

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

"ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NA FORMAÇÃO DE RAÍZES  
EM FOLHAS DESTACADAS DE *PERESKIA GRANDIFOLIA* HAW."

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para a obtenção do tí-  
tulo de Mestre em Ciências Biológi-  
cas na área de Biologia Vegetal.  
Realizada no Instituto de Botânica  
da Secretaria da Agricultura e  
Abastecimento de São Paulo.

Orientadora: Dra. Sonia M.C. Dietrich

Campinas

1983

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao Mauro

pela compreensão e carinho

Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich, pela sua orientação, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

À Dra. Walkyria Rossi Monteiro, do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, pela co-orientação de parte da tese.

Aos professores Drs. Ivany F.M. Válio, Ladaşlav Sodek e Maria de Fátima A. Pereira do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, pela revisão crítica do manuscrito.

À Dra. Ana Cristina de Franco Siqueira, pela análise estatística dos resultados.

Ao Instituto de Botânica, da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, por permitir o uso dos seus recursos técnico-científicos.

Ao Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Anatomia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas.

A todos os amigos da Seção de Fitoecologia que com muita amizade e cooperação contribuíram para a realização deste trabalho.

À Laiz Cwerner, pela gentileza da revisão linguística do texto.

À Jacinta de Fatima Prada Lourenço, pela dedicação à datilografia do texto.

## ABREVIATURAS

ABA - ácido abscísico

AIA - ácido indolil-3-acético

AIB - ácido indolil-3-butírico

AIL - ácido indolático

DMSO - dimetilsulfóxido

EtOH - álcool etílico

etrel - ácido 2-cloroetilfosfônico

GA<sub>3</sub> - ácido giberélico

K - cinetina

TIBA - ácido 2,3,5-triidobenzoico

Z - zeatina

## ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Enraizamento: aspectos gerais.....	1
2. Fatores envolvidos no enraizamento.....	4
2.1. Influência de fatores ambientais.....	4
2.1.1. Luz.....	4
2.1.2. Temperatura.....	7
2.1.3. Meio de enraizamento.....	7
2.2. Influência de substâncias endógenas e da aplicação de reguladores de crescimento....	8
2.2.1. Rizocalina.....	9
2.2.2. Substâncias reguladoras de <u>cresci</u> <u>mento</u> .....	11
A. Auxinas.....	11
B. Ácido giberélico.....	14
C. Citocininas.....	16
D. Ácido abscísico.....	18
E. Etileno.....	19
2.2.3. Co-fatores de enraizamento.....	21
2.2.4. Carboidratos.....	23

2.2.5. Peroxidase.....	24
2.2.6. Idade da planta.....	26
3. Aspectos morfogênéticos da formação de raízes <u>ad</u> <u>ventícias</u> .....	28
4. Enraizamento em <i>Pereskia grandifolia</i> .....	31
II. OBJETIVOS.....	34
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. Material vegetal.....	36
2. Métodos.....	36
2.1. Cultura das folhas.....	36
2.2. Iniciação de raízes.....	37
2.3. Análise de carboidratos.....	38
2.3.1. Extração dos açúcares solúveis em metanol: clorofórmio: água.....	39
2.3.2. Extração de polissacarídeos solúveis em água.....	41
2.3.3. Extração de polissacarídeos insolú veis em água (amido).....	41
2.3.4. Cromatografia e densitometria.....	42
2.4. Estudo da atividade de peroxidase (EC. 1.11.1.7) e suas isoenzimas durante o enraizamento.....	43
2.4.1. Preparação do pó-cetônico.....	43

2.4.2. Extração de peroxidase a partir do pó cetônico.....	45
2.4.3. Extração de peroxidase a partir de tecido fresco.....	46
2.4.4. Ensaio enzimático.....	47
2.4.5. Eletroforese.....	47
2.5. Análise estatística.....	49
IV. RESULTADOS.....	50
1. Enraizamento foliar.....	50
1.1. Efeito do escuro e do GA <sub>3</sub> .....	50
1.2. Iniciação de raízes.....	51
2. Análise de carboidratos presentes em lâminas e pecíolos de folhas durante o enraizamento.....	66
2.1. Açúcares livres redutores.....	66
2.1.1. Análise quantitativa.....	66
2.1.2. Análise qualitativa: Cromatografia e densitometria.....	70
2.2. Carboidrato total.....	73
2.3. Amido.....	74
3. Peroxidase.....	79
3.1. Atividade da peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas destacadas, durante o enraizamento.....	79

3.2. Padrão de isoenzimas de peroxidase em lâmi nas e pecíolos de folhas, durante o enraiza mento.....	84
3.3. Efeito do GA <sub>3</sub> na atividade da peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas nos primeiros três dias após o destacamento da plan ta-mãe.....	87
3.4. Efeito do GA <sub>3</sub> no padrão de isoenzimas de pe roxidase em lâminas e pecíolos de folhas nos três dias após o destacamento.....	88
3.5. Atividade de peroxidase em pecíolos de fo lhas destacadas, durante o enraizamento....	91
V. DISCUSSÃO.....	95
VI. RESUMO.....	112
VII. SUMMARY.....	115
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	118

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Enraizamento: aspectos gerais.

A propagação vegetativa de plantas superiores ocupa um papel fundamental na horticultura, tornando possível a obtenção de plantas geneticamente uniformes, descendentes de uma planta selecionada.

São vários os métodos utilizados em reprodução vegetativa, sendo o da propagação por estacas e folhas isoladas um dos mais antigos e importantes.

A capacidade de regenerar raízes varia grandemente com a espécie em questão, fato este que colaborou para que muitas pesquisas fossem desenvolvidas nesta área. Resultados destas pesquisas aparecem em várias revisões como LIBBERT (1956b), LIBBERT (1957, *in* GAUTHERET, 1969), CHAMPAGNAT (1961), DORE (1965), TORREY (1965) e HESS (1969).

Já em 1905, McCALLUM (*in* DORE, 1965) mostrou a facilidade que algumas plantas possuem em produzir raízes em estacas, quando estas são conservadas em condições favoráveis. A formação de raízes em estacas e folhas isoladas é um

dos processos mais importantes que leva ao desenvolvimento de uma nova planta a partir de um órgão injuriado, pois são as raízes que irão assegurar o suprimento de água e nutrientes, antes que ocorra a regeneração de gemas adventícias (FERNQVIST, 1966).

Além de sua importância na horticultura, a manipulação de partes isoladas de plantas mostra-se vantajosa em estudos fisiológicos nos quais a utilização da planta inteira se torna impraticável. Várias partes de plantas já foram usadas para esta finalidade, sendo que as folhas e cotilédones enraizados têm a vantagem de serem sistemas completos, apresentando uma fonte de produtos fotossintéticos e uma fase final de utilização dos materiais fixados (ZAIDAN, 1976). Além disso, o uso de folhas isoladas, nas quais existe a possibilidade de desenvolvimento de um sistema radicular independente, evita a mobilização de fatores nutricionais para outras partes da planta, tornando possível o controle da atividade metabólica da lâmina foliar (STUART, 1938).

São muitas as espécies vegetais cujas folhas enraizam logo após o destacamento da planta-mãe. Folhas de *Bryophyllum* e *Kalanchöe* possuem gemas pré-formadas na margem da lâmina, as quais dão origem a novas plantas; em *Begonia* folhas isoladas, quando colocadas sobre solo molhado e numa atmosfera úmida, formam gemas adventícias a partir de célu

las epidérmicas, regenerando novas plantas (ZAIDAN, 1976).

LINDEMUTH (1903, *in* GREGORY E SAMANTARAI, 1950) cita vinte e oito espécies, cujas folhas destacadas formam raízes dentro de um período de sete a vinte e quatro dias quando colocadas com os pecíolos inseridos em areia úmida. Este mesmo autor afirma ainda que folhas isoladas e enraizadas de *Citrus* e *Camelia* sobrevivem vários anos sem que haja formação de gemas.

O processo de enraizamento pode ser separado em três fases: desdiferenciação celular, iniciação do primórdio radicular e desenvolvimento deste primórdio. Quando a estaca ou folha é isolada da planta, o tecido vegetal sofre uma injúria. A partir daí, pode ocorrer desdiferenciação celular no órgão isolado e conseqüente iniciação do primórdio radicular. Entretanto, estas duas primeiras fases não estão obrigatoriamente relacionadas com a injúria causada pelo isolamento da estaca ou folha, pois o primórdio radicular pode se encontrar pré-formado nas plantas, permanecer dormente até que o isolamento da estaca ocorra e só então desenvolver-se (FERNQVIST, 1966).

No processo de iniciação e desenvolvimento de raízes, estão envolvidos muitas substâncias e fatores, sejam eles endógenos ou exógenos.

## 2. Fatores envolvidos no enraizamento.

### 2.1. Influência de fatores ambientais.

Fatores ambientais influenciam grandemente os processos fisiológicos em uma planta, ativando ou inibindo reações bioquímicas que aí ocorrem, por exemplo. Esses fatores também exercem influência sobre a desdiferenciação celular e, conseqüentemente, sobre a iniciação e o crescimento de raízes em estacas (NITSCH, 1963). Portanto, para efeito de propagação ou para estudos fisiológicos, as condições de cultura do material utilizado tornam-se bastante importantes.

Dos fatores ambientais que influenciam a iniciação de raízes - luz, temperatura, aeração e pH do meio e suprimento adequado de água - a luz parece desempenhar papel principal (HESS, 1969).

#### 2.1.1. Luz.

GREGORY E SAMANTARAI (1950) verificaram que o peso das raízes produzidas em folhas destacadas de *Phaseolus vulgaris* é proporcional à quantidade de luz recebida diariamente. De acordo com esses autores, o enraizamento destas folhas parece estar relacionado com a atividade fotossintética.

ca das mesmas.

A demonstração de que os assimilados podem se tornar fator limitante para o enraizamento foi feita por diversos pesquisadores que trabalharam com diferentes espécies (HOWARD E SYKES, 1966; MOORE E LOVELL, 1970; NANDA E ANAND, 1970; ALTMAN E WAREING, 1975; VEIERSKOV *et al.*, 1976). Mais recentemente, ELIASSON (1978) demonstrou que deficiência de produtos fotossintéticos, provocada em estacas provenientes de plântulas de *Pisum sativum* cultivadas no escuro ou em baixa irradiação, afetou negativamente a formação de raízes. A adição de açúcar substituiu parcialmente a luz, aumentando o número de raízes formadas em condições de baixa irradiação.

A presença de luz é, portanto, sem dúvida nenhuma, um fator importante no controle da formação de raízes (MOORE E LOVELL, 1970; 1972; ELIASSON, 1978; STRÖMQUIST E ELIASSON, 1979; ELIASSON E BRUNES, 1980). Uma demonstração nítida deste fato foi ainda feita por LOVELL *et al.* (1972; 1973), na qual uma inibição na formação de raízes por sacarose, observada na luz, transformou-se em promoção quando as estacas permaneciam no escuro.

O efeito da luz no enraizamento é, todavia, muito complexo. Nem todas as espécies respondem igualmente ao aumento de luz, devido ao fato de possuírem diferentes reservas de carboidratos e eficiência fotossintética. Embora

seja possível verificar uma correlação direta entre formação de raízes e quantidade e qualidade de luz recebida, o processo de formação do primórdio radicular ou o crescimento do primórdio já diferenciado podem ser inibidos pela luz. A iluminação direta na região onde estão se formando os primórdios pode inibir fortemente o processo (GALSTON, 1948; SHAPIRO, 1958; KAWASE, 1965; ELIASSON, 1978; ELIASSON, 1980 e HUSS-DANELL *et al.*, 1980).

A qualidade da luz também pode afetar o enraizamento. FLETCHER *et al.* (1965) verificaram que, em segmentos de plântulas de feijão, os comprimentos de onda referentes ao azul e vermelho longo são inibitórios, enquanto a luz vermelha é promotora.

WENT E THIMANN (1937) mostraram que, em *P. sativum* a iluminação de segmentos caulinares estiolados por diferentes comprimentos de onda inibiu a formação de raízes. Se os segmentos possuíam folhas, o mesmo processo era promovido pela luz. Deve-se, portanto, distinguir o efeito da luz mediado pelas folhas do efeito da iluminação nos tecidos que regeneram as raízes (MEVIUS, 1930 *in* FERNQVIST, 1966).

Outro caso de inibição por altos níveis de iluminação foi verificado por MOORE E LOVELL (1972) em cotilédones de *Sinapis alba*.

O papel da luz na rizogênese está em parte ligado à atividade fotossintética dos cotilédones, pois quan

do foi aplicado um inibidor de fotossíntese (DCMU), houve inibição de enraizamento, mesmo na luz, exatamente como ocorria com a remoção da lâmina cotiledonar (LOVEL *et al.*, 1972).

### 2.1.2. Temperatura

As diferentes espécies de plantas exigem um ótimo de temperatura diferente para o crescimento e isto pode ser importante para o enraizamento de segmentos caulinares ou folhas isoladas (KLOUGART *et al.*, 1964, *in* FERNQVIST, 1966). Geralmente, temperaturas entre 20 °C e 25 °C promovem o enraizamento, enquanto que 15 °C pode inibir consideravelmente o processo. GALSTON (1957) verificou que a resposta a reguladores de crescimento depende, em grande parte, das condições de temperatura às quais está sujeito o tecido vegetal.

### 2.1.3. Meio de Enraizamento

O substrato utilizado para enraizamento de estacas ou folhas também é importante, pois dele dependem a capacidade de retenção de água e a oxigenação (ZIMMERMANN E HITCHCOCK, 1929). O crescimento do primórdio é sensível não só à deficiência de oxigênio (EVANS, 1953; HARTMAN E KESTER,

1968), como também de água.

## 2.2. Influência de substâncias endógenas e da aplicação de reguladores de crescimento.

A maioria das investigações referentes à iniciação de raízes mostra que tanto fatores genéticos como fisiológicos governam este processo. Isto pode explicar as variações na capacidade de formar raízes, observadas entre espécies diferentes e até mesmo dentro da mesma espécie.

Reguladores de crescimento presentes naturalmente nas plantas podem afetar em maior ou menor grau a iniciação de raízes, dependendo da concentração endógena.

Em muitos estudos realizados com o objetivo de se verificar o efeito de reguladores no processo de iniciação de raízes, foi empregado o método da aplicação exôgena destes, tentando-se de certo modo, "imitar" uma condição fisiológica que poderia acontecer internamente nas plantas em determinadas situações. Desta forma, efeitos de substâncias como AIA, AIB,  $GA_3$ , K, ABA na formação de raízes, tornaram-se grandemente conhecidos.

### 2.2.1. Rizocalina

A procura de uma substância específica promotora de enraizamento teve início em 1929, quando Went observou que difusatos de folhas de *Acalypha* possuíam a capacidade de induzir a formação de raízes adventícias em estacas de *Acalypha* e *Carica* (WENT, 1929, in GIROUARD, 1969).

BOUILLENNE E WENT (1933) estudaram a formação de raízes em hipocótilos de *Impatiens* e formularam a hipótese da rizocalina. Rizocalina seria um hormônio específico promotor de raízes, não nutricional, produzido nas folhas por ação da luz, podendo ser estocado nos cotilédones. Este hormônio, termoestável e transportado basipetamente, apresentou-se, em experimentos posteriores, bastante semelhante à auxina e, em 1937, Went e Thimann afirmaram que um dos hormônios causadores da formação de raízes era idêntico à auxina.

A hipótese da rizocalina foi modificada várias vezes, sendo que as últimas modificações (BOUILLENNE E BOUILLENNE-WALRAND, 1947; BOUILLENNE, 1952, in GAUTHERET, 1969; BOUILLENNE, 1964) descrevem-na como sendo um complexo de três fatores, responsável pela organização dos meristemas radiculares: o primeiro, um fator móvel, altamente específico com grupos ortodifenólicos, sintetizado nas folhas expostas à luz; o segundo, uma auxina, fator móvel e não específico, presente na planta em concentrações fisiológicas; e o

terceiro, uma enzima oxidativa, localizada em células e tecidos específicos (floema, periciclo e câmbio).

LIBBERT (1956a) deu apoio parcial ao conceito de rizocalina, pois pode verificar que auxina mais um fator móvel "X" desempenham papel importante na iniciação de raízes. Entretanto, pôs em dúvida a hipótese de que as enzimas que reagem com rizocalina estejam presentes em apenas algumas células e tecidos. Esse autor postulou, então, que o fator "X" sintetizado nos ramos e gemas de plantas reagiria com auxina e o complexo formado induziria a formação de raízes adventícias. Um aumento na concentração de auxina seria seguido de mobilização do fator.

BASTIN (1966) verificou que, durante o processo de enraizamento, AIA poderia aumentar a síntese de compostos fenólicos, que são inibidores específicos da enzima AIA-oxidase.

Por outro lado, LIBBERT (1956b) extraiu de raízes de ervilha um fator inibidor de rizogênese. SKOOG E MILLER (1957) consideraram a possível intervenção de dois fatores (auxina e cinetina) de ações antagônicas. A formação de raízes e de gemas poderia ser regulada pela variação nas concentrações de auxina e cinetina (regulador de crescimento sintetizado principalmente nas raízes). Um excesso na proporção da primeira em relação à segunda estimularia a rizogênese, enquanto o oposto inibiria o processo.

Finalmente, LIBBERT (1967, *in* GAUTHERET, 1969) isolou um RNA com propriedades rizogênicas a partir de fragmentos de caule tratados com auxina. Este fato está de acordo com o conceito de SKOOG E MILLER (1957) e confirma a hipótese de BOUILLENNE (1964).

### 2.2.2. Substâncias reguladoras de crescimento

#### A. Auxinas

Já é bem conhecido o fato de que entre os reguladores de crescimento, o AIA, assim como outras auxinas sintéticas (AIB, ANA, etc.) desempenha importante papel na iniciação de raízes adventícias. WENT E THIMANN (1937) foram dos primeiros a verificar seu efeito promotor no processo de enraizamento, embora tenha sido também demonstrado que o AIA inibe o enraizamento em segmentos de hipocótilo de *Phaseolus aureus* (KRISHNAMOORTHY, 1970).

DAVIES E JOINER (1980) relataram o efeito promotor do AIB no aumento da atividade cambial, na formação da célula inicial da raiz e na diferenciação do primórdio radicular, em segmentos de *Ficus pumila* jovens e adultos. A concentração do AIB exigida por segmentos de plantas jovens foi bem inferior em comparação com os segmentos das adultas,

sugerindo que plantas jovens possuem níveis mais elevados de auxina endógena do que plantas adultas.

O efeito promotor do AIA está, às vezes, relacionado com outros fatores que são limitantes para a formação de raízes. Alguns desses fatores são de efeito nutricional, como por exemplo, carboidratos e substâncias nitrogenadas, enquanto que outros podem ser os co-fatores de crescimento, que atuam sinergisticamente com as auxinas (VAN OVERBEEK *et al.*, 1946; HESS, 1969).

Sabe-se que a capacidade de enraizar apresentada por estacas é determinada pelo balanceamento de fatores nutricionais e reguladores de crescimento e que o enraizamento não ocorre mesmo quando a concentração de um deles sozinho é muito alta (NANDA *et al.*, 1971).

O AIA pode afetar a formação de raízes, agindo ou diretamente nas células das quais o primórdio se inicia (HAISSIG, 1979), ou indiretamente, por seu envolvimento no metabolismo total, causando um movimento direcional de nutrientes (ALTMAN E WAREING, 1975). Essas observações sugerem que o aumento do AIA endógeno na base de uma estaca ou o tratamento com auxina exógena poderia afetar imediatamente o acúmulo de outros fatores que são necessários para a formação de raízes.

A importância das folhas na iniciação de raízes foi verificada por vários autores (LOEB, 1917, WENT,

1929, *in* GIROUARD, 1969; VAN OVERBEEK E GREGORY, 1945; ALTMAN E WAREING, 1975). O papel das gemas na indução de enraizamento pode variar com a época do ano em que as estacas são feitas (HESS, 1969). LEK (1924, 1934, *in* HESS, 1969) verificou que gemas em crescimento ativo promovem o enraizamento, enquanto que gemas dormentes o inibem. O efeito promotor das gemas pode ser devido a um aumento no suprimento de auxina durante períodos de não-dormência (BOUILLENNE E WENT, 1933). A retirada de gemas presentes em estacas de ervilha inibiu a formação de raízes nesse sistema (ERIKSEN, 1973).

Mais recentemente, WIGHTMAN E THIMANN (1980) verificaram que a remoção total do epicôtilo e a total ou parcial dos cotilédones resultou em diferentes graus de inibição de indução de primórdios de raízes laterais e uma inibição mais rigorosa da emergência destas raízes laterais em *P. sativum*. Esses autores sugeriram, pelos seus resultados, que auxinas da parte aérea da planta podem ser responsáveis pela indução de raízes laterais. O possível acúmulo dessas auxinas na porção mais apical de raízes cujos ápices foram removidos, poderia ser responsável pelo grande número de raízes laterais que emergem nesse local (TORREY, 1950; WIGHTMAN E THIMANN, 1980).

Trabalhando com plântulas de *P. vulgaris*, ALTMAN E WAREING (1975) verificaram que a expressão do efeito promotor do AIA na indução de raízes mostra-se dependente da

área foliar e é sempre melhor quando todas as folhas estão presentes. No período após a excisão, açúcares se acumulam lentamente na base das estacas. A aplicação exógena de AIA no hipocótilo intensifica este fenômeno, segundo os autores, pela formação de um sítio de acúmulo de metabólitos na base da estaca.

Concentrações supraótimas de auxina podem apresentar efeito deletério, chegando inclusive a matar o tecido cortical (HESS, 1969; WIGHTMAN *et al.*, 1980). Tal efeito parece ser devido à formação de etileno (THIMANN, 1977).

Um fato também freqüentemente observado em experimentos de enraizamento é a inibição de alongamento da raiz em resposta à presença de auxina (WIGHTMAN *et al.*, 1980).

## B. Ácido giberélico

Os resultados encontrados na Literatura, que dizem respeito ao efeito do GA<sub>3</sub> na iniciação de raízes, mostram que este pode ser em alguns casos inibitórios ou sem efeito (BRIAN *et al.*, 1955; BRIAN *et al.*, 1960; BÖTTGER, 1974; COLEMAN E GREYSON, 1976; GOODWIN E MORRIS, 1979; WIGHTMAN *et al.*, 1980) e, em outros, promotor (NANDA *et al.*, 1967; 1972; ANAND *et al.*, 1972; VARGA E HUMPHRIES, 1974; SMITH E THORPE, 1975b; HANSEN, 1976; COLEMAN E GREYSON, 1977a).

COLEMAN E GREYSON (1976) verificaram que o tratamento com auxina diminui a inibição causada pelo  $GA_3$  em estacas foliares de *Lycopersicon esculentum* e levantaram a hipótese de que o  $GA_3$  inibe inicialmente a síntese local de amido. Isto poderia bloquear a formação e o desenvolvimento inicial dos primórdios radiculares por meio da diminuição da concentração de carboidratos, que seriam utilizados para produzir energia metabólica e síntese rápida de parede celular por via dos açúcares fosforilados. COLEMAN E GREYSON (1977a) confirmaram tal hipótese.

ANAND *et al.* (1972), VARGA E HUMPHRIES (1974) e COLEMAN E GREYSON (1977a) atribuíram a promoção de enraizamento por  $GA_3$  a um aumento na síntese de auxina. Os experimentos indicam que esta promoção por  $GA_3$  pode estar relacionada com precursores específicos de AIA como triptofano, triptamina e AIL.

VARGA E HUMPHRIES (1974) demonstraram aumento significativo no enraizamento de estacas de *P. vulgaris*, quando o  $GA_3$  foi aplicado à lâmina foliar, em presença de triptofano. Este resultado foi atribuído a um aumento na biossíntese de AIA na lâmina foliar. Desta forma, o  $GA_3$  parece facilitar a utilização do triptofano em direção à síntese de auxina. Foi interessante notar que a aplicação de TIBA na porção mais superior do pecíolo suprimiu o efeito estimulador do  $GA_3$ , presumivelmente porque este composto inibe o

transporte de AIA através do pecíolo, resultando na inibição do enraizamento.

WIGHTMAN *et al.* (1980), trabalhando com raízes primárias de plântulas de ervilha, obtiveram evidências de uma pequena inibição no número de primórdios radiculares laterais em alguns tratamentos com  $GA_3$ , muito embora não tenha sido encontrada uma relação dose-resposta. Esses resultados mostraram que o efeito inibitório do  $GA_3$  na formação de raízes laterais em *P. sativum* não é específico.

### C. Citocininas

Outro grupo de reguladores de crescimento de grande interesse em estudos de iniciação de raízes é o das citocininas.

MILLER (1961) afirmou que cinetina promove iniciação de raízes apenas sob determinadas condições. Contudo, em concentrações elevadas, não só o processo de iniciação é inibido como também o próprio crescimento da raiz.

Como estas substâncias retardam a degradação de proteínas em folhas isoladas (RICHMOND E LANG, 1957) e estimulam a síntese de RNA e proteína (OSBORNE, 1962), a quantidade de triptofano disponível para a síntese de auxinas é menor. A razão auxina/citocinina no tecido sofre, com isto, uma alteração, provocando a formação de calos na base do pecíolo e inibição da diferenciação de raízes.

O efeito das citocininas na formação de raízes laterais já foi estudado em raízes isoladas de ervilha por TORREY (1962) e BÖTTGER (1974). Torrey demonstrou que baixas concentrações de sulfato de adenina ou cinetina, na presença de auxina, promovem levemente a indução de raízes, enquanto que concentrações elevadas inibem o processo.

Mais recentemente, WIGHTMAN *et al.* (1980), trabalhando com raízes de plântulas de ervilha, verificaram que zeatina, cinetina e seus ribosídeos causaram uma inibição marcante tanto na iniciação de primórdios como na emergência de raízes laterais. No entanto, baixas concentrações destas citocininas promoveram a formação de primórdios radiculares. Esses autores compararam os resultados de seus experimentos, nos quais as raízes presumivelmente estariam recebendo auxina das partes aéreas da plântula, com os de TORREY (1962), em que segmentos basais de raízes de ervilha foram cultivados em presença de AIA e citocininas. Quando as citocininas foram aplicadas em concentrações elevadas, ocorreu inibição de formação de raízes laterais, enquanto que em baixas concentrações, houve indução de raízes laterais. Tal interação entre auxina e baixas concentrações de citocininas foi também encontrada em "estacas" foliares de *Begonia* (HEIDE, 1965).

#### D. Ácido abscísico

O efeito do ácido abscísico (ABA) no que se refere ao processo de enraizamento já foi descrito como sendo: 1) estimulador da produção de raízes adventícias em hipocótilos de *P. aureus* e *Hedera helix* (CHIN *et al.*, 1969) e em estacas de *Phaseolus coccineus* (HARTUNG *et al.*, 1980); 2) levemente inibitório no enraizamento de folhas de *Begonia* (HEIDE, 1968); e 3) sem efeito aparente no número de raízes que se formam em discos de folhas de *L. esculentum* (COLEMAN E GREYSON, 1977b).

Inibição na formação de primórdios de raízes laterais tratadas com ABA também foi descrita por BÖTTGER (1974), que trabalhou com raízes isoladas de ervilha. No entanto, quando as raízes estão ligadas às plântulas, o tecido está sujeito à ação de reguladores de crescimento (auxinas, por exemplo) que, vindo dos outros tecidos, modificam a resposta ao ABA.

O efeito promotor na formação de raízes adventícias, encontrado por HARTUNG *et al.* (1980), pode ter ocorrido, segundo os autores, pelo menos em parte, devido ao acúmulo de compostos assimilados, especialmente sacarose, transportados basipetamente a partir das folhas primárias até as partes inferiores dos segmentos tratados com ABA. Os autores comentam ainda que a promoção de enraizamento por ABA pode ser explicada pela observação de que este composto

é capaz de promover a divisão celular (ALTMAN E GOREN, 1971; MINOCHA, 1979).

#### E. Etileno

Nos últimos anos, o papel do etileno no crescimento e desenvolvimento de plantas tem sido explorado com muita expectativa. A maioria dos estudos focalizaram caules ou outros órgãos aéreos e pouco foi feito para elucidar a influência do etileno nas raízes, exceto mostrar que este gás é, geralmente, inibidor do seu crescimento (CHADWICK E BURG, 1967; ANDREAE *et al.*, 1968). O etileno é produzido nas raízes (BURG, 1962), além de em outros órgãos vegetais, e por muitos organismos inferiores que vivem no solo (RADIN E LOOMIS, 1969). Portanto, de acordo com estes autores, é muito provável que as raízes sejam continuamente afetadas por etileno. Etileno aplicado em raízes isoladas de *Raphanus sativus* inibiu alongamento, iniciação de raízes laterais e atividade cambial. No entanto, esses dois primeiros processos foram estimulados quando as raízes tratadas com etileno receberam também 1% de CO<sub>2</sub>, mostrando uma interação entre estes dois gases (RADIN E LOOMIS, 1969).

