



LÚCIA HELENA PEGOLO GAMA

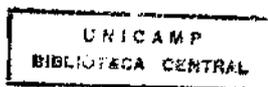
DESENVOLVIMENTO DO BOTÃO FLORAL DE *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL: CONTROLE AMBIENTAL E HORMONAL

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por (a) *Lúcia Helena Pegolo Gama* e aprovada pela Comissão Julgadora. *15/10/96 Maria de Fátima D. Aleixo*

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima D. Aleixo Pereira

Campinas - SP
1996



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TUNICAMP
	G14d
V.º	29007
PREÇO	667/96
	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> X
PREÇO	288,00
DATA	05/11/96
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G14d

Gama, Lúcia Helena Pegolo
Desenvolvimento do botão floral de *Rhododendron
simsii* cv. Helmut Vogel : controle ambiental e hormonal /
Lúcia Helena Pegolo Gama. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Maria de Fátima Domingos Aleixo Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

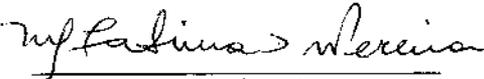
1. Azalea. 2. Fotoperiodismo vegetal. 3. Hormônios
vegetais. 4. Azalea - Floração. 5. Vernalização. I. Pereira,
Maria de Fátima Domingos Aleixo. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 15 de outubro de 1996.

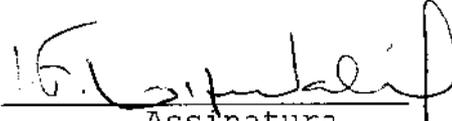
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

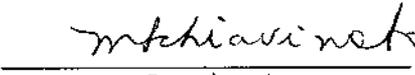
Profa.Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira


Assinatura

Prof.Dr. Ivany F. M. Válio


Assinatura

Profa.Dra. Marlene A. Schiavinato


Assinatura

SUPLENTE:

Prof.Dr. Jorge Vega

Assinatura

Ao Paulo, meu amigo e companheiro,
aos meus pais, Fred e Azélia,
aos meus irmãos, Beto e Cláudia.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira pela orientação dada a este trabalho.

Ao Dr. Ivany F. M. Válio, à Dra. Marlene Aparecida Schiavinato e ao Dr. Jorge Vega pelas sugestões dadas por ocasião da pré-banca.

Ao Sr. Vagner Alves Carvalho, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio técnico no uso do Microscópio Eletrônico de Varredura.

À Sra. Dora Schreurs de Wit, gerente de produção da Empresa de Wit Plantas LTDA. por ceder o material utilizado neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), e ao Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa (FAEP), pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos, pela apoio e incentivos dedicados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Paulo pelo carinho, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Índice

	página
I- Resumo.....	i
II- Abstract.....	iii
III- Introdução.....	1
IV- Objetivo... ..	14
V- Material e Métodos....	15
1- Material.....	15
2- Métodos de trabalho.....	15
2.1- Cultivo.....	15
2.2- Determinação dos estádios de desenvolvimento do ápice de azaléia.....	16
2.3- Fotoperíodo.....	16
2.4- Vernalização.....	17
2.5- Tratamento com (GA ₃) ácido giberélico.....	17
2.6- Tratamento com retardante de crescimento.....	18
2.7- Medidas do botão floral.....	18
2.8- Antese.....	18
2.9- Extração e fracionamento de substâncias giberelínicas...19	
2.9.1- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)..22	
2.9.2- Cromatografia em camada delgada(TLC).....23	
2.10- Detecção de substâncias giberelínicas	24
2.10.1- Bioteste do alongamento do hipocótilo de alface.24	
2.10.2- Teste químico para detecção de substâncias giberelínicas.....	24
2.11- Análise Estatística.....	25

VI- Resultados.....	26
1- Caracterização do ápice.....	26
2- Efeito do tratamento de frio (vernalização) e interação com fotoperíodo.....	28
3- Efeito do tratamento com ácido giberélico e interação com fotoperíodo.....	30
4- Efeito do tratamento com cicocel.....	45
5- Extração de substâncias giberelínicas.....	51
VII- Discussão.....	55
VIII- Bibliografia.....	65

RESUMO

Rhododendron simsii é uma espécie ornamental, tendo uma grande importância comercial. Esta espécie apresenta dormência do botão floral. O objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento do botão floral e o tempo médio de antese desta espécie, mais especificamente da cultivar Helmut Vogel, examinando a influência de baixas temperaturas (vernalização), fotoperíodo, ácido giberélico e cicocel, bem como estudar o envolvimento de substâncias giberelínicas endógenas. Foi também construída uma escala, demonstrando vários estádios de desenvolvimento do botão floral, que abrange do estágio vegetativo até o floral completo.

Os tratamentos com baixas temperaturas ou GA₃, promoveram o desenvolvimento e a quebra da dormência do botão floral e conseqüentemente o tempo para antese foi diminuído. A vernalização pode ser substituída por tratamento com ácido giberélico, sendo que foi verificado que a concentração e o momento de aplicação de ácido giberélico influenciam a resposta. Em relação ao fotoperíodo, quando este apresentou influência, dias longos (DL) foi o fotoperíodo promotor. O tratamento com cicocel evidenciou o envolvimento de substâncias giberelínicas nos processos estudados, pois as plantas que foram tratadas com cicocel demonstraram menor desenvolvimento do botão floral e atraso na antese, quando comparados com plantas que não foram tratadas com cicocel. O envolvimento de

substâncias com atividade giberelínica foi também demonstrado através da análise cromatográfica e bioensaios de extratos de folhas de plantas logo após serem vernalizadas.

Os resultados sugerem que o controle do desenvolvimento do botão floral em *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel, pode ser controlado pelo tratamento de vernalização e a ação deste envolve alterações nos níveis de substâncias giberelínicas.

ABSTRACT

Rhododendron simsii is a species considered ornamental and has a great commercial importance. This species presents dormancy in its floral bud. The objective of this study was the observation of the floral bud development and the average time for the species anthesis, more specifically for the Helmut Vogel cv., through the investigation of the influences of the low temperatures (vernalization), photoperiod, gibberellic acid and cycocel, as well as studying the involvement of endogenous gibberellic substances. A scale was also built, showing several stages of the floral bud development, which comprises from the vegetative stage to the complete floral stage.

The treatments with low temperatures or GA₃ promoted greater development and the breaking flower bud dormancy, and consequently the anthesis time was decreased. The vernalization could be substituted through gibberellic acid treatment. However, it was observed that the concentration and the time of the gibberellic acid application do influence the result. Regarding the photoperiod, when it showed influence, the photoperiod promoter was the LD. The cycocel treatment proved the influence of the gibberellinic substances in the studied processes, since the plants which were treated with cycocel showed lower floral bud development and the delay of the anthesis, when compared with control plants.

Substances with gibberellinic activity were demonstrated when extracted from plant leaves just after they had been vernalized.

These results suggest the participation of gibberellinic substances influencing the bud development and the breaking dormancy, speeding up the anthesis. The vernalization treatment is involved in the control of these substances.

INTRODUÇÃO

As azaléias são plantas de grande importância comercial, devido à sua utilização como plantas ornamentais. Pertencem ao gênero *Rhododendron* (família Ericaceae) que é constituído de mais de 800 espécies e milhares de variedades. São provenientes da Ásia, América do Norte e Europa (CRILEY, 1985; BODSON, 1989).

A literatura é abundante em relação a esse gênero, abordando geralmente aspectos de técnicas de cultivo, não enfocando questões fisiológicas.

A espécie estudada foi *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel (Azaléia), uma das espécies mais cultivadas comercialmente em vasos.

A maioria das azaléias exploradas comercialmente é híbrida, de folhas persistentes, cultivadas em casa de vegetação (BODSON, 1989).

O processo de floração é um mecanismo fundamental para a perpetuação da espécie, pois é o primeiro passo para o sucesso da reprodução sexuada. Este sucesso é um dos maiores desafios para as plantas, já que são organismos sésseis sujeitos às variações ambientais. Para o controle eficaz da reprodução sexuada, as plantas têm desenvolvido sofisticados mecanismos internos.

Apesar da floração ser um processo único e integrado, este termo é muito abrangente (BERNIER, 1988). Dada a abrangência, o

processo pode ser dividido em duas fases: 1^o - indução, evocação e iniciação floral, 2^o - desenvolvimento do ápice e botão floral até a antese.

A iniciação floral é precedida pela indução e evocação.

