

MICHELE PACHECO GARCIA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO DURANTE O DESENVOLVIMENTO E A
SENESCÊNCIA DE FOLHAS DE SOJA, *GLYCINE MAX* L.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

MICHELE PACHECO GARCIA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO DURANTE O DESENVOLVIMENTO E A SENESCÊNCIA DE
FOLHAS DE SOJA, *GLYCINE MAX L.***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*

Aprovada: 31 de outubro de 2008

Prof. José Cambraia

Prof. Rolf Puschmann

Dr^a. Kacilda Naomi Kuki

Prof^a. Andréa Miyasaka de Almeida
(Co-orientadora)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pela orientação, dedicação, paciência, compreensão e pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada pelo exemplo de competência, ética e responsabilidade.

Aos professores Fábio Murilo DaMatta, Andréa Miyasaka de Almeida, Marco Antônio Oliva Cano, José Cambraia, Rolf Puschmann e Everaldo Gonçalves de Barros pela colaboração na realização desse trabalho, seja por sugestões, seja por empréstimos de aparelhos e drogas necessários.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal e à professora Marília Ventrella, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos e funcionários dos Laboratórios 349, 250 e 310 e da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) pela vasta contribuição e solidariedade: Carlos Raimundo, Geraldo, Antônio Cordeiro, Mercês, Reginaldo, Oswaldo, Bhering, João Bosco, Rogério.

Ao pessoal da casa de vegetação do Bioagro pelas urgências atendidas: Cupertino, José Carlos, Nilton.

Aos meus colegas de curso e/ou de trabalho pela convivência e ajuda, em especial Agnaldo Chaves, Carla Quinhones, Danilo Daloso, Diego Carretero, Eduardo Gusmão, Elaine Cabrini, Fábio Santos, Gabriela Leão, Gládis Jucoski, Gustavo Kling, Ricardo Wolfgramm, Rogério Ribas, Samuel Cordeiro, Waldir Diola, Werner Antunes.

Às minhas estagiárias Nilmara, Aline, Marcela e Nayara. Sem elas o trabalho seria muito mais difícil.

Aos meus amigos de sempre Desirée, Vanessa (mãe), Fernanda, Marcela, Juliana, Carla, Vanessa, Eryckson, Marlon, Flávia, Tenille, Karen, Marcus Vinícius, Thalita. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo que distantes.

Às pessoas que convivi nesse período, que me ajudaram, me ofereceram apoio e fizeram de Viçosa um lar: Otávia, Igor, Frederico, Rafael, Henrique, Fernanda, Rafael (Fino), Fábio (Gaúcho), Daniela, Patrik, Fabrício (Tiger). Além de me aconselharem a não desistir, deram motivos suficientes para que isso não acontecesse.

Às minhas companheiras de república Juliana, Silvana e em especial Marina, que se tornou muito mais que vizinha de quarto: uma amiga essencial. Obrigada pelos últimos meses!

À minha família, por compartilhar comigo minhas angústias, dores, pelo apoio, amor, atenção, paciência e força incondicionais, que foram base para a realização desse trabalho como um todo. Mãe, pai, irmã, irmão: vocês são minha vida!

Às minhas avós Josina e Mariana.

À UFMS e todos os professores que me ajudaram a construir a base para chegar até aqui. Em especial, Leandro Aguiar e Liliane Camargos, que me deram a oportunidade de conhecer a pesquisa e aprender essa área.

E principalmente a Deus, pela vida e proteção constante ao longo dela.

BIOGRAFIA

MICHELE PACHECO GARCIA, filha de Eliones Garcia dos Santos e Ana Cristina Pacheco Garcia, nascida em Três Lagoas/MS no dia 03 de maio de 1984.

Em 2001 concluiu o Ensino Médio no Colégio Hermezindo Alonso Gonzáles – Funlec e em 2002 ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de sua cidade natal, diplomando-se em fevereiro de 2006.

Em outubro de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo sua tese em outubro de 2008.

CONTEÚDO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 – INTRODUÇÃO	12
2 – OBJETIVOS	17
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 – Material vegetal e cultivo	18
3.2 – Determinação de teores de clorofilas e carotenóides	19
3.3 – Determinação de trocas gasosas.....	19
3.4 – Avaliação de danos celulares	20
3.4.1 – Peroxidação de lipídios	20
3.4.2 – Extravasamento de eletrólitos.....	20
3.5 – Determinação do teor de peróxido de hidrogênio	21
3.6 – Avaliação de atividades enzimáticas	21
3.6.1 – Obtenção dos extratos enzimáticos	21
3.6.2 – Dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).....	22
3.6.3 – Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	22
3.6.4 – Peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)	22
3.6.5 – Peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	23
3.6.6 – Redutase da glutathiona (GR, EC 1.6.4.2)	23
3.7 – Análise Quantitativa de Proteína.....	24
3.8 – Análises estatísticas	24
4 – RESULTADOS.....	25

4.1 – Amostragem do processo de desenvolvimento	25
4.2 – Teores de clorofilas e de carotenóides	27
4.3 – Trocas gasosas.....	33
4.4 – Danos celulares	36
4.4.1 – Concentrações de aldeído malônico.....	36
4.4.2 – Percentagens de extravasamento de eletrólitos	38
4.5 – Teores de peróxido de hidrogênio	39
4.6 – Atividades enzimáticas	41
5 – CONCLUSÕES.....	49
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE.....	59

RESUMO

GARCIA, Michele Pacheco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2008. **Alterações Fisiológicas e avaliação do estresse oxidativo durante o desenvolvimento e a senescência de folhas se soja, *Glycine max* L.** Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva. Co-orientadores: Andréa Miyasaka de Almeida e Fábio Murilo DaMatta.

Foram avaliadas diversas alterações fisiológicas e o estresse oxidativo ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46 (Conquista), em dois diferentes grupos de plantas: com órgãos reprodutores intactos, cujas plantas seguiram o ciclo normal até a senescência e com órgão reprodutores removidos, a fim de prolongar o ciclo de vida, retardando a senescência foliar. Foram avaliados: teores de clorofilas e carotenóides, parâmetros de trocas gasosas, atividades de algumas enzimas do sistema antioxidativo, teores de peróxido de hidrogênio, além de danos celulares. As folhas analisadas das plantas desenvolvendo normalmente apresentaram progressiva degradação de clorofilas e carotenóides (em menor proporção), fato que resultou na coloração amarela característica de folhas senescentes, enquanto as plantas desfloradas mantiveram suas folhas verdes. A degradação dos pigmentos resultou em queda acentuada das taxas de assimilação líquida de carbono (A) nas plantas com órgãos reprodutores intactos, além de ter ocorrido queda na condutância estomática (g_s) e aumento na razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a). Ao contrário, as plantas com órgãos

reprodutores removidos apresentaram menor queda em *A, gs* e *Ci/Ca*, que se mantiveram constantes após a ligeira queda inicial. O percentual de extravasamento de eletrólitos em plantas em senescência natural aumentou ao longo do desenvolvimento, mas não foi acompanhado de aumento de aldeído malônico (MDA). Em plantas desfloradas o extravasamento foi inicialmente constante, seguido de queda com o início da senescência, mas, por outro lado, os níveis finais de MDA foram duas vezes maiores que os iniciais. As folhas das plantas intactas apresentaram baixos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ao contrário das plantas desfloradas. A baixa atividade da dismutase do superóxido (SOD) em plantas senescendo normalmente, além das atividades elevadas de peroxidase (POX) e peroxidase do ascorbato (APX), devem ter sido as responsáveis pelos baixos níveis de H_2O_2 nessas plantas. Inversamente, a atividade intensa de SOD e a baixa atuação de POX e APX em plantas desfloradas contribuíram para os altos teores de peróxido de hidrogênio. A catalase (CAT) teve sua atividade em queda ao longo do experimento, nas folhas de ambos os tratamentos, indicando que a enzima não teve participação importante na remoção de H_2O_2 . Nos trifólios das plantas dos dois tratamentos, a redutase da glutatona (GR) teve sua atividade inicialmente elevada, seguida de queda drástica até o final do experimento. Tais resultados indicam que o estresse oxidativo não foi o fator determinante da senescência foliar natural das plantas de soja utilizadas no presente experimento.

ABSTRACT

GARCIA, Michele Pacheco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2008. **Physiological changes and evaluation of oxidative stress during leaf development and senescence in soybean, *Glycine max* L.** Adviser: Marco Aurélio Pedron e Silva. Co-advisers: Andréa Miyasaka de Almeida and Fábio Murilo DaMatta

Physiological changes and oxidative stress were studied in soybean leaves, *Glycine max*, variety MG / BR 46 (Conquista) during their development. In a group of plants the reproductive organs were removed, in an attempt to extend their life cycle, retarding their leaf senescence. In the control plants the flowers were not removed and the plants followed their normal cycle until natural senescence. Control plants developed normally, exhibiting progressive degradation of chlorophylls and carotenoids (in low proportion), with the characteristic yellow color of senescent leaves. On the other hand, plants with no flower kept their leaves green until the end of the experiment. The degradation of the pigments led to a sharp decline in carbon assimilation rates (A) in control plants, in which also occurred a decrease in stomatal conductance (g_s) and increase in the ratio between the internal and ambient CO_2 concentration (C_i/C_a). In contrast, plants without flowers showed a minor drop in A , g_s and C_i/C_a . The proportion of electrolyte leakage increased in the control plants throughout their development. Leaves of control plants showed lower levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), in contrast with a great increase observed in plants with no flowers. The low activity of superoxide dismutase (SOD) in control plants in addition to the high activity

of peroxidases (POX) and ascorbate peroxidase (APX) are likely responsible for the low levels of H₂O₂ in those plants. Conversely, the intense activity of SOD and the low performance of POX and APX in plants without flowers might have contributed to the high levels of hydrogen peroxide. Catalase (CAT) activity dropped continuously in the leaves of the two kind of plants, indicating that this enzyme does not play a fundamental role in the removal of reactive oxygen species during this senescence. In both kind of plants, the activity of glutathione reductase had initially increased, followed by a sharp decrease until the end of the experiment. The results of this experiment suggest that oxidative stress is not the determinant factor associated with leaf senescence process in soybean plants.

1 – INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é uma planta herbácea pertencente à família *Leguminosae* e sub-família *Fabaceae*, que apresenta grande diversificação genética e morfológica em função do elevado número de variedades e cultivares. É amplamente utilizada na alimentação humana, tendo papel semelhante à carne, leite e manteiga, pois tem elevada quantidade de proteínas e gordura (Gomes, 1976).

Inúmeros estudos têm destacado o potencial de fitoquímicos presentes na soja, como as saponinas e isoflavonas no controle de diferentes enfermidades. Os grãos de soja compõem-se basicamente de proteínas, glicídios e lipídios, contendo também cálcio, fósforo e ferro (Sgarbieri et al, 1981). Além da proteína, a soja fornece os ácidos graxos essenciais, algumas vitaminas e compostos fitoquímicos, como as isoflavonas, que apresentam importante propriedade de atividade antioxidante (Esaki et al, 1999). Além disso, no campo, é forragem de primeira ordem, enriquece o solo com o nitrogênio que retira do ar atmosférico, humifica-o com seu sistema radicular, ao encerrar seu ciclo vital, quando toda sua volumosa massa vegetal não é usada como adubo verde e ainda protege o solo contra erosão e ação direta do sol (Gomes, 1976).

Sendo uma espécie monocárpica, a soja possui um controle correlativo, sendo que sua senescência foliar inicia quando o fim do seu desenvolvimento é alcançado, com o enchimento dos grãos, cessando assim o seu ciclo reprodutivo único. Dessa forma, o desenvolvimento

reprodutivo governa a senescência foliar e a remoção dos órgãos reprodutivos pode reverter a destruição das folhas senescentes (Lim et al, 2007).

Em qualquer espécie vegetal, a senescência não ocorre desordenadamente, sendo que sua indução e seu progresso são controlados em resposta a fatores ambientais, como desidratação e baixa temperatura, além de uma regulação diferencial programada de uma série de genes relacionados à senescência (SAGs) (Gan e Amasino, 1997; Biswal et al, 1999; Yoshida, 2003).

Além de fatores externos, há interferência também de fatores internos como sinalizadores da senescência, entre eles, os hormônios. Os principais hormônios envolvidos são as auxinas, citocininas e giberelinas, que inibem a senescência, e ácido abscísico e etileno, que a induzem. A regulação da senescência também conta com a participação do ácido jasmônico e do ácido salicílico (Gan e Amasino, 1997).

Na senescência monocárpica, além das estruturas reprodutivas, outras partes da planta podem participar como controles correlativos. As raízes, por exemplo, tem importante papel na manutenção das folhas, principalmente através da produção de citocininas (Noodén *et al*, 2004). As citocininas podem aumentar a quantidade de flores e frutos em soja, sugerindo que esse hormônio atua redirecionando o movimento de assimilados na planta, prevenindo a abscisão desses órgãos (Reese et al, 1995; Nagel et al, 2001).

