

JULIETA ANDREA SILVA DE ALMEIDA

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela candidata Julieta Andrea Silva de Almeida e aprovada pela Comissão Julgadora.



M. Fátima D. M. Pereira

**CONTROLE DA INICIAÇÃO FLORAL EM
Helianthus annuus L. (GIRASSOL)**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira †

AL64c

16157/BC

CAMPINAS
1992

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À memória de meu querido pai, Hugo.

À minha querida mãe, Lecy.

Aos meus irmãos e amigos Carlos,

Fábio, Hugo e Hilda.

AGRADECIMENTOS

À amiga Dra. Maria de Fátima D.A. Pereira pelos ensinamentos, apoio, estímulo e carinho durante todos os momentos.

Ao Dr. João Pereira, pela colaboração com gráficos e fotografias desta tese, como também com incentivo e amizade.

Aos professores Ana M.M.A. Lagôa, Ivany F.M. Válio e Paulo Mazzafera pelas observações e críticas construtivas na pré-banca desta tese.

Aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários, João Humberto, Pedro Ariolli, Sebastião Gonçalves e Eduardo Calixto Oliveira pela colaboração junto aos experimentos em casa de vegetação, com cuidado e boa vontade.

Aos funcionários Dulce R.G. Joaquim, Dulcinéia Pereira de Souza, Marcus Luciano Neaime e Sebastiana Rodrigues Vieira dos Santos pelo auxílio técnico e amizade.

Às amigas Cidinha, Luzia e Lorenza pelo amizade e carinho.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biologia, pela atenção e amizade.

Ao Celso Jamil Marur, que colaborou com a estatística desta tese, com paciência e entusiasmo.

Aos alunos do Departamento de Fisiologia Vegetal pelo apoio nos momentos difíceis, amizade como também pelos muitos ensinamentos de vida.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior), pela bolsa concedida, que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos amigos Érika, Marisa, Mara e Túlio pela grande ajuda e amizade no meu caminho.

ÍNDICE

	página
I- INTRODUÇÃO.....	01
II- MATERIAL E MÉTODOS.....	13
1- Material.....	13
2- Métodos de trabalho.....	13
2.1- Cultivo.....	13
2.2- Caracterização do ápice de girassol.....	13
2.3- Fotoperíodo.....	14
2.4- Temperatura.....	14
2.5- Remoção de cotilédones.....	16
2.6- Aplicação de substâncias reguladoras de crescimento.....	16
2.7- Determinação da quantidade mínima de GA ₃ que promove a iniciação floral e época ideal de aplicação.....	17
2.8- Aplicação de inibidores da síntese de giberelina.....	18
2.8.1- CCC.....	18

2.8.2-	TETCYCLACIS.....	18
2.8.3-	PACLOBUTRAZOL.....	18
2.9-	Extração, fracionamento de substâncias giberelínicas.....	20
2.9.1-	Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC.....	22
2.10-	Biotestes.....	22
2.10.1-	Alongamento do hipocótilo de alface.....	22
2.10.2-	Arroz anão.....	23
2.11-	Análise estatística.....	24
III -	RESULTADOS.....	25
3.1-	Caracterização do ápice do estádio vegetativo ao floral.....	25
3.2-	Efeito do fotoperíodo.....	27
3.3-	Efeito da interação temperatura e fotoperíodo.....	27
3.4-	Efeito da remoção de cotilédones.....	30
3.5-	Efeito de substâncias fenólicas.....	39
3.6-	Efeito da aplicação de substâncias reguladoras de crescimento em ápice de girassol.....	44
3.7-	Efeito da aplicação de ácido giberélico.....	47
3.8-	Efeito de inibidores da síntese de giberelina.....	66
3.9-	Extração de substâncias giberelínicas de ápices de plantas de girassol.....	90

IV- DISCUSSÃO.....	98
V- CONCLUSÕES.....	116
VI- RESUMO.....	117
VI- BIBLIOGRAFIA.....	118

I - INTRODUÇÃO

Conquistadores espanhóis quando chegaram às Américas, por volta de 1500, tiveram uma grande surpresa diante do avanço e riquezas das civilizações indígenas das Américas Central e do Sul. Os índios que habitavam as Américas eram agricultores exímios que domesticavam e cultivavam alguns produtos importantes para alimentação. Muitos destes produtos foram levados para a Europa pelos conquistadores e, dentre estes, o girassol (Helianthus annuus L.). Pesquisadores acreditam que foi no Peru que pela primeira vez um europeu pôde contemplar de perto a flor solene do girassol. Várias descobertas arqueológicas indicam que sua origem é do Novo México e do Arizona. O girassol chegou à América do Sul acompanhando o ciclo natural de migração dos indígenas americanos que vinham do Norte.

Após a Primeira Guerra Mundial o girassol passou a ser utilizado como matéria prima para a fabricação do óleo comestível. Passando a ser, atualmente, a segunda maior cultura produtora de óleo comestível no mundo. União Soviética, Estados Unidos e Argentina são os principais produtores de girassol.

Este produto é recomendado para consumo por ter gorduras insaturadas o que propícia uma dieta que evita o colesterol.

O principal produto do girassol é o óleo obtido a partir de sementes. Destas também se obtém farinha proteica utilizada na alimentação humana, das aves e animais domésticos. Todas as outras partes da

planta podem ser utilizadas, como: as cascas de sementes que são usadas na ração de gado e combustível para geração de vapor, o caule, que armazena a maior parte dos nutrientes retirados do solo, pode pela técnica de tombamento devolver estes nutrientes ao solo; a planta inteira, pode ser utilizada na silagem para ração de bovinos e atualmente, é vista como uma excelente planta para a produção de mel (PELEGRINI, 1985).

A floração é um processo fascinante do desenvolvimento das plantas superiores, uma vez, que contribui na manutenção das espécies. Apesar da grande quantidade de trabalhos já realizados neste tema muitos enigmas ainda existem (CLELAND, 1978).

Há fatores que são determinantes para que ocorra floração numa dada espécie, como fotoperíodo. Quanto ao fotoperíodo, as plantas são classificadas, quanto à floração, como de dias curtos, de dias longos ou indiferentes. Aquelas que florescem só quando os períodos de escuro diários forem maiores do que um certo período crítico são denominadas de dia curto e aquelas que requerem um período de escuro mais curto do que um certo período crítico como plantas de dia longo. Aquelas que não tem a floração afetada pelo fotoperíodo são denominadas indiferentes (SMITH, 1975). Helianthus annuus (girassol) foi classificada por VINCE-PRUE (1975) como uma planta indiferente ao fotoperíodo. Anteriormente à classificação de VINCE-PRUE, DYER et al. (1959) já haviam classificado o girassol como uma espécie de dias curtos quantitativa. GOYNE & SCHNEITER (1987) verificaram as respostas fotoperiódicas de 16 cultivares de girassol, ocorrendo tanto cultivares indiferentes ao comprimento dia quanto de dias longos ou curtos. Também foi verifica-

da, que há na emergência da plântula, uma relação significativa entre o fotoperíodo e o número de dias até o aparecimento das brácteas. Esta relação se explicaria pela sensibilidade ao fotoperíodo.

Na passagem de uma planta do estágio vegetativo para o floral há uma fase que é denominada evocação, na qual ocorrem eventos que levam o ápice a um estágio floral (METZGER, 1987), isto é, a planta passa para a iniciação floral não havendo a possibilidade de retroceder o processo.

Segundo BERNIER *et al.* (1981b), há várias sequências de eventos ocorrendo paralelamente, parecendo que estas são independentes umas das outras. Mas há um ponto em que esta independência cessa entre as sequências iniciando-se um relacionamento que as conduz à floração. Assim, cada sequência de eventos seria responsável por uma evocação parcial.

A percepção do fotoperíodo ocorre nas folhas que controlam a produção do estímulo floral, enquanto, os eventos evocacionais ocorrem no ápice após a chegada do estímulo floral, sendo assim indiferente ao fotoperíodo (VINCE-PRUE, 1975). Observando o aspecto de evocação em plantas de girassol STEEVES *et al.* (1969) verificaram que, durante o crescimento vegetativo, a síntese de DNA e mitose são interrompidos ou reduzidos a uma taxa extremamente baixa. Não há figuras mitóticas e não há incorporação de precursores de DNA marcado. A zona periférica nesta fase vegetativa apresenta atividade mitótica que está relacionada com a formação dos primórdios foliares. Quando inicia a floração a zona nuclear desaparece e inicia-se um processo de atividade mitótica em todo o ápice. Posteriormente DAVIS *et al.* (1979) estudando ápices ve-

getativos de girassol verificaram também que a síntese de DNA e atividade mitótica são menos frequentes na zona central quando comparado com a zona periférica. MARC & PALMER (1982) obtiveram informações relacionadas com a evocação de plantas de girassol, verificando que a atividade mitótica é baixa na zona central no início do desenvolvimento das plantas (6^o - 7^o dia de idade). Por volta do 12^o dia há um aumento desta atividade, atingindo um pico no 16^o dia. Os autores sugerem que, nesta cultivar, a iniciação floral ocorreria por volta do 12^o dia de idade das plântulas após a semeadura.

Diversos estudos têm indicado que, dentre os eventos que ocorrem na evocação, a atividade de gens parece estar bastante envolvida com este processo. Para EVANS (1971), a evocação é causada por um estímulo específico de derrepressão de um operon policistrônico de genes florais, possivelmente em células receptoras específicas do ápice. SEARLE (1965) considera que para que ocorra a iniciação da diferenciação floral são necessárias que mudanças específicas na função do gene, ou estimulação de certos genes passivos ou inativação seletiva de genes repressivos em períodos e locus apropriados na cadeia de DNA. Desta forma a floração é vista como ativação e desativação de genes florais. A promoção ou repressão de genes leva à produção de novos RNAs e, conseqüentemente, de novas enzimas necessárias para a iniciação e desenvolvimento de primórdios florais (VINCE-PRUE, 1975). Estudos com ápices de plantas de Stevia rebaudiana, na transição floral, feitos por MONTEIRO E GIFFORD (1988a) indicam que o conteúdo de RNA e proteínas é baixo na fase vegetativa. Foi verificado que após a indução destes ápices houve aumento do conteúdo destas substâncias. BERNIER (1971)

estudando mudanças na transição floral de ápices de plantas fotoperiódicas (Pharbitis, Sinapis e Lolium), observou que o primeiro evento detectável no meristema foi um aumento considerável na síntese RNA.

A floração é frequentemente estudada nas plantas fotoperiódicas, uma vez que, nestes casos, o processo está sob o controle absoluto do ambiente. A exposição destas a um comprimento de dia apropriado leva à formação do estímulo floral (BERNIER, 1971). Já o estudo nas plantas indiferentes ao fotoperíodo é menos frequente devido à dificuldade de se estabelecer a cronologia de eventos celulares no ápice na ausência de um ponto de referência, como ocorre com as plantas fotoperiódicas (MARK & PALMER, 1982).

HAVELANGE & BERNIER (1974) estudando a passagem do estado vegetativo para o floral de Sinapis alba (DL), observaram que o ápice evocado quando comparado com o vegetativo apresentou: perfil maior de mitocôndria por secção celular, presença maior da enzima succinato desidrogenase, aumento do retículo endoplasmático e tamanho reduzido de vacúolos.

Estudos de PIERARD et al. (1980) com plantas de Sinapis alba indicam que após o tratamento das plantas com um dia longo foi detectada a presença de determinadas proteínas denominadas B e C nestes ápices induzidos. Estas proteínas estavam ausentes em ápices de plantas vegetativas. Assim, demonstrou-se que a expressão do gene é mudada durante a transformação floral, o que sustenta a interpretação de BERNIER et al. (1981b) de eventos evocacionais parciais, como mudança na expressão do gene. Sustentando esta hipótese KOVALEVA & MILYAEVA (1987), mostraram diferenças na composição proteica entre o estágio vegetativo e

floral em ápices de plantas de Rudbeckia bicolor e Perilla nankinensis. MILLER & LYNDON (1977) também verificaram em Silene coeli-rosa, espécie de dias longos, que a concentração de RNA foi maior no ápice de plantas expostas a tratamento indutivo do que naquelas mantidas em dias curtos

Na região do ápice, ocorrem também transformações morfológicas. O ápice vegetativo produz primórdios foliares e com a chegada do estímulo floral passa por uma reorganização e inicia a formação de órgãos florais (VINCE-PRUE, 1975).

ESAU (1974) explica que o meristema apical vegetativo está organizado de forma a se distinguírem duas regiões: a túnica que consiste de uma ou mais camadas superficiais de células e o corpo formada por um grupo de células de espessura de várias camadas. Com a chegada do estímulo floral, segundo BERNIER et al. (1981a), o meristema se organizaria em zonas central, periférica e medular. A zona central onde estariam incluídas as células da túnica e do corpo. A zona periférica estaria cercanda a zona central incluindo também células da túnica e do corpo as quais estão localizadas nos flancos do meristema. E a zona medular a qual inclui filas de células grandes e achatadas localizadas abaixo da zona central.

Para LYNDON & BATTEY (1985) o ápice, muda de uma forma de crescimento repetitivo indeterminado de iniciação de folhas para um modo sequencial de crescimento na iniciação de flores.

O acompanhamento da passagem do estágio vegetativo para o floral, de plantas de Cyclamem persicum, feito por SUNDBERG (1981) mostram algumas mudanças: com duas semanas observou que o diâmetro do ápice era

de 100µm com uma única camada de células da túnica. Na 40ª semana os ápices estavam três vezes maiores do aqueles mais jovens e com três camadas de células na túnica, tendo também um aumento significativo na quantidade de RNA celular. MONTEIRO & GIFFORD (1988a) também observaram um aumento no número de camadas da túnica na zona central de ápices induzidos de Stevia rebaudiana (DC) quando comparado com aqueles em estágio vegetativo.

Já no século XIX Julio Sachs propôs a existência de substância responsável pela formação das flores (BERNIER et al. 1981a).

CHAILAKHYAN na década de 50, denominou esta substância promotora de floração hipotética como florígeno (VINCE-PRUE, 1975). Desde então, intensas pesquisas tem sido realizadas na busca da identificação química desta substância. Segundo ZEEVAART (1984) e BERNIER (1988) experimentos de enxertia com plantas fotoperiódicas apoiam esta hipótese. Folhas de plantas fotoinduzidas, podem induzir floração em uma planta receptora vegetativa e mantida em condição não indutora.

ZEEVAART (1982) obteve resultados de formação de flores combinando a união entre duas espécies fotoperiódicas diferentes, tendo sido Echeveria harmssi usada como receptora e Bryophyllum daigremontianum, induzida, como doadora. A combinação entre estas duas espécies foi compatível e as plantas receptoras (Echeveria) produziram gemas florais e floresceram. Apesar deste relativo sucesso, ainda não foi possível caracterizar a natureza bioquímica do florígeno. Estudos têm sido feitos para extração desta substância mas ainda não foram suficientes para sua identificação (CLELAND, 1982).

Assim, pode ser que a floração seja controlada pela interação de duas ou mais substâncias reguladoras de crescimento. Estudos feitos com aplicação de substâncias reguladoras de crescimento têm demonstrado que, dependendo da espécie, da época de aplicação e da concentração estas substâncias podem promover, atrasar ou inibir o desenvolvimento do ápice floral.

As Auxinas podem ter efeito de promoção ou inibição de floração, sendo que a literatura indica maior número de espécies em que ocorre inibição do que promoção. A ocorrência destes efeitos numa mesma espécie depende de alguns fatores como quantidade aplicada, condição de luz e época na qual é feita a aplicação (BERNIER *et al.*, 1981b). A aplicação de AIA em Chenopodium rubrum promoveu floração quando o tratamento foi dado após o período de indução das plantas (KREKULE & SEIDLOVÁ, 1973). Quando AIA foi aplicado antes ou durante o tratamento indutor teve efeito inibitório (SEIDLOVÁ & KHATOON, 1976). KREKULE *et al.* (1985) aplicando AIA em plantas de Chenopodium rubrum (DC) e Chenopodium murale (DL) obtiveram resultados de inibição de floração quando estas foram tratadas no período de escuro indutivo.

Como as auxinas, as citocininas também podem ter efeito de promoção ou de inibição na floração, contudo, o efeito de promoção é mais observado. Este grupo de substâncias parece não ter um papel de muito destaque no processo de floração. Seu efeito também depende da quantidade aplicada e época do tratamento (BERNIER *et al.*, 1981b). Conforme METZGER (1987) parece não haver evidência convincente ligando citocininas e indução de floração numa relação de causa e efeito. Quando citocinina é aplicada em plantas de Sinapis alba (DC) promove eventos

evocacionais parciais, causando algumas mudanças típicas da transição floral, contudo, é necessário o tratamento de dias longos que produz outras mudanças nos ápices. Desta forma, citocinina e os dias longos são fatores controladores de duas partes independentes do processo de evocação em Sinapis alba (HAVELANGE *et al.*, 1986). Trabalho realizado por KHURANA & MANESHWARI (1986a) com Lemna paucicostata (espécie indiferente ao fotoperíodo) em meio de cultura indica que o tratamento com citocininas em presença de nível alto de ferro e EDTA promoveu a floração nesta espécie. Somente na presença de EDTA a citocinina não tem efeito promotor, este só ocorreu quando a concentração de ferro for mais alta do que o nível normal. SEIDLOVÁ & KREKULE (1977) observaram que a aplicação de cinetina em Chenopodium rubrum teve efeito inibidor para a floração tanto quando aplicada em plantas induzidas ou não.

A aplicação de citocininas em plantas de Sinapis alba (DL) mantidas em condições não indutivas mostraram que estas substâncias causaram aumento significativo de atividade mitótica nas células do meristema apical, porém, sem efeito para a floração. Os resultados sugerem que a ativação mitótica que ocorre no meristema de plantas submetidas a dia longo é produzido por uma citocinina ou que o componente mitótico do estímulo floral em Sinapis seja uma citocinina (BERNIER, *et al.*, 1977).

Dentre os reguladores de crescimento testados para a floração, as giberelinas são os mais interessantes, desde que elas são vistas ser o primeiro grupo de substâncias que pode induzir formação de flor em muitas espécies sob condições não indutivas (ZEEVAART, 1983).

O envolvimento de giberelinas na floração está na maioria das vezes relacionados com espécies que apresentam o hábito de crescimento em roseta. Silene armeria, uma espécie de dia longo, cultivada e mantida em condição de dias curtos, foi tratada com solução de GA₃ ou GA₇, tendo ambas substâncias causado a iniciação floral. Foi verificado inicialmente que houve um alongamento de caule e posteriormente ocorreu a iniciação floral (CLELAND & ZEEVAART, 1970). Comparando extratos de ápices de plantas de Brassica napus, ROOD et al. (1989) verificaram que a concentração total de substâncias giberelínicas foi mais baixa nas plantas vegetativas do que nas florais. LANGENAUER et al. (1975) aplicaram ácido giberélico nos ápices de plântulas de girassol e verificaram adiantamento da floração em relação às plantas controle. O tratamento produziu plantas maiores, mais altas e com caule delgado. PATERSON (1984), trabalhando com a parte apical de plantas de girassol em meio de cultura, verificou que a adição de GA₃ ou cinetina ao meio promoveu a formação de flores após três a quatro semanas.

GA₃ quando aplicado na plúmula de plantas de Pharbitis nil teve efeito promotor de floração e quando aplicado na região de cotilédones não afetou a floração (OGAWA, 1981). SAWHNEY et al. (1978) estudando plantas de Impatiens balsamina (DC), onde verificaram que GA₃ aplicado em ramo lateral destas plantas tanto em fotoperíodo indutivo ou sob iluminação contínua induz o desenvolvimento de gemas florais, mesmo quando as folhas deste ramo são removidas, mostrando que enquanto as folhas são essenciais para a fotorrecepção, não o são para causar a floração induzida por GA₃. NANDA et al. (1976) encontraram efeito sinérgico entre GA₃ e os monofenóis ácido salicílico e

B-naftol no adiantamento da iniciação floral de plantas de Impatiens balsamina (DC) mantidas em condição não indutiva.

As substâncias fenólicas também tem efeitos em floração de muitas espécies. Ilustrando o efeito destas substâncias, UMEMOTO (1971) trabalhando com aplicação de ácido clorogênico em Lemna gibba G3, em meio de cultura, observou efeito de inibição de floração das plantas tratadas. ZUCKER et al. (1965) verificaram, através de estudo da passagem do estágio vegetativo para o floral de plantas de Nicotiana tabacum cultivar Maryland Mammoth (DC) e Nicotiana sylvestris (DL), que ocorrem variações no nível de ácido clorogênico nos ápices destas espécies. Observaram também que há uma queda nos teores desta substância nas folhas expandidas na época da indução, podendo ser devida à sua migração para o ápice. KHURANA & MAHESHAWARI (1986b) observaram indução da floração de Lemna paucicostata (DC) quando aplicaram ácido tânico em plantas em meio de cultura em condições não indutivas. O efeito observado foi de indução de floração, os autores sugerem que haveria uma interação de fenóis com hormônios de planta, auxina ou gibberelinas.

Em plantas fotoperiódicas é conhecido que as folhas possuem papel importante, pois são os órgãos que percebem o estímulo da luz. Algumas espécies ao passarem do estágio vegetativo para o floral necessitam ter determinado número de folhas. Assim, a presença ou ausência destes órgãos parece ter relação com o processo da floração (PENEL et al., 1985). LAGÔA & PEREIRA (1984) observaram que, em (Phaseolus vulgaris L.), cv. Goiano precoce, a remoção de primórdios de folhas trifolioladas retardou a iniciação floral desta espécie. SHINOZAKI

(1985) removendo cotilédones de plantas de Pharbitis nil, verificou que este tratamento causou inibição forte na floração desta espécie. Trabalho de HADDAD (1991) com Lantana montevidensis, uma herbácea de cerrado, mostrou que a remoção da parte aérea desta espécie pelo fogo ou por poda estimula a sua floração.

A proposta deste estudo foi a de caracterizar o processo de floração da espécie Helianthus annuus cultivar 33, verificando alguns fatores que poderiam influenciar este processo. Objetivou-se também quais substâncias químicas poderiam estar envolvidas no controle da floração desta espécie. Assim, pretende-se contribuir com mais alguma informação sobre o processo de floração, que muito ainda há para se conhecer, principalmente com espécies indiferentes ao fotoperíodo.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1- MATERIAL

O material utilizado para este estudo foi Helianthus annuus L. (girassol).

2- MÉTODOS DE TRABALHO

2.1 - CULTIVO

Sementes de girassol foram colocadas para germinar em bandejas plásticas contendo vermiculite e envoltas por plásticos transparentes. Estas foram mantidas em câmara de crescimento por 72 horas, a 25°C sob luz contínua e irrigadas com água destilada quando necessário. Quando estavam em estágio de plântulas, foram transplantadas para vasos plásticos contendo solo adubado e esterilizado com brometo de metila, sendo uma planta por vaso. Estes vasos foram mantidos em casa de vegetação em temperatura e fotoperíodo naturais.

2.2 - CARACTERIZAÇÃO DO ÁPICE DE GIRASSOL

Plantas de girassol foram observadas quanto ao seu desenvolvimento vegetativo e floral. Para os aspectos vegetativos foram feitas medidas de altura e contagem do número de folhas visíveis a olho nu das plantas.

Para o estudo da floração de girassol foram feitas observações do ápice, com o auxílio de estéreomicroscópio. Para tanto, a porção apical das plantas foi removida e fixada em plasticina sobre uma lâmina de vidro. Procedeu-se em seguida à dissecação deste ápice caracterizando-o morfológicamente em fases de seu desenvolvimento.

2.3- FOTOPERÍODO

Plantas de girassol foram cultivadas em fotoperíodo curto (oito horas de luz natural) e fotoperíodo longo (dezoito horas de luz), sendo o dia normal prolongado com iluminação fornecida por lâmpadas incandescentes ($0,53uw.cm^{-2}$) das dezoito horas até às duas horas da manhã. As plantas foram mantidas em temperatura ambiente e observadas desde o estágio de plântula até o adulto. Foram analisados os aspectos vegetativos como também o desenvolvimento do ápice.

2.4 - TEMPERATURA

Plantas de girassol foram cultivadas em época de outono-inverno e primavera-verão, avaliadas quanto aos aspectos vegetativos e desenvolvimento de estágio de ápice. Para cada época foram mantidas plantas em fotoperíodo curto e longo. Para a época de primavera-verão foram considerados os meses de outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março cujas temperaturas são mais altas durante o ano. Para a época

de outono-inverno os meses de abril, maio, junho, julho, agosto e setembro cujas temperaturas são baixas. As temperaturas médias no período em que as plantas foram cultivadas são apresentadas na tabela 1.

TABELA 1- Temperaturas médias durante o período de cultivo das plantas.

MESES	MÁXIMA	MÍNIMA	MÉDIA
Janeiro	29,1	19,1	24,4
Fevereiro	29,3	20,2	24,8
Março	29,9	19,7	24,8
Abril	29,0	17,8	23,4
Maio	25,7	14,2	20,0
Junho	23,8	13,1	18,4
Julho	23,7	11,1	17,4
Agosto	26,3	13,5	19,9
Setembro	25,5	15,5	20,6
Outubro	28,2	15,4	21,8
Novembro	26,6	17,4	22,0
Dezembro	28,7	18,7	23,7

Os dados foram fornecidos pela FEAGRI (UNICAMP).

2.5 - REMOÇÃO DE COTILÉDONES

Os experimentos de remoção de órgãos constaram da retirada de um ou dois cotilédones de plantas em idades diferentes. As plantas utilizadas para estes experimentos foram preparadas como citado anteriormente no item 2.1 e mantidas em casa de vegetação em fotoperíodo e temperatura naturais.

2.6 - APLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REGULADORAS DE CRESCIMENTO

Os tratamentos com substâncias exógenas foram sempre iniciados em plantas a partir do 10^o dia da embebição das sementes. As substâncias foram aplicadas na forma de gota, depositada sobre o ápice de cada planta, com auxílio de uma microseringa graduada. O intervalo para os tratamentos variou desde aplicações de dois em dois dias até aplicações diárias, com o término no 20^o dia de idade das plantas.

Foram utilizadas as substâncias reguladoras de crescimento: ácido indol-3-acético, 6-benziladenina e ácido giberélico, na concentração de 10⁻³M. Para cada uma destas foram utilizados 30µl por ápice de planta por aplicação.

Foram utilizadas também as substâncias fenólicas: ácido salicílico, ácido clorogênico, ácido cafêico e cumarina, na concentração de 10⁻³M. Utilizou-se uma gota de 25µl de cada uma destas substâncias por ápice de planta por aplicação. Para o controle foi utilizada água destilada. Foram feitas avaliações dos parâmetros de desenvolvimento

vegetativo e floral.

2.7 - DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE MÍNIMA DE GA₃ QUE PROMOVE A INICIAÇÃO FLORAL E ÉPOCA IDEAL DE APLICAÇÃO

Os tratamentos com GA₃ foram feitos de acordo com a descrição do item 2.5 anteriormente. As quantidades de GA₃ utilizadas assim como o número de aplicações e épocas são apresentados na tabela 2.

TABELA 2 - Aplicação de GA₃ em diferentes concentrações, volume e número de aplicações em plantas de girassol com idades diferentes.

IDADE DA PLANTA (dias)*	NÚMERO DE APLICAÇÕES	QUANTIDADE DE GA ₃ /ÁPICE (µg)	QUANTIDADE TOTAL DE GA ₃ /ÁPICE (µg)
10,12,14,16,18,20	6	0,030	0,180
16,18,20	3	0,030	0,090
10,12,14	3	0,030	0,090
10,12,14,16,18,20	6	0,015	0,090
14	1	0,005	0,005
14	1	0,015	0,015
12	1	0,005	0,005
12	1	0,015	0,015
10	1	0,005	0,005
10	1	0,015	0,015
10	1	0,030	0,030

* Dia de aplicação do tratamento.

Alternativamente, sementes foram embebidas em GA₃ em placa de Petri forradas com papel de filtro por 24 horas, em seguida transferidas para bandejas com vermiculite e mantidas por dois dias em câmara de

crescimento a 25^oC. As plantas foram avaliadas periódicamente quanto a altura, número de folhas e desenvolvimento do ápice.

2.8 - APLICAÇÃO DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE GIBERELINA

Foram testados os efeitos da aplicação de várias substâncias conhecidas como inibidoras da síntese de giberelina. Os tratamentos iniciaram-se sempre no 10^o dia de idade das plantas.

2.8.1- CCC- (Cloroeto de 2 cloroetiltrimetilamônio), foi utilizado na concentração de 800ppm, com aplicações a cada dois dias, durante vinte dias.

2.8.2- TETCYCLACIS- (5-(4-clorofenil)-3,4,5,10 - pentazatetraciclo [5,4,10^{2.6},0⁸ x 11] dodeca- 3.9- dieno), na concentração de 10⁻⁴M, com aplicações diárias, durante trinta dias.

2.8.3- PACLOBUTRAZOL - ([(2RS,3RS)-1-(4 clorofenil) - 4 - dimetil - 2 -(1,2,4 - triazol -1- ul) pentar -3-01], foi aplicado como descrito para os outros inibidores, contudo em idades diferentes das plantas como também em concentrações e quantidades diversas (tabela 3).

TABELA 3 - Aplicação de paclobutrazol em plantas de girassol, em concentrações e quantidades diferentes e número de vezes.

IDADE DAS PLANTAS*	QUANTIDADE DE PACLO/ÁPICE (μ l)	NÚMERO DE APLICAÇÕES	QUANTIDADE TOTAL (μ l)	CONC. (M)
10	20	1	20	10^{-4}
10	20	1	20	10^{-5}
14	20	1	20	10^{-4}
14	20	1	20	10^{-5}
15	20	2	40	10^{-4}
15	20	2	40	10^{-5}
15	20	2	40	10^{-6}
10	20	6	120	10^{-4}
10	20	3	60	10^{-4}
10	20	6	120	10^{-3}
10	20	16	320	10^{-3}
10	30	11	240	10^{-3}

* Primeiro dia de aplicação.

Paclobutrazol foi também aplicado diretamente na terra. Neste caso foi feita uma única aplicação em idades diferentes. Cada vaso recebendo 20ml de uma solução de $5 \times 10^{-3} M$. As plantas utilizadas nestes experimentos foram preparadas e mantidas como especificado no item 2.1. Para todos os tratamentos as plantas foram avaliadas quanto aos aspectos vegetativos e florais.

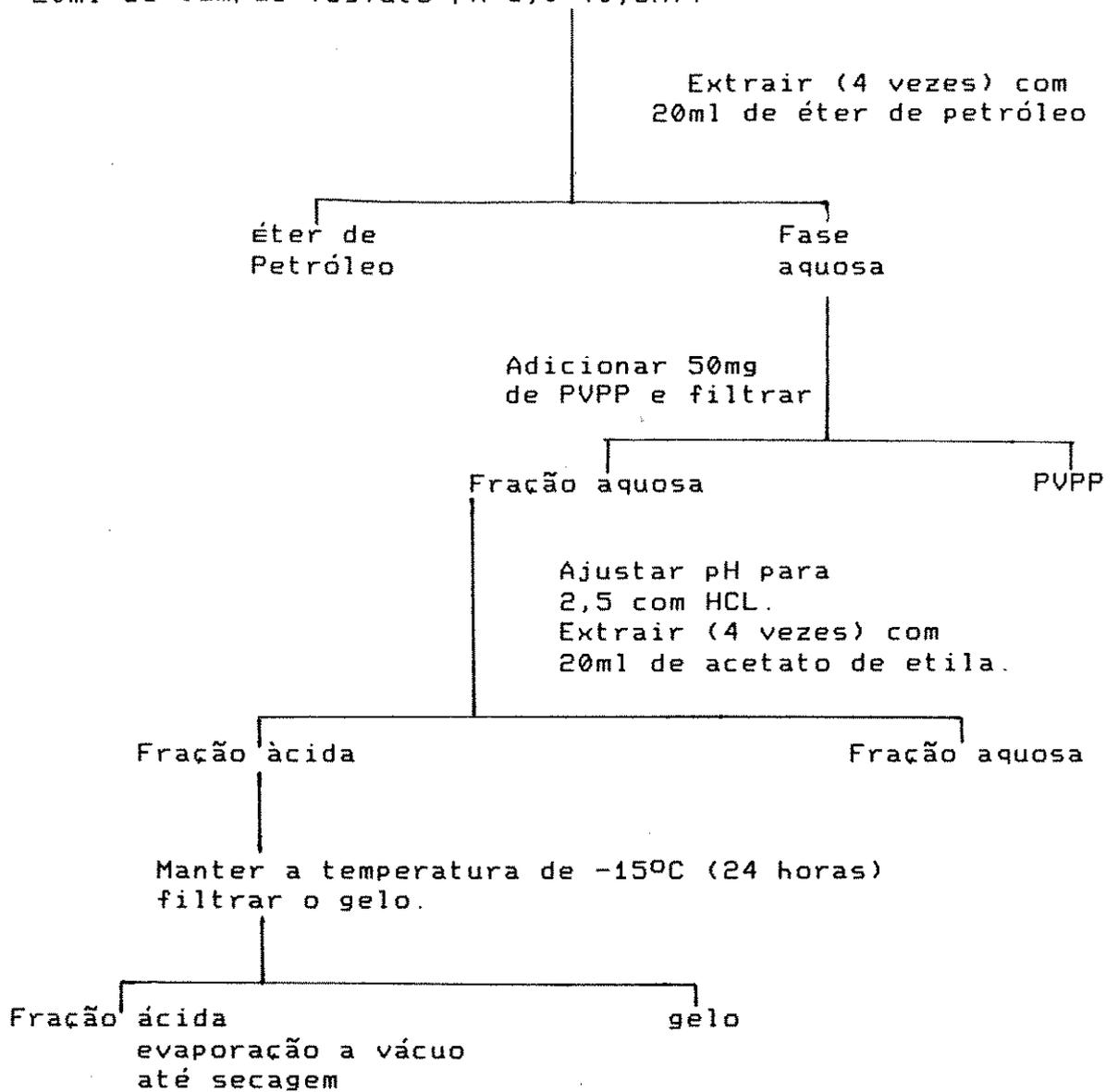
2.9 - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS GIBERELÍNICAS

Para a extração de substâncias giberelínicas foi utilizada a porção apical das plantas, que constou dos primeiros 5mm apicais, após a remoção das folhas expandidas e em expansão. Cada coleta constou de 40 ápices. Na época da coleta foi feita a dissecação em estereomicroscópio de dez ápices com a mesma idade para determinação do estágio de desenvolvimento médio.