Os mecanismos de indução e a natureza química do estímulo são problemas ainda não resolvidos no estudo do desenvolvimento floral (CLELAND, 1978; O'NEILL, 1992). Em muitas espécies, fatores do ambiente, como fotoperíodo e temperatura baixa (vernalização), são importantes como fatores da indução (BERNIER, 1971). No entanto, em algumas espécies, estes fatores ambientais não estão envolvidos na floração, ou seja as plantas são indiferentes a estes estímulos. Neste caso, a floração parece ser influenciada por fatores intrínsecos das plantas.

Há evidências da participação de substâncias de crescimento no processo de evocação floral.

Os fatores que promovem a floração são percebidos por diferentes partes da planta, isto indica que estas partes interagem entre si. Assim, o meristema apical permanecendo vegetativo ou tornando-se floral, é controlado por sinais a longa distância a partir da planta inteira (BERNIER *et al.*, 1981).

Julio Sachs, no século 19, foi o primeiro a propôr a existência de substâncias específicas formadoras de flores (BERNIER *et al.*, 1993). Em 1937, Chailakhyan propôs que a substância envolvida na floração era de natureza hormonal, a qual denominou de florígeno (VINCE-PRUE, 1975). Apesar das inúmeras tentativas apresentadas na literatura o florígeno não foi

identificado. SEIDLOVÁ (1985) sugere o envolvimento de fatores hormonais, como resultado de indução fotoperiódica para reorganização do crescimento apical. Muitas pesquisas tem sido realizadas para a identificação química de substâncias, bem como seu envolvimento no processo de transição floral.

Várias teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo do controle químico da transição para o florescimento. Uma delas, que já é clássica, é o conceito florigeno/antiflorígeno (LANG, 1984, citado por BERNIER *et al.*, 1993). A segunda tem como hipótese o transporte de nutrientes, modificando a relação fonte/dreno dentro da planta, após a indução (SACHS & HACKETT, 1977). E, finalmente, a teoria multifatorial, sugerindo que muitas substâncias químicas, como fitormônios e fotoassimilados, participariam da indução floral (BERNIER *et al.*, 1993). METZGER (1987) sugere que o estímulo seria determinado pelo balanço de hormônios e fotoassimilados que chegam ao ápice numa sequência específica.

Acredita-se que a indução floral ocorra somente quando todas as substâncias estiverem presentes no ápice, no tempo correto e nas concentrações adequadas. A interação entre estas diferentes substâncias pode ser mais importante do que a presença, em caráter absoluto, de qualquer uma delas. Assim, cada substância por si só não vai atuar necessariamente na mesma direção em todas as partes da planta (BERNIER, 1988). O conteúdo, o metabolismo e/ou a distribuição de substâncias, mudam durante a

transição floral e isto leva a crer que estas mudanças estão diretamente ligadas ao desenvolvimento (BERNIER *et al.*, 1981).

Os eventos que ocorrem no ápice culminando com a iniciação floral são denominados evocação, que é um período onde ocorrem alterações moleculares e celulares irreversíveis nos níveis de organização do ápice. Essas mudanças ocorrem em uma determinada sequência, interagindo entre si em alguns passos da transição floral, levando à morfogênese floral (BERNIER, 1988).

A morfogênese floral é um processo complexo, no qual ocorrem transformações do meristema vegetativo para meristema floral, após a chegada do estímulo floral.

As transformações em tamanho e forma que ocorrem no domo apical, são as marcas mais evidentes de transição para desenvolvimento floral. Estas transformações diferem de espécie para espécie (VINCE-PRUE, 1975).

Em girassol (*Helianthus annuus*) o domo apical na fase vegetativa apresenta-se completamente plano. Com o início da transição floral, o domo apresenta um leve arredondamento e posteriormente, ainda na fase de transição floral, ele volta a assumir uma forma achatada (ALMEIDA, 1992). Em *Stevia rebaudiana*, o meristema na fase reprodutiva é um domo com marcante arredondamento, em contraste com o meristema vegetativo que é um domo levemente arredondado (MONTEIRO & GIFFORD Jr., 1988). O mesmo padrão é encontrado em *Arachis hypogaea* (ARMANDO Jr., 1990).

Em plantas induzidas, com a chegada do estímulo floral ocorre o aumento na taxa de divisão celular no domo apical. Em algumas delas isto ocorre antes de qualquer outra mudança morfológica ou química (SEIDLOVÁ, 1985). O ápice passa de uma forma de crescimento repetitivo indeterminado de iniciação de folhas (característica de ápice vegetativo) para um modo sequencial de crescimento e iniciação floral (LYNDON & BATTEY, 1985).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar como grupos de células indiferenciadas se desenvolvem em órgãos florais (COEN & CARPENTER, 1992).

Segundo GREPPIN *et al.* (1995), mensageiros químicos ativam uma cascata de reações biológicas e biofísicas levando sinais até as células alvo, as células meristemáticas.

O desenvolvimento do botão floral é o processo que ocorre entre a iniciação floral e a antese (METZGER, 1987). Segundo KINET *et al.* (1985), este processo também é influenciado por fatores ambientais e endógenos. Existem poucos trabalhos tratando da influência destes fatores no desenvolvimento do botão floral até a antese. Os trabalhos tratam mais dos aspectos relacionados com a ontogênese do botão floral.

Os botões florais de azaléias passam por um período de dormência durante seu desenvolvimento (CRILEY, 1985).

A dormência do botão floral é um fenômeno que consiste na redução do desenvolvimento e de sua atividade metabólica, mesmo em condições de temperatura e luminosidade suficientes para o

crescimento (BODSON, 1989). Botões florais de muitas espécies entram em dormência, sendo que o estágio de desenvolvimento das flores no início da dormência varia de espécie para espécie (KINET *et al.*, 1985). Esta avaliação tem sido aplicada para sementes e gemas vegetativas, embora pouco seja conhecido sobre a relação entre o desenvolvimento de primórdios florais e a dormência (LUNA *et al.*, 1990). Se a dormência não é quebrada por um tratamento apropriado, ela conduzirá ao aborto da inflorescência ou a uma grande heterogeneidade do desenvolvimento posterior dos botões até a antese (BODSON, 1989). Segundo MASIA (1993), a indução da dormência e seu término estão ligados às modificações que ocorrem principalmente a nível do botão.

A vernalização é importante para o desenvolvimento dos botões florais dormentes. Para produzir rápido crescimento sob condições favoráveis, a dormência do botão pode ser quebrada por exposição a baixas temperaturas, embora o frio não seja sempre uma exigência absoluta para o desenvolvimento até a antese (KINET *et al.*, 1985). A duração do tratamento suficiente para satisfazer a necessidade de temperaturas baixas (vernalização) varia largamente entre espécies e até mesmo dentro de uma espécie (POWEL, 1987).

A importância do tratamento de vernalização para acelerar a quebra da dormência do botão floral de algumas angiospermas lenhosas está bem estabelecida. As temperaturas mais efetivas para a quebra da dormência variam entre 0 e 5°C e a duração do tratamento depende da espécie e da cultivar (BASCONSUELO, 1995).

O tratamento de vernalização é feito em azaléias cultivadas, a fim de se obter quebra da dormência do botão floral e antese homogênea das flores. Em azaléias, a dormência do botão floral é quebrada depois de 4 a 6 semanas em resfriamento natural no campo ou estocagem artificial em câmaras frias (POST, 1942 citado por CRILEY, 1985). PETERSEN & KRISTOFFERSEN (1969), observaram que em azaléias "Red Wing" e "Reinhold Ambrosius" a exposição de plantas com botões florais a baixas temperaturas antecipa e uniformiza o florescimento.

Segundo KINET *et al.* (1985), após o período de frio para a quebra da dormência do botão floral de muitas espécies, tratamentos com temperaturas mais altas aceleram a antese.

O comprimento do dia (fotoperíodo) tem um envolvimento importante no controle da dormência do botão floral em muitas espécies. Dependendo da espécie estudada e do estágio de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos o comprimento do dia crítico pode variar (KINET *et al.*, 1985).

A vernalização interage fortemente com condições de luz. Em algumas plantas fotoperiódicas o tratamento com baixas temperaturas pode predominar ao requerimento do comprimento do dia para o desenvolvimento do botão floral. Segundo BODSON (1989), dias longos e baixas temperaturas atrasam a iniciação floral, mas promovem desenvolvimento da inflorescência para antese em azaléias.

Alguns autores sugerem que a influência desses fatores ambientais estão ligados às giberelinas.

Segundo MASIA *et al.* (1993), diferentes classes de fitormônios são importantes fatores para quebra da dormência, embora muitos mecanismos envolvendo a indução e término da dormência de botões e gemas precisem ser elucidados.