O efeito positivo do etileno na formação de raízes e transporte de auxinas foi mostrado por PRATT E GOESCHL (1969). Este efeito positivo foi também verificado indiretamente por KRISHNAMOORTHY (1970). Segundo este autor,

AIA, GA<sub>3</sub>, K e TIBA inibem a formação de raízes em hipocótilos de feijão mungo. O efeito inibitório de GA<sub>3</sub> e K deixou de existir quando essas substâncias foram combinadas com etrel, composto que libera etileno quando em contato com células vegetais (YANG, 1969).

A produção de etileno é ainda estimulada pela presença de auxina (ABELES, 1966). BATTEN e MULLINS (1978) determinaram respostas de enraizamento e produção de etileno por segmentos de hipocótilo de feijão mungo estiolados, tratados com ANA e AIB. Entretanto, não foi encontrada uma relação entre a capacidade das auxinas de induzir formação de raízes e sua capacidade de induzir a produção de etileno. De acordo com os autores acima, o etileno não parece estar diretamente envolvido na produção de raízes adventícias nesta planta e, concentrações altas, não fisiológicas deste gás, são necessárias para causar um efeito positivo na formação de raízes em feijão mungo. Concluíram ainda que, neste sistema utilizado, o efeito das auxinas no enraizamento não é resultado da sua capacidade de produzir etileno.

Produção de etileno também foi detectada em discos de folhas de tomateiro (COLEMAN *et al.*, 1980). Neste sistema, a produção de etileno foi relacionada positivamente com o aumento da concentração de AIA mas não com o enraizamento. Resultados semelhantes foram obtidos por BATTEN E MULLINS (1978). COLEMAN *et al.* (1980) observaram que o etilel

no não é o responsável pela resposta de enraizamento causada pelas auxinas, como havia sido proposto por ZIMMERMAN E HITCHCOCK (1933, *in* COLEMAN *et al.*, 1980) e sugeriram que o etileno não é inibidor de enraizamento em discos de folha de tomateiro. Com base nas suas observações, sugerem ainda que a iniciação de raízes exige um nível crítico de auxina e que pequenas quantidades de etileno determinam um leve efeito inibidor. Qualquer elevação na quantidade de etileno, mesmo em presença de auxina, torna-se progressivamente inibitória ao processo de formação de raízes. Tais resultados dão suporte à hipótese de MULLINS (1972) propondo que a formação de raízes induzida por auxina se contrapõe aos efeitos inibitórios do etileno produzido através da indução por auxina.

### 2.2.3. Co-fatores de enraizamento.

A impossibilidade de se conseguir provocar enraizamento em algumas espécies, mesmo quando diferentes tratamentos com substâncias reguladoras de crescimento eram efetuados, estimulou a continuação de pesquisas visando encontrar outras substâncias naturais, promotoras de enraizamento.

HESS (1964) comparou extratos alcoólicos obtidos de tecidos provenientes de estacas difíceis de enraizar e fáceis de enraizar, encontrando quatro substâncias que

estimulavam a formação de raízes em estacas de *P. aureus*. Essas quatro substâncias se encontravam em maior concentração em estacas fáceis de enraizar e reagiam sinergisticamente com o AIA. Por este efeito sinérgico, foram denominadas co-fatores de enraizamento.

Um desses co-fatores, encontrados em *Hedera helix*, é o ácido isoclorogênico. Outros compostos fenólicos foram ensaiados e o que parece ter atividade específica mais elevada é o catecol. Os requisitos estruturais para atividade biológica máxima parecem ser uma relação *orto* dos grupos hidroxila e uma posição *para* livre (HESS, 1969). O requisito *orto*-diidroxil é semelhante ao mostrado por ZENK E MULLER (1963) para proteção do AIA contra o sistema de oxidação dessa auxina.

Hess (1969) observa ainda que o modo de ação de compostos fenólicos na estimulação da iniciação de raízes é, pelo menos em parte, através da proteção do AIA. Na verdade, quando se aplica catecol juntamente com AIA, este último é encontrado livre no tecido vegetal por um período de tempo maior. O segundo co-fator extraído por HESS (1969) parece ser uma mistura de terpenóides oxigenados e o terceiro apresenta comportamento cromatográfico semelhante ao da substância encontrada por KAWASE (1964) em centrifugados de estacas de *Salix alba*.

#### 2.2.4 Carboidratos

Como já foi mencionado anteriormente, o enraizamento de vários sistemas vegetais está relacionado com a atividade fotossintética e, por conseguinte, com os produtos da fotossíntese. COLEMAN E GREYSON (1977b) verificaram que a regeneração de raízes em discos de folhas de *L. esculentum* depende totalmente da aplicação exógena de carboidratos. Quatro carboidratos ensaiados (sacarose, maltose, glicose e glicose + frutose) proporcionaram regeneração de raízes.

Também já foi mencionado o efeito positivo de produtos fotossintéticos na formação de raízes em estacas de *P. sativum* (ELIASSON, 1978). No entanto, existe ainda a questão do efeito detrimental de níveis supraótimos de carboidratos no enraizamento. Este efeito foi observado em estacas de *P. sativum* (ELIASSON, 1978) e em cotilédones isolados de *R. sativus* (MOORE *et al.*, 1972).

Muitos pesquisadores têm investigado o efeito de carboidratos em diversos órgãos de diferentes espécies vegetais. BACHELARD E STOWE (1962) demonstraram, com segmentos apicais de *Eucalyptus camaldulensis*, que sacarose estimula a formação de raízes sob luz contínua e LEROUX (1973), trabalhando com *P. sativum*, descobriu que a glicose promove a formação de raízes em segmentos caulinares crescidos "in

vitro", no escuro. Em hipocótilos de *P. vulgaris*, foi mostrado por FERNQVIST (1966) que a formação de raízes é promovida por vários açúcares. Em segmentos caulinares de *Crysanthemum*, STOLTZ (1968) encontrou uma correlação positiva entre o conteúdo total de carboidratos e a capacidade de enraizar. Além disto, NANDA *et al.* (1971, 1973b) demonstraram, com segmentos caulinares de *Populus nigra*, que o enraizamento é dependente de um suprimento adequado de glicose. Foi também mostrado que auxina interage com glicose na formação de raízes. Este regulador de crescimento promove ou inibe a iniciação de raízes dependendo da concentração de glicose no meio.

Outro parâmetro importante é a razão carboidrato/nitrogênio (C/N). KRAUS E KRAYBILL (1918, *in* VEIERSKOV *et al.*, 1976) observaram que o número de raízes em segmentos de caule de tomateiro aumenta quando a razão C/N é elevada, enquanto que o inverso promove o crescimento da raiz.

#### 2.2.5. Peroxidase

Muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de mostrar a relação entre enzimas e enraizamento. Dentre as enzimas, as peroxidases ocupam um lugar de destaque, e seu papel no crescimento e diferenciação celular tem sido estudado por vários autores (GALSTON E DALBERG, 1954; SIEGEL E GALSTON, 1967; NANDA *et al.*, 1973; BHATTACHARYA E KUMAR,

1980).

Como se sabe, as peroxidases existentes em plantas possuem formas moleculares múltiplas (isoenzimas), as quais variam em concentração ou atividade de acordo com a espécie, tecido, estágio de desenvolvimento da planta, infecções patogênicas e aplicação de substâncias de crescimento (SHANNON, 1968). O efeito sobre substâncias de crescimento é de especial interesse, pois sabe-se que as peroxidases catalisam a oxidação do AIA, sugerindo assim um importante papel desta enzima na regulação do crescimento da planta (LEE, 1972).

Padrões eletroforeticamente distintos de isoperoxidases foram observados em vários órgãos de ervilha (OCKERSE *et al.*, 1966; SIEGEL E GALSTON, 1967) tabaco (GALSTON *et al.*, 1968) e em medula de *Pelargonium* (LAVEE E GALSTON, 1968), mostrando que auxina pode promover ou inibir a atividade ou síntese "de novo" de isoenzimas específicas (LAVEE E GALSTON, 1968). Alterações no padrão de isoperoxidases são também obtidas com a aplicação de  $GA_3$  em variedades anãs de ervilha e milho (BIRECKA E GALSTON, 1970; McCUNE, 1961; McCUNE E GALSTON, 1959) e de cinetina em culturas de calos de tabaco (LEE, 1971).

MOLNAR E LaCROIX (1972a), estudando a formação de raízes em estacas de *Hydrangea macrophylla*, verificaram que ocorria um aumento de peroxidase nos tecidos do floe

ma e xilema (próximo ao ponto onde tem início a formação dos primórdios radiculares), antes mesmo de haver qualquer alteração anatômica. Foi sugerido que a peroxidase tem um papel importante na diferenciação celular, particularmente do tecido vascular. Aumento da atividade peroxidásica foi também observado em segmentos de plântulas de *P. aureus*, coincidindo com o desenvolvimento das raízes nesse tecido (BATTACHARYA E KUMAR, 1980).

A relação entre isoenzimas de peroxidases e enraizamento foi estudada por CHANDRA *et al.* (1973), em hipocótilo de *P. aureus*. Nesse sistema, estreptomicina (CHANDRA *et al.*, 1971) e benziladenina (CHANDRA *et al.*, 1973) inibem a formação de primórdios radiculares, suprimindo a diferenciação de células do parênquima floemático e a formação de novas isoperoxidases. Esses resultados sugerem que alterações de isoperoxidases específicas caracterizam a diferenciação de células do parênquima floemático e a formação de primórdios radiculares.

#### 2.2.6. Idade da planta

A capacidade de responder ao tratamento com auxina diminui com a idade da planta (THIMANN, 1977). Este mesmo autor afirma que, numa planta difícil de enraizar, como é o caso de *Pinus strobus*, estacas retiradas de plantas

com dois anos de idade enraizam muito bem, enquanto que se estas são retiradas de plantas com dez anos, a formação de raízes é praticamente inexistente, sob o mesmo tratamento com auxina.

DAVIES E JOINER (1980) observaram que estacas retiradas de plantas adultas de *Ficus pumila* não enraizam tão eficientemente quanto estacas de plantas jovens. A concentração de AIB exigida pelas estacas adultas é bem maior do que no caso das jovens. É possível que as primeiras possuam um nível endógeno de auxina (ou outros compostos necessários para estimular a iniciação de raízes) bem mais baixo do que as últimas.

Outro aspecto interessante com relação à idade da planta refere-se ao sistema de oxidação da auxina. GALSTON E DALBERG (1954), mostraram que, em plântulas de ervilha, a capacidade das células de raízes e caules para destruir o AIA aumenta à medida em que a célula envelhece. Este aumento na atividade do sistema AIA-OXIDASE pode ser a causa da diminuição da sensibilidade de células mais velhas à auxina, podendo, na verdade, constituir um mecanismo bioquímico de "envelhecimento".

### 3. Aspectos morfogenéticos da formação de raízes adventícias.

Nos vários sistemas em que a formação de raízes adventícias foi estudada no seu aspecto anatômico, os autores têm mostrado uma tendência de subdividir o fenômeno em diferentes estágios, já que o processo parece ser altamente organizado. GORTER (1968) sugeriu que a iniciação do primórdio radicular se dá através dos seguintes estágios: 1) desdiferenciação de uma célula normal diferenciada (esta desdiferenciação se manifesta através de um certo isolamento de uma célula do tecido ao qual ela pertence). Durante sua diferenciação, essas células tornam-se grandes e altamente vacuoladas. Seu tamanho, portanto, deve subseqüentemente ser reduzido e o conteúdo de citoplasma, aumentado. A redução do tamanho da célula será obtida pelas divisões celulares, sendo que as células filhas continuam a se dividir, sem aumentar de tamanho; 2) determinação, que pode ser considerada como dois processos: a) arranjo das células em um meristema organizado, e b) determinação da formação de um primórdio radicular, em oposição a um primórdio de gema; e 3) crescimento desse primórdio.

Na realidade, um dos aspectos mais fascinantes da formação de raízes adventícias é que células originalmente não determinadas para formar raízes - por exemplo, células

lulas do parênquima de pecíolos - se tornam meristemáticas novamente (processo chamado de desdiferenciação). A partir deste estado meristemático, elas se diferenciam em células de raízes (OPPENORTH, 1980). Como todas as células derivam-se do zigoto, todas possuem a informação genética necessária para formar uma nova planta. Isto tem sido mostrado com frequência desde os experimentos com células de floema secundário de *Daucus carota* (STEWART *et al.*, 1964).

TORREY (1966) sugeriu, sem citar evidências experimentais, que uma única célula é ativada, passando por uma série de divisões para formar um tecido meristemático, também denominado por este autor de meristemóide. Isto foi confirmado por SMITH E THORPE (1975a), em hipocótilos de *Pinus radiata*.

A iniciação de raízes geralmente ocorre próxima aos tecidos vasculares do órgão onde se forma a raiz (ESAU, 1965; HARTMAN E KESTER, 1968). O ponto de origem de uma células inicial de raiz varia entre as espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie (WILCOX, 1955). Esta célula inicial pode aparecer na região do floema (SATO, 1955, *in* SMITH E THORPE, 1975a), na zona cambial (SMITH, 1936), no parênquima interfascicular ou em um raio vascular (ESAU, 1965).

Em alguns casos, um grupo de células e não apenas uma célula inicial começa a se dividir, dando origem ao meristema (GREGORY E SAMANTARAI, 1950). Esses autores ve-

rificaram que, em pecíolos de folhas primárias de *P. vulgaris*, células do parênquima próximas ao floema e células dos raios medulares aumentam de tamanho e iniciam divisões no terceiro dia após o destacamento da folha, formando regiões meristemáticas no córtex interno. No quarto dia, o floema prolifera e pequenos feixes adventícios são formados nos raios medulares. A organização do primórdio radicular por grupos de células dos raios medulares ocorre rapidamente. No sexto dia, raízes são vistas crescendo através do tecido cortical desorganizado.

O fato das divisões celulares estarem associadas com células adjacentes ao floema sugere que açúcares e compostos nitrogenados solúveis são necessários à iniciação, sendo estes presumivelmente difundidos através dos elementos de tubos crivados. Foi verificado ainda que seções transversais do pecíolo apresentam primórdios em todos os estágios de desenvolvimento, isto é, desde grupos não coordenados de células meristemáticas até raízes totalmente emergidas. De acordo com os autores, competição por nutrientes deve, portanto, ocorrer entre os primórdios formados.

MOLNAR E LaCROIX (1972b) demonstraram, em segmentos caulinares de *Hydrangea macrophylla*, que as raízes adventícias também se originam a partir de um grupo de células. Estas células meristemáticas situam-se entre os feixes vasculares, externamente ao câmbio interfascicular, apresentando

núcleos grandes e citoplasma denso. Aparentemente, nessa planta, as células iniciais de raízes se formam durante o desenvolvimento do caule, estando, portanto, presentes já no momento em que os segmentos são isolados. Células iniciais de raiz, pré-formadas, permanecem dormentes até que os caules sejam cortados e colocados sob condições favoráveis para o desenvolvimento posterior do primórdio radicular (CARPENTER, 1961).

#### 4. Enraizamento em *Pereskia grandifolia*

A formação de raízes adventícias ocorre espontaneamente em estacas caulinares de *P. grandifolia*, sem que seja necessária a aplicação de qualquer promotor de enraizamento (BRITTON E ROSE, 1963, in ZAIDAN, 1976).

Folhas destacadas desta mesma planta também enraizam facilmente sendo que o processo independe do tratamento fotoperiódico e da aplicação de substâncias auxínicas (ZAIDAN, 1976). Entretanto, a maior porcentagem de enraizamento é obtida em fotoperíodo de dezesseis horas.

Interrupção da nervura central próximo ao pecíolo diminui o enraizamento (ZAIDAN E VALIO, 1977), provavelmente porque substâncias sintetizadas na lâmina foliar não podem ser translocadas para o pecíolo, onde seriam utilizadas na formação de raízes (WELLS E RIOPEL, 1972).

Com relação à idade da folha, ZAIDAN (1976) observou que folhas muito jovens apresentam porcentagem de enraizamento bem mais baixa do que folhas maiores, mais desenvolvidas, e que AIA aumenta sensivelmente o número de raízes formadas em cada folha, não aumentando, entretanto, a porcentagem de folhas enraizadas. Esta autora conclui que provavelmente folhas destacadas possuem conteúdo endógeno ótimo de promotores de enraizamento e que a aplicação de substâncias auxínicas aumenta apenas o número de raízes formadas por folhas. Foi verificado ainda que não há formação de gemas na base do pecíolo, embora as folhas enraizadas sobrevivam por muitos meses em cultura (ZAIDAN, comunicação pessoal).

Durante o processo de enraizamento dessas folhas, ocorrem alterações nos conteúdos de carboidratos e proteína presentes nas folhas (ZAIDAN E VALIO, 1977). Estes autores demonstraram ainda a presença, nessas folhas, de um promotor de enraizamento de estacas de plântulas de *P. vulgaris*. Testes cromogênicos indicaram que tal substância é um composto fenólico.

Plantas de *P. grandifolia* crescidas em condições naturais entram em senescência durante os meses de inverno, vindo a perder todas as suas folhas. Experimentos preliminares mostraram que, no período que antecede o inverno, já não é mais possível observar o enraizamento foliar.

Testes preliminares da atividade peroxidásica feitos em pecíolos de folhas recém-coletadas, em diferentes épocas do ano, mostraram que há uma pequena variação na atividade desta enzima; e que, quando a atividade inicial é mais baixa, há uma porcentagem maior de enraizamento das folhas e vice-versa.

Dadas as peculiaridades conhecidas a respeito desta planta, considerou-se relevante a continuação da pesquisa sobre a formação de raízes em suas folhas isoladas.

## II. OBJETIVOS

O emprego de cultura de folhas enraizadas em estudos de fisiologia, tanto do metabolismo como do desenvolvimento, tem sido de grande vantagem, sendo este um sistema vegetal, que contém uma fonte de produtos fotossintéticos e uma fase final de utilização dos materiais fixados.

Focalizando o período de iniciação e desenvolvimento dos primórdios radiculares em pecíolos de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar alterações quantitativas e qualitativas nos carboidratos presentes em pecíolos e lâminas foliares;
2. Determinar alterações na atividade de peroxidases, bem como variações no padrão de isoenzimas de peroxidases em pecíolos e lâminas foliares;
3. Determinar anatomicamente: a) como, b) em que células do pecíolos, c) em que fase após o destacamento da folha ocorre o aparecimento do primórdio radicular e d) com base nos conhecimentos acima, verificar como se dá o desenvolvimento dos primórdios formados;

4. Comparar o comportamento das folhas quanto aos aspectos 1, 2 e 3, em condições que promovem (luz) e que inibem (escuro e  $GA_3$  na luz) o seu enraizamento, a fim de se conhecer alguns dos processos relacionados com a formação de raízes.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Material Vegetal

Em todos os experimentos realizados, foram utilizadas folhas retiradas de plantas da espécie *Pereskia grandifolia* Haward, existentes no Instituto de Botânica da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

#### 2. Métodos

##### 2.1. Cultura das folhas

Folhas de *P. grandifolia* foram coletadas pouco antes do início do experimento, trazidas para o laboratório em bandejas contendo água e lavadas superficialmente em água corrente. Em seguida, foram plantadas em caixas de plástico transparente contendo vermiculite umedecida com água destilada e tampadas com vidro para evitar ressecamento.

Os experimentos foram realizados em ambiente com temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ , irradiância de  $1.200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ,

fornecida por lâmpadas fluorescentes e incandescentes, e em fotoperíodo diário de 16 horas. Quando parte das folhas foi submetida ao tratamento de escuro, estas foram levadas para uma câmara escura, mantida a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ , logo após a lavagem.

## 2.2. Iniciação de raízes

Em folhas de *Pereskia grandifolia*, as raízes começam a apontar externamente na base do pecíolo, entre nove e treze dias após o destacamento da planta-mãe. Foi realizado um experimento com o objetivo de se verificar a partir de qual tipo de células e quando tem início a formação do primórdio radicular. Também se quis detectar, a nível histológico, a inibição de iniciação de raízes causada pelos tratamentos de escuro e de  $\text{GA}_3$ , na luz.

Para isto, folhas foram coletadas e lavadas como descrito acima e, em seguida, divididas em três grupos, cujas folhas permaneceram durante vinte e quatro horas nas seguintes condições: 1) folhas com os pecíolos imersos em água destilada, na luz; 2) folhas com pecíolos imersos em água destilada, no escuro; 3) folhas com pecíolos imersos em solução aquosa de  $\text{GA}_3$  (10 mg/l), na luz. Decorrido este período, os pecíolos foram lavados em água destilada, sendo as folhas, então, plantadas da maneira descrita no item 2.1. As bandejas contendo as folhas foram mantidas em condições de

luz (fotoperíodo diário de dezesseis horas) ou de escuro, de acordo com o tratamento recebido nas primeiras vinte e quatro horas após seu destacamento.

Pecíolos de folhas recém-coletadas e de folhas com 1, 3, 5, 7, 10, 12 e 15 dias de cultura nesses tratamentos foram coletados e fixados em FAA 50 (50 ml de etanol 95%, 5 ml de ácido acético glacial, 10 ml de formol e 35 ml de água destilada) por vinte e quatro horas. Em seguida, foram desidratados, utilizando-se o método do álcool butílico terciário, e embebidos em parafina (JOHANSEN, 1940). Os pecíolos foram seccionados com 12  $\mu$ m de espessura e corados. A coloração foi feita com safranina e verde-firme, além de ácido tânico e cloreto férrico, de acordo com FOSTER (1934), modificado por GIFFORD (1966, *in* CLARK, 1973). As fotomicrografias foram tiradas em fotomicroscópio de marca Zeiss, com câmara adaptável C 35.

### 2.3. Análise de carboidratos

Folhas de *P. grandifolia* foram coletadas e lavadas da maneira usual, recebendo em seguida os três tratamentos descritos no item 2.2. (luz, escuro e GA<sub>3</sub>, na luz). Amostras de pecíolos e lâminas foliares foram retiradas de folhas recém-coletadas e de folhas com 1, 2, 3, 7, 10 e 14 dias de cultura, a fim de se proceder à análise de carboidra

tos, de acordo com a metodologia descrita por SHANNON (1968). No caso de folhas mantidas no escuro, a obtenção de amostras foi possível somente até o décimo dia, devido à não sobrevivência das folhas nessas condições, após este período.

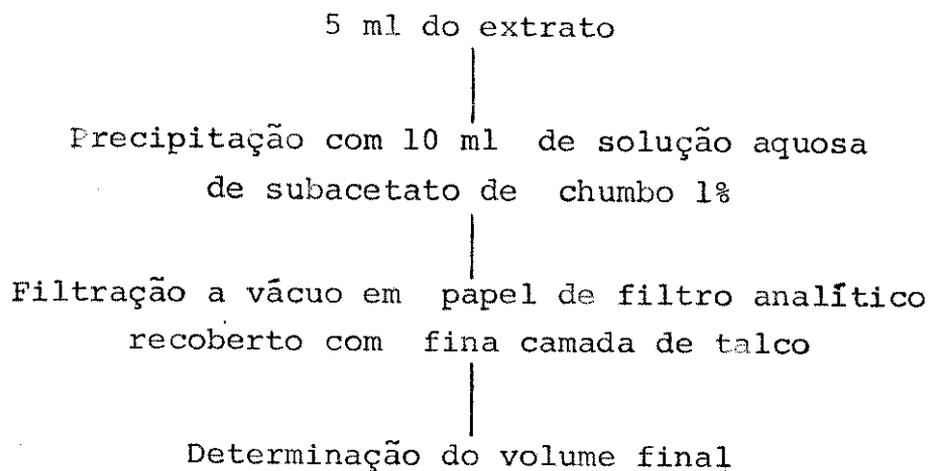
Para determinação de peso seco, amostras de lâminas e de pecíolos foram também retiradas nestes mesmos dias, pesadas e, em seguida, levadas para uma câmara de temperatura constante "Stabiltherm", da Blue M. Electric Co., onde foram mantidas por vinte e quatro horas a 80 °C. Após este período foram transferidas para um dessecador até resfriamento, pesadas em balança analítica, e colocadas novamente na câmara, a 80 °C. Este procedimento foi repetido até que as amostras apresentassem peso constante.

#### 2.3.1. Extração dos açúcares solúveis em metanol: clorofórmio: água

Amostras com 10 g de peso fresco de lâminas foliares e 4 g de peso fresco de pecíolos foram homogeneizadas, respectivamente, em 20 ml e 8 ml de solução metanol: clorofórmio: água (13:4:3 v/v), por 4 minutos, em homogeneizador Vir-Tis, modelo 45, utilizando-se a velocidade média do aparelho, a 4 °C. A seguir, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos, a 1.000 g, a 5 °C. Os sobrenadantes de cada re-extração foram juntados e evaporados em evapo

rador rotatório, a vácuo, até a obtenção de uma fração aquosa.

Os extratos assim obtidos apresentaram cor escura, devido à presença de pigmentos. Desta forma, alíquotas foram tomadas de cada extrato e submetidas ao seguinte processo de clarificação (YELENOVSKY E GUY, 1977):



O conteúdo de açúcares redutores, nestes extratos e nos extratos não clarificados, foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945), enquanto que o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) foi empregado na dosagem de carboidratos totais. Em ambos os métodos, a glicose foi utilizada como padrão.

O conteúdo de carboidratos detectado após a clarificação foi menor do que nos extratos não clarificados, embora nenhuma alteração nas proporções entre os diferentes açúcares tenha sido verificada. Desta foram, os resultados apresentados são relativos aos extratos clarificados.

### 2.3.2. Extração de polissacarídeos solúveis em água

Os resíduos das extrações com metanol: clorofórmio: água foram suspensos em 30 ml de EtOH 10% - no caso de lâminas - e em 12 ml - no caso de pecíolos - e mantidos a 5 °C durante 16 horas. A seguir, foram centrifugados a 1.000 xg, a 5 °C por 10 minutos, e os sobrenadantes, separados. Os resíduos foram lavados quatro vezes com EtOH 10% e os sobrenadantes de cada reextração juntados, medindo-se o volume final.

Os extratos obtidos nesta fração tiveram seu conteúdo de carboidratos totais quantificados através do método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

### 2.3.3. Extração de polissacarídeos insolúveis em água (amido)

Aos resíduos das extrações com EtOH 10% feitos a partir das lâminas e pecíolos, adicionaram-se, respectivamente, 30 ml e 12 ml de DMSO 95%, sendo as misturas mantidas a 70 °C por um período de duas horas, sob agitação contínua. Em seguida, estas foram centrifugadas a 1.000 xg, por 10 minutos, a uma temperatura de aproximadamente 10 °C. Os resíduos da centrifugação foram reextraídos duas vezes com

DMSO 95%, os sobrenadantes das reextrações juntados e o volume final medido.

O conteúdo de carboidratos presente nos extratos em DMSO foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), usando-se a glicose como padrão. Como a formação de cada ligação glicosídica libera uma molécula de água, o peso do amido é aproximadamente 10% menor do que o número equivalente de moléculas de glicose. Segundo SHANNON (1968), uma correção média de 0,88 foi determinada experimentalmente, usando-se soluções-padrão de amido e glicose. Esta correção foi usada nos dados de determinação de amido.

#### 2.3.4. Cromatografia e Densitometria

Os extratos obtidos nesta primeira fração foram submetidos à cromatografia descendente em papel Whatman nº 1, utilizando-se o seguinte sistema de solventes: acetato de etila: ácido acético: piridina: água (60:15:15:10, v/v), por 40 horas, à temperatura ambiente (JARVIS E DUNCAN, 1974). Outro sistema testado foi butanol: piridina: água (6:4:3, v/v), porém, melhor separação dos compostos foi obtida quando se utilizou o primeiro sistema de solventes.

Após secagem, os cromatogramas foram revelados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em acetona alcalina (TRE-

VELYAN *et al.*, 1950), utilizando-se ao invés de hidróxido de amônio 6 N, uma solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5%, para retirar o excesso de óxido de prata. Em seguida, os cromatogramas foram fotografados e as manchas analisadas em densitômetro de marca "EEL", com registro manual.

#### 2.4. Estudo da atividade de peroxidase (EC. 1.11.1.7) e suas isoenzimas durante o enraizamento.

Folhas de *P. grandifolia* foram coletadas e lavadas da maneira usual, recebendo os mesmos três tratamentos descritos no item 2.2. (luz, escuro e GA<sub>3</sub>, na luz).

