruturais, afetam a função das proteínas das membranas (Kasamo e Sakakibara, 1995). Existem, atualmente, duas teorias para explicar os mecanismos envolvidos nessa modulação da atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática (Grandmuougin-Ferjani e col., 1997). Uma teoria diz que as mudanças na composição lipídica induzem alterações nas propriedades físicas globais da bicamada de lípidos, afetando indiretamente as atividades das enzimas. A outra teoria diz que ocorre uma interação direta dos lípidos com as enzimas. A modulação da H^+ -ATPase das membranas dos tonoplastos das plantas também depende da quantidade de colesterol e da taxa de lípido-proteína para que ocorra o bombeamento de H^+ através da membrana, em condições ótimas (Nakamura e col., 1997).

As ATPases e outras enzimas das membranas biológicas podem ser identificadas por marcadores específicos, conforme métodos descritos por Briskin e col. (1987), alguns dos quais foram utilizados neste trabalho. A ATPase sensível ao vanadato é específica para membrana plasmática, a ATPase sensível ao nitrato é específica para tonoplasto e a ATPase sensível a azida é específica para membrana da mitocôndria. Outra enzima específica para a mitocôndria, cuja atividade foi medida neste trabalho, é a citocromo-c oxidase.

2.10 Efeitos das radiações ionizantes nas membranas lipídicas

Os efeitos das radiações ionizantes nas biomembranas incluem modificações em lípidos, proteínas e DNA. Esses efeitos podem influir na fluidez, carga superficial e transporte das membranas. A existência de uma estreita relação entre as membranas e o DNA de alguns sistemas biológicos é que sugere que as membranas sejam alvos importantes no processo de irradiação e que essa interação deve ser útil, também, no mecanismo de reparo (Edwards e col., 1984).

A peroxidação lipídica consiste na reação de lípidos (LH) com o oxigênio molecular para formar hidroperóxidos de lípido (LOOH). A fórmula geral simplificada

pode ser representada como: $LH + O_2 \rightarrow LOOH$. Durante esse processo há a geração de radicais de lipídeos (L^*) e a reação termina somente quando todos os radicais são eliminados pela interação radical-radical, com a formação de produtos não radicais. A duração da cadeia cinética, v , da peroxidação radioinduzida pode ser definida como:

$$v = \frac{\text{número de moléculas de } O_2 \text{ consumidas}}{\text{radicais OH iniciais}}$$

e equivale ao número de ciclos de reações para a formação dos hidroperóxidos (LOOH).

A peroxidação lipídica induzida pela radiação é acompanhada pela diminuição da fluidez da membrana e apresenta o interessante fenômeno do efeito inverso da taxa de dose. Neste evento o efeito da radiação aumenta com a diminuição da taxa de dose, quando em uma dose absorvida constante (Stark, 1991). Existem dois modos de ações na peroxidação lipídica: a) ocorrência do acúmulo de produtos polares, que vai provocar um aumento na constante dielétrica do interior da membrana, que, por sua vez, vai influir no movimento das partículas carregadas através da membrana, e; b) por reações bimoleculares em que duas espécies de radicais reagem para formar um produto não radical, como, por exemplo, ligações cruzadas de moléculas de lipídeo, que vão influir na microviscosidade do interior das membranas e modificar as propriedades de difusão. Os ácidos graxos insaturados são muito sensíveis aos radicais livres. Segundo Voisine e col. (1991), os radicais livres gerados pela radiação gama em membranas microssomais de couve-flor induzem um pequeno aumento no conteúdo de ácidos graxos livres, semelhante ao processo de senescência e, não, ao do envelhecimento, em que há acúmulo desses componentes. O efeito da peroxidação lipídica parece ser detectável mesmo em níveis naturais de radiação ionizante (Stark, 1991).

As proteínas das membranas que possuem grupos -SH são oxidadas pela radiação, contribuindo para uma parte dos danos celulares. Já as proteínas com grupo -SH reduzidos podem atuar como radioprotetores, ao doar um átomo de hidrogênio para a molécula de DNA que perdeu um hidrogênio por causa da irradiação (Edwards e col., 1984).

A radiação ionizante pode causar mudanças na carga superficial, e, conseqüentemente, na mobilidade eletroforética das membranas (Edwards e col., 1984). As alterações das propriedades eletroforéticas podem, também, modificar o número de grupos iônicos da membrana, as constantes de dissociação dos grupos iônicos ou o arranjo topográfico desses grupos na superfície das membranas. Tudo isso pode causar mudanças

nas interações entre as células, nas interações entre cálcio e membrana e na permeabilidade aos íons. Modificação no mecanismo de transporte também é possível ser provocada pela radiação ionizante, compreendendo o aumento na captura de íon sódio, a perda de íon potássio ou a estimulação/inibição da captura de aminoácidos.

O colesterol desempenha um papel importante no processo de irradiação das membranas lipídicas. Quando em concentrações fisiológicas, cerca de 30%, ele protege a bicamada de fosfolípideo contra os danos oxidativos, diminuindo a quantidade de hidroperóxidos produzidos pela radiação (Parasassi e col., 1995). Isso ocorre uma vez que seja formado um obstáculo à difusão da reação de propagação das cadeias de radicais, por que o colesterol fica alojado entre duas cadeias insaturadas adjacentes de acila. A bicamada se condensa, já que o colesterol se aloja entre os espaços descontínuos das interações hidrofóbicas criadas pela presença dos produtos de oxidação.

Os efeitos das radiações em membranas celulares de plantas têm sido pouco explorados e têm apresentado resultados diversificados. As modificações causadas pelas radiações ionizantes em nível de membrana celular vegetal têm sido pesquisadas em flores de brócoli (Voisine e col., 1991, 1993), fruta de maçã (Dong e col., 1994), fruta de melão (Lester e Whitaker, 1996), tubérculo de batata (Hayashi e col., 1992; Todoriki e col., 1994a), folhas de *Chelidonium majus* (Sato e col., 1995) e hipocótilo de feijão (Pai e Gaur, 1983, 1987).

2.11 Outros métodos para medidas de senescência vegetal

Uma forma de se detectarem danos a membranas nos tecidos vegetais é pela medida de impedância ou condutividade elétrica. Isso tem sido utilizado em plantas para verificar as mudanças causadas por estresses ambientais ou mecânicos (Cox e col., 1993; Zhang e Willison, 1992, 1993; Singh e col., 1992; Zhang e col., 1993) e durante o amadurecimento de frutas (Harker e Maindonald, 1994). O método também tem sido útil para detecção de tubérculos de batata irradiados (Hayashi e col., 1996; Sherz, 1991).

Quando as membranas são danificadas por causas externas ou pelo próprio processo natural de degeneração acabam perdendo as características de semi-permeabilidade ideal. Ocorre, então, o extravasamento ou liberação de íons de dentro para fora das células. Isto pode ser medido com um condutímetro para verificar a perda de íons para o meio externo aquoso (Trippi e col., 1988; Paulin e col., 1986; De Luca d'Oro e Trippi, 1987; Pastori e Trippi, 1993).

2.12. Prolongamento da vida útil de flores cortadas

Quando removidas da planta, as flores sofrem um processo acelerado de deterioração, uma vez que perderam a sua fonte natural de matéria bruta necessária para o funcionamento normal de seu metabolismo. Ocorrem mudanças internas na tentativa de recuperação e manutenção da vitalidade, mas há, também, um aumento da susceptibilidade a agentes patológicos externos. A respiração das flores é de grande importância, uma vez que as reservas armazenadas, principalmente em forma de carboidratos, são gradualmente exauridas por esse processo (Castro e Honório, 1992).

O prolongamento da vida útil das flores cortadas em vaso pode ser obtido mediante os seguintes suprimentos exógenos (Rogers, 1973):

- a) água para manter a turgescência;
- b) uma fonte de substrato regulador da taxa respiratória;
- c) uma fonte de elemento anti-senescente;
- d) um bactericida;
- e) um fungicida;
- f) substâncias reguladoras da abertura do botão e desenvolvimento;
- g) substâncias capazes de manter a coloração das pétalas.

Segundo Castro e Honório (1992), existem quatro tipos de soluções químicas preservativas para flores de corte, dependendo do objetivo de uso:

- a) soluções de condicionamento, para restaurar a turgidez, cujos principais componentes são água limpa, germicidas, sacarose em baixa concentração, em alguns casos, e um acidificante;
- b) soluções de "pulsing", para saturar os tecidos florais com alta concentração de sacarose (2-20%) e outros compostos químicos, dependendo da espécie;
- c) solução de abertura floral, para manter a absorção da água de forma constante, contendo açúcares e outras substâncias para impedir o bloqueio vascular, e;
- d) solução de manutenção, cujo ingrediente principal também é a sacarose em concentrações de 0,5 a 2%, dependendo da espécie da flor, e outras substâncias.

De forma geral, as soluções preservativas têm como principais componentes a água, algum açúcar em forma de glicose ou sacarose, ions minerais, como a prata e o cobalto, e

germicidas, como a 8-hidroxiquinolina e o tiabendazole. A sacarose preserva e estende o tempo de vida útil em vaso de flores cortadas, como, por exemplo, crisântemos irradiados (Dohino e Hayashi, 1995; Kikuchi e col., 1995; Hayashi e Todoriki, 1996; Nakahara e col., 1998). A sacarose administrada exogenamente é transportada, via xilema e floema, da haste até a flor, onde se acumula, aumentando a pressão osmótica e a capacidade de absorver água, o que leva a um aumento da turgidez das pétalas (Mayak e Halevy, 1986). O açúcar exógeno também mantém o volume da matéria seca e serve de substrato para a respiração celular, principalmente nas pétalas, além de retardar a proteólise, o aumento do pH e a alteração da cor das pétalas (Halevy e Mayak, 1979). Além de manter a estrutura e a função das mitocôndrias, serve, também, de substrato para a síntese de proteínas (Mayak e Halevy, 1986), mantém o nível de microviscosidade das membranas de pétalas de rosa (Goszczyńska e col., 1990) e cravo (Adam e col., 1983) e protege a estrutura e a função das células submetidas a stress hídrico (Crowne e col., 1988), atuando como um anti-dessecante, cujo principal mecanismo é o fechamento parcial dos estômatos (Rogers, 1973). O efeito do hormônio citocinina pode ser aumentado pela sacarose, retardando a senescência das flores (Mayak e Halevy, 1986). Os sais de 8-hidroxiquinolina promovem o fechamento dos estômatos e são, também, agentes quelantes, que precipitam microelementos como o cobre, o manganês, o ferro e o zinco, impedindo a sua utilização pelos microorganismos na formação e ação de vitaminas essenciais (Rogers, 1973). O sulfato de 8-hidroxiquinolina, além de estender o tempo de vida das flores em vaso, promove o aumento do tamanho das flores de rosa (Parups, 1975).

O tiabendazole [2-(4-thiazolyl)-benzimidazole] é um fungicida que age de forma similar às citocininas, atuando com grande eficiência na preservação de flores de cravo, diminuindo a produção de etileno (Apelbaum e Katchansky, 1978).

Segundo Sing e col. (1992), um suprimento exógeno de nitrato de amônia retarda a senescência de folhas destacadas de tabaco, mantendo o conteúdo de clorofila e elevando o nível endógeno das citocininas.

O sulfato de alumínio pode ser um substituto mais barato dos sais de 8-hidroxiquinolina, sendo igualmente eficiente para flores de Proteáceas (Haasbroek e col., 1973), de gladiolos (Rameshwar, 1974) e crisântemos (Kikuchi e col., 1995).

O benzoato de sódio e o análogo da rizobitoxina, ácido L-2-amino-4-(2-aminoetoxi)-trans-3-butenoico, quando adicionados a uma solução preservativa contendo 8-

hidroxiquinolina, retardam a senescência de flores de cravo, inibindo a produção de etileno e aumentando mais ainda o tempo de vida útil das flores em vaso (Baker e col., 1977).

Detergentes não-iônicos podem ser efetivos como solução de "pulsing", como, por exemplo, Tween 20 e Physan 20 para crisântemo, Agral LN para rosa, Physan 20 para gipsofila e Triton X-100 para girassol (Jones e col., 1993).

O propil galato, um inibidor das lipoxigenases, é um "scavenger" de radicais livres não específico, capaz de reduzir a produção de etileno em folhas de soja, diminuindo o acúmulo de ACC no tecido vegetal (Pennazio e Roggero, 1992). Entretanto, alguns "scavengers" de radicais hidroxila como o benzoato de sódio, formado de sódio, manitol e dimetilsulfoxido, não afetam a biossíntese de etileno em folhas de soja, indicando que neste sistema o radical OH^{\bullet} não está envolvido na produção de etileno. Já em pétalas de cravo, o benzoato de sódio e o propil galato não são efetivos contra a senescência, mas, o 3,4,5-triclorofenol, que também é um "scavenger" de radical livre, é capaz de prolongar a vida útil das flores de cravo em vaso (Paulin e col., 1986).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental da tese foi desenvolvida em dois laboratórios. Na primeira etapa, no Departamento de Aplicações na Engenharia e Indústria, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), foram realizados testes de tolerância de algumas variedades de flores da família Compositae (Asteraceae) à radiação gama e avaliações da efetividade de soluções de manutenção. A segunda etapa foi desenvolvida no Radiation Utilization Laboratory, do National Food Research Institute (NFRI), em Tsukuba, no Japão, compreendendo medidas bioquímicas e fisiológicas de crisântemos irradiados.

3.1 Primeira etapa (Brasil: fevereiro a agosto de 1995 e janeiro a outubro de 1996)

3.1.1 Flores utilizadas

- * Flor: *Chrysanthemum* sp, variedade "Dow talk"(amarela)
Doses: 0, 50, 200, 400 e 600Gy (taxa de dose: 576Gy/h)
Solução de manutenção: água filtrada;
- * Flor: *Chrysanthemum* sp, mini-crisântemo "Olho-de-gato"
Doses: 0,300 e 1000Gy (taxa de dose: 545Gy/h)
Solução de manutenção: água filtrada, mas, submetida a solução de "pulsing" com 3,5% de sacarose;
- * Flor: *Chrysanthemum* sp, mini-crisântemo "Pinochio"
Doses: 0 e 900Gy (taxa de dose: 493Gy/h)
Solução de manutenção: Chrysal;
- * Flor: *Chrysanthemum* sp, mini-crisântemo amarelo
Doses: 0 e 900Gy (taxa de dose: 488Gy/h)
Soluções de manutenção: 0,1% de sulfato de alumínio com 1% de sacarose; 0,01% de sulfato de hidroxiquinolina com 1% de sacarose;
- * Flor: *Chrysanthemum* sp, mini-crisântemo branco
Doses: 0 e 300Gy (taxa de dose: 510Gy/h)
Solução de manutenção: 0,1% de sulfato de alumínio com 1% de sacarose;
- * Flor: *Rhodanthe manglesii* Lindl
Doses: 0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (338Gy/h)
Solução de manutenção: 0,02% de sulfato de hidroxiquinolina;

* Flor: *Helichrysum bracteatum* Andr.