A presença de fitormônios na estrutura reprodutiva e mudanças nas suas concentrações durante o desenvolvimento (combinado com respostas de tratamento exógeno), sugerem que estas substâncias têm uma função essencial no controle de desenvolvimento de flores (KINET *et al.*, 1985).

É preciso enfatizar que os hormônios não agem sozinhos, mas em conjunto, representando uma rede de eventos do balanço hormonal (POWEL, 1987).

A literatura apresenta auxinas, giberelinas, etileno e citocininas como fatores envolvidos no desenvolvimento de plantas. Esses multifatores fisiológicos complicam os estudos pois em adição às concentrações endógenas, sua ação pode ser afetada por razões relativas de síntese e destruição de formas ativas, combinadas com a formação e a hidrólise de formas conjugadas inativas (GREYSON, 1994).

As giberelinas são um grupo de hormônios com importantes funções fisiológicas, que controlam uma série de processos do crescimento e desenvolvimento da planta, entre eles as diferentes fases da floração (YAMAGUCHI *et al.*, 1982; CROZIER, 1983; GRAEBE, 1987). Segundo KINET *et al.* (1985) as giberelinas são notáveis em diminuir o tempo para a antese do botão floral, quebrando sua

dormência e/ou aumentando o tamanho das flores, evitando aborto e murcha em várias espécies.

Sabe-se que diferentes giberelinas estão envolvidas em diferentes processos, em diferentes espécies de plantas (SPONSEL, 1985).

Alguns autores sugerem que a influência da vernalização e do fotoperíodo está ligada à giberelina. HAZEBROEK *et al.* (1993), trabalhando com *Thlaspi arvense* L., sugerem que a vernalização ativa um ou mais passos da biossíntese de giberelinas e desta forma uma giberelina específica acumula-se acima de um determinado limiar e o crescimento do caule é iniciado. ZANEWICH & ROOD (1995), demonstraram a influência da vernalização na concentração e metabolismo de giberelinas atuando no crescimento do caule de *Brassica napus* cv. Crystal.

Estudos realizados em plantas que apresentam dormência do botão floral mostram a relação entre vernalização e giberelina. Em geral a aplicação de giberelina substitue o tratamento de frio (vernalização). A aplicação de giberelina pode substituir, pelo menos em parte, a necessidade da vernalização em botões de damasco e pêssago (HATCH & WALKER, 1969 citado por POWEL, 1987).

Aplicações de giberelinas em azaléia favorecem a quebra da dormência, mas nem sempre são eficazes. O sucesso do tratamento depende da cultivar (LARSON & SYDNOR, 1971; BROWN, 1972) ou das condições ambientais (PEMBERTON & WILKINS, 1985).

Em azaléia cultivar Glória, foi demonstrado maior desenvolvimento das flores de plantas tratadas com 6 semanas de

frio que daquelas que receberam 4 semanas de frio seguido de aplicação de ácido giberélico (GA_3) (BLACK et al., 1990). Por outro lado, segundo JOINER et al. (1982/1983), tanto a aplicação de GA_3 ou GA_{4+7} , como o tratamento de frio quebram dormência do botão floral em "Red Wing" e "Alaska". Ainda foi mostrado um aumento nos níveis de substâncias giberelínicas em flores tratadas com frio até estas serem removidas do tratamento.

A relação entre fotoperíodo e giberelina foi sugerida por alguns autores (METZGER & ZEEVAART, 1982; ZEEVAART, 1971). Alguns trabalhos com azaléia relacionam a quebra da dormência do botão floral com vernalização, fotoperíodo e tratamento com giberelina. BROWN & BOX (1971) observaram que azaléias "Red Wing" e "Alaska" floresceram mesmo sem o tratamento de frio, quando foram tratadas com dias curtos (9 horas) seguido de dias longos (18 horas) e mantidas a 18°C.

Nem todos os cultivares de azaléias são igualmente sensíveis ao fotoperíodo. Assim, esse fator e suas interações com outros fatores ambientais e endógenos têm que ser estudados.

Segundo BASCONSUELO et al. (1995) o tratamento de frio, em plantas de pêssigo, acelera o desenvolvimento das gemas florais, enquanto o tratamento de GA_3 atrasa este desenvolvimento e pode retardar a quebra da dormência destas gemas. Nesta espécie, LUNA et al. (1990) verificaram que enquanto os botões florais estão dormentes e seu desenvolvimento é incompleto, há concentrações relativamente altas de giberelinas livres, mas com o botão

próximo ao final da dormência há uma diminuição nas concentrações de giberelinas.

A antecipação do florescimento depois do tratamento com giberelina não é encontrada em todas as espécies. O estágio de desenvolvimento, quando da aplicação, a concentração e o tipo de giberelina, podem influenciar a resposta. Segundo ALMEIDA & PEREIRA (1996), o tempo de aplicação de ácido giberélico foi mais crítico do que a quantidade de ácido giberélico aplicada, para iniciação e desenvolvimento do ápice floral em *Helianthus annuus* L.

Alterações nas concentrações endógenas de substâncias giberelínicas em diferentes fases do desenvolvimento do botão floral, têm sido descritas em várias espécies. MURAKAMI (1973) demonstrou que pétalas de *Pharbitis nil* contém quantidades relativamente altas de substâncias giberelínicas e que a concentração máxima é alcançada 12 horas antes da antese, antes das pétalas alcançarem o comprimento final e a maior massa fresca. O crescimento do tubo floral foi fortemente inibido após a remoção da antera, mas após a aplicação de GA₃ seu crescimento foi estimulado. Desta forma MURAKAMI (1975) sugere que a antera seja fonte de substâncias de crescimento e as giberelinas podem estar entre estas substâncias.

O crescimento da corola em *Gaillardia grandiflora* é acompanhado por um aumento da atividade giberelínica, sendo que a interação de múltiplos hormônios no controle deste processo parece não ser importante (KONING, 1984). Por outro lado, RAAB &

KONNING (1987), apontaram que a expansão da corola em *Ipomoea nil* parece ser iniciada por mudanças no balanço entre substâncias hormonais como giberelinas e etileno, 2 dias antes da antese.

A relação entre o efeito de giberelinas e o estágio de desenvolvimento no momento da aplicação, foi estudada por BODSON (1986) em azaléias. Foi verificado que a aplicação de GA₄₊₇ nos estádios iniciais de desenvolvimento do botão inibe o seu desenvolvimento, e quando esse tratamento é realizado em botões florais já visíveis ocorre uma antecipação da antese. A antecipação da antese em resposta ao tratamento com giberelinas é frequentemente obtida em espécies bulbosas e lenhosas, onde os botões florais têm um período de dormência (KINET *et al.*, 1985).

Alguns estudos têm sido realizados com a aplicação de retardantes de crescimento para verificar o envolvimento de giberelinas em determinados processos de desenvolvimento de plantas. Aplicações de CCC em tomate, antes da iniciação floral ou depois dos botões florais estarem visíveis, reduziram o aborto em plantas mantidas em altas temperaturas e baixa irradiância. O efeito de CCC sobre o florescimento em tomate é mediado em parte pela redução de níveis endógenos de giberelinas (ABDUL *et al.*, 1978).

Na produção de azaléias em vaso, um dos tratamentos realizados é a aplicação de retardantes de crescimento para inibir o alongamento da parte aérea.

Dentre os retardantes de crescimento conhecidos, cicocel, fosfon D, AMO 1618 ancymidol, tetyclacis, paclobutrazol,

uniconazol, inibem biossíntese de giberelinas, bloqueando ciclização no geranylgeranyl pirofosfato (RADEMACHER, 1992). Os principais retardantes de crescimento utilizados em azaléias são o paclobutrazol e o cicocel (STUART, 1961; KEEVER & FOSTER, 1991).

WILKINSON & RICHARDS (1991) concluíram que para *Rhododendron* "Sir Robert Peel" uma única dose de paclobutrazol 500mg/L pulverizado é o mais conveniente para o uso comercial.

OBJETIVOS

A proposta deste trabalho foi caracterizar as alterações morfológicas ocorridas nos ápices de *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel (azaléia), quando da transição do ápice vegetativo para floral. Objetivou-se também, estudar o desenvolvimento do botão floral até a antese, examinando a influência de tratamentos de frio (vernalização), fotoperíodo, GA₃ e cicocel, bem como, a análise de níveis endógenos de substâncias giberelínicas envolvidas neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - MATERIAL

Foram utilizadas plantas de *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel (Azaléia) cedidas pela Empresa "de Witt Plantas Ltda" (Holambra). As plantas foram retiradas em diferentes etapas de desenvolvimento.