##### 2.4.1. Preparação do pó-cetônico

Amostras de lâminas (20 g) e de pecíolos (5 g) de folhas recém-coletadas e de folhas com 1, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultura foram submetidas à preparação do pó-cetônico, segundo a técnica de OELSHLEGEL E STAHMANN (1973), que resumidamente consta do seguinte:

Para cada 1 g (peso fresco) de tecido, adição de 6 ml de acetona gelada ( $-20^{\circ}\text{C}$ , sob gelo seco)

Banho em acetona por 2 h,  
a  $-20^{\circ}\text{C}$  com três trocas

Homogeneização em Vir-Tis utilizando  
a última troca, a  $-20^{\circ}\text{C}$

Repouso por 30 min., a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  
agitando ocasionalmente

Filtração a vácuo, lavando duas vezes  
com acetona gelada

Secagem em dessecador por várias horas,  
sob vácuo

Estocagem no frio ( $4^{\circ}\text{C}$  até a utilização)

As outras folhas foram sendo coletadas das caixas de cultura em dias sucessivos ao plantio, a fim de serem submetidas à mesma técnica.

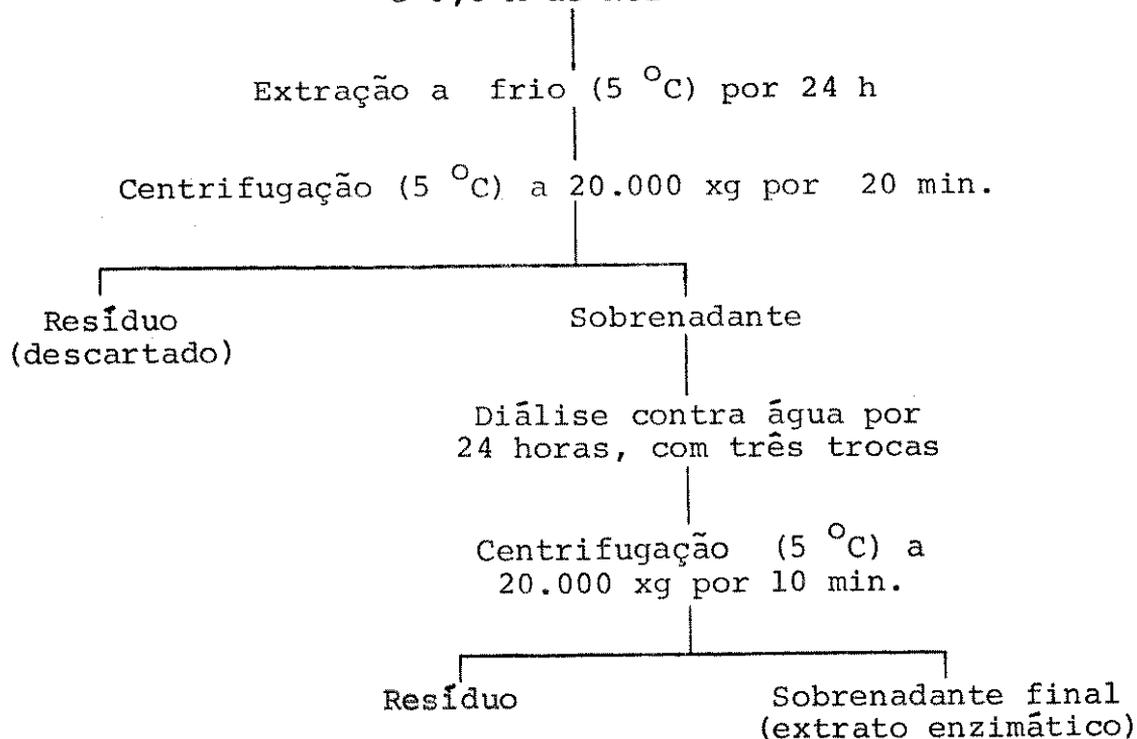
Segundo LOOMIS E BATTAILE (1966), material vegetal é especialmente difícil de ser manipulado, pois quando o tecido é macerado, libera compostos fenólicos que podem oxidar-se e reagir com proteínas. Isto pode causar alterações subsequentes no padrão de separação destas proteínas por eletroforese

(OELSHLEGEL E STAHMANN, 1973). Pós-cetônicos são muito convenientes para extração de proteínas. São estáveis e produzem um padrão de bandas similar ao que se obtém com extratos de tecido fresco, e ainda sem as inconveniências que os últimos podem trazer.

#### 2.4.2. Extração de peroxidase a partir do pó cetônico

Quando todos os pós-cetônicos haviam sido obtidos, procedeu-se à extração enzimática da seguinte maneira:

0,2 g de pó-cetônico + 3,0 ml tampão fosfato de sódio, 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,05 M de ácido ascórbico e 0,8 M de KCl



### 2.4.3. Extração de peroxidase a partir de tecido fresco

Nos casos em que material vegetal fresco foi utilizado, ao invés de pó-cetônico, a extração foi feita a partir de pecíolo, imediatamente após a coleta das folhas em cultura, utilizando-se o procedimento descrito por LEE (1971), modificado.

500 mg de pecíolo + 4 ml de tampão fosfato de sódio  
0,1 M, pH 7,0 contendo 0,05 M de ácido ascórbico e  
0,8 M de KCl

Maceração em almofariz pré-resfriado, a 5 °C

Centrifugação (5 °C) a 20.000 xg por 15 min.

Resíduo

Sobrenadante I

Reextração em 4 ml de tampão

Centrifugação (5 °C) a 20.000 xg  
por 15 min.

Resíduo

Sobrenadante II

+  
Sobrenadante I

Diálise por 24 h contra água  
destilada com três trocas

Centrifugação (5 °C) por 15 min.

Resíduo

Sobrenadante final  
(extrato enzimático)

#### 2.4.4. Ensaio enzimático

Os extratos obtidos através de ambas as formas foram sempre utilizados imediatamente após a última centrifugação, para fins de determinação da atividade da peroxidase nos tecidos estudados, segundo o método de LEE (1972), modificado. Em cada tubo foi adicionada uma mistura de incubação feita com soluções recém-preparadas de guaiaicol 50 mM (1,0 ml), peróxido de hidrogênio 20 mM (1,0 ml), tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,0 (1,0 ml), uma alíquota do extrato enzimático e água destilada até volume final de 4 ml. Os tubos com esta mistura foram colocados em banho-maria, a 37 °C e a atividade da enzima determinada pelo aumento da densidade óptica da mistura em espectrofotômetro, a 470 nm, em períodos sucessivos de 0 a 2 minutos, durante os quais a reação apresentou uma resposta linear. Os resultados foram expressos em atividade específica da enzima em  $\Delta D.O. 470 \text{ nm} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \text{ min.}^{-1}$ . O conteúdo de proteína solúvel foi determinado, em cada extrato, pelo reagente de Folin-fenol, de acordo com LOWRY *et al.* (1951), usando-se albumina de soro bovino como padrão.

#### 2.4.5. Eletroforese

Os extratos obtidos a partir da extração dos

pós-cetônicos, além de serem ensaiados para atividade da peroxidase, foram também submetidos à eletroforese. As isoenzimas de peroxidase foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, preparado de acordo com a metodologia descrita por Davis (1964), com cada tubo possuindo 9 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno. As alíquotas foram misturadas com sacarose até atingir concentração de 10% e, em seguida, misturadas com 1  $\mu$ l de azul de bromofenol a 0,001%, sendo então colocadas sobre a superfície do gel. A separação foi obtida através da passagem de uma corrente elétrica de 2 mA por tubo, por dez minutos, ou até que o gel superior (de poros grandes) houvesse sido percorrido pelo extrato. Logo em seguida foi aplicada uma corrente de 3 mA por tubo, até que o azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior de cada gel (mais ou menos duas horas de corrida). A temperatura do tampão em contato com as colunas de gel foi conservada próximo de 4 °C durante a eletroforese, por meio de circulação de água fria dentro de um compartimento envolto da câmara de eletroforese.

A separação de isoenzimas das amostras de lâminas e pecíolos foi feita separadamente, devido à limitação no número de tubos existente no aparelho de eletroforese. Desta forma, os resultados são apresentados em quadros separados. Na medida do possível, as condições de corrida foram mantidas constantes para lâminas e pecíolos. A única diferen

ça foi que, no caso de pecíolos, aplicaram-se amostras contendo aproximadamente 400 µg de proteína, enquanto que as amostras dos extratos de lâminas continham aproximadamente 300 µg de proteína.

Terminada a eletroforese, os géis foram retirados dos tubos e colocados imediatamente em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, contendo 52 mM de guaiacol e 20 mM de peróxido de hidrogênio, para que as bandas de isoenzimas pudessem ser visualizadas. Nestas condições eletroforéticas, as isoenzimas de peroxidase de lâminas e pecíolos de folhas de *P. grandifolia* revelaram-se aniônicas.

## 2.5. Análise Estatística

O esquema de análise de variância utilizado foi o fatorial (com 2 repetições), segundo PIMENTEL GOMES (1976). Nos casos em que o teste F mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos a 5%, determinou-se a DMS (diferença mínima significativa) a 5% pelo teste Tuckey. Para melhor visualização dos resultados, as respostas estatísticas foram expressas nas tabelas onde as médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Enraizamento foliar.

##### 1.1. Efeito do escuro e do GA<sub>3</sub>

Quando folhas de *P. grandifolia* são submetidas ao tratamento com GA<sub>3</sub> (10 mg/l) durante as primeiras 24 horas após o seu destacamento, a formação de raízes é totalmente inibida. Do mesmo modo, folhas não tratadas, mantidas no escuro após o destacamento, têm o enraizamento inibido, enquanto que se estas são mantidas na luz, a formação de raízes ocorre naturalmente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Efeito do escuro e do GA<sub>3</sub> no enraizamento de folhas destacadas de *P. grandifolia*.

Tratamento	% enraizamento*
Luz - H <sub>2</sub> O	90
Escuro - H <sub>2</sub> O	0
Luz - GA <sub>3</sub> (10 mg/l)	0

\*Resultados obtidos 16 dias após o início do experimento

## 1.2. Iniciação de raízes

Nos pecíolos de folhas de *P. grandifolia*, o tecido vascular encontra-se arranjado em forma de crescente (Figura 1A). Este cilindro vascular é cercado externamente por células do parênquima cortical. Em pecíolos de folhas recém-coletadas, não se observa proliferação celular no córtex. O parênquima cortical do pecíolo é discernível em parênquima cortical externo e interno. Nesse último, as células apresentam paredes relativamente espessadas, forma arredondada, são menores e, em conjunto lembram um parênquima colenquimatoso. Algumas células dos parênquimas medular e radial são portadoras de núcleos grandes. Não se observam, no entanto, evidências de divisão celular nestes tecidos (Figuras 1A e B).

Três dias após o destacamento da folha, observam-se as primeiras divisões celulares no pecíolo. Estas ocorrem nas células do parênquima cortical interno (Figura 2), sendo, principalmente periclinais (aumentando o diâmetro do pecíolo), e transversais. Neste estágio, pode-se notar claramente, ainda em secções longitudinais, que, na base do pecíolo, o parênquima cortical apresenta uma camada de células dividindo-se transversalmente (Figura 3). Começam a aparecer, nesse estágio, agrupamentos de células em divisão a partir das quais novas células irão sendo produzidas (Figura

ra 4).

Após cinco dias em condições de cultivo, a situação de proliferação celular nos pecíolos está bem avançada ao redor do tecido vascular (Figura 5). Imediatamente na base do pecíolo, observa-se, em secções longitudinais, que a camada de células em divisão transversal apresenta-se nitidamente formada (Figura 6). Toda esta proliferação celular dá origem a um tecido com aparência de calo, onde se vêem divisões transversais e periclinais. Este calo forma-se abaixo do tecido vascular (Figuras 6 e 7) e possui intensa atividade meristemática, com a presença de diversos agrupamentos de células em divisão (Figura 7). Estes agrupamentos originam-se da seguinte maneira: três ou mais células afastam-se um pouco, deixando um espaço intercelular relativamente grande; após tal processo, as células dividem-se ao redor deste centro. O xilema velho torna-se parcialmente obstruído e novas células de xilema são produzidas através da atividade cambial que favorece mais o xilema do que o floema (Figura 8).

As alterações vão ocorrendo de tal forma que, em sete dias, já é nítida a presença do calo logo abaixo do cilindro vascular (Figura 9), bem como da camada de células em divisão transversal.

Secções transversais feitas na altura do calo mostram a intensa atividade proliferativa deste tecido,

com a presença de agrupamentos de células em divisão, divisões essas que ocorrem em diversos sentidos, desordenadamente, além de início de diferenciação celular, representada aqui pela presença de elementos traqueais (Figura 10). Divisões celulares continuam ocorrendo no parênquima cortical (Figura 11). Nesta última figura, podem-se observar novas células do xilema, xilema velho parcialmente obstruído, além de divisões celulares no parênquima radial.

Com dez dias em cultura, o calo na base do pecíolo já está bem formado (Figuras 12 e 13), apresentando diferenciação de um grande número de elementos traqueais (Figura 13). Tanto no parênquima cortical como no calo, as divisões celulares em geral não são particularmente orientadas (Figuras 13 e 14). Verificam-se ainda divisões celulares nos parênquimas radial e medular (Figura 15).

Até dez dias após o destacamento das folhas, as alterações histológicas que ocorrem nos pecíolos que receberam os três tratamentos diferentes (luz, escuro e  $GA_3$  na luz) são muito semelhantes. Portanto, as figuras mostradas até o décimo dia, referem-se a secções de pecíolos-contrôle, mantidos na luz. Com relação ao tratamento de escuro, não foi possível a obtenção de pecíolos após o sétimo dia, devido à não sobrevivência das folhas nessas condições, por períodos prolongados. As diferenças observadas entre os dois tratamentos restantes (luz, com e sem  $GA_3$ ) são registradas a

partir do décimo segundo dia.

Doze dias após o destacamento, os pecíolos de folhas-controle, mantidas na luz, mostram o aparecimento de primórdios de raízes, representados aqui por ápices meristemáticos radiculares. Estes podem ser vistos em cortes transversais na região do calo (Figuras 16 e 17) ou em cortes longitudinais (Figuras 18 e 19). As células dos parênquimas cortical, floemático, xilemático, medular e radial se diferenciam, tornam-se meristemáticas, formando um calo logo abaixo do tecido vascular, i.e., na base do pecíolo. É, portanto, nesta massa de células (calo) que tem início a organização de um grupo de células, as quais, sendo meristemáticas (são pequenas e com citoplasma denso, isto é, pouco vacuolado), formam o ápice do primórdio radicular.

Convém salientar que as modificações observadas iniciam-se na região proximal (base) do pecíolo, progredindo para a região distal, com o passar dos dias, durante o experimento.

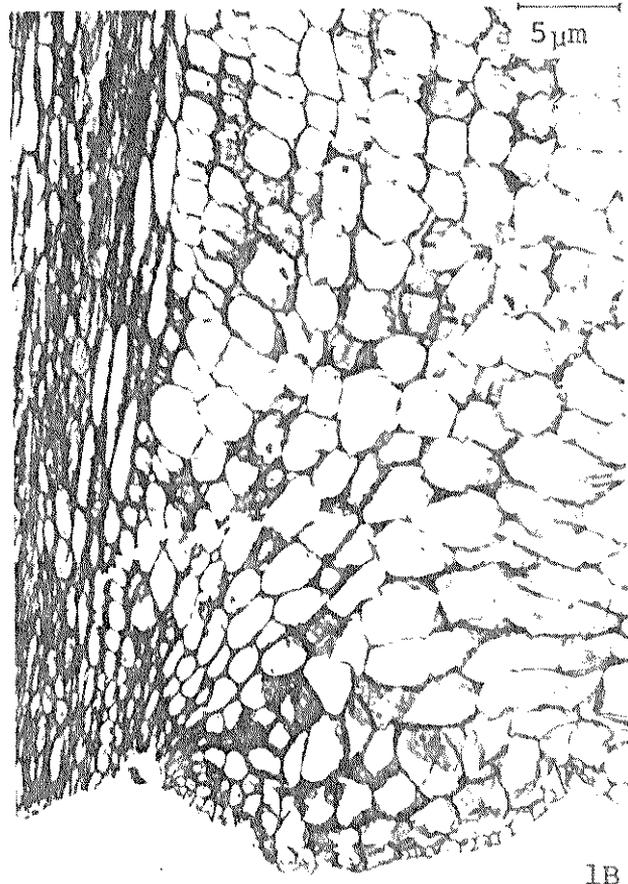
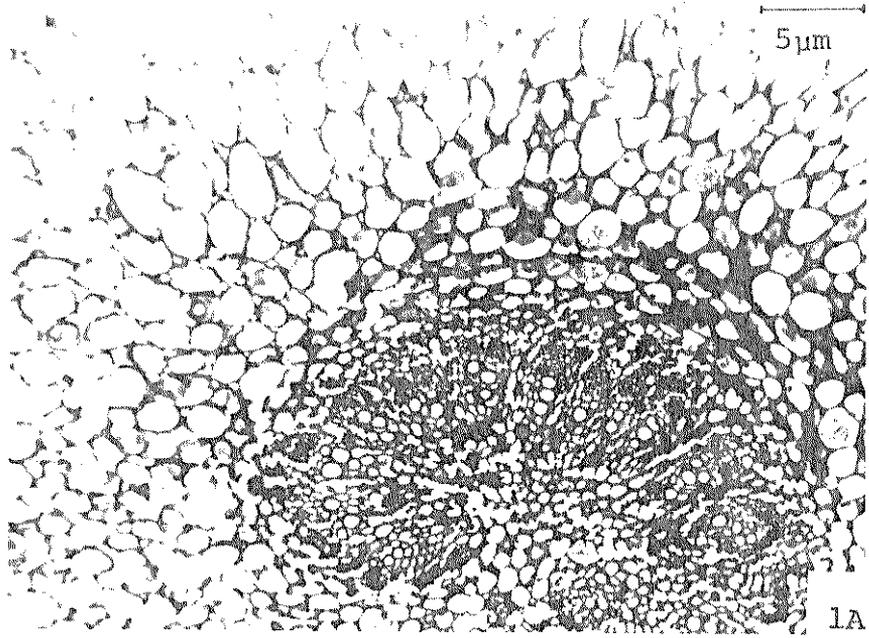
Em todos os casos estudados observou-se que a organização do primórdio radicular, no pecíolo, tem início na região externa ao cilindro vascular central e em posição inferior a este, isto é, na base do pecíolo, onde o calo foi formado (Figuras 16, 18 e 19). Próximo ao sítio de organização do primórdio, células diferenciam-se em elementos do tecido vascular (Figuras 17 e 19) que farão a conexão do siste

ma vascular da futura raiz com o do pecíolo.

Os pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$  apresentam comportamento diferente do controle, visto que não há organização do ápice de primórdio radicular no calo formado abaixo do cilindro vascular central. Nesse calo são vistos agrupamentos de células em divisão (Figuras 20 e 21) e, longitudinalmente, a camada de células dividindo-se transversalmente (Figura 22), assim como a diferenciação de elementos traqueais.

O desenvolvimento do primórdio vai ocorrendo gradualmente em pecíolos de folhas-controle, mantidas na luz como mostram as Figuras 23 a 28. A conexão do tecido vascular do primórdio com o tecido vascular do pecíolo é mostrada na Figura 24. O número de raízes formadas em cada pecíolo é variável, tendo sido encontrado, neste experimento, o número máximo de cinco raízes. Na Figura 26, cuja fotografia foi tirada de uma secção transversal feita na altura do calo, observa-se a presença de três primórdios radiculares, sendo dois mais recentes do que o terceiro. Em uma secção feita mais acima no pecíolo, observou-se um ápice meristemático de primórdio radicular, bem como traços de três primórdios, cujos ápices, tendo se desenvolvido, já se encontravam em altura inferior do pecíolo (Figura 27). Em secções transversais deste mesmo pecíolo, em uma altura onde o tecido vascular aparece organizado (aproximadamente 2,5 mm da base), po

FIGURA 1. Secções transversal (A) e longitudinal (B) de pecíolos de folhas recém-coletadas de *Pereskia grandifolia*, onde não se observam divisões celulares.



Figuras 2 a 4. Aspectos de pecíolos de folhas-controle de *Pereskia grandifolia*, na luz, 3 dias após o destacamento, mostrando células em divisão no parênquima cortical interno.

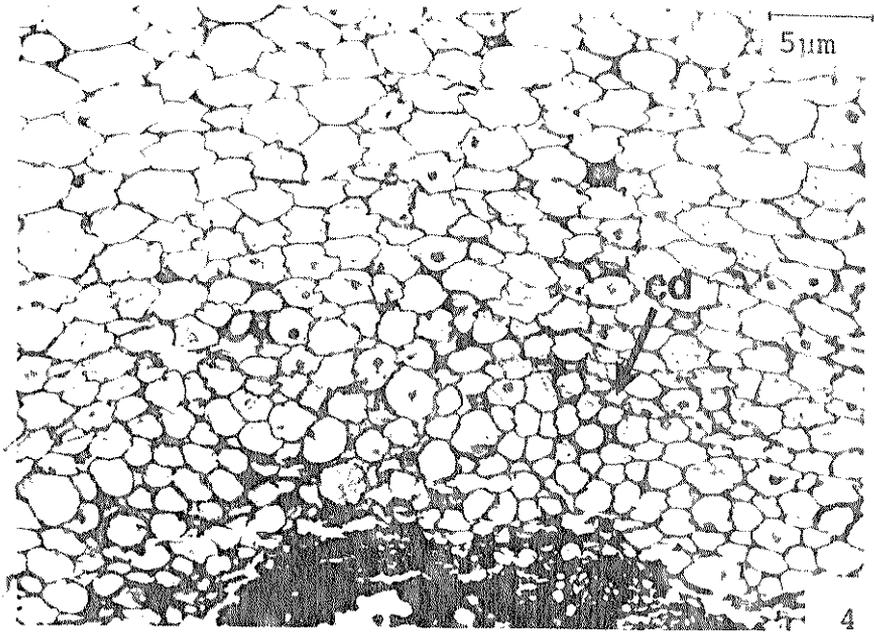
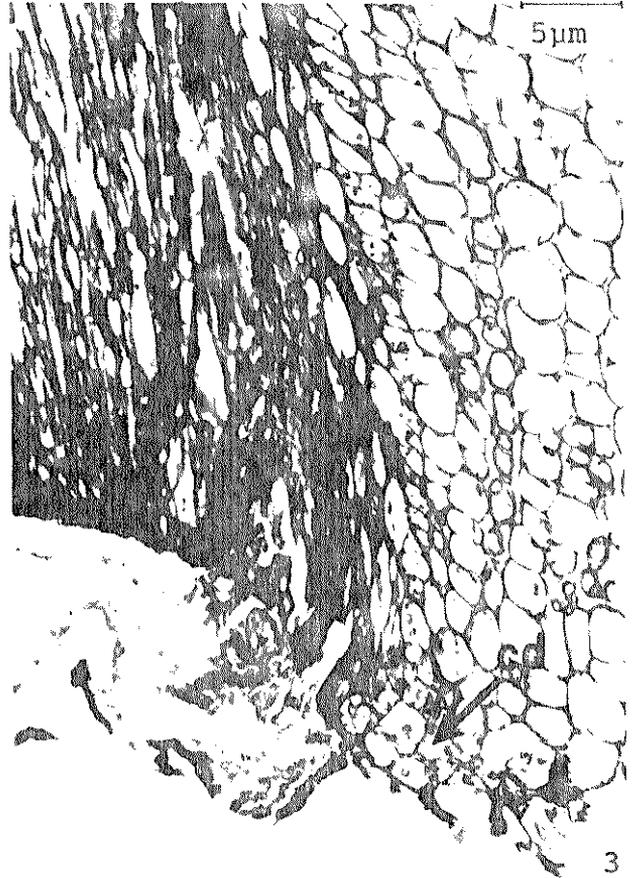
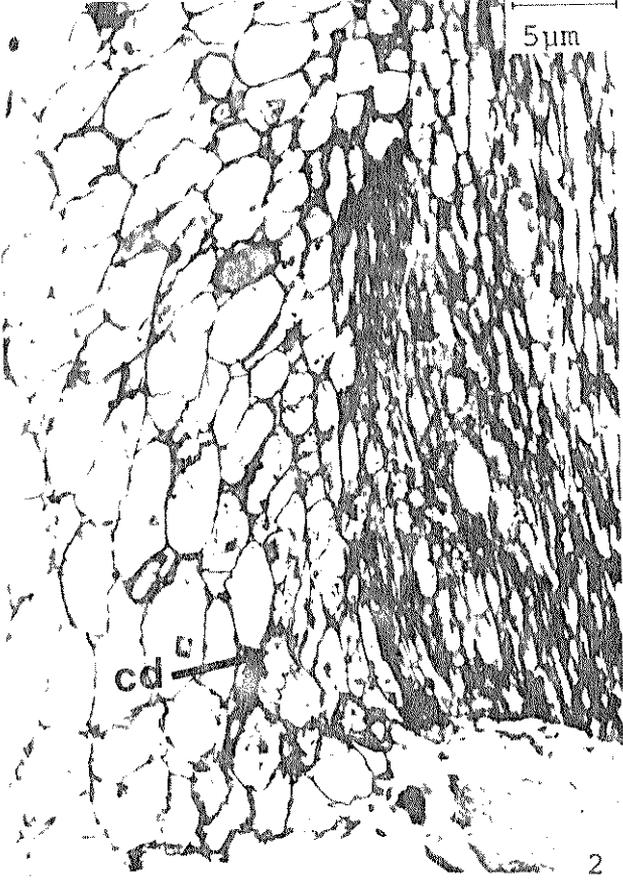
Fig.2. Secção longitudinal. Divisões celulares no parênquima cortical interno.

Fig.3. Secção longitudinal. Camada de células dividindo-se transversalmente na base do pecíolo.

Fig.4. Secção transversal. Início da formação de agrupamentos de células em divisão.

cd - célula em divisão.

a - agrupamento de células em divisão.



Figuras 5 a 8. Aspectos de pecíolos de folhas-controle de *Pereskia grandifolia*, na luz, 5 dias após o destacamento, mostrando proliferação celular intensa nos tecidos.

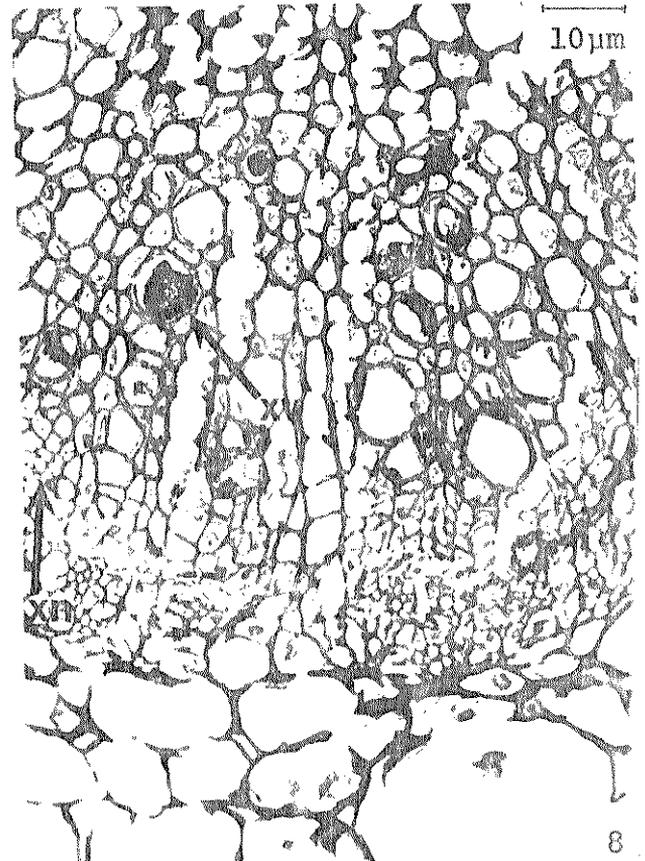
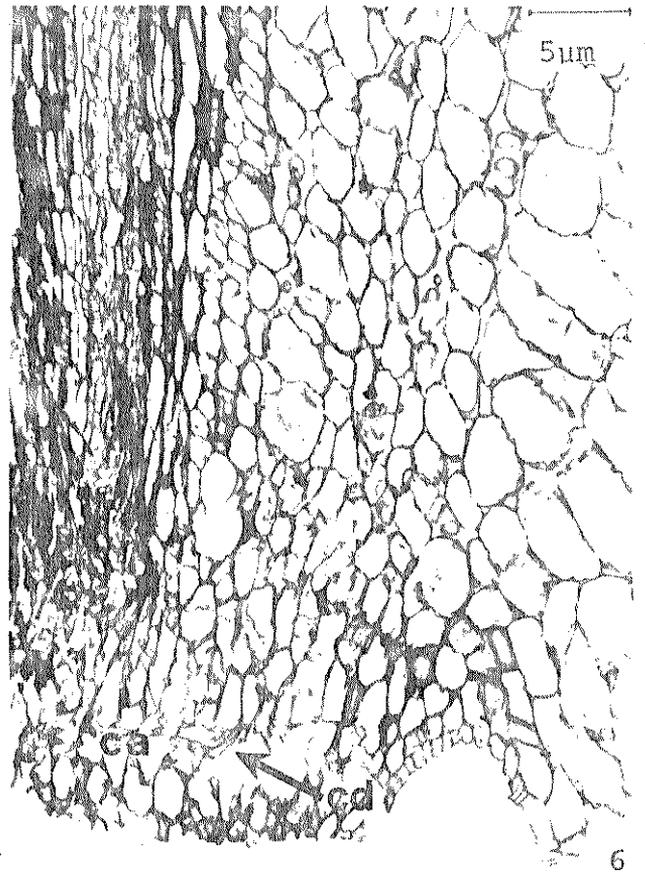
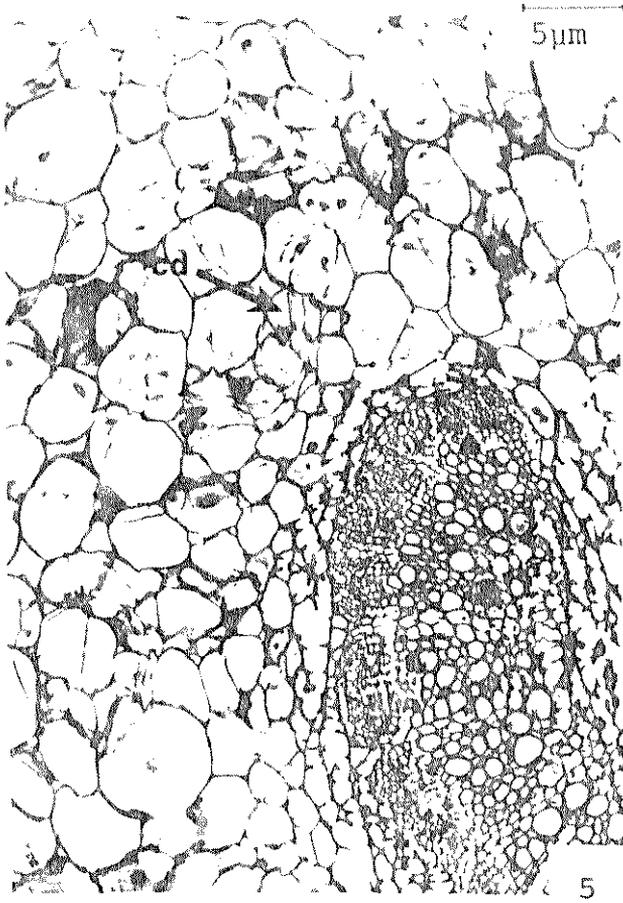
Fig.5. Secção transversal. Células em divisão formando faixas no parênquima cortical.