Doses: 0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (taxa de dose: 205Gy/h)

Solução de manutenção: 0,02% de sulfato de hidroxiquinolina;

* Flor: *Callisthephus chinensis*

Doses: 0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (taxa de dose: 234Gy/h)

Solução de manutenção: 0,02% de sulfato de hidroxiquinolina;

* Flor: *Gerbera* sp

Doses: 0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (taxa de dose: 208Gy/h)

Solução de manutenção: 0,02% de sulfato de hidroxiquinolina;

As flores para os testes de tolerância a radiação gama foram adquiridas no mercado de flores do CEAGESP, na cidade de São Paulo. Essas flores eram provenientes de cidades próximas à capital, tais como Arujá, Ibiúna, Cotia, Mogi das Cruzes, Atibaia e Holambra.

As hastes das flores foram cortadas logo que chegaram ao laboratório e imersas em água filtrada. No início, foram irradiadas no mesmo dia, à tarde. Posteriormente, a irradiação passou a ser efetuada no dia seguinte, de manhã, após um período de rehidratação, procedimento comumente praticado no NFRI. Antes da irradiação as hastes foram cortadas novamente com tesoura até o comprimento de aproximadamente 20cm. Este tamanho correspondia à altura do compartimento para amostras da fonte de irradiação.

Uma fonte Gammacell 220 (587,6-549,9Ci, em 1995, e 520,3-471,0Ci, em 1996, de cobalto-60, Nordion Intl., Ont., Canada) foi utilizada para as irradiações.

As flores foram mantidas à temperatura ambiente, de 15° a 21°C no inverno, de 20° a 25°C na primavera e outono e de 21° a 28°C no verão, com luz fluorescente entre 8:00-18:00 horas, menos nos finais de semana e feriados, quando a iluminação era somente a natural, proveniente das janelas do laboratório.

3.1.2 Soluções de manutenção utilizadas

Y Solução de manutenção de sulfato de alumínio (Rameshwar, 1974):

- 0,1% de sulfato de alumínio;
- 0,001% de sulfato de hidrazina;
- 0,025% de ácido maleico hidrazina;
- 0,01% de ácido cítrico;

Y *Solução de manutenção de 8-HQS (A):*

- 0,01% ou 0,02% de sulfato de 8-hidroxiquinolina;
- 0,01% de ácido cítrico;
- 0,0025% de nitrato de prata.

Y *Solução de manutenção de 8-HQS (B):*

- 0,01% ou 0,02% de sulfato de 8-hidroxiquinolina;
- 0,01% de ampicilina;
- 0,01% de estreptomicina.

Em alguns casos foi adicionada sacarose nas soluções acima, para verificar-se o seu efeito no desenvolvimento das inflorescências e se a sua presença seria benéfica para as flores.

Y *Solução de manutenção comercializada:*

- Crysal, Pokon & Chrysal - Naarden-Holland, Pokon & Chrysal - Naarden-Holland.

3.2 Segunda etapa (Japão: setembro a dezembro de 1995 e novembro de 1996 a abril de 1997)

3.2.1 Flor utilizada e tratamento

* *Dendranthema grandiflorum* Kitamura - crisântemo branco, tamanho grande, uma inflorescência por haste.

Doses: 0 e 750Gy (taxa de dose: 3kGy/h).

As flores foram adquiridas em uma floricultura na cidade de Tsukuba, distrito de Ibaraki, Japão. No primeiro período (setembro a dezembro de 1995), as flores foram mantidas à temperatura ambiente, entre 20° a 25°C, das 8:00 às 17:00h. À noite e nos finais de semana e feriados a temperatura não foi controlada, variando de 10° a 18°C. No segundo período (novembro de 1996 a abril de 1997), as flores foram mantidas à temperatura constante de 20°C. A luminosidade foi mantida com luz fluorescente entre 8:00-18:00 horas, menos nos finais de semana e feriados.

Assim que chegaram ao laboratório, as hastes das inflorescências foram quebradas ou cortadas dentro de água corrente e imediatamente imersas em um recipiente contendo água limpa. Foram mantidas assim até a manhã seguinte para rehidratação. Às 8:30h do dia seguinte as hastes foram cortadas, com tesoura, até o comprimento de aproximadamente 20cm. Este tamanho correspondia à altura do compartimento para amostras da fonte de irradiação.

A seguinte solução de manutenção foi utilizada:

Y Solução de manutenção de 8-HQS:

- 0,02% de sulfato de 8-hidroxiquinolina;
- 0,01% de ampicilina;
- 0,01% de estreptomicina.

Metade das amostras foram mantidas na solução acima; a outra metade, na mesma solução, com 2% de sacarose.

As amostras foram divididas em quatro grupos:

- C - controle, não irradiado e mantido em solução de 8-HQS, sem sacarose;
- I - irradiado e mantido em solução de 8-HQS, sem sacarose;
- CS - não irradiado e mantido em solução de 8-HQS, com sacarose;
- IS - irradiado e mantido em solução de 8-HQS, com sacarose.

3.2.2 Irradiação e amostragem

Uma fonte Gammacell 220 ($2,1 \times 10^2$ TBq de cobalto-60; Nordion Intl., Ont., Canada), similar à existente no IPEN foi utilizada para as irradiações realizadas no Japão. A dosimetria foi realizada com dosímetro CTA (FTR-125, Fuji Photo Film Co., Ltd.).

3.2.3 Medidas de produção de etileno e gás carbônico das flores de crisântemo

A produção de etileno (ETH) e de gás carbônico (CO₂) das inflorescências foi medida em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14B, equipado com uma coluna de Porapak Q de 2m de comprimento, 3mm de diâmetro e 80-100 mesh, e dois detectores, um TCD (Thermal Conductivity Detector), para detecção de gás carbônico e outro FID (Flame Ionization Detector), para detecção de etileno. As primeiras medidas foram iniciadas 6 horas após a irradiação, o que correspondeu ao tempo necessário de incubação das amostras para que uma quantidade suficiente de gás etileno pudesse ser detectada. As medidas subsequentes prosseguiram pelo tempo de vida útil em vaso das flores. Por dia eram incubadas, separadamente, 12 amostras (3 repetições por grupo), em recipientes de vidro âmbar de um litro (uma inflorescência por recipiente), em uma incubadora de baixa temperatura Eyela LTI-600SD (Tokyo Rikakikai Co. Ltd.), a 25°C, no escuro. Após 6 horas, 2ml de cada amostra foram injetados no cromatógrafo a intervalos de 15 minutos. Uma seringa Pressure Lock series "A" gas Dynatech PS (Precision Sampling Corporation), de 0-5ml foi utilizada para as amostragens dos gases. As seguintes condições de uso do cromatógrafo foram mantidas: temperatura de injeção, 80°C; temperatura do forno, 60°C;

gás carregador, hélio. Os cromatogramas foram obtidos em um computador e uma impressora Chromatopac C-R7A, Shimadzu, conectados ao cromatógrafo.

3.2.4 Medidas de impedância dos capítulos de crisântemos

As medidas de impedância foram realizadas nos capítulos dos crisântemos, logo após a retirada das flores, com a inserção de dois eletrodos, distanciados um centímetro um do outro. As medidas foram feitas em um Digital Spectral Analyzer TR 9403, Advantest, 3 horas, 12 horas, 1, 2, 3, 4, 7, 11, 15, 20 e 25 dias após a irradiação. Foram feitas duas repetições por grupo.

3.2.5 Medidas de condutividade dos capítulos e folhas de crisântemos

A liberação dos íons pelos capítulos e folhas foi medida com um Conductivity Meter Horiba ES-12. As amostras foram incubadas em água deionizada, a 25°C, para a obtenção da liberação em um período de uma hora. Para calcular a porcentagem de liberação, o total de íons foi obtido congelando-se as amostras a -80°C. Foram feitas duas repetições por grupo.

3.2.6 Processamento das flores de crisântemo para obtenção das frações microsomal e mitocondrial

3.2.6.1 Homogeneização das flores (Esquema 1)

A homogeneização das flores foi realizada segundo método descrito por Yoshida (1984), com algumas modificações. As flores foram separadas do capítulo e pesadas em uma balança Mettler PM4600, para medidas de peso fresco. Imediatamente, foram homogeneizadas em 40ml de solução de maceração ("grinding solution"). Como as flores soltas do capítulo oxidavam e definhavam rapidamente, foi necessário processar uma inflorescência, de cada vez, até a fase de filtração do homogeneizado em gaze, para evitar-se a degradação das flores. Esta fase levou uns sete minutos para cada inflorescência, o que correspondeu a aproximadamente uma hora para oito amostras (duas amostras por grupo). Este número de amostras foi estabelecido por que os rotores da centrífuga e da ultracentrífuga comportavam no máximo oito tubos de 40ml e 25ml, respectivamente. Isso limitou a repetição das amostras a duas por tratamento, pois repetir todo o processo, mais uma vez, seria impossível no mesmo dia.

As abreviações dos reagentes estão por extenso no Apêndice 1.

Y *Solução de maceração ("grinding solution"):*

Solução estoque, pH 7,6 (ajuste com 3M de KOH):

- 0,5mM de D-manitol;
- 75mM de MOPS-KOH;
- 5mM de EDTA ;
- 5mM de EGTA ;
- 10mM de KF.

Reagentes para serem adicionados à solução (estoque no momento da homogeneização das amostras):

- 2mM de PMSF, solução mantida a -20°C;
- 0,1% de BSA, reagente mantido a 4°C;
- 1,5% de PVP;
- 5mM de DTT, reagente mantido a 4°C;
- 10µg/ml de BHT, solução estoque de 100mg/ml, mantida a -20°C.

Todo o preparo do homogeneizado foi feito com luvas descartáveis, para evitar o contato dos reagentes tóxicos com a pele. A solução de maceração foi preparada com agitador magnético. Como o PMSF não se diluía completamente, a solução era agitada antes de ser adicionada às flores destacadas para serem homogeneizadas. Foi usado um ACE homogenizer, Nissei AM-8, com recipiente e hélice de aço inox, com compartimento apropriado para receber gelo picado, para manter a temperatura baixa. O processamento das amostras foi realizado ajustando-se a velocidade da hélice para >20.000rpm (capacidade máxima do aparelho), por 30 segundos, parando-se para soltar eventuais pedaços que não foram triturados, e homogeneizando-se por mais 30 segundos. O homogeneizado foi, então, filtrado em quatro camadas de gaze (15x15cm). A gaze foi torcida com as mãos e o líquido filtrado foi coletado em um béquer de 100ml, mantido em gelo picado.

3.2.6.2 *Obtenção das membranas microssomais e mitocôndrias (Esquema 1)*

O filtrado, correspondendo a aproximadamente 40ml, foi centrifugado em tubos de plástico, por 10min a 1.500 x g (3.000rpm), a 4°C, para retirarem-se algumas impurezas. O sobrenadante foi, então, centrifugado por 30min a 10.000 x g (11.000rpm), a 4°C, em uma centrífuga Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge, Hitachi 20PR-52-D, Hitachi Koki Co. Ltd., usando rotor RPR-20-2-997.

Vinte e cinco mililitros do sobrenadante foram ultracentrifugados, por uma hora, a 145.000 x g (45.000rpm), a 4°C, em ultracentrifuga Beckman Optima L-70 Ultracentrifuge, com rotor TY-70, capacidade para 8 tubos de 25ml. Duas horas antes, o rotor foi colocado na ultracentrifuga para atingir a temperatura de 4°C.

Enquanto o sobrenadante era ultracentrifugado, o precipitado ("pellet") contendo a fração mitocondrial, obtida na centrifugação com 11.000rpm, foi suspenso, para ser guardado. A parede do tubo da centrifuga foi enxugada cuidadosamente com lenço de papel, envolvido na ponta de uma pinça. Uma haste de cerâmica foi utilizada para espalhar o precipitado pela parede do tubo, facilitando a diluição da amostra. Meio mililitro de solução de suspensão ("suspending solution") foi adicionado para diluir o precipitado, utilizando-se um agitador de tubos Vortex. Este procedimento permitiu que o precipitado se soltasse completamente da parede do tubo, com facilidade, e fosse diluído. Mais 0,5ml de solução de suspensão foi utilizado, somando, no final, um mililitro de solução de mitocôndria, que foi distribuída em tubos Ependorf de 0,5ml armazenados a -80°C.

‡ *Solução de suspensão A ("suspending solution"):*

- 10mM de Mes-Tris (pH 7,3). O Tris é adicionado no final para acerto do pH;
- 0,25M de manitol;
- 1mM de EGTA;
- 20% de glicerol.

O precipitado, correspondente à fração das membranas microssomais (45.000rpm), foi suspenso na mesma solução acima citada para a fração mitocondrial, com adição de 1mM de DTT. O procedimento para obter um mililitro de solução de membrana microssomal foi o mesmo descrito para a fração mitocondrial, sendo que 100µl foram utilizados no mesmo dia para as medidas de microviscosidade. Um volume de 0,7ml também foi separado para a extração lipídica e armazenado a -80°C, juntamente com o restante das amostras.

3.2.6.3 Medidas de microviscosidade das membranas microssomais

Cem microlitros da solução microssomal (correspondente a 100-200µg de proteína/ml de solução) foram ressuspenso em 2,5ml de outra solução de suspensão B.

‡ *Solução de suspensão B:*

- 5mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,3;
- 0,6M de manitol;
- 1mM de EDTA.

As membranas foram marcadas com DPH, como sonda química fluorescente, conforme descrito por Borochoy e col. (1978).

‡ *Solução estoque de DPH:*

- 2mM de DPH, diluído em THF.

A solução estoque de DPH foi diluída na solução de suspensão B na proporção de 1:1000. Dois mililitros da solução contendo as membranas microsossomais foram adicionados a 2ml da solução contendo DPH, dando, portanto, uma proporção de 1:1. A concentração final de DPH foi de $1\mu\text{M}$ e a concentração final de membranas foi de 100-200 μg de proteína/ml. A incubação para a incorporação da sonda DPH nas membranas foi realizada em frascos de 15ml com tampa, durante 3 horas, à temperatura ambiente (22-25°C), utilizando-se agitadores magnéticos.

As medidas de microviscosidade foram efetuadas em um Fluorescence Polarization Spectrophotometer FS-501 A, Photal, Otsuka Eletronics Co. Ltd., acoplado a um Proportional Temperature Control NESLAB, Photal, Otsuka Eletronics Co. Ltd. e a um computador NEC, PC-9801 RX com impressora MC-920 Plotter, Photal. A temperatura das amostras foi mantida a $22,0\pm 0,1^\circ\text{C}$, sob constante agitação e sob as seguintes condições de uso do polarizador: tempo de entrada de luz ("gate time") - 3 segundos; número de medidas - 10 vezes; comprimento de onda para medida - 420nm; comprimento de onda para excitação - 365nm; abertura da fenda - 7nm.

3.2.7 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas das frações mitocondrial e microsossomal foram determinadas segundo método de Lowry e col., modificado por Peterson (1977).