A maioria dos estudos moleculares que visam o melhor entendimento sobre a senescência foliar tem sido feita em *Arabidopsis thaliana*. Apesar de ter um ciclo muito curto, *Arabidopsis* não é uma planta monocárpica, portanto as descobertas a respeito do controle genético de sua senescência podem não revelar os mecanismos envolvidos na senescência foliar de outras plantas, como a soja (Lim *et al*, 2007).

A morte de grupos de células faz parte do desenvolvimento de muitos organismos, podendo também ser resposta a estresses bióticos e abióticos. A morte celular programada pode ser um processo auto-destrutivo, envolvido na formação de elementos traqueais e degeneração da camada de aleurona durante a germinação, por exemplo (Jones e Dangl, 1996). Pode também

estar associada ao processo de senescência, que envolve uma desmontagem ordenada de componentes celulares e permite um aproveitamento máximo de nutrientes para as outras partes da planta (Lim *et al.*, 2007)

No decorrer da senescência, dentre outras alterações, observa-se aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produzidas durante o metabolismo aeróbico normal, pela interação do O₂ e elétrons provindos da cadeia de transporte de elétrons dos cloroplastos e das mitocôndrias (Bor *et al.*, 2003). A susceptibilidade ao estresse oxidativo depende do balanço global entre a produção de oxidantes e a capacidade antioxidante da célula (Prochazkova *et al.*, 2001).

As espécies reativas de oxigênio incluem o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ânion superóxido (O₂^{•-}), e o radical hidroxil (HO[•]), os quais podem causar danos às macromoléculas celulares. Os danos provocados pelas EROs podem ser evitados por sistemas antioxidativos enzimáticos e não-enzimáticos. No sistema antioxidativo enzimático em plantas superiores, destacam-se as enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), além de outras peroxidases (POX) e redutase da glutathione (GR). A SOD catalisa a dismutação do superóxido, mantendo baixos níveis desse radical, sendo o H₂O₂ produto de sua reação. A CAT converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água e a APX catalisa a oxidação do ascorbato à monodesidroascorbato (MDHA), usando peróxido de hidrogênio como oxidante (Jimenez *et al.*, 2002). Além disso, as plantas contam com mecanismos não enzimáticos, envolvendo compostos como o ácido ascórbico e a glutathione, que são encontrados em altas concentrações no cloroplasto e outros compartimentos (Mittler, 2002).

Durante a senescência foliar monocárpica em arroz, Srivalli e Khanna-Chopra (2001) observaram aumento no estresse oxidativo nas células, devido ao declínio de SOD e CAT e posterior indução de novas isoformas, menos ativas. O aumento na atividade de CAT logo após o florescimento em soja sugere que as folhas aumentam a sua capacidade de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água. Porém, quando se aproxima mais da senescência (25 dias após o florescimento), essa

habilidade decresce com a queda da atividade dessa enzima (Fu *et al*, 2000).

Além da destruição das EROs, as células também contam com sistemas capazes de reduzir a sua produção, como parte do seu sistema de proteção contra o estresse oxidativo. Algumas formas de se reduzir a produção de EROs envolvem a dissipação de energia entre o fluxo de elétrons da cadeia respiratória e a síntese de ATP (Maxwell *et al.*, 1999; Considine *et al.*, 2003). Para isso, as plantas podem se utilizar de duas proteínas mitocondriais: a oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora (UCP) (Sluse *et al*, 2000, 2002).

As células da folha sofrem mudanças ordenadas em sua estrutura, no metabolismo e na expressão gênica (Lim *et al*, 2007), ao longo do processo de senescência. Os plastídios do mesofilo são as primeiras organelas a sofrer mudanças dramáticas; cloroplastos e peroxissomos sofrem conversão em gerontoplastos e glioxissomos, respectivamente, indicando que a senescência é um fenômeno de diferenciação e não apenas uma forma de necrose.

As células do mesofilo são as primeiras e estão entre as principais a tornarem disponível quase todo o recurso da folha durante a senescência. Ocorre o aumento na atividade metabólica, responsável por converter o material celular acumulado durante a fase de crescimento, havendo hidrólise de macromoléculas para remobilização de nutrientes (Lim e Nam, 2005). Células senescentes passam por reorganização interna e são metabolicamente ativas, sendo que várias rotas são ativadas e continuam ocorrendo ao longo do processo de senescência.

O deslocamento de nutrientes em plantas monocárpicas parece ser parte de uma estratégia reprodutiva que otimiza o ciclo vital da espécie (Noodén *et al*, 2004). Nesse grupo de plantas acredita-se que o desenvolvimento dos frutos retira carboidratos e minerais (principalmente nitrogênio e fósforo) das partes vegetativas, levando-as à morte (Marschner, 1995).

Vários parâmetros fisiológicos podem ser utilizados para indicar a senescência, entre eles o sintoma de clareamento, típico em folhas. Essas mudanças estruturais são acompanhadas por variações bioquímicas, como

catabolismo das clorofilas e progressiva perda de proteínas cloroplastídicas, como a Rubisco e as proteínas do sistema coletor de luz (Brouquisse *et al*, 2001). Também pode ocorrer decréscimo de carotenóides, além do acúmulo de outros pigmentos e compostos secundários. Em folhas de soja, Fu *et al* (2000) verificaram o decréscimo nos teores de clorofila e carotenóides durante a senescência. Um evento importante é a desmontagem do aparato fotossintético, com decréscimo na atividade fotossintética (Woolhouse, 1984; Grover *et al*, 1992). Essa ocorrência, acompanhada por um suave decréscimo na extinção fotoquímica do fotossistema II, em folhas senescentes, pode expor as folhas a um excesso de energia de excitação, a qual, se não dissipada seguramente, pode resultar em danos ao FSII, em consequência da redução dos seus centros de reação (Demming-Adams *et al*, 1992). O declínio na capacidade fotossintética acompanhando a senescência foliar foi uma das primeiras observações deste processo em plantas superiores (Yoo *et al*, 2003). Ao contrário dos cloroplastos, núcleo e mitocôndrias se mantêm intactos até o último estágio, por serem requeridos para viabilidade celular (Simeonova *et al*, 2000).

A fim de contribuir para o conhecimento dos diversos aspectos envolvidos no desenvolvimento e na senescência das folhas de soja, julgou-se importante avaliar as modificações fisiológicas, desde a sua formação e amadurecimento até a finalização de seu processo de senescência e abscisão. Além disso, procurou-se observar o efeito da remoção das flores no processo de senescência foliar. Foram avaliados parâmetros de trocas gasosas, danos celulares e a participação de enzimas do sistema antioxidativo durante este processo, comparando plantas desenvolvendo normalmente com outras cuja senescência foi retardada pela remoção dos órgãos reprodutores.

2 – OBJETIVOS

Esse trabalho teve como propósito acompanhar e comparar algumas respostas fisiológicas em folhas de plantas de soja com órgãos reprodutores intactos (senescência normal) e folhas de plantas com órgãos reprodutores removidos (senescência retardada), em diferentes estádios de desenvolvimento.

O objetivo principal foi confirmar a hipótese de que o desenvolvimento de flores e frutos governa a senescência foliar da soja, pelo desencadeamento de estresse oxidativo. Para isso, foram avaliados diversos aspectos fisiológicos, relacionados com atividade fotossintética e com possíveis danos oxidativos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Sementes de soja (*Glycine max* L.) da variedade MG/BR 46 (Conquista), fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, foram selecionadas e tratadas com fungicida e inoculante (composto por bactérias do gênero *Rhizobium*, com turfa como substrato). Em seguida, foram colocadas para germinar em uma mistura de solo, esterco de curral curado e areia (3:1:1, v/v/v), em vasos plásticos de 3L. A adubação e a correção da acidez dessa mistura foram feitas de acordo com análise de solo e recomendações técnicas para a cultura (Ribeiro, 1999). Três plantas por vaso permaneceram em casa de vegetação, no período de fevereiro a junho de 2008, onde tiveram irrigação apropriada (solo mantido na sua capacidade de campo) e foram tratadas com inseticidas e fungicidas apropriados, quando necessário.

O experimento contou com dois tratamentos primários: plantas com órgãos reprodutivos intactos, que tiveram seu ciclo de vida sem interferência e plantas com órgãos reprodutivos removidos, por retirada manual de suas flores. Estes dois grupos de plantas foram acompanhados ao longo de todo o seu ciclo vital.

Todas as avaliações, nos dois tratamentos, foram feitas nos folíolos do 6º nó (4ª folha trifoliolada) e as análises de trocas gasosas e pigmentos foram iniciadas aos 22 dias, quando as folhas já se apresentavam

completamente expandidas e fotossinteticamente ativas. Aos 43 dias após o plantio, foram iniciados os outros tipos de análises.

Até o início da senescência, todas as avaliações foram feitas em intervalos semanais, à semelhança do executado por Fu *et al*, 2000. Após o início da senescência, os intervalos foram de 3 dias, até a ocorrência da abscisão do quarto trifólio.

3.2 Determinação de clorofilas e de carotenóides

Os teores de pigmentos (clorofila a, b e carotenóides) foram determinados de acordo com método descrito por Wellburn (1994). Dois discos foliares com diâmetro de 0,5 cm foram colocados em recipientes contendo 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃). Após 6 horas em temperatura ambiente, as absorvâncias dos extratos foram lidas a 480 nm, 649,1 nm e 665,1 nm, e os teores dos pigmentos determinados e expressos em $\mu\text{g cm}^{-2}$.

3.3 Trocas gasosas

As avaliações relacionadas com as trocas gasosas foram iniciadas após completa expansão dos folíolos, e foram feitas sempre às 9h. As taxas de assimilação líquida do carbono (A), condutância estomática (g_s), transpiração e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) foram medidas em sistema aberto, sob luz saturante artificial de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura e concentração de CO₂ ambiente, com analisador de gás infravermelho (IRGA) portátil (Li-6400 Li-Cor, USA), seguindo o método descrito por Vu *et al* (1986).

3.4 Análises de danos celulares

3.4.1 Peroxidação de Lipídios

Danos celulares foram avaliados por meio de peroxidação de lipídios, via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Cakmak & Horst (1991). Para isso, 0,150 g de folíolos foram homogeneizados em 2 mL de solução contendo 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 g por 15 minutos. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% em TCA 20% e todas as amostras foram incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo, seguido de centrifugação a 13000 g por 4 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968).

3.4.2 Extravazamento de eletrólitos

Os danos celulares foram avaliados também por meio de extravazamento de eletrólitos, conforme descrito por Lima *et al* (2002). Para isso, 10 discos de 1,2 cm foram colocados em 15 mL de água miliQ e deixados por 6 horas à temperatura ambiente (média de 25°C). A condutância inicial (Ci) foi estimada utilizando um condutivímetro (Biosystems LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Após essa leitura, as mesmas amostras foram colocadas em estufa a 90°C por 2 horas e feita uma segunda leitura (Cf). A permeabilidade relativa foi calculada pela relação $Ci/(Ci+Cf) \times 100$ (Tarhanen *et al*, 1999) e o resultado foi expresso em percentagem.

3.5 Peróxido de Hidrogênio

Amostras de 0,1 g de folíolos foram trituradas em nitrogênio líquido e então homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5 contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de 4 camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10000 g por 15 minutos. Todas as etapas foram realizadas a 4°C (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 25 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação contendo $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, para volume final de 2 mL. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos para os reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos das amostras, segundo Gay e Gebicki (2000). As concentrações de H_2O_2 nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

3.6 Atividades enzimáticas

3.6.1 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a determinação das atividades das enzimas peroxidases totais (POX), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e dismutase do superóxido (SOD), foram utilizados extratos enzimáticos brutos obtidos por meio da homogeneização de 0,3 g de folíolos. Estes foram fragmentados em almofariz, em 2 mL de solução de extração, constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) 1%. O homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos, a 12.000 g, a 4°C e o sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas e nas dosagens de proteína.

3.6.2 Dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da dismutase do superóxido foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 40 μL de extrato enzimático bruto foram adicionadas a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μM (Del Longo *et al*, 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15W mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm. A absorbância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por tempo igual, serviu de branco e foi subtraída da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971).