O desenvolvimento floral foi acompanhado até a antese. Em cada ápice desenvolve um conjunto de 3 flores. Este conjunto foi, neste trabalho, denominado de botão floral.

2 - MÉTODOS

2.1 - CULTIVO

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação do Departamento de Fisiologia Vegetal (UNICAMP), utilizando-se 10 repetições por tratamento. As plantas foram regadas diariamente e adubadas semanalmente com solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1938). O substrato utilizado para o desenvolvimento das plantas era composto de casca de pinheiro, xaxim e areia grossa.

2.2 - DETERMINAÇÃO DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO ÁPICE DE AZALÉIA

Os ápices de azaléia foram dissecados sob microscópio estereoscópico, para determinação do seu estágio de desenvolvimento. Para tanto, utilizou-se uma escala de 5 estádios, que está ilustrada na figura 1, obtida através de micrografias em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL MOD. JSMT - 300 e operado a 5 KV. O material foi fotografado a fresco utilizando-se 5mm apicais.

A descrição dos estádios foi baseada em alguns trabalhos, com espécies e/ou cultivares de azaléias diferentes, realizados por alguns autores como, CRILEY, 1969; GODKIN & BALLANTYNE, 1970; PETERSEN, 1972; BODSON, 1983.

2.3 - FOTOPERÍODO

Para o tratamento fotoperiódico, foram utilizados dias longos (DL)- 18 horas de luz diárias ou dias curtos (DC)-8 horas de luz diárias. Em DL, devido ao fotoperíodo natural de Campinas variar entre 10,5 a 13,5 horas durante o ano, o fotoperíodo foi complementado com luz artificial de baixa irradiância, utilizando-se lâmpadas incandescentes (53 W.m^{-2}). Em DC, as bancadas, suporte das plantas, foram cobertas com pano preto opaco para impedir a entrada de luz além das 8 horas

diárias. Essas plantas foram mantidas em temperatura ambiente, na casa de vegetação.

2.4 - VERNALIZAÇÃO

O tratamento de vernalização foi realizado na Empresa "de Witt Plantas Ltda", onde as plantas foram mantidas em câmara fria (4°C) por 6 semanas, dentro de caixotes de madeira, no escuro.

2.5 - TRATAMENTO COM GA₃ (ÁCIDO GIBERÉLICO)

O ácido giberélico (GA₃) foi aplicado nos botões florais em tempos e concentrações diferentes, que serão especificados no texto.

As aplicações foram feitas semanalmente, exceto em um dos experimentos onde GA₃ foi aplicado a cada duas semanas, em 4 botões florais por vaso, até atingirem a antese. Os botões foram envolvidos com pequenos chumaços de algodão, e com auxílio de um conta-gotas o algodão foi umedecido com ácido giberélico (por volta de 6 gotas de GA₃).

Os vasos possuíam 4 plantas, sendo que foram selecionados e marcados um botão floral por planta. O botão selecionado foi o do ramo mais desenvolvido.

2.6 - TRATAMENTO COM RETARDANTE DE CRESCIMENTO

Foi utilizado cicocel, na concentração recomendada para o cultivo comercial (3465 mg.L^{-1}). As plantas foram pulverizadas com cicocel com auxílio de uma bomba manual de pulverização, até que as folhas estivessem visualmente molhadas. Esse tratamento foi feito semanalmente, durante 8 semanas.

2.7 - MEDIDAS DO BOTÃO FLORAL

Botões florais previamente marcados, no total de 4 botões por vaso foram medidos semanalmente até a antese.

O comprimento do botão floral foi medido com papel milimetrado, do ápice ao final da escama de proteção externa.

A largura do botão floral foi determinada medindo-se o maior diâmetro do botão com o auxílio de um paquímetro.

2.8 - ANTESE

O processo de antese (abertura das flores) foi avaliado contando-se diariamente o número de botões florais que apresentavam as pétalas visíveis (início da antese) até completar 100% de antese, quando todas as flores estavam abertas.

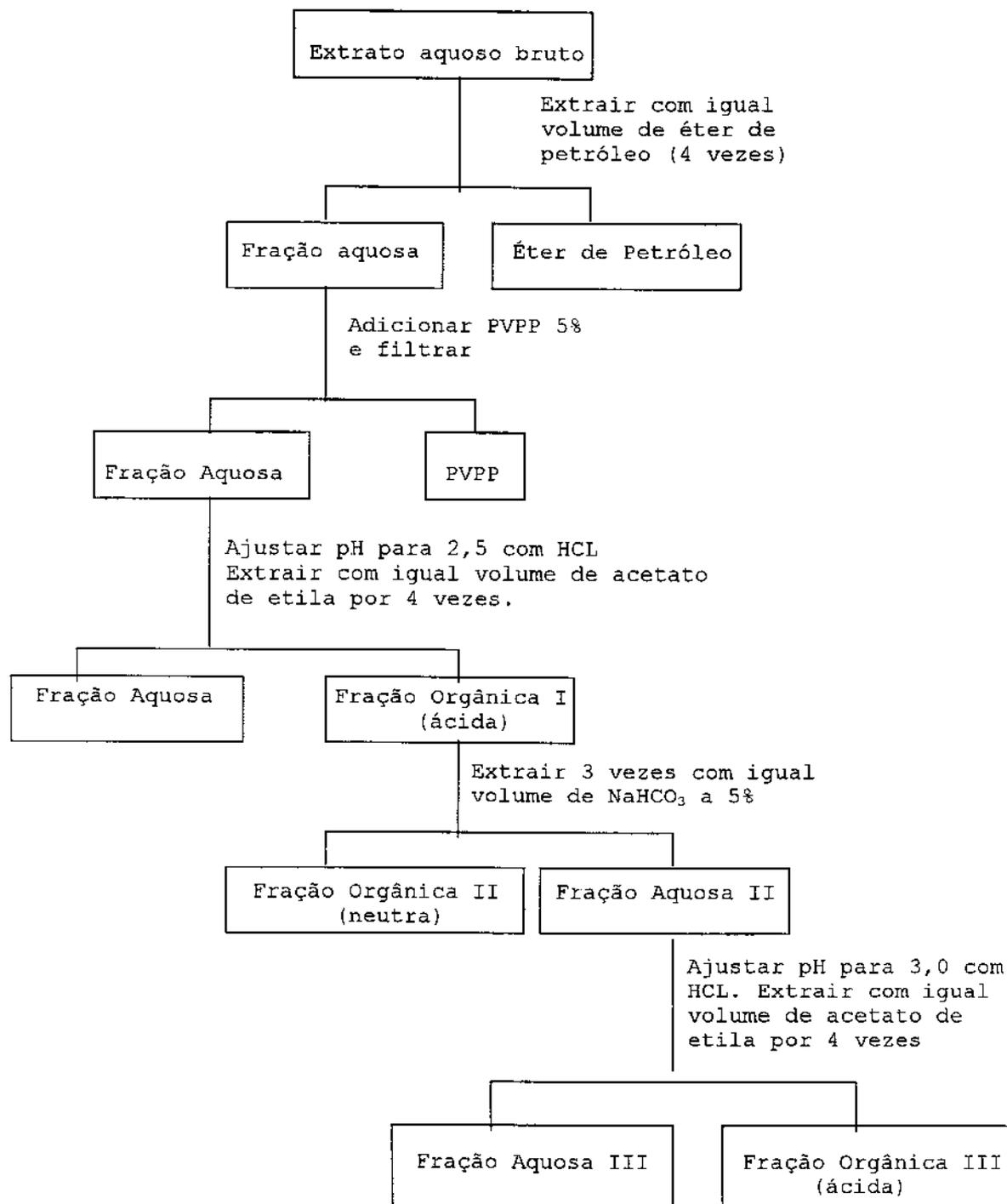
2.9-EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS GIBERELÍNICAS

Para extração e purificação de substâncias giberelínicas foram utilizados os métodos de extração descritos por VÁLIO (1970) e REEVE & CROZIER (1978), com modificações.