3.2.7.1 Soluções

Υ Solução estoque

a. CTC:

- 0,1% de CuSO_4 .
- 0,2% de K-tartarato:
- 10% de Na_2CO_3 .

b. 10% de SDS.

c. 0,8N de NaOH.

d. Reagente de fenol Folin-Ciocalteu.

Υ Soluções de trabalho

- reagente A : CTC:NaOH:SDS:H₂O (1:1:1:1 vol.):

- 0,15% de DOC:

- 72% de TCA.

Υ Solução padrão de BSA

- 0,5mg/ml de BSA;
- 1mg/ml de azida sódica.

A solução de BSA foi dividida em pequenas alíquotas, em tubos Ependorf de 0,5ml, e guardada em freezer, a -80°C. A curva-padrão foi obtida com 0, 10, 20, 30 e 40µl da solução padrão.

3.2.7.2 Procedimento para o ensaio

Em tubos Ependorf de 2ml adicionou-se:

1) Amostra + H₂O : 1ml

- quantidade de solução de membrana microssomal - 3µl;
- quantidade de solução de membrana mitocondrial - 2µl.

2) DOC : 0,1ml

Mistura em Vortex e repouso por 10min.

3) TCA : 0,1ml

Mistura em Vortex:

Centrifugação a 3.000g (10.000rpm), por 15min:

Descarte do sobrenadante, limpando-se a borda do tubo com papel absorvente.

4) Adição de 0,6ml de H₂O ao precipitado, misturando-se em Vortex.

5) Adição de 0,6ml de reagente A, misturando-se em Vortex e deixando-se em repouso por 10min.

6) Adição de 0,3ml de reagente Folin-Ciocalteau phenol.

Mistura em Vortex e repouso por 30min.

7) Leitura da absorvância em espectrofotômetro, com DO=750nm.

3.2.8 Determinação da atividade específica de ATPase

As atividades das ATPases sensíveis ao vanadato e ao nitrato foram determinadas na fração microsomal e as atividades da ATPase sensível a azida e da citocromo-*c* oxidase foram determinadas na fração mitocondrial. As atividades foram medidas de acordo com método de Briskin e col. (1987).

3.2.8.1 ATPase sensível ao vanadato

A ATPase sensível ao vanadato é específica de membrana plasmática.

Υ Soluções

Υ *Mistura de ATP, pH 6,5:*

- 30mM de Tris-Mes, pH 6,5 (preparar só a solução 30mM de Mes, adicionar o Tris no final para ajustar o pH);

- 50mM de KCl;

- 3mM de MgSO₄;

- 3mM de ATP;

- 1mM de NaN₃;

- 0,1mM de MoO₄NH₄.

Armazenamento da mistura de ATP em alíquotas, a -20°C.

Υ *Solução estoque de vanadato:*

- 2mM de vanadato (temperatura ambiente).

Υ *Reagente de interrupção e coloração ("stopping & color reagent"):*

- 0,42% de molibdato de amônia, em 1N de H₂SO₄;

- 10% de ácido ascórbico;

- Molibdato de amônia:ácido ascórbico (6:1 vol.).

☆ *Procedimento para o ensaio:*

1) Mistura de ATP : 1ml;

2) Solução estoque de vanadato ou água: 50µl;

3) Enzima :5µl da solução de membrana microssomal (10-50µg de proteína)

Pipetagem da solução de enzima na parede do tubo e acionamento do cronômetro ao colocar-se o tubo no agitador Vortex (tempo zero). Imersão imediata do tubo em banho-maria, a 38°C. Os demais tubos seguiram o mesmo procedimento e foram imersos a intervalos de 30 segundos;

4) Incubação por 30min;

5) Reagente de interrupção e coloração: 2,6ml

Retirada dos tubos na sequência de entrada no banho-maria, a intervalos de 30 segundos, adicionando-se o reagente de interrupção e coloração, voltando-se à temperatura ambiente. Repouso por 30min;

6) Leitura da absorvância em espectrofotômetro, com DO=700nm, seguindo-se a ordem de saída dos tubos do banho-maria.

3.2.8.2 *ATPase sensível ao nitrato*

A ATPase sensível ao nitrato é específica para o tonoplasto.

Y *Mistura de ATP, pH 8,0:*

- 30mM de tris-mes, pH 8,0 (preparar só a solução 30mM de tris, adicionando-se o mes no final, para acertar o pH);

- 50mM de KCl ou 50mM de KNO₃;

- 3mM de ATP;

- 3mM de MgSO₄;

- 0,1mM de MoO₄NH₄.

Distribuição da mistura em aliquotas e armazenamento a -20°C.

☆ *Procedimento para o ensaio:*

1) Mistura de ATP: 1ml (um tubo com KCl e outro com KNO₃);

2) Enzima: 5µl da solução de membrana microssomal (10-50µg de proteína).

O restante do procedimento foi o mesmo empregado para a determinação da ATPase sensível ao vanadato.

3.2.8.3 *ATPase sensível a azida*

A ATPase sensível a azida é específica para membrana mitocondrial.

Y Mistura de ATP, pH 8,5;

-30mM de tris-mes. pH 8,5 (preparar só 30mM de tris. adição do mes no final para ajuste do pH);

- 50mM de KCl;

- 3mM de MgSO₄;

- 3mM de ATP;

- 0,1mM de MoO₄NH₄;

- 1mM de NaN₃ (preparo de uma mistura de ATP com NaN₃ e outra sem).

Distribuição da mistura em alíquotas e armazenamento a -20°C.

☆ Procedimento para o ensaio:

1) Mistura de ATP : 1ml (um tubo com NaN₃ e outro sem);

2) Enzima: 3µl da solução de membrana mitocondrial;

O restante do procedimento foi o mesmo efetuado para a ATPase sensível ao vanadato.

Uma solução de 0,5M de KH₂PO₄ foi preparada como padrão de fosfato inorgânico.

☆ Cálculo da atividade específica (AE) das enzimas (µmole/min./mg proteína):

$$AE = \frac{\frac{DO \text{ amostra}}{DO \text{ padrão}} \times 0,5mM}{\mu g \text{ (proteína)} \times 30min} \times 1000$$

3.2.9 Determinação da atividade específica da citocromo-c oxidase

Y Soluções estoque:

1) Tampão fosfato de potássio, 50mM, pH 7,5

- 50mM de KH₂PO₄ (monobásico);

- 50mM de K₂HPO₄ (dibásico);

2) 0,3% de digitonina (w/v), em tampão fosfato.

3) 0,45mM de citocromo-c, em tampão fosfato (distribuição, em alíquotas, em tubos Ependorf e armazenamento a -20°C.

☆ Procedimento para o ensaio:

O citocromo-c foi reduzido, adicionando-se hidrosulfito de sódio suficiente para ocorrer uma leve descoloração da solução, seguido de borbulhamento de ar, com uma pipeta Pasteur. A reação foi feita dentro da cubeta de 3ml do espectrofotômetro.

- 1) 0,3% de digitonin : 0,1ml;
- 2) 50mM de tampão fosfato : 2,8ml;
- 3) Enzima: 1µl da solução de membrana mitocondrial;
- 4) Manutenção a 25°C por 3min.. dentro do espectrofotômetro;
- 5) Citocromo-c: 0,1ml;
- 6) Leitura em DO=550nm. para obtenção da curva de oxidação.

A atividade específica foi determinada medindo-se o aumento da DO durante um período de, aproximadamente, 3min.

Cálculo da atividade específica (AE) da citocromo-c oxidase (µmole/min./mg proteína):

$$AE = \frac{\Delta DO}{18,5mM \times min. \times 3 \times 1.000} \text{ mg de proteína}$$

3.2.10 Extração lipídica das membranas microssomais

A extração lipídica foi realizada segundo método de Bligh-Dyer (1959), utilizando-se os 0,7ml de solução de membrana que tinham sido separados no processamento das membranas. Foram utilizados tubos de centrifuga Pyrex, de 50ml. com tampas de teflon. Todo o material utilizado foi de vidro, por causa dos reagentes.

☆ *Procedimento para o ensaio:*

- 1) 0,7ml de suspensão de membrana;
- 2) Adição de 5,3ml de água;
- 3) Adição de 22,5ml de CHCl₃/MeOH (1:2);
- 4) Agitação vigorosa e repouso por 20min;
- 5) Adição de 7,5ml de água;
- 6) Adição de 7,5ml de CHCl₃;
- 7) Agitação vigorosa e centrifugação a 1.000 x g (3.000rpm), por 15min;
- 8) Descarte do sobrenadante (MeOH), com uma pipeta Pasteur acoplada a uma bomba de água;
- 9) Transferência cuidadosa da camada de CHCl₃, com uma pipeta Pasteur, para outro tubo de centrifuga;
- 10) Adição de 12ml de MeOH/H₂O (10:9);
- 11) Mistura vigorosa e centrifugação a 1.000 x g, por 10min;
- 12) Descarte do sobrenadante, com uma pipeta Pasteur;

- 13) Transferência da camada de CHCl_3 para um frasco evaporador de 100ml;
- 14) Adição de 5-6 gotas MeOH;
- 15) Evaporação em evaporador rotatório. em banho-maria, a 40°C .
- 16) Dissolução com 5ml de CHCl_3 , mantendo-se o frasco evaporador em gelo picado e repouso até a solução se concentrar no fundo do frasco;
- 17) Armazenamento da solução em frascos de vidro com tampa de teflon, a -80°C .

Em um dia foi possível processarem-se 8 amostras, utilizando-se dois evaporadores rotatórios simultaneamente.

3.2.11 Determinação de fosfolipídeos

A concentração de fosfolipídeo da membrana microsomal foi determinada segundo método de Bartlett (1959). Meio mililitro da solução de lipídeo correspondeu a 1-5 μg de fósforo. Foram utilizados tubos de Pirex de 10ml, com tampas de teflon.

Υ Soluções estoque:

- 10N de H_2SO_4 ;
- 0,22% de MoO_4NH_4 ;
- Reagente Fiske-Subbarow:
 - 6g de NaHSO_3 dissolvidos em 40ml de água;
 - 0,1g de ácido sulfônico 4-amino-3-hidroxi-1-naftaleno;
 - 2,2g de Na_2SO_3 .

O reagente deve ser filtrado e armazenado em frasco âmbar.

- Padrão de fosfato: 0,439g de KH_2PO_4 diluído em 100ml de água, correspondendo a 1mg/ml de fósforo.

☆ Procedimento para o ensaio:

- 1) Secagem das amostras, com nitrogênio, em um TAH-1G dry thermo-unit, Taitec, Japan, a 40°C .
- 2) Adição de 0,5ml de 10N de H_2SO_4 . Os tubos foram fechados hermeticamente;
- 3) Incubação a 200°C por 3 horas;
- 4) Resfriamento;
- 5) Adição de 2 gotas de água oxigenada;
- 6) Incubação a 200°C por 1,5 horas;
- 7) Resfriamento ;
- 8) Adição de 4,6ml de MoO_4NH_4 ;
- 9) Adição de 0,2ml de reagente Fiske-Subbarow ;

- 10) Fervura dos tubos, em banho-maria, por 7min.;
- 11) Resfriamento;
- 12) Leitura da absorvância com DO de 830nm. A solução deve ficar azul.
- 13) Cálculo da concentração de fosfolípideo ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ proteína):

- Equação da reta para o padrão de fosfato

$$y = 4,9698x - 0,00406 \quad (y : \text{DO})$$

$$x = \text{DO} + 0,00406/4,9698 \quad (x : \mu\text{mole})$$

$$\frac{\text{DO} + 0,00406}{4,9698} \times \frac{1}{0,5\text{ml}} \times \frac{5\text{ml}}{0,7\text{ml}}$$

3.2.12 Determinação de esteróis

Y Preparo das amostras

A concentração de esterol da membrana microsomal foi determinada utilizando-se um F-kit Cholesterol (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany), contendo:

Solução 1 - tampão fosfato de amônio, pH 7,0,

- 2,6mol/l de metanol,

- aproximadamente 220.000U de catalase e estabilizantes;

Solução 2 - 0,05mol/l de acetilacetona,

- 0,3mol/l de metanol e estabilizantes;

Solução 3 - aproximadamente 12U de colesterol oxidase;

Solução-padrão de colesterol - 1mg/ml em isopropanol.

Foram utilizados 2ml da solução de lipídeos.

★ Procedimento para o ensaio:

- 1) Preparo da solução 4 - solução 1: solução 2 (3:2 vol.);
- 2) Repouso a 20-25°C, por uma hora;
- 3) Secagem dos 2ml das amostras com nitrogênio, a 40°C;
- 4) Adição de 0,2ml de isopropanol;
- 5) Adição de 2,5ml da solução 4;
- 6) Pipetagem da metade da mistura (1,35ml) em outro tubo de ensaio;
- 7) Adição de 10 μl de água em um dos tubos e de 10 μl da solução 3 (colesterol oxidase) no outro tubo. Os tubos foram tampados hermeticamente com parafilme e o conteúdo misturado cuidadosamente;
- 8) Incubação a 38°C durante uma hora;
- 9) Resfriamento até atingir-se a temperatura ambiente;

10) Leitura da absorvância com DO de 405nm. A solução deve ficar amarela.

Cem microlitros do padrão de colesterol foram diluídos em 100 μ l de isopropanol

3.2.13 Análise estatística

As análises das médias e desvios-padrão foram efetuadas pelo Microsoft Excel, versão 7.0, da Microsoft Inc., enquanto as análises de variância, testes de comparação múltipla de Tukey-Kramer e teste de Student foram realizados pelo ANOVA (One-way analysis of variance), pelo programa GraphPad Instat, versão 2.01, da GraphPpad Software Inc.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tolerância das flores à radiação gama

O aspecto visual foi considerado como parâmetro para classificar as flores como tolerantes ou não, dependendo da dose de radiação e da solução de manutenção empregadas. A tolerância das flores cortadas a radiação ionizante tem sido classificada como: tolerante - doses acima de 700Gy; moderadamente tolerante - doses até 500Gy e não tolerante - doses abaixo de 200Gy (FAO/IAEA RCM, 1998).

A família Compositae é a mais abundante das Angiospermae, compreendendo cerca de 19.000 espécies de plantas (Joly, 1976), distribuídas por todas as regiões do mundo. Isto justificaria a variação das respostas observadas neste trabalho, apresentadas na Tabela 2, em que crisântemos e gérberas foram pouco radio-tolerantes, mesmo a uma dose tão baixa quanto 50Gy no caso do crisântemo cultivar Dow talk, quando mantida só em água filtrada. *Callistephus* foi moderadamente tolerante e *Rhodante* e *Helichrysum* foram bastante tolerantes à radiação-gama. A radio-resistência destes dois últimos gêneros deve-se, provavelmente, ao fato de que essas plantas têm, naturalmente, um baixo conteúdo de água, sendo usadas frequentemente em arranjos de flores secas.