Para a obtenção das substâncias giberelínicas foi seguido o método de extração descrito por REEVE & CROZIER (1978), com modificações (esquema 1).

Os ápices foram macerados e extraídos três vezes com metanol P.A. Após a remoção do metanol por evaporação sob pressão reduzida em temperatura de 35°C, o resíduo foi ressuspensionado com tampão fosfato 0,5M pH 7,8, sendo re-extraído três vezes com éter de petróleo. A fase aquosa foi tratada com polivinilpirrolidona (PVPP), filtrada a vácuo. O pH do filtrado foi corrigido para 2,5 com HCL (3N) e em seguida fracionado quatro vezes com acetato de etila. A fração ácida assim obtida foi mantida em -15°C por 24 horas. Após este período esta fração ácida foi filtrada em papel de filtro, rapidamente, com a finalidade de remover a água.

Tecido macerado e extraído 3 vezes com um excesso de metanol frio. Mistura dos extratos metanólicos e redução para fase aquosa a vácuo. Adição de 20ml de tampão fosfato pH 8,0 (0,5M).



ESQUEMA 1- Extração e fracionamento de substâncias giberelínicas segundo REEVE & CROZIER, (1978) modificado.

2.9.1 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - HPLC

Para utilização em HPLC o extrato após a evaporação total do acetato de etila foi ressuscitado em 2ml de metanol. Este extrato metanólico foi eluído com mais 8ml de metanol, em mini-coluna SEP-PAK C₁₈ CARTRIDGE (WATER ASSOCIATES). Esta mini-coluna foi estabilizada com 10ml de metanol. Em seguida, o metanol do extrato foi removido por evaporação a pressão reduzida a 35^oC. O extrato foi ressuscitado em 2 ml de metanol que foi novamente seco em nitrogênio líquido. Este extrato foi então ressuscitado em 1ml de uma solução de metanol e ácido acético 0,5% (2:3 v:v).

O extrato purificado foi então cromatografado para separação das substâncias giberelínicas, através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

Utilizou-se, em coluna C₁₈ ODS - Hypersil (5 μ m, 250 x 5mm), gradiente de 30 minutos de 40 a 85% de metanol em solução aquosa de ácido acético a 0,5%, com fluxo de 1ml/min. Eluatos foram coletados no final da coluna de dois em dois, logo, tendo cada fração um volume de 2ml e totalizando quinze frações dos extratos.

2.10 - BIOTESTES

2.10.1 - ALONGAMENTO DO HIPOCÓTILO DE ALFACE

Foi utilizado o bioensaio originalmente descrito por FRANKLAND e WAREING, 1960. As sementes de alface, da cultivar Grand Rapids, foram

germinadas em placas de Petri a 25°C por 24 horas, sob luz contínua para obtenção das plântulas para o bioensaio.

Cada fração coletada em HPLC foi subdividida em quatro partes que foram distribuídas ao acaso em cubetas de 2x2cm. As subfrações foram depositadas sobre duas folhas de papel de filtro em cada cubeta e secas a temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. O papel de cada cubeta foi umedecido com 400µl de água destilada e sobre este foram colocadas quatro plântulas de alface. As cubetas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C e luz contínua por quatro dias. Após este período, de crescimento, o comprimento do hipocótilo das plântulas de alface foi medido.

Para a curva padrão foram utilizadas concentrações de 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 5×10^{-8} M de ácido giberélico.

2.10.2 - ARROZ ANÃO

O procedimento utilizado para este bioensaio foi o originalmente descrito por MURAKAMI (1968). Sementes de arroz anão Tanginbozu foram colocadas em água destilada e mantidas em câmara de crescimento a 30°C por 48 horas, sob luz contínua sendo a água trocada a cada doze horas. Após este período, quando as sementes já estavam germinadas, portanto, com os coleóptiles presentes, foram colocadas em tubos de vidro de 8,5cm de altura x 2,5cm de diâmetro (duas plântulas por tubo) contendo 20ml ágar (1%) como substrato. Os tubos foram mantidos por 72 horas nas condições de temperatura e luz iniciais e a cada 24 horas

foi adicionado 1ml de água destilada em cada tubo.

Entre o coleoptile e a bainha da primeira folha foi aplicado 1ul de cada fração do extrato coletado com auxílio de uma microsseringa. As frações do extrato quando coletadas foram totalmente secas com auxílio de ventilador nos próprios frascos nas quais foram coletadas. Após a secagem foram ressuspendidas em 50ul de uma solução de etanol e água destilada (1:1, v/v). O sistema foi mantido nas condições de temperatura e luz iniciais por 96 horas. Após este período o comprimento das folhas das plântulas foi medido. Cada tratamento constou de cinco repetições. Para a curva padrão foram utilizadas as concentrações de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} e $10^0 \mu\text{g}$ de GA₃.

2.11- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando as comparações foram feitas entre dois tratamentos (controle e tratadas) utilizou-se o teste T "Student", a nível de 5% (SNEDECOR, 1962).

Os demais tratamentos foram analisados pelo teste de Análise de Variância Simples e a diferença mínima significativa foi calculada pelo Teste de Tukey a nível de 5% (PIMENTEL, 1984). As diferenças são apresentadas através de letras, que quando repetidas indicam que entre os valores correspondentes não há diferenças significativas.

III- RESULTADOS

3.1- CARACTERIZAÇÃO DO ÁPICE DO ESTÁDIO VEGETATIVO AO FLORAL

Com observações do ápice de plantas de Helianthus annuus cv.33 (girassol), feitas a partir de disseções em estereomicroscópio, desde o estágio vegetativo até o floral, foi possível diagramar uma sequência de estádios de ápice, conforme a figura 1, onde foram definidos seis estádios de desenvolvimento do ápice. No estágio 0, as plantas estavam com o ápice vegetativo, isto é, o domo era plano, com os primórdios foliares cobrindo-o e com uma coloração verde forte brilhante (figura 1). O estágio 1, foi caracterizado como floral. O domo apresentava forma cônica, sendo cercado pelos primórdios foliares, possuindo uma coloração verde forte mas sem brilho. Já, no estágio 2, o domo estava achatado, com coloração verde pálida, primórdios foliares e início do aparecimento das primeiras brácteas. No estágio 3, domo era plano, apresentando, no centro, um círculo pequeno de coloração verde forte enquanto o resto do domo era verde pálido. A borda do domo, neste estágio 3, era recoberta com as brácteas e alguns primórdios foliares. No estágio 4, o domo foi caracterizado por estar bastante plano, em forma de disco. Da margem externa deste domo para o seu centro, foi verificado o aparecimento das primeiras flores, formando um anel de cor esbranquiçada, possuindo algumas brácteas na sua borda. No quinto estágio, todo o domo estava ocupado pelos primórdios de flores. Com a forma bastante plana e coloração branca. Neste está-

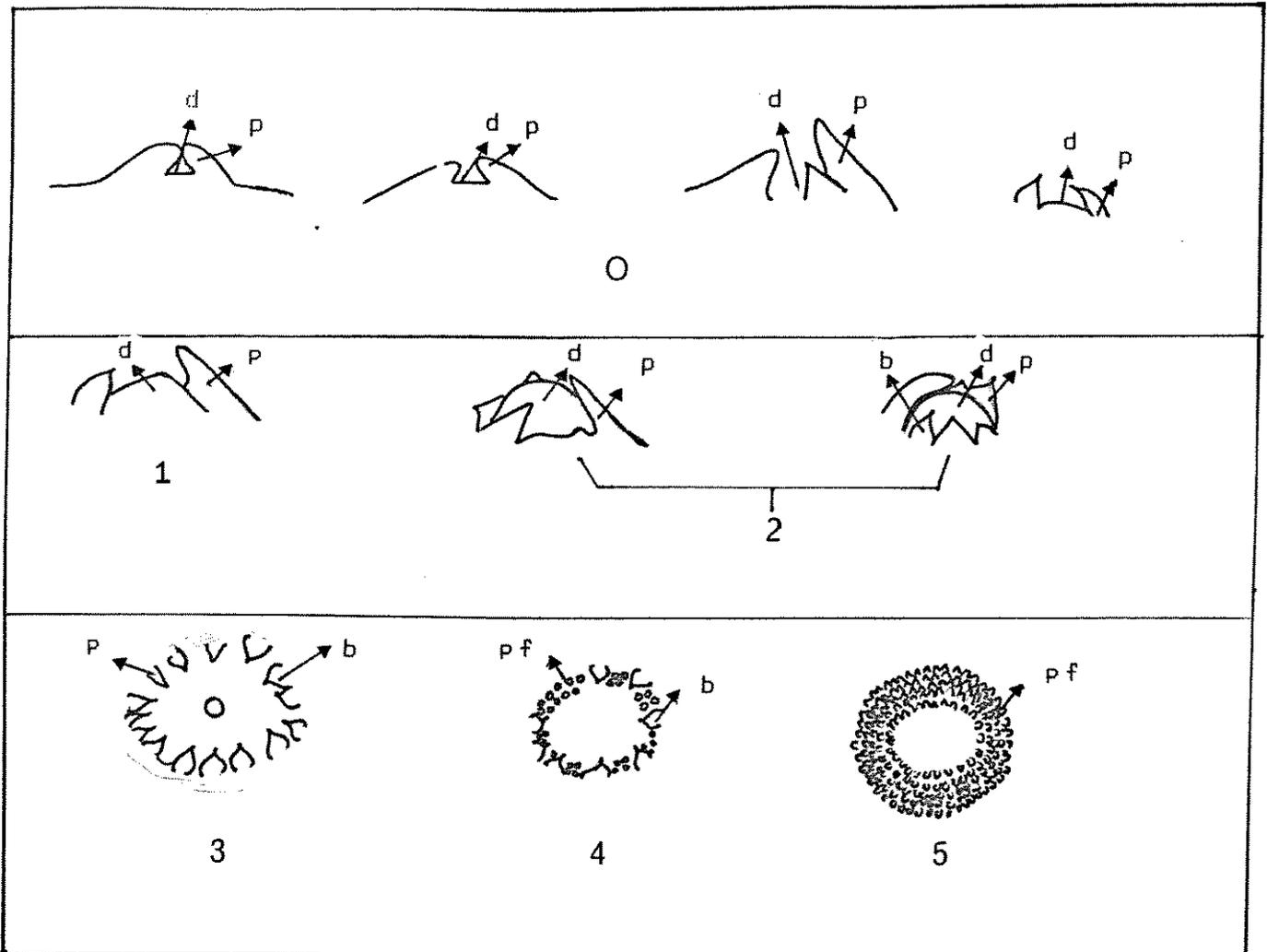


FIGURA 1 - Escala de estádios de desenvolvimento de ápice vegetativo para floral de plantas de Helianthus annuus (GIRASSOL).

- d - Domo apical
- p - Primórdios foliares
- b - Brácteas
- pf - Primórdios florais

dio de desenvolvimento da planta já visível um botão floral pequeno.

3.2- EFEITO DO FOTOPERÍODO

Quando se testaram fotoperíodos curtos e longos observou-se que não houve efeito deste fator de ambiente no desenvolvimento vegetativo, tanto em relação à altura como número de folhas por planta (figura 2A).

Na figura 2B, encontram-se os resultados de avaliação de dissecação de ápice. O comprimento do dia também não teve efeito para a iniciação floral e nem para desenvolvimento de ápice.

3.3- EFEITO DA INTERAÇÃO TEMPERATURA E FOTOPERÍODO

Verificado o efeito do fator de ambiente, fotoperíodo, procedeu-se à observação do efeito de temperatura e fotoperíodo no desenvolvimento de plantas de girassol.

A figura 3 apresenta os resultados do desenvolvimento vegetativo de plantas cultivadas em épocas de outono-inverno e primavera-verão, em condições de fotoperíodo curtos e longos. Foi visto que na época de outono-inverno ocorreu uma diferença de altura das plantas mantidas em dias curtos e longos até o 35^o dia (Figura 3A). Na época de primavera-verão ocorreu promoção de crescimento das plantas sob dias longos em relação às plantas em dias curtos (figura 3B).

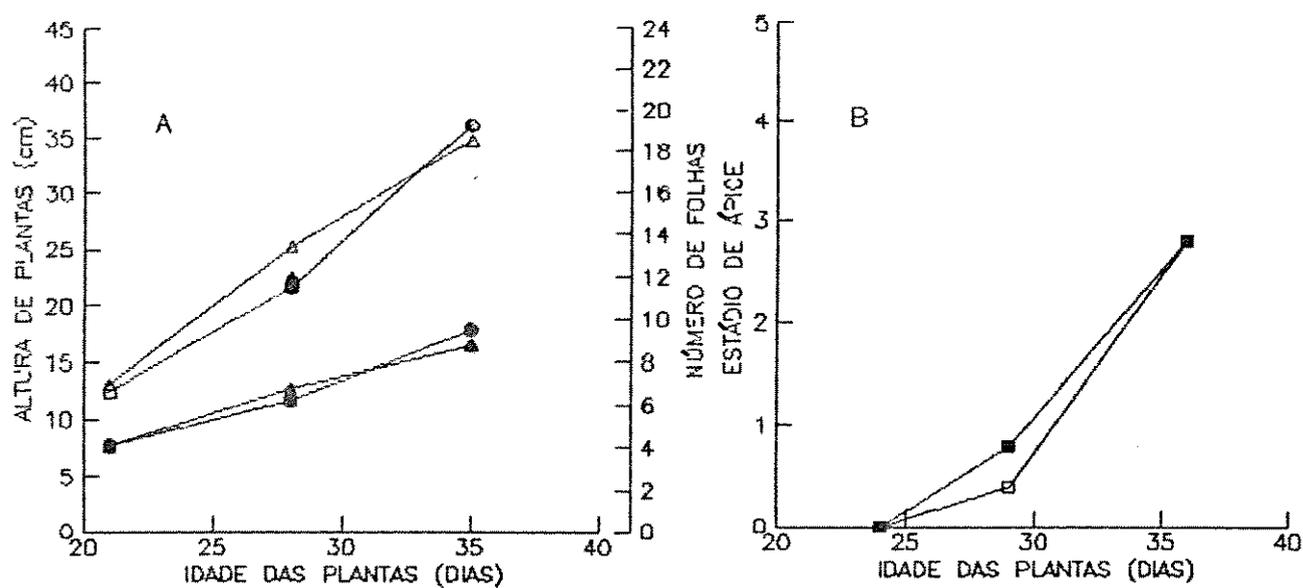


FIGURA 2 - Influência do fotoperíodo no desenvolvimento vegetativo e na floração de plantas de girassol.
 A- Altura de planta e Número de folhas B- Estádio de ápice
 O= Altura de planta Δ= Número de folhas ■= Estádio de ápice
 Símbolos: escuros= dias longos claros= dias curtos

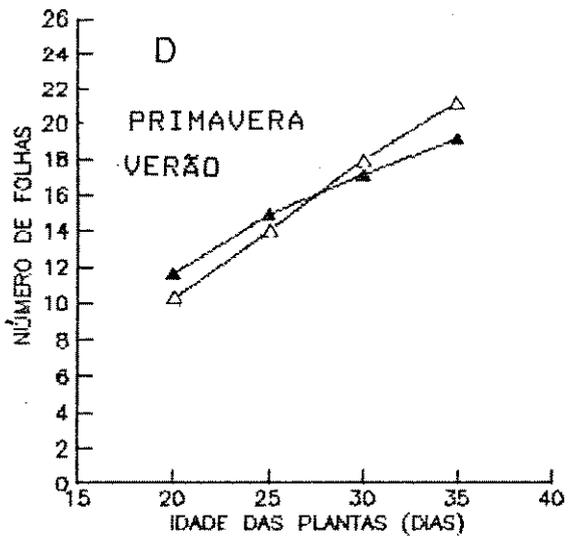
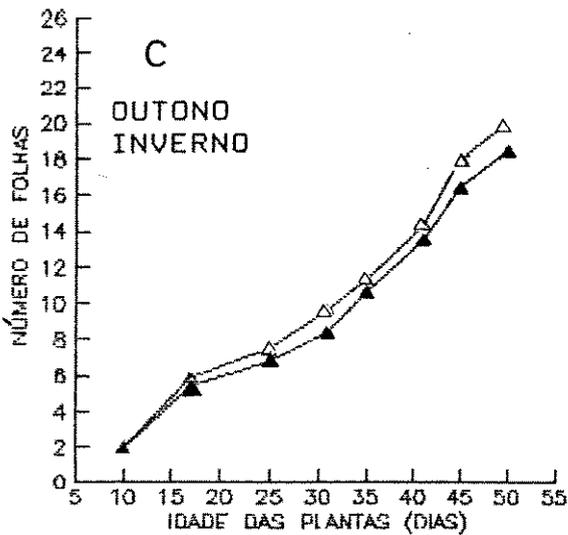
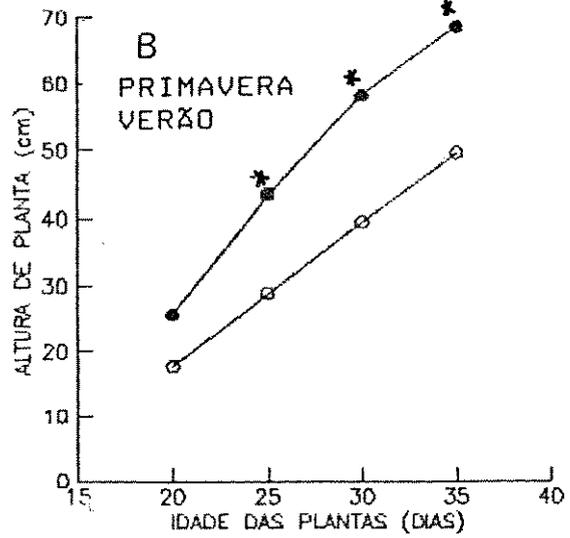
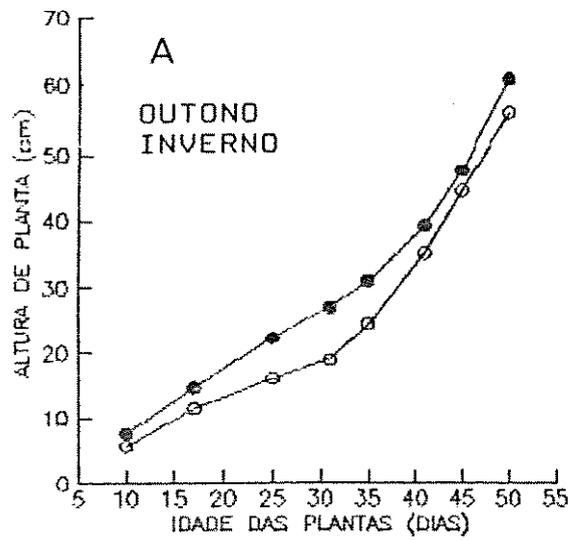


FIGURA 3- Observações de parâmetros de desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol, cultivadas em fotoperíodo curtos e longos em época de outono-inverno e primavera-verão.

A e B - Altura de planta

B e D - Número de folhas

Simbolos: escuros= dias longos

claros= dias curtos

* Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos

Com relação ao número de folhas (figuras 3C e 3D), não foi observado efeito da época em que os experimentos foram realizados, em nenhum dos fotoperíodos testados.

Foi verificado que, para a iniciação floral, a interação entre estes dois tratamentos também não causou efeito marcante conforme as figuras 4A e 4B. As plantas cultivadas em época de outono-inverno em dias longos, apresentaram antecipação significativa de desenvolvimento do ápice em relação às plantas em dias curtos (figura 4A).

Estes resultados do efeito da interação de temperatura e fotoperíodo, mostram que o comportamento fotoperiódico das plantas não é afetado por alteração de temperatura. As plantas em época de outono-inverno no 35^o dia, estavam vegetativas enquanto que nesta mesma idade, as plantas em época de primavera-verão já estavam em estágio 2 de desenvolvimento de ápice.

Em época de primavera-verão a iniciação floral é antecipada em relação à época de temperaturas mais baixas.

3.4- EFEITO DA REMOÇÃO DE COTILÉDONES

A remoção de cotilédones foi testada, a fim de verificar se haveria algum envolvimento com o processo da floração, sendo removidos um ou dois cotilédones.

Foi feita a remoção de dois cotilédones em plantas com 3,10 e 15 dias de idade. Avaliação de desenvolvimento de ápice destas plantas indicou que, para a iniciação floral, os tratamentos não tiveram efei-

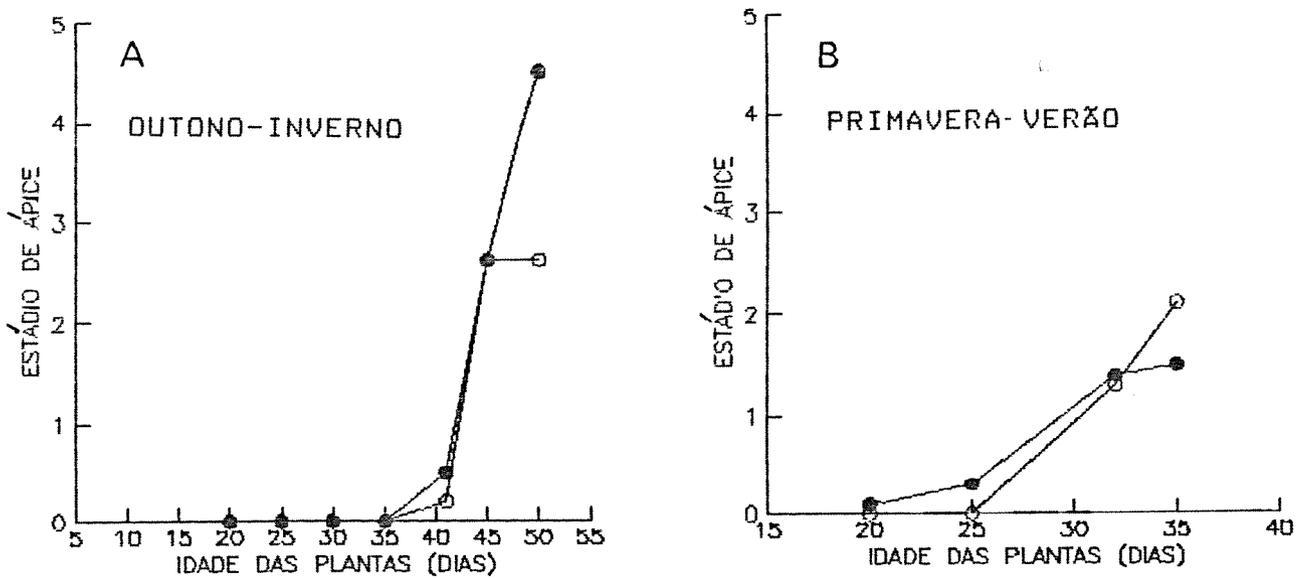


FIGURA 4 - Análise de ápice de plantas de girassol, cv. 33, cultivadas em fotoperíodos curtos e longos, nas épocas de outono-inverno e primavera-verão.

Simbolos: escuros= dias longos claros= dias curtos

* Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos

to. Contudo, aos 28 dias, todos os tratamentos apresentaram atraso significativo do desenvolvimento do ápice em relação às plantas controle. Este efeito foi mantido até o final do experimento somente nas plantas cuja remoção foi aos 10 dias de idade (figura 5A).

Quando foram removidos um ou dois cotilédones aos sete dias de idade, não houve efeito na iniciação floral e desenvolvimento de ápice conforme os resultados da figura 5B.

Na figura 5C são apresentados os resultados da remoção de dois cotilédones aos 15 dias de idade, onde constata-se que este tratamento não causou efeito significativo na floração de girassol.

O atraso de desenvolvimento de ápice verificado na figura 5A quando removeu-se dois cotilédones aos 10 dias foi confirmado com o resultado da figura 5D, onde observa-se que este tratamento, realmente, não teve efeito para a iniciação floral mas atrasou significativamente o desenvolvimento do ápice. As diferenças entre as idades de plantas nos gráficos 5A e 5D, em relação a plantas com 10 dias de idade, provavelmente se deva aos experimentos terem sido conduzidos em épocas diferentes como, um em meses mais quentes do ano (figura 5A) e outro em meses mais frios (figura 5D). No entanto, não deixam de confirmar um atraso no desenvolvimento do ápice em plantas com dez dias de idade.

Comparando-se os resultados dos tratamentos de remoção de um ou dois cotilédones no 10^o dia, verificou-se que estes não causaram efeito na iniciação floral e no desenvolvimento do ápice (figura 6). Ainda neste experimento, foram removidos dois cotilédones aos 15 dias de idade, não sendo obtidos resultados significativos para a floração.

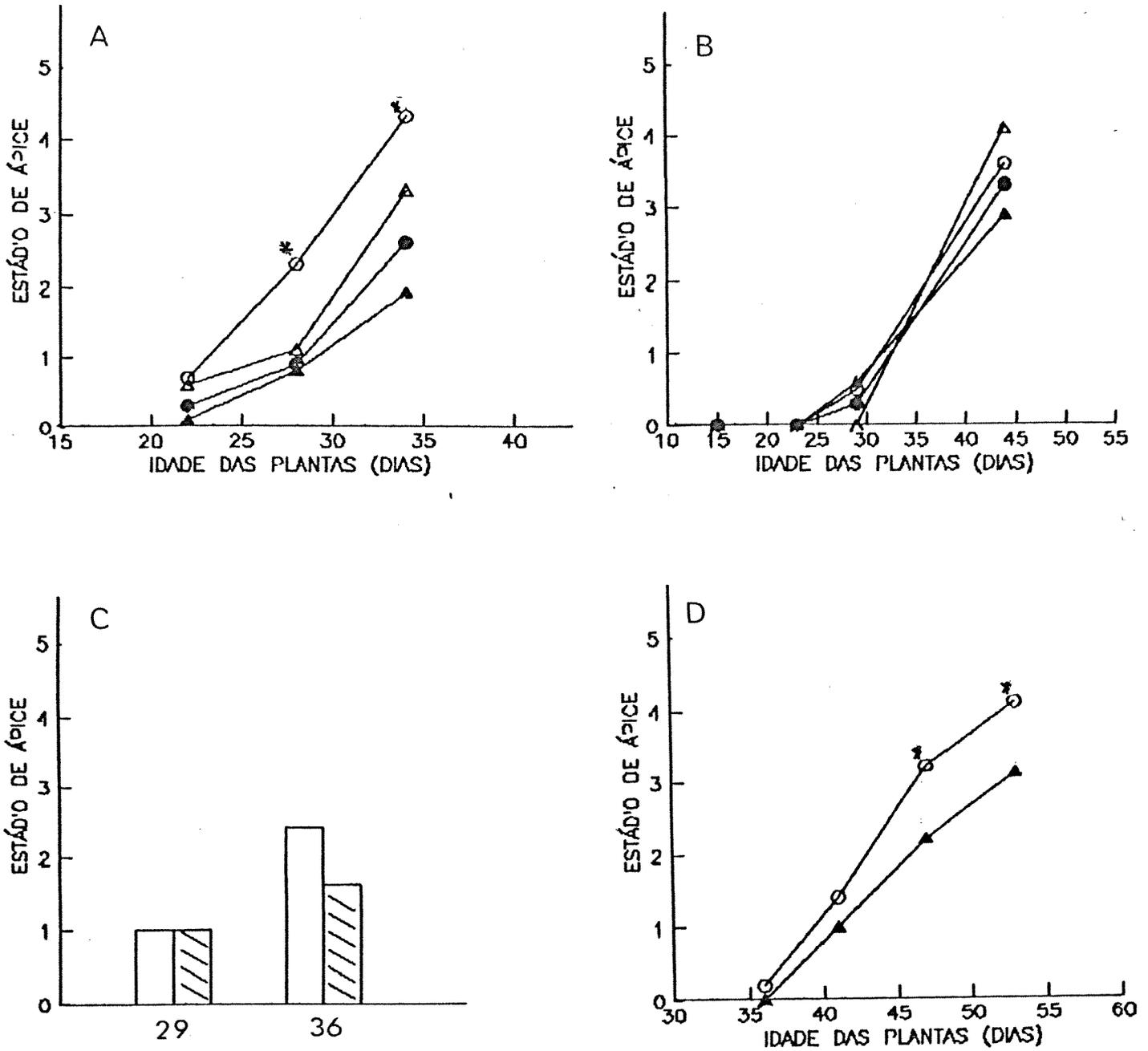


FIGURA 5 - Efeito da remoção (Rem.) de um ou dois cotilédones (cot.) na floração de girassol em idades diferentes.
 A: Rem. dois cot. - O= Controle ●= 3 dias ▲= 10 dias △= 15 dias
 B: Rem. no 7º dia - O= Controle ●= um cot. ▲= dois cots.
 C: Rem. no 15º dia - □=Controle ▨= dois cots.- Avaliações= dias 29 e 36
 D: Rem. no 10º dia - O= Controle ●= 2 cots.
 * Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle.

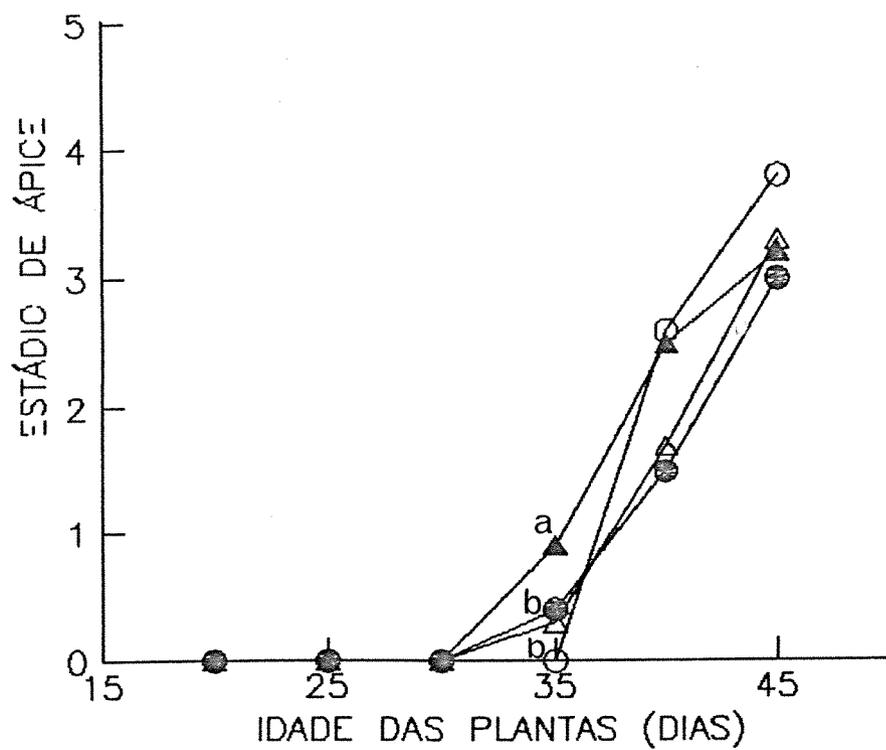


FIGURA 6 - Efeito da remoção (rem.) de cotilédones (cot.) na floração de plantas de girassol.

O = Controle ▲ = Rem. de dois cots. - 15 dias de idade
 ● = Rem. dois cots. - 10 dias de idade
 Δ = Rem. um cot. - 10 dias de idade

Os resultados da remoção de cotilédones aos 10 ou 15 dias não foram muito constantes, o que dificultou a continuação de seu estudo.

Para o desenvolvimento vegetativo foi verificado que, a remoção de dois cotilédones aos 3 e 10 dias atrasou o crescimento de caule, enquanto a remoção aos 15 dias não apresentou efeito (figura 7A). No final do experimento a altura das plantas cuja remoção foi feita no 3º dia era igual à do controle. Quando um ou dois cotilédones foram removidos no 7º dia não ocorreu efeito para o crescimento (figura 7B). A remoção de dois cotilédones aos 10 e 15 dias (figuras 7C e 7D respectivamente), provocou atraso de crescimento de caule.

Na figura 8A são apresentados resultados da remoção de um ou dois cotilédones no 10º dia, e dois no 15º dia. Verificou-se que a remoção de um ou dois cotilédones no 10º dia atrasou o crescimento.

Quanto ao número de folhas verificou-se que, a remoção de um ou dois cotilédones no 10º dia e dois no 15º dia de idade das plantas causaram atraso na sua formação (figura 8B). Contudo, ao final do experimento, as plantas de todos os tratamentos apresentavam número de folha igual ao controle.

Quando a remoção de dois cotilédones foi feita aos 3, 10 e 15 dias houve atraso na formação de folhas no 10º dia (figura 9A). Para a remoção de um ou dois cotilédones no 7º dia não foi verificado qualquer efeito para o número de folhas (figura 9B). As figuras 9C e 9D mostram que a remoção de dois cotilédones aos 10 ou 15 dias não teve efeito para o número de folhas.