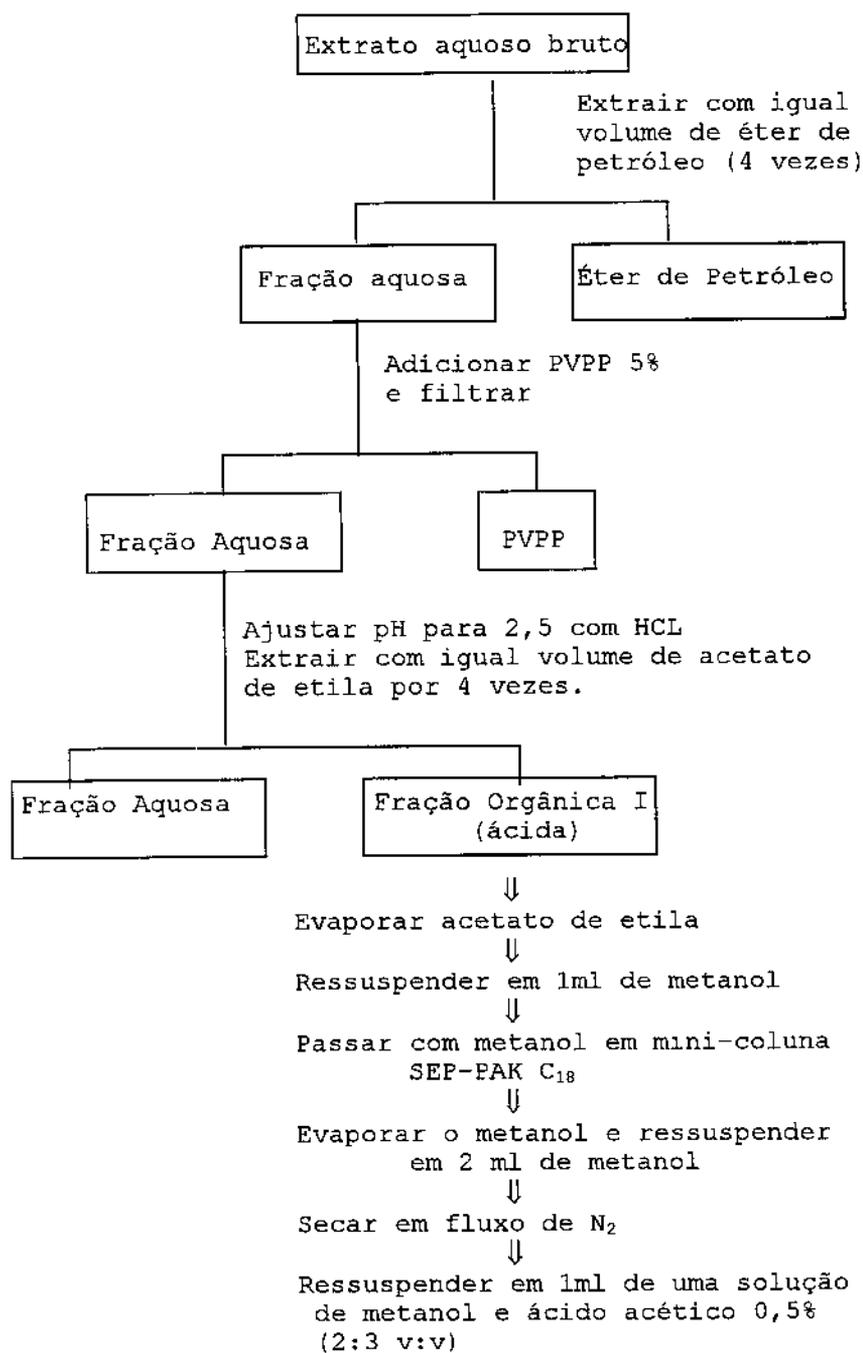
Para extração, foram utilizados 2 ou 5g de botões florais ou de folhas da porção mediana do caule, em diferentes etapas de desenvolvimento da planta.

O material foi cortado e em seguida foi triturado em homogeneizador Virtis 45 com 20ml de metanol 80% e guardado em refrigerador por 24 horas. Em seguida foi filtrado e o resíduo retomado em 20ml de metanol 80% e guardado em refrigerador por 24 horas. No dia seguinte foi novamente filtrado e juntaram-se os dois filtrados obtidos (extrato metanólico).

Utilizando um evaporador rotatório sob pressão reduzida a 35°C foi removido todo o metanol do extrato, obtendo-se então um extrato aquoso bruto, que foi submetido a um processo de fracionamento para a obtenção da fração orgânica ácida I ou III dependendo do tipo de cromatografia a ser utilizada, HPLC ou TLC respectivamente (ver esquemas I e II).



ESQUEMA I - Diagrama esquemático de extração e fracionamento de substâncias de crescimento (VÁLIO, 1970), modificado.



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

2.9.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Após a obtenção da fração orgânica I, esta foi purificada (vide esquema II) para, a seguir, ser cromatografada por HPLC de fase reversa, com a finalidade de separação das substâncias giberelínicas. A coluna utilizada foi C₁₈ ODS - Hipersil 5µm, com 250 mm de comprimento por 5mm de diâmetro. A fase móvel (solvente), constituiu-se de um gradiente de ácido acético 0,5%(solvente A)/metanol (solvente B) variando de 40 a 85% em 30 minutos com fluxo de 1ml/min.

As amostras, ao sair da coluna, passaram por um detector de UV (LKB VWM 2141 PHARMACIA) sendo que, de 2 em 2 minutos foram coletados 2ml de amostra. No final dos 30 minutos foram coletadas 15 amostras.

As frações coletadas (2ml) em HPLC foram subdivididas em 4 alíquotas, cada uma das quais foi colocada em uma divisão de cubeta de plástico para gelo com 2 folhas de papel de filtro e deixadas em temperatura ambiente até a evaporação total do solvente.

No caso do controle, foi colocado apenas o papel de filtro.

Todas as cubetas foram umedecidas com 1,0ml de água destilada.

2.9.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC)

O extrato obtido através do fracionamento, que corresponde à fração orgânica III (ácida), foi aplicado em placas de vidro (20 X 20 cm) com uma camada de sílica gel G e água destilada misturadas na proporção de 1:2 (g de sílica:ml de água destilada).

As placas, antes da aplicação do extrato, foram ativadas por 30 minutos a 110°C e os cromatogramas foram desenvolvidos num percurso de aproximadamente 15 cm (do local de aplicação à frente da placa), utilizando-se como sistema de solventes isopropanol:amônia:água (10:1:1 V/V)-solvente 1 ou benzeno:n butanol:ácido acético (14:5:1 V/V)-solvente 2.

Após a evaporação do solvente, os cromatogramas foram testados com diferentes metodologias para evidenciar a presença de substâncias giberelínicas.

Os cromatogramas foram divididos longitudinalmente em 4 bandas e em 10 faixas transversais, desde o ponto de aplicação até a frente do cromatograma, correspondendo a 10 faixas de Rf.

A sílica de cada subdivisão do cromatograma foi raspada e distribuída ao acaso nas cubetas de fôrma para gelo e sobre a sílica foi colocada uma folha de papel de filtro.

Como controle, foi utilizada a mesma quantidade de sílica das subdivisões cromatografadas, mas com placas percorridas somente pelo solvente.

Todas as cubetas foram umedecidas com água destilada.

2.10 - DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS GIBERELÍNICAS

2.10.1 - Bioteste do alongamento do hipocótilo de alface

Este bioteste específico para evidenciar substâncias giberelínicas, foi descrito por FRANKLAND & WAREING (1960).

Sementes de alface cv. Grand Rapids, foram germinadas em placas de Petri a 25°C por 24 horas sob luz contínua. Após este período, foram selecionadas pelo tamanho as plântulas mais uniformes e colocadas 4 plântulas em cada divisão das cubetas para gelo preparadas anteriormente com o material cromatografado.

As fôrmas de plástico para gelo, foram transferidas para câmara de crescimento sob luz contínua a 25°C por 72 horas, dentro de bandejas de plástico tampadas com vidro transparente e vedadas com fita adesiva para evitar evaporação.

Após 72 horas, foram medidos os hipocótilos das plântulas de alface e as medidas transformadas em porcentagem do controle.

2.10.2 - Teste químico para detectar substâncias giberelínicas

Para evidenciar a existência de substâncias giberelínicas no extrato, cromatografado em Camada Delgada (TLC), o cromatograma foi revelado pulverizando-se com etanol 5% em

ácido sulfúrico 95% e colocado por 10 minutos a 110°C para secagem (JONES et al., 1963). As placas foram observadas em luz UV para verificar a ocorrência ou não de manchas fluorescentes, o que caracteriza a presença ou ausência de substâncias giberelínicas. A mesma metodologia foi usada para uma solução de ácido giberélico (controle).