Em geral, a administração da solução de manutenção contendo sacarose, após a irradiação, minimizou os efeitos danosos da radiação-gama, como foi observado em *Calistephus*, com 800Gy e nos crisântemos (Tab. 2). Este foi um dos motivos para que o crisântemo fosse escolhido como material de pesquisa para as medidas bioquímicas e fisiológicas, além de ser uma das flores mais cultivadas e comercializadas nos mercados brasileiro e japonês, estando, ainda, disponível no mercado durante o ano todo. O *Dendranthema grandiflorum* é obtido com facilidade nas floriculturas japonesas e tem a vantagem de ser comercializado na forma de uma haste constituída por uma inflorescência, o que permite a seleção homogênea das amostras.

Tabela 2 . Tolerância a radiação gama de algumas flores da família Compositae

<i>Flor</i>	<i>Doses (taxa de dose)</i>	<i>Solução de manutenção</i>	<i>Doses danosas</i>
<i>Chrysanthemum</i> sp, Dow talk (amarelo)	0, 50, 200, 400 e 600Gy (576Gy/h)	água filtrada	≥ 50Gy
<i>Chrysanthemum</i> sp, Olho-de-gato	0, 300 e 1000Gy (545Gy/h)	solução de "pulsing" com 3,5% de sacarose	≥ 300Gy
<i>Chrysanthemum</i> sp, Olho-de-gato	0 e 900Gy (499Gy/h)	0,1% de sulfato de alumínio com 1% de sacarose;	tolerante
		0,01% de sulfato de hidroxiquinolina com 1% de sacarose	tolerante
<i>Chrysanthemum</i> sp, mini-crisântemo branco	0 e 300Gy (510Gy/h)	0,1% de sulfato de alumínio com 1% de sacarose	tolerante
<i>Chrysanthemum</i> sp, mini-crisântemo amarelo	0 e 900Gy (493Gy/h)	0,1% de sulfato de alumínio com 1% de sacarose;	900Gy
		0,01% de sulfato de hidroxiquinolina com 1% de sacarose	900Gy
<i>Chrysanthemum</i> sp, mini-crisântemo Pinochio (branco)	0 e 900Gy (493Gy/h)	Chrysal	tolerante
<i>Rhodante manglesii</i> Lindl	0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (338Gy/h)	0,02% de sulfato de hidroxiquinolina	tolerante
<i>Helichrysum bracteatum</i> Andr.	0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (205Gy/h)	0,02% de sulfato de hidroxiquinolina	tolerante
<i>Callistephus chinensis</i>	0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (234Gy/h)	0,02% de sulfato de hidroxiquinolina;	>400Gy
		0,02% de sulfato de hidroxiquinolina com 2% de sacarose	>800Gy
<i>Gerbera</i> sp	0, 200, 400, 600, 800 e 1000Gy (208Gy/h)	0,02% de sulfato de hidroxiquinolina	≥ 200Gy

4.2 Produção de etileno e gás carbônico das inflorescências de crisântemo

A produção de etileno (ETH) e de gás carbônico (CO_2) das inflorescências irradiadas (I e IS) foi estimulada 6 horas após a irradiação com 750Gy, mas, declinou para os valores próximos aos do controle um dia após o tratamento (Fig. 3 e 4).

A Figura 3 apresenta a produção de gás carbônico das inflorescências de crisântemo, após a irradiação. Um dia após o tratamento os níveis de CO_2 das flores irradiadas (I e IS) retornaram aos valores próximos aos das respectivas amostras não-irradiadas (C e CS). Como o açúcar é uma fonte energética, a respiração se manteve mais elevada enquanto houve a administração exógena de sacarose (CS e IS).

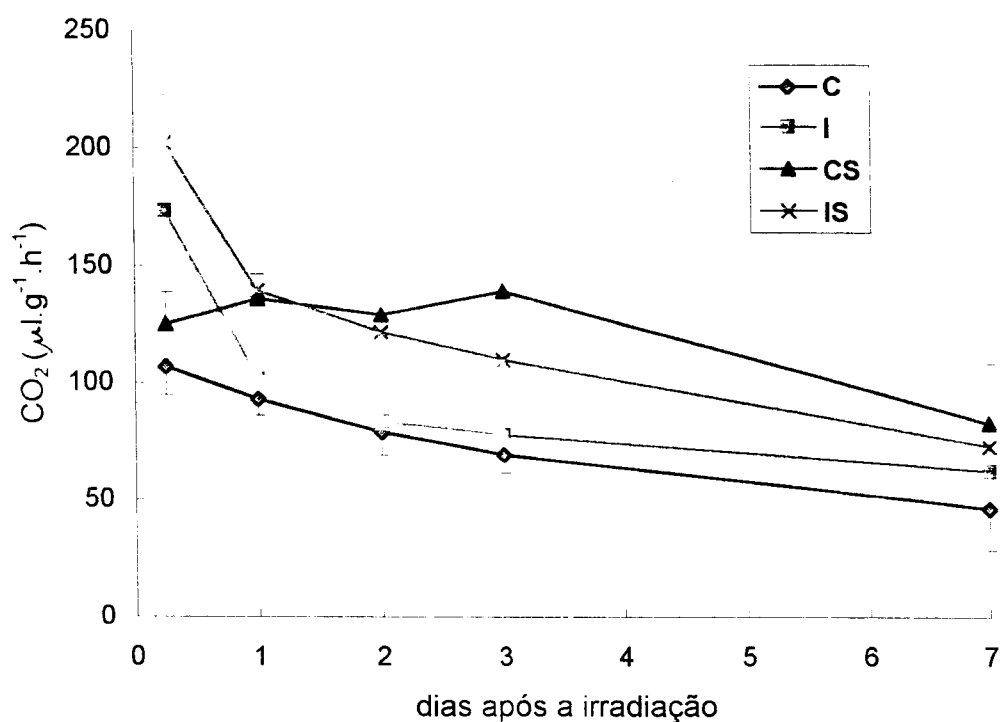


Figura 3. Produção de gás carbônico de inflorescências de crisântemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I - irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose. Análise estatística: Apêndice 2.

A Figura 4 apresenta a produção de etileno das mesmas amostras de crisântemo utilizadas acima para medir a taxa respiratória. Novamente, a produção de ETH das inflorescências irradiadas (I e IS) foi estimulada no início, mas, retornou aos níveis das flores não-irradiadas (C e CS) um dia após o tratamento.

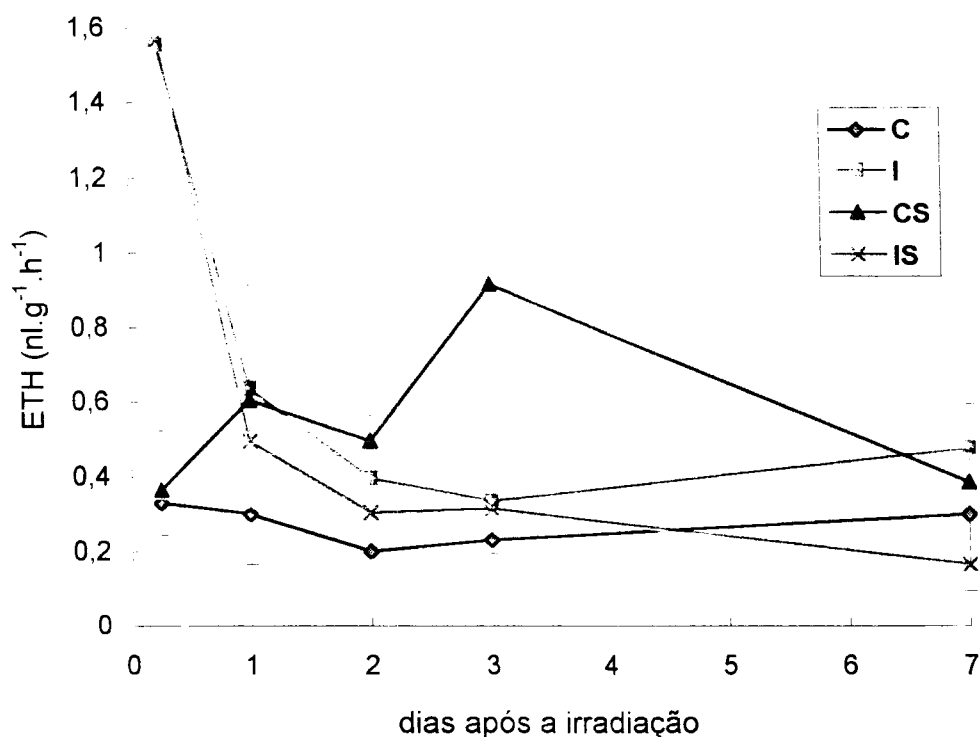


Figura 4. Produção de etileno de inflorescências de crisântemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I - irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose. Análise estatística: Apêndice 3.

O estímulo na produção de ambos os gases também foi observado em outras plantas irradiadas (Levitt, 1980). Entretanto, alguns pesquisadores obtiveram uma inibição na produção de ETH e de CO₂ em maçã (Jiao, 1989) e inibição da produção de etileno em cravo (Tanabe e col., 1994), irradiados. Segundo Jiao (1989), a radiação inibiu a atividade da enzima formadora do hormônio etileno e houve uma diminuição dos precursores ACC e MACC. Junto com a diminuição da taxa respiratória, este seria um dos motivos para o maior tempo de prateleira observado nas frutas irradiadas.

O aumento nas taxas de produção de gás carbônico e etileno foi, provavelmente, resposta imediata ao estresse provocado pela radiação e uma tentativa da planta de reagir e se proteger. Rigney e Wills (1985) também observaram que houve um aumento na produção de etileno em maçãs e uvas logo após a irradiação com doses baixas de radiação-gama, entre 75 e 450Gy, e que nas uvas a produção voltou a diminuir dois dias após o tratamento, como observamos nos crisântemos irradiados, um dia após a irradiação. Por outro lado, as maçãs irradiadas apresentaram quase sempre uma taxa de produção mais elevada com doses mais altas do que 225Gy, que persistiu por vários dias (Rigney e Wills, 1985). Dos dados obtidos por nós e por outros pesquisadores, até agora, não foi possível

estabelecer que tipo de plantas responderiam com estímulo ou inibição da produção de etileno diante do estresse provocado pelas radiações, nem determinar que mecanismos estariam envolvidos.

4.3 Impedância dos capítulos de crisântemo

A impedância dos capítulos das inflorescências irradiadas (I e IS) aumentou logo após a irradiação, permanecendo elevada durante 11 dias (Figura 5). O controle (C) e a amostra suprida com sacarose (CS) apresentaram um aumento menor na impedância.

A medida de impedância é bastante sensível para se detectarem os efeitos logo após a irradiação e é um método relativamente simples, que não requer o processamento das amostras.

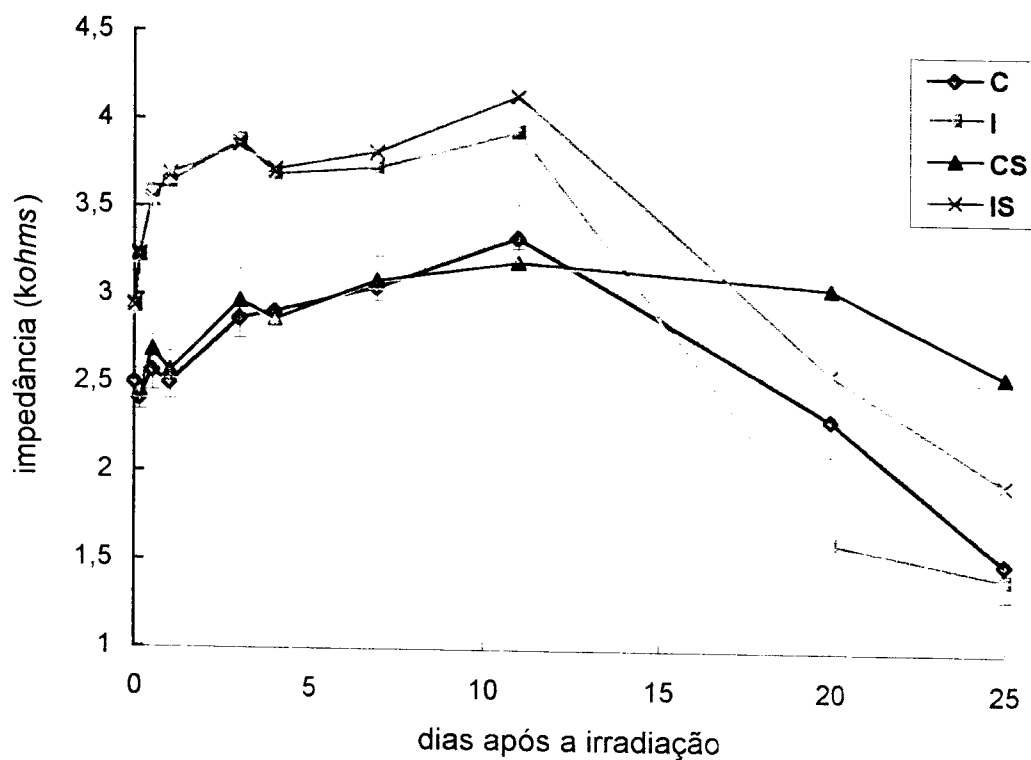


Figura 5. Impedância dos capítulos de crisântemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I - irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose. Análise estatística: Apêndice 4.

4.4 Condutividade dos capítulos e das folhas de crisântemo

A liberação de íons pelos capítulos e folhas de crisântemo aumentou significativamente nas amostras controle (C) e irradiada (I), por volta de duas semanas após o tratamento (Fig. 6 e 7). A sacarose impediu a senescência dos capítulos e folhas irradiados (IS), o que pode ser verificado pela liberação baixa de íons durante o tempo de vida em vaso das inflorescências CS e IS.

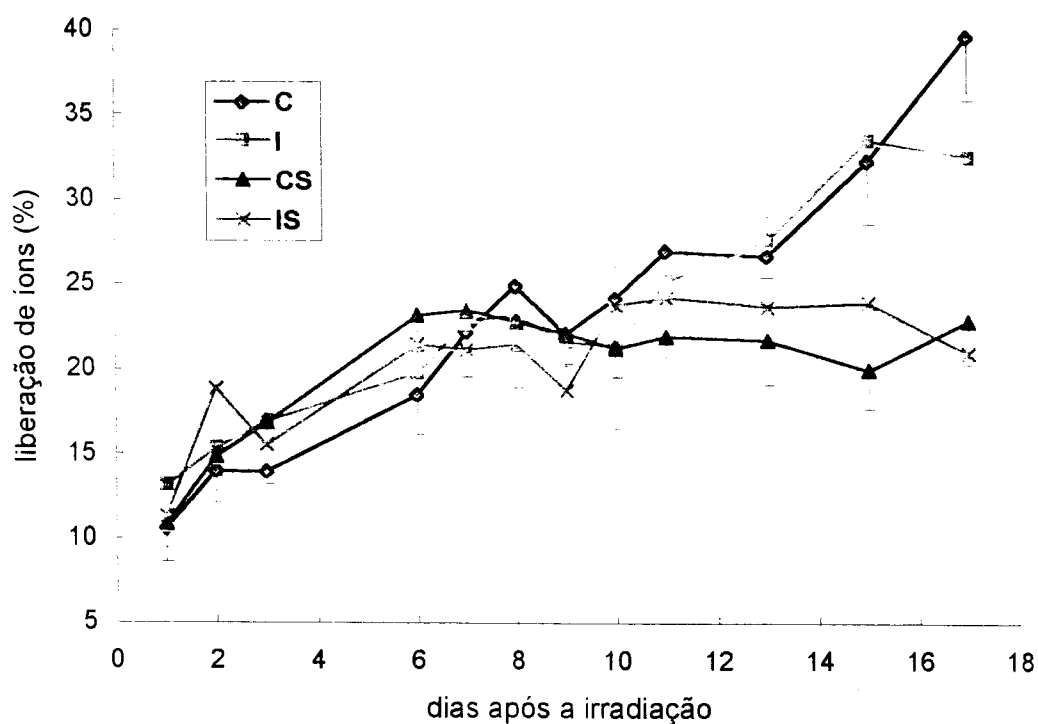


Figura 6. Condutividade de capítulos de crisântemo, *Dendranhema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I - irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose. Análise estatística: Apêndice 5.