Fig.6. Secção longitudinal. Calo em início de formação na base do pecíolo; camada de células em divisão transversal na base do pecíolo; divisões celulares não orientadas no parênquima cortical.

Fig.7. Secção transversal. Calo mostrando intensa atividade meristemática e agrupamentos de células em divisão. A faixa que circunda a região central representa parte do tecido vascular lesado, na base do pecíolo.

Fig.8. Secção transversal. Detalhe mostrando obstrução parcial do xilema velho e novas células de xilema.

a - agrupamento de células em divisão; ca - calo; cd - célula em divisão; xn - novas células de xilema; xv - xilema velho obstruído.



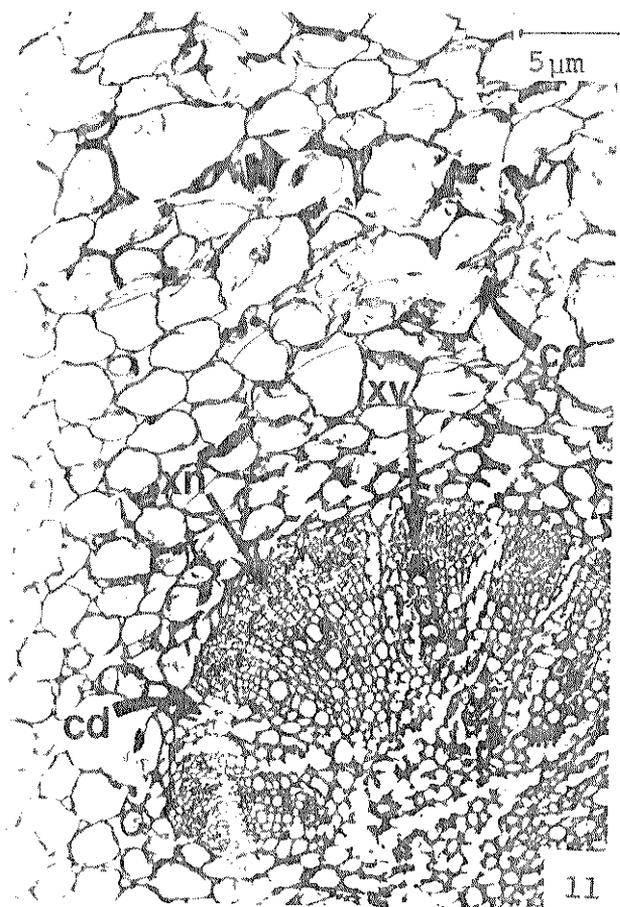
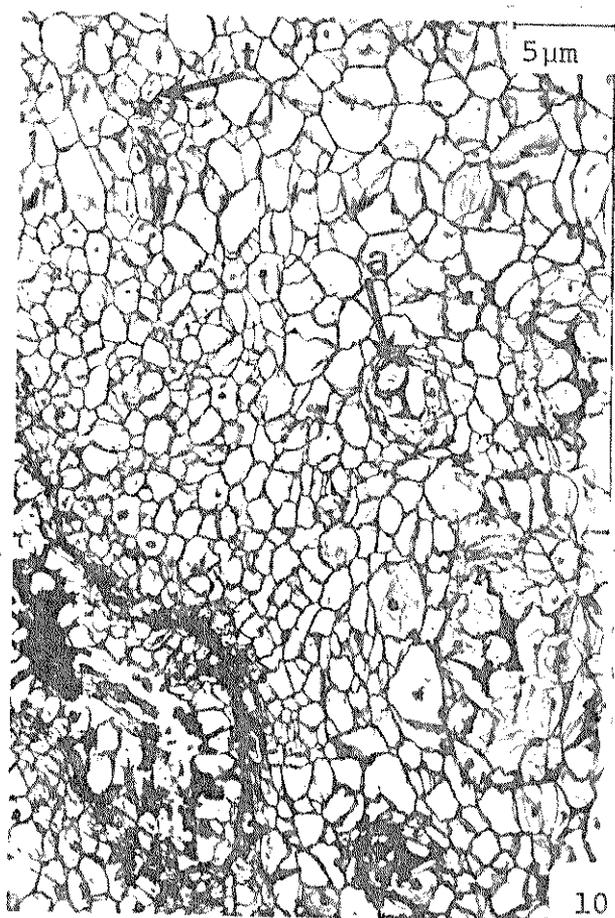
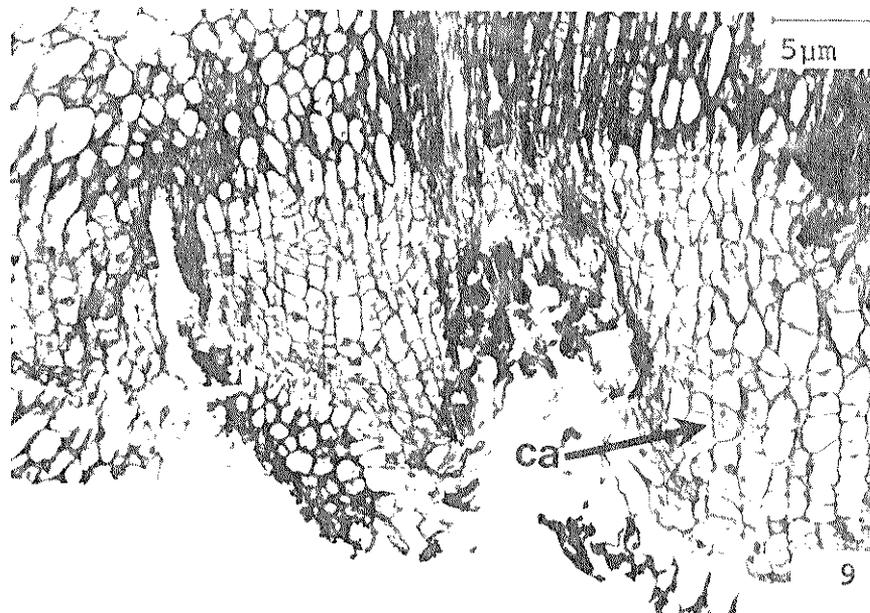
Figuras 9 a 11. Aspectos de pecíolos de folhas-controlle de *Pereskia grandifolia*, na luz, 7 dias após o seu destacamento.

Fig.9. Secção longitudinal, mostrando a formação do calo na base do pecíolo.

Fig.10. Secção transversal feita na região do calo, apresentando agrupamentos de células em divisão, além de células que se dividem formando faixas. Diferenciação de elementos traqueais.

Fig.11. Secção transversal. Xilema velho parcialmente obstruído; novas células de xilema; divisões celulares nos parênquimas radial e cortical.

a - agrupamento de células em divisão; ca - calo; cd - célula em divisão; cb - câmbio; t - elemento traqueal; xn - novas células de xilema; xv - xilema velho, obstruído.



Figuras 12 a 15. Aspectos de pecíolos de folhas-controle de *Pereskia grandifolia*, na luz, 10 dias após o destacamento.

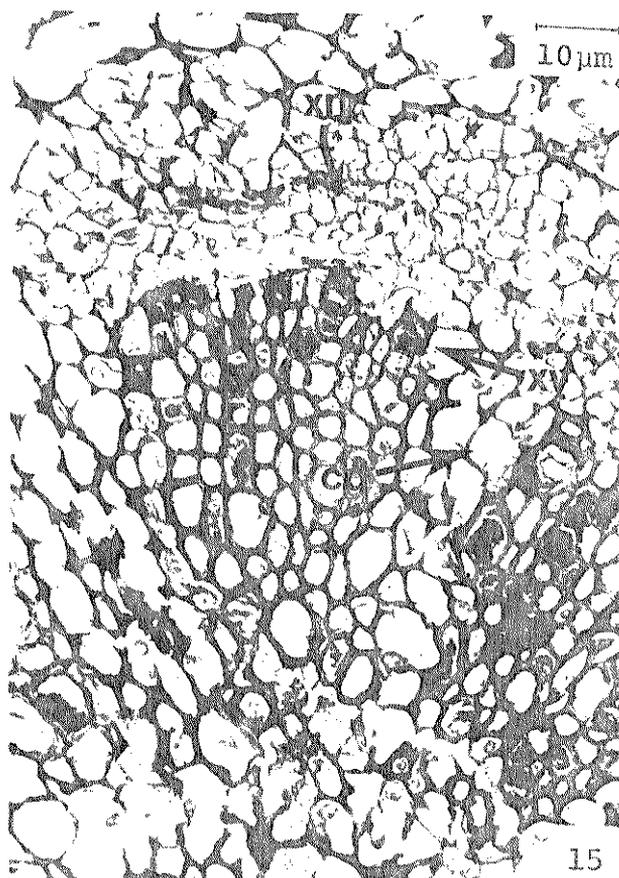
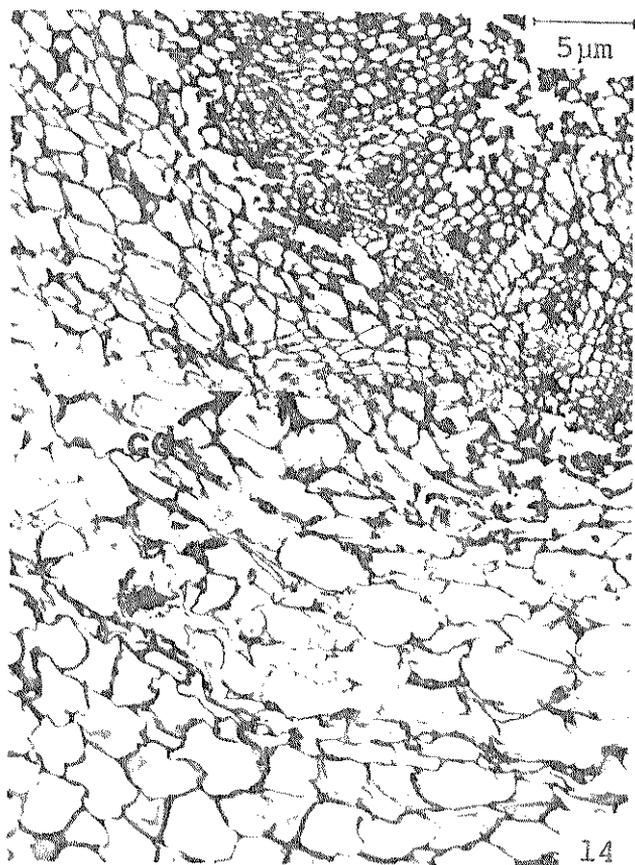
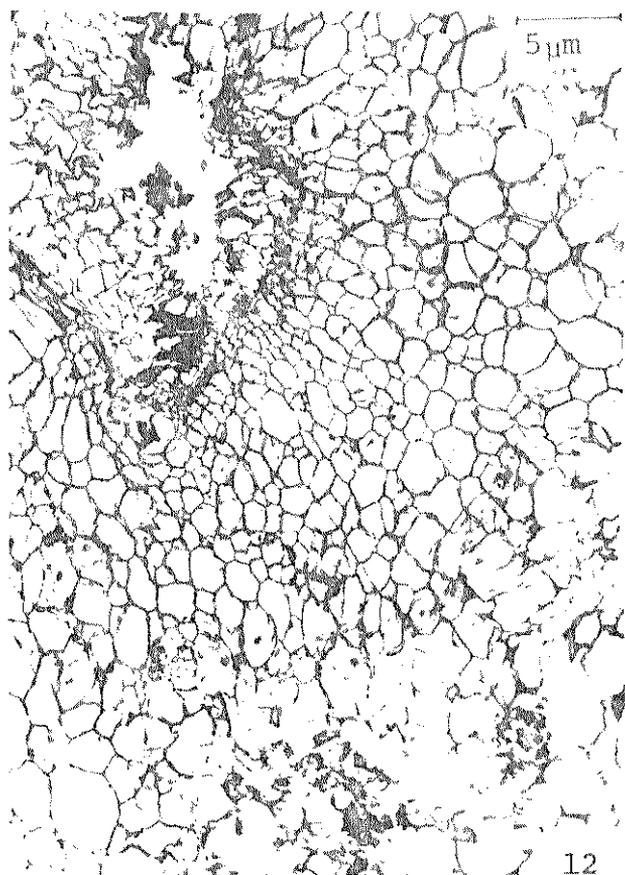
Fig.12. Secção transversal feita na região do calo, mostrando a intensa atividade meristemática neste tecido.

Fig.13. Secção longitudinal. Diferenciação de elementos traqueais no calo.

Fig.14. Secção transversal. Divisões celulares não orientadas e em faixa, no parênquima cortical; divisões celulares no parênquima radial.

Fig.15. Secção transversal. Detalhe mostrando novas células do xilema, xilema velho parcialmente obstruído e divisões celulares nos parênquimas radial e medular.

a - agrupamento de células em divisão; ca - calo; cb - câmbio; cd - células em divisão; t - elementos traqueais; xn - novas células de xilema; xv - xilema velho, obstruído.



Figuras 16 a 19. Primórdios radiculares em pecíolos de fo-  
lhas-controle de *Pereskia grandifolia*, na  
luz, 12 dias após o destacamento.

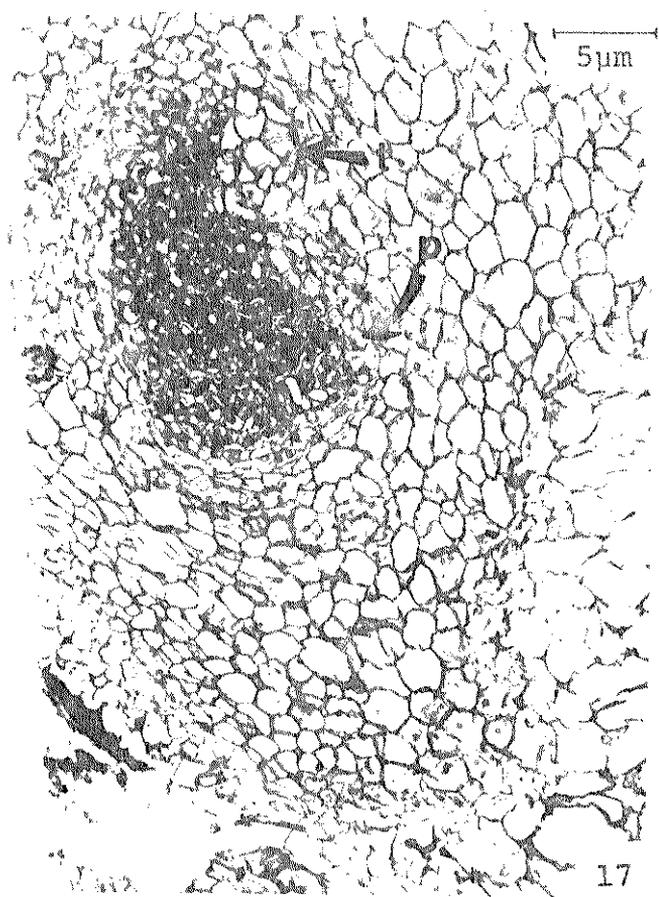
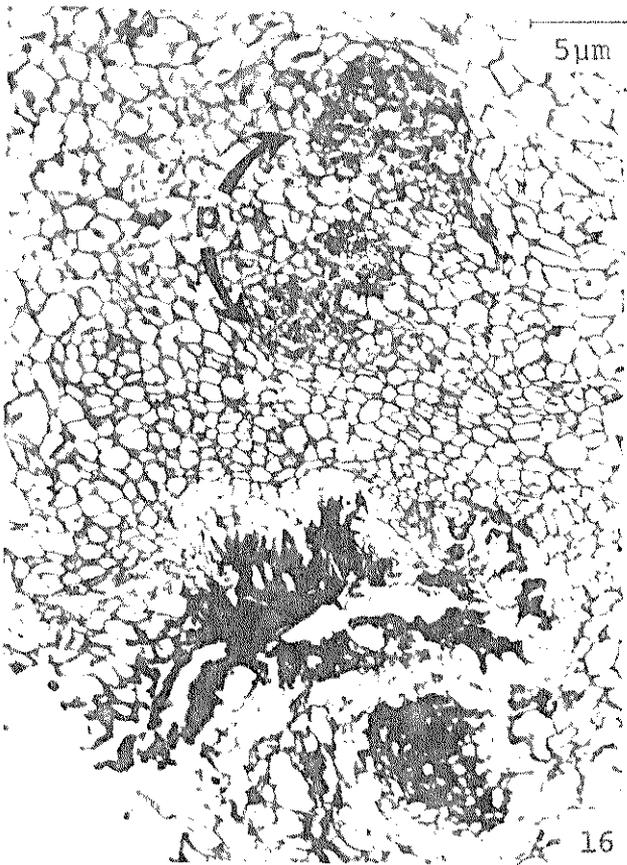
Fig.16 Secção transversal feita na região  
do calo, mostrando 3 ápices meristemáticos  
de primórdios radiculares no tecido do ca-  
lo e parte do tecido vascular do pecíolo,  
lesado.

Fig.17. Secção transversal do calo, mos-  
trando o ápice meristemático de um primór-  
dio radicular e elementos traqueais dife-  
renciados.

Fig.18. Secção longitudinal. Ápice meris-  
temático de um primórdio radicular.

Fig.19. Secção longitudinal. Ápice meris-  
temático de um primórdio radicular mais  
desenvolvido, pronto para perfurar a cam-  
da externa de células na base do calo. E-  
lementos traqueais diferenciados.

p - primórdio radicular; t - elementos  
traqueais.



Figuras 20 a 22. Aspectos de pecíolos de folhas de *Pereskia grandifolia*, tratadas com GA<sub>3</sub>, na luz, 12 dias após o destacamento.

Figs.20 e 21. Secções transversais feitas na região do calo, mostrando intensa proliferação celular com agrupamentos de células em divisão.

Fig.22. Secção longitudinal. Calo na base do pecíolo com elementos traqueais diferenciados.

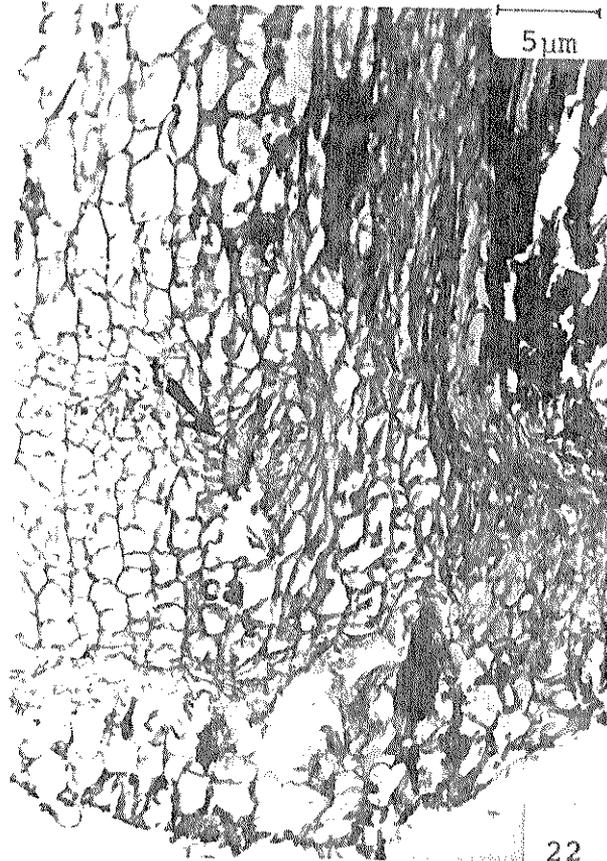
a - agrupamento de células em divisão; ca - calo; t - elementos traqueais.



20



21



22

Figuras 23 a 25. Secções longitudinais mostrando aspectos de raízes em pecíolos de folhas-controlé de *Pereskia grandifolia*, na luz, 15 dias após o destacamento.

Fig.23. Duas raízes formadas, uma das quais com o ápice fora do tecido do calo.

Fig.24. Detalhe da conexão do tecido vascular do pecíolo com o tecido vascular da raiz.

Fig.25. Conexão do primórdio de raiz com o tecido do pecíolo.

c - conexão entre pecíolo e raiz; r - raiz;  
v - tecido vascular.



23



24



25

Figuras 26 e 27. Secções transversais feitas na região do ca-  
lo em pecíolos de folhas-controle de *Pereskia grandifolia*, na luz, 15 dias após o des-  
tacamento.

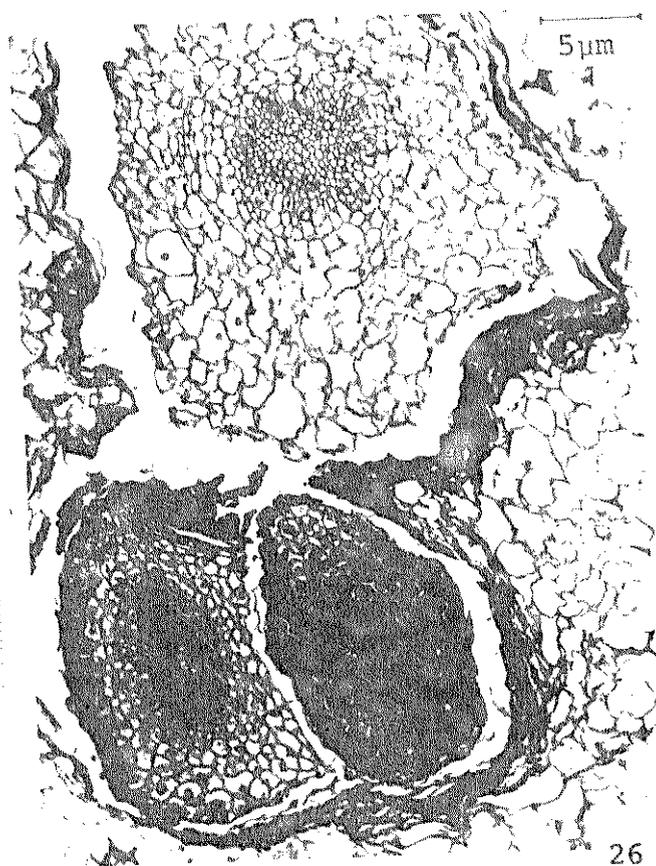
Fig.26. Três primórdios radiculares; dois foram seccionados na altura do ápice meris-  
temático e o terceiro, seccionado abaixo do ápice.

Fig.27. Ápice de um primórdio radicular.

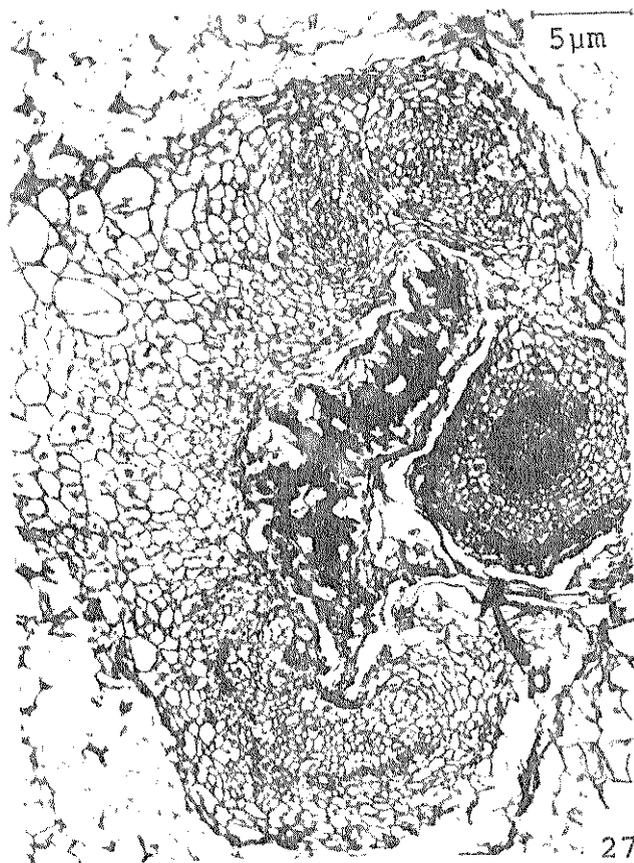
p - primórdio radicular.

Figura 28. Secção transversal de pecíolo de folha-con-  
trole de *Pereskia grandifolia*, na luz, 15 dias após o destacamento. Elevada atividade meristemática nos tecidos, novas células de xilema e xilema velho parcialmente obstruído.

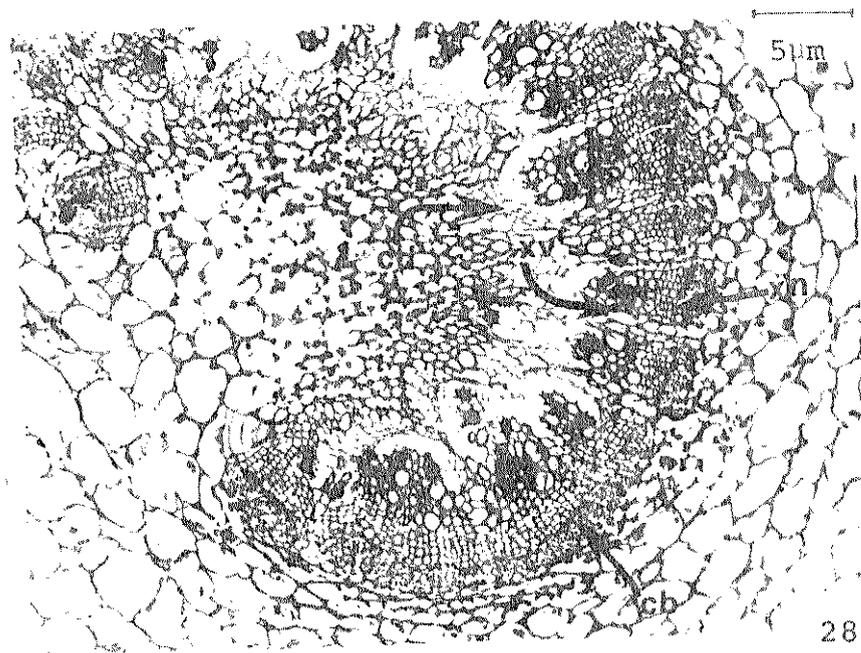
cb - câmbio; cd - células em divisão; xn - novas células de xilema; xv - xilema velho, obstruído.