2.11 - Análise Estatística

O teste t "Student" foi aplicado para comparação de dois valores médios (controle e tratadas), ao nível de 5% (SNEDECOR, 1965). Em experimentos com mais de uma variável, usou-se análise fatorial, determinando-se nestes casos a diferença mínima significativa, pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade (GOMES, 1984). As diferenças são apresentadas por letras, que quando repetidas indicam que entre os valores correspondentes não há diferenças significativas.

RESULTADOS

1 - CARACTERIZAÇÃO DO ÁPICE

Para caracterização dos estádios de desenvolvimento do ápice, estes foram dissecados e observados em estereomicroscópio. De acordo com estas observações, foram caracterizados 6 estádios, que foram ilustrados através de micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura.

Na figura 1A, pode-se observar o ápice em estágio 0 (ápice vegetativo). Este estágio se caracteriza por apresentar o domo achatado e a presença de 3 primórdios foliares. A partir do estágio 1 até o estágio 5 os ápices foram caracterizados como florais. O estágio 1 é observado na figura 1B, onde pode-se notar a presença de 3 ápices axilares que darão origem a 3 flores, evidenciando primórdios de 2 escamas em cada ápice. No centro observa-se o ápice terminal que geralmente não continua seu desenvolvimento.

Nas figuras seguintes, observa-se em detalhe o desenvolvimento de 1 dos 3 ápices axilares.

No estágio 2 (figura 1C), observa-se o domo achatado, envolto por primórdios do cálice e as sépalas mais externamente. Na figura 1D, nota-se o ápice no estágio 3, onde pode ser observada a presença de primórdios das pétalas e internamente a iniciação de primórdios de estames.

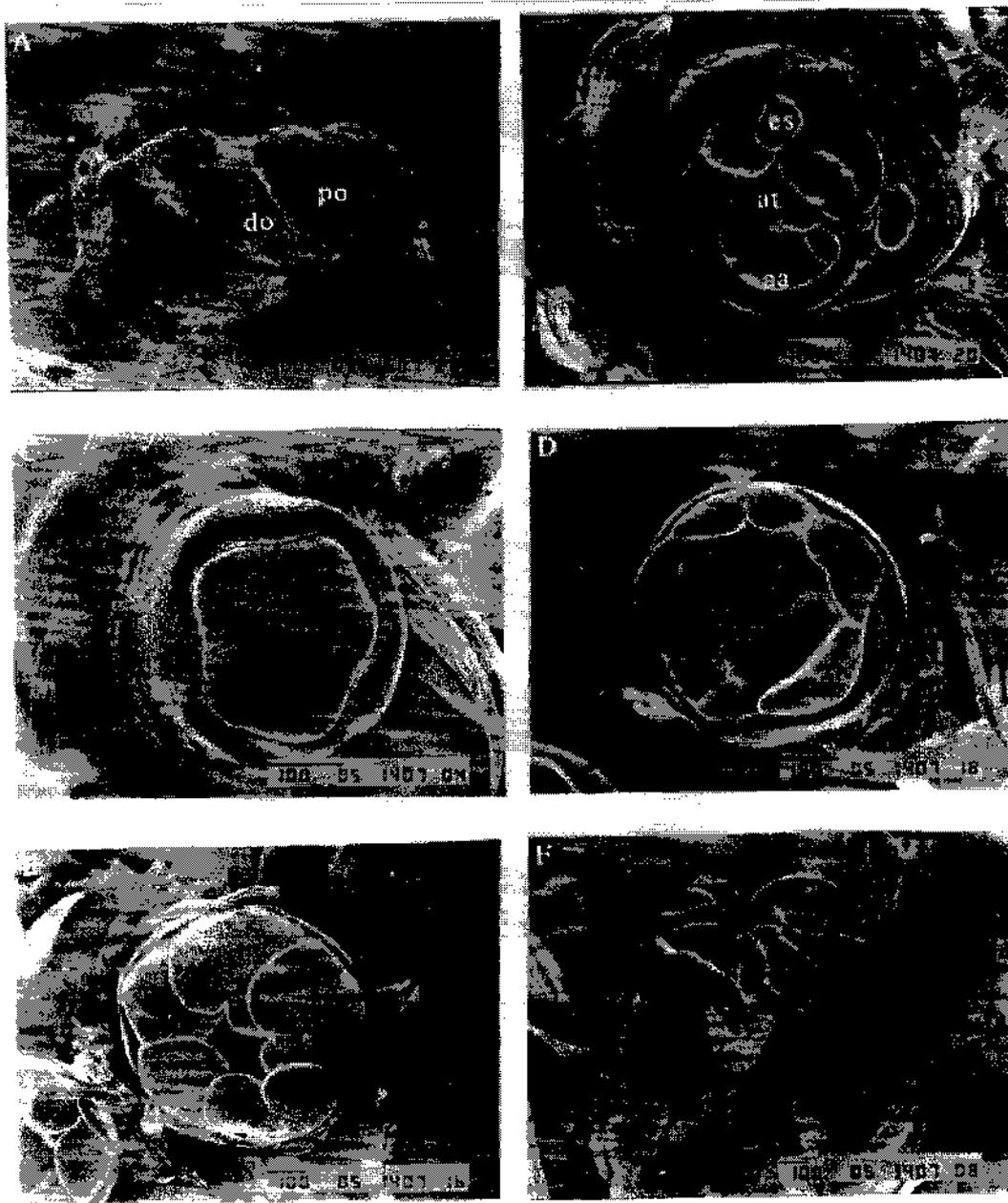


Figura 1: Micrografias de ápices de *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel, obtidas em microscópio eletrônico de varredura. A barra horizontal na figura está representada em μm .

- | | |
|----------------------|--------------------|
| A- estágio 0 | es- escamas |
| B- estágio 1 | at- ápice terminal |
| C- estágio 2 | se- sépalas |
| D- estágio 3 | pe- pétalas |
| E- estágio 4 | ta- estames |
| F- estágio 5 | ti- estilete |
| do- domo | ov- ovário |
| po- primórdio foliar | et- estigma |
| aa- ápices axilares | |

No estágio 4 (figura 1E), observam-se primórdios de pétalas recobrando o ápice, impedindo a visualização de outras estruturas.

Na figura 1F, os primórdios das pétalas foram eliminados, para ser possível a visualização completa do pistilo, cuja presença caracteriza o estágio 5. Assim, pode ser observado o estilete alongado, o ovário e o estigma.

2 - EFEITO DO TRATAMENTO DE FRIO (VERNALIZAÇÃO) E INTERAÇÃO COM FOTOPERÍODO

As figuras 2A e 2B referem-se à influência do tratamento de vernalização e fotoperíodo, no desenvolvimento do botão floral de *R. simsii* cv. Helmut Vogel.

Observando a figura 2A, podemos notar que o fotoperíodo não apresentou influência significativa no desenvolvimento do botão floral, em relação ao seu comprimento, tanto em plantas vernalizadas como na controle. Comparando o efeito da vernalização, entre plantas vernalizadas e controle, observa-se que independente do fotoperíodo as plantas vernalizadas, mostraram um aumento significativo no comprimento do botão floral.

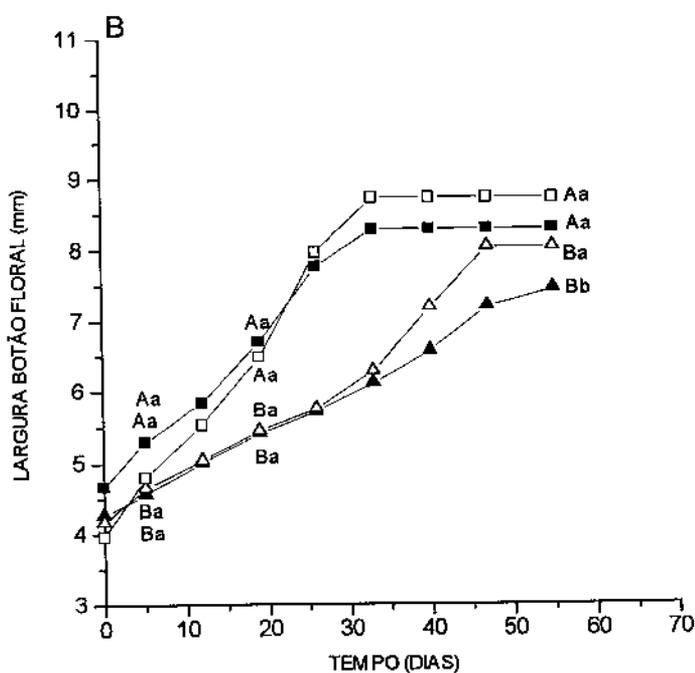
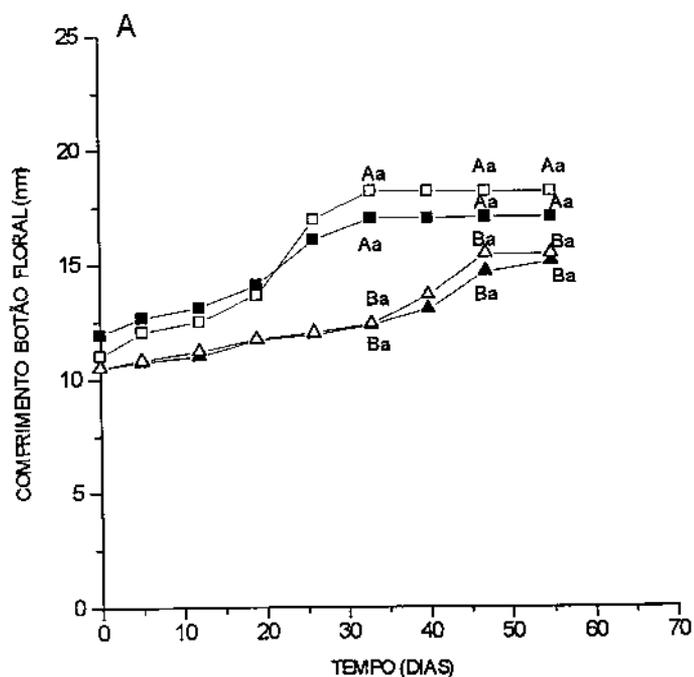