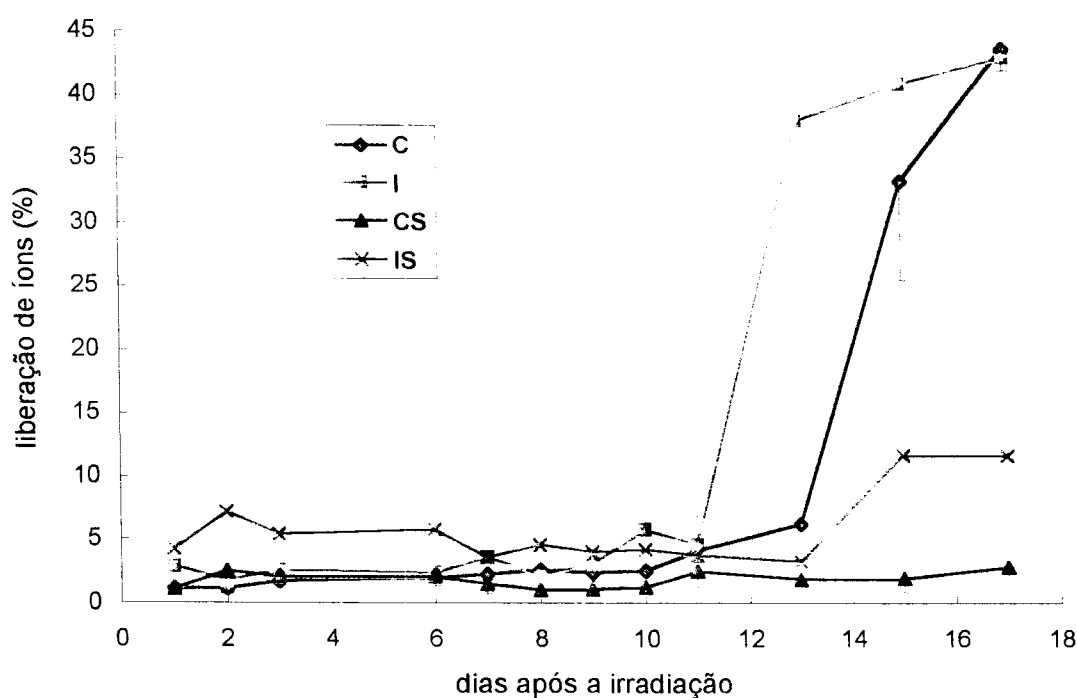


Figura 7. Condutividade de folhas de crisântemo, *Dendranhema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose. Análise estatística: Apêndice 6.

A liberação de íons decorrente da perda da semi-permeabilidade das membranas também foi observada em estudos realizados com flores de cravo (Trippi e col., 1988; Paulin e col., 1986), folhas de aveia (De Luca d'Oro e Trippi, 1987) e folhas de milho (Pastori e Trippi, 1993).

Este tipo de medida, apesar de ser simples, necessita de muitas repetições, pois a variação das médias é bastante grande. O método não se mostra muito promissor, pois a liberação de íons se torna bem evidente só quando a planta se encontra no estado visual de definhamento.

4.5 Fluidez das membranas microssomais das flores de crisântemo

A fluidez das membranas microssomais diminuiu gradativamente em todas as amostras no decorrer do tempo (Fig. 8). Entretanto, houve uma queda mais acentuada na amostra irradiada (I), a partir do segundo dia, enquanto que as amostras irradiadas e supridas com sacarose (IS) e controle (C) apresentaram valores semelhantes por quase todo o período de observação. Somente no segundo dia as flores IS tiveram uma maior queda na fluidez, em relação ao controle (C). As flores mantidas com sacarose, sem serem irradiadas (CS), apresentaram valores mais altos de fluidez por todo o período. A sacarose foi efetiva

em proteger as membranas e impedir a aceleração da senescência causada pela radiação-gama.

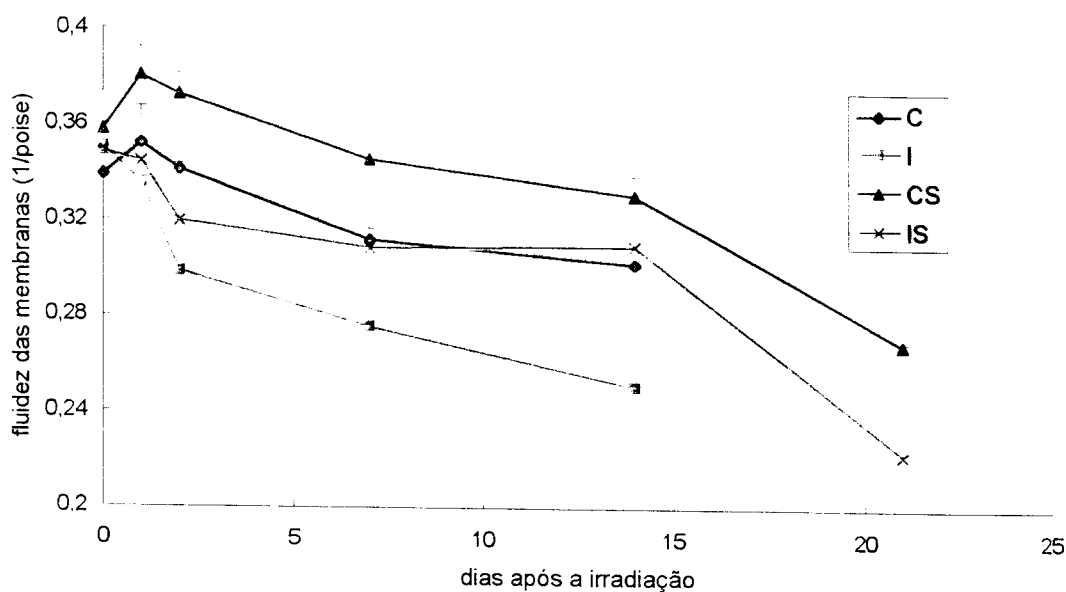
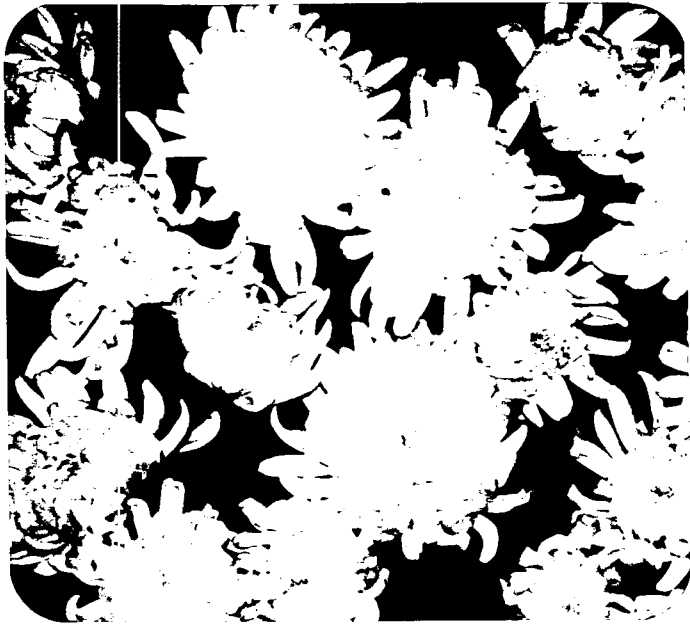


Figura 8. Fluidez das membranas microsossomais de flores de crisântemo, *Dendranhema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose. Análise estatística: Apêndice 7.

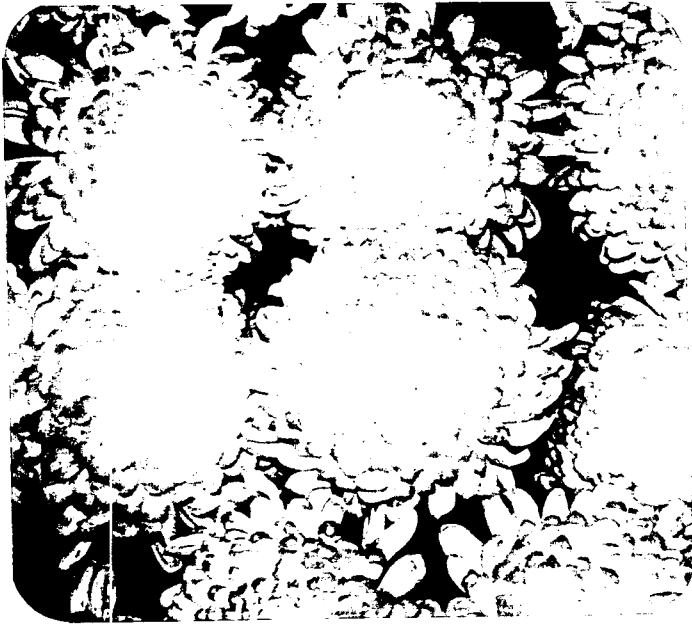
Borochoy e col. (1976) observaram que pétalas de rosa tiveram um aumento na microviscosidade das membranas durante o envelhecimento e Goszczynska e col. (1990) constataram que um suprimento exógeno de açúcar foi capaz de retardar o processo degenerativo, modificando o "turnover" de lipídeos. Nossos resultados confirmaram a eficácia da sacarose para preservar a integridade das membranas das flores irradiadas. O aspecto visual das inflorescências C e IS não se alterou, apresentando desenvolvimento normal (Fig. 9). As inflorescências CS que foram mantidas com sacarose, sem serem irradiadas, desenvolveram-se rápida e vigorosamente (Fig.9), mais do que o controle C, mantendo-se viáveis por uma semana a mais que as amostras controle (Tabela 3). A radiação bloqueou o desenvolvimento das inflorescências, que apresentaram sinais de amarelecimento e definhamento das folhas por volta de uma semana após a irradiação. Entretanto, mesmo essas inflorescências cujo desenvolvimento foi inibido ainda mantiveram uma aparente viabilidade das flores, durando até 15 dias.



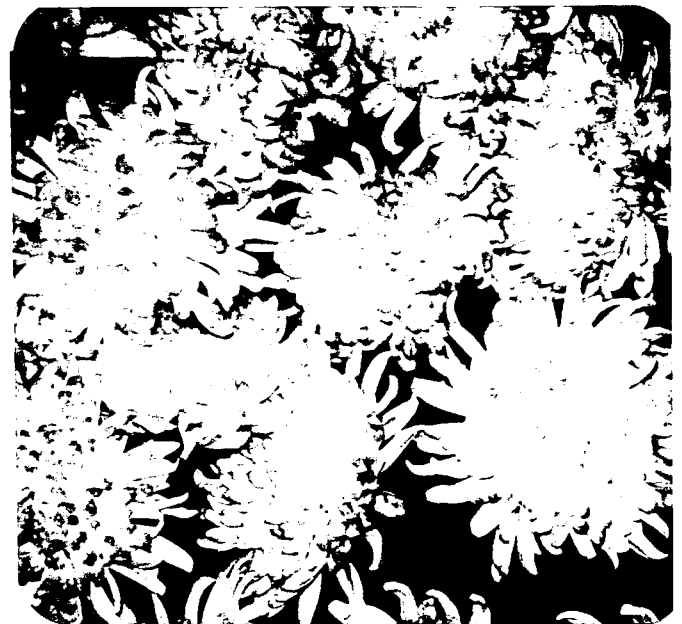
C



I



CS



IS

Figura 9. Inflorescências de *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, 15 dias após a irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C – controle, não irradiado; I – irradiado; CS – não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS – irradiado, suprido com 2% de sacarose.

Tabela 3. Tempo de vida útil em vaso das inflorescências de crisântemos, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/hora).

Amostra	dias após a irradiação*
controle, C	21
irradiado, I	15
suprido com sacarose, CS	28
irradiado e suprido com sacarose, IS	21

* duração das flores em que mais de 50% das inflorescências perderam a viabilidade, apresentando sinais de definhamento.

Segundo Shinitzky (1984), a taxa de proliferação celular seria inversamente proporcional à microviscosidade das membranas biológicas, o que pode ter ocorrido no caso dos crisântemos supridos com sacarose, uma vez que o capítulo, ao ser irradiado, era constituído por flores em estado jovem (a inflorescência poderia ser considerada em estado de “botão”) que foram se desenvolvendo no decorrer do experimento.

4.6 Taxa de esterol:fosfolípideo das membranas microsossomais de flores de crisântemo

A irradiação e o suprimento de sacarose não causaram modificações significativas nos níveis dos lípideos das membranas microsossomais.

A diminuição inicial da fluidez, no segundo dia, nas amostras irradiadas (I e IS) foi acompanhada pelo aumento da taxa de esterol:fosfolípideo (Tab. 4), que foi atribuído à concentração elevada de esterol (Tab. 5). Entretanto, as quantidades de esterol e fosfolípideo continuaram a aumentar em todas as amostras durante quase todo o período de duração dos experimentos (Tab. 5 e 6). A concentração de fosfolípideo diminuiu nas amostras controle (C) e irradiada (I), 14 dias após a irradiação, o que correspondeu a 2 dias antes do definhamento das flores.

Foi observado que o processo de senescência estava relacionado ao aumento da taxa de esterol:fosfolípideo, pela diminuição de fosfolípideo, em membranas celulares de flores de couve-flor (Voisine e col., 1991, 1993), pétalas de rosa (Borochoy e col., 1978, 1990) e pétalas de cravo (Drory e col., 1992). Entretanto, Marangoni e col. (1996) citaram exemplos de plantas que apresentaram um aumento no conteúdo de esterol durante a senescência e Lester e Whitaker (1996) também obtiveram um aumento de esterol após a irradiação em frutas de melão. Hayashi e col. (1992) verificaram que tubérculos de batata,

irradiados com 1kGy, apresentavam um aumento gradual no conteúdo de fosfolípido, nas primeiras semanas de armazenamento. Posteriormente, Todoriki e col. (1994a) observaram que os ácidos graxos dos fosfolípidos se distribuíam em diferentes concentrações dentro do tubérculo irradiado, mas, após 28 dias de armazenamento, ocorria um aumento generalizado.