26



27

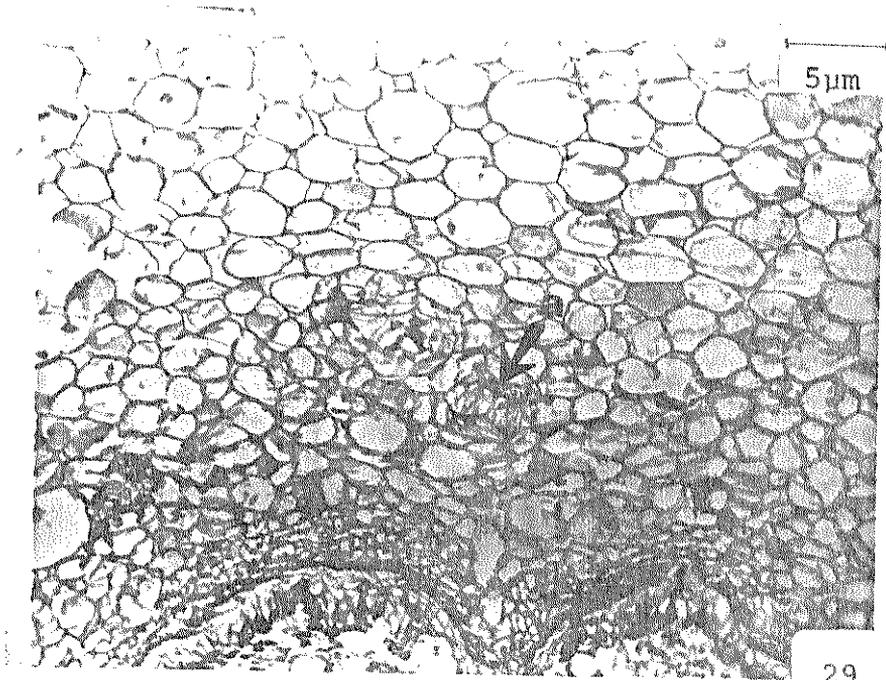


28

Figuras 29 e 30. Aspectos de pecíolos de folhas de *Pereskia grandifolia*, tratadas com GA<sub>3</sub>, 15 dias após o destacamento.

Fig.29. Secção transversal feita na região do calo, mostrando agrupamentos de células em divisão, porém, ausência de diferenciação de primórdios radiculares.

Fig.30. Secção longitudinal. Intensa atividade proliferativa nos tecidos; ausência de diferenciação de primórdios radiculares.  
a - agrupamento de células em divisão.



29



30

de-se observar a presença de células novas de xilema e parênquima xilemático em elevada atividade proliferativa (Figura 28).

Os pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$  não mostram o tipo de diferenciação verificado em pecíolos de folhas-controle. Nestes tecidos observa-se formação de calo com agrupamentos de células em divisão (Figura 29), diferenciação de elementos traqueais, divisão celular no parênquima cortical interno e presença da camada de células em divisão na base do calo (Figura 30).

Desta forma, verificou-se que o calo formado em pecíolos tratados com  $GA_3$  apresenta as mesmas características do controle, embora o tecido falhe em passar por uma nova diferenciação que levaria à formação de primórdios radiculares.

## 2. Análise de carboidratos presentes em lâminas e pecíolos de folhas durante o enraizamento.

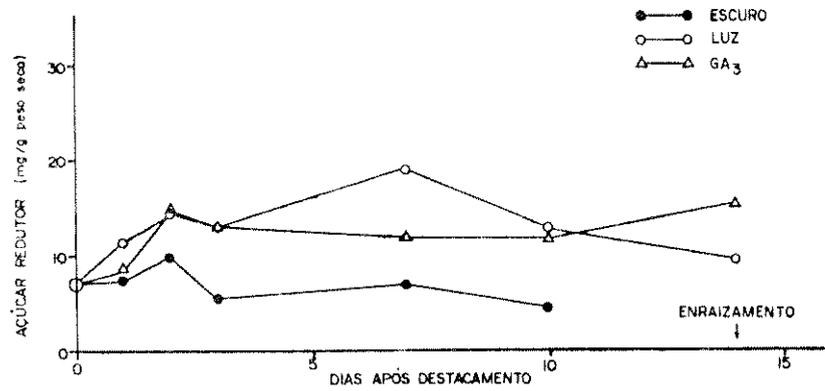
### 2.1. Açúcares livres redutores

#### 2.1.1. Análise quantitativa

A análise quantitativa dos açúcares livres

reduzidos, extraídos na fração metanol: clorofórmio: água (13:4:3 v/v), mostra que lâminas foliares (Figura 31A - Tabela 2A) e pecíolos (Figura 31B - Tabela 2B) apresentam inicialmente, i.e., em folhas recém-coletadas, um conteúdo semelhante desses açúcares por mg de peso seco. No entanto, durante o período de cultivo das folhas, os pecíolos passam a apresentar maior quantidade de açúcares livre em relação às lâminas, as quais não sofrem muita variação no conteúdo destes compostos, durante o período estudado. O que ocorre nas últimas, é um pequeno aumento, até o segundo dia, tanto em folhas-controle na luz ou escuro, como em folhas tratadas com  $GA_3$ , seguido de pequenas variações no conteúdo de açúcares livres. No sétimo dia, lâminas de folhas-controle na luz apresentam um aumento significativo, para em seguida voltar a níveis semelhantes aos encontrados no primeiro dia. Lâminas de folhas tratadas com  $GA_3$  apresentam, após o décimo dia, uma tendência ao aumento no conteúdo de açúcares livres. No caso de lâminas de folhas mantidas no escuro, observa-se uma quantidade levemente menor desses compostos.

Com relação aos pecíolos (Figura 31B - Tabela 2B) há um aumento sensível nos três tratamentos, até o segundo dia, seguido por uma diminuição em pecíolos de folhas mantidas no escuro (0% de enraizamento); um aumento maior, que progride até o décimo quarto dia, em pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$  (0% de enraizamento); e um pequeno aumento



## PECIOLOS

B

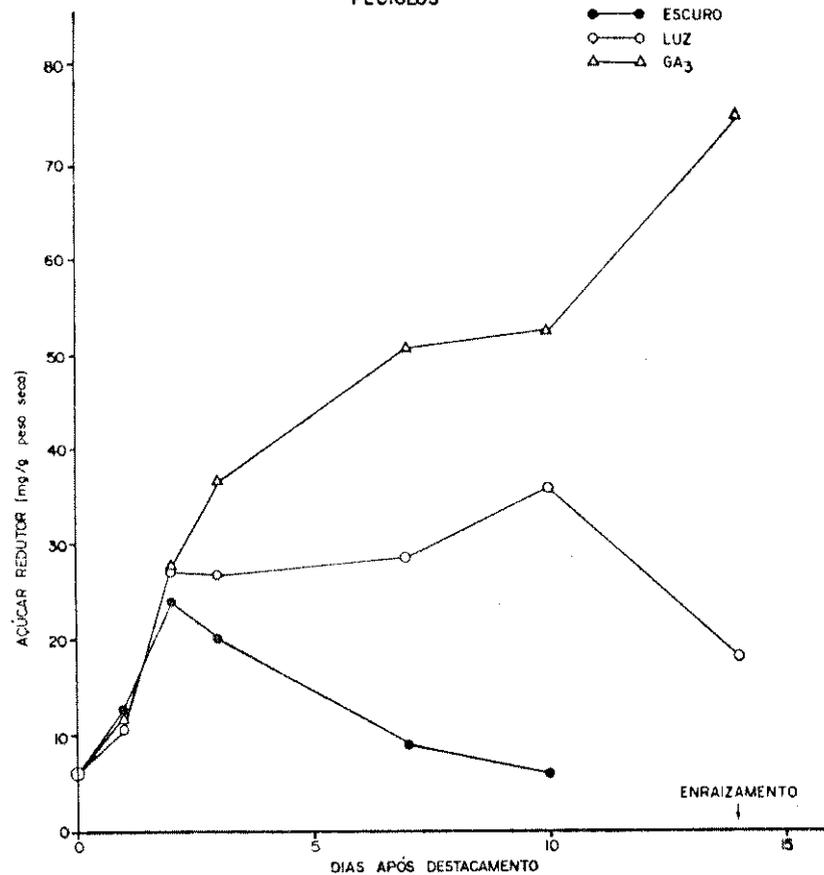


Figura 31. Variações no conteúdo de açúcares redutores em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

TABELA 2. Variações no conteúdo de açúcares redutores em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

A			
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>
0	6.95 A*a**	6.95 Aa	6.95 Aa
1	11.19 Ba	7.53 Ab	8.58 Ab
2	14.64 Ca	10.09 Bb	15.14 BDa
3	13.12 Ca	5.59 ACb	13.13 BCa
7	18.90 Da	6.84 Ab	12.17 Cc
10	12.88 Ca	4.53 Cb	11.94 Ca
14	9.49 Ba		15.51 Db

B			
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>
0	6.32 Aa	6.32 Aa	6.32 Aa
1	10.73 Ba	12.65 Ba	11.79 Ba
2	27.49 Ca	23.91 Cb	27.74 Ca
3	26.80 Ca	20.03 Cb	36.77 Dc
7	28.40 Ca	9.20 ABb	50.91 Ec
10	35.65 Da	6.17 Ab	52.31 Ec
14	17.92 Ea		75.74 Fb

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical)

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal)

DMS (Tuckey 5%)

em pecíolos-controle (87% de enraizamento). Esse aumento atinge um máximo no décimo dia, seguindo-se uma diminuição no décimo quarto dia, quando grande parte das folhas-controle, neste experimento, apresentavam raízes externamente, na base dos pecíolos.

### 2.1.2. Análise qualitativa: Cromatografia e densitometria

A separação dos açúcares livres através de cromatografia em papel indica a presença, nos extratos feitos a partir de pecíolos, de sacarose, glicose, frutose, arabinose, traços de galactose, além de traços de outro açúcar não identificado, cujo Rf é inferior ao da sacarose (Figuras 32A e 33A). Esses açúcares aparecem tanto em pecíolos de folhas que enraizam (luz), como também em pecíolos de folhas que receberam tratamento inibitório ao enraizamento (escuro e GA<sub>3</sub> na luz). Entretanto, nota-se uma certa variação no conteúdo de alguns desses açúcares, dependendo do tratamento e tempo de cultivo das folhas (Figuras 32A e 33A). Como já foi mencionado, o tratamento com GA<sub>3</sub> causa um grande aumento no conteúdo de açúcares livres em geral, presentes nos pecíolos (Figura 31B - Tabela 2B) e, através da separação por cromatografia, observa-se que no sétimo, décimo e décimo quarto dias, os maiores responsáveis por esse aumento são a glicose

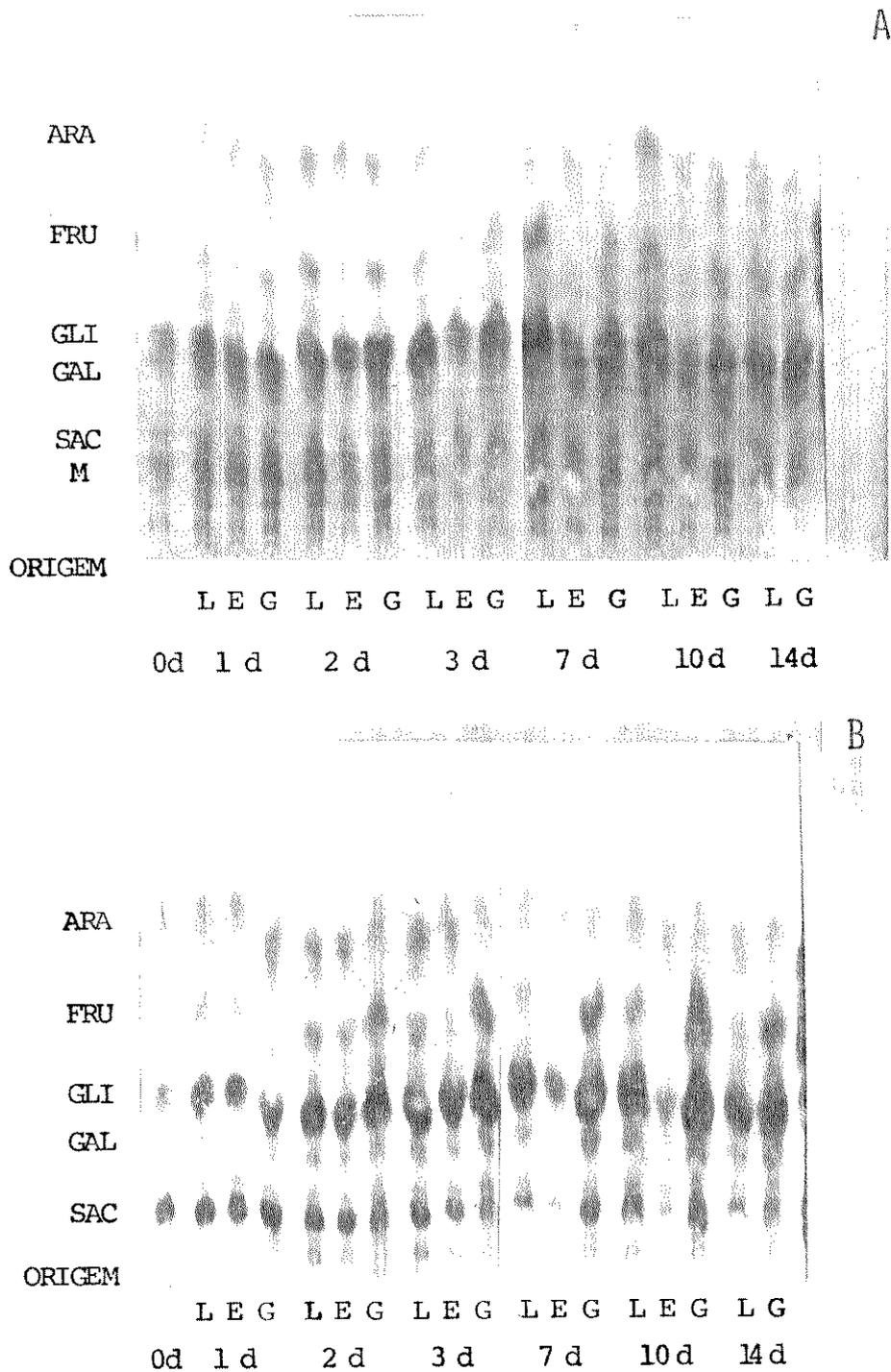
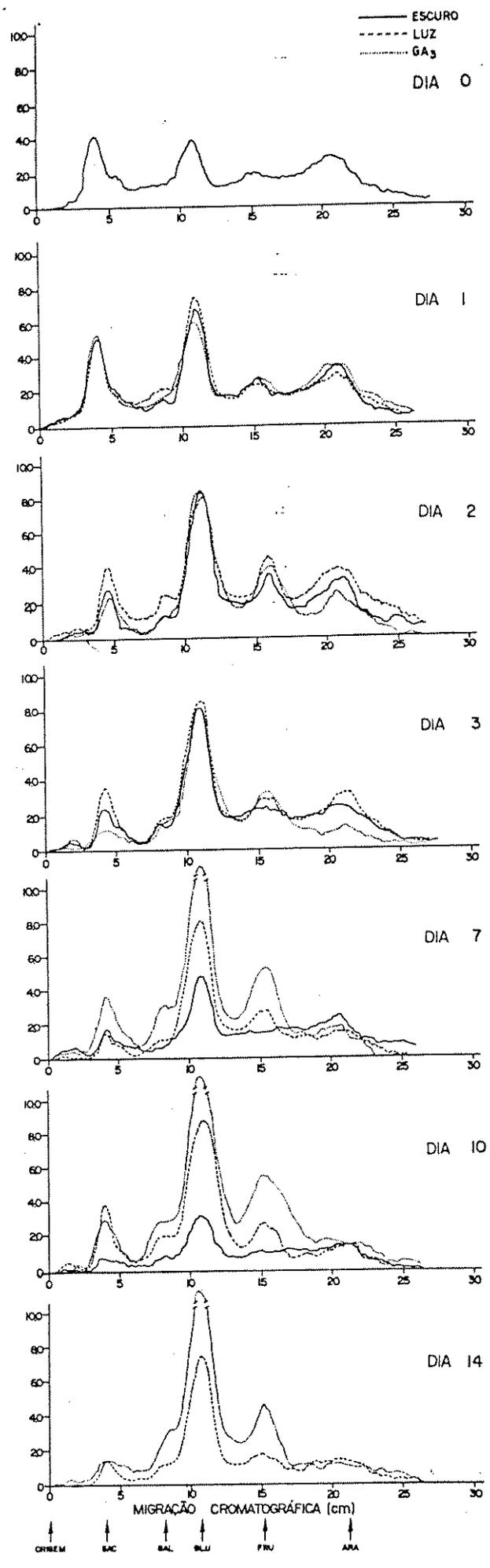
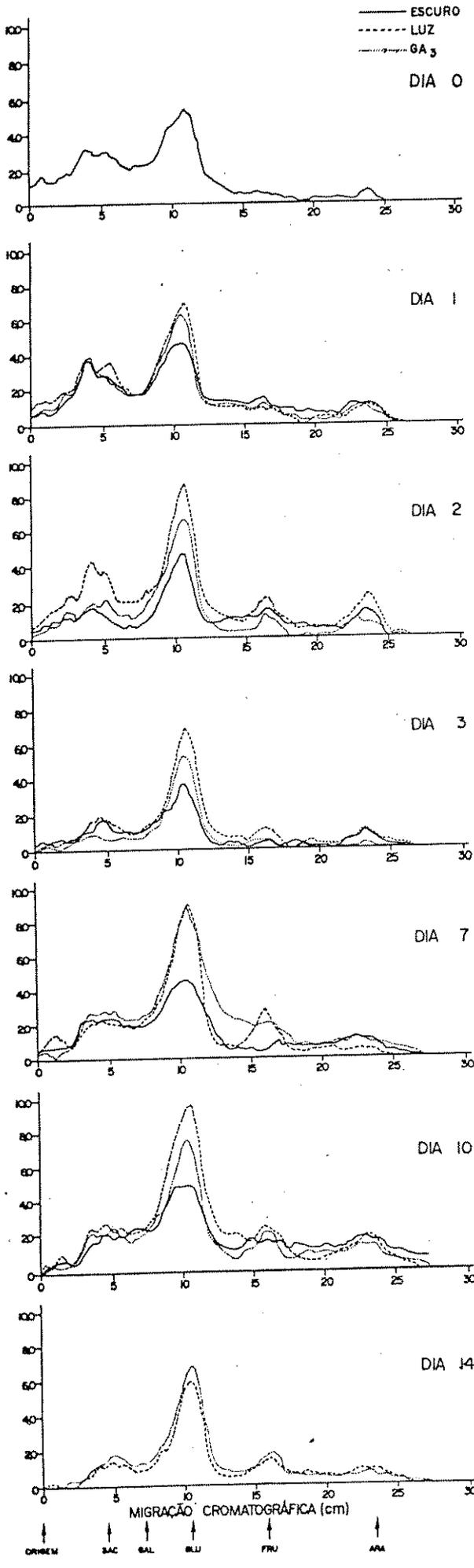


Figura 32. Cromatogramas de açúcares livres presentes em lâminas (A) e pecíolos (B), de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*.

L - luz; E - escuro; G - ácido giberélico; d - dias; FRU - frutose; SAC - sacarose; GLI - glicose; ARA - arabinose; GAL - galactose; M - maltose

Figura 33. Densitometria dos açúcares livres redutores presentes, em lâminas (A) e pecíolos (B), durante o enraizamento de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*. SAC - sacarose; GAL - galactose; GLI - glicose; FRU - frutose; ARA - arabinose



e a frutose. No caso de pecíolos de folhas que enraizam, estes dois componentes se mantêm constantes após o terceiro dia, diminuindo no décimo quarto dia. O aumento inicial, observado nos dois primeiros dias e nos três tratamentos, faz-se notar pelo aumento de glicose e frutose nos extratos.

Os principais açúcares livres presentes nas lâminas destas folhas são os mesmos encontrados nos pecíolos, mais outros três: um açúcar com Rf semelhante ao da maltose, outro, cujo Rf é inferior ao da maltose e um terceiro, com Rf levemente superior ao da sacarose (Figuras 32A e 33A). Os aumentos no conteúdo de glicose e frutose não são tão marcantes nas lâminas de folhas tratadas com  $GA_3$ , na luz, como o são nos pecíolos destas folhas (Figuras 32B e 33B). A arabinose é encontrada em todos os extratos, embora em quantidades bem reduzidas.

## 2.2. Carboidrato total

A análise quantitativa dos carboidratos totais presentes em lâminas de folhas durante o cultivo indica uma diminuição, até o terceiro dia, no conteúdo total destes açúcares nos três tratamentos estudados (Figura 34A - Tabela 3A). Esta diminuição é mais acentuada em lâminas de folhas mantidas no escuro. A partir do terceiro dia, o nível de concentração desses compostos permanece constante até o final

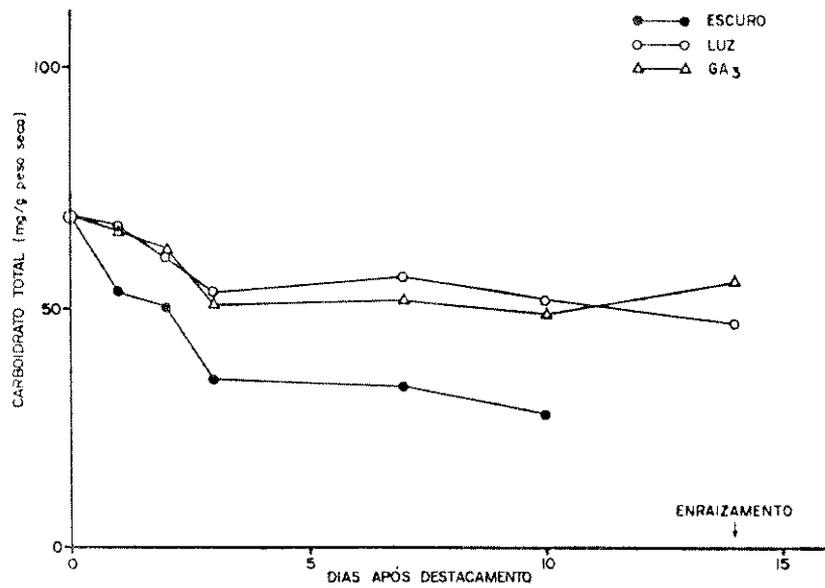
do experimento.

Com relação aos carboidratos totais presentes nos pecíolos, observa-se mais uma vez uma diminuição em pecíolos de folhas mantidas no escuro (Figura 34B - Tabela 3B) e aumento em pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$ , na luz ou controle, na luz. Nestas últimas, porém, segue-se nova diminuição no décimo quarto dia.

Deve-se salientar que o conteúdo inicial de açúcar total em lâminas de folhas é ligeiramente mais elevado (aproximadamente 70 mg/g peso seco) do que em pecíolos (aproximadamente 50 mg/g peso seco).

### 2.3. Amido

O conteúdo de amido encontrado em folhas recém-coletadas é bem maior nas lâminas (aproximadamente 24 mg/g peso seco) (Figura 35A - Tabela 4) do que em pecíolos (aproximadamente 3 mg/g peso seco) (Figura 35B - Tabela 4B). Entretanto, com o decorrer do tempo em que as folhas permanecem em cultura, esta situação se inverte. Nos pecíolos ocorre um grande aumento no conteúdo de amido nos três tratamentos aplicados (Figura 35B - Tabela 4B). Em pecíolos de folhas mantidas no escuro, este aumento atinge um máximo no sétimo dia seguido de uma diminuição no décimo dia, enquanto que em folhas mantidas na luz, o máximo ocorre nos sétimo e



## PECIOLOS

B

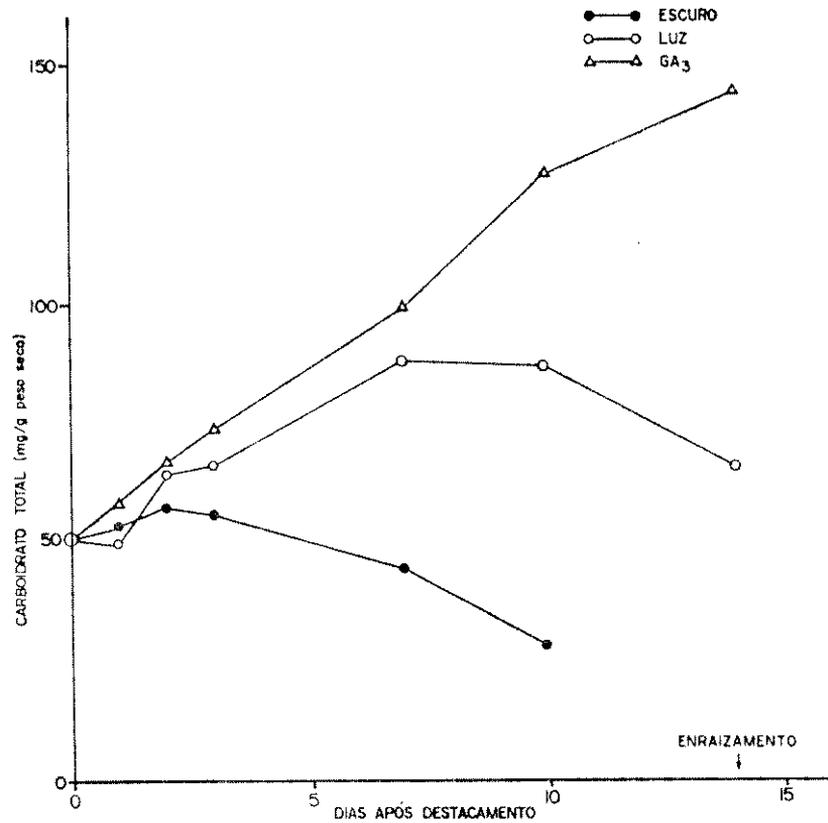


Figura 34. Variações no conteúdo de carboidrato total em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

TABELA 3. Variações no conteúdo de açúcares totais em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pepereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

A				
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>	
0	69.42 A*a**	69.42 Aa	69.42 Aa	
1	67.56 ABa	53.92 Bb	66.83 ABa	
2	61.50 Ba	50.26 Bb	61.99 Ba	
3	53.75 Ca	35.31 Cb	50.99 Ca	
7	57.06 Ca	34.37 Cb	52.25 Ca	
10	52.15 Ca	28.46 Cb	49.41 Ca	
14	47.03 Ca		56.32 BCb	

B				
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>	
0	50.52 Aa	50.52 ABa	50.52 Aa	
1	49.23 Aa	53.29 ABab	58.65 Ab	
2	64.16 Bab	57.43 Aa	68.85 Bb	
3	66.07 Ba	55.50 Ab	74.17 Bc	
7	87.44 Ca	44.43 Bb	99.51 Cc	
10	86.92 Ca	28.14 Cb	124.09 Dc	
14	65.92 Ba		143.44 Eb	

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical).

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal)

DMS (Tuckey 5%)

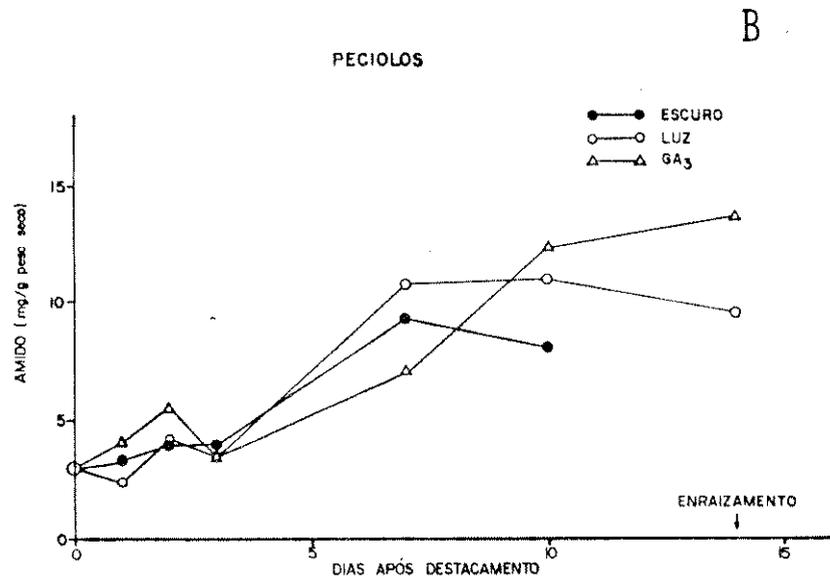
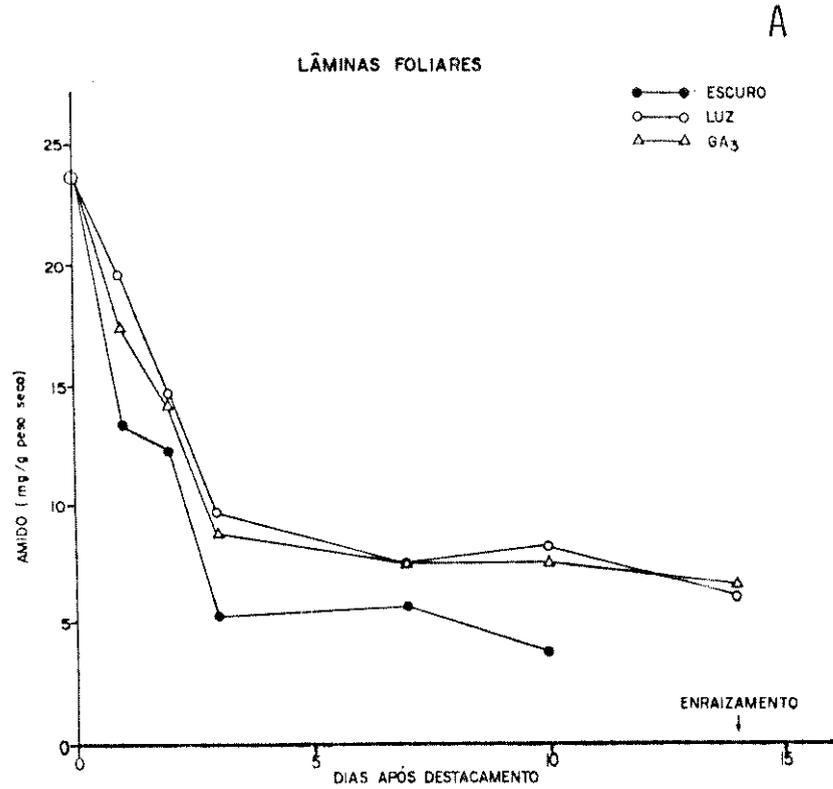


Figura 35. Variações no conteúdo de amido em lâminas (A) e pe-  
cíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia gran-*  
*difolia*, durante o enraizamento.