FIGURA 2: EFEITO DA VERNALIZAÇÃO E DO FOTOPERÍODO SOBRE (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+FRIO --▲-- DC-CONT --□-- DL+FRIO --△-- DL-CONT

LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO VERNALIZAÇÃO E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO

LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

Em relação à largura do botão floral, pode-se observar na figura 2B, que em plantas vernalizadas não houve influência do fotoperíodo. Em plantas não vernalizadas, apenas no final do tratamento, o desenvolvimento do botão floral foi promovido sob DL. O tratamento de vernalização promoveu o desenvolvimento do botão quando comparado com o controle dentro de cada fotoperíodo, este efeito foi marcante.

3 - EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO GIBERÉLICO E INTERAÇÃO COM FOTOPERÍODO

Com base nos resultados obtidos anteriormente, foi estudado o efeito de GA₃ e do fotoperíodo no desenvolvimento do botão floral de azaléia.

Plantas tratadas com GA₃ sob efeito dos dois fotoperíodos, mostraram diferença significativa no comprimento e largura do botão floral a partir do 20^o dia de tratamento até o final do experimento, assim tratamento com DL promoveu o desenvolvimento do botão floral, quando comparado com tratamento de DC. Por outro lado, o efeito do fotoperíodo em plantas controle foi efêmero e pouco intenso (figuras 3A e 3B). Ao analisar-se o efeito do tratamento com GA₃, comparando plantas tratadas com plantas controle sob o mesmo fotoperíodo, observou-se o efeito promotor da giberelina tanto em DC como em DL, pois o comprimento e a largura do botão floral em plantas com GA₃ foi significativamente maior a partir do 13^o dia de tratamento.

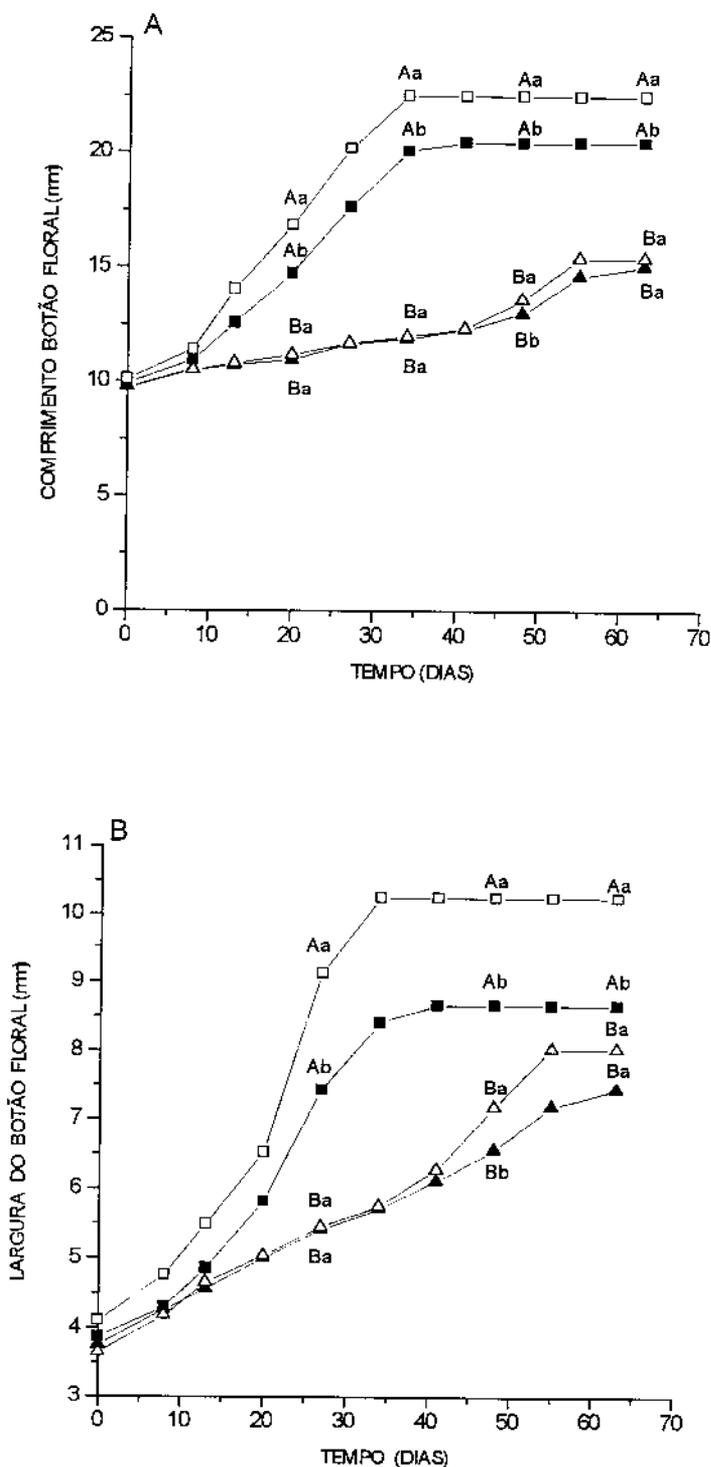


FIGURA 3: EFEITO DA APLICAÇÃO DE GA_3 ($10^{-3}M$), COMBINADO COM TRATAMENTO FOTOPERIÓDICO NO (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+ GA_3 --▲-- DC-CONT --□-- DL+ GA_3 --△-- DL-CONT
 LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GA_3 ($10^{-3}M$) E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.
 LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

Tanto o tratamento com GA_3 quanto o tratamento de vernalização, reduziram significativamente o tempo médio de antese (tabela 1).

A aplicação de GA_3 $10^{-3}M$ nas primeiras 5 semanas é suficiente para promover a antese e o desenvolvimento do comprimento e largura do botão floral (figura 4A e 4B).

A partir de 14 até por volta de 30 dias de experimento, DL foi efetivo promovendo o desenvolvimento do comprimento do botão floral tratado com GA_3 .

Nas duas últimas semanas de tratamento esse efeito de DL desapareceu, não ocorrendo diferença significativa com plantas tratadas sob DC. Com relação às plantas controle, o efeito do tratamento com DL promovendo desenvolvimento do botão floral, quando comparado com plantas tratadas com DC, foi observado aos 14 e 42 dias de tratamento (figura 4A).

Plantas tratadas com GA_3 não apresentaram influência do fotoperíodo ao longo de todo o experimento, quando foi medida a largura do botão floral. Tratamento com DL promoveu significativamente a largura do botão, em relação a DC, somente a partir de 14 dias de experimento, em plantas controle.