Em nosso trabalho, o aumento na quantidade de fosfolípido, mesmo nos crisântemos irradiados, deve estar relacionado com o desenvolvimento da inflorescência. As flores irradiadas devem ter acionado algum mecanismo de defesa que manteve as inflorescências no estado jovem, mas, que não foi suficiente para superar e romper o bloqueio causado pela dose de 750Gy. Segundo Sato e col.(1995), tonoplastos irradiados “in vitro” foram mais radiosensíveis do que quando irradiados “in vivo”, sugerindo que as células possuíam algum mecanismo protetor.

O conceito de que a fluidez das membranas lipídicas sofre alterações durante a vida da planta, podendo ser prejudicada por fatores ambientais tais como temperatura, stress hídrico e radiação (Levitt, 1980), parece ser uma regra geral. Mas, a idéia de que a deterioração e rigidez das membranas, causadas pela radiação ionizante, possam ser devidas ao decréscimo do conteúdo de fosfolípido, por causa da peroxidação lipídica (Stark, 1991), não pode ser aplicada a todas as plantas. Edwards e col. (1984) sugeriram que a peroxidação lipídica não estaria envolvida nos danos induzidos pela radiação, em nível celular.

Tabela 4. Taxa de esterol/fosfolípido das membranas microssomais (mol/mol)

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,189 ± 0,047	0,157 ± 0,037	0,220 ± 0,049	0,155 ± 0,003	n.s.
1	0,260 ± 0,001	0,356 ± 0,069	0,226 ± 0,040	0,349 ± 0,007	n.s.
2	0,303 ± 0,010	0,371 ± 0,045	0,239 ± 0,000	0,333 ± 0,044	n.s.
7	0,377 ± 0,048	0,423 ± 0,018	0,453 ± 0,069	0,380 ± 0,008	n.s.
14	0,552 ± 0,040	0,481 ± 0,031	0,468 ± 0,026	0,475 ± 0,010	n.s.
21	-	-	0,472 ± 0,035	0,492 ± 0,067	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo.

Tabela 5. Conteúdo de esterol das membranas microsossomais ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,039 \pm 0,013	0,025 \pm 0,001	0,034 \pm 0,002	0,027 \pm 0,001	n.s.
1	0,036 \pm 0,007 ^a	0,052 \pm 0,002 ^{a,b}	0,040 \pm 0,003 ^a	0,057 \pm 0,002 ^b	*
2	0,052 \pm 0,000 ^a	0,074 \pm 0,004 ^b	0,053 \pm 0,000 ^a	0,065 \pm 0,000 ^c	*
7	0,088 \pm 0,001	0,104 \pm 0,013	0,104 \pm 0,000	0,089 \pm 0,013	n.s.
14	0,108 \pm 0,014	0,104 \pm 0,012	0,122 \pm 0,006	0,131 \pm 0,008	n.s.
21	-	-	0,140 \pm 0,016	0,139 \pm 0,021	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média \pm desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; * p <0,05; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer(p <0,05).

Tabela 6. Conteúdo de fosfolípideo das membranas microsossomais ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,205 \pm 0,015	0,166 \pm 0,049	0,157 \pm 0,025	0,175 \pm 0,004	n.s.
1	0,139 \pm 0,025	0,148 \pm 0,022	0,180 \pm 0,018	0,161 \pm 0,010	n.s.
2	0,173 \pm 0,006	0,201 \pm 0,013	0,219 \pm 0,000	0,199 \pm 0,026	n.s.
7	0,234 \pm 0,028	0,244 \pm 0,022	0,233 \pm 0,035	0,233 \pm 0,030	n.s.
14	0,195 \pm 0,011 ^a	0,215 \pm 0,011 ^{a,b}	0,262 \pm 0,025 ^b	0,275 \pm 0,013 ^b	*
21	-	-	0,296 \pm 0,013	0,282 \pm 0,004	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média \pm desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; * p <0,05; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p <0,05).

4.7 Peso fresco e concentração de proteínas microsossomais e mitocondriais de flores de crisântemo

O peso fresco das flores supridas com sacarose (CS) aumentou notavelmente e as flores IS também continuaram a se desenvolver tão bem quanto o controle, apesar de irradiadas (Tab. 7). A dose de 750Gy inibiu severamente o desenvolvimento das flores I, que estacionaram no estado de inflorescência jovem, mas, os sintomas visíveis de definhamento só apareceram após uma semana. A figura 9 apresenta as inflorescências no 15º dia após a irradiação, quando as amostras supridas com sacarose (CS) estavam no auge do desenvolvimento. O açúcar também foi responsável pelo aumento do balanço de água e do potencial osmótico das flores (Halevy e Mayak, 1981), como foi constatado pelo peso fresco (Tab. 7).

Tabela 7. Peso fresco (g) de flores de crisântemo por inflorescência

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	7,42 ± 0,44	8,27 ± 2,07	7,27 ± 0,16	7,79 ± 0,43	n.s.
1	8,33 ± 0,86	7,43 ± 0,88	9,78 ± 1,22	8,87 ± 1,25	n.s.
2	7,97 ± 0,85	8,95 ± 2,31	9,19 ± 0,01	10,98 ± 3,56	n.s.
7	10,89 ± 0,89 ^a	8,16 ± 0,01 ^a	21,44 ± 4,55 ^b	11,65 ± 1,27 ^a	*
14	11,74 ± 3,44 ^a	7,62 ± 1,88 ^a	22,13 ± 1,66 ^b	15,35 ± 0,76 ^a	n.s.
21	-	-	21,56 ± 4,30	16,51 ± 3,59	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; *p<0,05; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

As concentrações de proteínas das membranas microssomais e mitocondriais não foram afetadas pela dose de 750Gy (Tab. 8 e 9). Diminuição de proteínas em membranas de mitocôndria foi observada por Pai e Gaur (1983), em hipocótilo de feijão irradiado com 2,5 e 5,0kGy, que foram doses bem mais altas do que a utilizada no nosso trabalho. O aumento no peso fresco pode ser atribuído, então, à maior absorção de água provocada pela sacarose.

Tabela 8. Conteúdo de proteína da membrana microssomal por peso fresco das flores (mg/g)

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,874 ± 0,062	0,926 ± 0,023	0,950 ± 0,018	0,887 ± 0,012	n.s.
1	0,977 ± 0,083	0,939 ± 0,063	0,937 ± 0,089	0,862 ± 0,014	n.s.
2	0,730 ± 0,074	0,692 ± 0,123	0,762 ± 0,030	0,646 ± 0,190	n.s.
7	0,705 ± 0,007	0,711 ± 0,018	0,800 ± 0,028	0,720 ± 0,099	n.s.
14	0,700 ± 0,014	0,716 ± 0,066	0,670 ± 0,028	0,660 ± 0,028	n.s.
21	-	-	0,650 ± 0,000	0,645 ± 0,078	n.s.

C: controle; I: irradiado; S: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo.

Tabela 9. Conteúdo de proteína da membrana mitocondrial por peso fresco das flores (mg/g)

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	2,074 ± 0,049	1,998 ± 0,107	2,134 ± 0,048	1,965 ± 0,454	n.s.
1	1,884 ± 0,083	2,035 ± 0,074	1,828 ± 0,032	2,259 ± 0,757	n.s.
2	1,644 ± 0,015	1,607 ± 0,123	1,546 ± 0,049	1,494 ± 0,062	n.s.
7	1,650 ± 0,000	1,704 ± 0,021	1,660 ± 0,042	1,530 ± 0,014	n.s.
14	1,415 ± 0,021	1,475 ± 0,016	1,220 ± 0,170	1,370 ± 0,028	n.s.
21	-	-	1,300 ± 0,028	1,270 ± 0,035	n.s.

C: controle; I: irradiado; S: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo.

4.8 Atividades das enzimas microsossomais e mitocondriais das flores de crisântemo

As atividades das ATPases e da citocromo-*c* oxidase não sofreram alterações significativas por causa da irradiação com 750Gy (Tab. 10, 11, 12 e 13). A atividade da ATPase sensível ao vanadato (Tab. 10) diferiu somente no 14º dia, com aumento significativo na amostra IS. As atividades da ATPase e da citocromo-*c* oxidase da mitocôndria diminuíram no 14º dia, nas amostras C e I, indicando que as flores estavam entrando em processo de definhamento, o que de fato começou a ocorrer 2 dias depois. A diminuição da atividade da citocromo-*c* oxidase foi observada, também, em pétalas velhas de cravo (Adam e col., 1983; Beja-Tal e Borochoy, 1994).

Tabela 10. Atividade específica da ATPase sensível ao vanadato (µmole/min./mg de proteína) - membrana plasmática

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,074 ± 0,016	0,052 ± 0,010	0,064 ± 0,008	0,078 ± 0,011	n.s.
1	0,067 ± 0,009	0,078 ± 0,006	0,071 ± 0,004	0,077 ± 0,001	n.s.
2	0,077 ± 0,006	0,083 ± 0,002	0,076 ± 0,002	0,081 ± 0,000	n.s.
7	0,098 ± 0,006	0,119 ± 0,004	0,109 ± 0,015	0,126 ± 0,006	n.s.
14	0,104 ± 0,008 ^a	0,101 ± 0,002 ^a	0,132 ± 0,014 ^{a,b}	0,166 ± 0,010 ^b	**
21	-	-	0,163 ± 0,040	0,198 ± 0,002	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; **p<0,01; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Tabela 11. Atividade específica da ATPase sensível ao nitrato ($\mu\text{mole}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína) - tonoplasto

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,026 \pm 0,006	0,022 \pm 0,011	0,023 \pm 0,009	0,025 \pm 0,000	n.s.
1	0,022 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,029 \pm 0,006	0,023 \pm 0,003	n.s.
2	0,027 \pm 0,007	0,021 \pm 0,003	0,032 \pm 0,000	0,028 \pm 0,004	n.s.
7	0,032 \pm 0,001	0,032 \pm 0,004	0,035 \pm 0,002	0,037 \pm 0,013	n.s.
14	0,029 \pm 0,004	0,038 \pm 0,003	0,036 \pm 0,007	0,046 \pm 0,001	n.s.
21	-	-	0,034 \pm 0,002 ^a	0,063 \pm 0,007 ^b	*

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média \pm desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; * $p < 0,05$; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Tabela 12. Atividade específica da ATPase sensível a azida ($\mu\text{mole}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína) - membrana da mitocôndria

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,208 \pm 0,016	0,233 \pm 0,007	0,203 \pm 0,011	0,202 \pm 0,035	n.s.
1	0,223 \pm 0,016	0,203 \pm 0,022	0,223 \pm 0,008	0,187 \pm 0,007	n.s.
2	0,227 \pm 0,007	0,217 \pm 0,031	0,266 \pm 0,008	0,248 \pm 0,008	n.s.
7	0,247 \pm 0,002	0,252 \pm 0,023	0,284 \pm 0,003	0,264 \pm 0,001	n.s.
14	0,205 \pm 0,011 ^a	0,204 \pm 0,014 ^a	0,312 \pm 0,011 ^b	0,266 \pm 0,004 ^c	**
21	-	-	0,347 \pm 0,005	0,347 \pm 0,032	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média \pm desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; ** $p < 0,01$; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Tabela 13. Atividade específica da citocromo-c oxidase ($\mu\text{mole}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína) - mitocôndria

dias	C	I	CS	IS	A.V.
0	0,255 \pm 0,020	0,282 \pm 0,023	0,253 \pm 0,009	0,287 \pm 0,061	n.s.
1	0,319 \pm 0,033	0,319 \pm 0,009	0,304 \pm 0,012	0,280 \pm 0,062	n.s.
2	0,355 \pm 0,036	0,312 \pm 0,014	0,353 \pm 0,035	0,352 \pm 0,035	n.s.
7	0,340 \pm 0,030	0,332 \pm 0,033	0,352 \pm 0,035	0,453 \pm 0,051	n.s.
14	0,279 \pm 0,012 ^a	0,255 \pm 0,040 ^a	0,436 \pm 0,001 ^b	0,396 \pm 0,027 ^b	**
21	-	-	0,385 \pm 0,016 ^a	0,481 \pm 0,027 ^b	*

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média \pm desvio-padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Todoriki e col. (1994b), irradiando tonoplastos de tubérculos de batata "in vitro" e "in vivo", obtiveram uma diminuição da atividade da H^+ -ATPase e um aumento na formação de ácidos graxos livres, com doses de 0,1, 0,5 e 1,0kGy. Esses pesquisadores elucidaram que a inativação da H^+ -ATPase aumentava em decorrência da deterioração causada pela radiação nos lipídeos das membranas. Por outro lado, Lester e Whitaker (1996) demonstraram que 1kGy de radiação gama retardou a senescência de frutas de melão armazenadas durante 10 dias. A perda de proteínas e o catabolismo dos fosfolipídeos das membranas plasmáticas diminuíram com a irradiação e a atividade da H^+ -ATPase foi mantida nas frutas irradiadas, mostrando que a irradiação foi um tratamento eficaz para preservar as frutas por mais tempo.

Nossos resultados indicaram que, com a dose de 750Gy, as enzimas da membrana plasmática, do tonoplasto e da mitocôndria de flores irradiadas não foram inibidas pela radiação, bem como o metabolismo de fosfolipídeo e esterol.

4.9 Resumo dos resultados

<i>Parâmetros</i>				
<i>medidos</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>
CO ₂	↓	↑↓, ≈ controle	→↓, >> controle	↑↓, >> controle
ETH	→	↑↓, > controle	↑, > controle	↑↓, ≈ controle
Fluidez	↓	↓, << controle	↑↓, >> controle	↓, ≈ controle
Desenv. infloresc.	↑	inibição	↑, >> controle	↑, ≈ controle
ST/FL	↑	↑, > controle*	↑, ≈ controle	↑, > controle*
Esterol (ST)	↑	↑, > controle*	↑, ≈ controle	↑, > controle
Fosfolípideo (FL)	↑	↑, ≈ controle	↑, > controle	↑, > controle
peso fresco-flores	↑*	sem alteração	↑, >> controle	↑, > controle*
Proteínas-microsomo	↓	↓, ≈ controle	↓, ≈ controle	↓, ≈ controle
Proteínas-mitocôndria	↓	↓, ≈ controle	↓, ≈ controle	↓, ≈ controle
ATPase-memb.plasm.*	↑	↑, ≈ controle	↑, > controle	↑, > controle
ATPase-tonoplasto*	→ →	≈ controle	↑, > controle	↑, > controle
ATPase-mitocôndria*	↑	↑, ≈ controle	↑, > controle	↑, > controle
Impedância-capítulo	↑↓	↑, ≈ controle	↑, >> controle, ↓	↑, >> controle, ↓
Condutivid.-capítulo*	↑	↑, ≈ controle	↑, < controle	↑, < controle
Condutivid.-folha*	→↑	→↑, > controle	→ →	→↑, < controle

*diferença não significativa; *significativo só no final.