3.6.3 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada segundo Haver e McHale (1987). Alíquotas de 100 μL do extrato enzimático foliar bruto foram adicionadas a 2,9 mL de um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH7,0, e H_2O_2 12,5 mM. O decréscimo na absorbância a 240 nm, a 25°C, foi medido durante o primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Anderson *et al*, 1995) e resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.6.4 Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade das POX foi determinada seguindo-se os procedimentos descritos por Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 50 μL do extrato enzimático bruto de folhas foram adicionadas a 2,95 mL de uma mistura de reação

constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. O acréscimo na absorvância a 420 nm, a 25°C foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance & Maehley, 1955) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.6.5 Peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), e modificado por Koshiba (1993). Alíquotas de 200 μL de extrato enzimático foliar bruto foram adicionadas a 2,8 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano & Asada, 1981) e o resultado expresso em ηmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.6.6 Redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2)

O extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade da GR, foi obtido pela homogeneização de 0,15 g de folíolos em 2,0 mL de solução de extração, constituída de água destilada, EDTA 1 mM, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5, DTT 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, isoascorbato 10 mM, Triton x100 0,1% e PVPP. O homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos, a 15.000 g, e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade da GR. A seqüência de eventos foi executada a 4°C e a absorvância lida a 340nm. Determinou-se a atividade da GR segundo Carlberg e Mannervik (1985) e o resultado foi expresso em ηmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.7 Análise Quantitativa de Proteínas

As proteínas das amostras das folhas utilizadas foram quantificadas de acordo com método de Bradford (1976). Foram utilizados 5 µL de extrato e 95 µL de água para 900 µL de Reagente de Bradford. As absorbância foram lidas a 595 nm, e os dados finais foram utilizados para expressar as atividades das enzimas, por mg de proteína.

3.8 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x13 (2 tratamentos e 13 datas de avaliações), sendo 6 repetições para cada tratamento e data de análise, para as avaliações de trocas gasosas. Para as avaliações de pigmentos o esquema fatorial foi 2x14, sendo 5 repetições para cada tratamento. Para as demais avaliações, foi feito fatorial 2x11, sendo 4 repetições para cada tratamento.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa Sisvar 5.0, da Universidade Federal de Lavras. Além disso, para descrever um modelo de resposta ao longo do desenvolvimento das plantas, foi realizada análise de regressão, utilizando o programa OriginPro 7.0.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Processo de desenvolvimento da planta

A Tabela 1 mostra, de forma resumida, as principais alterações observadas ao longo do ciclo de vida das plantas mantidas com órgãos reprodutores intactos da variedade de soja, MG/BR 46 (Conquista).

Tabela 1: Principais eventos ao longo do ciclo vital de plantas de soja (*Glycine max*), variedade MG/BR 46, com desenvolvimento normal (órgãos reprodutores intactos), cultivadas em casa de vegetação.

Dias após germinação	Data	Coleta	Eventos
	13/02/08		Plantio
	20/02/08		Germinação total (Estádio VE)
3	23/02/08		Cotilédones completamente expandidos (Estádios VC e V1)
7	27/02/08		Surgimento do 2º trifólio (Estádio V2)
22	13/03/08	1	4º trifólio completamente expandido (Estádio V4) Início de análises de trocas gasosas e pigmentos
29	20/03/08	2	5º trifólio completamente expandido (Estádio V5)
36	27/03/08	3	Início do florescimento (Estádio R1)
43	03/04/08	4	Início de coletas para análises restantes
50	10/04/08	5	Formação de vagens (Estádio R4)
57	17/04/08	6	Surgimento de novos ramos
64	24/04/08	7	Enchimento de grãos (Estádio R5)
70	30/04/08	8	Novos trifólios
78	08/05/08	9	Novos trifólios
85	15/05/08	10	Amadurecimento de grãos e início da senescência (Estádio R7)
92	22/05/08	11	Novos trifólios
99	29/05/08	12	Queda dos cotilédones
103	02/06/08	13	Início da abscisão dos primeiros trifólios (Estádio R8)
106	05/06/08	14	Senescência total e abscisão do 4º trifólio

As plantas que tiveram seus órgãos reprodutores removidos mantiveram suas folhas sempre verdes e maiores, além de apresentarem maior número de ramos laterais (Figura 1). A variedade escolhida, MG/BR 46 (Conquista), é considerada de ciclo semi-tardio, de 110 a 140 dias. A melhor época de cultivo em campo é de 15 de outubro a 15 de novembro, época do ano em que o período de luz chega a quase 14 horas/dia (primavera/verão). Acredita-se que devido à época do experimento, às condições de casa de vegetação (incluindo radiações menores) e pela soja responder a fotoperíodo curto, seu ciclo tenha sido um pouco reduzido. Durante o período inicial de cultivo, o máximo de luz que se teve foi pouco mais de 12 horas/dia em Viçosa (Fonte: br.weather.com), entre plantio e florescimento, fase decisiva para o ciclo da soja.



Figura 1: Estádios finais de plantas de soja (*Glycine max*), variedade MG/BR 46, nos dois tratamentos: plantas com órgãos reprodutores removidos e plantas com órgãos reprodutores intactos.

Durante o desenvolvimento das plantas, há uma competição por nutrientes entre os órgãos vegetativos e reprodutivos. Flores e frutos são poderosos drenos de sais minerais, açúcares e aminoácidos, e acumulam

grandes quantidades dessas substâncias, o que resulta em decréscimo na quantidade presente nas folhas. Os mecanismos pelo quais os frutos podem desviar nutrientes do interior das folhas ainda não estão completamente esclarecidos, mas alguns hormônios, especialmente citocininas e ácido abscísico devem estar envolvidos (Noodén *et al*, 1990; Zacarias e Reid, 1990).

A senescência foliar é usualmente correlacionada com o decréscimo de citocininas nas folhas (Noodén *et al*, 1997). As citocininas vindas da raiz via xilema são conhecidas por retardar a senescência foliar e seu declínio pode ser importante na senescência das folhas de soja. As vagens reduzem a produção desse hormônio nas raízes, nos primeiros estádios de desenvolvimento e esse decréscimo é requerido para a senescência monocárpica em soja. Dessa forma, a remoção contínua das vagens causa um aumento dos níveis de citocinina na seiva xilemática, os quais retardam a senescência foliar (Noodén *et al*, 1990). Em contraste, ácido abscísico é considerado um promotor da senescência foliar (Tadas *et al*, 1999), funcionando como sinalizador do transporte de assimilados para sementes e frutos em desenvolvimento (Yang *et al*, 1999).

4.2 Teores de clorofilas e de carotenóides

Os teores de clorofilas a, b e carotenóides no 4º trifólio das plantas apresentaram variações semelhantes, mas dependentes do tipo de tratamento (Figuras 2, 3 e 4, respectivamente). Os teores destes pigmentos aumentaram significativamente nos dois tratamentos nas fases iniciais do ciclo, porém nas plantas com órgãos reprodutores intactos observou-se queda drástica e significativa após a formação de vagens (iniciada aos 50 dias de idade) e início de enchimento dos grãos. Nas plantas com órgãos reprodutores removidos, que não passaram por essas fases, os teores de clorofilas a e b tenderam a permanecer estáveis, próximos aos valores máximos (cerca de 20 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para clorofila a e de 8 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para clorofila b) até o fim do acompanhamento das plantas. Os teores de carotenóides totais apresentaram leve tendência de decréscimo nas plantas com flores

removidas, ao contrário das outras, nas quais os níveis de carotenóides caíram para abaixo de $0,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ ao final do ciclo. Os níveis máximos de carotenóides alcançados foram de aproximadamente $4 \mu\text{g cm}^{-2}$, em ambos os tratamentos, por volta do 50º ao 70º dia.

Além disso, o pico máximo de clorofilas a e b nas plantas com órgãos reprodutores removidos foi por volta dos 85 dias de idade, quando as plantas com órgãos reprodutores intactos apresentaram queda drástica nestes pigmentos. Em plantas de soja desfloradas continuamente, Wittenbach (1982) observou o mesmo resultado após quatro semanas.

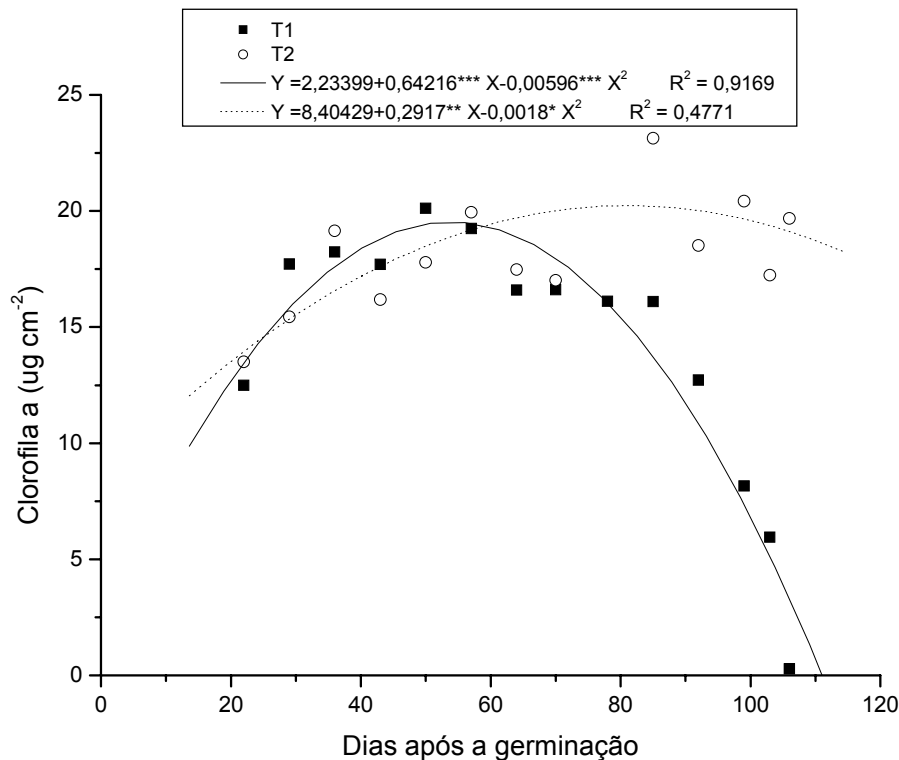


Figura 2 – Teores de clorofila a no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

Os níveis de clorofila a sempre se mantiveram acima dos níveis de clorofila b ao longo do desenvolvimento (Figuras 2 e 3), resultado também obtido por Jiang *et al* (2006). Em plantas “desfloradas”, Crafts-Brandner e

Egli (1987) observaram declínio mais lento nos níveis de clorofilas, o que resultou na manutenção das folhas verdes, mesmo após a abscisão foliar dos controles.

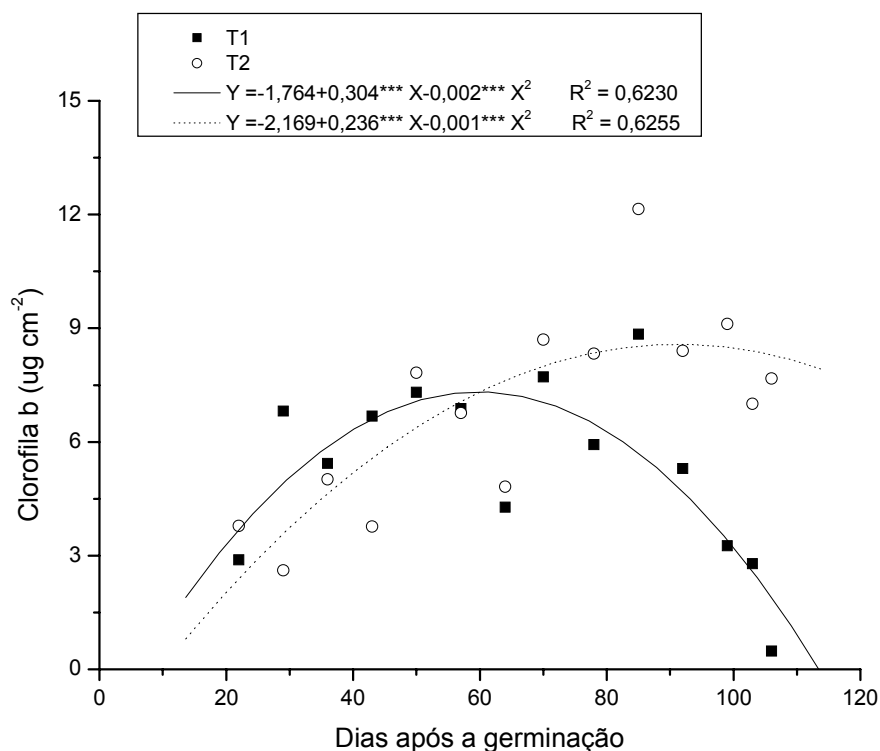


Figura 3 – Teores de clorofila *b* no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

Alguns autores sugerem que reduções nas concentrações de clorofilas podem estar associadas a processos fotooxidativos (Krause, 1988) ou a alterações na organização dos fotossistemas, servindo como fotoproteção (Ottander et al, 1995; Elvira et al, 1998; Kranner et al, 2002). Essa queda pode estar associada à maior destruição de pigmentos para realocação de nutrientes, como carbono, nitrogênio e magnésio, que compõem a estrutura da clorofila, para o grão (Hayati et al, 1995), já que as plantas senescendo normalmente tiveram maiores quedas que as plantas desfloradas.