TABELA 4. Variações no conteúdo de amido em lâminas (A) e pe-  
cíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandi-  
folia*, durante o enraizamento.

A				
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>	
0	23.75 A*a**	23.75 Aa	23.75	Aa
1	19.68 Ba	14.69 Bb	17.49	Bc
2	14.75 Ca	12.33 Cb	14.34	Ca
3	9.72 Da	5.22 Db	8.82	Da
7	7.55 Ea	5.05 Db	7.51	Ea
10	8.27 Ea	3.78 Eb	7.47	Ea
14	6.05 Fa		6.67	Ea

B				
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>	
0	3.09 ABa	3.09 Aa	3.09	Aa
1	2.44 Aa	3.34 Aab	4.10	Ab
2	4.11 Ba	4.05 Aa	5.62	Bb
3	3.49 ABa	3.99 Aa	3.65	Aa
7	10.64 Ca	9.29 Bb	7.18	Cc
10	10.97 Ca	8.14 Cb	12.30	Dc
14	9.57 Da		13.59	Eb

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical)

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal)

DMS (Tuckey 5%)

décimo dia, seguido de uma diminuição por volta do décimo quarto dia. Pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$  apresentam aumento de amido até o décimo quarto dia.

As lâminas foliares têm seu conteúdo de amido diminuído a partir da determinação inicial. Esta diminuição é acentuada até o terceiro dia, sofrendo a partir daí pequenas alterações até o final do experimento (Figura 35A - Tabela 4A).

### 3. Peroxidase

#### 3.1. Atividade da peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas destacadas, durante enraizamento

Analisando-se a Figura 36A - Tabela 5A, pode-se observar que a atividade específica da peroxidase em lâminas foliares apresenta-se semelhante em folhas mantidas no escuro e naquelas mantidas na luz, não tendo sido detectadas diferenças estatisticamente significativas entre ambas (Tabela 5A).

Em pecíolos (Figura 36B - Tabela 5B), a atividade peroxidásica aumenta significativamente até o sexto dia após o destacamento das folhas em ambos os tratamentos, sendo que a partir daí, folhas mantidas no escuro (0% de en-

raizamento), passam a apresentar em seus pecíolos, uma atividade maior da enzima do que as que permaneceram na luz (90% de enraizamento). Esta diferença deixa de existir no décimo segundo dia, quando as atividades da peroxidase em ambos os tratamentos são praticamente iguais. Em seguida, enquanto esta atividade sofre um aumento em pecíolos de folhas mantidas na luz, o acompanhamento da mesma em pecíolos de folhas mantidas no escuro não é possível além deste ponto, devido a não sobrevivência das folhas nessas condições, por períodos prolongados. Vale ressaltar que, entre folhas que permaneceram na luz mais de 50% apresentavam raízes no nono dia após o destacamento da planta-mãe, neste experimento.

O aumento inicial na atividade desta enzima, observado em pecíolos, não ocorre nos tecidos de lâminas foliares (Figuras 36A e B).

Com relação ao conteúdo de proteína, lâminas de folhas recém-coletadas apresentam uma quantidade duas vezes maior de proteína do que pecíolos (Figuras 37A e B - Tabelas 6A e B). Nestes últimos, o conteúdo de proteína sofre variação somente após o nono dia, em folhas mantidas na luz e após o 3º dia, em folhas mantidas no escuro. Em lâminas foliares, nota-se uma variação maior, tanto nas folhas mantidas na luz como nas mantidas no escuro, sendo que nestas últimas, o conteúdo de proteína é maior entre o sexto e décimo segundo dias. Maior quantidade de proteína é observada no no

Figura 36

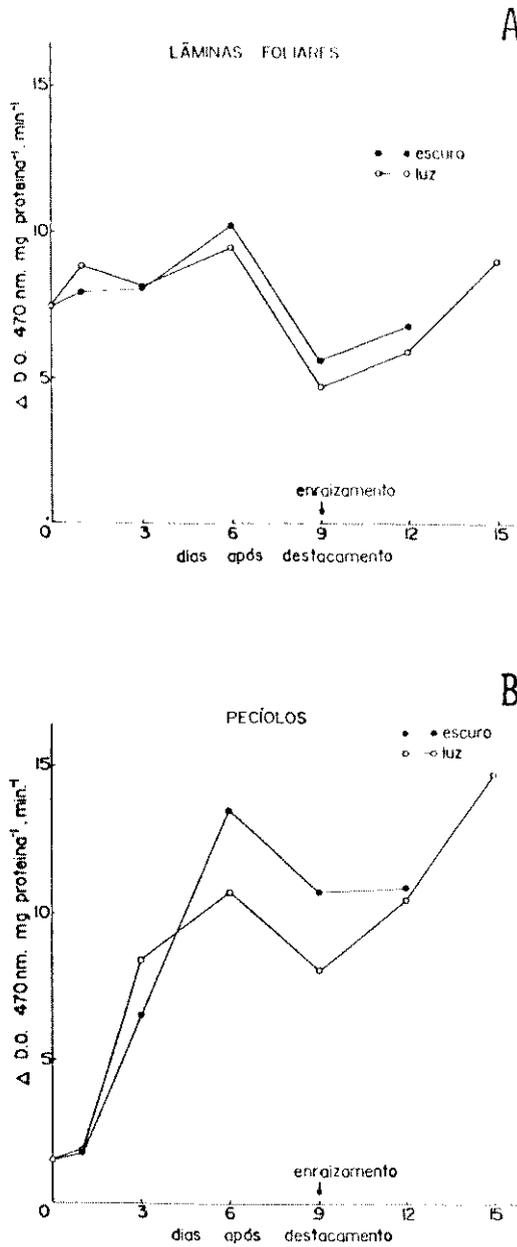


Figura 37

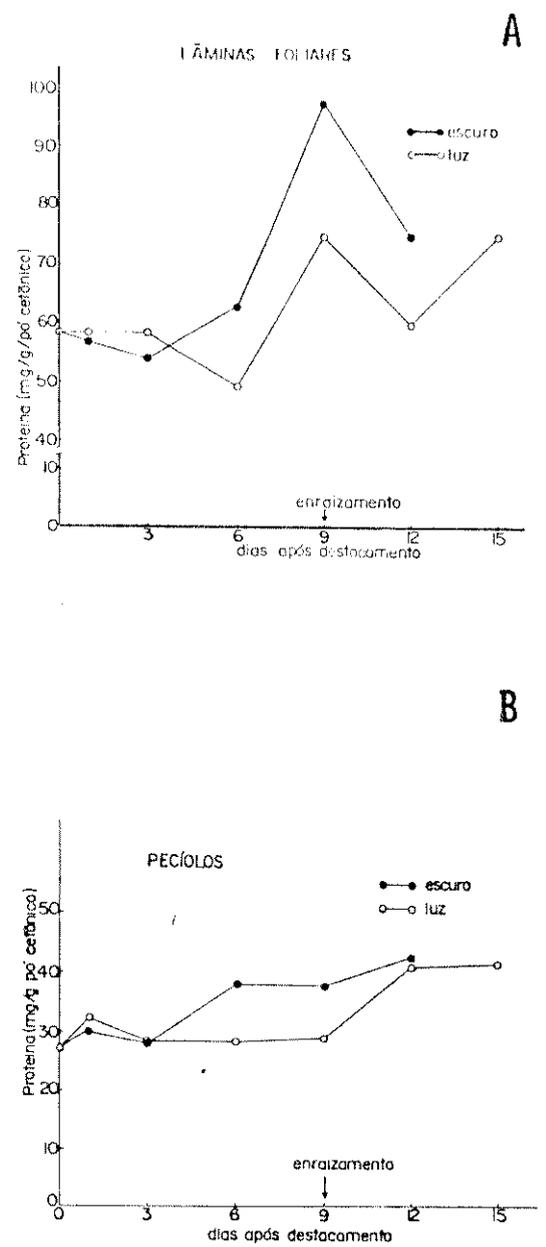


Figura 36. Atividade específica da peroxidase em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

Figura 37. Variações no conteúdo de proteína em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

TABELA 5. Atividade específica da peroxidase em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

A		
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro
0	7.43 A*a**	7.43 Aa
1	8.85 CBa	7.89 Aa
3	8.08 ABa	8.05 Aa
6	9.47 Ca	10.24 Ba
9	4.70 Da	5.61 Ca
12	5.87 Ea	6.80 Da
15	9.00 BC	

B		
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro
0	1.56 Aa	1.56 Aa
1	1.84 Aa	1.72 Aa
3	8.43 Ba	6.61 Bb
6	10.79 Ba	13.56 Cb
9	8.16 Ba	10.77 Cb
12	10.50 Ba	10.93 Ca
15	14.77 C	

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical) - DMS (Tuckey 5%)

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal) - (F - 5%)

TABELA 6. Variações no conteúdo de proteína em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereeskia grandifolia*, durante o enraizamento.

A		
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro
0	58.50 A*a**	58.50 Aa
1	58.50 Aa	57.00 Aa
3	58.50 Aa	54.00 Aa
6	49.50 Aa	63.00 Ab
9	75.00 Ba	97.50 Bb
12	60.00 Aa	75.00 Cb
15	75.00 B	

B		
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro
0	27.00 Aa	27.00 Aa
1	32.30 Aa	30.00 Aa
3	28.60 Aa	27.90 Aa
6	28.60 Aa	37.90 Bb
9	29.10 Aa	37.90 Bb
12	41.30 Ba	42.20 Ba
15	42.00 B	

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical) - DMS (Tuckey 5%)

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal) - (F - 1%)

no dia em ambos os tratamentos, coincidindo com a data em que pelo menos 50% das folhas mantidas na luz apresentavam raízes, neste experimento.

### 3.2. Padrão de isoenzimas de peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas, durante o enraizamento

Os resultados obtidos com os experimentos feitos a partir de lâminas foliares podem ser observados na Figura 38A. Através da eletroforese foi possível a separação de oito isoenzimas de peroxidase presentes na lâmina foliar. A atividade da peroxidase nestes tecidos, como foi visto na Figura 36A, sofre um aumento até o sexto dia, uma queda por volta do nono dia e em seguida um novo aumento. De acordo com o resultado obtido na separação das isoenzimas, este aumento de atividade não está relacionado com a formação de novas isoenzimas, mas sim com o aumento de atividade de determinadas isoenzimas pré-existentes nas lâminas.

Isoenzima nº 2, embora com pouca atividade nas lâminas de folhas recém-coletadas, vai se tornando mais ativa em lâminas de folhas mantidas em condições favoráveis ao enraizamento (luz), apresentando seu máximo de atividade no sexto dia. Em lâminas de folhas mantidas no escuro (condição não favorável ao enraizamento), esta isoenzima apresenta

ta-se com atividade baixa (Figura 38A). Isoenzima nº 3 parece, em geral, estar mais ativa em lâminas de folhas mantidas no escuro, enquanto que isoenzima nº 4 aparece, nos dois tratamentos (luz e escuro), somente a partir do nono dia. Isoenzima nº 5 começa a sofrer um aumento na atividade 24 horas após o destacamento da folha, atingindo a atividade máxima no sexto dia em lâminas de folhas mantidas em presença ou ausência de luz. O padrão de atividade desta isoenzima acompanha muito bem o padrão de atividade peroxidásica apresentado na Figura 36A, não parecendo, no entanto, estar relacionado com a formação de raízes.

Isoenzima nº 6 apresenta baixa atividade em lâminas de folhas recém-coletadas, e, embora esta atividade seja aumentada em lâminas de folhas mantidas na luz, permanece baixa quando as folhas são mantidas no escuro.

Isoenzima nº 7 está presente apenas em folhas recém-coletadas e 24 horas após o destacamento, em folhas mantidas na luz, desaparecendo nos tempos subseqüentes.

Com relação às isoperoxidasas presentes nos pecíolos destas mesmas folhas que foram mantidas na luz ou no escuro, obtem-se, por separação eletroforética, um total de 10 bandas de isoenzimas (Figura 38B). Assim como nas lâminas, nas quais o aumento de atividade da peroxidase (Figura 36A) não está relacionado com a formação de novas isoenzimas e sim com o aumento na atividade de certas isoenzimas já pre

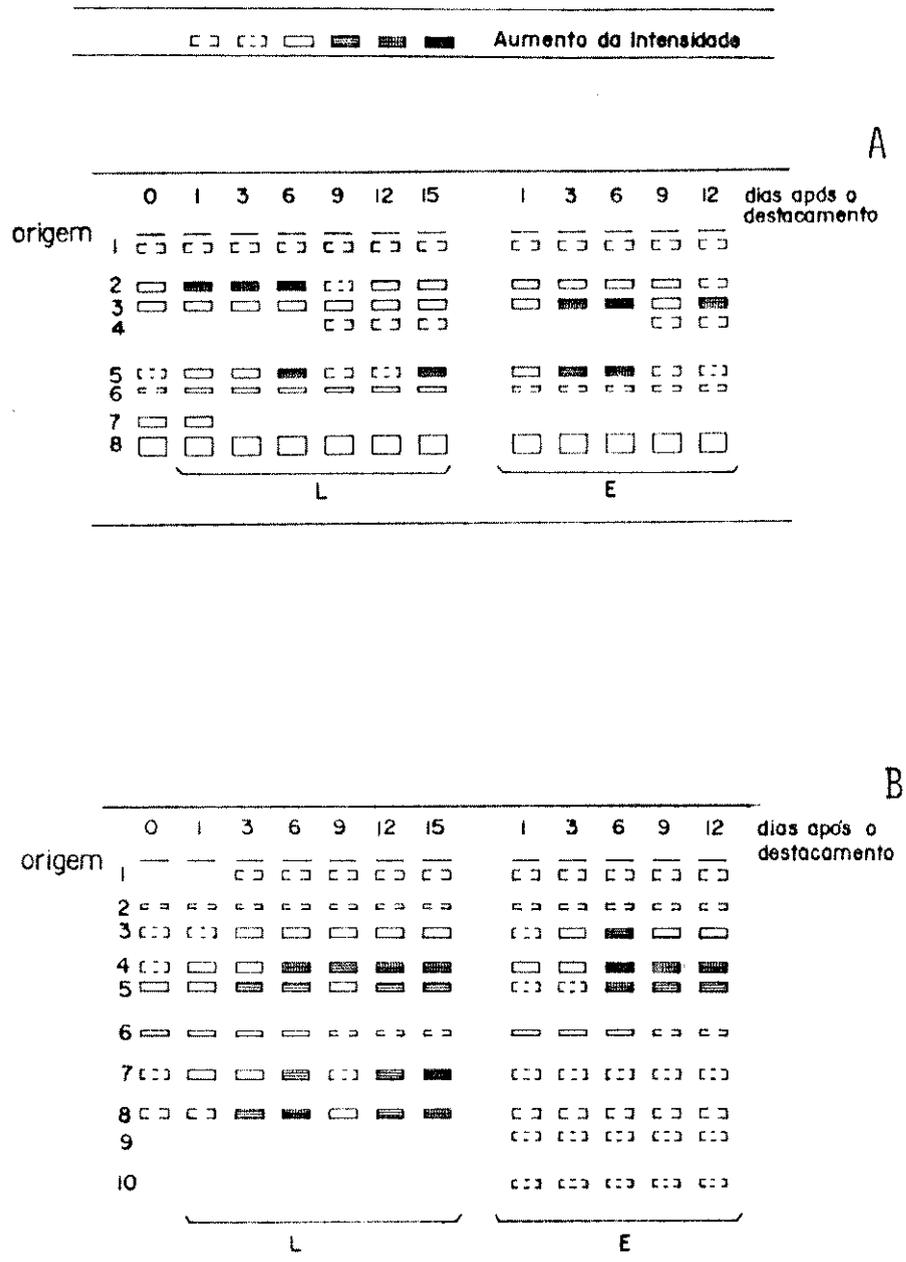


Figura 38. Padrão isoenzimático de peroxidase em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

L = luz; E = escuro.

sentes em lâminas de folhas recém-coletadas (Figura 38A), também nos pecíolos, o aumento de atividade da peroxidase (Figura 36B) está, pelo menos em parte, relacionado com o aumento em atividade que isoenzimas pré-existentes (p.e. isoenzimas nº 4 e nº 5) sofrem após o destacamento da folha (Figura 38B).

Contribuindo para este padrão de atividade apresentado na Figura 36B está também o aparecimento de duas novas isoenzimas (nº 9 e nº 10) em pecíolos de folhas mantidas no escuro.

Isoenzimas nº 7 e nº 8 são pouco ativas em pecíolos de folhas recém-coletadas, permanecendo assim em folhas mantidas em condições de não enraizamento mas com aumento de atividade em pecíolos de folhas controle, mantidas na luz. Neste último caso acompanham, de certa forma, o padrão de atividade enzimática mostrado na Figura 36B.

Isoenzima nº 6, presente em todos os pecíolos, tem sua atividade levemente diminuída 9 dias após o destacamento da folha.

3.3. Efeito do  $GA_3$  na atividade da peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas nos primeiros três dias após o destacamento da planta-mãe.

Utilizando-se  $GA_3$  como inibidor de enraizamento em folhas de *P. grandifolia*, observa-se, setenta e duas horas depois, que o aumento da atividade da peroxidase em pecíolos é menor quando comparado com os outros tratamentos (Tabela 7). Em lâminas foliares, a atividade da enzima apresenta-se menor após 24 horas em relação aos tratamentos luz e escuro, embora após setenta e duas horas, uma diferença na atividade entre as lâminas de folhas que receberam diferentes tratamentos não seja verificada.

#### 3.4. Efeito do $GA_3$ no padrão de isoenzimas de peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas nos três primeiros dias após o destacamento

A análise do padrão de isoenzimas em lâminas de folhas tratadas com  $GA_3$  mostra algumas semelhanças com o tratamento de escuro - condição na qual também não ocorre formação de raízes (Figura 39A). Isoenzima nº 2 apresenta-se, no primeiro e terceiro dias, com maior atividade em lâminas de folhas que enraizam (luz) do que naquelas que não enraizam (escuro ou  $GA_3$ , na luz), enquanto que a isoenzima nº 5 está mais ativa no terceiro dia em lâminas de folhas mantidas em condições de não enraizamento. Isoenzima nº 7 está presente em folhas recém-coletadas e, vinte e quatro ho-

TABELA 7. Efeito do GA<sub>3</sub> na atividade específica de peroxidase em lâminas e pecíolos de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante as primeiras horas após o destacamento da planta-mãe.

Horas após o destacamento	Atividade Específica da Peroxidase (Δ D.O. 470 nm . mg prot. <sup>-1</sup> min. <sup>-1</sup> )					
	Luz			Escuro		
	Lâmina	Pecíolo	GA <sub>3</sub>	Lâmina	Pecíolo	Lâmina Pecíolo***
0	7,43 A*a**	1,56 Aa		7,43 Aa	1,56 Aa	7,43 Aa 1,56 Aa
24	8,85 Ba	1,84 Aa		7,89 Aa	1,71 Aa	4,28 Bb 2,10 Aa
72	8,08 ABa	8,43 Ba		8,05 Aa	6,61 Bb	8,75 Ca 3,85 Bc

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical)

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal)

\*\*\*A análise estatística foi feita separadamente para lâminas e pecíolos, portanto não devem ser comparados entre si.

DMS (Tuckey 5%)

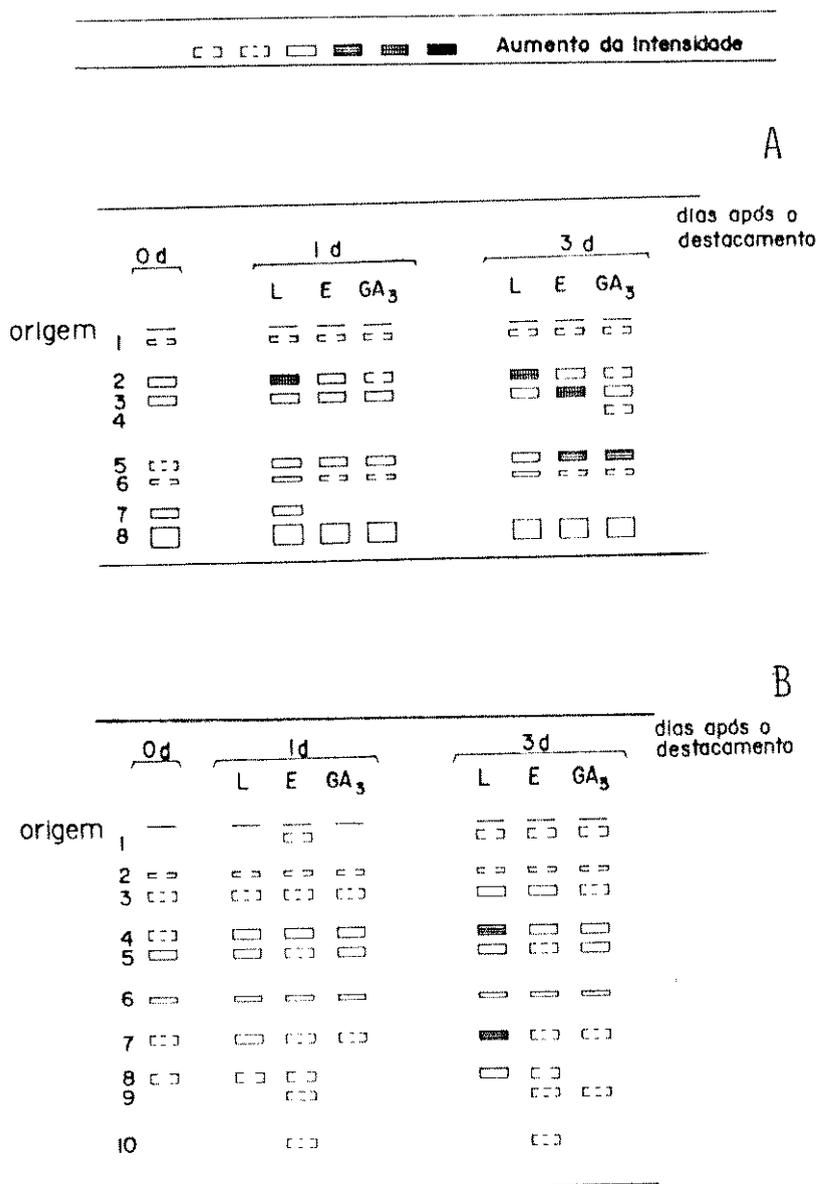


Figura 39. Padrão isoenzimático de peroxidase em lâminas (A) e pecíolos (B) de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, nos primeiros três dias após o destacamento.

L - luz; E - escuro; GA<sub>3</sub> - ácido giberélico.

ras após o destacamento, em folhas mantidas na luz. Porém, em folhas que recebem tratamento de escuro e de GA<sub>3</sub>, na luz, o mesmo não acontece.

Com relação aos pecíolos, isoenzima nº 9 é formada em folhas tratadas com GA<sub>3</sub>, três dias após o destacamento (Figura 39B), enquanto que isoenzima nº 8 não se forma em tecidos que receberam esse tratamento.

### 3.5. Atividade de peroxidase em pecíolos de folhas destacadas, durante o enraizamento

De acordo com os resultados apresentados na Figuras 36A e B - Tabelas 5A e B, observa-se que ocorrem maiores alterações na atividade da peroxidase nos tecidos de pecíolos do que nas lâminas foliares. Esta observação, aliada ao fato de que o tratamento com GA<sub>3</sub> causou o efeito no padrão isoenzimático mostrado nas Figuras 39A e B, levou à realização de um novo experimento, cujo objetivo foi determinar a atividade da peroxidase em pecíolos de folhas sob os três tratamentos (luz, escuro e GA<sub>3</sub>, na luz).

Os resultados obtidos neste experimento são mostrados na Figura 40A e Tabela 8A. Estes resultados reproduziram um padrão de atividade peroxidásica semelhante ao observado na Figura 36B, para os tratamentos de luz e escuro.

Em pecíolos de folhas-controle na luz e em pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$ , na luz, a atividade da enzima parece comportar-se em geral de maneira semelhante, mostrando uma mesma tendência de aumento até o décimo terceiro dia, seguido de uma diminuição no décimo sexto dia, em pecíolos tratados com  $GA_3$ . No tratamento com  $GA_3$ , observa-se uma queda no nono dia após o destacamento. Verificou-se que no décimo quarto dia, pelo menos 50% das folhas-controle, mantidas na luz neste experimento, apresentavam raízes.

As alterações significativas no conteúdo de proteína solúvel, em pecíolos de folhas colocadas em condições favoráveis (luz) e não favoráveis (escuro ou  $GA_3$ , na luz) ao enraizamento são pouco frequentes no período estudado (Figura 40B - Tabela 8B).

A diminuição apresentada no primeiro dia após o início do experimento, mais acentuadamente em pecíolos de folhas-controle na luz, pode ser devido à maior absorção de água pelos tecidos. Isto porque esses tecidos ficam em contacto com as soluções-teste (água ou  $GA_3$ ), durante as vinte e quatro primeiras horas após o destacamento da folha e os resultados são expressos em relação ao peso fresco dos pecíolos.

Poucas variações significativas no conteúdo de proteína também foram observadas no experimento anterior, como mostrou a Figura 37B e Tabela 6B.