5 CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho, nas condições experimentais realizadas, foram as seguintes:

A tolerância a radiação gama das flores de corte da família Compositae varia entre espécies, sendo necessário um estudo de cada espécie para classificá-las de acordo com a sua radiosensibilidade. As espécies com pouca quantidade de água, como *Rhodante manglesii* Lindl e *Helichrysum bracteatum* Andr., utilizadas como flores secas, são mais radio-tolerantes, sendo, portanto, as mais adequadas para serem submetidas a tratamento quarentenário pela radiação-gama;

As medidas de impedância do capítulo e de fluidez das membranas das flores de crisântemo são métodos eficientes e bastante precisos para indicar que a radiação-gama causou modificações não detectáveis macroscopicamente, logo após a irradiação.

A manutenção das inflorescências de crisântemo em solução contendo 2% de sacarose, após o tratamento com radiação-gama para fins de desinfestação, é um método eficiente para que flores irradiadas durem tanto quanto flores não irradiadas.

A solução de manutenção contendo sacarose é capaz de evitar os danos das radiações no que tange à membrana microssomal, fornecendo energia para que as flores continuem se desenvolvendo e prolongando o tempo de vida em vaso das inflorescências irradiadas.

A dose de 750Gy não altera significativa ou negativamente os conteúdos de proteínas das membranas microssomais e das mitocôndrias, assim como as atividades enzimáticas e os níveis de lipídeos, o que deve permitir que ocorra a captação de sacarose exógena, que, por sua vez, vai contribuir para o aumento do substrato respiratório, que deve atuar na proteção das flores contra a radiação ionizante.

Apêndice 1
Reagentes utilizados

- **Ampicillin:** (D[-]-&-aminobenzylpenicillin) sodium salt. $C_{16}H_{18}N_3O_4SNa$. PM=371,4 (Sigma Chemical Co.)
- **BHT:** 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene). $C_{15}H_{24}O$. PM=220,36 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **BSA:** bovine serum albumin, reagente mantido a 4°C
- **Dipotassium hydrogenphosphate:** potassium phosphate, dibasic. K_2HPO_4 . PM=174,18 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **D-mannitol:** $HOCH_2(CHOH)_4CH_2O_4$. PM=182,17 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **DOC:** deoxycholic acid sodium salt
- **DPH:** 1-6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. $(C_6H_5)_2(CH:CH)_3$. PM=232,32 (Nacalai Tesque Inc. Kyoto)
- **DTT** (\pm)-dithiothreitol(threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol), $HSCH_2CH(OH)CH(OH)CH_2SH$. PM=154,25 (Wako Pure Chemical Industries, LTD.), reagente mantido a 4°C
- **EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt dihydrate. PM=372,2 (Sigma Chemical Co.)
- **EGTA:** ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid, $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$. PM=380,4 (Sigma Chemical Co.)
- **8-HQS:** 8-hydroxyquinoline sulfate. $(C_8H_7NO)_2 \cdot H_2SO_4$. PM=388,39 (Nacalai Tesque, Inc. Kyoto)
- **KF:** potassium fluoride. PM=58,10 (Nacalai Tesque, Inc. Kyoto)
- **Mes:** 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, monohydrate. $C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$. PM=213,25 (Dojindo)
- **MOPS:** 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid. $C_7H_{15}NO_4S$. PM=209,27 (Dojindo)
- **PMSF:** phenylmethylsulfonyl fluoride. α -toluenesulfonyl fluoride. $C_6H_5CH_2SO_2F$. PM=174,20 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **Potassium dihydrogenphosphate:** potassium phosphate, monobasic. KH_2PO_4 . PM=136,09 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **PVP:** polyvinylpyrrolidone. (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **Saccharose:** $C_{12}H_{22}O_{11}$. PM=342,30 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

- **Streptomycin sulfate:** $(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2(H_2SO_4)_3$, PM=1457,39 (Nacalai Tesque, Inc. Kyoto)
- **TCA:** Trichloroacetic acid
- **THF:** tetrahydrofuran, $OCH_2CH_2CH_2$, PM=72,11 (Wako Pure Chemical Industries Ltd.)
- **Tris:** tris(hydroxymethyl) aminomethane $NH_2C(CH_2OH)_3$, PM=121,14 (Nacalai Tesque Inc. Kyoto)

Apêndice 2

Produção de gás carbônico ($\mu\text{l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de inflorescências de crisântemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy(3kGy/h). C - controle, não irradiado; I - irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose.

<i>dias</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>	<i>A.V.</i>
0,25	106,74±12,79 ^a	172,55±14,60 ^b	124,16±14,05 ^a	201,55±20,55 ^{bc}	***
1	92,81±7,52 ^a	100,54±3,85 ^a	135,11±10,54 ^b	138,72±7,39 ^b	**
2	78,81±10,54 ^a	82,36±7,13 ^a	128,28±4,84 ^b	121,02±17,23 ^b	***
3	69,15±8,33 ^a	76,70±15,7 ^a	138,49±5,2 ^b	109,16±14,24 ^b	***
7	46,33±18,26	61,32±17,54	81,85±25,84	72,030±37,22	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; **p<0,01; ***p<0,001; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Apêndice 3

Produção de gás etileno ($\eta\text{l.g}^{-1}\text{.h}^{-1}$) de inflorescências de crisântemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy(3kGy/h). C - controle, não irradiado; I - irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose.

<i>dias</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>	<i>A.V.</i>
0,25	0,33 ± 0,09 ^a	1,55 ± 0,34 ^b	0,36 ± 0,16 ^a	1,57 ± 0,51 ^b	**
1	0,3 ± 0,14	0,63 ± 0,11	0,6 ± 0,31	0,49 ± 0,18	n.s.
2	0,2 ± 0,05 ^a	0,39 ± 0,06 ^a	0,49 ± 0,07 ^b	0,3 ± 0,15 ^{ab}	*
3	0,23 ± 0,04 ^a	0,33 ± 0,06 ^a	0,91 ± 0,05 ^b	0,31 ± 0,11 ^a	***
7	0,3 ± 0,21	0,47 ± 0,03	0,38 ± 0,21	0,16 ± 0,1	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Apêndice 4

Impedância (*kohms*) dos capítulos de crisântemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose.

<i>dias</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>	<i>A. V.</i>
0	2,5 ± 0,10	2,92 ± 0,21	-	2,94 ± 0,18	n.s.
0,125	2,41 ± 0,07 ^a	3,21 ± 0,19 ^b	2,45 ± 0,13 ^a	3,22 ± 0,14 ^b	**
0,5	2,57 ± 0,12 ^a	3,57 ± 0,13 ^b	2,68 ± 0,12 ^a	3,53 ± 0,25 ^b	**
1	2,50 ± 0,10 ^a	3,63 ± 0,20 ^b	2,56 ± 0,08 ^a	3,68 ± 0,18 ^b	**
3	2,87 ± 0,12 ^a	3,87 ± 0,07 ^b	2,96 ± 0,11 ^a	3,85 ± 0,20 ^b	**
4	2,91 ± 0,04	3,68 ± 0,10	2,86 ± 0,18	3,71 ± 0,20	n.s.
7	3,05 ± 0,08	3,72 ± 0,33	3,08 ± 0,10	3,81 ± 0,27	n.s.
11	3,34 ± 0,07 ^a	3,93 ± 0,13 ^b	3,19 ± 0,14 ^a	4,14 ± 0,11 ^b	**
20	2,32 ± 0,21	1,61 ± 0,15	3,05 ± 0,33	2,57 ± 0,52	n.s.
25	1,51 ± 0,21	1,41 ± 0,12	2,56 ± 0,51	1,95 ± 0,13	n.s.

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; **p<0,01; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Apêndice 5

Condutividade (% de liberação de íons) de capítulos de crisântemo, *Dendranhema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose.

<i>dias</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>	<i>A. V.</i>
1	10,53 ± 1,28	13,05 ± 2,05	10,71 ± 1,35	11,21 ± 1,45	n.s.
2	13,95 ± 2,73	15,23 ± 0,40	14,71 ± 2,71	18,72 ± 3,65	n.s.
3	13,91 ± 1,81	16,80 ± 0,80	16,71 ± 1,17	15,41 ± 2,32	n.s.
6	18,47 ± 2,85	19,67 ± 2,44	23,04 ± 2,12	21,33 ± 3,75	n.s.
7	22,20 ± 3,25	22,69 ± 2,77	23,34 ± 2,37	21,02 ± 3,35	n.s.
8	24,90 ± 1,08	23,04 ± 3,96	22,68 ± 3,88	21,35 ± 2,89	n.s.
9	22,10 ± 2,39	21,46 ± 1,89	21,96 ± 1,87	18,64 ± 2,16	n.s.
10	24,17 ± 2,16	21,25 ± 4,73	21,10 ± 4,73	23,69 ± 4,49	n.s.
11	27,00 ± 1,34	25,06 ± 2,31	21,80 ± 1,19	24,13 ± 3,46	n.s.
13	26,73 ± 3,92	27,54 ± 1,40	21,58 ± 2,57	23,57 ± 6,39	n.s.
15	32,30 ± 2,59 ^a	33,43 ± 3,80 ^a	19,84 ± 2,28 ^b	23,82 ± 0,00 ^a	*
17	39,72 ± 7,19 ^a	32,45 ± 3,88 ^a	22,75 ± 2,55 ^b	20,86 ± 3,91 ^b	**

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; *p<0,05; **p<0,01; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Apêndice 6

Condutividade (% de liberação de íons) de folhas de crisântemo, *Dendranhema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose.

<i>dias</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>	<i>A. V.</i>
1	1,09 ± 0,32 ^a	2,75 ± 0,79 ^{ab}	1 ± 0,17 ^a	4,17 ± 0,49 ^b	**
2	1,08 ± 0,32	1,68 ± 0,08	2,43 ± 1,75	7,08 ± 2,4	n.s.
3	1,65 ± 0,38 ^a	2,49 ± 0,1 ^{ab}	1,94 ± 0,62 ^a	5,33 ± 1,43 ^b	*
6	1,94 ± 0,66	2,27 ± 0,28	1,94 ± 0,9	5,67 ± 1,89	n.s.
7	2,23 ± 0,5	3,5 ± 1,97	1,38 ± 0,7	3,5 ± 0,47	n.s.
8	2,57 ± 0,9	2,16 ± 0,13	0,92 ± 0,2	4,45 ± 2,24	n.s.
9	2,37 ± 0,73	3 ± 1,56	0,97 ± 0,24	3,86 ± 1,72	n.s.
10	2,55 ± 1,27	5,62 ± 1,91	1,11 ± 0,18	4,13 ± 2,28	n.s.
11	4,11 ± 1,02	4,45 ± 2,34	2,38 ± 1,28	3,65 ± 3,65	n.s.
13	6,22 ± 2,88 ^a	37,82 ± 5,87 ^b	1,73 ± 0,29 ^d	3,14 ± 0,99 ^a	**
15	33,21 ± 7,85 ^a	40,69 ± 2,6 ^a	1,83 ± 1,06 ^b	11,52 ± 4,69 ^b	**
17	43,56 ± 1,76 ^a	42,75 ± 0,21 ^a	2,68 ± 0,93 ^b	11,48 ± 11,48 ^b	**

C: controle; I: irradiado; CS: não irradiado, mantido com 2% de sacarose; IS: irradiado e mantido com 2% de sacarose. Média±desvio padrão; A.V.: análise de variância; n.s.: não significativo; *p<0,05; **p<0,01; letras diferentes na mesma linha indicam diferenças no teste de Tukey-Kramer (p<0,05).

Apêndice 7

Fluidez (1/poise) das membranas microsossomais de flores de crisântemo, *Dendranhema grandiflorum* Kitamura, após irradiação-gama com 750Gy (3kGy/h). C - controle, não irradiado; I irradiado; CS - não irradiado, suprido com 2% de sacarose; IS - irradiado e suprido com 2% de sacarose.

<i>dias</i>	<i>C</i>	<i>I</i>	<i>CS</i>	<i>IS</i>	<i>A.V.</i>
0	0,339±0,008	0,350±0,007	0,357±0,006	0,348±0,025	n.s.
1	0,352±0,004	0,335±0,015	0,380±0,012	0,344±0,011	n.s.
2	0,341±0,006 ^a	0,298±0,002 ^b	0,372±0,009 ^c	0,319±0,004 ^{ab}	**
7	0,312±0,006 ^a	0,275±0,004 ^b	0,345±0,000 ^c	0,308±0,012 ^a	**
14	0,302±0,004 ^a	0,250±0,005 ^b	0,330±0,008 ^a	0,309±0,010 ^a	**
21	-	-	0,268±0,001 ^a	0,222±0,006 ^b	**

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, JR., M.E. Radiation stress. In: *Ethylene in plant biology*, 2. ed., Academic, Harcourt Brace Jovanovich, [S.I.], p. 91-92, 1992.
2. ADAM, Z.; BOROCHOV, A.; MAYAK, S.; HALEVY, A.H. Correlative changes in sucrose uptake, ATPase activity and membrane fluidity in carnation petals during senescence. *Physiol. Plant.*, v. 58, p. 257-262, 1983.
3. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular biology of the cell*, 3. ed., Garland, New York & London, 1983.
4. APELBAUM, A.; KATCHANSKY, M. Effects of thiabendazole on ethylene production and sensitivity to ethylene of bud cut flowers. *HortScience*, v. 13, n. 5, p. 593-594, 1978.
5. BAKER, J.E.; WANG, C.Y.; LIEBERMAN, M.; HANDENBURG, R. Delay of senescence in carnation by a rhizobitoxine analog and sodium benzoate. *HortScience*, v. 12, n. 1, p. 38-39, 1977.
6. BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, v. 234, p. 466-468, 1959.
7. BEJA-TAL, S.; BOROCHOV, A. Age-related changes in biochemical and physical properties of carnation petal plasma membranes. *J. Plant Physiol.*, v. 143, p. 195-199, 1994.
8. BLANK, A.; MAC KEON, T.A. Three RNAases in senescent and nonsenescent wheat leaves. *Plant Physiol.*, v. 97, p. 1402-1408, 1991a.
9. BLANK, A.; MAC KEON, T.A. Expression of three RNAase activities during natural and dark-induced senescence of wheat leaves. *Plant Physiol.*, v.97, p. 1409-1413, 1991b.
10. BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917, 1959.
11. BOROCHOV, A.; HALEVY, A.H.; SHINITZKY, M. Increase in microviscosity with ageing in protoplast plasmalemma of rose petals. *Nature*, v. 263, p. 158-159, 1976.