Os teores de carotenóides caíram significativamente a partir da fase de enchimento de grãos (64 dias) em plantas senescendo normalmente, enquanto que no outro grupo de plantas (Figura 4) houve apenas ligeira queda, permanecendo em torno de $3 \mu\text{g cm}^{-2}$. Além de sua função de pigmentos acessórios na captação de luz, os carotenóides funcionam como fotoprotetores, dissipando a energia armazenada, pela transferência de excitação (Biswal, 1995). Se tal energia não for dissipada, pode ocorrer a formação de oxigênio singleto (O_2^-) e outras espécies reativas de oxigênio (Asada, 1999). Portanto, essa queda nos teores de carotenóides em plantas com órgãos reprodutores intactos é uma evidência do estresse oxidativo relacionado com o processo de senescência e com a possível destruição do aparato fotossintético (Jiang *et al*, 2005).

O decréscimo nos teores de clorofilas e carotenóides durante a senescência de folhas de soja também foi observado por Fu *et al* (2000), visto ser uma das principais manifestações da senescência foliar resultante do declínio na razão síntese/degradação de pigmentos (Lu *et al*, 2001).

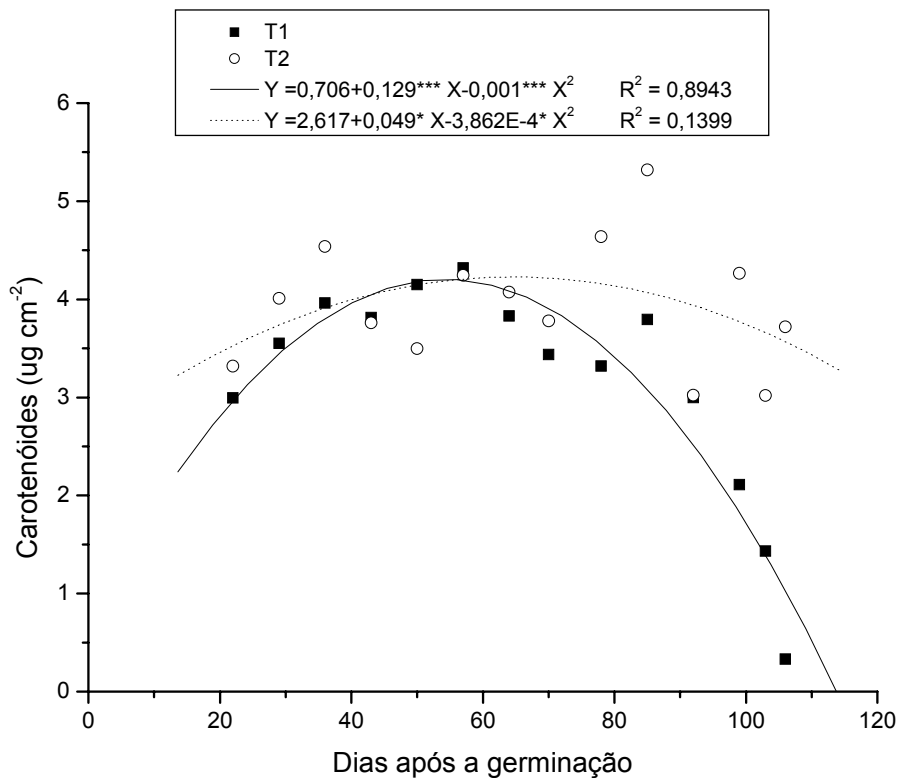


Figura 4 – Teores de carotenóides no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

Em relação à razão clorofila *a/b* (Figura 5), em plantas com órgãos reprodutores intactos foi observada queda linear desde o início das coletas até o final do ciclo, quando essa razão atingiu valor de 1,8. Em plantas com órgãos reprodutores removidos, essa queda aconteceu de forma aproximadamente linear até por volta de 85 dias de idade, seguida de tendência de estabilização até o fim do experimento, com valores finais em torno de 2,3. Estes dados confirmam a observação visual de que a senescência do quarto trifólio foi retardada pela remoção de flores, resultando em redução na degradação de clorofila *a*, que foi mais elevada nas plantas com flores intactas.

Tang *et al* (2005) observaram queda na razão clorofila *a/b* durante a senescência foliar de arroz e Camp *et al* (1982) observaram o mesmo em trigo.

Quando a absorção de luz pelos pigmentos torna-se excedente à capacidade de uso para produção de NADPH e ATP (para síntese de carboidratos), a fotossíntese é progressivamente inibida, ocorrendo destruição dos pigmentos, quando a condição adversa se prolonga. Diversos agentes estressores (bióticos e abióticos) diminuem a concentração de clorofila *a* nos tecidos fotossintéticos, tanto pelo aumento da degradação quanto pela inibição da biossíntese (Gan, 2007).

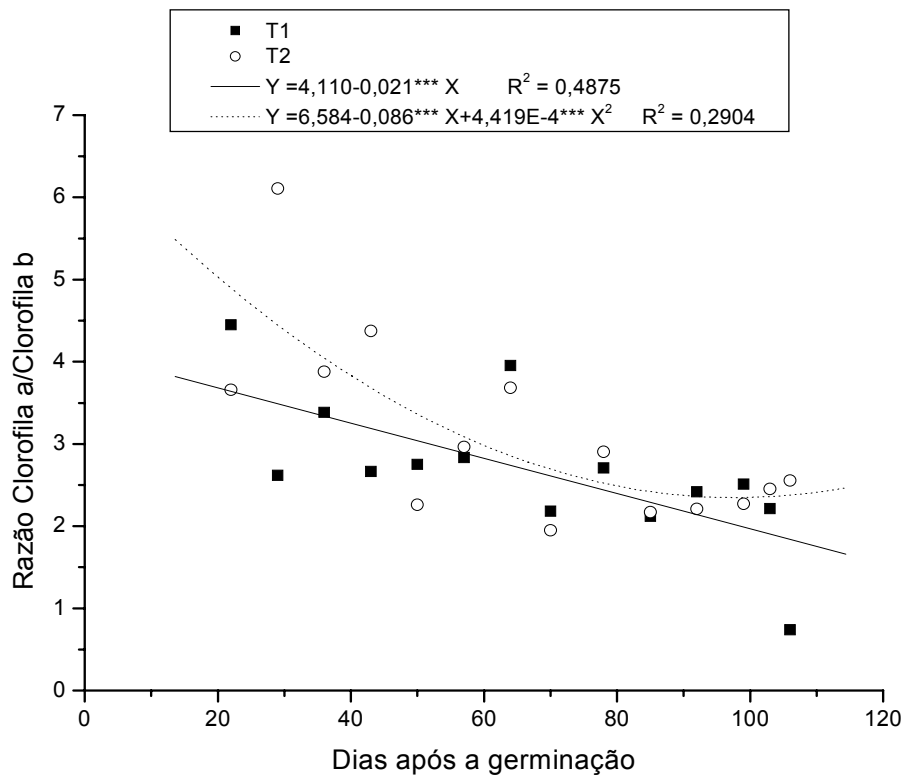


Figura 5 – Razão clorofila *a/b* no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

4.3 Trocas Gasosas

As maiores taxas de assimilação líquida de carbono (A) no 4º trifólio (Figura 6) ocorreram entre os 29 e 50 dias de idade, nos dois tratamentos, que corresponde ao período após a expansão completa do 5º trifólio até início da formação de vagens nas plantas intactas. Nas plantas controle (órgãos reprodutores intactos) houve queda muito acentuada em A a partir do 43º dia, chegando a valores inferiores a $1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nas plantas com órgãos reprodutores intactos, foram mantidos valores finais mais elevados (em torno de $6,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de A , ao final do experimento. A maior queda da fotossíntese em plantas senescendo é, possivelmente, consequência da queda dos teores de pigmentos presentes nos cloroplastos (Figuras 2, 3 e 4) e na condutância estomática (Figura 7).

Nos dois tratamentos, a maior capacidade de assimilação de CO_2 foi apresentada na fase de início do florescimento, devido à funcionalidade plena do aparato fotossintético. Essa capacidade se perdeu ao longo do desenvolvimento, semelhante ao observado por Jiang *et al*, 2005. Essa resposta também foi observada em folhas de trevo branco (Yoo *et al*, 2003) e arroz (Tang *et al*, 2005). Em plantas de soja com órgãos reprodutores removidos o declínio menos acentuado nos valores de A foi observado também por Lenz *et al* (1973), Thorne *et al* (1974), Mondal *et al* (1978), Wittenbach (1982) e Fu *et al* (2000). Um detalhe importante é que folhas de algumas espécies anuais exibem um progressivo declínio na razão fotossintética depois da expansão total das folhas (Woolhouse, 1967; Jiang *et al*, 1993). Isso justifica a menor, mas presente queda na fotossíntese, mesmo no 4º trifólio de plantas com órgãos reprodutores removidos.

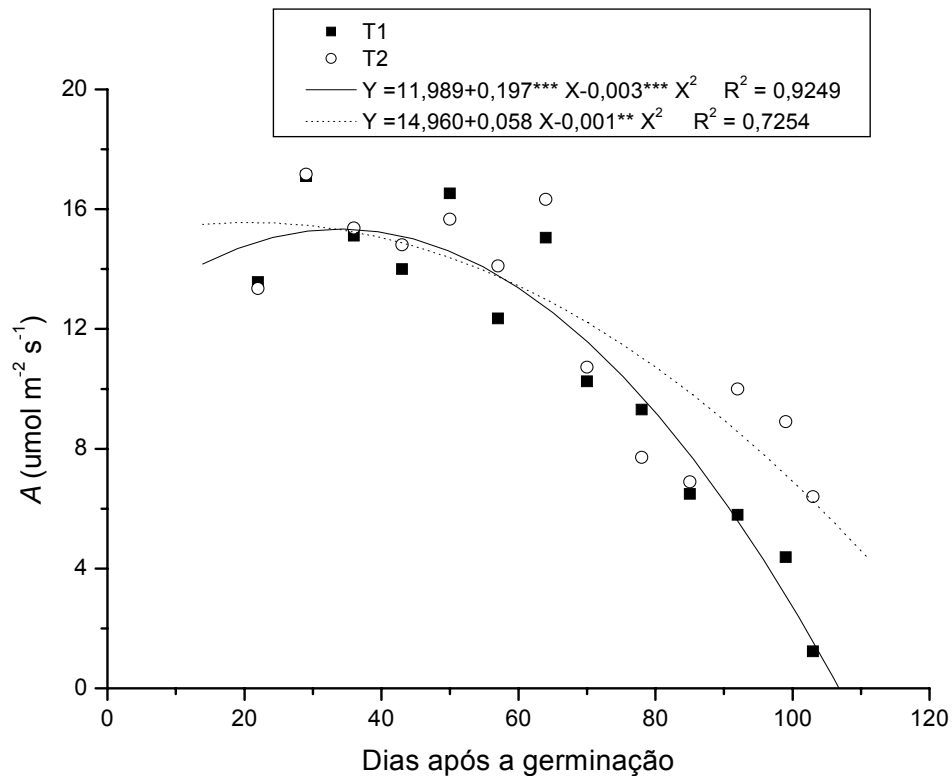


Figura 6 – Taxas de assimilação líquida de carbono (A) no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

A queda na condutância estomática (g_s) foi constante nas plantas intactas, até valores próximos de $0,05 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto que nas plantas desfloradas, após queda semelhante até cerca do 85º dia de idade, ocorreu tendência à estabilização em valores em torno de $0,15 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas últimas coletas (Figura 7).

As razões entre as concentrações interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) variaram inicialmente de modo similar no 4º trifólio das plantas dos dois tratamentos, com ligeiro decréscimo entre 22 e 57 dias de idade (valores próximos a 0,77). A partir de então, a razão C_i/C_a voltou a aumentar ligeiramente nas plantas com flores intactas (chegando a quase 0,9) e permaneceu constante naquelas que tiveram suas flores removidas.

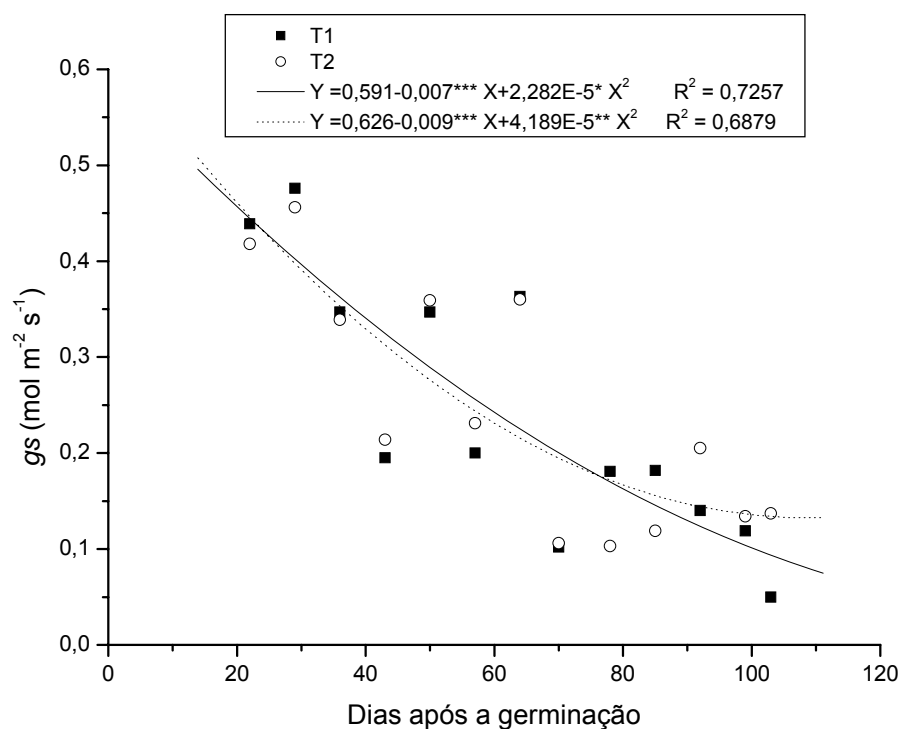


Figura 7 – Condutância estomática (g_s) no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

O presente trabalho foi realizado num período de transição de estações. O início, em fevereiro, foi caracterizado por chuva e calor, condição bem diferente da encontrada nas etapas finais do trabalho, em maio/junho, época com baixa umidade relativa do ar e início de frio. Tais alterações ambientais podem justificar as quedas em A e g_s , mesmo nas plantas com órgãos reprodutores removidos. Nos dois casos, as reduções na condutância estomática contribuíram para as quedas na atividade fotossintética, além das reduções nos teores de clorofila.