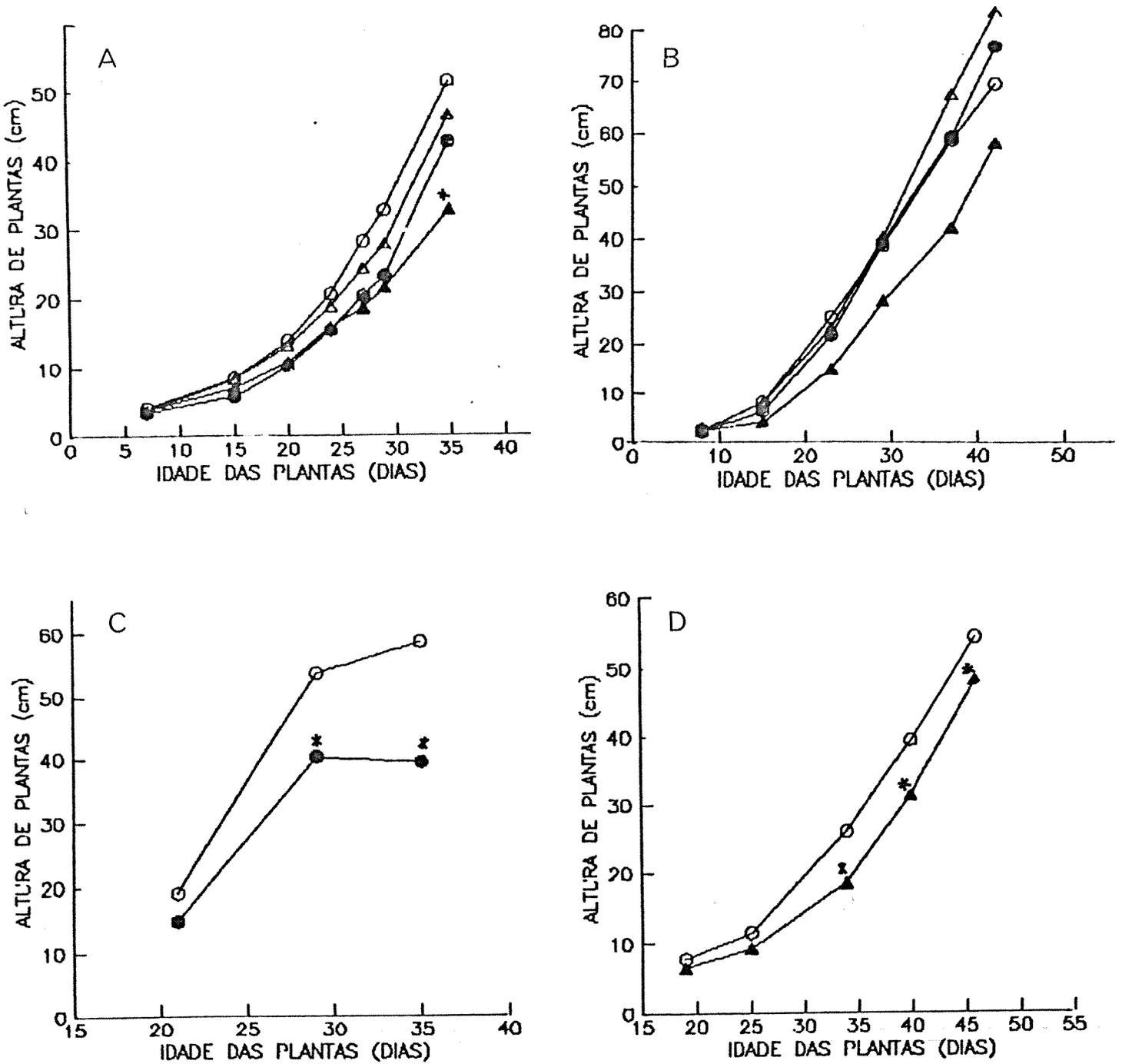


FIGURA 7 - Efeito da remoção (rem.) de um ou dois cotilédones (cot.) no crescimento de plantas de girassol.

A: Rem. dois cots. - ○ = Controle ● = 3 dias ▲ = 10 dias △ = 15 dias

B: Rem. no 7^o dia - ○ = Controle ● = um cot. ▲ = dois cots.

C: Rem. no 15^o dia - ○ = Controle ● = dois cots.

D: Rem. no 10^o dia - ○ = Controle ● = dois cots.

* Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle.

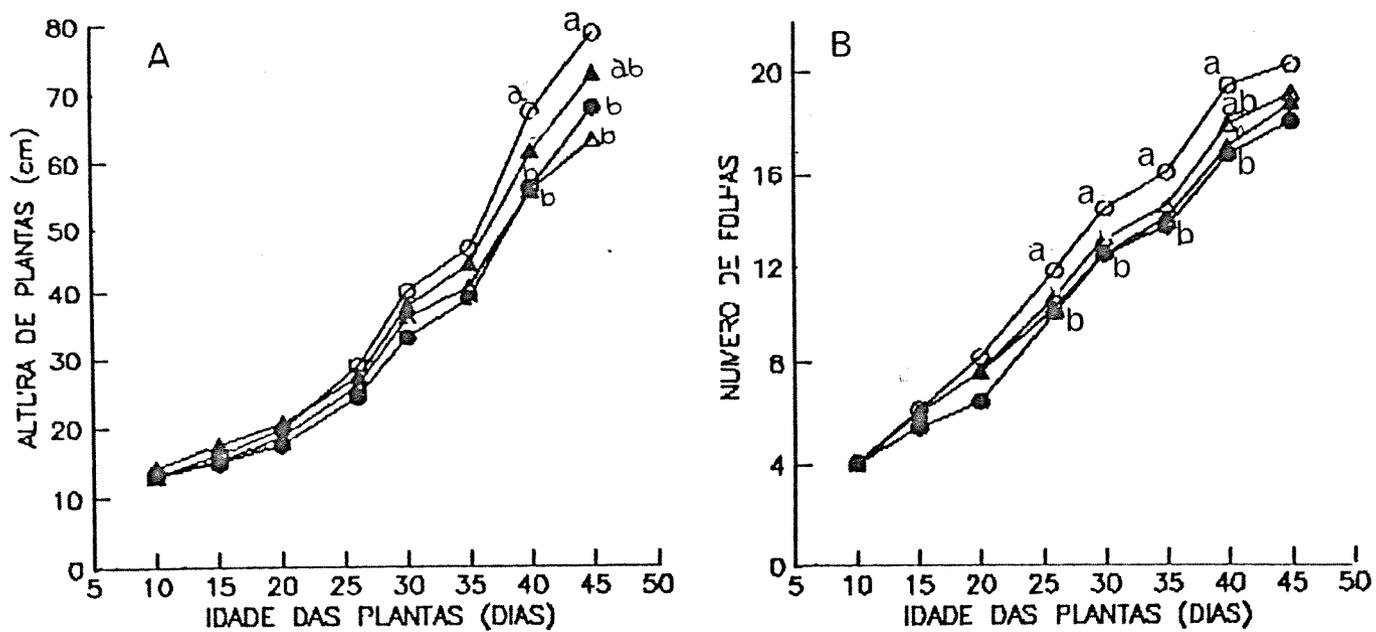


FIGURA 8 - Efeito da remoção (rem.) de cotilédones (cots.) no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol.

A= Crescimento de planta B= Número de folhas

O= Controle

▲= Rem. de dois cots. - 15 dias de idade

●= Rem. de dois cots. - 10 dias de idade

△= Rem. de um cot. - 10 dias de idade.

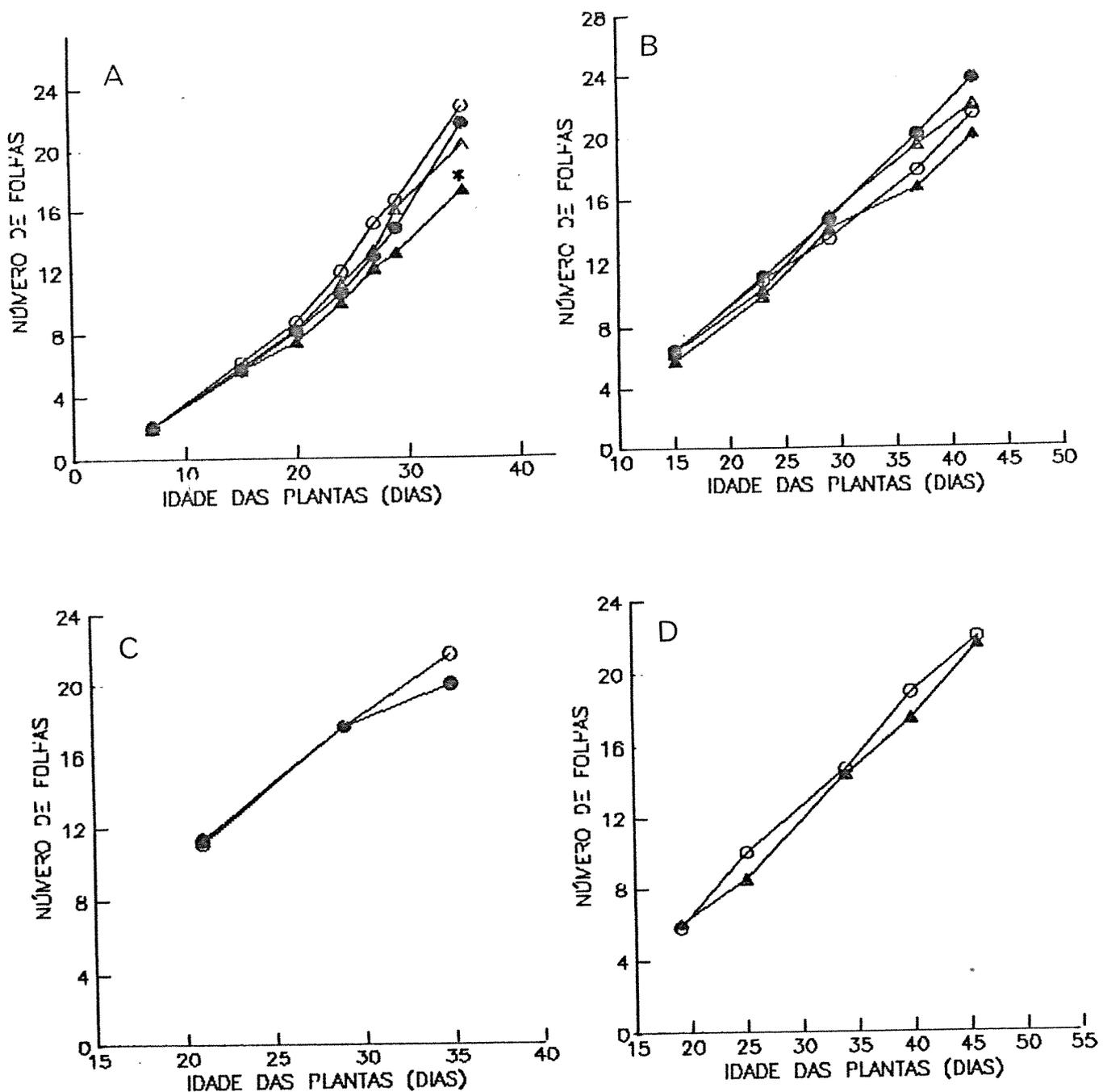


FIGURA 9 - Efeito da remoção (rem.) de um ou dois cotilédones (cot), na iniciação foliar de plantas de girassol.
 A: Rem. de dois cot. - O= Controle ●= 3 dias ▲= 10 dias △= 15 dias
 B: Rem. no 7º dia - O= Controle ●= Um cot. ▲= Dois cots.
 C: Rem. no 15º dia - O= Controle ●= Dois cots.
 D: Rem. no 10º dia - O= controle ●= Dois cots.
 * Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle.

3.5- EFEITO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

Após verificação do efeito de fatores do ambiente em plantas de girassol, passou-se ao estudo do envolvimento de grupos de substâncias que poderiam estar relacionadas com controle endógeno de floração desta espécie. Foram inicialmente testadas substâncias fenólicas.

A primeira substância fenólica testada foi o ácido salicílico, que foi aplicado num total de 80 μ l por planta, em oito aplicações de 10 μ l de 2 em 2 dias (a partir do 7^o dia de idade), este tratamento não mostrou efeito no desenvolvimento vegetativo (figura 10A) e nem em desenvolvimento floral (figura 10B).

O aumento da quantidade desta substância para 120 μ l (tabela 4) ou 240 μ l (tabela 5) não resultou em qualquer efeito para o desenvolvimento vegetativo, iniciação floral e desenvolvimento de ápice.

Dentre as substâncias fenólicas foram também testados cumarina e os ácidos clorogênico e cafêico. Os resultados do efeito destas substâncias para altura e número de folhas das plantas são apresentados na figuras 11A e 11B, respectivamente e indicaram que não houve qualquer efeito sobre estes parâmetros. Estas substâncias também não apresentaram efeito na iniciação floral (figura 11C), ocorrendo somente um atraso no desenvolvimento do ápice aos 39 dias de idade das plantas tratadas com ácido cafêico. Contudo, este atraso não foi mantido, pois aos 47 dias os resultados de todos os tratamentos foram estatisticamente iguais aos do controle (figura 11C).

Desta forma, apesar de ter ocorrido atraso de desenvolvimento do ápice em plantas tratadas com ácido cafêico, os resultados do estudo

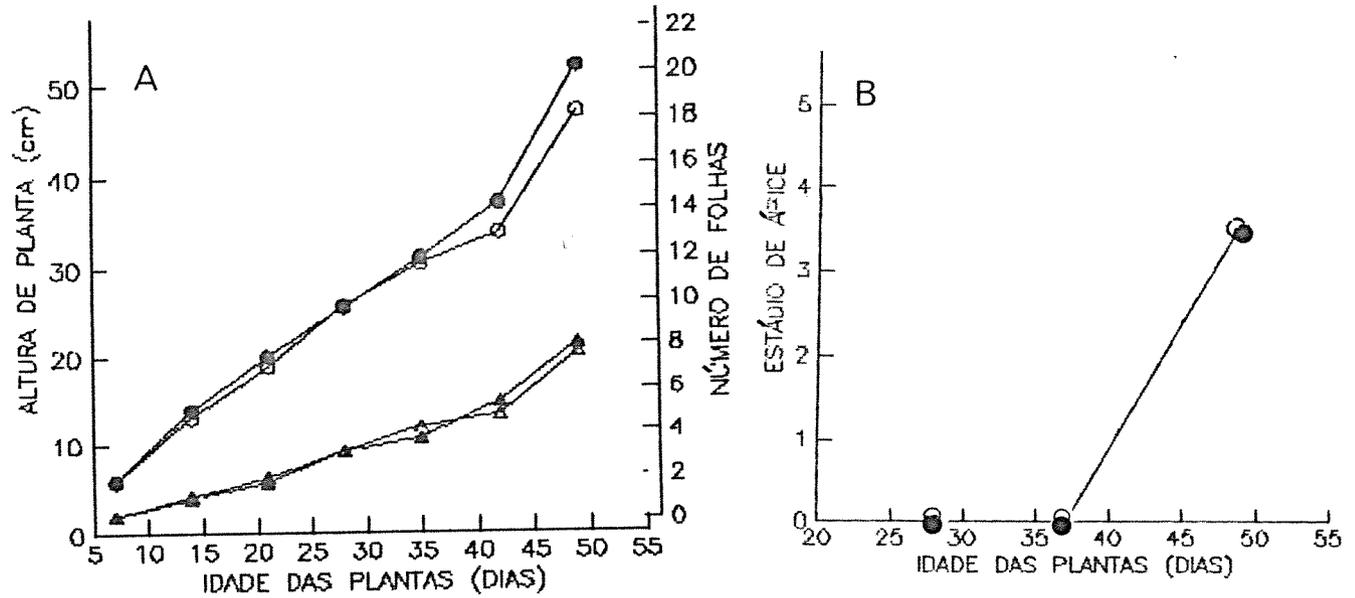


FIGURA 10 - Efeito de oito aplicações de ácido salicílico $10^{-3}M$ no ápice de plantas de girassol (10ul/aplicação).
 A- Altura de planta:○ e Número de folhas:△ B- Estádio de ápice:○
 Símbolos: claros= controle escuros= ácido salicílico

TABELA 4 - Efeito da aplicação de $120\mu\text{l}$ de ácido salicílico no desenvolvimento vegetativo e floração de plantas de girassol. Aplicações de $10\mu\text{l}$ (2 em 2 dias) com início no 10^{o} dia de idade.

I	ALTURA (cm)		NÚMERO DE FOLHAS		ESTÁDIO DE ÁPICE	
	1	2	1	2	1	2
11	3.2	3.5	2.3	3.3	---	---
15	---	---	---	---	0	0
25	19.8	19.1	11.7	12.0	1.1	1.2
34	51.4	48.8	18.8	18.7	3.8	3.5

I= Idade (dias), 1= Controle e 2= Ácido salicílico $10^{-3}\text{M}-10\mu\text{l}/\text{aplicação}$.

TABELA 5 - Efeito da aplicação exógena de $240\mu\text{l}$ de ácido salicílico 10^{-3}M para o desenvolvimento vegetativo e floração de plantas de girassol. Aplicações (12) de $20\mu\text{l}$ com início no 26° dia de idade.

I	ALTURA (cm)		NÚMERO DE FOLHAS		ESTÁDIO DE ÁPICE	
	1	2	1	2	1	2
27	4.8	5.8	4.0	4.0	---	---
35	9.5	10.0	7.5	7.0	---	---
41	13.6	13.8	9.0	8.8	---	---
46	21.3	23.1	12.5	12.9	---	---
47	---	---	---	---	0.7	1.7
52	---	---	---	---	2.5	2.3
58	---	---	---	---	2.8	3.4

I= Idade (dias), 1= Controle

2= ácido salicílico - 10^{-3}M - $20\mu\text{l}$ /aplicação

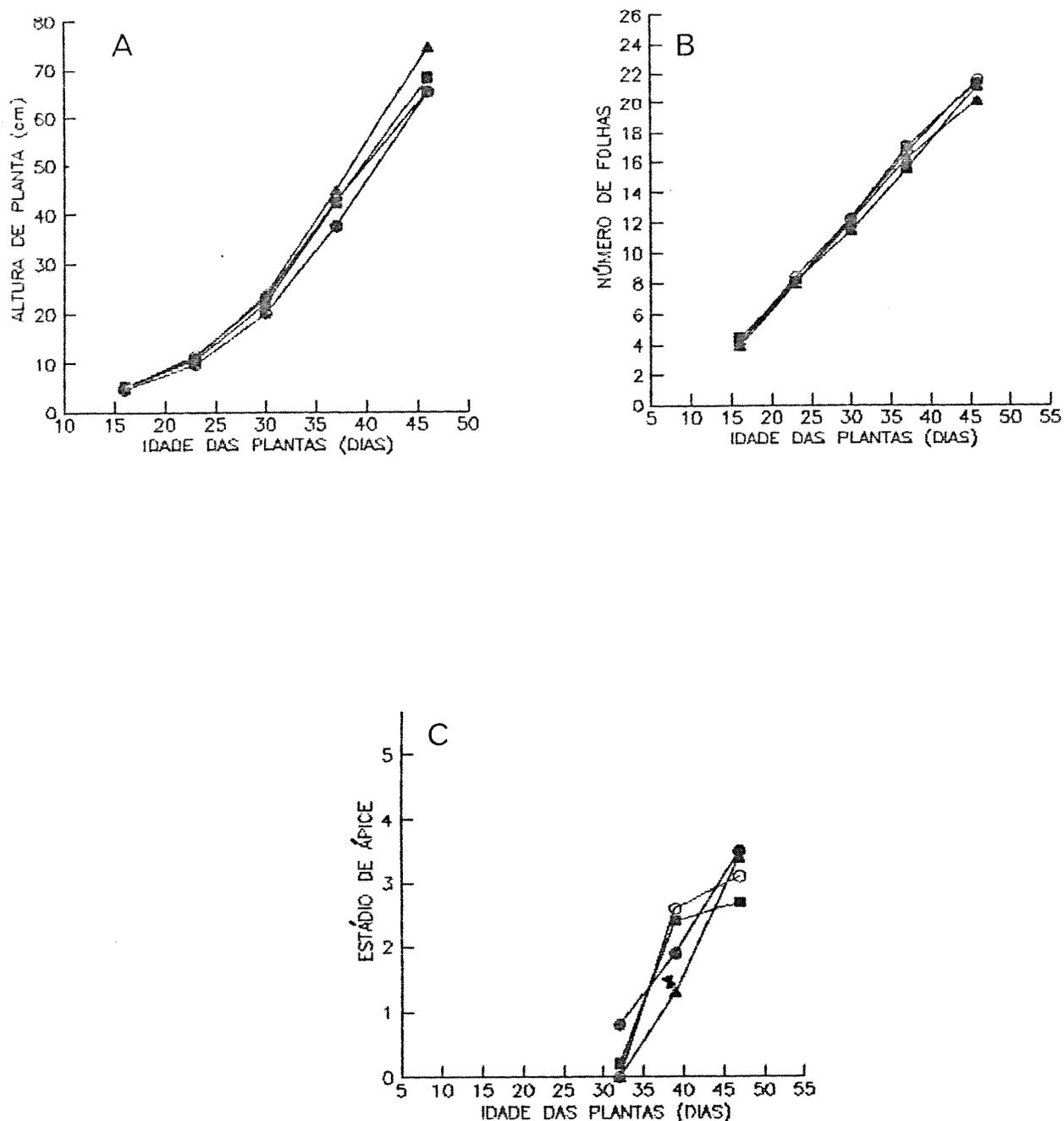


FIGURA 11 - Efeito da aplicação de substâncias fenólicas (125 μ l) no desenvolvimento vegetativo e floração de plantas de girassol.
 A- Alatura de planta B- Número de folhas C- Estádio de ápice
 O= Controle ■= Ácido clorogênico ▲= Ácido cafeico ●= Cumarina
 * Diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o controle.

com estas substâncias, não foram suficientes para caracterizar o seu envolvimento com a floração de girassol.

3.6- EFEITO DA APLICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REGULADORAS DE CRESCIMENTO EM ÁPICE DE GIRASSOL

Dando sequência ao estudo do efeito de substâncias que poderiam estar envolvidas com o controle do processo de floração em girassol, testaram-se também algumas substâncias reguladoras de crescimento. Foram utilizados ácido indol-3-acético (AIA), 6-benziladenina (6BA) e ácido giberélico (GA₃). A análise dos parâmetros de desenvolvimento vegetativo mostra que o GA₃ promoveu significativamente o crescimento de caule em relação ao controle (figura 12A) em todas as observações feitas, as outras substâncias, AIA ~~e 6BA~~, também apresentaram ^{ou} efeito, porém não tão marcante. O AIA promoveu crescimento somente aos 35 dias de idade.

Na figura 12B, os resultados mostram que GA₃ promoveu a formação de folhas a partir do dia 26. Este efeito foi observado com aplicação de 6BA, mas apenas no final do experimento. O tratamento com AIA apresentou resultados iguais ao controle.

A análise de desenvolvimento de ápice (figura 13), mostra que GA₃ teve efeito promotor, bastante expressivo, tanto para a iniciação floral quanto para o desenvolvimento do ápice. A análise mostra que aos 26 dias, o controle estava no estágio 0 enquanto plantas tratadas estavam no estágio 3. Aos 35 dias de idade, o controle estava próximo

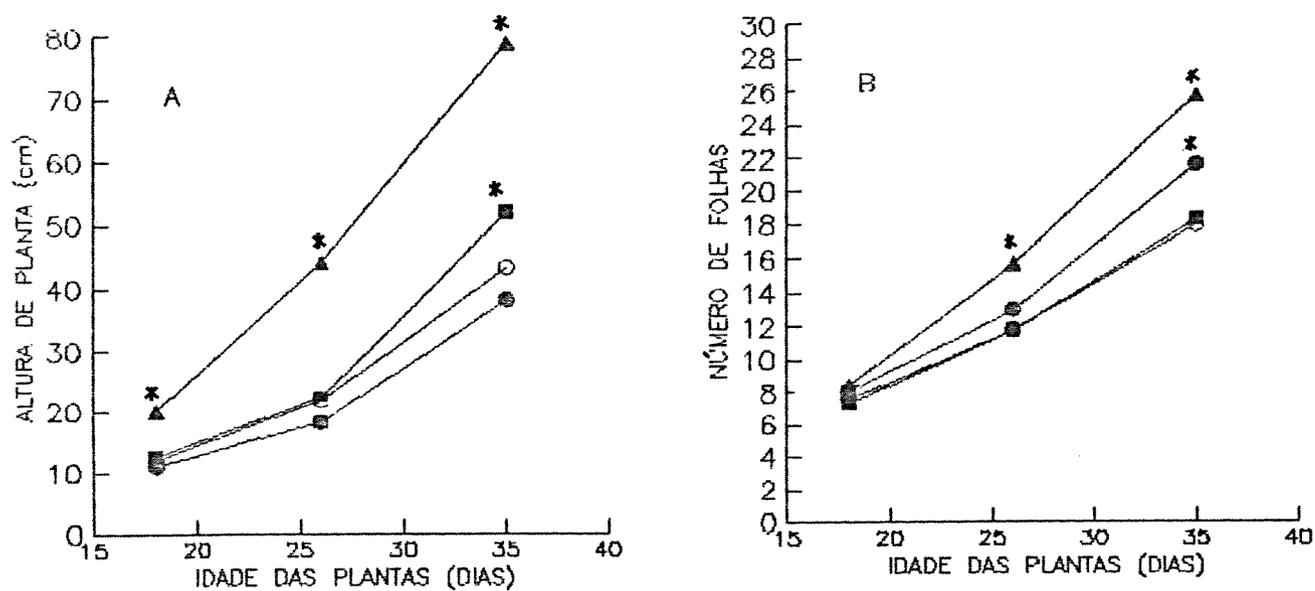


FIGURA 12 - Efeito da aplicação de substâncias reguladoras de crescimento no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol.

O = Controle ■ = AIA ● = 6BA ▲ = GA₃

* Diferença estatisticamente significativa entre o tratamento e controle.

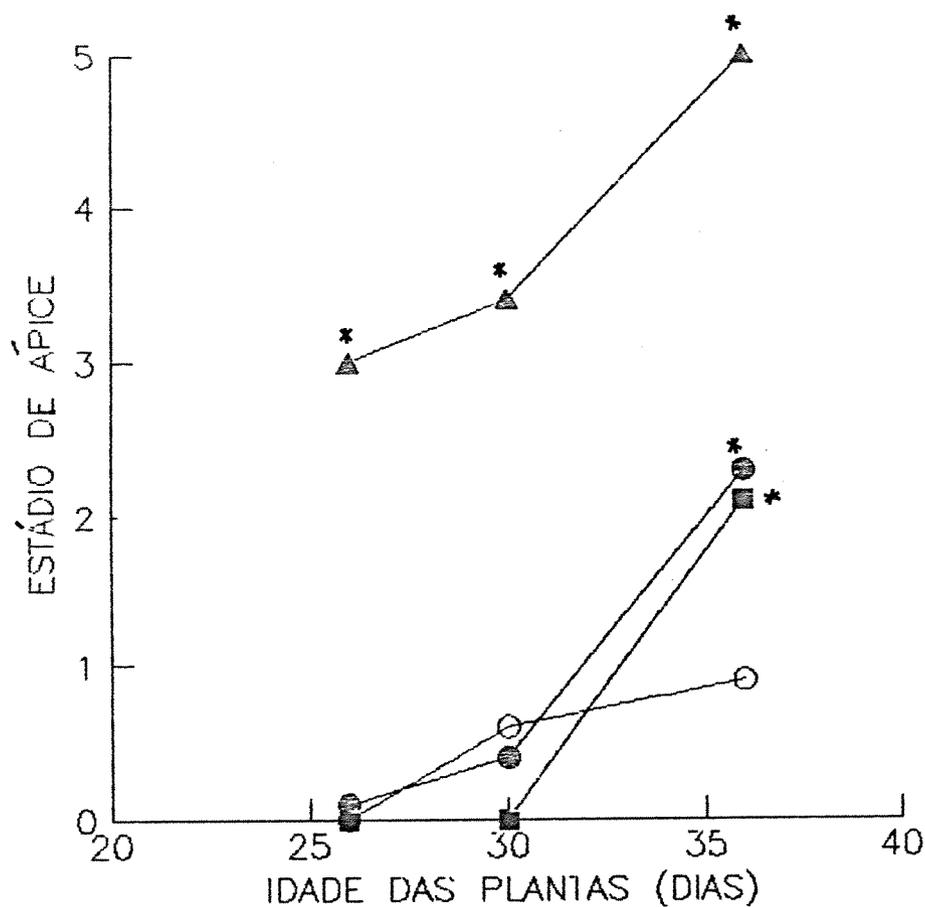


FIGURA 13 - Efeito da aplicação de substâncias reguladoras de crescimento na iniciação floral e desenvolvimento do ápice de plantas de girassol.

○ = Controle ■ = AIA ● = 6BA ▲ = GA₃

* Diferença estatisticamente significativa entre o tratamento e o controle.

do estágio 1 e aquelas tratadas com GA₃ estavam próximas do estágio 5. Verificando-se também nesta figura, que o AIA e o 6BA não tiveram efeito na iniciação floral, contudo aos 35 dias de idade, estes tratamentos promoveram significativamente o desenvolvimento do ápice em relação ao das plantas controle.

Assim, a aplicação de diferentes substâncias reguladoras de crescimento em plantas de girassol, indicaram que AIA e 6BA exerceram algum efeito no desenvolvimento do ápice, enquanto, GA₃, teve efeito tanto na iniciação floral quanto para o desenvolvimento do ápice desta espécie.

3.7- EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃)

Foi verificado anteriormente que GA₃ na concentração de $10^{-3}M$, apresentou efeito expressivo na iniciação floral e desenvolvimento do ápice, assim como no desenvolvimento vegetativo. Diante destes resultados, tornou-se conveniente um estudo mais detalhado do efeito desta substância, verificando-se qual a época ideal para sua aplicação, como também a quantidade necessária para que tivesse efeito sobre o processo de floração em Helianthus annuus.

GA₃ foi aplicado inicialmente, em plantas em idade entre 10 e 20 dias. Observa-se pela figura 14, que plantas tratadas aos 10, 12 e 14 dias apresentaram promoção significativa da iniciação floral e para aquelas tratadas aos 16 dias o mesmo não ocorre. O desenvolvimento do ápice foi promovido pelos dois tratamentos. Entretanto, o tratamento

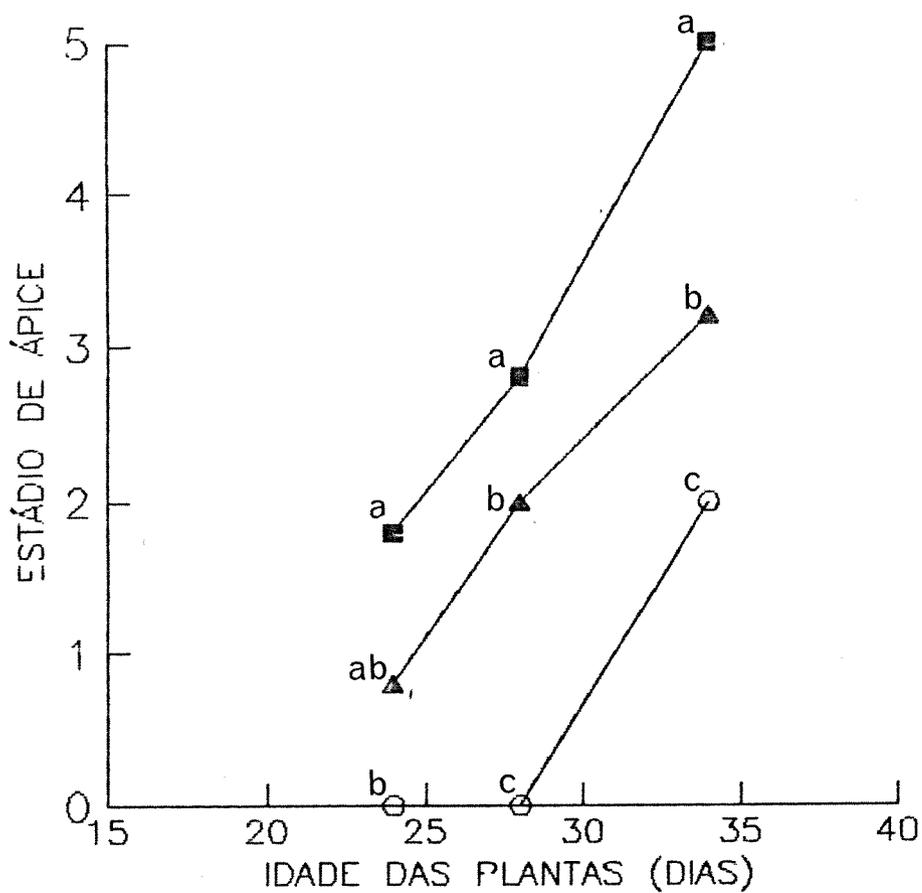


FIGURA 14 - Efeito de GA_3 na iniciação floral e desenvolvimento do ápice, aplicado em idades diferentes em plantas de girassol.
 O = Controle Dias de aplicações: ■ = 10/12/14 ▲ = 16/18/20

com aplicações aos 10,12 e 14 dias foi mais efetivo para o desenvolvimento de ápice do que aos 16,18 e 20 dias.