12. BOROCHOV, A.; HALEVY, A.H.; BOROCHOV, H.; SHINITZKY, M. Microviscosity of plasmalemmas in rose petals affected by age and environmental factors. *Plant. Physiol.*, v. 61, p. 812-815, 1978.
13. BOROCHOV, A.; ITZHAKI, H.; MAYAK, S. Membrane lipid metabolism in relation to petal senescence. In: *Plant lipid biochemistry, structure and utilization*, QUINN, P.J. and HARWOOD, J.L., Portland Press, London, p. 90-92, 1990.
14. BRISKIN, D.P.; LEONARD, R.T.; HODGES, T.K. Isolation of the plasma membrane markers and general principles. *Meth. Enzymol.*, v. 148, p. 542-558, 1987.
15. BURG, S.P. AND BURG, E.A. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.*, v. 42, p. 144-152, 1967.
16. CASTRO, C.E.F; HONÓRIO, S.L. Colheita e conservação de flores. In: *Manual de floricultura*, Maringá, p. 161-170, 1992.
17. CASTRO, C.E.F.. A Floricultura no Brasil. In: *Manual de Floricultura*, Maringá, p. 1-11, 1992.
18. CHIU, H.T. Control of major insect pests on cut chrysanthemum flowers by gamma radiation. *Plant. Prot. Bull.*, v. 28, p. 139-146, 1986.
19. COORTS, G.D. Internal metabolic changes in cut fowers. *Hotscience*, v. 8, n. 3p. 195-198, 1973.
20. COX, M.A.; ZHANG, M.; WILLISON, J.H.M. Apple bruise assessment through electrical impedance measurements. *J. Hortic. Sci.*, v. 68, n.3, p. 393-398, 1993.
21. CROWNE, J.H.; CROWNE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; WISTROM, C.A.; SPARGO, B.J.; ANCHORDOGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 947, p. 367-384, 1988.
22. DE LUCA D'ORO, G.M.; TRIPPI, V.S. Effect of stress conditions induced by temperature, water and rain on senescence development. *Plant Cell Physiol.*, v. 28, n.8, p. 1389-1396, 1987.
23. DOHINO, T.; HAYASHI, T. Avoidance of electron-irradiation induced injuries of chrysanthemum cut flowers. *Res. Bul. Plant Protection*, Jpn. , v. 1, p.95-100, 1995.

24. DONG, C.Z.; MONTILLET, J.L.; TRIANTAPHYLIDES, C. Effects of gamma irradiation on the plasma membrane of suspension-cultured apple cells. Rapid irreversible inhibition of H⁺-ATPase activity. *Physiol. Plant.*, v. 90, p. 307-312, 1994.
25. DROILLARD, M.J.; PAULIN, A.; MASSOT, J.C. Free radical production, catalase and superoxido dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant*, v. 71, p. 197-202, 1987.
26. DRORY, A.; BOROCHOV, A.; MAYAK, S. Transient water stress and phospholipid turnover in carnation flowers. *J. Plant Physiol.*, v. 140, p. 116-120, 1992.
27. EDWARDS, J. C.; CHAPMAN, D.; CRAMP, W.A.; YATVIN, M. B. The effects of ionizing radiation on biomembrane structure and function. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, v. 43, p. 71-93, 1984.
28. FAO/IAEA. *2nd Research Co-ordination Meeting of Co-ordinated Research Programme on Irradiation as a Quarantine Treatment of Mites, Nematodes and Insects Other than Fruit Fly*, 7-11 March, Bangkok, Thailand, 1994.
29. FAO/IAEA *Final Research Coordination Meeting (RCM) on Use of Irradiation as a Quarantine Treatment of Mites, Nematodes and Insects other than Fruit Flies*. 3-7 November, 1997, Honolulu, Hawaii, USA, 1998.
30. FRUPEX. *Catálogo informativo. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA, Secretaria do Desenvolvimento Rural - SDR, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais - FRUPEX. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO*, 1994.
31. GATTI, E.U. Aspectos econômicos da floricultura no Brasil. In: *Manual de Floricultura*, p. 12-31, 1992.
32. GORSEL, R. van. Postharvest technology of imported and trans-shipped tropical floricultural commodities. *HortScience*, v. 29, n. 9, p. 979-981, 1994.
33. GOSZCZYNSKA, D.; ITZHAKI, H.; BOROCHOV, A.; HALEVY, A.H. Effects of sugar on physical and compositional properties of rose petal membranes. *Scientia Hortic.*, v. 43, p. 313-320, 1990.

45. JIAO, X.Z. The effects of gamma-ray on ultrastructure and ethylene biosynthesis in apple pulp cells. *Plant Physiol. suppl. PPYSA*, v. 59, n. 4, p.194, 1989.
46. JOLY, A.B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*. 3. ed., Companhia E. Nacional, São Paulo, 1976.
47. JONES, R.B.; SEREK, M.; REID, M.S. Pulsing with Triton x-100 improves hydration and vase life of cut sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *HortScience*, v. 28, n. 12, p. 1178-1179, 1993.
48. KASAMO, K.; SAKAKIBARA, Y. The plasma membrane H⁺ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Science*, v. 111, p. 117-131, 1995.
49. KIKUCHI, O.K.; DEL MASTRO, N.L.; WIENDL, F.M. Preservative solution for gamma-irradiated chrysanthemum cut flowers. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 46, n. 4-6, p. 1309-1311, 1995.
50. KIKUCHI, O.K.; TODORIKI, S.; HAYASHI, T. Sucrose delays membrane deterioration of chrysanthemum flowers induced by gamma-rays. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 51, n. 2, p. 175-179, 1998.
51. KIKUCHI, O.K.; DEL MASTRO, N.L.; WIENDL, F.M. Utilização da radiação ionizante para desinfestação de flores de corte. I. Sensibilidade de rosas e de crisântemos irradiados com cobalto-60. In: ANAIS DA 45^a REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, Recife, Pernambuco, v. 42, 1993.
52. KINET, J. M.; SACHS, R. M.; BERNIER, G. *The physiology of flowering*, v. III, CRC, Florida, 1985.
53. LESTER, G.E.; WHITAKER, B.D. Gamma-ray-induced changes in hypodermal mesocarp tissue plasma membrane of pre- and post-storage muskmelon. *Physiol. Plant.*, v.98, p. 265-270, 1996.
54. LEVITT, J. *Responses of plants to environmental stresses: water, radiation, salt and other stresses*, vol. III, Academic, New York, 1980.
55. LORENZI, H.; SOUZA, H.M. *Plantas ornamentais no Brasil - arbustivas, herbáceas e trepadeiras*, Editora Plantarum, Nova Odessa, SP, 1995.

56. MARANGONI, A. G.; PALMA, T.; STANLEY, D. W. Membrane effects in post-harvest physiology. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 7, p. 193-217, 1996.
57. MAYAK, S.; DILLEY, D.R. Regulation of senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus*). Effect of abscisic acid and carbon dioxide on ethylene production. *Plant Physiol.*, v. 58, p. 663-665, 1976.
58. MAYAK, S.; HALEVY, A.H. Flower senescence. In: THIMANN, K.V.; ADELMANN, R.C.; ROTH, G.S., *Senescence in Plants*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986.
59. McCAIN, A. H. Diseases of Chrysanthemum. American Phytopathological Society, <http://www.scisoc.org/ismpmi/common/names/chrysant.htm> :1-3, 1997.
60. MCKERSIE, B. D.; THOMPSON, J. E. Influence of plant sterol on the phase properties of phospholipid bilayers. *Plant Physiol.*, v. 63, p. 802-805, 1979.
61. MICHELET, B.; BOUTRY, M. The plasma membrane H⁺-ATPase. A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.*, v. 108, p. 1-6, 1995.
62. MONK, L. S.; FAGERSTEDT, K.V.; CRAWFORD, R.M.M. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.*, v. 76, p. 456-459, 1989.
63. MUNOZ, B.R. Uso potencial de la radiacion ionizante en Ecuador, como un tratamiento cuarentenario para frutas frescas, vegetales y flores cortadas. *Politecnica*, v. 15, n.2, p. 105-120, 1990.
64. NAKAHARA, K.; KIKUCHI, O. K.; TODORIKI, S.; HOSODA, H.; HAYASHI, T. Role of sucrose in gamma-irradiated chrysanthemum cut flowers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 62, p. 49-53, 1998.
65. NAKAMURA, Y.; SAKAKIBARA, Y.; KOBAYASHI, H.; KASAMO, K. Rapid reconstitution of tonoplast H⁺-translocation pyrophosphatase from cultured rice cells into liposomes. *Plant Cell Physiol.*, v. 38, n. 3, p. 371-374, 1997.
66. NOODÉN, L. D.; LEOPOLD, A. C. *Senescence and aging in plants*. Academic, London, 1988.

67. OKUYAMA, M. H.; SAITO, I. Crisântemo (*Chrysanthemum* sp). In: CASTRO, C.E.F. *Manual de floricultura*. Maringá, p.216-217, 1992.
68. PAI, K.U.; GAUR, B.K. Quantitative and qualitative changes in mitochondrial protein isolated from gamma-irradiated kidney bean hypocotyl segments. *Env. Exp. Bot.*, v. 23, n. 2, p. 143-148, 1983.
69. PAI, K.U.; GAUR, B.K. Gamma-ray induced biochemical changes in the outer mitochondrial membrane from kidney bean hypocotyls. *Env. Exp. Bot.*, v. 27, n. 3, p. 297-304, 1987.
70. PARASASSI, T.; GIUSTI, A. M.; RAIMONDI, M.; RAVAGNAN, G.; SAPORA, O.; GRATTON, E. Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 19, n. 4, p. 511-516, 1995.
71. PARUPS, E.V. Effects of Flower Care floral preservative on the vase-life and bloom size of *Rosa hybrida* c.v. Forever Your roses. *Can. J. Plant Sci.*, v. 55; p. 775-781, 1975.
72. PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidative protection in a drough-resistant maiz strain during leaf senescence. *Physiol. Plant.*, v. 87, p. 227-231, 1993.
73. PAULIN, A.; DROILLARD, M.J.; BUREAU, J.M. Effect of a free radical scavenger, 3-4-5-trichlorophenol, on ethylene production and on changes in lipids and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*), *Physiol. Plant.*, v. 67, p. 465-471, 1986.
74. PENNAZIO, S.; ROGGERO, P. Effects of free radical scavenger on stress ethylene in soybean leaves hypersensitively reacting to tobacco necrosis virus. *Annals of Botany*, v. 69, p. 437-439, 1992.
75. PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, v. 83, p. 346-356, 1977.
76. PIRIYATHAMRONG, S.; CHOUVALITVONGPORN, P.; SUDATHIT, B. Disinfestation and vase-life extension of orchids by irradiation. In: MOY, J. H., *Radiation disinfestation of food and agricultural products*: Proceedings of an International Conference, Honolulu, Hawaii, November 14-18, 1983, p. 222-225, 1985.

77. RAMESHWAR, A. Aluminium sulfate, a new preservative for cut flowers. *Indian J. Hortic.*, v. 31, n. 1, p. 95-96, 1974.
78. RAWITSCHER, F. *Elementos básicos de botânica*, 6.ed., Editora Nacional, São Paulo, p. 334, 1972.
79. RIGNEY, C. J.; WILLS, P. A. Suitability of low-dose gamma irradiation for desinfestation of several fruits. In: MOY, J. H., *Radiation disinfestation of food and agricultural products*, Proceedings of an International Conference, Honolulu, Hawaii, November 14-18, 1983, p. 129-134, 1985.
80. ROGERS, M.N. An historical and critical review of postharvest physiology research on cut flowers. *HortScience*, v.8, n. 3, p. 189-194, 1973.
81. SATO, M.; YOKOYAMA, S.; KOSHIBA, T.; WATANABE, M.; HIRAOKA, A. Gamma-irradiation damage to leaf vacuole membranes of *Chelidonium majus*. *Env. Exp. Bot.*, v. 35, n. 1, p. 71-81, 1995.
82. SCHERZ, H. Detection of irradiated potatoes by conductivity measurements. In: J.J. RAFFI; BELLIARDO, J.J. , *Potential New Methods of Detection of Irradiated Food, BCR Information, Chemical Analysis, Report EUR 13331 EN*. Commission of the European Communities, Luxembourg, Belgium, 1991.
83. SHINITZKY, M. Membrane fluidity and cellular functions. In: *Physiology of membrane fluidity*, v. I, CRC, 1984.
84. SINGH, S.; LETHAM, D.S.; ZHANGH, X.D.; PALNI, L.M.S. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VI. Effect of nitrogenous nutrients on cytokinin levels and senescence of tobacco leaves. *Physiol. Plant.*, v. 84, p. 262-268, 1992.
85. STARK, G. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1071, p. 103-122, 1991.
86. TANABE, K.; DOHINO, T. Effects of electron beam irradiation on cut flowers. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*, v. 2, p. 1-9, 1993.

87. TANABE, K.; DOHINO, T.; MISUMI, T. Effects of electron beam irradiation on ethylene production and senescence of cut flowers. *Res. Bull. Prot. Japan*, v. 30, p. 75-82, 1994.
88. THIMANN, K.V. The senescence of leaves. In: THIMANN, K.V.; ADELMAN, R.C. & ROTH, G.S., *Senescence in plants*. Florida. CRC Press, p. 85-116, 1986.
89. THOMPSON, J.E.; LEGGE, R.L.; BARBER, R.F. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.*, v. 105, p. 317-344, 1987.
90. TODORIKI, S.; DAN, K.; HYASHI, T. Lipid content and fatty acid composition of gamma-irradiated potato tubers. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, v. 41, n. 5, p. 358-362, 1994a.
91. TODORIKI, S.; HAYASHI, T.; NAKAMURA, Y.; KASAMO, K. Effects of gamma-irradiation on the activity of tonoplast H⁺-ATPase from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Physiol.*, v. 35n. 5, p. 829-836, 1994b.
92. TRIPPI, V.S.; PAULIN, A.; PRADET, A. Effect of oxygen concentration on the senescence and energy metabolism of cut carnation flowers. *Physiol. Plant.*, v. 73, p. 374-379, 1988.
93. VOISINE, R.; VEZINA, L.P.; WILLEMOT, C. Induction of senescence-like deterioration of microsomal membranes from cauliflower by free radicals generated during gamma irradiation. *Plant Physiol.*, v. 97, p. 545-550, 1991.
94. VOISINE, R.; VEZINA, L.P.; WILLEMOT, C. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of gamma-irradiated cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiol.*, v. 102, p. 213-218, 1993.
95. WIT, A.K.H.; VRIE, M. van de. Gamma radiation for post harvest control of insects and mites in cut flowers. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, v. 50/2b, p. 697-704, 1985.
96. YOSHIDA, S. *Studies on freezing injury of plant cells*. *Plant Physiol.*, v. 75, p. 38-42, 1984.
97. ZHANG, M. I. N.; WILLISON, J. H. M. Electrical impedance analysis in plant tissue in-vivo detection of freezing injury. *Can. J. Bot.*, v. 70, n. 11, p. 2254-2258, 1992.

98. ZHANG, M. I. N.; WILLISON, J. H. M. Electrical impedance analysis in plant tissues: impedance measurement in leaves. *J. Exp. Bot.*, v. 44, n. 265, p. 1369-1375, 1993.
99. ZHANG, M. I. N.; WILLISON, J. H. M.; HALL, S. A. Measurement of heat injury in plant tissue using electrical impedance analysis. *Can. J. Bot.*, v. 71, n. 12, p. 1605-1611, 1993.