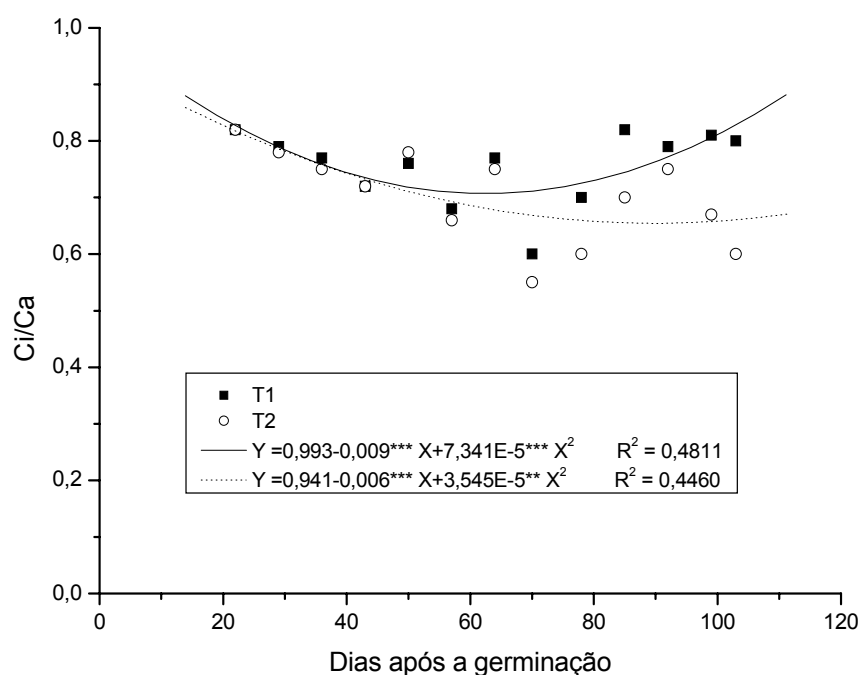


Figura 8 – Razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (Ci/Ca) no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

Quando há alta atividade fotossintética, a quantidade interna de gás carbônico tende a diminuir, pois o mesmo está sendo incorporado e, dessa forma, há uma tendência de se promover maior abertura estomática, levando à maior condutância estomática (Farquhar e Sharkey, 1982). Nas plantas com órgãos reprodutores intactos, cuja fotossíntese teve queda significativa, houve decréscimo acentuado em *g_s*, levando ao aumento de CO₂ interno.

4.4 Danos celulares

4.4.1 Peroxidação de lipídios

No 4º trifólio das plantas intactas, os teores de aldeído malônico (MDA) decresceram lenta e progressivamente dos 43 dias até o final do seu ciclo vital (Figura 9), mantendo valores em torno de 55 $\eta\text{mol g}^{-1}$ MF.

Entretanto, nas plantas que tiveram as flores removidas, houve constante aumento, atingindo valores em torno de $160 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF, cerca de três vezes superiores ao mínimo, próximo aos 100 dias de idade. Aumento semelhante também foi visualizado por Srivalli e Khanna-Chopra (2004), em plantas de trigo com espiga removida.

A peroxidação de lipídios gera o aldeído malônico (MDA), que é um produto da decomposição de ácidos graxos das biomembranas e é uma forma de atestar a presença de radicais livres. (Lin e Kao, 2000; Munné-Bosch *et al*, 2002). Prochazkova *et al* (2001) detectaram, em folhas de milho, aumento na peroxidação de lipídeos, assim como ocorreu em folhas de arroz com senescência promovida por alagamento (Lin *et al*, 2000).

A elevação nos teores de MDA, indicativo de danos às membranas, observada nos trifólios de plantas que tiveram suas flores removidas é aparentemente contrária às expectativas. Essas plantas apresentaram elevada atividade fotossintética, que requer integridade de membranas em geral, ao contrário das intactas.

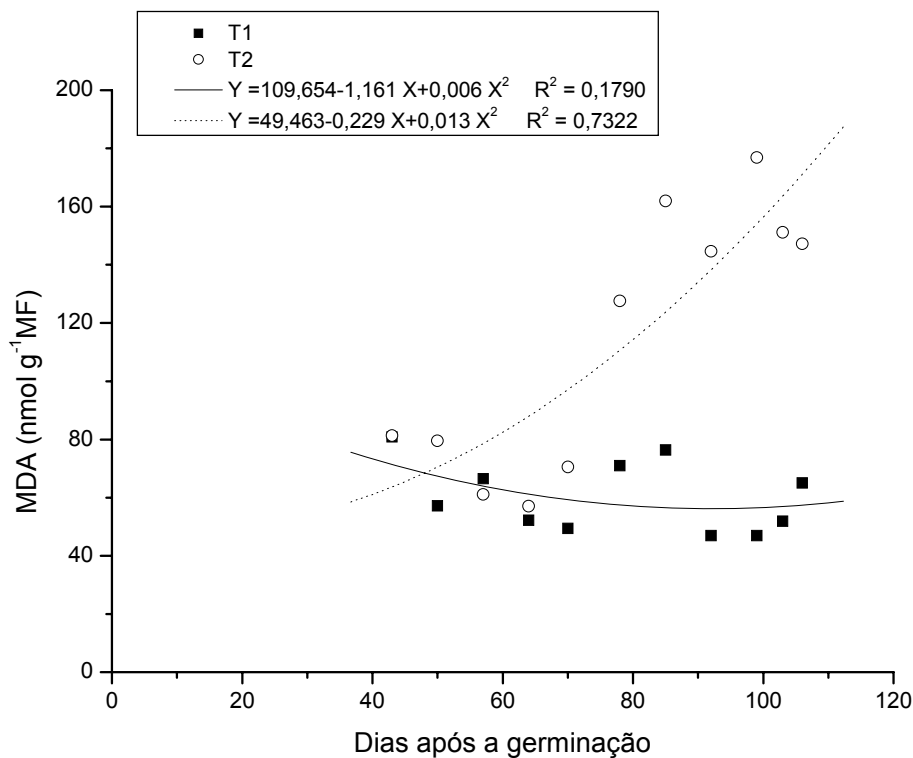


Figura 9 – Concentrações de aldeído malônico no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

4.4.2 Extravazamento de Eletrólitos

O extravazamento de eletrólitos no 4º trifólio de plantas intactas apresentou ligeira queda até cerca dos 60 dias de idade, seguida de aumento até o final do experimento, quando valores próximos a 7,5% de extravazamento foram atingidos (Figura 10). Nas plantas com órgãos reprodutores removidos também houve queda, que persistiu até cerca de 90 dias de idade, com tendência de estabilização do extravazamento até o final do experimento, mantendo valores finais médios de 4,7%.

Durante a senescência, ocorrem alterações na permeabilidade das membranas e a redução da capacidade de retenção de solutos (Ferguson *et al.*, 1973; Prochazkova *et al.*, 2001). Os maiores índices de extravazamento

de eletrólitos refletem essa maior permeabilidade, fato também ligado ao estresse oxidativo (Prochazkova *et al*, 2001). Em plantas senescendo normalmente, o grande percentual de extravazamento de eletrólitos não coincide com as baixas concentrações de MDA (Figura 9). Em plantas desfloradas, também há contradição, sendo que o baixo percentual de extravazamento não condiz com altas concentrações de MDA.

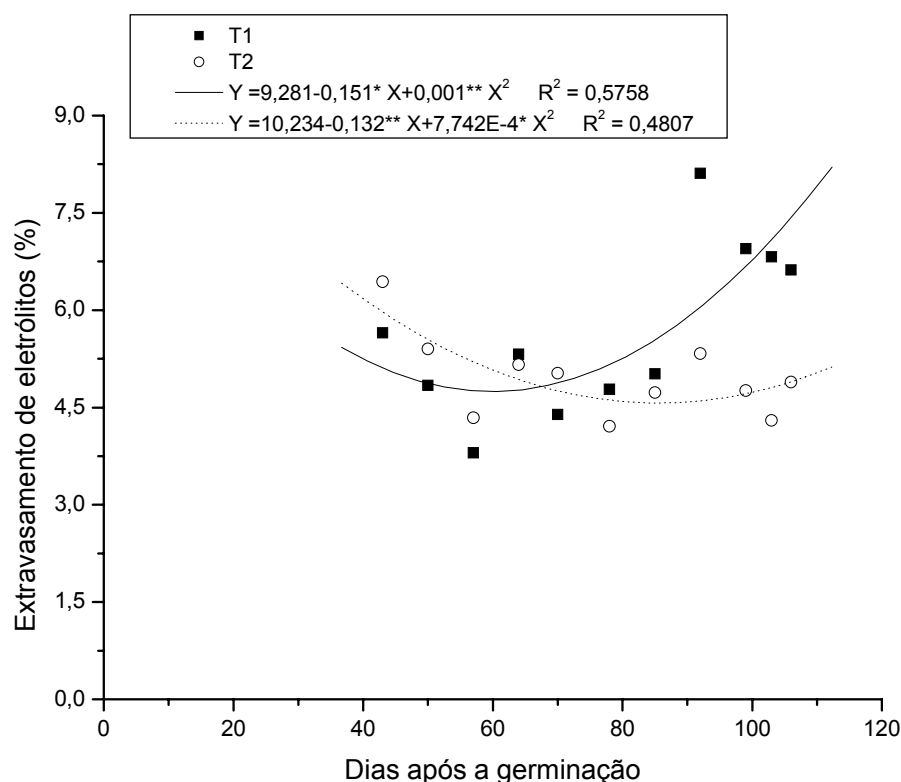


Figura 10 – Percentagens de extravasamento de eletrólitos no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

4.5 Peróxido de Hidrogênio

No 4º trifólio das plantas com órgãos reprodutores intactos, os teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) aumentaram em cerca de 50%, tendo seu pico de 67 μmol g⁻¹ MF entre os 64º e 78º dias, seguido de queda com o

início do amadurecimento de grãos (Figura 11). Já em plantas com órgãos reprodutores removidos, os teores de peróxido de hidrogênio aumentaram desde o início das avaliações, atingindo valores máximos (por volta de 180 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) ao final das avaliações. Ressalta-se que, neste caso, os teores de H_2O_2 chegaram a ser cerca de três vezes superiores aos valores encontrados no pico observado para plantas intactas.

A remoção de H_2O_2 depende de um sincronismo elevado de todas as enzimas antioxidativas (Jiang *et al*, 2005). Provavelmente, a diminuição nos teores de H_2O_2 observada nos estádios finais das plantas senescendo normalmente deve-se ao aumento das atividades das enzimas responsáveis pela eliminação de H_2O_2 , tais como APX e POX. Os níveis de EROs estão sob controles enzimáticos e não enzimáticos, sendo que o aumento de determinado intermediário (como o peróxido de hidrogênio, por exemplo) pode resultar no aumento da atividade de alguma enzima ou de algum metabólito, como o ascorbato (Dipierro *et al*, 2005). Tal aumento na atividade enzimática pode promover a queda na concentração desse intermediário e de outras EROs. Os presentes dados são contrastantes com os obtidos por Prochazkova *et al* (2001), que trabalhando com folhas de milho, observaram aumento nos teores de peróxido de hidrogênio durante a senescência.