Diante de resultados indicativos de que GA₃ tem efeito na floração de girassol, quando aplicado na faixa entre 10,12 e 14 dias, qual a idade ideal, entre estas, em que a aplicação desta substância seria mais efetiva? Assim, plantas foram tratadas aos 10,12 e 14 dias, separadamente. Os resultados destes tratamentos são apresentados na figuras 15A e 15B. Neste caso, não houve efeito na iniciação floral, mas ocorreu promoção significativa do desenvolvimento do ápice. Os resultados obtidos indicaram também que GA₃ foi mais efetivo quando aplicado em plantas mais jovens.

Para verificar se GA₃ poderia agir ainda mais cedo, estudou-se o seu efeito quando aplicado às sementes. Assim, sementes foram embebidas em solução de GA₃ ($10^{-3}M$), por 24 horas. A análise de floração (figura 16), mostra que a embebição de GA₃ promoveu o desenvolvimento do ápice comparado com o do controle, porém não teve efeito significativo na iniciação floral. Nesta figura é possível também comparar os resultados de sementes embebidas com o de plantas tratadas aos 12 e 18 dias, verificando-se que, tanto plantas de sementes embebidas quanto aquelas tratadas no 12º dia de idade apresentaram efeito de promoção de desenvolvimento do ápice em relação ao controle. Com a aplicação aos 12 dias foi confirmado o resultado obtido anteriormente (figura 15B), no qual é visto que o tratamento nesta idade não teve efeito para a iniciação floral. GA₃ aplicado aos 18 dias de idade não apresentou efeito significativo para a iniciação floral nem para o desenvolvimento do ápice (figura 16). Estes resultados confirmam que aplica-

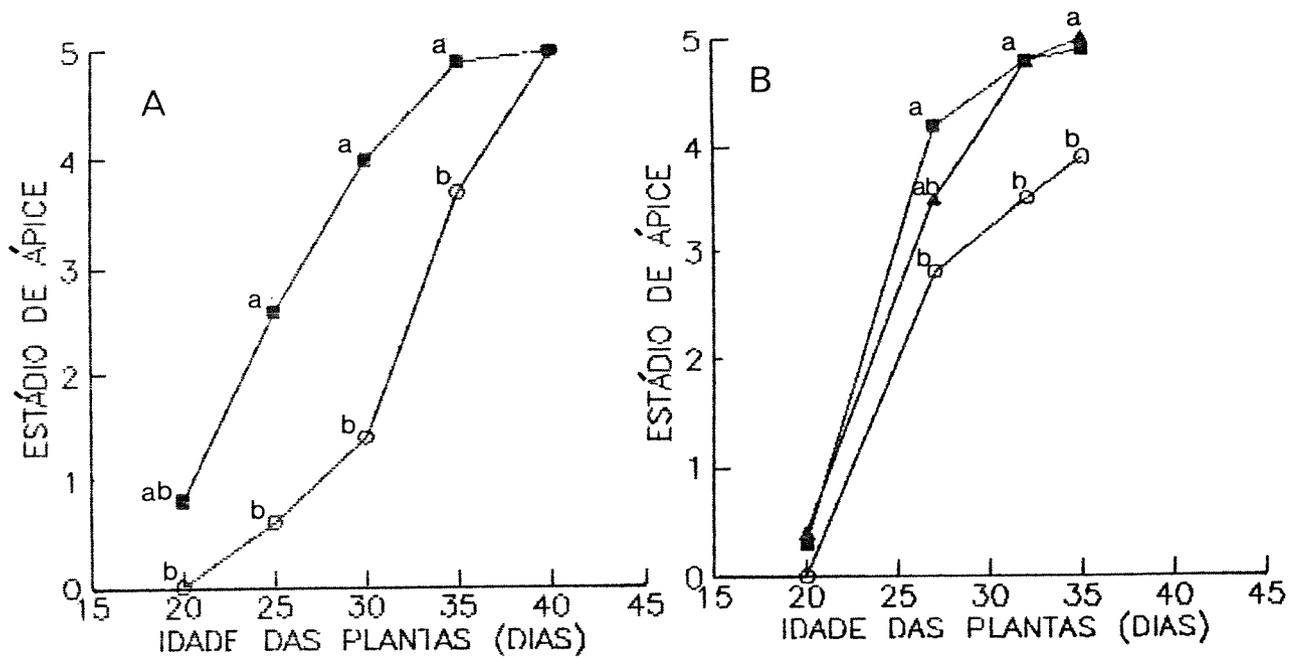


FIGURA 15 - Análise de ápice de plantas de girassol tratadas com GA₃ em idades diferentes. A- 10 dias B- 12 e 14 dias
 O= Controle ■= 10 dias ■= 12 dias ▲= 14 dias

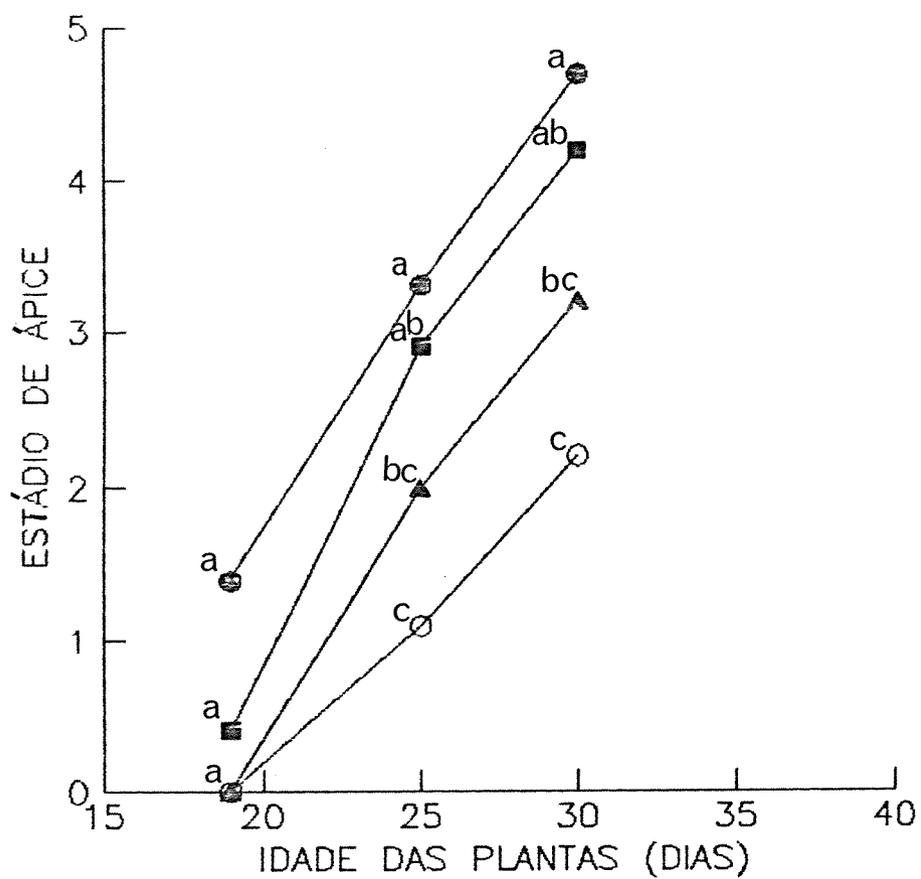


FIGURA 16 - Análise de ápice de plantas de girassol tratadas com GA₃ em idades diferentes. ○ = Controle ■ = 12 dias ▲ = 18 dias ● = Sementes embebidas (por 24 horas).

ções de GA₃ em plantas mais velhas não causam efeito na iniciação floral e no desenvolvimento do ápice.

Outro aspecto abordado sobre o efeito de GA₃ para floração foi a quantidade aplicada. Numa primeira tentativa, GA₃ foi aplicado nas quantidades de 0,090µg e 0,180µg, que foi iniciada em plantas com 10,12 e 14 dias de idade. Cada quantidade foi fracionada e aplicada em três ou seis vezes, sendo cada aplicação de 0,015µg e 0,030µg, respectivamente, ficando caracterizado, pela análise de ápice, que ambos tratamentos foram capazes de antecipar significativamente o desenvolvimento do ápice (figura 17). Verificou-se também que o tratamento de 0,090µg foi o único que apresentou promoção significativa da iniciação do floral.

A tabela 6 apresenta resultados de análise de ápice de plantas tratadas com 0,090µg de GA₃, cuja quantidade foi fracionada de duas formas: um tratamento com seis aplicações de 0,015µg e outro com três de 0,030µg. Foi verificado então, que aplicações iniciais de 0,015µg ou 0,030µg apresentaram o mesmo efeito de promoção na iniciação floral. Ambas

aplicações promoveram o desenvolvimento do ápice da mesma forma. Estes resultados, confirmam também aqueles obtidos para a iniciação floral e desenvolvimento do ápice com 0,090µg (figura 17).

Quantidades menores de GA₃ foram testadas, sendo que 0,045µg de GA₃ foi fracionado em três vezes (0,015µg) e aplicado aos 10,12 e 14 dias de idade das plantas. Os resultados obtidos foram de promoção da iniciação floral e desenvolvimento de ápice (tabela 6).

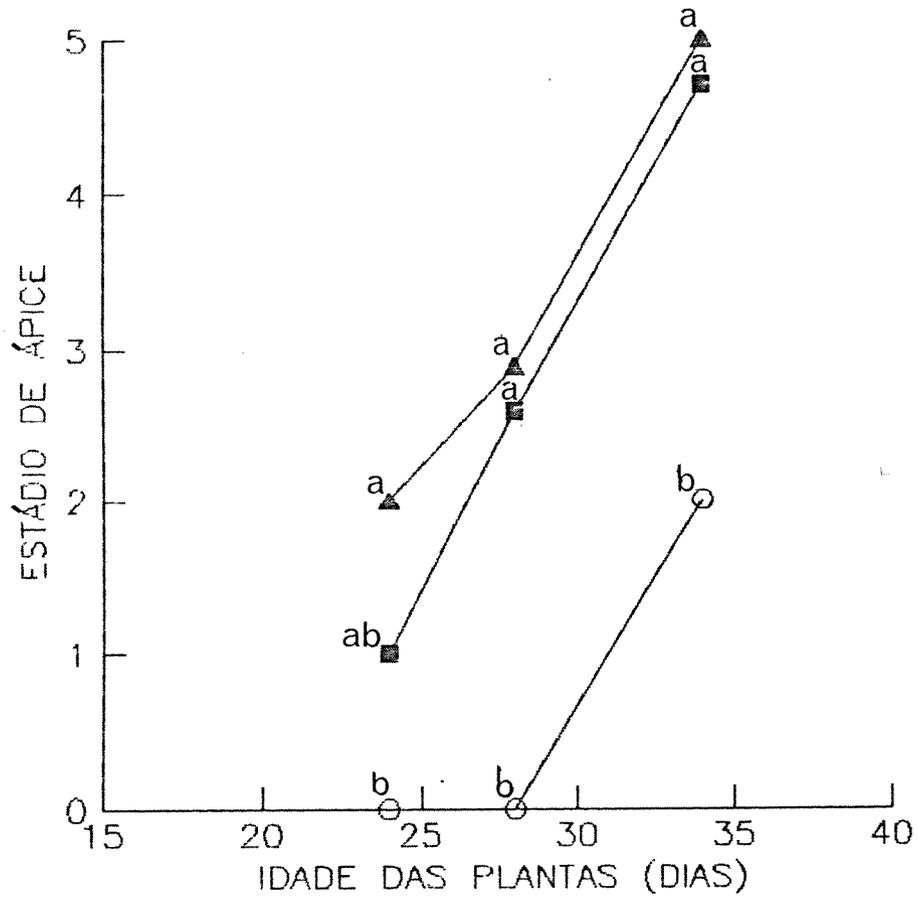


FIGURA 17 - Efeito da aplicação de GA₃ em quantidades diferentes em plantas de girassol.

○ = Controle ■ = 0,180 μg ▲ = 0,090 μg

TABELA 6 - Efeito da aplicação exógena de GA₃ (0.045μg e 0.090μg) na iniciação floral e desenvolvimento do estágio de ápice de plantas de girassol.

ESTÁDIO DE ÁPICE				
D.A.	CONTROLE	10/12/14 0.045μg	10 a 20 0,090μg	10/12/14 0.090μg
I				
20	0	0	0	0
25	0.2b	1.7a	1.6a	2.0a
30	1.0b	2.9a	2.9a	3.5a
35	2.1	5.0a	4.6a	4.9a
40	2.7	5.0a	5.0a	5.0a

D.A.= Dias da aplicação, I= Idade (dias)

Letras indicam comparações feitas dentro de cada idade.

Anteriormente foi verificado que GA₃ aplicado em quantidade maior (0,090ug), teve efeito no desenvolvimento do ápice de plantas tratadas aos 16,18 e 20 dias. Desta forma, tornou-se conveniente verificar se quantidade menor de GA₃ também teria efeito para o ápice de plantas tratadas nesta fase. Assim, aplicação de 0,045ug de GA₃ aos 16,18 e 20 dias, fracionado em três aplicações de 0,015ug, mostrou que o tratamento não causou efeito na iniciação floral (figura 18). Neste mesmo experimento a aplicação desta quantidade aos 10,12 e 14 dias, causou promoção de iniciação floral (figura 18). Com este resultado, confirma-se o verificado anteriormente na figura 14, onde 0,090ug aplicados, nesta mesma época, causou efeito de promoção na iniciação floral somente aos 10,12 e 14 dias de idade, mostrando que, para a iniciação floral, a quantidade, dentro dos limites aqui utilizados, não foi o aspecto mais importante e sim a época de aplicação, ocorrendo maior efetividade quando a aplicação foi feita aos 10,12 e 14 dias.

Pelos resultados anteriores foi visto que, as plantas de girassol foram respondendo com antecipação da iniciação floral e desenvolvimento do ápice à medida que as quantidades de GA₃ aplicadas foram reduzidas. Então, tornou-se conveniente verificar se quantidades menores do que 0,045ug de GA₃ teriam ainda efeito na sua floração.

Desta forma, a quantidade de GA₃ aplicada foi reduzida de 0,045ug para 0,015ug, sendo que esta quantidade foi fracionada em três partes (0,005ug) que foram aplicadas no ápice de plantas aos 10,12 e 14 dias. A análise de ápice (figura 19) indica que esta quantidade não antecipou a iniciação floral mas causou efeito no desenvolvimento do ápice. Comparando este resultado, de iniciação floral, com

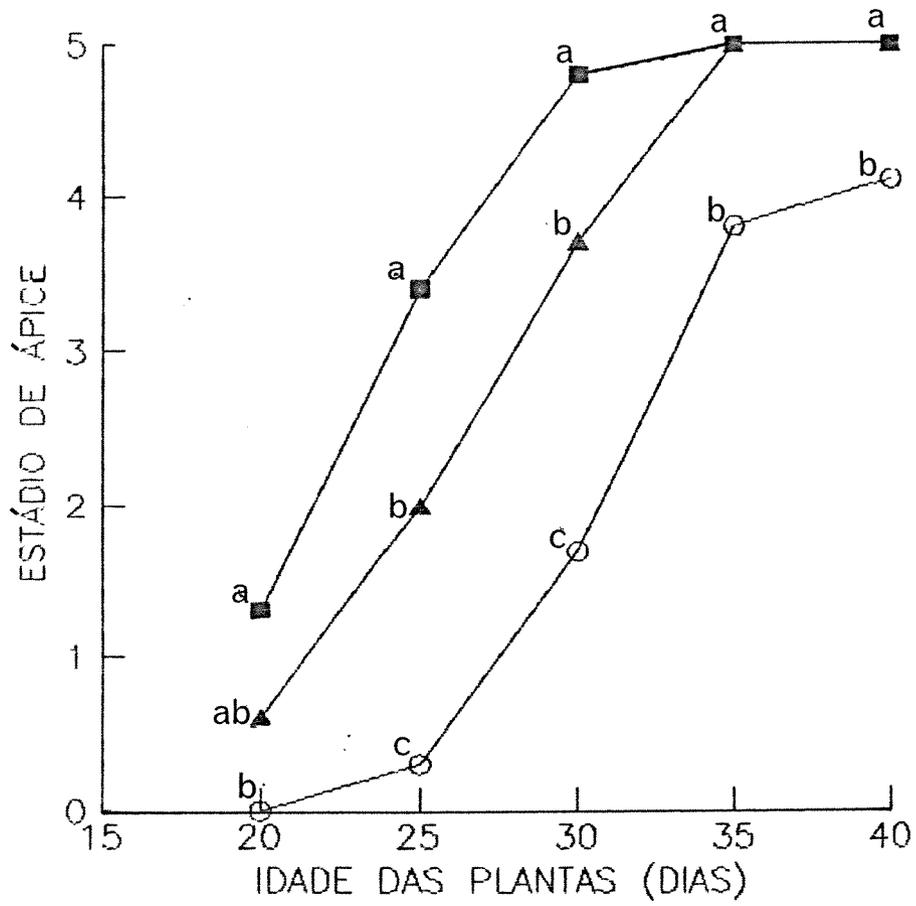


FIGURA 18 - Efeito da aplicação de GA_3 em idades diferentes de plantas de girassol.

○ = Controle Dias de aplicações: ■ = 10/12/14 ▲ = 16/18/20

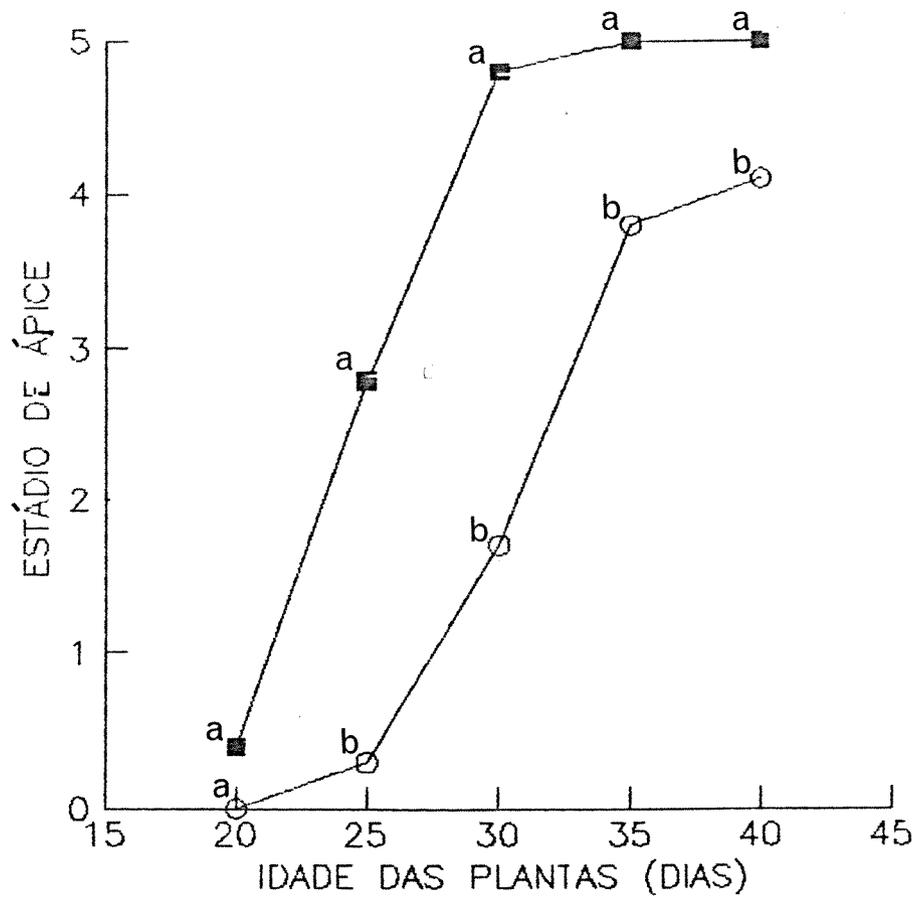


FIGURA 19 - Efeito da aplicação de $0,015\mu\text{g}$ de GA_3 na iniciação floral e desenvolvimento do ápice em plantas de girassol.

O = Controle Dias de aplicações: ■ = 10/12/14 (três aplicações de $0,005\mu\text{g}$).

os obtidos anteriormente (tabela 6), quando as plantas foram tratadas com quantidades maiores de ácido giberélico ($0,090\mu\text{g}$ e $0,045\mu\text{g}$) observa-se que, para aquelas quantidades ocorreu a antecipação da iniciação floral, o que não foi obtido com esta quantidade de $0,015\mu\text{g}$.

Explorando ainda, os efeitos do tratamento com $0,015\mu\text{g}$, aplicou-se esta quantidade de uma única vez, sem fracionamento, aos 10, 12 e 14 dias separadamente. Foi visto que $0,015\mu\text{g}$ de GA₃ aplicados em três vezes ($0,005\mu\text{g}$) aos 10, 12 e 14 dias não promoveu a iniciação floral mas, teve efeito na antecipação do desenvolvimento do ápice (figura 19) confirmando os resultados mostrados na figuras 15A e 15B. Para que haja promoção da iniciação floral parece haver a necessidade de uma quantidade mínima, e que $0,015\mu\text{g}$ é baixa para a ocorrência desta promoção. Isto foi confirmado quando $0,030\mu\text{g}$ foram aplicados de uma só vez aos 10 dias (figura 20), onde ocorreu promoção da iniciação floral e desenvolvimento do ápice. Assim, o efeito de promoção da iniciação floral ocorreu somente para quantidades entre $0,030\mu\text{g}$ e $0,090\mu\text{g}$ e quando aplicados na faixa de 10, 12 e 14 dias.

Observado anteriormente que a quantidade de $0,015\mu\text{g}$ teve efeito na floração desta espécie, foi dado procedimento aos testes com aplicação reduzida de GA₃, quando foi utilizado a quantidade de $0,005\mu\text{g}$, que foi aplicada de uma vez só, nos dias 10, 12 e 14. Os resultados (figura 21) indicam que dentre os tratamentos a aplicação aos 10 dias foi o único que causou efeito de promoção do desenvolvimento do ápice, não ocorrendo efeito de qualquer um destes na iniciação floral. Confirmando o que foi verificado anteriormente, que quantidades menores do que $0,030\mu\text{g}$ de ácido giberélico não tiveram efeito para a ini-

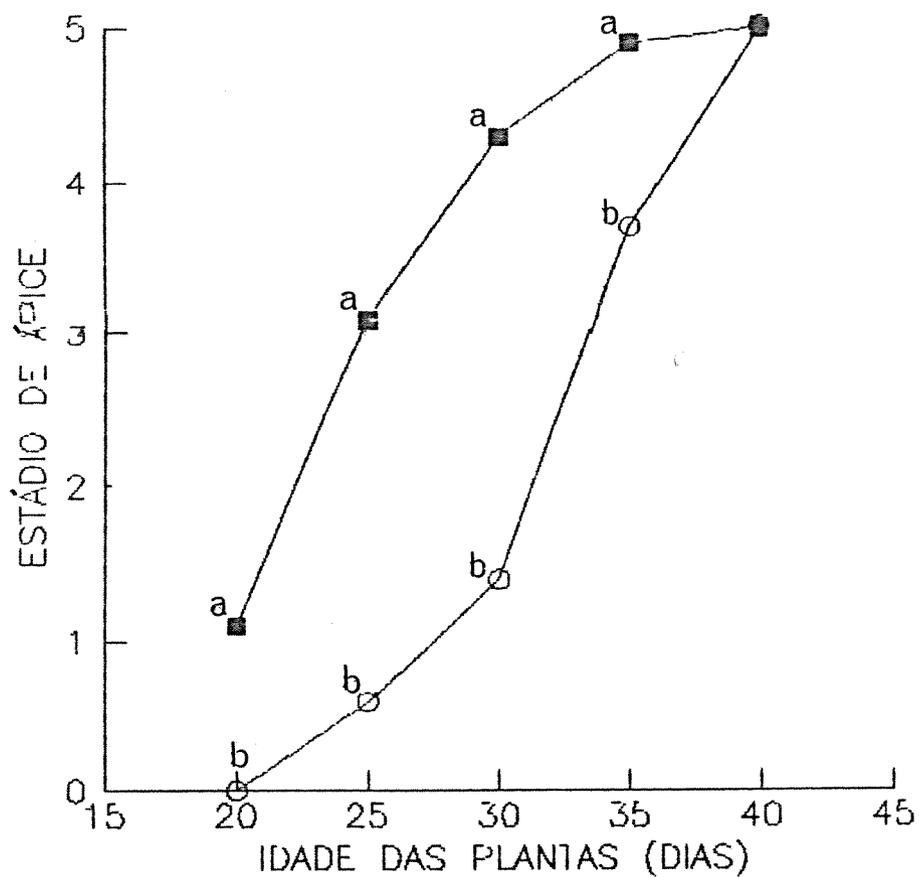


FIGURA 20 - Efeito da aplicação de $0,030\mu\text{g}$ de GA_3 na iniciação floral e desenvolvimento do ápice em plantas de girassol. \circ = Controle \blacksquare = 10 dias.

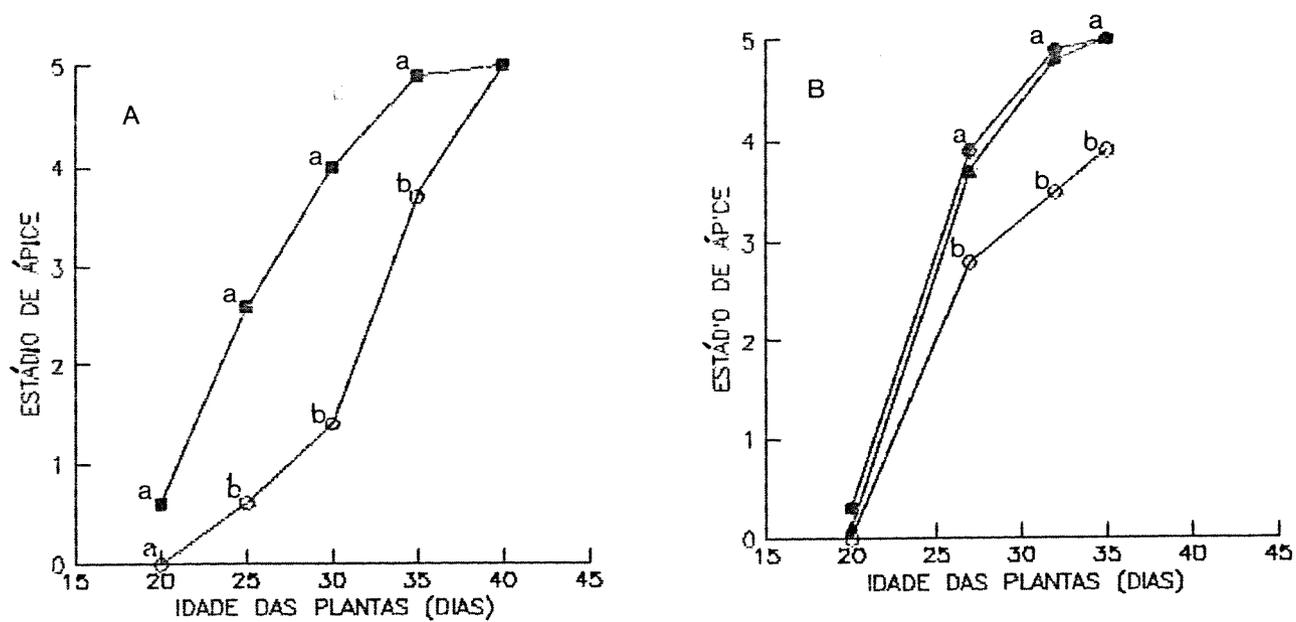


FIGURA 21 - Efeito da aplicação de $0,005\mu\text{g}$ de GA₃ no ápice de plantas de girassol em idades diferentes. ○ = Controle ■ = 10 dias ▲ = 12 dias ● = 14 dias.

ciação floral de girassol

Para o aspecto desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol tratadas com GA₃ exógeno, foram feitas observações para altura total e número de folhas, tendo sido obtidos resultados tanto da época de aplicação quanto da quantidade. Enfocando resultados relacionados à época de aplicação foi observado que GA₃ promoveu o crescimento de caule (figura 22A) e número de folhas (figura 22B) quando aplicado tanto na faixa de 10,12 e 14 dias quanto na de 16,18 e 20, no 35^o dia de observação.

Para o tratamento cujas sementes foram embebidas por 24 horas com ácido giberélico foi verificado que o crescimento de caule manteve-se igual ao das plantas controle (figura 23A), ocorrendo promoção do número de folhas, como observado na figura 23B. Neste mesmo experimento, o GA₃ foi aplicado aos 18 dias de idade e também foi notado que o crescimento de caule (figura 23A) não foi diferente do controle, como também não houve diferença entre os resultados de número de folhas (figura 23B).

Quantidades maiores de GA₃ aplicadas (0,090μg e 0,180μg) causaram efeitos significativos, tanto para crescimento de caule quanto para o número de folhas (tabela 7).

Na tabela 8, estão os resultados do tratamento das plantas com 0,090μg de GA₃ que confirmam aqueles vistos anteriormente na tabela 7, onde este tratamento promoveu o crescimento de caule. Para o número de folhas o efeito foi o mesmo tanto numa faixa quanto na outra.

Quando GA₃ foi reduzido de 0,090μg para 0,045μg, observou-se que esta quantidade promoveu o crescimento de caule e número de folhas

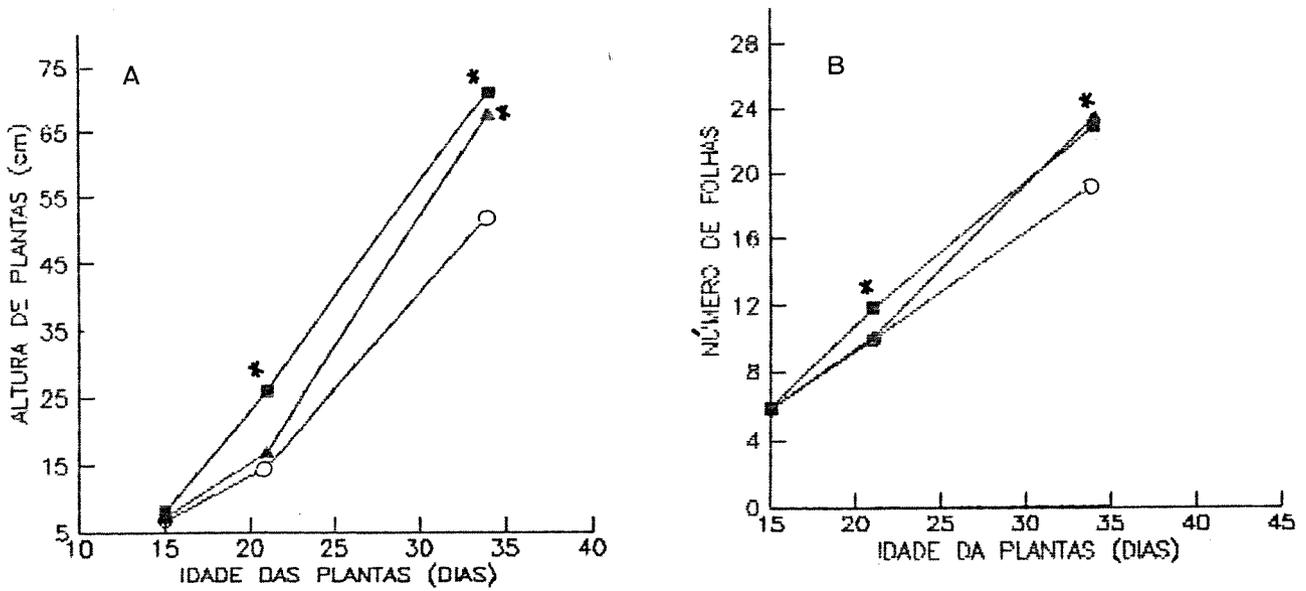


FIGURA 22 - Efeito da aplicação de GA₃ no desenvolvimento vegetativo em plantas de girassol. A- Altura de planta B- Número de folhas
 O= Controle Dias de aplicações: ■= 10/12/14 ▲= 16/18/20
 * Diferença estatisticamente significativa entre o tratamento e o controle.

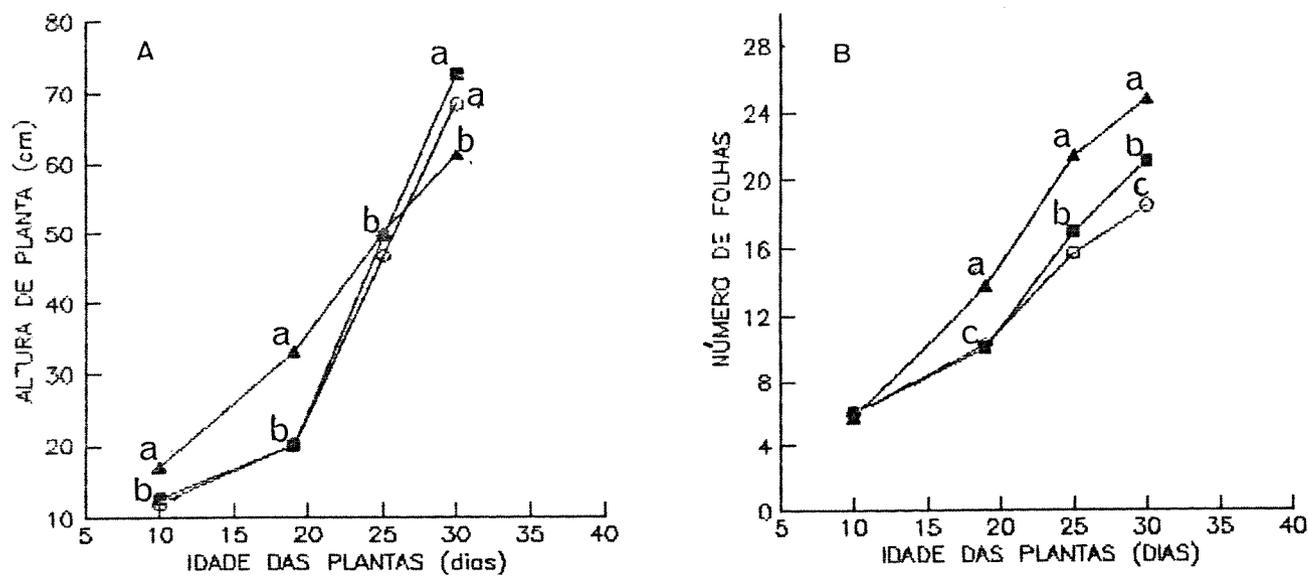


FIGURA 23 - Efeito da aplicação de GA_3 no desenvolvimento vegetativo em plantas de girassol em idades diferentes. O = Controle ■ = 18 dias ▲ = Sementes embebidas (24 horas).