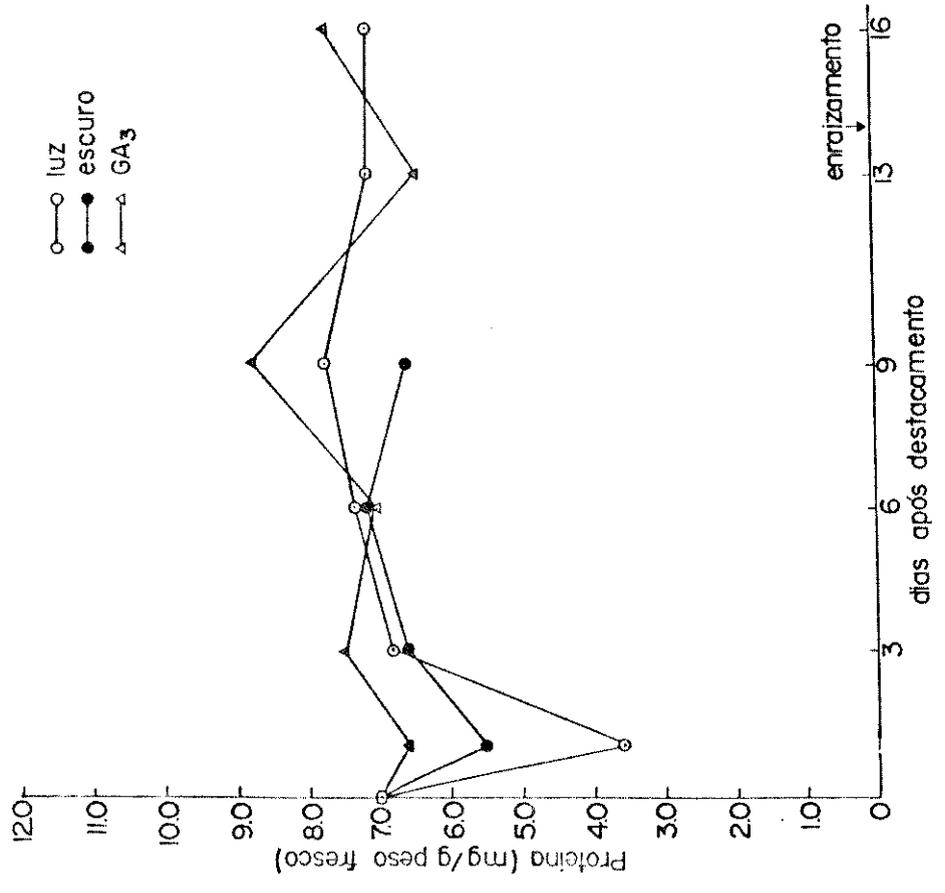
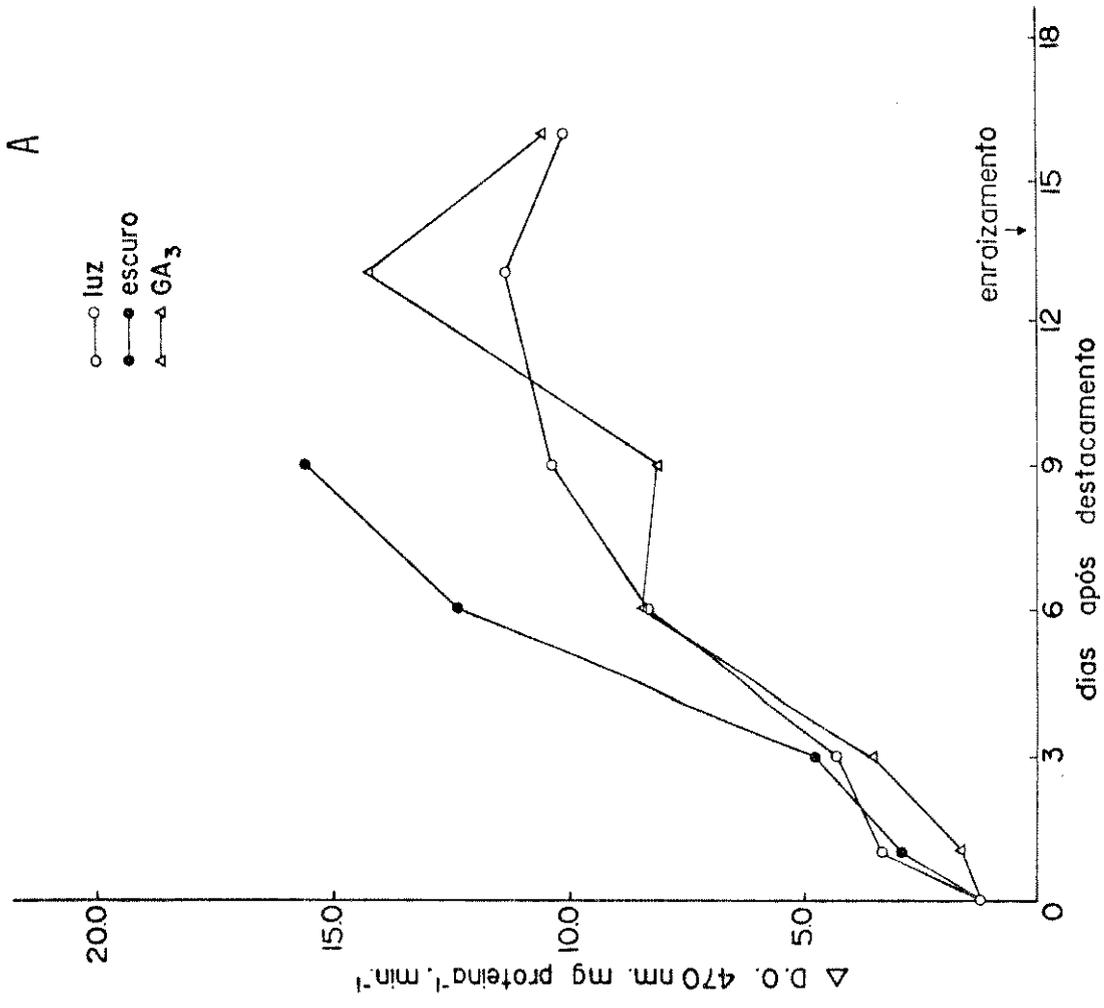


Figura 40. Atividade específica da peroxidase (A) e variações no conteúdo de proteí na (B) em pecíolos de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia* durante o enraizamento.

TABELA 8. Atividade específica da peroxidase (A) e variações no conteúdo de proteína (B) em pecíolos de folhas destacadas de *Pereskia grandifolia*, durante o enraizamento.

A			
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>
0	1.25 A*a**	1.25 Aa	1.25 Aa
1	3.31 Ba	2.92 Ba	1.65 Ab
3	4.32 Bab	4.74 Ca	3.53 Bb
6	8.31 Ca	12.28 Db	8.42 Ca
9	10.34 Da	15.52 Eb	8.11 Cc
13	11.32 Da		14.17 Db
16	10.14 Da		10.59 Ea

B			
Tempo (dias após destacamento)	Luz	Escuro	GA <sub>3</sub>
0	7.03 Aa	7.03 Aa	7.03 Aa
1	3.66 Ba	5.47 Bb	6.59 Ab
3	6.83 Aa	6.63 ABa	7.47 ABa
6	7.30 Aa	7.10 Aa	7.06 Aa
9	7.74 Aab	6.67 ABa	8.80 Bb
13	7.16 Aa		6.41 Aa
16	7.38 Aa		6.72 Aa

\*As letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada tratamento (vertical)

\*\*As letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada tempo (horizontal)

DMS (Tuckey 5%)

## V. DISCUSSÃO

Em folhas de *P. grandifolia*, as primeiras alterações histológicas que levam à formação do calo na base dos pecíolos são observadas entre 48 e 72 horas após o isolamento da folha. Essas alterações são representadas por divisões - principalmente periclinais - de células do parênquima, externas ao floema, formando regiões meristemáticas no córtex interno, próximo à base do pecíolo. Concomitantemente, na região basal do parênquima cortical forma-se uma camada de células que se dividem transversalmente e que se estende desde a epiderme do pecíolo até a região interna do córtex.

Desta forma, verificou-se que não há uma única célula inicial de raiz no sistema estudado e sim um grupo de células que começa a se dividir dando origem a novas células que retêm a capacidade mitótica. TORREY (1966) sugeriu e SMITH e THORPE (1975a), trabalhando com hipocótilos de *Pinus radiata*, confirmaram a existência de uma única célula inicial que, quando ativada, divide-se várias vezes, formando um meristema (também chamado meristemóide), a partir do qual se forma o primórdio radicular.

Por outro lado, GREGORY e SAMANTARAI (1950)

verificaram que, em pecíolos de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris*, grupos de células parenquimáticas, próximas ao floema e células de raios medulares, apresentam intensa atividade mitótica três dias após o início do tratamento, vindo a formar regiões meristemáticas no córtex interno. A origem de raízes adventícias, a partir de um grupo de células, também foi demonstrada por MOLNAR e LA CROIX (1972b) em segmentos caulinares de *Hydrangea macrophylla*. Raízes adventícias podem originar-se de células do parênquima floemático em *Hedera helix* (GIROUARD, 1969), *Rosa* (CARLSON, 1933), *Salix* (CARLSON, 1938) ou de outros tecidos, como por exemplo, do câmbio interfascicular em *Chrysanthemum* ou ainda de uma camada de células parenquimáticas internas à camada de fibras, em *Dianthus* (HARTMANN e KESTER, 1968). GAUTHERET (1968) demonstrou que o efeito positivo de luz no enraizamento de rizomas de *Helianthus tuberosus* "in vitro" tem como principal sítio de ação o câmbio vascular.

Em pecíolos de *P. grandifolia*, as divisões celulares no parênquima cortical são seguidas de divisões nos parênquimas radial, medular, floemático e xilemático, representando portanto a fase de desdiferenciação celular que ocorre no processo de enraizamento. A atividade proliferativa leva à formação de um calo abaixo do tecido vascular. Nesse tecido formado, as células retêm a capacidade mitótica. A segunda fase deste processo, conforme GORTER (1968), com-

preende o arranjo das células em um meristema organizado, o que ocorre ao redor do décimo segundo dia em pecíolos de *P. grandifolia*, mantidos em condições favoráveis ao desenvolvimento de raízes. O meristema formado no calo compreende o ápice do primórdio radicular. O calo apresenta um grande número de elementos traqueais diferenciados, mesmo antes do aparecimento do ápice do primórdio, os quais deverão iniciar a conexão com o tecido vascular do pecíolo.

Intensa atividade mitótica ocorre mesmo em pecíolos de folhas que não enraizam por estarem mantidas no escuro. Nesses tecidos ocorre formação de calo e diferenciação de elementos traqueais, sem contudo haver a organização do primórdio radicular. No entanto, o comportamento destes pecíolos só foi registrado até o sétimo dia, já que, após esse período, não houve sobrevivência das folhas em ausência de luz.

Em pecíolos tratados com  $GA_3$ , este composto inibe a formação de raízes, sem contudo inibir a proliferação celular dos tecidos mencionados e a conseqüente formação do calo, que, de maneira semelhante aos pecíolos, nos quais ocorre enraizamento, também apresenta diferenciação de elementos traqueais. O câmbio vascular também se apresenta em atividade, como nos pecíolos-controle. Portanto, a inibição por  $GA_3$  não se dá através de inibição da atividade mitótica nos tecidos associados com o evento da organogênese. SMITH e

THORPE (1975b) demonstraram que o efeito do GA<sub>3</sub> aplicado exogenamente depende do período durante o qual se deu a aplicação. Este regulador de crescimento é inibitório ao enraizamento se aplicado entre zero e quatro dias, período no qual se dá a formação de meristemóides. É promotor, se aplicado entre o quarto e sexto dias, período que coincide com os primeiros eventos histológicos observáveis na iniciação de raízes, ou seja, a formação de "locus" meristemáticos (SMITH e THORPE, 1975a). COLEMAN e GREYSON (1977b) verificaram que a inibição por GA<sub>3</sub> também se dá a nível de formação de meristemóides, além de inibição de síntese de amido num estágio anterior (zero a quarenta e oito horas). Um terceiro efeito inibidor pode ser verificado, a nível de destruição de um tipo de primórdio de formação tardia (96 a 144 horas).

O efeito inibidor do GA<sub>3</sub> na formação de raízes em *P. grandifolia* demonstrado aqui, refere-se à aplicação deste composto apenas durante as primeiras vinte e quatro horas após o destacamento das folhas, quando mantidas sob luz. No entanto, em um experimento preliminar, verificou-se que o GA<sub>3</sub> inibe a formação de raízes também em folhas mantidas no escuro, embora não tenha sido analisado o seu efeito, nessas condições, no desenvolvimento do calo na base do pecíolo.

De qualquer maneira, no que se refere ao tratamento com GA<sub>3</sub> na luz, verifica-se que as primeiras diferenças, a nível histológico, entre os tecidos tratados e os

não tratados , nos quais ocorre diferenciação de raízes, são observadas após doze dias , quando os primórdios de raízes começam a aparecer nos pecíolos não tratados com GA<sub>3</sub>. Isto mostra que o estímulo inibitório fornecido por este composto apresenta atuação a longo prazo, pelo menos no que se refere às alterações histológicas que levam à formação de raízes. A inibição observada ocorre a nível de organização do meristema que dá origem ao ápice do primórdio, já que a desdiferenciação celular, a formação do calo, a atividade cambial e o início de diferenciação celular, que precedem o aparecimento dos primórdios nas folhas-controle, não são inibidos por esse tratamento.

THORPE e MURASHIGE (1968) sugeriram a hipótese de que o acúmulo de amido antes e durante a formação do primórdio seria um pré-requisito necessário para uma resposta positiva de enraizamento. COLEMAN e GREYSON (1976), tendo verificado que GA<sub>3</sub> inibe a regeneração de raízes em estacas foliares de *L. esculentum*, reforçaram a hipótese de THORPE e MURASHIGE (1968), pois seus resultados sugeriram que o GA<sub>3</sub> inicialmente inibe a síntese localizada de amido, sem ter efeito significativo na degradação de amido por amilase. Já é bem conhecido o efeito promotor do GA<sub>3</sub> na síntese de algumas enzimas hidrolíticas, como por exemplo, da  $\alpha$ -amilase (MOORE, 1979). Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o conteúdo de amido em pecíolos de folhas tratadas com

$GA_3$  é inicialmente semelhante ao de folhas-controle, embora nestas últimas, o acréscimo verificado após o terceiro dia no conteúdo desse carboidrato ocorra antes do que em pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$ .

O tratamento com  $GA_3$  não parece, portanto, inibir a síntese de amido nos pecíolos, já que a partir do décimo dia o seu conteúdo é ainda maior do que em pecíolos não tratados.

Nas lâminas foliares, nos três tratamentos estudados e, mais acentuadamente, em folhas mantidas no escuro, ocorre um decréscimo no conteúdo de amido até o terceiro dia, quando começa a ocorrer um aumento mais acentuado deste composto nos pecíolos, sugerindo uma translocação de produtos da hidrólise do amido, da lâmina para o pecíolo.

Os tecidos do pecíolo exigem, neste ponto, maior energia metabólica para sustentar a elevada proliferação celular que ali ocorre, seja sob condições favoráveis ou não ao enraizamento.

Com relação ao conteúdo de açúcares redutores nos pecíolos, verifica-se um grande aumento inicial nos dois primeiros dias, nos três tratamentos estudados. Em seguida, o conteúdo desses açúcares nos pecíolos de folhas mantidas no escuro sofre um decréscimo gradual até o décimo dia, decorrente da não atividade fotossintética e portanto, não reposição de açúcares nesses tecidos. A intensa atividade de

proliferação celular verificada nestes pecíolos parece ser responsável pelo consumo de grande parte das reservas de carboidratos ali existentes.

A importância da luz na formação de raízes se dá especialmente através dos produtos da fotossíntese (MOORE E LOVELL, 1970; VEIERSKOV *et al.*, 1976; ELIASSON, 1978). Este último autor verificou que estacas provenientes de plântulas de *Pisum sativum* cultivadas no escuro ou em baixa irradiação, têm seu enraizamento inibido devido à deficiência de produtos fotossintéticos.

O conteúdo de açúcares totais em pecíolos apresenta um padrão de variação semelhante ao observado para os açúcares redutores, com a diferença de que o aumento inicial verificado nos dois primeiros dias de experimento é bem menor do que o aumento de açúcares redutores. Esse acréscimo nos açúcares livres ocorre provavelmente devido a um aumento na atividade de enzimas hidrolíticas, que atuam no sentido de liberar açúcares necessários ao suprimento energético dos tecidos, que passam então a apresentar intensa atividade proliferativa. A partir do terceiro dia, os pecíolos de folhas mantidas no escuro sofrem um decréscimo no conteúdo de açúcares totais, enquanto que nos pecíolos-controle (luz) há um aumento até o décimo dia, seguido por uma diminuição e, nos pecíolos tratados com GA<sub>3</sub>, um aumento gradual até o final do experimento.

O comportamento dos açúcares livres e totais apresentado pelos pecíolos durante o período em que as folhas foram mantidas em cultura (0 a 14 dias) fornece informações a respeito do padrão de utilização destes açúcares no processo de formação de raízes. Pecíolos de folhas mantidas no escuro e que portanto não estão sintetizando carboidratos através da fotossíntese não enraizam. Os carboidratos estão sendo utilizados para suprir a demanda metabólica dos tecidos que, apesar de não mostrar diferenciação de raízes, apresentam atividade mitótica elevada, com conseqüente formação de calo. O problema da não diferenciação de primórdios radiculares poderia ser explicado, portanto, não só pela não reposição dos carboidratos na folha e no pecíolo, como também pela vida curta das folhas mantidas no escuro.

Pecíolos de folhas-controle, que enraizam normalmente, apresentam uma diminuição no conteúdo de açúcares livres e totais ao redor do décimo quarto dia, quando praticamente todas as folhas apresentam raízes na base do pecíolo, o que demonstra ter havido utilização destes açúcares durante o processo de formação de raízes.

Em pecíolos de folhas cujo enraizamento é inibido pelo tratamento com  $GA_3$ , o conteúdo de açúcares totais e, mais acentuadamente, de açúcares livres aumenta bastante em relação aos outros dois tratamentos, já a partir do terceiro dia, e continua aumentando até o décimo quarto dia.

GREGORY E SAMANTARAI (1950) demonstraram que em pecíolos de *Phaseolus vulgaris* ocorre uma diminuição no conteúdo de açúcares totais, próximo ao dia em que se dá o aparecimento de raízes. Em pecíolos de *Hedera helix*, isto também acontece quando os pecíolos enraizam sob tratamento com AIB, mas não em pecíolos-controle, que não enraizam. Nestes últimos, o conteúdo de carboidrato permanece praticamente constante até o final do experimento. Em *P. grandifolia*, nos pecíolos tratados com GA<sub>3</sub>, em que ocorre formação do calo e diferenciação de elementos traqueais mas não diferenciação de raízes, parece haver um excesso de carboidratos livres e totais.

MOORE E LOVELL (1970, 1972) demonstraram que irradiação durante o período de enraizamento é um fator importante no controle da formação de raízes e que a inibição por sacarose, observada na luz, transformou-se em promoção quando as estacas permaneciam no escuro. LOVELL *et al.* (1972) demonstraram que a formação de raízes em cotilédones é inibida no escuro ou por pré-tratamento com DCMU na luz ou no escuro, enquanto que na luz ou no escuro, com suprimento de sacarose, o enraizamento ocorre normalmente. Isto indica, seguramente, que o enraizamento é um processo dependente de energia e que, sob condições dentro das quais a energia necessária não está disponível - ausência de luz, por exemplo - o processo não ocorre. Quando sacarose é acrescentada ao meio, na presença de luz, a formação de raízes é inibida.

Parece, portanto, haver uma concentração ótima de produtos assimilados, acima e abaixo da qual o enraizamento é inibido. VEIERSKOV *et al.* (1976) reforçam a hipótese de que níveis supra-ótimos de carboidratos inibem a formação de raízes. Portanto, é possível que a não formação de raízes em pecíolos tratados com GA<sub>3</sub> seja devida a um excesso de carboidratos presente nesses tecidos.

O conteúdo de açúcares livres redutores presentes nas lâminas foliares sofre poucas alterações significativas no decorrer do experimento, nos três tratamentos estudados. Observa-se que lâminas de folhas mantidas no escuro possuem menor quantidade destes açúcares. Já os resultados de açúcares totais mostram, nos primeiros três dias, um decréscimo nos três tratamentos - sendo mais acentuado nas folhas mantidas no escuro - após o que o nível se mantém estável até o final do experimento.

No que se refere ao balanço de carboidratos, o papel das lâminas foliares parece limitar-se ao fornecimento destes metabólitos aos pecíolos e, portanto, as alterações que lá ocorrem, nos níveis destes compostos, estão sujeitas a fatores como:

1. fotossíntese
2. hidrólise
3. translocação dos compostos para outras partes da planta (no caso, o pecíolo).

que de uma forma ou de outra, atuam variando a concentração de carboidratos nesses tecidos.

O tipo de açúcar presente nos tecidos onde as raízes serão formadas também deve ser considerado. Manose, rafinose, maltose, galactose e lactose não possuem propriedades rizogênicas (SPANJERSBERG E GAUTHERET, 1963). A formação de raízes pode ser obtida na presença de frutose, sacarose e glicose, sendo esta última duas vezes mais eficiente. Maltose, glicose, sacarose e glicose + frutose são eficientes na regeneração de raízes em discos de folhas de *L. esculentum* (COLEMAN E GREYSON, 1977b).

A análise cromatográfica dos açúcares presentes nos pecíolos de folhas durante o período de cultura demonstrou a presença de sacarose, glicose, frutose, arabinose e traços de galactose, tanto em pecíolos onde o enraizamento foi inibido como naqueles onde a resposta de enraizamento foi positiva.

Pecíolos tratados com  $GA_3$  apresentam, a partir do sétimo dia, aumento no conteúdo de glicose e frutose e diminuição no conteúdo de sacarose, indicando ocorrência de hidrólise. Nos pecíolos em que ocorre a formação de raízes, as concentrações de glicose e frutose praticamente não se alteram após o terceiro dia, vindo a diminuir somente no décimo quarto dia, o que sugere sua utilização no processo de diferenciação do primórdio radicular. No tratamento de es

curo, que não conduz ao enraizamento, a diminuição no conteúdo de açúcares livres observada após o segundo dia ocorre principalmente através da diminuição de sacarose, glicose e frutose. É provável que as alterações no conteúdo destes açúcares estejam relacionadas com a inibição do enraizamento de folhas mantidas no escuro e naquelas tratadas com GA<sub>3</sub>.

Outro aspecto do metabolismo de tecidos vegetais que está estreitamente relacionado ao processo de iniciação de raízes é a atividade da enzima peroxidase (CHANDRA *et al.*, 1971; MOLNAR E LA CROIX, 1972a; NANDA *et al.*, 1973; CHANDRA *et al.*, 1973; QUOIRIN *et al.*, 1974). MOLNAR E LA CROIX (1972a) demonstraram aumento da atividade de peroxidase próximo ao floema e xilema, antes de qualquer alteração na anatomia do tecido. Localização semelhante foi observada em raízes em desenvolvimento de *Vicia*, por JENSEN (1955), que sugeriu ser esta enzima importante na diferenciação celular, particularmente no tecido vascular.

NANDA *et al.* (1971) e NANDA E JAIN (1971) demonstraram que um balanço ótimo entre nutrição e auxina é necessário para a diferenciação de raízes, sugerindo que vários tipos de enzimas hidrolíticas e oxidativas estão envolvidas no processo.

Em *P. grandifolia* a atividade peroxidásica em lâminas de folhas mantidas na luz é semelhante à de folhas mantidas no escuro e sofre um decréscimo no nono dia, aumen-

tando logo em seguida. O significado desta queda na atividade não é conhecido. Porém, através da análise das isoenzimas, observa-se que a variação na atividade da peroxidase não ocorre devido à formação de novas isoenzimas, mas sim graças ao aumento na atividade de determinadas isoenzimas pré-existent na lâmina; por exemplo, isoenzimas nº 2 em folhas mantidas na luz e nº 3, em folhas mantidas no escuro. As isoperoxidasas encontradas em lâminas de folhas tratadas com  $GA_3$  não revelam qualquer diferença significativa, quando comparadas aos demais tratamentos.

O acompanhamento da atividade da peroxidase e suas isoenzimas durante a iniciação de raízes mostra que até o sexto dia após o destacamento das folhas, ocorre um marcante aumento na atividade da peroxidase presente nos pecíolos. A atividade da enzima é maior no sexto e nono dias em pecíolos de folhas mantidas no escuro, que não enraizam.

Com relação às isoenzimas presentes nos pecíolos de folhas mantidas no escuro, observa-se o aparecimento de duas novas bandas de rápida migração (números 9 e 10). Isoenzima nº 9 também aparece em pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$ , três dias após o destacamento da folha. O fato destas novas isoenzimas aparecerem em pecíolos de folhas que não enraizam sugere que sua atividade seja, na realidade, de AIA-oxidase, causando portanto a oxidação de auxinas endógenas que, outrossim, atuariam na formação de raízes nesses te

cidos. ENDO (1968) e YONEDA E ENDO (1970) mostraram que certas isoenzimas de peroxidase atuam como AIA-oxidases. A maior atividade específica da peroxidase detectada em pecíolos, no escuro (aproximadamente ao redor do sexto e nono dias) estaria em parte também associada à possível atividade de AIA-oxidase dessa enzima.

Por outro lado, em pecíolos de folhas que enraizam, as isoenzimas de números 7 e 8, com baixa atividade em pecíolos de folhas recém-coletadas, sofrem um aumento na atividade, aproximadamente a partir do terceiro dia. Em pecíolos de folhas que não enraizam, no escuro, as atividades de ambas isoenzimas mantêm-se baixas. Nos tratados com  $GA_3$ , em que o acompanhamento das isoenzimas foi feito somente até o terceiro dia, a isoenzima nº 8 não aparece. Estas duas isoenzimas parecem estar, portanto, relacionadas ao processo de enraizamento. QUOIRIN *et al.* (1974), trabalhando com esta cas caulinare de *Prunus accolade*, observaram que o enraizamento é acompanhado pelo aumento na atividade de duas isoenzimas anódicas pré-existentes e não pela formação de novas isoenzimas. O aparecimento de novas isoenzimas em tecidos impedidos de enraizar foi demonstrado por NANDA *et al.* (1973a). Estes autores detectaram, em hipocótilos de *Impatiens balsamina*, a formação de três novas isoenzimas em segmentos cujo enraizamento foi inibido pela aplicação de morfatina. Por outro lado, em segmentos-controle, nos quais o enraizamento

ocorreu, houve aparecimento de quatro novas isoenzimas, não detectadas nos segmentos tratados. Foi sugerido que estas isoenzimas estariam relacionadas ao processo de iniciação e desenvolvimento de raízes.

A atividade específica da peroxidase não sofre alterações entre o terceiro e o décimo segundo dias em pecíolos de folhas mantidas na luz, aumentando no décimo quinto dia. Em pecíolos de folhas mantidas no escuro, a atividade não sofre alterações significativas após o sexto dia. No nono dia, grande parte dos pecíolos de folhas mantidas na luz já apresentavam raízes, senão externamente, pelo menos no seu interior em forma de primórdios. O acompanhamento da atividade da enzima em pecíolos no escuro foi inviável neste experimento, a partir do décimo segundo dia, devido à não sobrevivência das folhas quando submetidas a longos períodos no escuro.

O comportamento da atividade peroxidásica foi mais uma vez analisado em pecíolos de folhas mantidas na luz, no escuro e tratadas com  $GA_3$ , tendo sido observado novamente um grande aumento na atividade nestes três tratamentos, ocorrendo no escuro o aumento mais notável. As atividades da enzima em pecíolos na luz e nos tratados com  $GA_3$  apresentam em geral comportamento semelhante. Neste experimento, aproximadamente 50% das folhas apresentavam raízes no décimo quarto dia, no controle.

O conteúdo de proteína nas lâminas sofre um aumento próximo ao nono dia, aumento este mais acentuado nas folhas mantidas no escuro do que nas folhas mantidas na luz. Em pecíolos, o conteúdo de proteína sofre poucas alterações significativas durante o período estudado, sob quaisquer dos tratamentos aplicados.

KAMÍNEK (1969) observou alterações nas diversas frações de proteínas, durante a formação de raízes em segmentos caulinares de ervilha. É possível que durante o enraizamento de folhas de *P. grandifolia*, embora o conteúdo de proteína sofra poucas alterações significativas, as proteínas constituintes sofram alterações quantitativas ou mesmo qualitativas, como ocorreu com as isoenzimas de peroxidase.

No presente trabalho, verificou-se que as alterações que ocorrem nos níveis de carboidratos e peroxidases em pecíolos de folhas mantidas em cultura são bem mais marcantes do que em lâminas. Além disto, nos pecíolos, como já foi visto, essas alterações variam de acordo com o tratamento aplicado, não ocorrendo apenas em pecíolos de folhas que enraizam. Portanto, são essas variações que parecem estar relacionadas com o processo de iniciação de raízes nos pecíolos de folhas de *P. grandifolia*, seja através do mecanismo de controle nos níveis de carboidratos, seja através do sistema de controle dos níveis de proteínas, em geral, e de peroxidases e suas isoperoxidases, em particular.

Neste último caso, o sistema de controle pode atuar, inibindo ou ativando determinadas isoenzimas de peroxidase, algumas das quais, como já foi mencionado, com atividade de AIA-oxidase. Foi verificado que compostos fenólicos podem apresentar papel importante no controle destas isoenzimas, protegendo o AIA através de inibição do sistema de AIA-oxidase (HESS, 1969; LEE, 1977). ZAIDAN (1976) demonstrou, através de testes cromogênicos a presença de fenóis em folhas de *P. grandifolia*. Portanto, no sistema estudado é bem possível que estes compostos atuem inibindo a oxidação do AIA em pecíolos de folhas nas quais ocorre a diferenciação de raízes.

## VI. RESUMO

Folhas destacadas de *Pereskia grandifolia* enraizam facilmente quando mantidas na luz, sem haver necessidade da aplicação de reguladores de crescimento. Quando colocadas em câmara escura, ou quando tratadas com GA<sub>3</sub>, na luz, o enraizamento é fortemente inibido.

No período entre 48 e 72 horas após o destacamento das folhas, observam-se, nos três tratamentos aplicados, as primeiras alterações histológicas na base do pecíolo, que levam à formação de um calo neste local. Contribuindo para a formação deste calo estão células dos parênquimas cortical, medular, radial, floemático e xilemático, que sofrem desdiferenciação e entram em estado meristemático, de proliferação celular ativa.