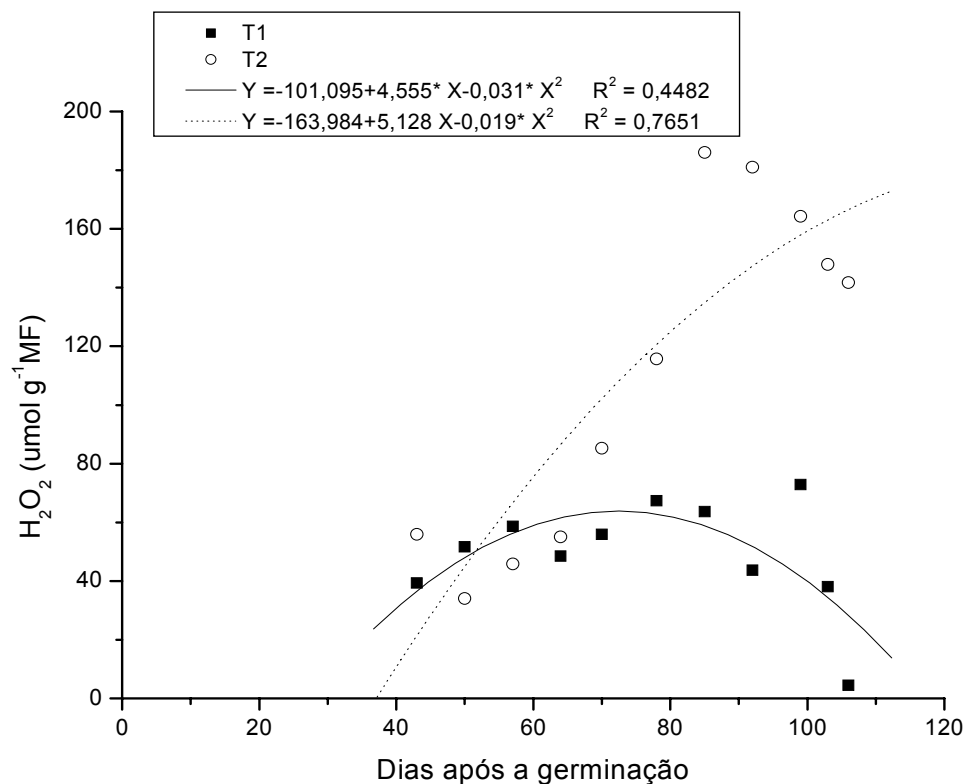


Figura 11 – Teores de peróxido de hidrogênio no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

Os elevados teores de H₂O₂ são indicativos de estresse oxidativo, ao contrário do que se observou nas folhas das plantas-controle, cujos níveis se mantiveram mais baixos que as plantas desfloradas. Os trifólios das plantas com órgãos reprodutores removidos, por sua vez, apresentaram elevados teores de peróxido de hidrogênio, mas mantiveram normal sua atividade fotossintética, além de baixo extravazamento de eletrólitos.

4.6 Atividades Enzimáticas

Em plantas intactas, a atividade da SOD apresentou queda inicial, com pequena estabilidade após os 64 dias de idade, mantendo valores

próximos a $7,0 \text{ U SOD mg}^{-1} \text{ proteína}$ (Figura 12). Esse resultado está de acordo com os baixos teores de peróxido de hidrogênio nesse tratamento (Figura 11), pois seus níveis se mantiveram baixos, até o final do experimento. Além disso, nos 4^{os} trifólios dessas plantas, as enzimas que catalisam a degradação dessa espécie reativa tiveram suas atividades em altos níveis (dados mostrados a seguir), o que deve ter colaborado para manter baixa a concentração de peróxido de hidrogênio.

Nas plantas com órgãos reprodutores removidos, a SOD apresentou queda na atividade até os 64^o dias (Figura 12), sendo que as maiores concentrações de peróxido de hidrogênio foram encontradas aos 70 dias de idade (Figura 11). Além disso, os valores máximos de H_2O_2 ($180 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$) nessas plantas ocorreram por volta dos 92 dias de idade, momento no qual a atividade da SOD se elevou novamente, até atingir valores cerca de 15 vezes superiores aos iniciais.

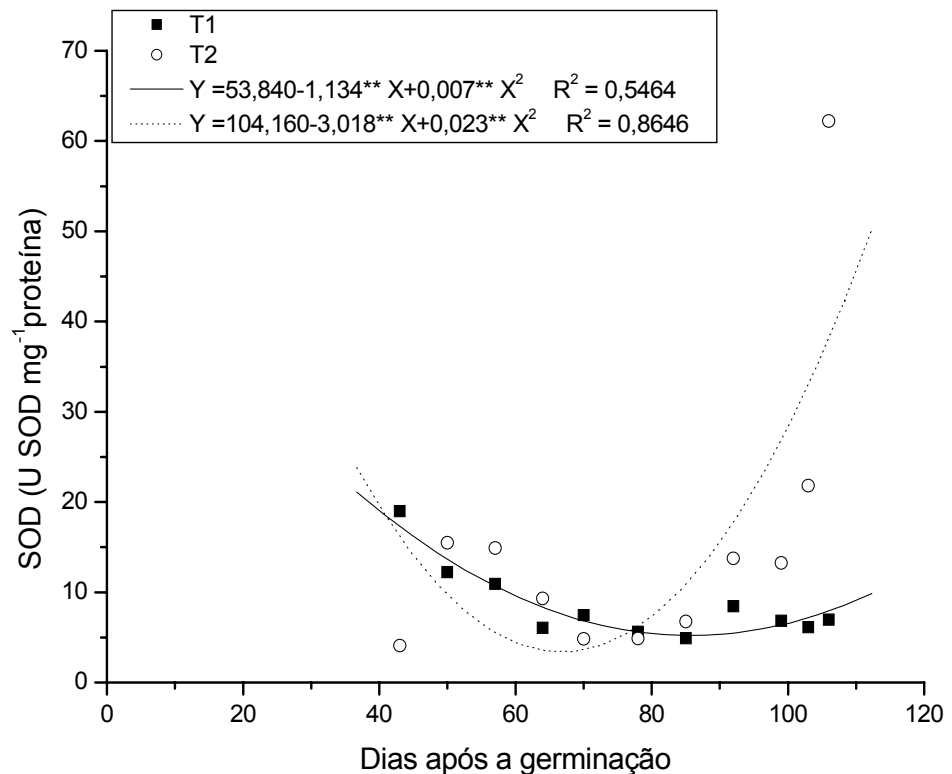


Figura 12 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) no 4^o trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com

órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

A atividade da catalase no 4^o trifólio das plantas, nos dois tratamentos, caiu acentuada e progressivamente ao longo de todo o desenvolvimento, atingindo valores três vezes menores que os iniciais (Figura 13) e concluindo com tendência de estabilização ao final do experimento. Esse decréscimo, também obtido por Fu *et al* (2000), é um dos fatores que podem contribuir para o acúmulo de peróxido de hidrogênio nas plantas com órgãos reprodutores removidos (Figura 11), indicando que a enzima não teve atividade suficiente para a decomposição do H₂O₂ nessas plantas, ou sua atuação não esteve relacionada com a senescência. O balanço entre as atividades de SOD e APX ou CAT nas células é crucial para determinar o nível de “steady-state” de peróxido de hidrogênio (Mittler, 2002).

O elevado estresse também pode inibir a síntese da enzima ou levar a uma mudança na montagem das suas subunidades (MacRae and Fergusam, 1985; Somashekaraiah *et al*, 1992), o que pode explicar o declínio em sua atividade. Essa resposta também foi relatada em trabalho com *Arabidopsis thaliana*, por Jung, 2004. Mizuno *et al* (1998) acreditam que a proteção das plantas contra o acúmulo de peróxido vem de uma ação conjunta das CATs com as APXs. As diferentes afinidades da APX e CAT pelo H₂O₂ sugerem que a peroxidase do ascorbato é responsável pela fina modulação de sinalização da espécie reativa, enquanto a catalase remove o excesso durante o estresse (Mittler, 2002). As plantas-controle podem ter apresentado essa resposta, o que explica o decréscimo da atividade da catalase, visto que também houve decréscimo nas concentrações de peróxido de hidrogênio.

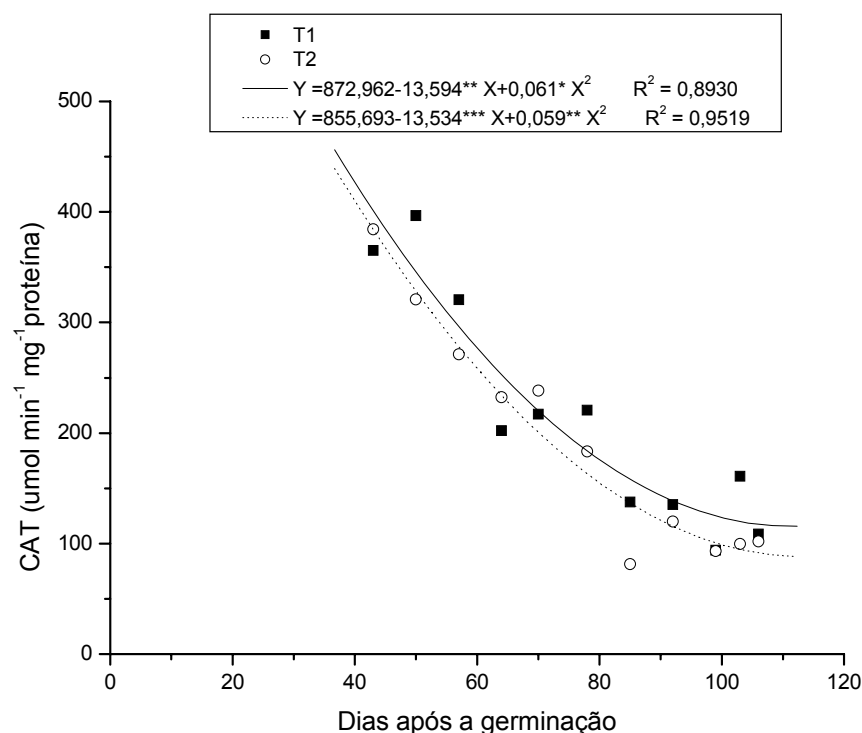


Figura 13 – Atividade da catalase (CAT) no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

As atividades de peroxidases totais (Figura 14) e peroxidase do ascorbato (Figura 15) apresentaram respostas semelhantes nos 4^{os} trifólios das plantas-controle. Ambas tiveram queda em suas atividades no início da floração, seguidas de aumento acentuado após o amadurecimento de grãos e início do processo de senescência. Fu *et al* (2000) também obtiveram esse tipo de resposta em soja e sugerem que a queda nas concentrações de peróxido de hidrogênio pode ser devida à alta capacidade de POX e APX de catalisar a degradação de peróxido de hidrogênio. O mesmo não aconteceu nas plantas com órgãos reprodutores removidos, cujas atividades enzimáticas se mantiveram em baixos níveis, inclusive com ligeira e progressiva queda, no caso da POX (chegando a valores abaixo de $20 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). Tais quedas podem justificar o acentuado aumento nos níveis de H_2O_2 nas plantas que tiveram suas flores removidas.

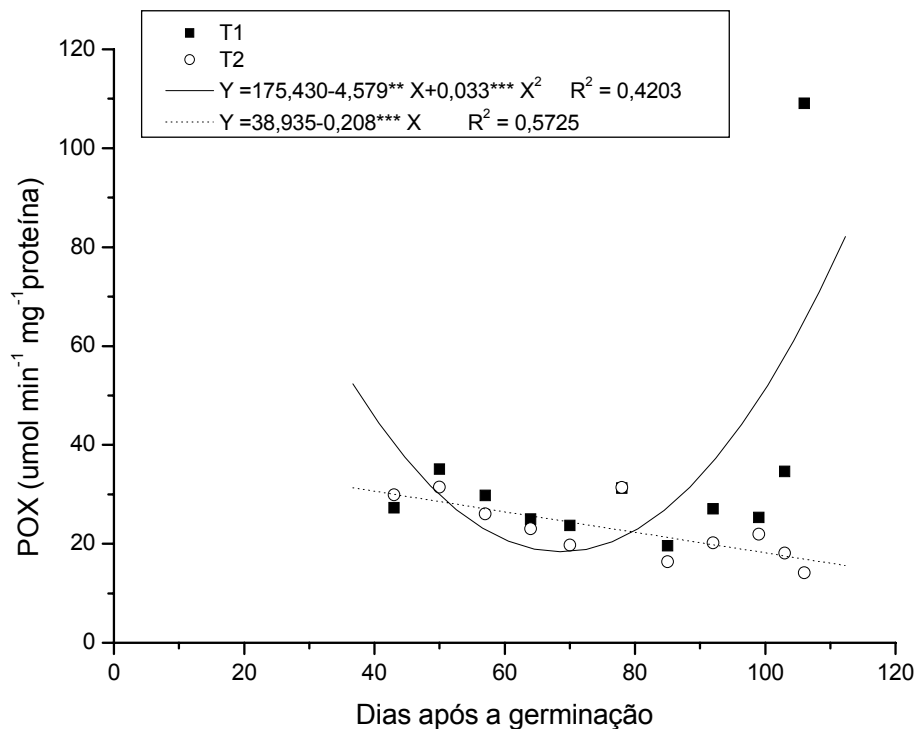


Figura 14 – Atividade da peroxidase (POX) no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

O 4º trifólio das plantas com órgãos reprodutores removidos não apresentou variações significativas nas atividades da APX, que se mantiveram sempre muito baixas ao longo do desenvolvimento, com valores não variando muito de $750 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Figura 15). As plantas com órgãos reprodutores intactos tiveram uma ligeira queda inicial seguida por forte elevação em seus níveis, com o amadurecimento de grãos e início da senescência (chegando a valores até onze vezes maiores que os das plantas desfloradas). Resposta semelhante também foi encontrada em soja exposta ao inseticida Deltamethrin (Bashir *et al*, 2007), onde o aumento em sua atividade foi considerado indicativo de que APX atua para eliminar as espécies reativas de oxigênio produzidas em condições de estresse.