TABELA 7 - Efeito da aplicação exógena de diferentes quantidades de GA₃ para desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol.

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)			NÚMERO DE FOLHAS		
	C	1	2	C	1	2
15	6.7	8.0	7.2	5.8	6.0	6.0
21	14.6	26.1*	24.0*	9.9	11.6*	11.2*
34	52.0	84.5*	62.0*	19.2	25.2*	26.3*

C= Controle, 1= 10 a 20 dias (0,090 μ g) e 2= 10 a 20 dias (0,180 μ g)

*Diferença estatisticamente significativa entre o tratamento e o controle.

TABELA 8 - Efeito da aplicação exógena de $0,090\mu\text{g}$ de GA_3 (fracionado) no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol em idades diferentes.

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)			NÚMERO DE FOLHAS		
	C	1	2	C	1	2
12	8.5	11.2	9.3	6.1	6.0	6.0
15	8.5b	13.4a	13.4a	6.2	6.6	6.9
20	12.3c	22.1a	22.3b	9.7	9.4	9.7
25	19.6b	34.7a	34.4a	12.0b	13.1	13.2
30	29.3b	48.6a	48.7a	15.6b	17.8a	18.4a
35	39.2b	60.0a	61.2a	18.5b	20.1ab	20.9a
40	47.5c	66.4b	69.7ab	20.8NS	19.8NS	21.3NS

C= Controle, 1= 10 a 20 dias - $0,015\mu\text{g}$ /aplicação e 2= 10/12/14 - $0,030\mu\text{g}$ /aplicação. NS= Não significativo.

Letras indicam comparações feitas dentro de cada idade.

(tabela 9). Também se verificou que $0,045\mu\text{g}$ de GA_3 foi mais efetivo para o crescimento quando aplicado em plantas com 10,12 e 14 dias do que com aquelas com 16,18 e 20. Para o número de folhas o efeito foi mesmo tanto numa faixa quanto na outra.

Para a quantidade de $0,015\mu\text{g}$, que foi fracionada e aplicada nos dias 10,12 e 14, também ocorreu promoção de crescimento de caule e número de folhas (figuras 24A e 24B). Para o número de folhas, os resultados confirmam o visto anteriormente, que no final do experimento estava igual ao do controle. Quando esta quantidade ($0,015\mu\text{g}$) foi aplicada de uma vez, em cada dia da faixa 10,12 e 14, foi constatado que ocorreu promoção de crescimento significativo das plantas (figuras 25A e 25B). Para o número de folhas, apesar de ter ocorrido antecipação da formação de folhas, ao final do experimento todos os tratamentos estavam iguais ao controle (figuras 26A e 26B).

Para os resultados de aplicação de $0,005\mu\text{g}$ de GA_3 , em uma única vez no ápice de plantas de girassol aos 10,12 e 14 dias, observa-se pelas figuras 27A, 27B, 28A e 28B que os tratamentos causaram efeito de promoção para crescimento de caule e número de folhas, como os verificados anteriormente.

O forte efeito de promoção de crescimento de caule em plantas de girassol, fica caracterizado através da figura 29.

3.8- EFEITO DE INIBIDORES DE SÍNTESE DE GIBERELINA

O tratamento das plantas com substâncias reguladoras de crescimento resultou no conhecimento de um possível envolvimento de substân-

TABELA 9 - Efeito da aplicação exógena de $0,045\mu\text{g}$ de GA₃ no desenvolvimento vegetativo em plantas de girassol em idades diferentes.

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)			NÚMERO DE FOLHAS		
	C	1	2	C	1	2
10	10.5	9.9	10.9	5.6	5.4	5.6
15	18.9	28.1	17.1	9.9	11.9a	9.4
20	25.5b	46.9a	25.9b	12.7b	15.4a	12.6b
25	34.3c	60.9a	43.7b	14.2b	19.5a	16.2b
30	41.9c	79.9a	60.4b	16.1c	25.6a	21.5b
35	54.0c	91.1a	70.6b	20.5b	26.5a	24.7a
40	67.6c	104.6a	82.8b	25.4NS	26.7NS	26.8NS

C= Controle, 1= Aplicação feitas nos dias 10/12/14 e 2= Aplicações feitas nos dias 16/18/20. NS= Não significativo.

Letras indicam comparações feitas dentro de cada idade.

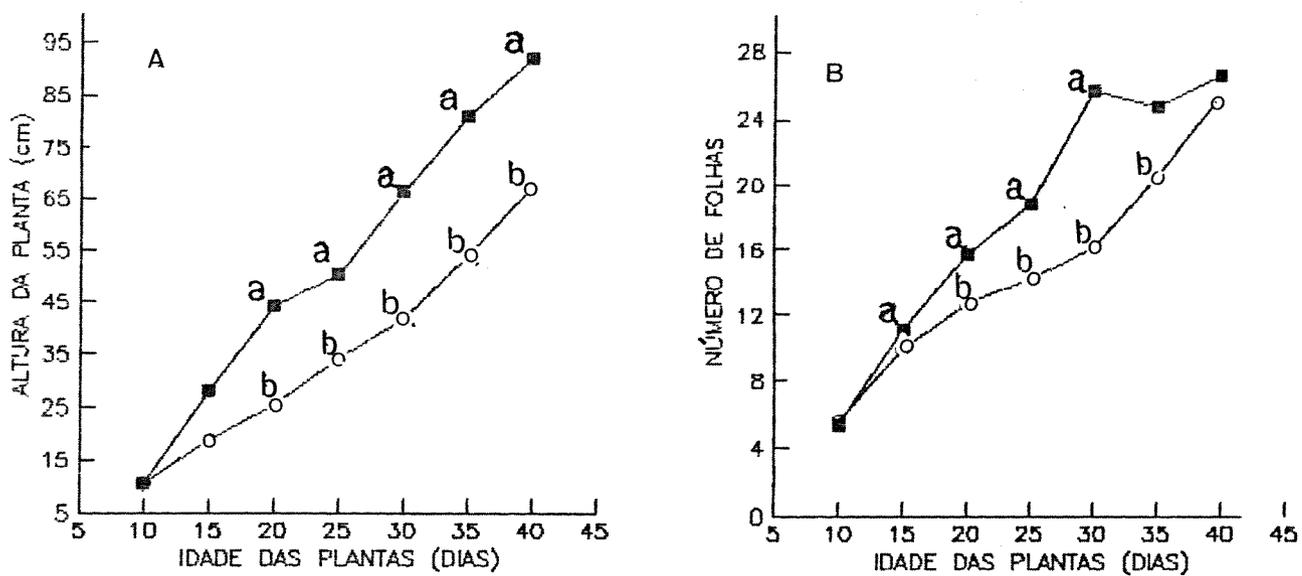


FIGURA 24 - Efeito da aplicação de $0,015\mu\text{g}$ de GA_3 no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol. A- Altura de planta B- Número de folhas c= Controle Dias de aplicações: ■=10/12/14.

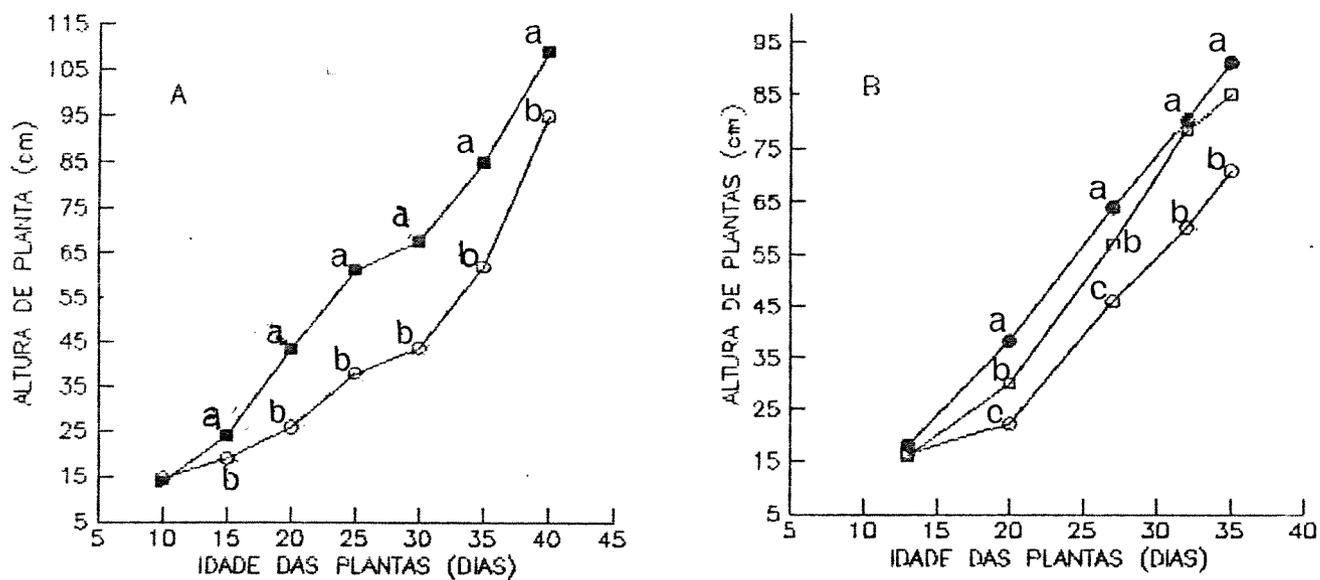


FIGURA 25 - Efeito da aplicação de $0,015\mu\text{g}$ de GA_3 em altura de plantas de girassol em idades diferentes.

Plantas tratadas: A- 10^o dia B- 12^o e 14^o dias

A- O = Controle ■ = 10 dias

B- O = Controle ● = 12 dias

□ = 14 dias

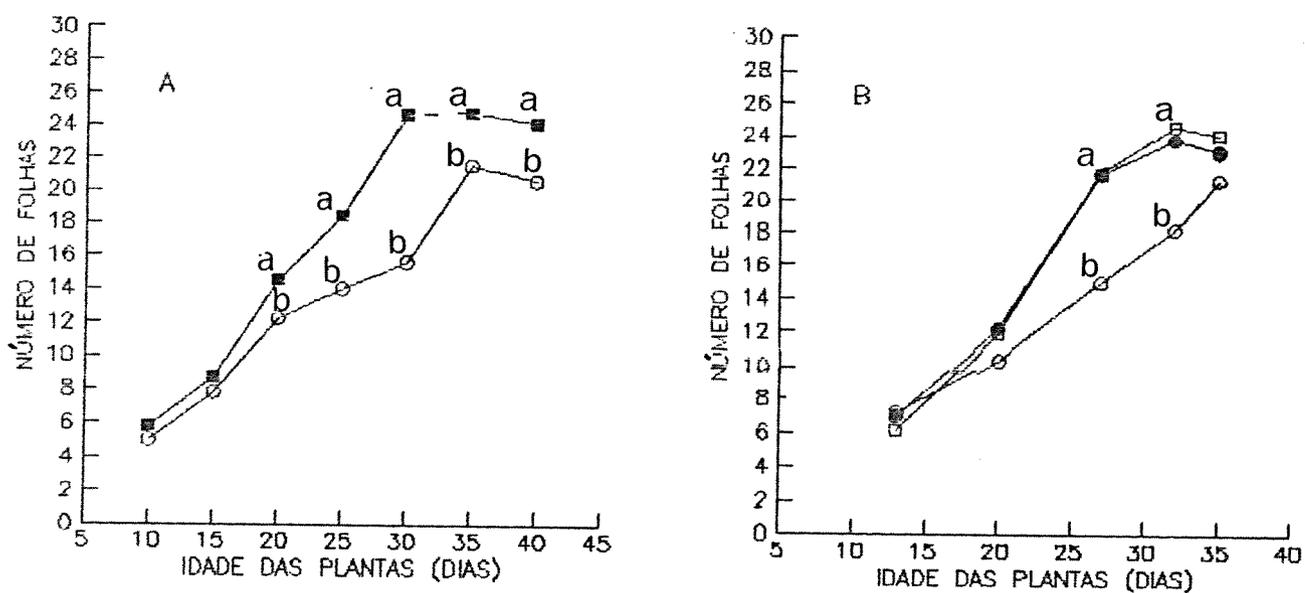


FIGURA 26 - Efeito da aplicação de $0,015\mu\text{g}$ de GA_3 no número de folhas de plantas de girassol em idades diferentes.
 Plantas tratadas: A- 10^o dia B- 12^o e 14^o dias
 A- ○ = Controle ■ = 10 dias
 B- ○ = Controle ● = 12 dias □ = 14 dias

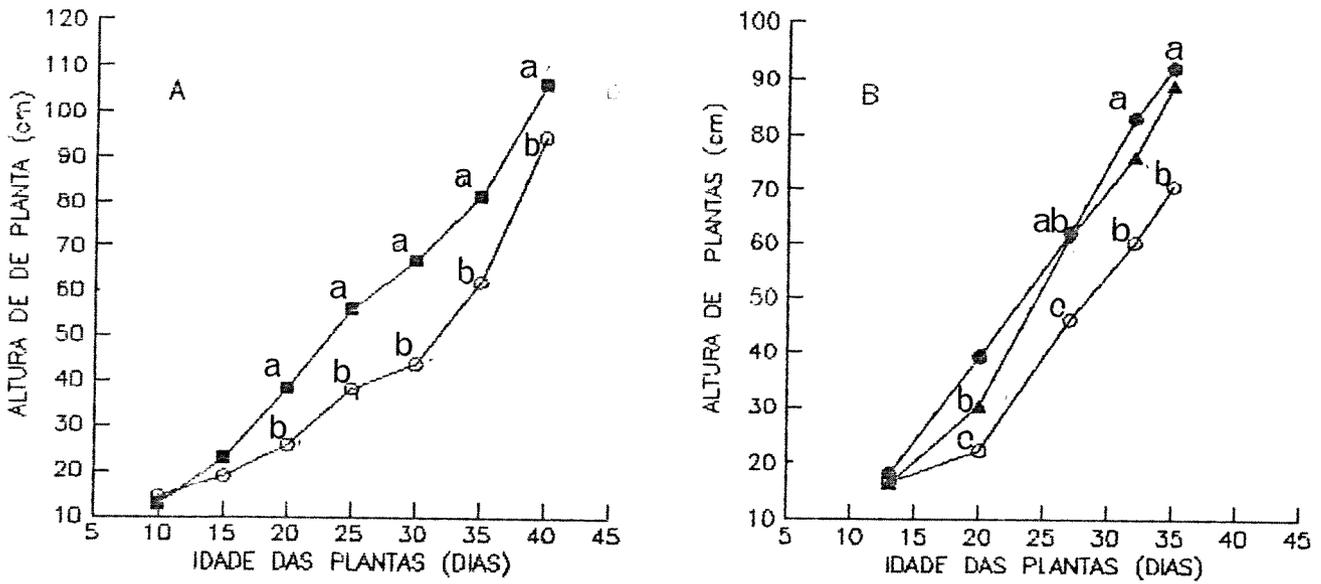


FIGURA 27 - Efeito da aplicação de $0,005\mu\text{g}$ de GA_3 em altura de plantas de girassol em idades diferentes.
 Plantas tratadas: A- 10^o dia B- 12^o e 14^o dias
 A: O= Controle ■= 10 dias B: O= Controle ●= 12 dias ▲= 14 dias

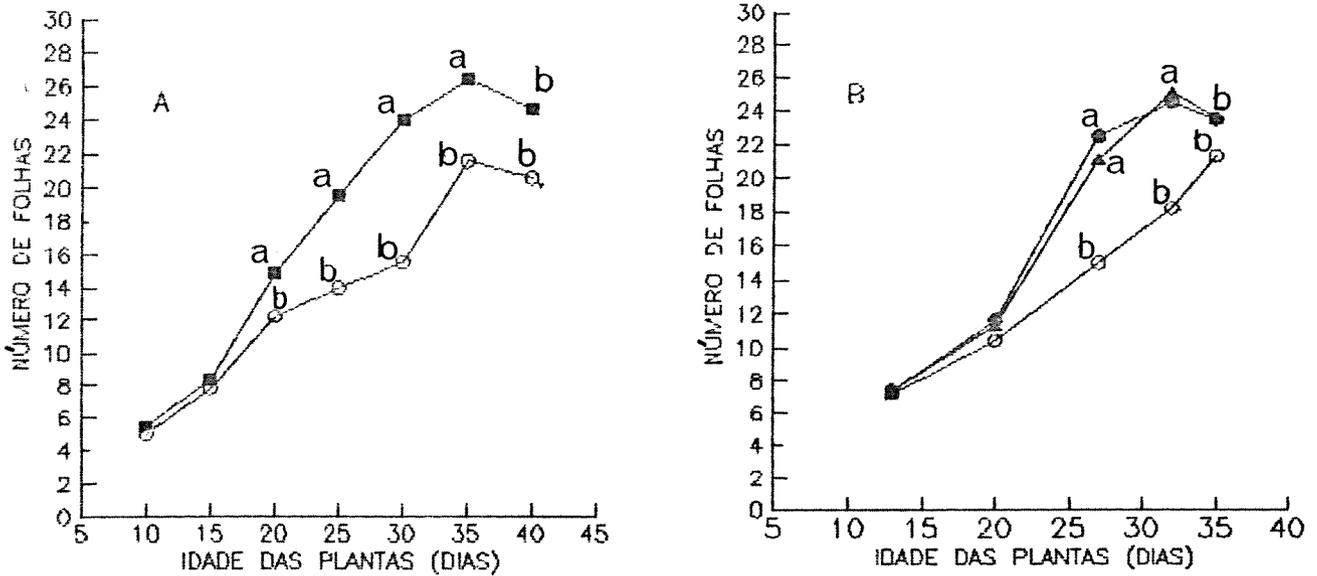


FIGURA 28 - Efeito da aplicação de $0,005\mu\text{g}$ de GA_3 no número de folhas em plantas de girassol em idades diferentes.

Plantas tratadas: A- 10^o dia

B- 12^o e 14^o dias

A: ○ = Controle ■ = 10 dias

B: ○ = Controle ● = 12 dias ▲ = 14 dias

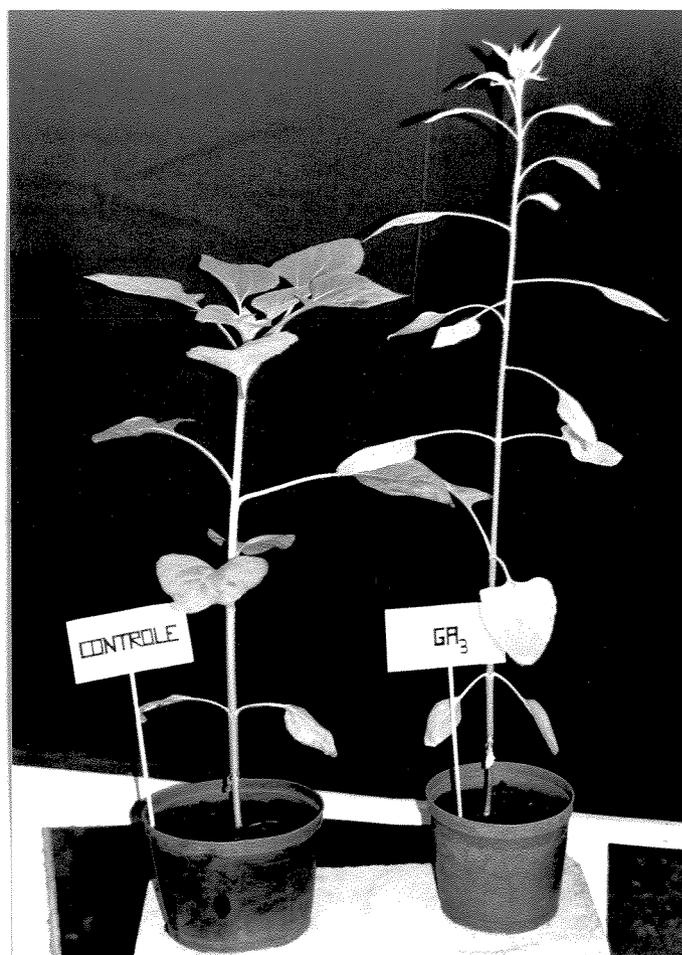


FIGURA 29 - Efeito da aplicação exógena de ácido giberélico no crescimento de caule de plantas de Helianthus annuus.

cias giberelínicas na floração de plantas de girassol. Uma maneira para verificação deste envolvimento foi a de tentar bloquear a síntese destas substâncias através de algum passo de sua via metabólica, com o uso de inibidores de síntese de giberelina.

Inicialmente foi testado o CCC, substância que foi aplicada nas plantas via ápice. A tabela 10 apresenta os resultados de desenvolvimento vegetativo, onde crescimento e o número de folhas não foram diferentes do controle. Nesta tabela também é apresentada a análise de dissecação de ápice que mostra que CCC não casou efeito para floração.

Foi verificado o efeito de outro inibidor, o tetcyclacis aplicado também via ápice, que não causou efeito nos parâmetros de desenvolvimento vegetativo e nem nos florais (tabela 11).

Além destas substâncias, foi testado paclobutrazol cuja forma de aplicação foi tanto via ápice como via terra. Para as aplicações via ápice, inicialmente foi testado uma única aplicação de paclobutrazol, nas concentrações de $10^{-4}M$ ou $10^{-5}M$, para os dias 10 ou 14. Neste experimento não houve efeito para a floração de qualquer uma das concentrações testadas nem para o dia 10 ou 14 (figura 30), como não foi verificado efeito destes tratamentos no desenvolvimento vegetativo (tabela 12).

Quando foram testadas duas aplicações de paclobutrazol nas concentrações de 10^{-6} , 10^{-5} e $10^{-4}M$, via ápice, em plantas com 15 dias de idade, também não foram encontradas diferenças na floração entre estes resultados e os do controle (figura 31). Também não ocorreu efeito para o desenvolvimento vegetativo (tabela 13). Em vista destes resultados, a aplicação desta substância foi feita em mais vezes, tendo sido

TABELA 10 - Efeito da aplicação CCC no desenvolvimento vegetativo, iniciação floral e desenvolvimento de ápice floral de plantas de girassol.

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)		NÚMERO DE FOLHAS		ESTÁDIO DE ÁPICE	
	1	2	1	2	1	2
17	8.7	10.6	6.7	6.7	---	---
21	---	---	---	---	0	0
24	21.0	23.7	11.2	12.2	---	---
26	---	---	---	---	0	0
28	---	---	---	---	0.4	0.4
30	37.3	41.3	17.0	17.4	---	---
38	---	---	---	---	3.4	3.4

1= Controle e 2= CCC.

TABELA 11 - Efeito da aplicação do inibidor de substâncias giberelínicas, tetcyclacis, no desenvolvimento vegetativo, iniciação floral e desenvolvimento do ápice floral em plantas de girassol.

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)		NÚMERO DE FOLHAS		ESTÁDIO DE ÁPICE	
	1	2	1	2	1	2
10	11.8	9.8	3.8	3.8	---	---
15	14.3	11.9	5.6	5.6	---	---
20	18.3	18.0	8.2	8.6	0	0
25	20.6	21.1	9.7	10.4	0	0
30	24.0	26.7	12.0	12.8	0.6	0.6
35	31.5	33.3	15.5	17.2	2.3	1.4
40	42.3	39.5	18.8	19.7	3.7	3.2

1= Controle e 2= Tetcyclacis

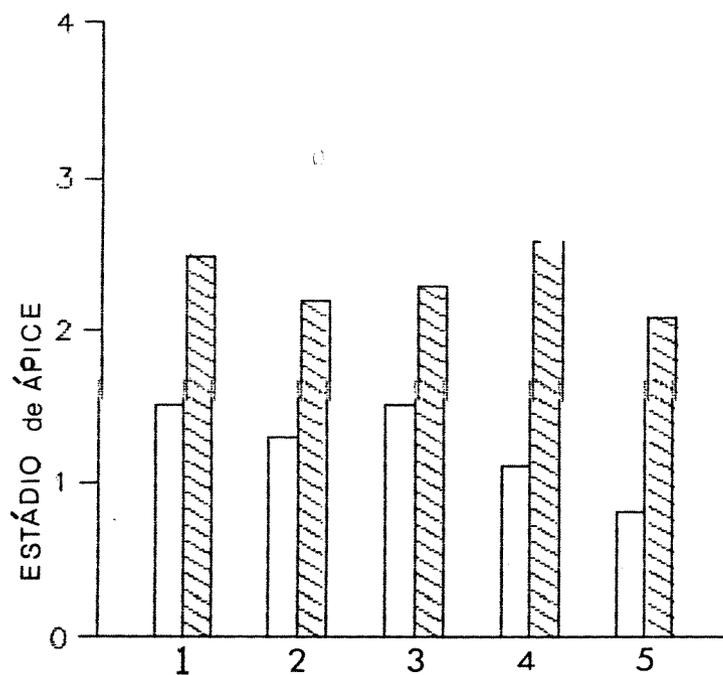


FIGURA 30 - Efeito da aplicação de paclobutrazol via ápice na floração em plantas de girassol.

Avaliações nos dias: \square = 32 e hatched = 36

1- Controle

Dias de aplicações: 2= $10^{-5}M$

3= $10^{-4}M$

4= $14 \cdot 10^{-4}M$

5= $14 \cdot 10^{-5}M$

TABELA 12 - Efeito da aplicação via ápice de paclobutrazol (10^{-5} e 10^{-4} M) no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol em idades diferentes.

I	ALTURA (cm)					NÚMERO DE FOLHAS				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
15	8.5	7.9	9.3	9.6	9.6	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
25	21.4	27.6	25.8	24.9	24.9	13.2	13.7	13.6	13.5	13.1
32	40.5	52.9	46.6	43.0	48.9	17.3	18.5	18.6	17.8	17.5

I= Idade (dias), 1= Controle, 2= 10 dias - 10^{-5} M, 3= 14 dias - 10^{-4} M e 4= 14 dias - 10^{-5} M.

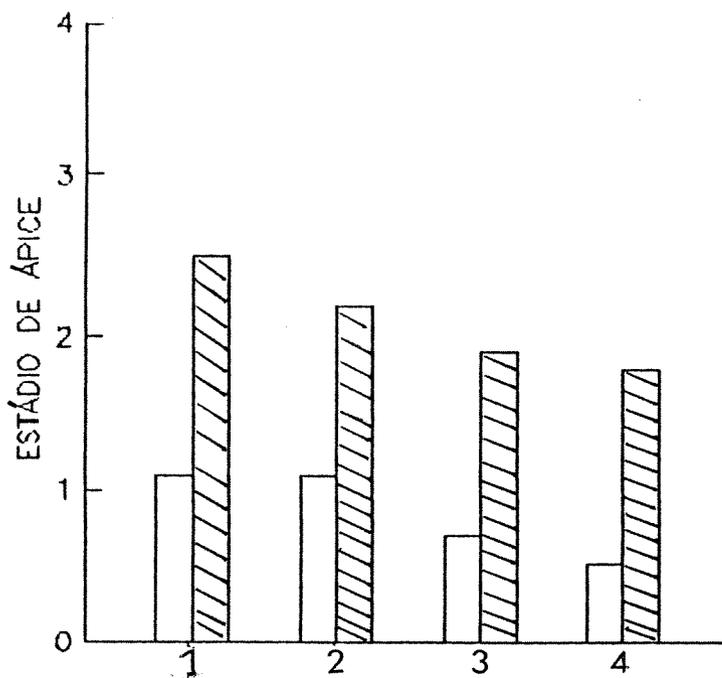


FIGURA 31 - Efeito da aplicação de paclobutrazol via ápice na floração em plantas de girassol em idades de 15 dias. Dias de avaliações: □ = 29 e ▨ = 35
1= Controle 2= $10^{-6}M$ 3= $10^{-5}M$ 4= $10^{-4}M$

TABELA 13 - Efeito da aplicação, via ápice, de paclobutrazol ($10^{-6}M$, $10^{-5}M$ e $10^{-4}M$) no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol aos 15 dias de idade.

IDADE	ALTURA (cm)				NÚMERO DE FOLHAS			
	1	2	3	4	1	2	3	4
21	19.9	21.4	18.9	16.7	11.1	11.6	11.5	10.7
29	53.8	55.8	47.9	47.1	17.3	17.1	16.9	16.1
35	61.2	62.4	54.4	56.5	21.3	19.4	19.4	18.7

1= Controle, 2= $10^{-6}M$, 3= $10^{-5}M$ e 4= $10^{-4}M$

testadas três e seis aplicações na concentração de $10^{-4}M$. A análise de dissecação de ápice destas plantas está na figura 32, cujos dados indicam que estas quantidades maiores de paclobutrazol também não tiveram efeito significativo. Estes tratamentos também não tiveram efeito no desenvolvimento vegetativo (tabela 14).

Em seguida, paclobutrazol foi aplicado na concentração de $10^{-3}M$, sendo com seis ou doze aplicações. Foram obtidos resultados significativos que são mostrados na figura 33, com o tratamento de seis aplicações ($120\mu l$) que atrasou o desenvolvimento de ápice. No, entanto, estes tratamentos não tiveram qualquer efeito no desenvolvimento vegetativo (tabela 15).

Foi verificado também, que efeito teria a aplicação de paclobutrazol via terra. Este tratamento constou de uma única aplicação de 20ml de paclobutrazol na concentração de $5 \times 10^{-3}M$. Esta forma de aplicação causou efeito bastante expressivo nas plantas. Na figura 34, observa-se que o tratamento atrasou o desenvolvimento de ápice, pois quando o controle estava em estágio 4 as plantas tratadas ainda não tinham atingido o estágio 1. Neste experimento foi testado também a aplicação de paclobutrazol ($10^{-3}M$) via ápice que iniciou-se no 10º dia e foi mantido até o final do experimento. Este resultado confirmou o obtido anteriormente (figura 33), pois quantidade maior de paclobutrazol atrasou o desenvolvimento de ápice. Comparando-se os resultados de paclobutrazol aplicado na terra e no ápice, é visto que ambos atrasaram o desenvolvimento de ápice. Contudo, o tratamento no ápice é menos efetivo (figura 34), pois aos 40 dias estava com estágio de ápice próximo ao do controle, enquanto o via terra permaneceu atrasado.

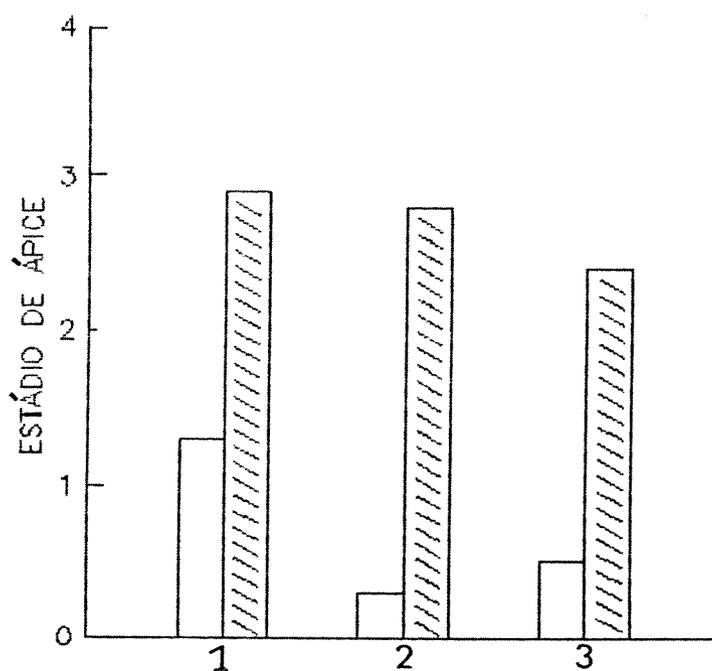


FIGURA 32 - Efeito da aplicação de paclobutrazol ($10^{-4}M$) via ápice na floração em plantas de girassol.

Dias de avaliações: □ = 29 e ▨ = 35

1= Controle 2= Aplicações de 2 em 2 dias - 120ul

3= Aplicações de 4 em 4 dias - 60ul

TABELA 14 - Efeito da aplicação, via ápice, de paclobutrazol ($10^{-4}M$) no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol no 10^o dia de idade.

Aplicações durante 20 dias de 2 em 2 dias ($60\mu l$) ou de 4 em 4 dias ($120\mu l$).