No entanto, a formação de primórdios radículares ocorre apenas em pecíolos de folhas-controle, mantidas na luz, já que aí ocorre a organização - no tecido do calo - de um meristema, o qual dá origem ao ápice do primórdio, ao redor do décimo segundo dia após o destacamento da folha.

A análise dos carboidratos presentes nas lâmini

nas e pecíolos durante o período de cultivo das folhas demonstra que as maiores alterações ocorrem nos pecíolos.

GA<sub>3</sub> causa um aumento nos conteúdos de açúcares livres redutores e açúcares totais, mais intenso do que o aumento verificado em pecíolos de folhas-controle, na luz, enquanto que em pecíolos de folhas mantidas no escuro, observa-se diminuição no conteúdo destes açúcares, decorrente da não atividade fotossintética dos mesmos.

Produtos da hidrólise do amido parecem ser translocados das lâminas para os pecíolos, onde o seu conteúdo sofre um aumento após o terceiro dia. O tratamento com GA<sub>3</sub> causa um aumento maior, porém um pouco atrasado em relação ao controle, na luz. O possível efeito inibidor dos açúcares em pecíolos de folhas tratadas com GA<sub>3</sub> é discutido, ao mesmo tempo em que no escuro, a baixa concentração destes compostos possa ser um fator limitante no processo de diferenciação de raízes, já que uma concentração ótima parece ser importante para que o enraizamento ocorra.

Os principais açúcares livres redutores encontrados nos pecíolos e lâminas são os mesmos nos três tratamentos estudados: sacarose, frutose, glicose, galactose e arabinose, sendo que as maiores alterações no seu conteúdo total são devidas especialmente à glicose, frutose e sacarose.

Com relação à atividade específica da peroxidase, verifica-se que em pecíolos, há um aumento inicial gran

de nos três tratamentos, embora no escuro, o aumento seja maior. Este maior aumento no escuro, ocorre em parte, devido ao aparecimento de duas novas bandas de isoenzimas, uma das quais também aparece em pecíolos de folhas tratadas com  $GA_3$ , três dias após o destacamento da folha. Estas isoenzimas que aparecem em pecíolos de folhas que não enraizam sugerem que sua atividade seja de AIA-oxidase, causando a oxidação de auxinas e inibindo, portanto, o enraizamento. Duas outras isoenzimas sofrem aumento significativo de atividade em pecíolos de folhas que enraizam. Este fato sugere que estas duas isoenzimas de peroxidase estejam envolvidas no processo de enraizamento.

As alterações na atividade da peroxidase nas lâminas foliares não são muito marcantes e ocorrem devido a alterações na atividade de determinadas isoenzimas pré-existent e não devido à formação de novas isoenzimas.

Conclui-se que não apenas as alterações histológicas como também as principais alterações metabólicas observadas durante o período estudado ocorrem nos pecíolos, algumas favorecendo e outras inibindo o processo de formação de raízes.

## VII. SUMMARY

Detached leaves of *Pereskia grandifolia* root easily when kept in light, not requiring any treatment with growth regulators. Rooting is inhibited when leaves are kept in the dark or treated with gibberellic acid.

The first histological changes observed in the petiole base that lead to the formation of a callus in this region take place between 48 and 72 hours after the detachment of the leaves from the mother plant, in all three treatments studied (light, dark, GA<sub>3</sub> in light).

Parenchima cells from the cortex, phloem and xylem go through dedifferentiation and become meristematic, contributing to the formation of the callus.

Formation of root primordia however occurs only in petioles of control leaves kept in light. In the calluses of these petioles a meristem is organized to give rise to the primordium apex, around the twelfth day of the experiment.

Analysis of carbohydrate contents present in leaf blades and petioles during the cultivation period shows greater variations in the petioles as compared to leaf blades.

The increase in the contents of both reducing and total sugars observed during the cultivation period was shown to be more intense in petioles of GA<sub>3</sub>-treated leaves than in control-leaves, whereas a decrease in the contents of these sugars was observed in petioles of dark treated leaves, in response to non-photosynthetic activity of these tissues.

Products of starch breakdown seem to be translocated from the leaf blades to the petioles, where starch content increases after the third day. GA<sub>3</sub> treated petioles show a higher but later increase in starch contents when compared to control petioles.

The possible inhibitory effect of high concentration of sugars in petioles of GA<sub>3</sub>-treated leaves is discussed. At the same time low concentrations of these same compounds - found in dark-treated petioles - may be a limiting factor for root differentiation, weighing the fact that an optimum sugar concentration seems to be important for rooting.

The main soluble sugars found in the petioles and leaf blades during the cultivation period were the same in all treatment studied: sacarose, arabinose, fructose, glucose, galactose.

As for the activity of peroxidase, it was shown that it is enhanced in the initial phases of the

experiment. This increase becomes greater in petioles of dark-treated leaves, partly due to the appearance of two new isoperoxidase bands, one of which also appeared in petioles of GA<sub>3</sub>-treated leaves, three days after the detachment of the leaves.

The appearance of new isoperoxidases in petioles of leaves in which rooting is inhibited, suggests their activity is actually of AIA-oxidase, causing the oxidation of auxins, therefore, inhibiting root initiation. Two different bands show an increase in activity in petioles of rooting, control-leaves. This fact suggests these 2 bands are involved in the rooting process.

The small variations in peroxidase observed in leaf blades are due to changes in activity of pre-existing bands and not to the formation of new ones.

It is concluded that not just the histological changes but also the main metabolic variations observed during the cultivation period occur in the petioles, not in the blades, some of which favoring, others inhibiting the process of root formation.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- ABELES, F.B., 1966. Auxin stimulation of ethylene evolution. *Plant Physiol.* 41:585-588.
- ALTMAN, A. & GOREN, R., 1971. Promotion of callus formation by abscisic acid in *Citrus* bud cultures. *Plant Physiol.* 47:844-846.
- ALTMAN, A. & WAREING, P.F., 1975. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of  $^{14}\text{C}$ -labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. *Physiol. Plant.* 33:32-38.
- ANAND, V.K., CHIBBAR, R.N. & NANDA, K.K., 1972. Effects of  $\text{GA}_3$  and IBA on rooting and on the sprouting of buds on stem cuttings of *Ipomoea fistulosa*. *Plant Cell Physiol.* 13:917-921.
- ANDREAE, W.A., VENIS, M.A., JURSIĆ, F. & DUMAS, T., 1968. Does ethylene mediate root growth inhibition by indole-3-acetic acid? *Plant Physiol.* 43:675-682.
- BACHELARD, E.P. & STOWE, B.B., 1962. A possible link between root initiation and anthocyanin formation. *Nature* 194:209-210.

- BASTIN, M., 1966. Root initiation, auxin level and biosynthesis of phenolic compounds. *Photochem. Photobiol.* 5:423-429.
- BATTEN, D.J. & MULLINS, M.G., 1978. Ethylene and adventitious root formation in hypocotyl segments of etiolated mung-bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) seedlings. *Planta* 138:193-197.
- BHATTACHARYA, N.C. & KUMAR, A., 1980. Physiological and biochemical studies associated with adventitious root formation in *Phaseolus mungo* L. in relation to auxin-phenol synergism. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 175:421-435.
- BIRECKA, H. & GALSTON, A.W., 1970. Peroxidase ontogeny in a dwarf pea stem as affected by gibberellin and decapitation. *J. Exp. Bot.* 21:735-745.
- BÖTTGER, M., 1974. Apical dominance in roots of *Pisum sativum* L.. *Planta* 121:253-261.
- BOUILLENNE, R., 1964. Aspects physiologiques de la formation des racines. *Bull. Soc. Roy. Belg.* 95:193-204.
- BOUILLENNE, R. & BOUILLENNE-WALRAND, M., 1947. Proposition d'une théorie de la rhizocaline. *Bull. Acad. Roy. Med. Belg. Cl. Sci.* 43:870-844.
- BOUILLENNE, R. & WENT, F.W., 1933. Recherches expérimentales sur la néoformation des racines dans les plantules et les

- boutures des plantes supérieures. Ann. Jard. Botan. Buitenzorg. 43:25-202.
- BRIAN, P.W., HEMMING, H.G. & RADLEY, M., 1955. A physiological comparison of gibberellic acid with some auxins. Physiol. Plant. 8:899-912.
- BRIAN, P.W., HEMMING, H.G. & LOVE, D., 1960. Inhibition of rooting of cuttings by gibberellic acid. Ann. Bot. 24: 407-419.
- BURG, S.P., 1962. The physiology of ethylene formation. Ann. Rev. Plant Physiol. 13:265-302.
- CARLSON, M.C., 1933. Comparative anatomical studies of Dorothy Perkins and American Pillar roses. I. Anatomy of canes. II. Origin and development of adventitious roots in cuttings. Contrib. Boyce Thompson Inst. Plant. Res. 5: 313-329.
- CARLSON, M.C., 1938. The formation of nodal adventitious roots in *Salix cordata*. Am. J. Bot. 25:721-725.
- CARPENTER, J.B., 1961. Occurrence and inheritance of preformed root primordia in stems of citron (*Citrus medica* L.). Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 77:211-218.
- CHADWICK, A.V. & BURG, S.P., 1967. An explanation of the inhibition of root growth caused by auxin. Plant Physiol. 42:415-420.

- CHAMPAGNAT, P., 1961. Différenciation. Formation des racines et des bourgeons. In W. Ruhland (ed.), Encycl. Plant Physiol. vol. 14. Springer-Verlag, Berlin, pp. 839-871.
- CHANDRA, G.R., GREGORY, L.E. & WORLEY, J.F., 1971. Studies on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyl. Plant Cell Physiol. 12:317-324.
- CHANDRA, G.R., WORLEY, J.F., GREGORY, L.E. & CLARK, H.D., 1973. Effect of 6-benzyladenine on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyl. Plant Cell Physiol. 14:1209-1212.
- CHIN, T., MEYER, M.M. & BEEVERS, L., 1969. Abscisic acid stimulated rooting of stem cuttings. Planta 88:192-196.
- CLARK, G., 1973. Staining procedures used by the biological stain commission. 418p. The Williams & Wilking Co., Baltimore.
- COLEMAN, W.K. & GREYSON, R.I., 1976. Root regeneration from leaf cuttings of *Lycopersicum esculentum* Mill.: application of the leaf plastochron index and responses of exogenous gibberellic acid. J. Exp. Bot. 27:1339-1351.
- COLEMAN, W.K. & GREYSON, R.I., 1977a. Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*Lycopersicum esculentum*) cultured *in vitro*. New Phytol. 78:47-54.

- COLEMAN, W.K. & GREYSON, R.I., 1977b. Analysis of root formation in leaf discs of *Lycopersicon esculentum* Mill. cultured *in vitro*. Ann. Bot. 41:307-320.
- COLEMAN, W.K., HUXTER, T.J., REID, D.M. & THORPE, T.A., 1980. Ethylene as an endogenous inhibitor of root regeneration in tomato leaf discs culture *in vitro*. Physiol. Plant. 48:519-525.
- DAVIS, B.J., 1964. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121:404-427.
- DAVIES, F.T.Jr. & JOINER, J.N., 1980. Growth regulator effects in adventitious root formation in leaf bud cuttings of juvenile and mature *Ficus pumila*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:91-95.
- DORE, J., 1965. Physiology of regeneration in cormophytes. In W. Ruhland (ed.), Handbuch der Pflanzenphysiologie. vol. 15. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-91.
- DUBOIS, M., GILLIES, K.A. HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 28:350-356.
- ELIASSON, L., 1978. Effects of nutrients and light on growth and root formation in *Pisum sativum* cuttings.

Physiol. Plant. 43:13-18.

ELIASSON, L., 1980. Interaction of light and auxin in regulation of rooting in pea stem cuttings. Physiol. Plant. 48:78-82.

ELIASSON, L. & BRUNES, L., 1980. Light effects on root formation in aspen and willow cuttings. Physiol. Plant. 48:261-265.

ENDO, T., 1968. Indoleacetate oxidase activity of horse radish and other plant peroxidase isozymes. Plant Cell Physiol. 9:333-341.

ERIKSEN, E.N., 1973. Root formation in pea cuttings. I. Effects of decapitation and disbudding at different developmental stages. Physiol. Plant. 28:503-506.

ESAU, K., 1965. Plant Anatomy. John Wiley and Sons, New York.

EVANS, H., 1953. Physiological aspects of the propagation of cacao from cuttings. Rep. 13<sup>th</sup> International Hort. Congr. 1952:1179-1190.

FERNQVIST, I., 1966. Studies on factors in adventitious root formation. Lantbrukshogskolans Ann. 32:109-244.

FLETCHER, R.A., PETERSON, R.L. & ZALIK, S., 1965. Effect of light quality on elongation, adventitious root production and the relation of cell number and cell size to

- bean seedling elongation. *Plant Physiol.* 40:541-548.
- FOSTER, A.S., 1934. The use of tannic acid and iron chloride for staining cell walls in meristematic tissues. *Stain Technol.* 9:91-92.
- GALSTON, A.W., 1948. On the physiology of root initiation in excised *Asparagus* stem tips. *Am. J. Bot.* 35:281-287.
- GALSTON, A.W., 1957. The experimental control of plant growth. In Went (ed.), *Biochemistry*. New York, pp. 315-328.
- GALSTON, A.W. & DALBERG, L.Y., 1954. The adaptative formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *Am. J. Bot.* 41:373-380.
- GALSTON, A.W., LAVEE, S. & SIEGEL, B.Z., 1968. The induction and repression of peroxidase isozymes by 3-indoleacetic acid. In F. Wightman and G. Setterfield (ed.), *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. Runge Press. Ottawa, pp. 455-472.
- GAUTHERET, R.J., 1969. Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.* 56:702-717.
- GIROUARD, R.M., 1969. Physiological and biochemical studies of adventitious root formation. Extractible rooting cofactors from *Hedera helix*. *Can J. Bot.* 47:687-699.

- GOODWIN, P.B. & MORRIS, S.C., 1979. Application of phyto hormones to pea roots after removal of the apex: effect on lateral root production. *Aust. J. Plant Physiol.* 6: 195-200.
- GORTER, C.J., 1968. Hormone translocation and rooting. In Y. Vardar (ed.), *Transport of Plant Hormones*. North Holland, Amsterdam, pp. 293-308.
- GREGORY, F.G. & SAMANTARAI, B., 1950. Factors concerned in the rooting responses of isolated leaves. *J. Exp. Bot.* 1: 159-193.
- HAISSIG, B.E., 1970. Influence of indole-3-acetic acid on adventitious root primordia of brittle willow. *Planta* 95: 27-35.
- HANSEN, J., 1976. Adventitious root formation induced by gibberellic acid and regulated by the irradiance to the stock plants. *Physiol. Plant* 36:77-81.
- HARTMAN, H.T. & KESTER, D.E., 1968. *Plant propagation, principles and practices*. Prentice Hall, London.
- HARTUNG, W., OHL, B. & KUMMER, V., 1980. Abscisic acid and the rooting of runner bean cuttings. *Z. Pflanzenphysiol.* 98:95-103.
- HEIDE, O.M., 1965. Interaction of temperature, auxins and kinins in the regeneration ability of *Begonia* leaf

cuttings. *Physiol. Plant* 18:891-920.

HEIDE, O.M., 1968. Stimulation of adventitious bud formation in *Begonia* leaves by abscisic acid. *Nature* 219: 960-961.

HESS, C.E., 1964. Naturally occurring substances which stimulate root initiation. In *Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale Paris; C.N.R.S.*, pp. 517-527.

HESS, C.E., 1969. Internal and external factors regulating root initiation. In W.J. Wittington (ed.), *Root Growth*. Butterworths, London, pp. 42-52.

HOWARD, B.H. & SYKES, J.Y., 1966. Regeneration of the hop plant (*Humulus lupulus* L.) from soft wood cuttings. II. Modification of the carbohydrate resources within the cutting. *J. Hort. Sci.* 47:155-163.

HUSS-DANELL, K., ELIASSON, L. & ÖHBERG, I., 1980. Conditions for rooting of leafy cuttings of *Alnus incana*. *Physiol. Plant* 49:113-116.

JARVIS, M.C. & DUNCAN, H.J., 1974. Paper chromatography of plant sugars. *J. Chromatogr.* 92:454-456.

JENSEN, W. A., 1955. The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 30:426-432.

- JOHANSEN, D.A., 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York.
- KAMÍNEK, M., 1969. Fractionation of proteins of pea stem sections during root formation and its inhibition by kinetin and ethionine. *Biol. Plant.* 11:86-94.
- KAWASE, M., 1964. Centrifugation, rhizocaline and rooting in *Salix alba* L. *Physiol. Plant.* 17:855-865.
- KAWASE, M., 1965. Etiolation and rooting in cuttings. *Physiol. Plant.* 18:1066-1076.
- KRISHNAMOORTHY, H.N., 1970. Promotion of rooting in mung bean hypocotyl cuttings with ethrel, an ethylene releasing compound. *Plant Cell Physiol.* 11:979-982.
- LAVEE, S. & GALSTON, A.W., 1968. Hormonal control of peroxidase activity in cultured *Pelargonium* pith. *Am. J. Bot.* 55:890-893.
- LEE, T.T., 1971. Cytokinin-controlled indoleacetic acid oxidase isoenzymes in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.* 47:181-185.
- LEE, T.T., 1972. Interaction of cytokinin, auxin and gibberellin on peroxidases isoenzymes in tobacco tissues cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 50:2471-2477.
- LEE, T.T., 1977. Role of phenolic inhibitors in peroxidase-mediated degradation of indole-3-acetic acid. *Plant*

Physiol. 59:372-375.

LEROUX, R., 1973. Contribution à l'étude de la rhizogenèse de fragments de tiges de Pois (*Pisum sativum* L.) cultivés *in vitro*. Rev. Cytol. Biol. Vég. 36:1-132.

LIBBERT, E., 1956a. Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. I. Die wirkungsweise einiger komponenten des, "Rhizokalinkomplexes". Flora 144:121-150.

LIBBERT, E., 1956b. Untersuchungen über Physiologie der Adventivwurzelbildung. II. Die korrelative beeinflussung der Adventivwurzelbildung durch andere organe, insbesondere durch die Wurzel. Planta 48:157-189.

LOEB, J., 1917. Influence of the leaf upon root formation and geotropic curvature in the stem of *Bryophyllum calycinum* and the possibility of a hormone theory of the processes. Bot. Gaz. 63:25-50.

LOOMIS, W.D. & BATTLE, J., 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry 5: 423-428.

LOVELL, P.H., ILLSLEY, A. & MOORE, K.G., 1972. The effects of light intensity and sucrose on root formation, photosynthetic ability, and senescence in detached cotyledons

of *Sinapis alba* L. and *Raphanus sativus* L.. Ann. Bot. 36:  
123-134.

LOVELL, P.H., ILLSLEY, A. & MOORE, K.G., 1973. The effect  
of sucrose on primordium development and on protein and  
RNA levels in detached cotyledons of *Sinapis alba* L. Ann.  
Bot. 37:805-816.

LOWRY, O.R., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.V.,  
1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193:265-275.

MCCUNE, D.C., 1961. Multiple peroxidases in corn. Ann. N.  
Y. Acad. Sci. 94:723-730.

MCCUNE, D.C. & GALSTON, A.W., 1959. Inverse effects of  
gibberellin on peroxidase activity and growth in dwarf  
strains of peas and corn. Plant Physiol. 34:416-418.

MILLER, C.O., 1961. Kinetin and related compounds in plant  
growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 12:395-408.

MINOCHA, S.C., 1979. The role of auxin and abscisic acid in  
the induction of cell division in Jerusalem Artichoke tuber  
tissue cultured *in vitro*. Z. Pflanzenphysiol. 92:431-441.

MOLNAR, J.M. & LA CROIX, J., 1972a. Studies of the rooting  
of cuttings of *Hydrangea macrophylla*: enzyme changes. Can.  
J. Bot. 50:315-322.

- MOLNAR, J.M. & LA CROIX, L.J., 1972b. Studies of the rooting of cuttings of *Hydrangea macrophylla*: DNA and protein changes. *Can J. Bot.* 50:387-392.
- MOORE, T.C., 1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag, New York.
- MOORE, K. & LOVELL, P., 1970. Control of rooting and the pattern of senescence in detached white mustard cotyledons. *Physiol. Plant.* 23:985-992.
- MOORE, K. & LOVELL, P., 1972. Rhizogenesis in detached cotyledons. *Physiol. Vég.* 10:223-235.
- MOORE, K., COBB, A. & LOVELL, P.H., 1972. Effects of sucrose on rooting and senescence in detached *Raphanus sativus* L. cotyledons. *J. Exp. Bot.* 23:65-74.
- MULLINS, M.G., 1972. Auxin and ethylene in adventitious root formation in *Phaseolus aureus* (Roxb.). In D.J. Carr (ed.), *Plant Growth Substances*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 526-532.
- NANDA, K.K. & ANAND, V.K., 1970. Seasonal changes in auxin effects on rooting of stem cuttings of *Populus nigra* and its relationship with mobilization of starch. *Physiol. Plant.* 23:99-107.
- NANDA, K.K., PUROHIT, A.N. & BALA, A., 1967. Effect of photoperiod, auxins and gibberellic acid on rooting of

stem cuttings of *Bryophyllum tubiflorum*. *Physiol. Plant* 20:1096-1102.

NANDA, K.K., JAIN, M.K. & MALHOTRA, S., 1971. Effect of glucose and auxins in rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*. *Physiol. Plant.* 24:387-391.

NANDA, K.K., ANAND, V.K. & CHIBBAR, R.N., 1972. The promotive effect of gibberellic acid on the production of adventitious roots on stem cuttings of *Ipomoea fistulosa*. *Planta.* 105:360-363.

NANDA, K.K., BHATTACHARYA, N.C. & KAUR, N.P. 1973a. Effect of morphactin on peroxidases and its relationship to rooting hypocotyl cuttings of *Impatiens balsamina*. *Plant Cell Physiol.* 14:207-211.

NANDA, K.K., JAIN, M.K. & BHATTACHARYA, N. C., 1973b. Rooting response of etiolate stem segments of *Populus nigra* to antimetabolites in relation to indole-3-acetic acid and glucose. *Biol. Plant.* 15:412-418.

NITSCH, J.P., 1963. The mediation of climatic effects through endogenous regulating substances. In Evans (ed.), *Environmental Control of Plant Growth*. New York, pp. 175-193.

OCKERSE, R., SIEGEL, B.Z. & GALSTON, A.W., 1966. Hormone induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. *Science* 151:452-453.

- OELSHLEGEL, F.J. Jr. & STAHMANN, M. A., 1973. II. The electrophoretic technique - a practical guide for its application. Bull. Torrey Botanical Club. 100:260-271.
- OPPENORTH, J.M., 1980. Formation of adventitious roots on green leaf cuttings of *Phaseolus vulgaris* L.. Ph.D. Thesis. Rijksuniversiteit.
- OSBORNE, D.J., 1962. Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium* leaves during senescence. Plant Physiol. 37:595-602.
- PIMENTEL GOMES, F., 1976. Curso de Estatística Experimental. 6 ed. Piracicaba, ESALQ.
- PRATT, H.K. & GOESCHL, J.D., 1969. Physiological roles of ethylene in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20:541-584.
- QUOIRIN, M., BOXUS, P. & GASPAR, T., 1974. Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. Physiol. Vég. 12:165-174.
- RADIN, J. W. & LOOMIS, R.S., 1969. Ethylene acid carbon dioxide in the growth and development of cultured radish roots. Plant Physiol. 44:1584-1589.
- RICHMOND, A. E. & LANG, A., 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. Science 125:650-651.
- SHANNON, J.C., 1968. A procedure for the extraction and

fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. Research Bull. (Purdue University) 842:2-8.

SHANNON, L.M., 1968. Plant isozymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 19:187-210.

SHAPIRO, S., 1958. The role of light in the growth of root primordia in stem of the Lombardy poplar. In K.V. Thimann (ed.), The Physiology of Forest Trees. Ronald Press, New York, pp. 445-465.

SIEGEL, B.Z. & GALSTON, A.W., 1967. The isoperoxidases of *Pisum sativum*. Plant Physiol. 42:221-226.

SKOOG, F. & MILLER, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.

SMITH, A.I., 1936. Adventitious roots in stem cuttings of *Begonia maculata* and *B. semperflorens*. Am. J. Bot. 23: 511-515.

SMITH, D.R. & THORPE, T.A., 1975a. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. I. Developmental sequence. J. Exp. Bot. 26:184-191.

SMITH, D.R. & THORPE, T.A., 1975b. Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. II. Growth regulators interactions. J. Exp. Bot. 26:193-202.

SOMOGYI, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160:61-63.

- SPANJERSBERG, G. & GAUTHERET, R.J., 1963. Recherches sur la production de racines par les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. 88<sup>ème</sup> Congr. Soc. Sav.:407-425.
- STEWART, F.C., MAPES, M.O., KENT, A.E. & HOLSTEN, R.D., 1964. Growth and development of cultured plant cells. *Science* 143:20-27.
- STOLTZ, L.P., 1968. Factors influencing root initiation in an easy- and a difficult-to-root *Chrysanthemum*. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 92:622-626.
- STRÖMQUIST, L.H. & ELIASSON, L., 1979. Light inhibition of rooting in norway spruce (*Picea abies*) cuttings. *Can. J. Bot.* 57:1314-1316.
- STUART, N.W., 1938. Nitrogen and carbohydrate metabolism of kidney bean cuttings as affected by treatment with indole acetic acid. *Bot. Gaz.* 100:298-311.
- THIMANN, K.V., 1977. Hormone action in the whole life of plants. The University of Massachusetts Press, Amherst.
- THORPE, T.A. & MURASHIGE, T., 1968. Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. *Science* 160:421-422.
- TORREY, J.G., 1950. The induction of lateral roots by indoleacetic acid and root decapitation. *Am. J. Bot.* 37:257-264.

- TORREY, J.G., 1962. Auxin and purine interactions in lateral root initiation in isolated pea root segments. *Physiol. Plant* 15:177-185.
- TORREY, J.G., 1965. Physiological bases of organization in the root. In W. Ruhland (ed.), *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. vol. 15. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1296-1327.
- TORREY, J.G., 1966. The initiation of organized development in plants. *Adv. Morphogenesis* 5:39-91.
- TREVELYAN, N.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S., 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166:444-445.
- Van OVERBEEK, J. & GREGORY, L.E., 1945. A physiological separation of two factors necessary for the formation of roots in cuttings. *Am. J. Bot.* 32:336-341.
- Van OVERBEEK, J., GORDON, S.A. & GREGORY, L.E., 1946. An analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings. *Am. J. Bot.* 33:100-107.
- VARGA, M. & HUMPHRIES, E.C., 1974. Root formation on petioles of detached primary leaves of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) pretreated with gibberellic acid, triiodo benzoid acid and cytokinins. *Ann. Bot.* 38:803-807.
- VEIERSKOV, B., HANSEN, J. & ANDERSEN, A.S., 1976. influ

- ence of cotyledon excision and sucrose on root formation in pea cuttings. *Physiol. Plant* 36:105-109.
- YANG, S.F., 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethyl phosphonic acid. *Plant Physiol.* 44:1203-1204.
- YELENOSKY, G. & GUY, C.L., 1977. Carbohydrate accumulation in leaves and stems of "Valencia" orange at progressively colder temperatures. *Bot. Gaz.* 138:13-17.
- YONEDA, Y. & ENDO, T., 1970. Peroxidase isozymes and their indoleacetate oxidase activity in the Japanese morning glory, *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.* 11:503-506.
- WELLS, W.A. & RIOPEL, J.L., 1972. *In vitro* studies of adventitious rooting in *Convolvulus sepium* L.. *Bot. Gaz.* 133:325-330.
- WENTH, F.E. & THIMANN, K.V., 1937. *Phytohormones*. The Mac Millan Co., New York.
- WIGHTMAN, F. & THIMANN, K.V., 1980. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. I. Sources of primordia-inducing substances in the primary root of pea seedlings. *Physiol. Plant.* 49:13-20.
- WIGHTMAN, F., SCHNEIDER, E.A. & THIMANN, K.V., 1980. Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots. II. Effects of exogenous growth factors on lateral root formation in pea roots. *Physiol. Plant.* 49:304-314.

- WILCOX, H., 1955. Regeneration of injured root systems in noble fir. Bot. Gaz. 116:221-234.
- ZAIDAN, L.B.P., 1976. Enraizamento de folhas de *Pereskia grandifolia* Haward. Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina. 91 pp.
- ZAIDAN, L.B.P. & VALIO, I.F.M., 1977. Rooting of detached leaves of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). Z. Pflanzenphysiol. 83:25-33.
- ZENK, M.H. & MULLER, G., 1963. *In vivo* destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. Nature 200:761-763.
- ZIMMERMANN, P.W. & HITCHCOCK, A.E., 1929. Vegetative propagation of holly. Am. J. Bot. 16:556-570.