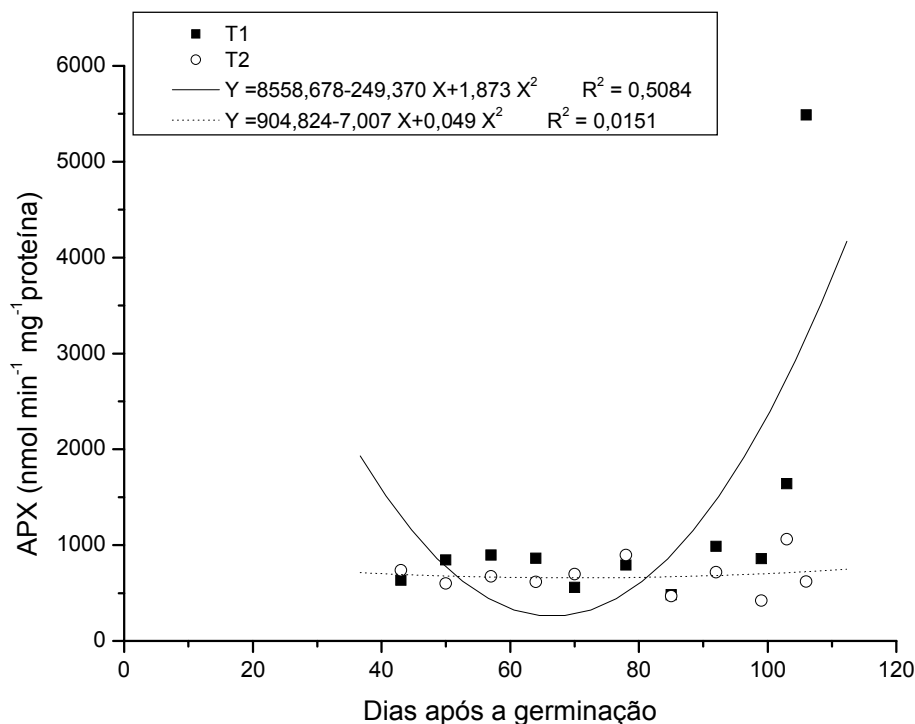


Figura 15 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) no 4º trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: $0,05 > p \geq 0,01$; **: $0,01 > p \geq 0,001$; ***: $p < 0,001$.

Segundo Lin & Kao (2000) e Alscher et al (2002), as SODs têm papel importante e primário na redução da peroxidação de lipídios, preservando o metabolismo celular contra ação dos radicais superóxidos (O_2^-), uma vez que as dismutases do superóxido catalisam a dismutação do ânion superóxido (O_2^-), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Giannopolitis et al, 1977).

No entanto, a eliminação de radicais superóxido pode não ser completa, e parte de suas moléculas é utilizada como substrato para originar o radical hidroxila (HO^\bullet), juntamente com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Scandalios, 1993). As peroxidases e as catalases estão entre as enzimas que destroem o H_2O_2 (Asada et al, 1987).

A redutase da glutatona teve sua atividade elevada intensamente da fase de formação de vagens à de enchimento de grãos, dos 50 a 85 dias de

idade (Figura 16), nos 4^{os} trifólios das plantas nos dois tratamentos, atingindo valores próximos entre si (média de 29 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína). Em plantas com órgãos reprodutores intactos, esse aumento pode estar relacionado às concentrações de peróxido de hidrogênio, que decresceram a partir do 64^o dia de idade. Em seguida, a atividade de GR decresceu drasticamente ao final do experimento, mantendo atividade nas plantas desfloradas pouco menor à das plantas que senesciam normalmente. Os dois tipos de plantas apresentaram o mesmo padrão de atividade, o que podem indicar que essa enzima, assim como a catalase, não esteve envolvida no processo de senescência.

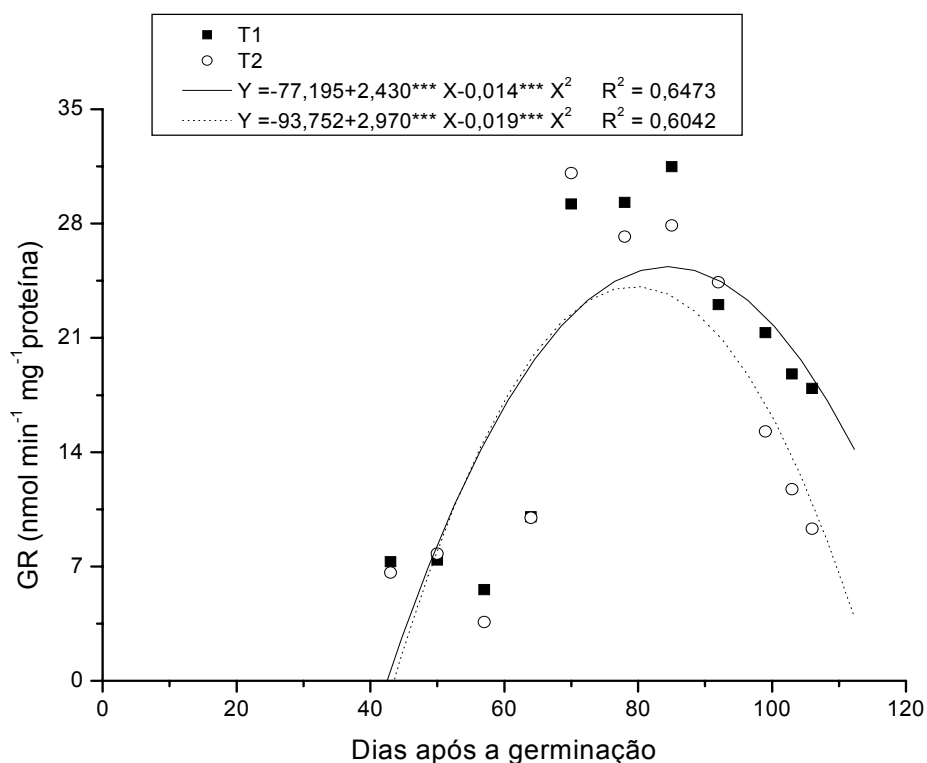


Figura 16 – Atividade da redutase da glutatona (GR) no 4^o trifólio de soja, *Glycine max*, variedade MG/BR 46, ao longo do desenvolvimento, em plantas com órgãos reprodutores intactos (T1) e plantas com órgãos reprodutores removidos (T2). Níveis de significância: *: 0,05 > p ≥ 0,01; **: 0,01 > p ≥ 0,001; ***: p < 0,001.

As GRs também atuam removendo o excesso de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). São enzimas dependentes de NAD(P)H, que catalisam a redução da glutatona oxidada (GSSG) em duas moléculas de glutatona

reduzida (GSH) (Calberg e Mannervik, 1985). São componentes do ciclo ascorbato-glutationa, participando juntamente com as APXs, redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) na remoção do excesso de H_2O_2 e outras espécies reativas de oxigênio (Foyer *et al*, 1997; Mittler, 2002). Além disso, a atividade da redutase da glutathione pode compensar os baixos níveis de catalase (Figura 13) e de peroxidase do ascorbato (Figura 15) em plantas com órgãos reprodutores removidos.

5 – CONCLUSÕES

As folhas das plantas com órgãos reprodutores intactos avaliadas apresentaram perda de pigmentos, queda na atividade fotossintética, danos celulares e estresse oxidativo, chegando à senescência do organismo como um todo. De forma contrária, as folhas das plantas com órgãos reprodutores removidos mantiveram suas funções fisiológicas próximas ao normal até o fim do experimento.

As plantas intactas chegaram à senescência, com queda nas atividades fotossintéticas, que não foram acompanhadas por aumento na peroxidação de lipídios nem na produção de H_2O_2 . Esses resultados indicam que a senescência deste grupo de plantas não deve ter sido causada e/ou acompanhada por estresse oxidativo.

Nas plantas desfloradas, apesar da intensa produção de H_2O_2 , as atividades das enzimas antioxidantes se mantiveram baixas. Nestas plantas, a remoção dos órgãos reprodutores pode ter levado a estresse oxidativo. No entanto, tal estresse não resultou em senescência foliar, já que essas plantas mantiveram suas folhas verdes e fotossinteticamente ativas até o final do experimento.

6 – BIBLIOGRAFIA

- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany** 53:1331-1341
- Anderson, M. D., Prasad T. K., Stewart C. R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology** 109:1247-1257
- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology** 50:601-639
- Asada K., Takahashi M. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, in: Kyle D. J., Osmond C. D., Arntzen C. J. (Eds.), *Photoinhibition*. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, 227-287
- Bashir F., Mahmooduzzafar, Siddiqi T. O., Iqbal M. (2007) The antioxidant response system in *Glycine max* (L.) Merr. exposed to Deltamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. **Environmental Pollution** 147:94-100
- Beauchamp C., Fridovich, I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 44:276-287
- Biswal B. (1995) Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. **Journal of Photochemistry and Photobiology** 30:3-13
- Biswal B., Biswal U. C. (1999) Leaf senescence: physiology and molecular biology. **Current Science** 77:775-782

- Bor M., Özdemir F., Türkan I. (2003) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science** 164:77-84
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254
- Brouquisse R., Evrard A., Rolin D., Raymond P., Roby C. (2001) Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. **Plant Physiology** 1:3-22
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000) Senescence and programmed cell death. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1044p.
- Cakmak I., Horst J. H. (1991) Effects of aluminium on lipid peroxidation, superoxid dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) **Physiologia Plantarum** 83:463-468
- Camp P. J., Huber S. C., Burke J. J., Moreland D. E. (1982) Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves. **Plant Physiology** 70:1641-1646
- Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. **Methods in Enzymology** 113:484-495
- Chance B., Maehley A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology** 2:764-775
- Considine M. J., Goodman M., Ehtay K. S., Laloi M., Whelan J., Brands M. D., Sweetlove L. J. (2003) Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. **The Journal Biology Chemistry** 278:22298-22302
- Crafts-Brandner S. J., Egli D. B. (1987) Sink removal and leaf senescence in soybean. **Plant Physiology** 85:662-666
- Demmig-Adams B., Adams III W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 43:599-626
- Dipierro N., Mondelli D., Paciolla C., Brunetti G., Dipierro S. (2005) Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminum stress. **Journal of Plant Physiology** 162:529-536

- Elvira R., Alonso S., Castilho J., Gimeno B. S. (1998) On the response of pigments and antioxidants of *Pinnus hapelensis* seedlings to Mediterranean climatic factor and long-term ozone exposure. **New Phytologist** 138:419-432
- Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y., Osawa, T. (1999) New potent antioxidative O-dihydroxyisoflavones in fermented japanese soybean products. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry** 63: 1637-1639
- Farquhar G. D., Sharkey T. D. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology** 33:317-345
- Ferguson C. H. R., Simons E. W. (1973) Membrane lipids in senescing green tissues. **Journal Experimental Botany** 24:307-316
- Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M. (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum** 100:241-254
- Fu J., Huang B., Zhang G. (2000) Physiological and biochemical changes during seed filling in relation to leaf senescence in soybean. **Biologia Plantarum** 43:545-548
- Gan, S. (2007) **Senescence Processes in Plants**. Blackwell Publishing Ltd, Iowa, USA, p 332.
- Gan S., Amasino R. M. (1997) Making sense of senescence. **Plant Physiology** 113:313-319
- Gay C., Gebicki J. M. (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry** 284:217-220
- Giannopolitis C. N., Ries S. K. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309-314
- Gomes, P. (1976) **A soja**. São Paulo – SP, 2ªedição, 149p.
- Grover A., Mohanty P. (1992) Leaf senescence-induced alterations in structure and function of higher plant chloroplasts. In: Abrol Y.P., Mohanty P., Govindjee, eds. **Photosynthesis: photoreactions to plant productivity**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 225-255
- Havir E. A., McHale N. A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** 84:450-455