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)			NÚMERO DE FOLHAS		
	1	2	3	1	2	3
14	9.3	11.3	9.9	5.9	6.0	5.9
21	18.1	20.9	18.3	11.3	11.0	10.9
28	38.7	40.1	36.0	16.3	15.7	15.9
35	51.4	56.5	49.7	20.2	20.0	20.4

1= Controle, 2= Aplicação de 2 em 2 dias e 3= Aplicação de 4 em 4 dia

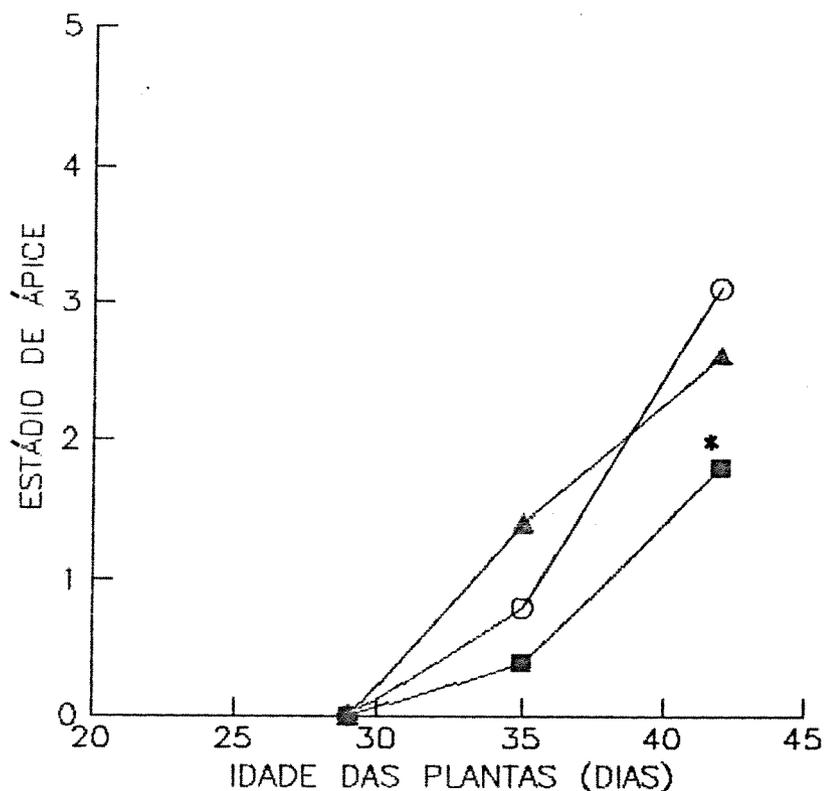


FIGURA 33 - Efeito da aplicação de paclobutrazol $10^{-3}M$ via ápice na floração em plantas de girassol.

Tratamentos efetuados em períodos diferentes:

■ = 2 em 2 dias - durante 20 dias - $120\mu l$

▲ = 4 em 4 dias - durante 41 dias - $240\mu l$

O = Controle

* Diferença estatisticamente significativa entre o tratamento e o controle.

TABELA 15 - Efeito da aplicação via ápice de paclobutrazol ($10^{-3}M$) no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol. Aplicações feitas de 2 em 2 dias, durante 20 dias ($120\mu l$) ou 41 dias ($240\mu l$).

IDADE (DIAS)	ALTURA (cm)			NÚMERO DE FOLHAS		
	1	2	3	1	2	3
11	5.8	5.7	5.7	3.9	4.0	4.0
18	11.8	11.4	11.4	7.9	7.9	7.8
25	23.7	22.3	22.0	12.1	11.5	11.7
32	36.1	35.4	35.0	14.9	14.7	15.5
38	48.0	48.5	45.2	18.0	17.2	18.9

1= Controle, 2= Aplicação de 2 em 2 dias - 20 dias - $120\mu l$ e

3= Aplicação de 2 em 2 dias - 41 dias - $240\mu l$

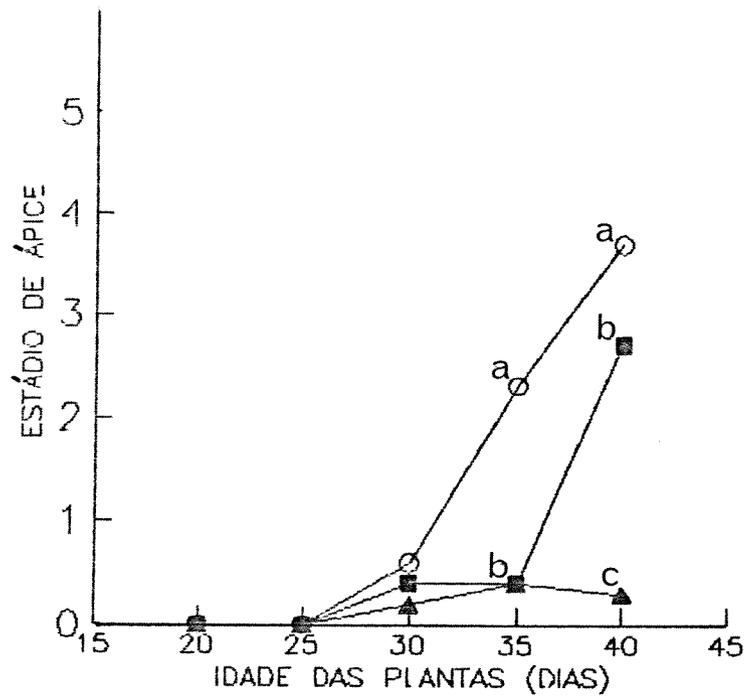


FIGURA 34 - Efeito da aplicação de paclobutrazol ($10^{-3}M$) via ápice e via terra (20ml/vaso) na iniciação floral e no desenvolvimento do ápice em plantas de girassol.

○ = Controle ■ = $10^{-3}M$ - aplicações diárias

▲ = Via terra - uma aplicação

Este resultado expressivo de atraso de desenvolvimento do ápice foi obtido em plantas tratadas no 10^o dia de idade. Contudo, ficou o questionamento de qual seria a época ideal para aplicação desta substância para efeito no atraso da floração de girassol? Ainda, este atraso na floração seria temporário ou permanente? Para um possível esclarecimento destas dúvidas, plantas de girassol foram tratadas com paclobutrazol, na terra, em cada dia da faixa de 10, 14 e 20 dias.

As análises de dissecação de ápice destas plantas tratadas são apresentadas na figura 35. Os tratamentos cujas aplicações foram aos 10 e 14 dias analisados, aos 37 dias, apresentaram efeitos iguais, isto é, atrasaram o desenvolvimento do ápice, enquanto, plantas tratadas aos 20 dias e o controle estavam iguais. Aos 43 dias de idade, a análise do ápice mostrou que se mantém a mesma situação vista anteriormente. Porém, as plantas aos 10 dias de idade estavam ainda bastante atrasadas. Ainda nesta figura é esclarecido que o efeito com paclobutrazol, é temporário, pois aos 79 dias de idade, as plantas de todos os tratamentos estavam bastante avançadas na floração e iguais ao controle. Assim, com este experimento verificou-se que a aplicação de paclobutrazol aos 10 dias foi mais efetiva no atraso da floração.

Nas figura 36A é observado que o crescimento das plantas tratadas via ápice ($10^{-3}M$) permaneceu como o controle. Já o crescimento de plantas tratadas na terra foi bastante reduzido. As plantas não passaram de 20cm de altura durante a condução do experimento. Este efeito de crescimento reduzido é confirmado com o tratamento de paclobutrazol aplicado de uma única vez em plantas com idade de 10,12 e 14 dias de idade, cujos resultados são apresentados na figura 36B. Verificou-se

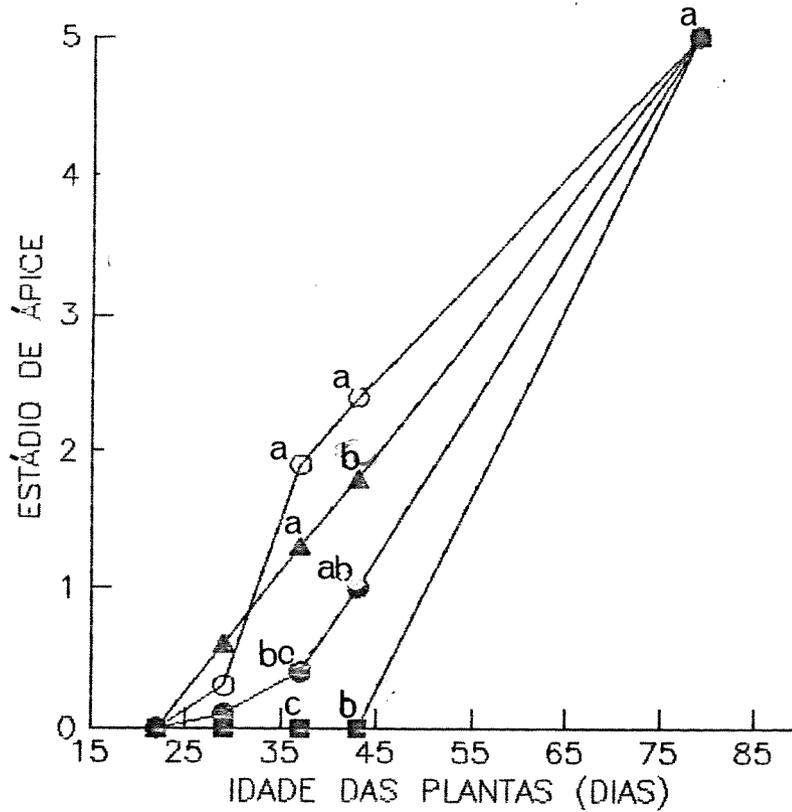


FIGURA 35 - Efeito da aplicação de paclobutrazol via terra na iniciação floral e no desenvolvimento do ápice de plantas de girassol.

O = Controle Dias de aplicações: ■ = 10 ● = 14 ▲ = 20

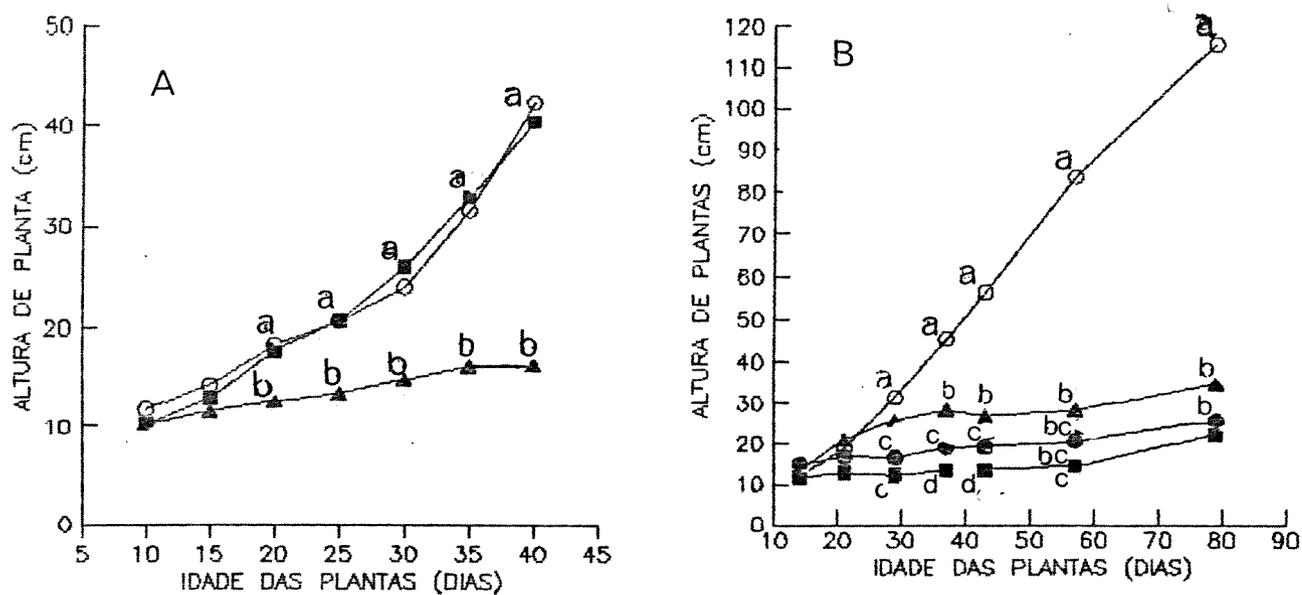


FIGURA 36 - Efeito da aplicação de paclobutrazol em altura de plantas de girassol. A- ○ = Controle ■ = Aplicação via ápice (10⁻³M) - diária ▲ = Via terra - 20ml/vaso (5x10⁻³M) B- Aplicação via terra em idades diferentes: ○ = Controle ■ = 10 dias ● = 14 dias ▲ = 20 dias

que o crescimento das plantas tratadas não ultrapassou 30cm, enquanto que o do controle atingiu cerca de 120cm de altura. Dentre os tratamentos, o mais efetivo foi a aplicação de paclobutrazol aos 10 dias. Contudo, no final do experimento, o crescimento de caule das plantas aos 10, 12 e 14 dias era igual.

Quanto ao número de folhas, a aplicação de paclobutrazol via ápice ($10^{-3}M$) todos os dias, embora tenha atrasado o desenvolvimento do ápice não causou efeito neste parâmetro (figura 37A). Por outro lado, o tratamento na terra em plantas com 10, 12 e 14 dias causou efeito, atrasando a formação de folhas. Entretanto, no final do experimento, plantas tratadas e controle apresentaram resultados iguais, com exceção do tratamento aos 20 dias, cujo número de folhas era menor (figura 37B).

O efeito de paclobutrazol na floração de plantas de Helianthus annuus fica bem caracterizado através das figuras 38A, 38B e 39. Na figura 38A está o detalhe de ápice de plantas controle (floral) e na figura 38B o detalhe de ápice de plantas tratadas com paclobutrazol (vegetativo). Estas plantas possuem a mesma idade. A figura 39 caracteriza o efeito de paclobutrazol no crescimento de caule.

3.9- EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS GIBERELÍNICAS DE ÁPICES DE PLANTAS DE GIRASSOL

Confirmando o envolvimento de substâncias giberelínicas na floração de girassol, passou-se a um estudo para tentar caracterizar sua

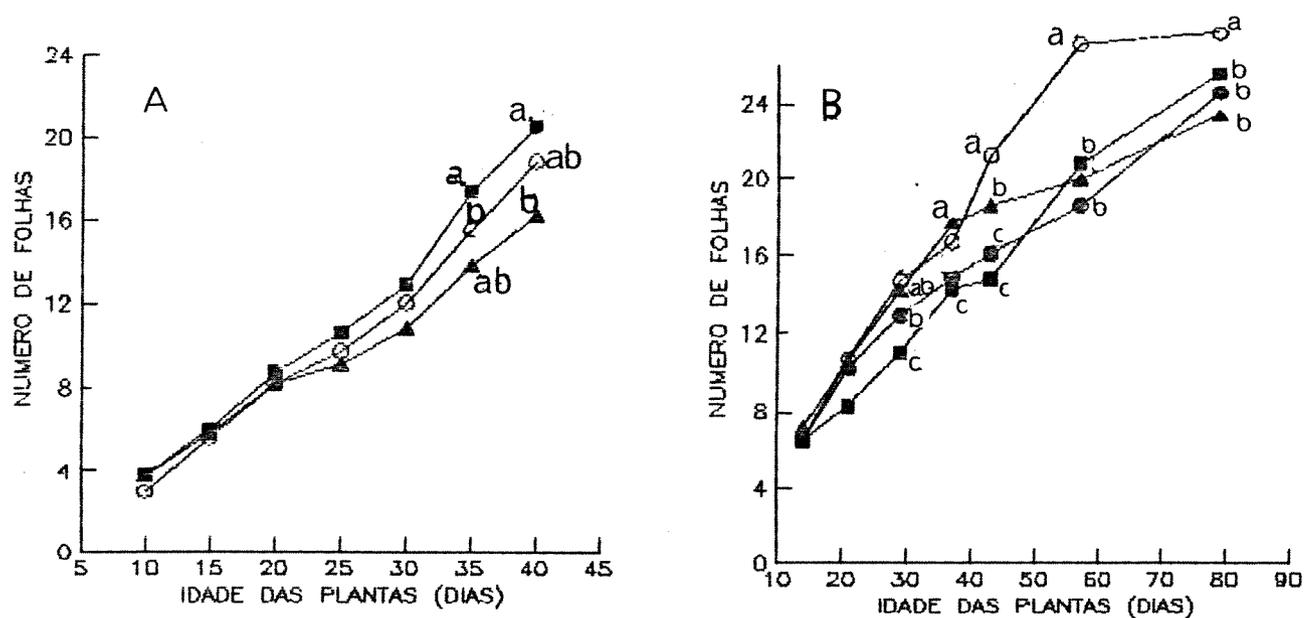


FIGURA 37 - Efeito da aplicação de paclobutrazol no número de folhas em plantas de girassol. A- ○= Controle ■= Aplicação via ápice ($10^{-3}M$) - diária ▲= Via terra - 20ml/vaso ($5 \times 10^{-3}M$) B- Aplicação via terra em idades diferentes: ○= Controle ■= 10 dias ●= 14 dias ▲= 20 dias



FIGURA 38 - Efeito da aplicação de paclobutrazol na floração de plantas de Helianthus annuus.

A - Detalhe de ápice floral das plantas controle

B - Detalhe de ápice vegetativo de plantas tratadas com paclobutrazol.



FIGURA 39 - Efeito de paclobutrazol no crescimento de caule de plantas de Helianthus annuus.

Plantas da direita - Controle

Plantas da esquerda - Tratadas com paclobutrazol

presença endógena.

Inicialmente foram feitos extratos de substâncias giberelínicas de ápices de plantas em estágio vegetativo e floral, que foram aplicados no bioteste do hipocótilo de alface (figura 40). Verificou-se que ocorreu um pico de atividade com o extrato floral, próximo à faixa de retenção de 9 a 10 minutos, na corrida em HPLC.

Continuando com esta investigação de substâncias giberelínicas endógenas, foram feitas extrações destas de ápices coletados em épocas diferentes (3,5,10,15,20,30 e 36 dias), objetivando encontrar uma possível faixa de idade na qual haja atividade maior destas substâncias. Os extratos foram biotestados em alface e arroz anão. Na figura 41 estão os histogramas referentes ao bioteste do hipocótilo de alface, para todas as datas de coleta. Verifica-se que atividade significativa foi encontrada somente para o bioteste correspondente aos 15 dias e nas frações 4 e 5, correspondentes a 8 a 10 minutos na corrida de HPLC.

Para o bioteste do arroz anão, a mesma situação foi observada, isto é, o pico de atividade significativo apareceu aos 15 dias (figura 42), assim confirmando o resultado do bioteste do hipocótilo de alface. Estes resultados detectaram a presença de atividade de substâncias giberelínicas em plantas com 15 dias de idade.

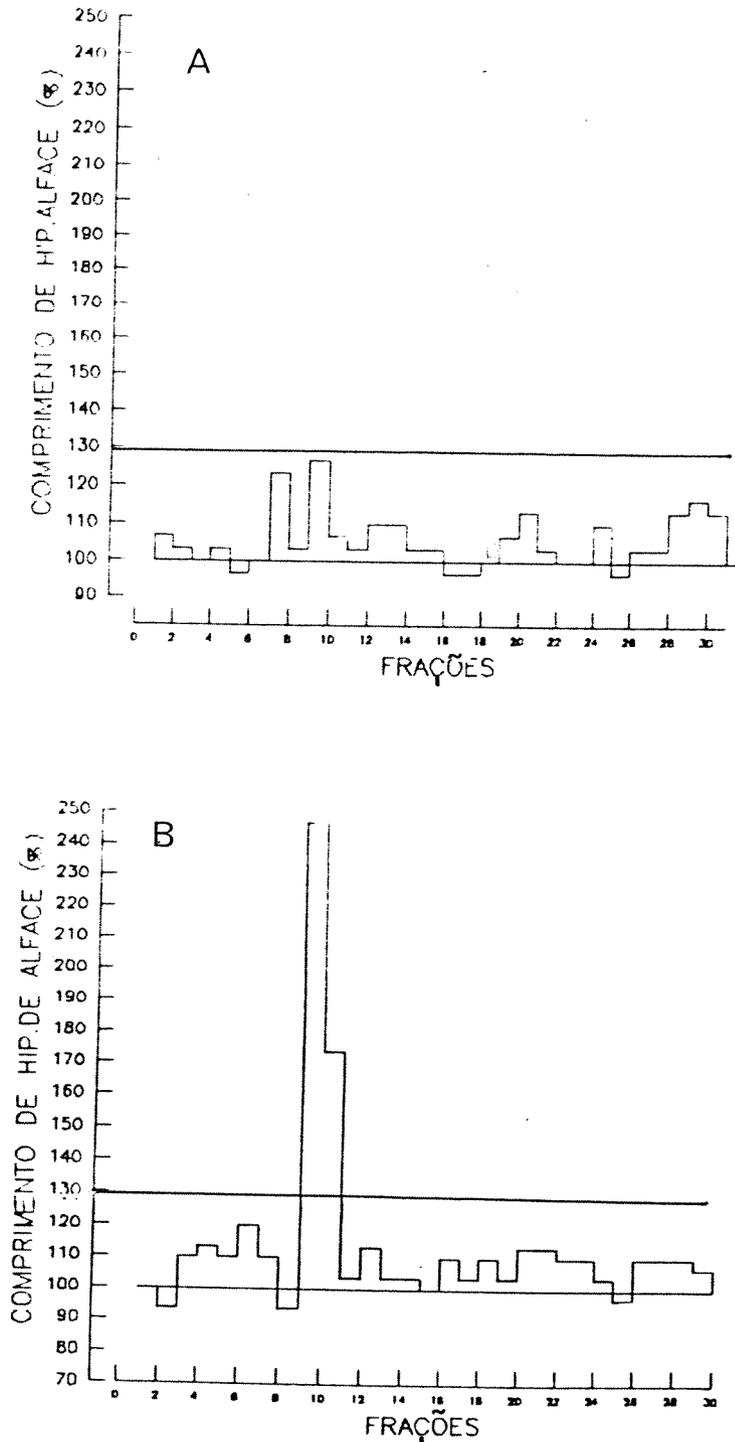
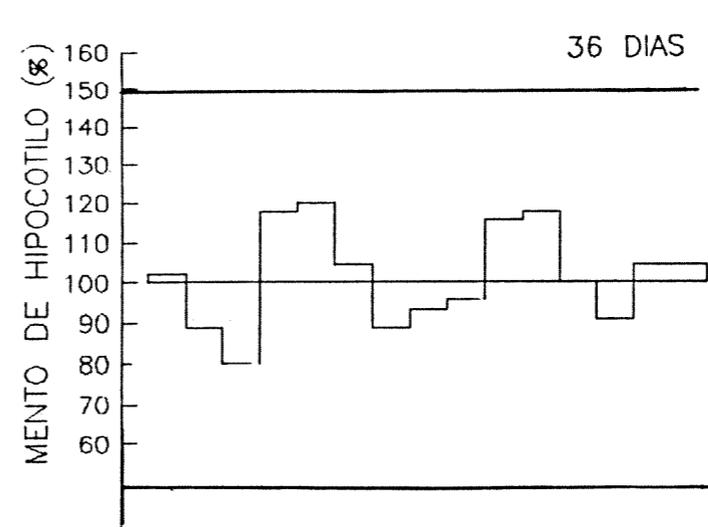
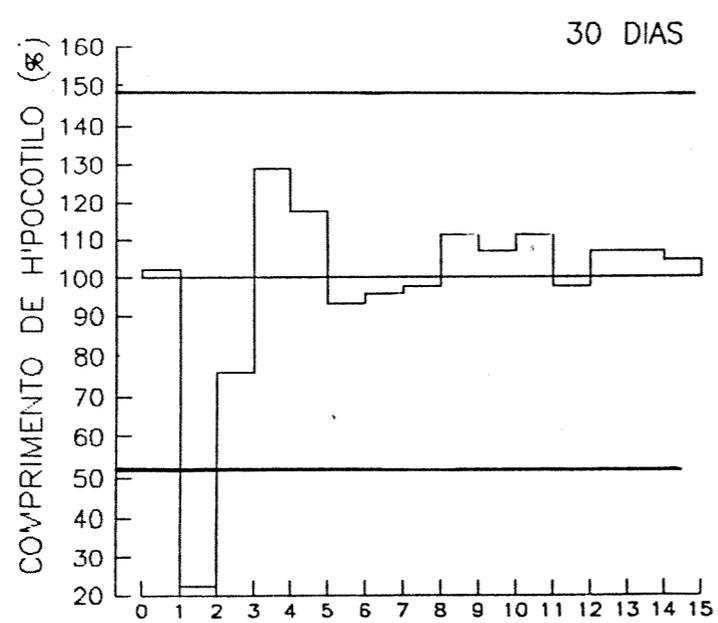
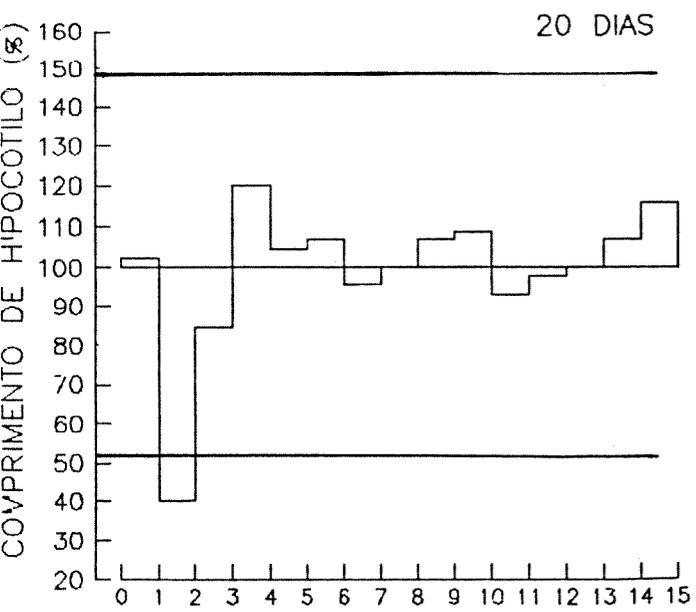
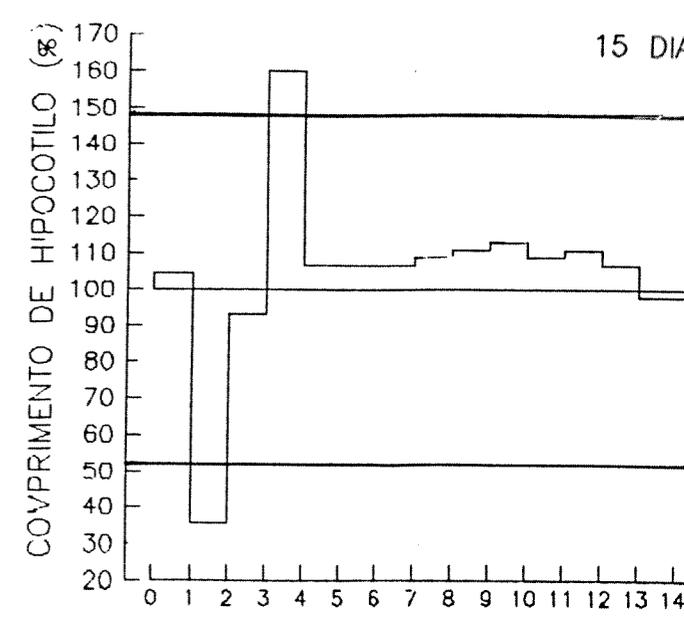
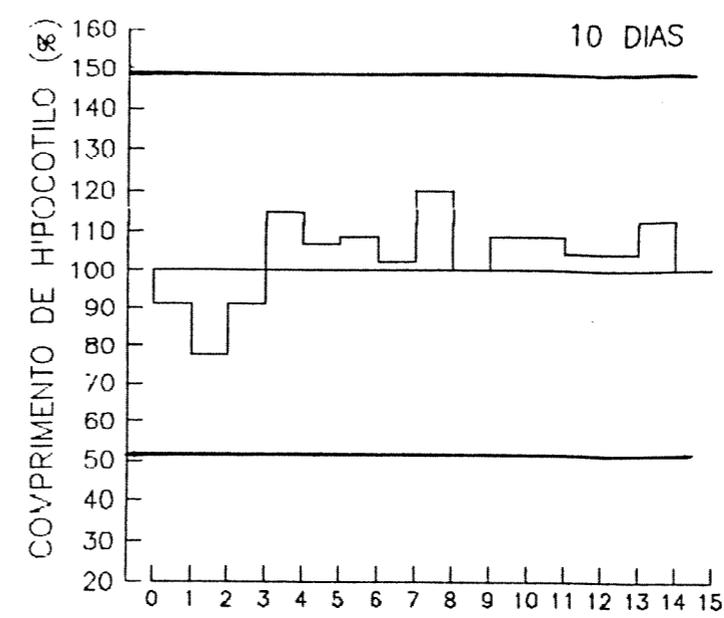
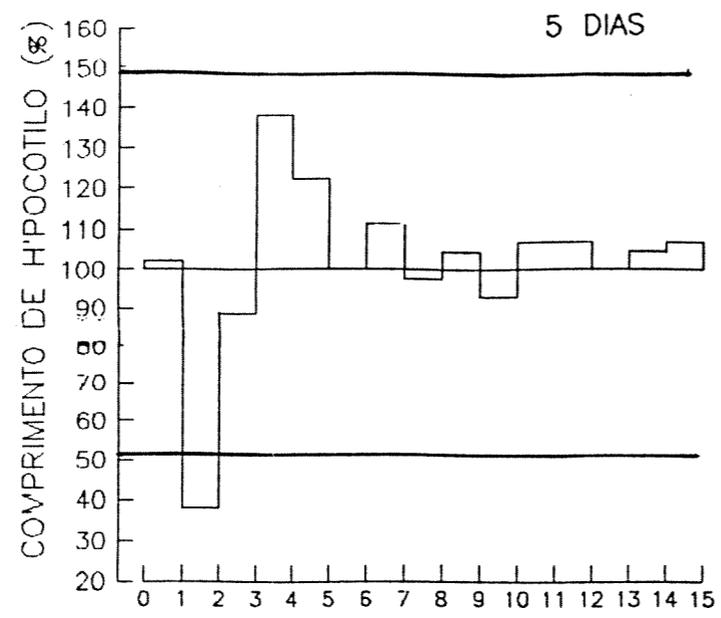
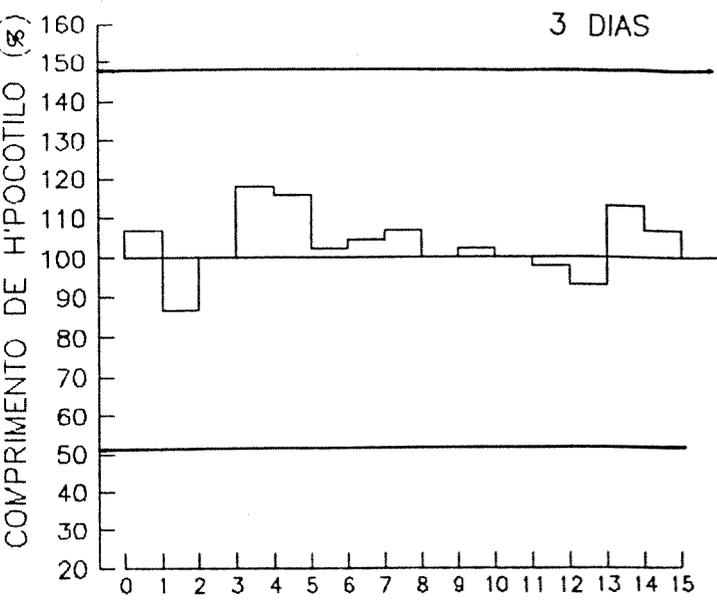


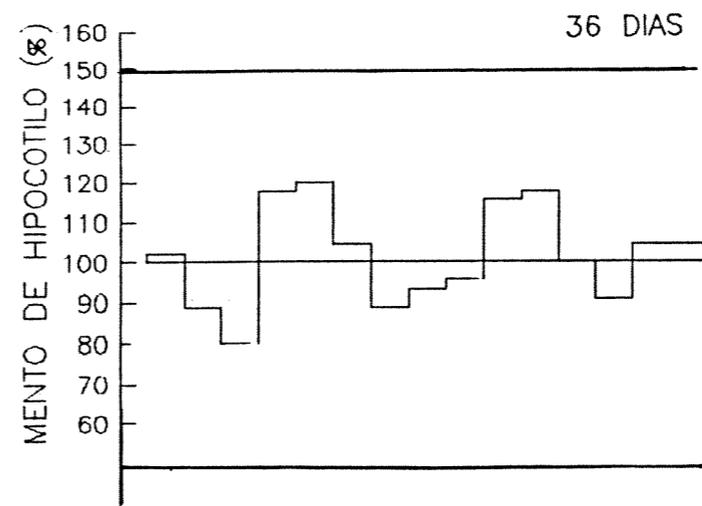
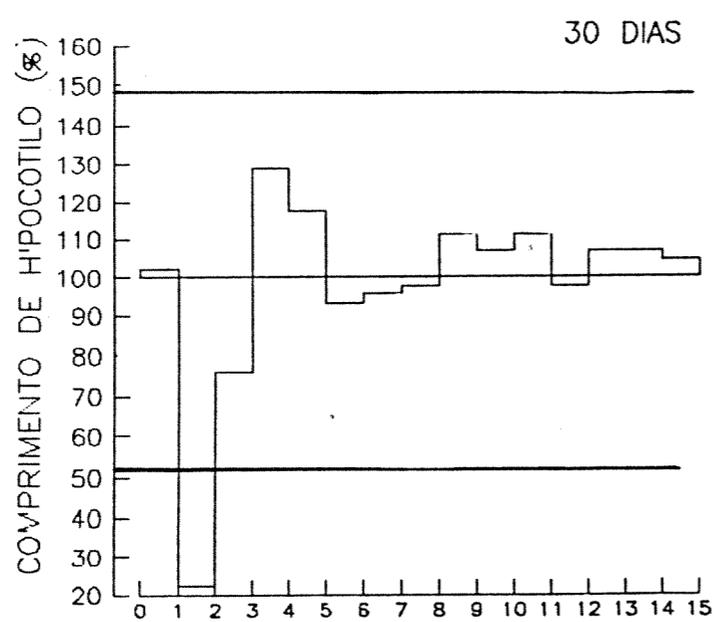
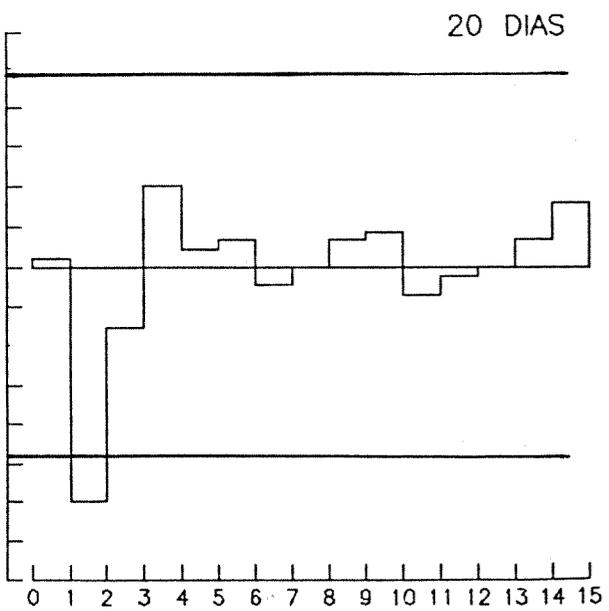
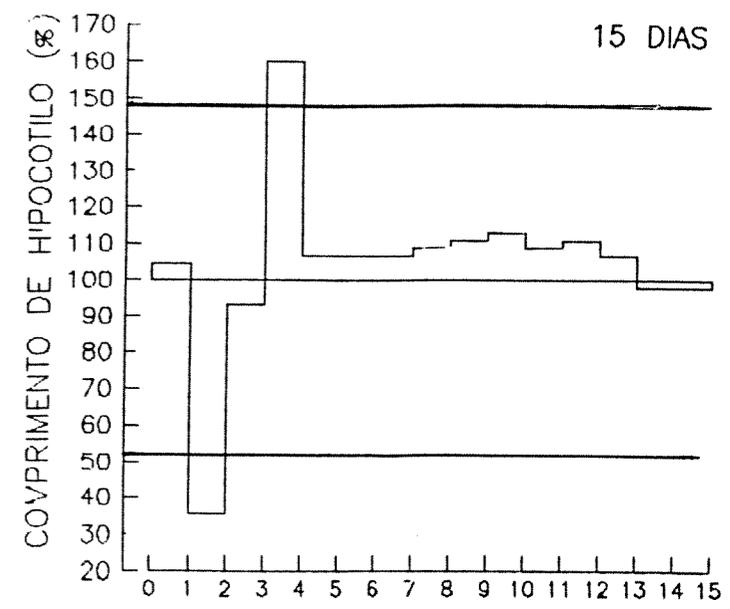
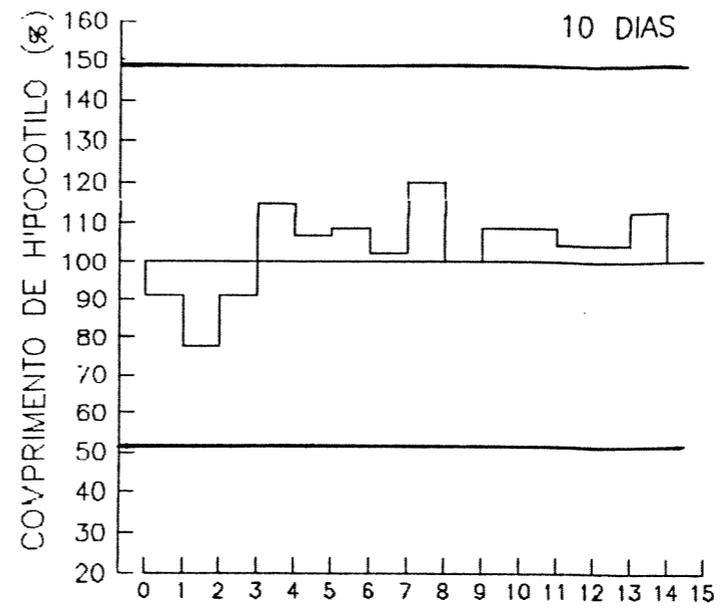
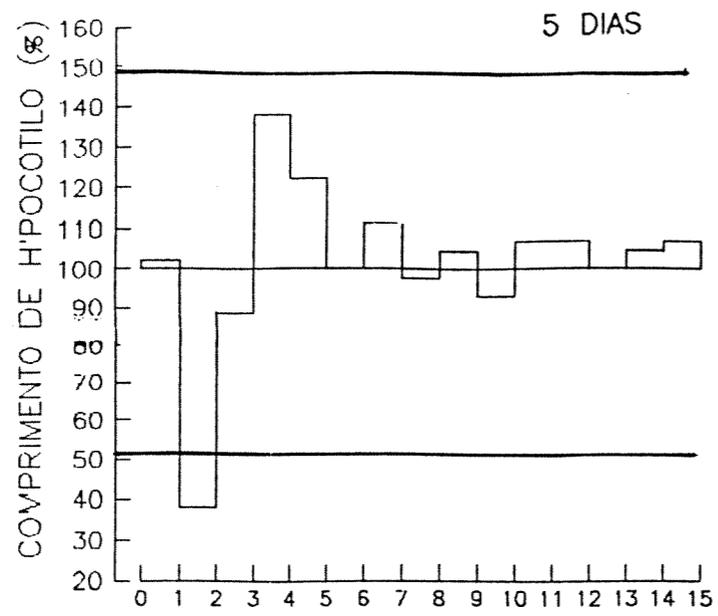
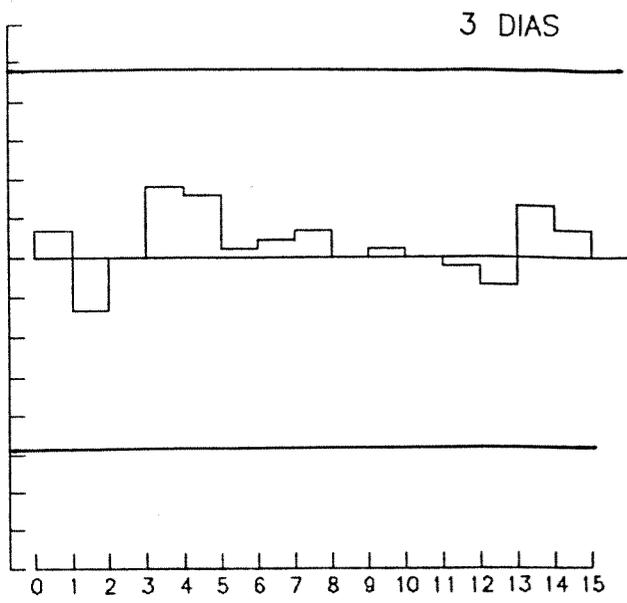
FIGURA 40 - Conteúdo endógeno de substâncias giberelínicas de ápices de plantas de girassol, testado em bioteste do hipocótilo de alfaca. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Análise de Variância Simples, a nível de 5%, conforme PIMENTEL (1984).

A- ápices vegetativos

B- ápices florais.

FIGURA 41 - Conteúdo endógeno de substâncias giberelínicas de ápices de plantas de girassol coletados em idades diferentes, testados em bioteste do hipocótilo de alface. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Análise de Variância Simples, a nível de 5%, conforme PIMENTEL (1984).





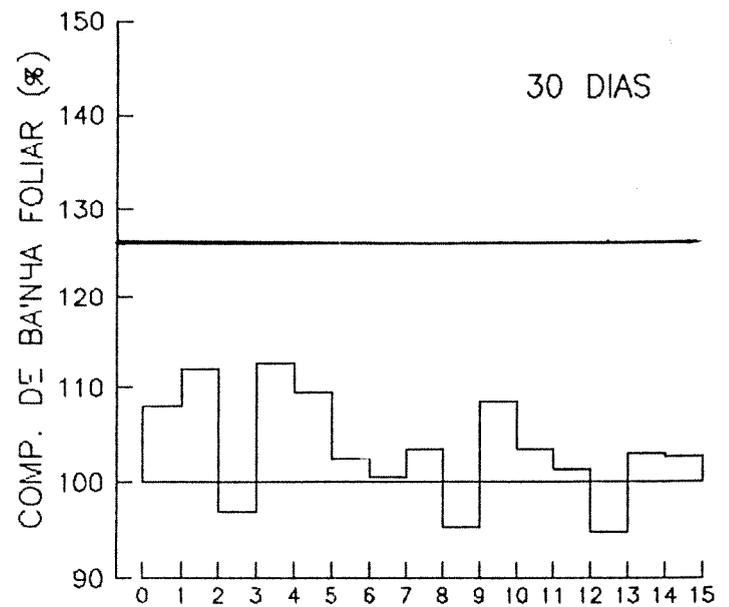
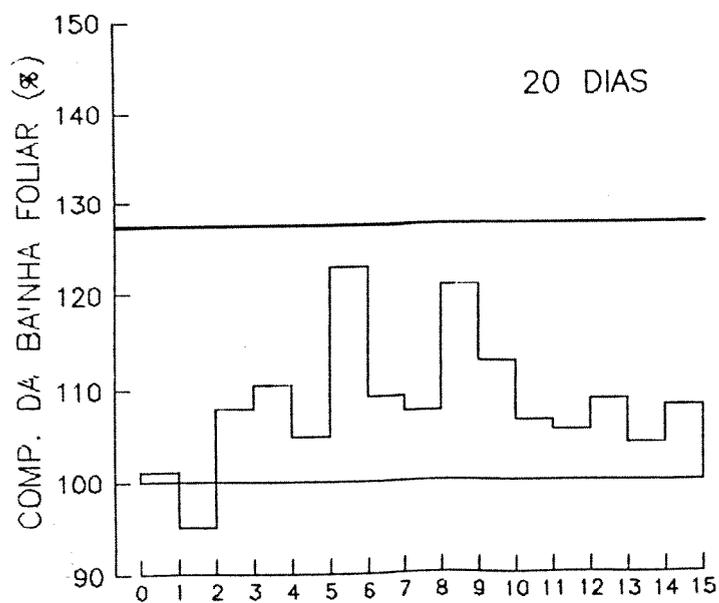
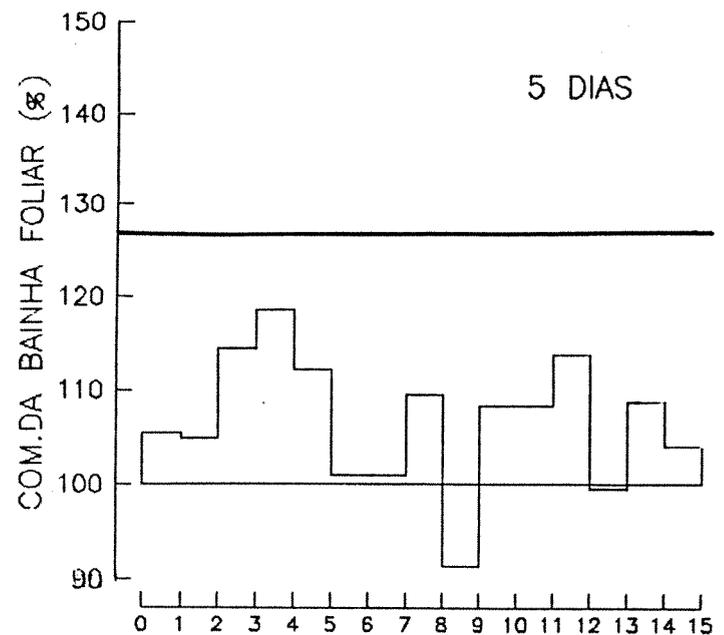
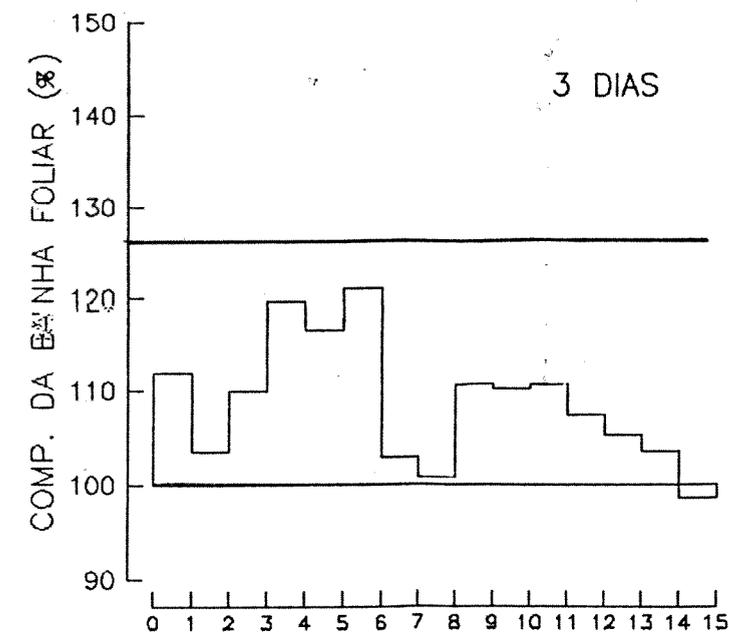
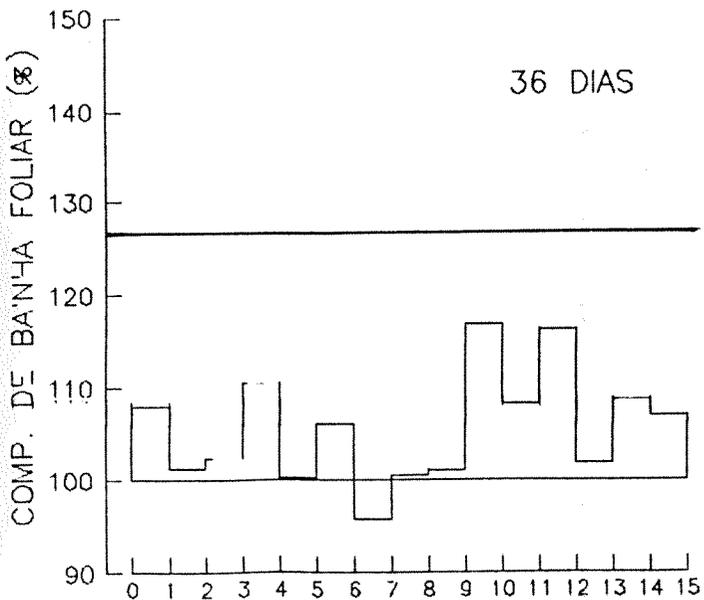
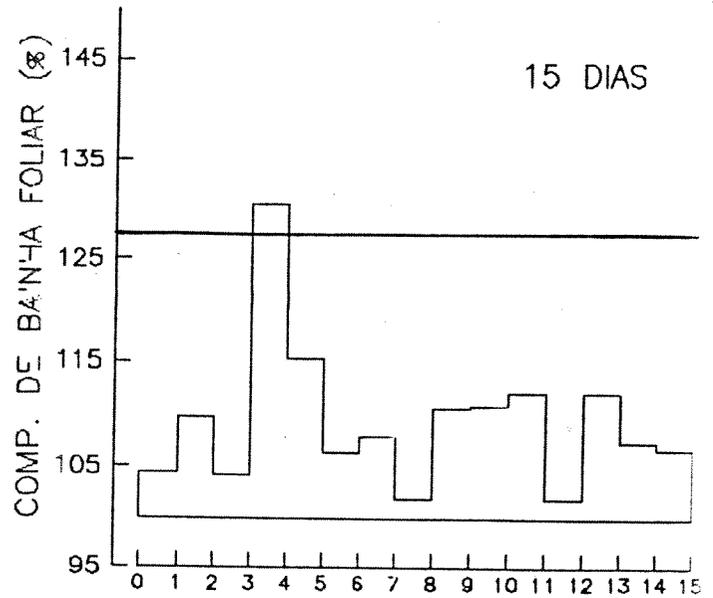
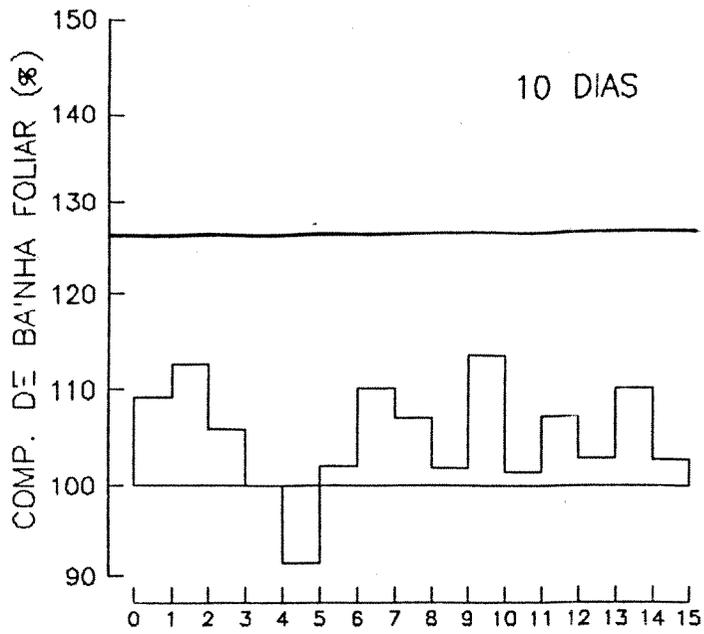


FIGURA 42 - Conteúdo endógeno de substâncias giberelínicas de ápices de plantas de girassol, coletados em idades diferentes, testados em bioteste do arroz anão. Os dados foram analisados pelo teste de Análise de Variância Simples, a nível de 5%, conforme PIMENTEL (1984).



IV - DISCUSSÃO

Para as plantas de girassol, cv. 33, foi verificado que o fotoperíodo não causou efeito na iniciação floral e desenvolvimento de ápice desta cultivar, como também causou efeito no seu desenvolvimento vegetativo (altura de planta e número de folhas). VINCE-PRUE (1975) fazendo um levantamento bibliográfico fotoperiódico para esta espécie encontrou referência em que ela é descrita como indiferente ao fotoperíodo e em outras em que a espécie apresenta uma resposta quantitativa a dias curtos. DYER *et al.* (1959) observaram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para floração de girassol. GOYNE & SCHNEITER (1987), estudando a influência de fotoperíodo em 16 genótipos de girassol, verificaram que entre estes ocorreram respostas tanto de dias longos como de dias curtos e alguns foram indiferentes ao comprimento do dia. Estas respostas diferenciais de fotoperíodo são de importância considerável para programa de produção de semente, onde a sincronização da antese é importante para ocorrer o cruzamento, uma vez que esta espécie apresenta fecundação cruzada (PELEGRINI, 1985).

Quando se consideram experimentos realizados em diferentes épocas do ano, testando-se efeito de fotoperíodo, verifica-se que o comportamento fotoperiódico das plantas não foi muito afetado pela época do ano que o experimento foi realizado. Houve promoção de crescimento de caule das plantas cultivadas em dias longos na época de primavera-verão em relação àquelas em dias curtos, o que não ocorreu nas plantas cultivadas na época de outono-inverno. É interessante,

ressaltar no entanto, que na época de outono-inverno (temperatura baixa) o desenvolvimento de ápice foi mais lento em relação ao observado na época primavera-verão (temperatura alta). Com 35 dias, os ápices de plantas na época de outono-inverno estavam em estágio 0 e com esta mesma idade na época de primavera-verão estavam próximos do estágio 2, o que mostra que o tempo de iniciação floral das plantas em época de primavera-verão foi mais curto do que aquele na época de outono-inverno.

A literatura apresenta alguns exemplos, como o de plantas de Anemona coronaria L., em que o aumento da temperatura atrasou o desenvolvimento do ápice, mas não teve efeito na iniciação floral (BEN-HOOD et al. (1988). ZAIDAN et al. (1991) estudando o efeito de temperatura e fotoperíodo em plantas de Hyptis brevipes observaram que esta espécie é obrigatória de dias curtos, mas é afetada por temperatura durante a indução. Em amendoim, ARMANDO, JR. (1990) constatou efeito de promoção de antese em plantas mantidas com temperatura noturna baixa, enquanto que este efeito não ocorreu quando as plantas estavam sob temperatura noturna alta.

A remoção de um ou dois cotilédones de plantas de girassol cv. 33 não teve efeito na iniciação floral, quando feita aos 3,7, 10 e 15 dias de idade. Contudo, ocorreu atraso no desenvolvimento do ápice floral quando feita remoção de um ou dois cotilédones, no 10^o dia. Verificou-se também, que este tratamento (10^o dia) atrasou o crescimento das plantas. Os tratamentos de remoção não alteraram significativamente a iniciação de primórdios foliares.

Este resultado de remoção de cotilédones, obtido aos 10 dias de idade das plantas de girassol cv. 33, tornou-se um indicativo de que esta faixa de idade poderia ser importante para a floração de girassol.

A remoção de cotilédones pode influenciar o processo de floração de outras espécies. PEREIRA (1981) verificou que a remoção de um cotilédone e das folhas primárias de plântulas de Phaseolus vulgaris atrasou a antese em relação a das plantas controle. LAGÔA & PEREIRA (1984) observaram que a remoção de um cotilédone de Phaseolus vulgaris, após 24 horas de embebição, não causou efeito na iniciação floral desta espécie, que também é indiferente ao fotoperíodo. SHINOZAKI (1985) observou resultados diferentes destes, quando foi feita a remoção de dois cotilédones de plântulas de Pharbitis nil antes de 15 dias de idade, verificou que o tratamento inibiu a floração. Um outro estudo interessante com cotilédones é o de HENRICKSON (1954) que, trabalhando com explantes de plântulas de girassol de cinco dias de idade, que consistiam da plúmula sozinha ou plúmulas em quantidades diferentes de tecido cotiledonar ligado a estas, verificou que ocorreu floração dos explantes com menor quantidade de tecido cotiledonar.

Seguindo com a tentativa de encontrar um fator relacionado com a floração de girassol, passou-se à aplicação de substâncias nestas plantas, em vista do grande número de informações na literatura de seus efeitos na mudança do estágio vegetativo para o floral.

Aplicação de substâncias fenólicas (Ácido salicílico, ácido clorogênico, ácido cafêico e cumarina) não causaram efeito marcante na

floração e no desenvolvimento vegetativo de plantas de girassol, cv.33. Excessão para o ácido cafêico, que causou atraso no desenvolvimento do ápice floral. Para uma resposta mais clara de fenóis na floração de girassol há a necessidade de se testarem outras substâncias fenólicas além das aqui utilizadas, como também aplicação de concentrações diferentes em épocas diversas do desenvolvimento desta cultivar. É frequente, na literatura, a ocorrência de trabalhos indicando o envolvimento de substâncias fenólicas no processo da floração. KUMAR & NANDA (1981) trabalhando com Impatiens balsamina (DC) observaram a promoção de floração com aplicação de ácido salicílico em condições fotoperiódicas não indutivas (luz contínua). Estes autores verificaram também que a atividade de AIAoxidase no caule de plantas controle não mudou enquanto que naquelas tratadas observaram atividade mais alta. Extraíndo compostos fenólicos de plantas vegetativas e florais de duas espécies de Nicotiana, ZUCKER et al. (1965) observaram a presença de ácido clorogênico nas folhas de plantas em estágio vegetativo e nos ápices de plantas em estágio floral. Os autores sugerem que o ácido clorogênico migraria das folhas para o ápice na época de indução floral. UMEMOTO (1971) também verificou efeito de ácido clorogênico na promoção de floração de Lemna gibba G3, quando aplicado em concentração alta, não observando efeito quando a concentração foi baixa. Outra observação sobre fenóis é de FUJIOKA et al. (1983) que, estudando a relação de ácido benzóico em espécies diferentes de Lemna encontraram, através de análise de níveis endógenos desta substância, que a sua concentração não foi diferente em plantas vegetativas e florais. Contudo, quando ácido benzóico foi aplicado nestas plantas, promoveu flo-

ração. Os autores sugeriram que ácido benzóico não é o único fator de indução em Lemna e que poderiam estar envolvidos outros reguladores de crescimento. Ligados a este estudo, WATANABE et al. (1983), obtiveram resultados interessantes, quando aplicaram ácido benzóico e observaram resposta de promoção de floração. Ao aplicarem esta substância junto com AIA, GA₃ ou ABA obtiveram inibição da floração, mas quando aplicado junto com citocininas (6BA, Zeatina e Cinetina), ocorreu promoção de floração em relação às plantas controle.

O tratamento de plantas de girassol cv. 33, com auxina causou promoção do desenvolvimento do ápice floral, pois, enquanto estas plantas estavam no estágio 2 de desenvolvimento de ápice as controle estavam próximas do estágio 1. No entanto, não causou efeito na iniciação floral.

Auxinas apresentam efeito no alongamento de células do caule, mas podem afetar muitos outros aspectos do crescimento, como modificar a resposta de floração (VINCE-PRUE, 1975). O efeito destas substâncias depende de alguns fatores como quantidade, se aplicada em excesso, em geral, parece ser inibitória (SCHWABE, 1987). Em espécies fotoperiódicas, pode ter efeito de promoção ou inibição da floração, que geralmente depende se sua aplicação for feita antes, durante ou após o período de indução. KREKULE & SEIDLOVÁ (1973) observaram em plantas de Chenopodium rubrum L. (DC) que AIA promoveu floração, no entanto, esta resposta foi dependente da época de aplicação, isto é, só ocorreu quando o tratamento foi feito após o período de indução floral. LAGÔA & PEREIRA (1991) verificaram que o ácido-3-indol-acético, aplicado em plantas intactas de Phaseolus vulgaris, atrasou a iniciação floral.

Outra observação neste sentido, foi a de CUETO & DATHE (1986), que aplicando AIA em plantas de café mantidas em condição indutiva, obtiveram atraso na floração destas.

O efeito de citocininas, neste estudo de iniciação floral de girassol da cv. 33, foi de promoção do desenvolvimento do ápice floral, não apresentando efeito qualquer na iniciação floral.

As citocininas também podem apresentar efeito de promoção ou inibição de floração sendo que, o efeito de promoção é mais frequente. Um outro aspecto é que este grupo de substâncias está relacionado com atividade mitótica durante a transição floral, assim estando mais ligado a eventos evocacionais. Contudo seu efeito também dependerá da época de aplicação e parte da planta na qual é depositada e ainda da concentração. Quando gavinhas de Vitis vinifera foram cultivadas em meio líquido com adição de 6BA houve promoção de ramificação e formação de inflorescência (SRINIVASAN & MULLINS, 1978). Outro exemplo de efeito de citocininas é o de KRANJCIC (1983) que, trabalhando com Wolffia arrhiza (L), uma planta de dia curto-longo encontrou que citocininas têm efeito de promoção floral nesta espécie. Após transferir as plantas de dia longo para dia curto, com simultânea aplicação de citocinina, os primeiros primórdios de flores apareceram 4 a 5 dias depois nas plantas controle e 2 a 3 dias naquelas tratadas com citocinina. Outra observação sobre citocininas em floração é a de DAVEY & VAN STADEN, (1978) que encontraram atividade de citocinina no exudato de raiz de Lupinus albus em todos os estádios de desenvolvimento. Esta atividade, entretanto, diminuiu com o início do desenvolvimento floral e foi baixa na época de floração, parecendo que as citocininas das ge-

mas florais originam-se nas raízes.

O efeito de GA₃ foi bastante expressivo na iniciação floral como no desenvolvimento do ápice floral em plantas de girassol cv.33, pois quando plantas tratadas estavam no estágio 3 de desenvolvimento do ápice floral as plantas controle ainda não haviam saído do estágio vegetativo, sugerindo que substâncias giberelínicas parecem ter um envolvimento com a floração de Helianthus annuus. Este resultado expressivo de GA₃ na promoção de floração de girassol, cv.33, demonstra também, que substâncias giberelínicas podem estar envolvidas com a floração em muitas plantas indiferentes ao fotoperíodo. Muitos exemplos do envolvimento de substâncias giberelínicas são encontrados para a floração de muitas espécies. Podendo também ocorrer efeito de inibição ou ainda para outras não ter qualquer efeito. WIBAUT *et al.* (1985) aplicaram GA₃ em dois genótipos de Silene armeria, obtendo para um deles antecipação do estágio pré floral mais cedo do que nas plantas controle. Genótipos de Sorghum quando tratados com GA₃ apresentaram promoção da iniciação floral em relação às plantas controle (WILLIAMS & MORGAN, 1979). Os autores sugeriram que o resultado poderia ser efeito de promoção do estímulo floral ou por um aumento da sensibilidade do ápice ao estímulo floral.

Outro exemplo do efeito de giberelinas exógenas em floração é o trabalho com plantas de Zinnia elegans, espécie de dias curtos, que estando em estágio vegetativo em condições de dias longos (não indutivos) foram tratadas com GA₃ (SAWHNEY & SAWHNEY, 1976). Estudo de KOHLI & SAWHNEY (1979) com três espécies de Amaranthus (DC) que foram tratadas com diferentes GAs, também caracteriza o efeito de giberelina

na floração. Os resultados mostram que o tratamento com GA₃ e GA₄₊₇ não causaram efeito na floração destas plantas mantidas tanto em condição de dias curtos ou longos. Mas, quando outra giberelina, GA₁₃ foi aplicada em plantas de A. caudatus, A. albiflorus e A. tricolor mantidas em fotoperíodo indutor todas apresentaram um encurtamento do período de floração. Entretanto, GA₁₃ não substituiu completamente a exigência de dias curtos indutivo pois não causou floração nas plantas mantidas em luz contínua. Também foi visto por SINGH & NANDA (1981) que GA₃ apresenta efeito de promoção floral, Callistemon viminalis, uma dicotiledônea lenhosa. Foi verificado também que a aplicação de GA₃ em três espécies de dias curtos Panicum miliaceum, P. miliare e Setaria italica, que estavam em condição de luz contínua, floresceram enquanto, as controle permaneceram vegetativas. Contudo, convém ressaltar que embora GA₃ tenha causado floração; em Panicum miliaceum e P. miliare sob condições fotoperiódicas não indutivas, as espigas que estas plantas produziram eram curtas, estéreis e secas após a emergência (KUMAR et al., 1977). Outra informação do efeito de giberelinas na floração é o trabalho com clones de Papaver bracteatum, que tratados com GA₃, apresentaram aumento de resposta de floração. Naqueles clones cuja floração é tardia, o efeito de GA₃ foi mais pronunciado em relação às plantas controle. Em clones cuja floração ocorre mais cedo, GA₃ também causou efeito, mas as diferenças entre plantas controle e tratadas não foram significativas (LEVY et al., 1986).

Passando-se a um estudo mais detalhado do efeito de GA₃ na floração de girassol foram obtidas algumas informações de época de tratamento e quantidade aplicada, que tornam bastante evidente que substân-

cias giberelínicas realmente parecem ter envolvimento maior com a passagem do estágio vegetativo para o reprodutivo, nesta cultivar 33 de girassol.

Para o aspecto tempo de aplicação, foi observado através de vários experimentos que GA₃ apresentou efeito de promoção de iniciação floral e desenvolvimento do ápice quando aplicado na faixa de 10, 12 e 14 dias de idade das plantas de girassol. Aplicações feitas na faixa de 16, 18 e 20 dias não foram tão efetivas para a floração.

Na faixa de 10, 12 e 14 dias foi constatado que GA₃ aplicado no dia 10 foi mais efetivo para o desenvolvimento de ápice do que nos dias 12 ou 14.

Como antecipação máxima do tratamento com GA₃ foi feita a embebição de sementes de girassol por 24 horas na solução de ácido giberélico antes do plantio, onde foi verificado que este tratamento promoveu o desenvolvimento do ápice floral. Contudo, quando este resultado foi comparado com o de plantas tratadas aos 12 dias de idade não houve diferenças significativas entre os seus efeitos na floração. Quando comparadas com plantas cuja aplicação de GA₃ foi aos 18 dias, verificou-se que o tratamento em fase mais adiantada não causou efeito na floração.

Estas informações parecem indicar que, para a floração de girassol, as substâncias giberelínicas que terão que participar neste processo devem estar presentes em fases jovens da plântula; e os resultados aqui indicando que é por volta do 10^o dia de idade. É possível que, estas substâncias giberelínicas estejam sendo produzidas a partir da embebição e sendo armazenadas em algum compartimento até que este-

jam num nível ótimo para participar do processo de floração de girasol, pois aos 20 dias de idade as plantas cujas sementes foram embebidas com GA₃ estavam próximas do estágio 2 de desenvolvimento do ápice e as controle ainda estavam vegetativas, sugerindo que o nível ótimo de substâncias giberelínicas para a floração foi atingido mais cedo nas plantas originadas de sementes que foram embebidas com GA₃.