- Hayati R., Egli D. B., Crafts-Brandner S. J. (1995) Carbon and nitrogen supply during seed filling and leaf senescence in soybean. **Crop Science** 35:1063-1069
- He Y., Tang W., Swain J. D., Green A. L., Jack T. P., Gan S. (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. **Plant Physiology** 126:707-716
- Heath R. L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 125:189-198
- Jiang C., Gao H., Zou Q., Jiang G., Li L. (2006) Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. **Environmental and Experimental Botany** 55: 87-96
- Jiang C., Li P., Gao H., Zou Q. (2005) Enhanced photoprotection at the early stages of leaf expansion in field-grown soybean plants. **Plant Science** 168:911-919
- Jiang C., Rodermel S. R., Shibles R. M. (1993) Photosynthesis, rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. **Plant Physiology** 101:105-112
- Jiménez A., Gómez J. M., Navarro E., Sevilla F. (2002) Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. **Plant Physiology and Biochemistry** 40:515-520
- Jiménez A., Hernández J. A., Pastori G., Del Rio L. A., Sevilla F. (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology** 118:1327-1335
- Jones A. M., Dangl J. L. (1996) Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. **Trends in Plant Science** 1:114-119
- Jung S. (2004) Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subject to drought. **Plant Science** 166:459-466
- Kar M., Mishra D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57: 315-319
- Koshiba T. (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology** 34:713-721

- Kranner I., Beckett R. P., Wornik S., Zorn M., Pfeifhofer H. W. (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. **Plant Journal** 31:13-24
- Krause G. H. (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. **Physiologia Plantarum** 74:566-574
- Kuo M. C., Kao C. H. (2003) Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum** 46:149-152
- Lenz F., Williams C. N. (1973) Effects of fruit removal on net assimilation and gaseous diffusive resistance of soybean leaves. **Angew Botanik** 47:47-63
- Lim P. O., Kim H. J., Nam H.G. (2007) Leaf Senescence. **Annual Review Plant Biology** 58:115-136
- Lim P. O., Nam H. G. (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. **Current Topics in Developmental Biology** 67:49-83
- Lima A. L. S., DaMatta F. M., Pinheiro H. A., Totola M. R., Loureiro M. E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea Canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany** 47:239-247
- Lin C. C., Kao C. H. (2000) Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. **Plant Growth Regulation** 30:151-155
- Lu C., Lu Q., Zhang J., Kuang T. (2001) Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field. **Journal of Experimental Botany** 52:1805-1810
- MacRae E. A., Ferguson I. B. (1985) Changes in catalase activity and H₂O₂ concentration in plants in response to low temperature. **Physiologia Plantarum** 65:51-56
- Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plants (2nd ed.). **Academic Press**, London.

- Maxwell D. P., Wang Y., McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cell. **The Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)** 96:8271-8276
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7:405-410
- Mizuno M., Kamei M., Tsuchida H. (1998) Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tuber during low-temperature storage. **Biochemistry Molecular Biology International** 44:717-725
- Mondal M. H., Brun W. A., Brenner M. L. (1978) Effects of sink removal on photosynthesis and senescence in leaves of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Plant Physiology** 61:394-397
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. **Planta** 214:608-615
- Nagel L., Brewster R., Riedell W. E., Reese R. N. (2001) Cytokinin regulation of flower and pod set in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). **Annals of Botany** 88:27-31
- Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology** 22:867-880
- Noodén L. D. (1988) Whole plant senescence. In **Senescence and Aging in Plants** (L.D. Noodén and A.C. Leopold, Eds.) Academic Press, San Diego CA 391-439
- Noodén L. D., Guiamet J. J., John I. (1997) Senescence mechanisms. **Physiologia Plantarum** 101:746-753
- Noodén L. D., Guiamet J. J., John I. (2004) Whole Plant Senescence. **Plant Cell Death Processes** 15:227-244
- Noodén L. D., Singh S., Letham S. (1990) Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. **Plant Physiology** 93:33-39
- Ottander C., Campbell D., Öquist G. (1995) Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. **Planta** 197:176-183

- Prochazkova D., Saíram R. K., Srivastava G. C., Singh D. V. (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Science** 161:765-771
- Reese R. N., Dybing C. D., White C. A., Page S. M., Larson J. E. (1995) Expression of vegetative storage protein (VSP-B) in soybean raceme tissues in response to flower set. **Journal of Experimental Botany** 46:957-964
- Ribeiro A. C. (1999) Recomendação de calagem e adubação de substratos para mudas, covas e canteiros. In: RIBEIRO CA, GUIMARÃES PTE, ALVAREZ V VH (eds) **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa, UFV-MG, 263p
- Salisbury, F. B., Ross C. W. (1992) **Plant Physiology**. 4th edition, Wadsworth Publishing Company. Belmont, California. 352p
- Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology** 103:7-12
- Sgarbieri, V. C.; Garruti, E. C.; Guzmán, E. C. (1981) Soybeans as an extender of common beans. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 58: 522-526
- Simeonova E., Sikira S., Charzynska M., Mostowska A. (2000) Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. **Protoplasma** 214:93-101
- Sluse F. E., Jarmuszkiewicz W. (2000) Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33:259-268
- Sluse F. E., Jarmuszkiewicz W. (2002) Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. **FEBS Letter** 510:117-120
- Somashekaraiah S. V., Padmaji K., Prasad A. R. K. (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxidation in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum** 85:85-89
- Srivalli B., Chopra, R.K. (2001) Induction of new isoforms of superoxide dismutase and catalase enzymes in the flag leaf of wheat during

- monocarpic senescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 228:1037-1042
- Srivalli B., Chopra, R.K. (2004) The developing reproductive 'sink' induces oxidative stress to mediate nitrogen mobilization during monocarpic senescence in wheat. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 352:198-202
- Tadas P., Agata P., Philip-D R., Bernard R., Elsbeth-L W. (1999) Identification of senescence-associated genes from daylily petals. **Plant Molecular Biology** 40:237-248
- Taiz L., Zeiger E. (2006) **Plant Physiology**. Fourth edition, Sinauer. Sunderland, MA.
- Tang Y., Wen X., Lu C. (2005) Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. **Plant Physiology and Biochemistry** 43:193-201
- Thorne J. H., Koller H. R. (1974) Influence of assimilate demand on photosynthesis, and carbohydrate level of soybean leaves. **Plant Physiology** 54:201-207
- Vu J. C. V., Yelenosky G., Bausher M. G. (1986) CO₂ exchange rate, stomatal conductance, and transpiration in attached leaves of Valencia orange. **HortScience** 21:143-144
- Wellburn A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology** 144:307-313
- Wittenbach V. A. (1982) Effect of pod removal on leaf senescence in soybeans. **Plant Physiology** 70:1544-1548
- Woolhouse H. W. (1984) The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. **Canadian Journal of Botany** 62:2934-2942
- Woolhouse H. W. (1967) The nature of senescence in plants. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. 21:179-230
- Yang J., Wang Z., Zhu Q., Su B. (1999) Regulation of ABA and GA to the grain filling of rice. **Acta Agronomica Sinica** 25:341-348
- Yoo S. D., Greer D. H., Laing W. A., McManus M. T. (2003) Changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition in leaves of white

clover at different developmental stages. **Plant Physiology and Biochemistry** 41:887-893

Yoshida S. (2003) Molecular regulation of leaf senescence. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 79-84

Zacarias L. Reid M. S. (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Physiologia Plantarum** 80: 549-554

APÊNDICES

Tabela 1: Teores de pigmentos ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Dias	Clorofila a		Clorofila b		Razão Chla/Chlb		Carotenóides	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	22	12,499	13,505	2,889	3,778	4,450	3,658	2,994	3,319
2	29	17,720	15,440	6,813	2,612	2,618	6,107	3,551	4,009
3	36	18,230	19,142	5,428	5,010	3,384	3,878	3,961	4,539
4	43	17,707	16,178	6,680	3,764	2,664	4,376	3,814	3,760
5	50	20,121	17,789	7,314	7,827	2,751	2,261	4,152	3,497
6	57	19,250	19,941	6,881	6,760	2,834	2,962	4,319	4,245
7	64	16,589	17,479	4,278	4,819	3,952	3,681	3,831	4,074
8	70	16,600	17,013	7,716	8,703	2,180	1,951	3,436	3,780
9	78	16,113	24,051	5,933	8,328	2,709	2,904	3,318	4,640
10	85	16,095	23,133	8,839	12,145	2,117	2,170	3,793	5,319
11	92	12,718	18,510	5,300	8,404	2,415	2,211	2,999	3,021
12	99	8,156	20,428	3,263	9,112	2,510	2,271	2,109	4,265
13	103	5,955	17,235	2,787	7,004	2,213	2,454	1,433	3,020
14	106	0,285	19,679	0,479	7,670	0,741	2,553	0,331	3,720

Tabela 2: Taxas de trocas gasosas ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coleta	Dia	A		gs		Ci/Ca	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2
1	22	13,56	13,35	0,439	0,418	0,82	0,82
2	29	17,10	17,17	0,476	0,456	0,79	0,78
3	36	15,12	15,37	0,347	0,339	0,77	0,75
4	43	14,00	14,81	0,195	0,214	0,72	0,72
5	50	16,53	15,66	0,347	0,359	0,76	0,78
6	57	12,35	14,11	0,200	0,231	0,68	0,66
7	64	15,05	16,33	0,363	0,360	0,77	0,75
8	70	10,25	10,72	0,102	0,106	0,60	0,55
9	78	9,31	7,71	0,181	0,103	0,70	0,60
10	85	6,49	6,89	0,182	0,119	0,82	0,70
11	92	5,79	9,99	0,140	0,205	0,79	0,75
12	99	4,38	8,90	0,119	0,134	0,81	0,67
13	103	1,24	6,40	0,050	0,137	0,80	0,60

Tabela 3: Atividades de Catalase ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ptn), Ascorbato Peroxidase ($\text{nmoles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ptn) e Peroxidase ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ptn) ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Datas	CAT		APX		POX	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2
4	43	365,160	384,432	634,303	738,987	27,297	29,901
5	50	396,707	320,765	846,211	600,263	35,112	31,497
6	57	320,741	271,201	896,814	673,751	29,776	26,060
7	64	202,142	232,421	863,745	615,121	24,988	23,028
8	70	216,921	238,278	557,725	698,573	23,733	19,716
9	78	220,617	183,217	790,180	896,127	31,272	31,399
10	85	137,582	81,510	481,008	468,051	19,640	16,405
11	92	135,350	119,979	987,721	716,765	27,082	20,199
12	99	94,154	93,081	857,992	421,368	25,332	21,942
13	103	160,893	99,795	1642,256	1062,129	34,664	18,117
14	106	108,537	101,917	5489,233	621,517	109,095	14,170

Tabela 4: Atividades de Superóxido Dismutase ($\text{U SOD}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ptn) e Glutaciona Redutase ($\text{nmolesNADPH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ptn) ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Datas	SOD		GR	
		T1	T2	T1	T2
4	43	18,966	4,085	7,298	6,626
5	50	12,221	15,492	7,380	7,779
6	57	10,940	14,890	5,580	3,601
7	64	6,070	9,307	10,040	9,979
8	70	7,465	4,848	29,210	31,082
9	78	5,615	4,890	29,294	27,204
10	85	4,912	6,774	31,473	27,882
11	92	8,442	13,746	23,031	24,408
12	99	6,858	13,262	21,314	15,268
13	103	6,140	21,797	18,788	11,723
14	106	6,950	62,222	17,907	9,313

Tabela 5: Teores de Ascorbato ($\mu\text{moles.mg}^{-1}$ MF) ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Datas	ASC	
		T1	T2
4	43	409,559	454,837
5	50	338,457	194,643
6	57	236,969	264,422
7	64	338,573	285,468
8	70	353,091	281,021
9	78	312,058	392,665
10	85	519,168	498,627
11	92	561,196	595,991
12	99	722,807	573,014
13	103	643,629	522,625
14	106	522,115	611,322

Tabela 6: Teores de Peróxido de Hidrogênio ($\mu\text{moles.g}^{-1}$ MF) ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Datas	H2O2	
		T1	T2
4	43	39,265	55,969
5	50	51,698	34,032
6	57	58,625	45,799
7	64	48,503	55,032
8	70	55,973	85,229
9	78	67,425	115,639
10	85	63,625	186,023
11	92	43,722	181,035
12	99	72,900	164,242
13	103	38,085	147,913
14	106	4,448	141,770

Tabela 7: Concentração de Aldeído Malônico (nmoles.g⁻¹ MF) ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Datas	MDA	
		T1	T2
4	43	80,814	81,268
5	50	57,161	79,468
6	57	66,532	61,110
7	64	52,194	57,059
8	70	49,369	70,539
9	78	71,024	127,622
10	85	76,376	161,909
11	92	46,891	144,633
12	99	46,904	176,835
13	103	51,910	151,178
14	106	64,984	147,191

Tabela 8: Concentração de Extravazamento de Eletrólitos (%) ao longo do desenvolvimento de folhas de soja, variedade MG/BR 46, nos diferentes tratamentos: T1 (plantas com órgãos reprodutores intactos) e T2 (plantas com órgãos reprodutores removidos).

Coletas	Datas	Extravazamento	
		T1	T2
4	43	5,646	6,443
5	50	4,841	5,396
6	57	3,798	4,336
7	64	5,318	5,163
8	70	4,390	5,032
9	78	4,778	4,212
10	85	5,023	4,734
11	92	8,106	5,332
12	99	6,947	4,761
13	103	6,821	4,298
14	106	6,621	4,894