Alguns estudos têm indicado que a época de aplicação de giberelinas é importante para a obtenção de resultados na floração em diferentes espécies. Trabalho de WIBAUT-BESNARD (1981) com Arabidopsis thaliana (DL), mantidas em dias curtos e tratadas com GA₃ em épocas diferentes mostra promoção de floração para tratamento feito em plantas em fase intermediária, sendo que aquelas tratadas no final da fase intermediária de crescimento responderam mais rápido. Outro exemplo para esta relação de época de aplicação de giberelina e seu efeito na floração é visto no trabalho de KING et al. (1987) que observaram que respostas de promoção ou inibição de floração de plantas de Pharbitis nil (cultivar Violeta), tratadas com GA₃, dependeram da época do tratamento. Quando GA₃ foi aplicado antes do tratamento indutivo promoveu floração e quando foi aplicado 20 horas após o tratamento inibiu a floração. Outro exemplo foi apresentado por SCHUCH et al. (1990) que GA₃ antecipou a antese em café quando foi aplicado em gemas florais maiores que 4mm, permanecendo iguais ao controle aquelas menores que 4mm. Assim, em café o tempo de aplicação é crítico uma vez que a resposta ao GA₃ de antecipação da floração foi dependente do desenvolvimento morfológico da gema floral. BODSON (1986) também verificou que o tratamento de azáleas com GA₄₊₇ em fases diferentes do desenvolvimento

da gema apical, causou respostas diferentes. Quando aplicado na fase vegetativa estimulou o crescimento da parte aérea e atraou ligeiramente a iniciação e desenvolvimento de flores. Quando aplicado na época de transição floral induziu a aborção das gemas em estágio precoce de desenvolvimento reprodutivo.

Informações sobre compartimentalização de substâncias giberelínicas foram fornecidas por HEDDEN et al. (1978) que explicam que, os níveis de GAs disponíveis poderiam ser controlados se sua biossíntese estiver compartimentalizada dentro de uma organela. Existem evidências consideráveis que plastídios contêm substâncias como giberelinas e são capazes de conduzir, pelo menos, alguns passos da biossíntese de GA.

Uma outra evidência para esta sugestão é o estudo de MARTINEZ et al. (1981) em que protoplastos de mesófilo e vacúolos que foram isolados de folhas de vigna e cevada previamente tratadas com GA₁ tritiado. Estes protoplastos retêm a capacidade de metabolizar GA₁, indicando que nem a estrutura da folha nem a parede celular são necessários para o metabolismo. Uma proporção maior de GA₃-glu foi encontrado nos protoplastos de vacúolos inteiros. Os resultados obtidos sugerem que os metabólitos de GA₁ são preferencialmente compartimentalizados nos vacúolos.

GA₃ foi aplicado nas plantas de girassol em quantidades desde de 0,005µg até 0,180µg, na faixa de idade entre 10,12 e 14 dias. Foi verificado que 0,180µg promoveu só o desenvolvimento do ápice floral. Enquanto 0,030µg, 0,045µg e 0,090µg promoveram a iniciação floral e o desenvolvimento posterior do ápice. Em quantidade menor que 0,015µg o efeito foi somente para promoção de desenvolvimento do ápice e causou

efeito somente quando aplicada aos 10 dias de idade. Quando a quantidade de $0,045\mu\text{g}$ foi aplicada em fase mais adiantada com 16,18 ou 20 dias ocorreu efeito de promoção apenas para o desenvolvimento do ápice floral, não afetando a iniciação.

Estes resultados indicam que a floração de girassol, cv. 33, em específico, o desenvolvimento do ápice, é bastante sensível ao GA_3 , uma vez que quantidades reduzidas foram efetivas. Porém, só ocorreu promoção da iniciação floral na faixa de $0,045\mu\text{g}$ a $0,090\mu\text{g}$ de GA_3 aplicados em idades de 10, 12 e 14 dias. Isto parece indicar que, para que a iniciação floral ocorra, os níveis endógenos de substâncias gibberelínicas devem estar num nível ótimo. Este efeito de quantidade também é visto no trabalho de KING *et al.* (1987) onde os autores observaram que GA_3 aplicado em Pharbitis nil (Kidachi) em doses diferentes causou resultados de promoção e inibição de floração. Plantas de Silene armeria (DL) quando mantidas em condição não indutiva de dias curtos e tratadas com GA_3 houve um efeito da quantidade para obtenção da resposta (CLELAND & ZEEVAART, 1970). O efeito de quantidade de GA_3 foi visto em plantas aquáticas de Pistia stratiotes que foram cultivadas em dias curtos e luz contínua em meio nutritivo com várias concentrações de GA_3 . O autor PIETERSE (1978) verificou que a quantidade de $1\mu\text{g/ml}$ foi promotora de floração e $0,1\mu\text{g/ml}$ não promoveu.

Plantas de girassol, cv. 33, quando tratadas com CCC ou tetcyclacis, não apresentaram efeitos destas substâncias para a iniciação, desenvolvimento de ápice floral e nem para o desenvolvimento vegetativo. É possível que esta ausência de resposta ao CCC e tetcyclacis deva-se a concentração e forma de aplicação. Um outro aspecto é o de que a

aplicação de substâncias inibidoras de giberelinas, em outras espécies, nas quais foi verificado efeito, pode ser que nestes casos tenham atingido o local de ação e aqui, podem ter sido ineficientemente absorvida ou metabolizada rapidamente antes de atingirem o local de ação como explica RADEMACHER & JUNG (1981) para outros inibidores. Contudo, é visto na literatura efeito destas substâncias na floração de outras espécies como em Vicia faba, na qual EL-ANTABLY (1976) analisou o conteúdo endógeno de substâncias giberelínicas de plantas tratadas com CCC antes e durante a floração. Nas plantas controle este autor detectou em cromatografia de camada delgada duas faixas de Rfs com atividade giberelínicas (Rfs 0,0-0,1 e 0,2-0,3) e nas florais apenas uma faixa. Nas plantas tratadas os níveis encontrados destas substâncias caíram pela metade.

Experimentos feitos com aplicação de paclobutrazol, via ápice, apresentaram efeito de inibição na floração desta cultivar 33 somente quando aplicada em concentração alta. Aplicação de paclobutrazol nas concentrações de $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ e $10^{-6}M$ não causaram efeito na floração porém, $10^{-3}M$ causou atraso no desenvolvimento do ápice floral, quando aplicado também em quantidade maior. Entretanto, aplicações de paclobutrazol na terra causaram efeito forte de inibição da floração de girassol. Foi visto por WILKINSON & RICHARDS (1991), efeito de paclobutrazol na promoção de floração em Rhododendron.

O efeito de inibição de floração de girassol, cv.33, obtido neste trabalho, tornou claro que substâncias giberelínicas estão bastante envolvidas com a floração de girassol. Resultados com aplicação de paclobutrazol na terra também indicaram que o tratamento é mais efeti-

vo na inibição de floração quando aplicado na faixa de 10 a 14 dias de idade das plantas.

Foi observado ainda que o efeito de inibição da floração é causado pelo tratamento de paclobutrazol na terra não é permanente, pois estas plantas apresentavam botão floral com cerca de 79 dias. Portanto, paclobutrazol inibiu as substâncias giberelínicas durante algum tempo. É possível que paclobutrazol absorvido foi metabolizado até ficar ausente ou estar em quantidade baixa que não pudesse mais atuar bloqueando a síntese de substâncias giberelínicas.

Para o desenvolvimento vegetativo (crescimento de caule e número de folha) de girassol cv.33, foi verificado que, dentre os tratamentos aplicados, GA₃ e paclobubutrazol causaram os efeitos mais expressivos para estas plantas em relação ao efeito dos outros tratamentos aqui aplicados.

A aplicação de GA₃ tanto na faixa de 10,12 e 14 dias como na de 16,18 e 20 dias promoveu o crescimento de caule. A exceção foi para o tratamento com sementes embebidas com GA₃, cujo crescimento não foi promovido. Com relação à quantidade também houve promoção de crescimento desde de 0,180µg até 0,005µg de GA₃ aplicado. A iniciação de primórdios foliares foi antecipada de forma geral para todos os tratamentos com GA₃, contudo ao final dos experimentos estavam iguais aos do controle.

Com paclobutrazol o crescimento das plantas foi diminuído expressivamente em relação ao controle. Este efeito de nanismo de plantas devido a paclobutrazol foi também observado para outras espécies. Quando paclobutrazol foi aplicado em cerejeiras, FACTEAU & CHESTNUT

(1991) verificaram que o crescimento foi reduzido significativamente. Este mesmo efeito foi encontrado por WILKINSON & RICHARDS (1991) com Rhododendron, onde foi observado uma redução no crescimento das plantas com o aumento da concentração de paclobutrazol aplicado. STERRET (1985) também encontrou efeito de diminuição de crescimento, peso e tamanho de folhas de plantas de feijão, quando a dose de paclobutrazol aplicada foi de 0,01 a 1,0 μ g/planta, estando diminuição em função da quantidade.

Outro aspecto a ser comentado é o de que os resultados de inibição de floração com aplicação de paclobutrazol foram mais efetivos quando aplicados na terra do que no ápice. Para algumas espécies, foi verificado que paclobutrazol foi eficientemente absorvido pelo sistema foliar como visto por MAUK *et al.* (1990) que aplicou paclobutrazol via foliar em planta de maçã e obteve resposta de redução de crescimento durante o ano de aplicação.

As folhas formadas nas plantas tratadas com paclobutrazol ficaram todas próximas umas das outras devido ao encurtamento do caule. Determinação do número de primórdios com este tratamento mostra que a formação de folhas foi lenta, mas ao final do experimento, estavam com número equivalente ao das plantas não tratadas, com exceção do tratamento cuja aplicação de paclobutrazol foi feita na terra, aplicado uma única vez aos 20 dias de idade das plantas. Resultado semelhante foi observado por STEFEENS (1988) que tratando plantas de maçã com 0,5mg/árvore de paclobutrazol verificou que o número de folhas das plantas não foi reduzido, embora o crescimento tenha cessado por cerca de 6 a 8 semanas.

As folhas das plantas tratadas com paclobutrazol estavam mais espessas, com cor verde mais forte e com um certo enrugamento. Este efeito parece ser característico de paclobutrazol, pois LEE *et al.* (1985) observaram que as folhas de plantas de feijão tratadas com paclobutrazol tornaram-se significativamente mais grossas e continham mais clorofila por unidade de área do que aquelas de plantas controle.

Estes resultados expressivos de promoção de crescimento por GAs e inibição por paclobutrazol sugerem que substâncias giberelínicas estão envolvidas no desenvolvimento vegetativo e floral desta cultivar 33 de girassol. No entanto, este efeito não esclarece que tipos de GAs poderiam estar envolvidas em cada processo. Uma vez que paclobutrazol inibe a síntese de GAs, na oxidação de ent-kaureno para ácido ent-kaurénico (RADEMACHER *et al.*, 1984, citado em SPONSEL, 1987).

Extrato de ápice de plantas de girassol em estágio vegetativo e floral biotestados mostraram que ocorreu atividade de substâncias giberelínicas no extrato de plantas florais de girassol. Observação semelhante foi verificada por ROOD *et al.* (1989), mas ao invés de utilizarem extrato de ápices usaram de caule de plantas de *Brassica napus*. Estes autores verificaram que, a partir deste extrato purificado e cromatografado em colunas de particionamento de sílica gel e biotestado em arroz anão, as concentrações de substâncias giberelínicas totais foram baixas durante o estágio vegetativo e aumentaram na época da iniciação floral.

Quando foram feitos extratos de ápices de plantas de girassol com 3,5,10,15,20,30 e 36 dias de idade e biotestados com alface e arroz, os resultados indicaram que 15 dias foi a época onde ocorreu presença

significativa de substâncias giberelínicas. Este resultado foi bastante consistente pois foi obtido tanto em bioteste de alface como de arroz anão. Outra observação é a de que a atividade destas substâncias estava presente na fração cujo tempo de retenção era seis a oito minutos da corrida em HPLC e que foi idêntico nos dois biotestes. Com estas frações, comparando o seu tempo de retenção com padrões de giberelinas marcadas radioativamente e cromatografadas nas mesmas condições que os extratos aqui utilizados, pode-se observar que a faixa 6 a 8 minutos correspondeu à de GA₁ que está entre 5 e 10 minutos (E. SAVIANI "comunicação pessoal"). Embora esta evidência não seja suficiente para se afirmar conclusivamente, é possível que a GA detectada em ápices florais de plantas de girassol, cv. 33, seja GA₁.

Os resultados com aplicação de ácido giberélico e de paclobutrazol mostraram que, no 10^o dia de idade, as plantas são mais sensíveis a estes tratamentos, indicando que o 10^o dia seria um ponto crítico na floração de girassol, cv.33. Entretanto, os resultados das extrações de substâncias giberelínicas mostram que o 15^o dia é a fase onde estas substâncias apresentam atividade maior. Desta situação pode-se inferir que o 10^o dia seria a época em que estas substâncias giberelínicas começariam a estar disponíveis e induzir o processo, porém, atingindo uma concentração tal que só pode ser detectada, nas condições experimentais usadas a partir do 15^o dia.

Alguns pontos verificados no decorrer deste estudo estão a favor desta situação: os resultados da remoção de cotilédones que atrasou o desenvolvimento do ápice floral em plantas no 10^o dia de idade, mas não teve efeito na iniciação floral; quando GA₃ foi aplicado em plan-

tas com 10, 12 e 14 dias, causando promoção do desenvolvimento do ápice floral e promovendo a iniciação floral; quando da aplicação de GA₃ ou de paclobutrazol em plantas com 16, 18 e 20 dias de idade causando pouco efeito na floração desta cultivar, parecendo desta forma, que as substâncias giberelínicas nesta faixa de idade mais adiantada já estariam presentes em nível ótimo para causar a floração.

V- CONCLUSÕES

A cultivar 33 de girassol é indiferente ao fotoperíodo.

Remoção de um ou dois cotilédones 10 dias de idade atrasou o desenvolvimento do ápice floral de plantas de girassol, cv.33 e não causou efeito na iniciação floral.

Substâncias fenólicas, AIA e 6BA apresentaram promoção de desenvolvimento do ápice e não causaram efeito na iniciação floral.

GA₃ causou expressiva promoção na floração quando aplicado em plantas com 10 a 14 dias em quantidade entre 0,005µg e 0,180µg. sugerindo que substâncias giberelínicas para o processo de floração de girassol, cv.33, devem estar atuando por volta do 10^o dia de idade das plantas.

Paclobutrazol inibiu fortemente a floração quando aplicado em plantas com 10 a 12 dias, sendo mais efetivo com aplicação na terra. Seu efeito de inibição não é, permanente, pois após um período longo as plantas floresceram.

Estudos cromatográficos de substâncias giberelínicas endógenas sugerem que estas substâncias participam do processo de floração de girassol, cv.33 e que GA₁ poderia ser a giberelina envolvida no processo.

RESUMO

Helianthus annuus (girassol) é uma composta, que está dentro do quadro das plantas economicamente importante em nosso país.

O objetivo deste trabalho foi o de verificar o comportamento floral desta espécie, que foi observada inicialmente ser indiferente ao comprimento do dia. Quando feita a remoção de um ou dois cotilédones no 10^o dia de idade das planta ocorreu atraso do desenvolvimento do ápice floral.

A partir disto, passou-se a verificar que substâncias poderiam estar envolvidas no controle de floração desta espécie. Foram testadas substâncias reguladoras de crescimento, 6BA, AIA, GA₃ e substâncias fenólicas (ácido clorogênico, ácido cafêico e cumarina). Dentre estas, GA₃ apresentou efeitos marcantes tanto na iniciação e no posterior desenvolvimento do ápice floral quanto no seu desenvolvimento vegetativo, quando aplicado nas plantas no 10^o dia de idade.

Para evidenciar este envolvimento de substâncias giberelínicas na floração de Helianthus annuus, trataram-se as plantas com paclobutrazol, substância inibidora da síntese de giberelinas; que inibiu expressivamente a sua floração contudo este efeito não foi permanente. Também tentou-se verificar como era este envolvimento, a nível endógeno, através de extração destas substâncias; observando-se atividade giberelínica em ápices coletados no 15^o dia de idade.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que substâncias giberelínicas estão envolvidas no controle de floração de girassol de que estariam num nível ótimo em plantas com 10 a 15 dias de idade.

VII - BIBLIOGRAFIA

- ARMANDO, JR, J. 1990. Controle da floração em amendoim (Arachis hypogaea L.). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- BEN-HOD, G.; KIGEL, L. e STEINTZ, B. 1988. Dormancy and flowering in Anemone coronaria L. as affected by photoperiod and temperature. Ann. Bot., 61: 623-63
- BERNIER, G. 1971. Structural and metabolic changes in the shoot apex in transition to flowering. Can. J. Bot., 49: 803-819.
- BERNIER, G. 1988. The control of floral evocation and morphogenesis Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol., 39: 175-219.
- BERNIER, G.; KINET, J.M.; JACQMARD, A.; HAVELANGE, A. e BODSON, M. 1977. Cytokinin as a possible component of the floral stimulus in Sinapis alba. Plant. Physiol., 60: 282-285.
- BERNIER, G.; KINET, J.M.; SACHS, R.M. 1981 a. The Physiology of flowering. Florida, CRC, v.1, 149 p.
- BERNIER, G.; KINET, J.M.; SACHS, R.M. 1981b. The physiology of flowering. Florida, CRC, v.2, 231 p.

- BODSON, M. 1986. Effect of GA₄₊₇ on the initiation and development of the inflorescence bud of evergreen azaleas. Arch. Int. Physiol. Biochim., 94: 38.
- CLELAND, C.F. 1978. The flowering enigma. Bio Science, 28: 265-269.
- CLELAND, C.F. 1982. The chemical control of flowering - A status report. In: Plant Growth Substances. Ed. WAREING, P.F. Academic Press. pp. 635-644.
- CLELAND, C.F. e ZEEVAART, J.A.D. 1970. Gibberellins in relation to flowering and stem elongation in the long day plant Silene armeria. Plant Physiol., 46: 392-400.
- CUETO, M.A. e DATHE, W. 1986. Effect of auxins on flower formation in coffee (Coffea arabica L.). Biologia Plantarum, 28: 355-360.
- DAVEY, J.E. e VAN-STADEN, J. 1978. Cytokinin activity in Lupinus albus. I. Distribution in vegetative and flowering plant. Physiol. Plant. 43: 77-81.
- DAVIS, E.L.; RINNIE, P. e STEEVES, T.A. 1979. Further analytical and experimental studies on the shoot apex of Helianthus annuus: variable activity in the central zone. Can. J. Bot., 57: 971-980.

- DYER, H.J.; SKOK, J. e SCULLY, N.J. 1959. Photoperiodic behavior of sunflower. Bot. Gaz., 121: 50-55.
- EL-ANTABLY, M.M.H. 1976. Studies on the physiology of shedding of buds, flowers and fruits in Vicia faba. II- Effect of cycocel (CCC) and the role of endogenous gibberellins and cytokinins. Z. Pflanzenphysiol., 80: 29-35.
- ESAU, K. 1974. O caule: Estágio primário de crescimento (cap. 16). In: Anatomia das plantas com sementes. Ed4. Editora EDGARD BLUCHER LTDA pp. 160-183.
- EVANS, L.T. 1971. Flower induction and the florigen concept. Annu. Rev. Plant. Physiol., 22: 365-394.
- FACTEAU, T.J. e CHEST NUT, N.E. 1991. Growth, fruiting, flowering and fruit quality of Sweet cherries treated with paclobutrazol. Hortscience, 26: 276-278.
- FRANKLAND, B. e WAREING, P.F. 1960. Effect of gibberelic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. Nature, 185: 255-256.
- FUJIOKA, S.; YAMAGUCHI, J.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N.; KAIHARA, S. e TAKIMOTO, A. 1983. Flowering and endogenous levels of benzoic acid in Lemna species. Plant Cell Physiol., 24: 235-239.

- GOYNE, P.J. e SCHNEITER, A.A. 1987. Photoperiod influence on development in sunflower genotypes. Agron. J., 79: 704-709.
- HADDAD, C.R.B. 1991. Efeito do fogo na floração de Lantana montevidensis BRIQ., uma planta de cerrado. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- HAVELANGE, A. e BERNIER, G. 1974. Descriptive and qualitative study of ultrastructural changes in the apical meristem of mustard in transition to flowering. I. The cell and nucleus. J. Cell Science, 15: 633-644.
- HAVELANGE, A.; BODSON, M. e BERNIER, G. 1986. Partial evocation by exogenous cytokinin in the long day plant Sinapis alba. Physiol. Plant., 67: 695-701.
- HEDDEN, P.; Mac MILLAN, J. e PHINNEY, B.O. 1978. The metabolism of the gibberellins. Annu. Rev. Plant Physiol., 29: 149-92.
- HENRICKSON, E.C. 1954. The flowering of sunflower explants in aseptic culture. Plant Physiol., 29: 536-538.
- KHURANA, J.P. e MAHESHWARI, S.C. 1986.a Floral induction in a photoperiodically neutral Duckweed Lemna paucicostata LP₆: Interaction of iron, EDTA and cytokinins. Biochim. Physiol. Pflanz., 181: 559-564.

- KHURANA, J.P. e MAHESHAWARI, S.C. 1986.b Induction of flowering in the duckweed Lemna paucicostata under non-inductive photoperiods by tannic acid. Physiol. Plant., 66: 447-450.
- KING, R.W.; PHARIS, R.P. e MANDER, L.N. 1987. Gibberellins in relation to growth and flowering in Pharbitis nil chois. Plant Physiol., 84: 1126-1131.
- KOHLI, R.K. e SAWHNEY, S. 1979. Promotory effect of GA₃ on flowering of Amaranthus - a short day plant. Biol. Plant., 21: 206-213.
- KOVALEVA, L. e MILYAEVA, E. 1987. Specific proteins in stem meristems during transition of flowering. Biol. Plant., 29: 395-398.
- KRANJCIC, B. 1983. The effects of cytokinins on flowering in the long-short-day plant Wolffia arrhiza (L.) Wimm. z. Pflanzenphysiol., 121: 281-286.
- KREKULE, J. e SEIDLOVÁ, F. 1973. Treatment that enhance flowering in post-inductive period of a short-day plant Chenopodium rubrum L. Ann. Bot., 37: 615-23.
- KREKULE, J.; PAVLOVÁ, L.; SDUCKOVÁ, D. e MACHACKOVÁ, I. 1985. Auxin in flowering of short-day and long-day Chenopodium species. Biol. Plant., 27: 310-317.

- KUMAR, S.; DATTA, K.S. e NANDA, K.K. 1977. Gibberellic acid causes flowering in the short-day plants Panicum miliaceum L., P. miliare Lamk and Setaria italica (L.) P. beauv. Planta, 134: 95-96.
- KUMAR, S. e NANDA, K.K. 1981. Effect of gibberellic acid and salicylic acid on the activity and eletrophoretic pattern of IAA-oxidase during floral induction in Impatiens balsamina. Biol. Plant., 23: 328-334.
- LAGÔA, A.M.M.A. e PEREIRA, A.D.F.M. 1984. Efeito correlativo de órgãos na iniciação floral em Phaseolus vulgaris cv. Goiano Precoce. An. IV Congr. SBSP. 1-6.
- LAGÔA, A.M.M.A. e PEREIRA, A.D.F.M. 1991. Efeito de substâncias de crescimento na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. Revta brasil. Bot., 14: 115-119.
- LANGENAUER, H.D.; ATSMON, D. e ARZEE, T. 1975. Effects of gibberellic acid on DNA synthesis and histology in the shoot apex of Helianthus annuus during the transition to flowering. Can. J. Bot., 53: 2650-2659.
- LEE, E.H.; BYUN, J.K. e WILDING, S.J. 1985. A new gibberellin biosynthesis inhibition, paclobutrazol (PP333), confers increased SO₂ tolerance on snap bean plants. Envirom. and Exper. Bot., 23: 265-275.

- LEVY, A.; PALEVITCH, D.; MILO, J. and LAVIE, D. 1986. Effect of gibberellic acid on flowering and thebaine yield of different clones of Papaver bracteatum. Plant Growth Regul., 4: 153-157.
- LYNDON, R.F. e BATTEY, N.H. 1985. The growth of the shoot apical meristem during flower initiation. Biol. Plant., 27:339-349.
- MARC, J. e PALMER, J.H. 1982. Changes in mitotic activity and cell size in the apical meristem of Helianthus annuus L. during the transition to flowering. Am. J. Bot., 69: 768-775.
- MARTINES, G.J.L.; OHLROGGE, J.B. e RAPPAPORT, L. 1981. Differential compartmentation of gibberellin A₁ and its metabolites in vacuoles of Cowpea and Barley leaves. Plant physiol., 68: 865-867.
- MAUK, C.S.; UNRATH, C.R.; BLANKENSHIP, S.M. e LEHMAN, L.J. 1990. Influence of method of application of paclobutrazol on soil residues and growth retardation in a "starkrinson"- Delicious apple orchard. Plant Growth Regul., 9: 27-35.
- METZGER, I.D. 1987. Hormones and reproductive development. In: Plant Hormones and their role in plant growth and development. Martinus Nijhoff Publishers. p. 431-462.

- MILLER, M.B. e LYNDON, R.F. 1977. Changes in RNA levels in the shoot apex of Silene during the transition to flowering. Planta, 136: 167-172.
- MONTEIRO, W.R. e GIFFORD, E.M.JR. 1988.b Morphological aspects of the shoot apex of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni (Asteraceae) during transition to flowering. Rev. Bras. Bot., 11: 1-10.
- MONTEIRO, R.W. e GIFFORD, E.M.JR. 1988.a Histochemical aspects of the shoot apex of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni (Asteraceae) during transition to flowering. Rev. Bras. Bot., 11: 11-21.
- MURAKAMI, Y. 1968. A new rice seedling bioassay for gibberellins "Microdrop Method" and its use for testing extracts of rice and morning glory. Bot. Mag., 81: 33-43.
- NANDA, K.K.; KUMAR, S. e SOOD, V. 1976. Effect of gibberellic acid and some phenols on flowering of Impatiens balsamina, a qualitative short-day plant. Physiol Plant., 38: 53-56.
- OGAWA, Y. 1981. Stimulation of the flowering of Pharbitis nil chois. by gibberellic Ag: Time dependent action at the apex. Plant Cell Physiol., 22: 675-681.

- PATERSON, K.E. 1984. Shoot tip culture of Helianthus annuus- flowering and development of adventitious and multiple shoots. Am. J. Bot., 71: 925-931.
- PELEGRINI, B. 1985. O girassol, sua história e seu perfil. In: Girassol uma planta solar que das américas conquistou o mundo. Editora Cone. p. 9-27.
- PENEL, C.; GASPAR, T.H. e GREPPIN, H. 1985. Rapid inteorgan communications in higher plants with special reference to flowering Biol. Plan., 27: 334-338.
- PEREIRA, A.F.M. 1981. Regulation of seedling development in Phaseolus vulgaris L. by the cotyledons and primary leaves. Revta brasl. bot., 4: 39-42.
- PIERARD, D.; JACMARD, A.; BERNIER, G. e SALMON, J. 1980. Appearance and disappearance of proteins in the shoot apical meristem of Sinapis alba in transition to flowering. Planta, 150: 397-405.
- PIETERSE, A.H. 1978. Experimental control of flowering in Pistia stratiotes L. (short communication). Plant Cell Physiol., 19: 1091-1093.
- PIMENTEL, G.F. 1984. A estatística Moderna na Pesquisa Agropecuária. Assoc. Bras. Pesq. Potassa e do Fosfato. p. 160.

- RADEMACHER, W. e JUNG, J. 1981. Comparative potency of various synthetic plant growth retardants on the elongation of rice seedlings. Z. Acker - und Pflanzenbau (J. Agronomy/ Crop Sciences, 150: 363-371.
- REEVE, D.R. e CROZIER, A. 1978. The analysis of gibberellins by high performace liquid chromatography. In: Isolation of plant growth substances. HILLMAN, J.R., ed. Cambridge University Press. london. p. 41-47.
- ROOD. S.B.; MENDEL, R. e PHARIS, R.P. 1989. Endogenous gibberellins and shoot growth and development in Brassica napus. Plant Physiol., 89: 269-273.
- SAWHNEY, S. e SAWHNEY, N. 1976. Floral induction by gibberellic acid in Zinnia elegans facq under non-inductive long days. Planta, 131: 207-208.
- SAWHNEY, S.; SAWHNEY, N. e NANDA, K.K. 1978. Studies on transmission of floral effects of photoperiod and gibberellin from one branch to the other in Impatiens balsamina. Biol. Plant., 20: 344-350.
- SCHUCH, U.K.; FUCHIGAMI, L.H. e NAGAO, M.A. 1990. Gibberellic acid causes earlier flowering and synchronizes fruit ripening of coffee. Plant Growth Reg., 9: 59-64.

- SCHWABE, W.W. 1987. Hormone involvement in day length and vernalization control of reproductive development. In: HOAD, G.V; LENTON, JR., JACKSON, M.B. e ATKIN, R.K. Hormones Action in Plant Development. Appraisal Butterworth e co (Publissher) Ltda. pp 315.
- SEARLE, N.E. 1965. Physiology of flowering. Annu. Rev. Plant Physiol., 16: 97-118.
- SEIDLOVÁ, F. e KHATOON, S. 1976. Effects of indol-3Yl acetic acid on floral induction and apical differentiation in Chenopodium rubrum L. Ann. Bot., 40: 37-42.
- SEIDLOVÁ, F. e KREKULE, J. 1977. Effects of kinetin on growth of the apical meristem and floral differentiation in Chenopodium rubrum L. Ann. Bot., 41: 755-763.
- SHINOZAKI, M. 1985. Organ correlation in long day flowering of Pharbitis nil. Biol. Plant., 27: 382-385.
- SINGH, K. e NANDA, K.K. 1981. Effect of gibberellic acid on extension growth bud dormancy & flowering of juvenile seedlings of Callistemon viminalis L. Ind. J. Exp. Bot., 19: 661-663.

- SMITH, H. 1975. Introduction - definitions and scope. In: *Phytochrome and Photomorphogenesis (An introduction to the photocontrol of plant development)*. McGraw-Hill Book Company (VK). pp. 235.
- SNEDECOR, G.W. 1965. *Structural methods applied to experiments in agriculture and biology*. IOWA. The IOWA State College, pp. 534.
- SPONSEL, V.M. 1987. Gibberellin biosynthesis and metabolism. In: P.J. DAVIES (ed.), Plant hormone and their role in plant growth and development, Martinus Nyjhoff Publishers, pp. 43-71.
- SRINIVASAN, C. e MULLINS, M.G. 1978. Control of flowering in the Grapevine (Vitis vinifera L.). Formation of inflorescence in vitro by isolated tendrils. Plant Physiol., 61: 127-130.
- STEEVES, T.A.; HICKS, M.A.; NAYLOR, J.M. e RENNIE, P. 1969. Analytical studies on the shoot apex of Helianthus annuus. Can. J. Bot., 47: 1367-1375.
- STEFFENS, G.L. 1988. Gibberellin biosynthesis inhibitors: Comparing growth-Retarding effectiveness on apple. J. Plant Growth Regl., Z: 27-36.
- STERRETT, J.P. 1985. Paclobutrazol: A promising growth inhibitor for injection into woody plants. J. Am. Hort Sci., 1100: 4-8.

- SUNDERG, M.D. 1981. Apical events prior to floral evocation in Cyclamen persicum F-1 Rosemunde (Primulaceae): Bot. Gaz., 142: 27-35.
- UMEMOTO, T. 1971. Effect of chlorogenic acid on flower production in long-day duckweed, Lemna gibba G3. Plant Cell Physiol., 12: 165-169.
- VINCE-PRUE, D. 1975. Photoperiodis in Plant. London Publisehd by London, McGraw-Hill, p. 444.
- WATANABE, K.; TAKIMOTO, A.; IWAMURA, H. e FUJIA, T. 1983. Flower inducing activity of benzoic acid derivatives for Lemna minor. Plan Cell Physiol., 24: 889-897.
- WIBAUT-BESNARD, C. 1981. Effectiveness of gibberellins and 6-benzyladenine on flowering of Arabidopsis thaliana. Physiol Plant., 53: 205-212.
- WIBAUT-BESNARD, C.; NOIN, M. e COCHET, T. 1985. Apical reactions to gibberellic acid application according to the geotype in Silene armeria. Biol. Plant., 27: 360-366.
- WILKINSON, R.I. e RICHARDS, D. 1991. Influence of paclobutrazol on growth and flowering of Rhododendron Sir Robert Peel. Hortscience, 26: 282-284.

- WILLIAMS, E.A. e MORGAN, P.W. 1979. Floral initiation in Sorghum hastened by gibberellic acid and far-red light. Planta, 145: 269-272.
- ZAIDAN, P.B.L.; DIETRICH, C.M.S. e SCHWABE, W.W. 1991. Effects of temperature and photoperiod on flowering in Hyptis brevipes. Physiol Plant., 81: 221-226.
- ZEEVAART, J.A.D. 1982. Transmission of the floral stimulus from a long short-day plant Bryophyllum daigremontianum, to the short-long-day plant Echeveria harmsii. Ann. Bot., 49: 549-552.
- ZEEVAART, J.A.D. 1983. Gibberellins and flowering. In: CROZIER, A., ed., The biochemistry and physiology of gibberellins. New York Praeger CBS. pp. 333-374.
- ZEEVAART, J.A.D. 1984. Photoperiodic induction, the floral stimulus flower-promoting substances. In: VINCE-PRUE, D.; THOMAS, B. e COCKSHULL, K.E. (eds.), Light and flowering progress. Academic Press. pp. 137-142.
- ZUCKER, M.; NITSCH, C. e NITSCH, J.P. 1965. The induction of flowering in Nicotiana. II. Photoperiodic alteration of the chlorogenic acid concentration. Am. J. Bot., 52: 271-277.