TABELA 1: EFEITO DO TRATAMENTO COM GA_3 ($10^{-3}M$) OU VERNALIZAÇÃO, NO TEMPO MÉDIO DE ANTESE (DIAS DE TRATAMENTO), EM PLANTAS DE *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

	DC	DL
GA_3	43,8±3,61	39,6±2,95
VERNALIZAÇÃO	37,2±4,89	39,3±2,21
CONTROLE	60,6±4,42	61,3±2,21

OS VALORES CORRESPONDEM AO TEMPO MÉDIO SEGUIDO DE DESVIO PADRÃO

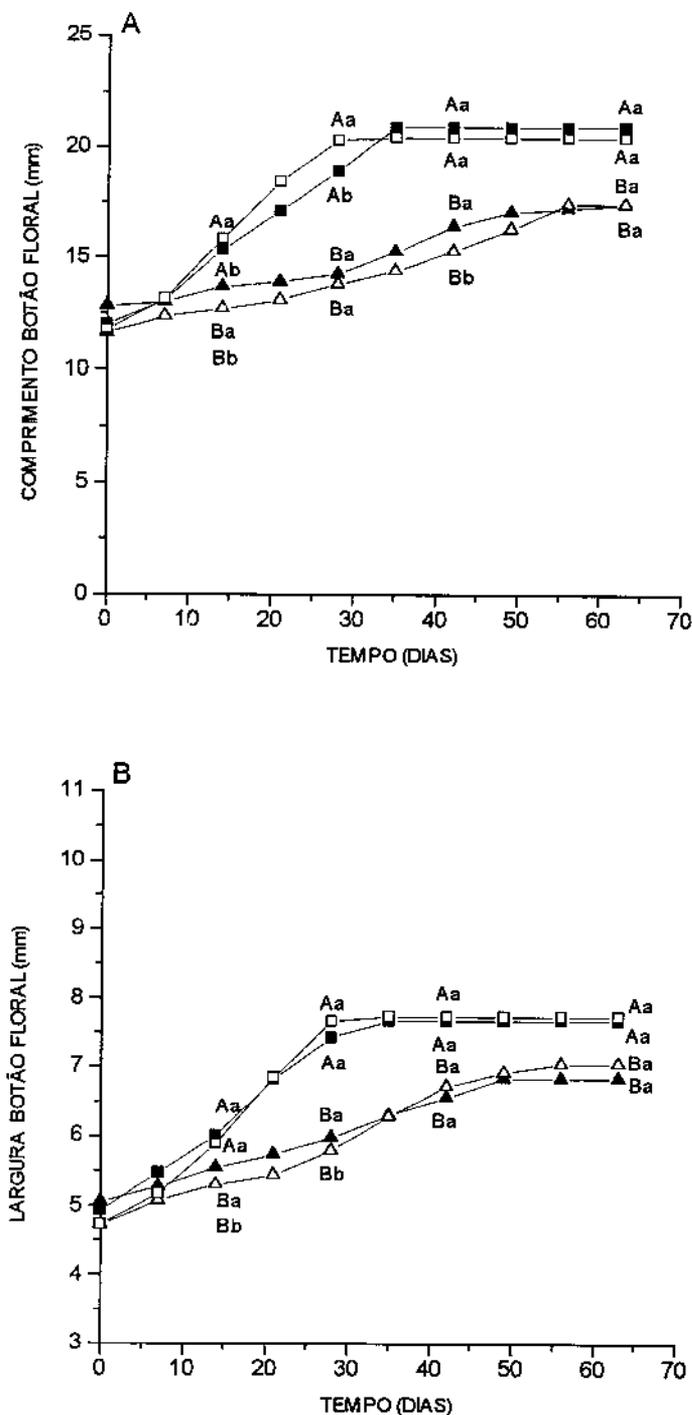


FIGURA 4: EFEITO DA APLICAÇÃO DE GA₃ (10⁻³M) NAS PRIMEIRAS 5 SEMANAS DE TRATAMENTO, COMBINADO COM FOTOPERÍODO: (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *R. simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+GA₃ --▲-- DC-CONT --□-- DL+GA₃ --△-- DL-CONT

LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GA₃ E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.

LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO

A aplicação de GA_3 $10^{-3}M$ a cada duas semanas, promoveu desenvolvimento do botão, independente do fotoperíodo, tanto em comprimento (figura 5A) quanto em largura (figura 5B), quando comparamos com as plantas controle. A antese atrasou 1 semana, em relação às plantas que receberam tratamento durante as 5 primeiras semanas (figura 4). O fotoperíodo não influenciou a resposta em nenhum dos parâmetros analisados.

Quando GA_3 $10^{-3}M$ foi aplicado, somente nas últimas 5 semanas de experimento, o fotoperíodo de 18 horas (DL) foi efetivo tanto no aumento do comprimento do botão floral (figura 6A) como na largura (figura 6B), quando comparado com o tratamento combinado com DC. O aumento do comprimento de botões florais de plantas controle, foi influenciado pelo fotoperíodo somente aos 35 e 42 dias de tratamento, neste caso o fotoperíodo de 8 horas (DC) foi significativamente efetivo. A largura do botão de plantas controle não foi influenciada pelo fotoperíodo.

Comparando-se o comprimento do botão floral de plantas tratadas com GA_3 nas últimas 5 semanas sob DC, com o de plantas controle sob DC, foi observado que o tratamento foi inibidor do desenvolvimento. Por outro lado, comparando-se plantas tratadas e controle sob DL, GA_3 aplicado tardiamente só promoveu o desenvolvimento significativamente nos dias 42 e 63 do experimento.

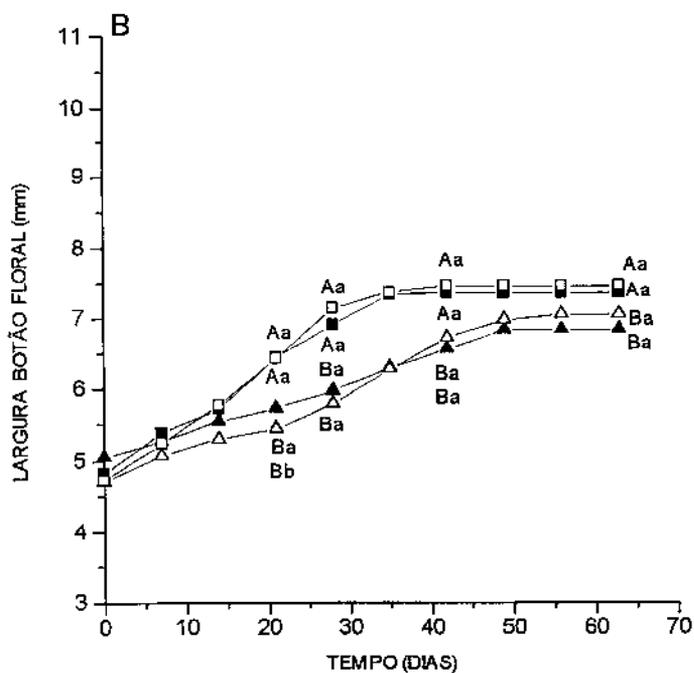
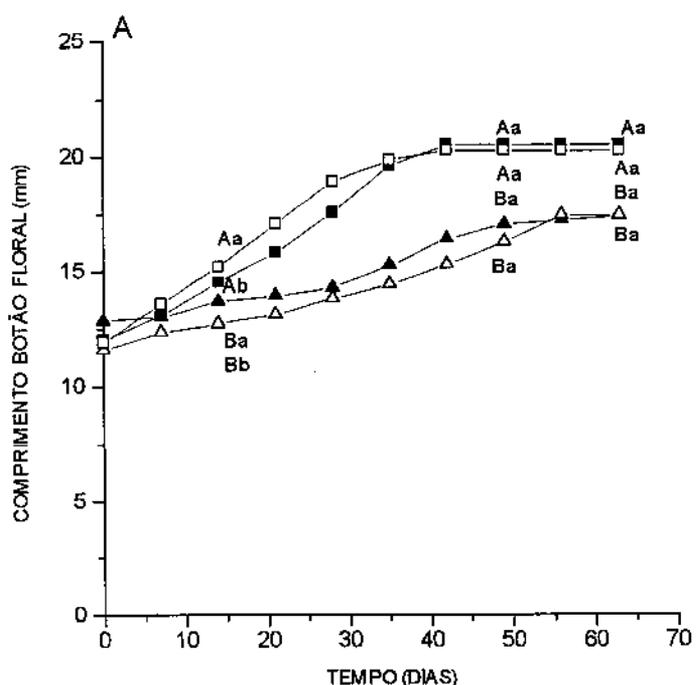


FIGURA 5: EFEITO DA APLICAÇÃO DE GA₃ (10⁻³M) A CADA DUAS SEMANAS, COMBINADO COM FOTOPERÍODO: (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *R. simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+GA₃ --▲-- DC-CONT --□-- DL+GA₃ --△-- DL-CONT
 LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GA₃ E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.
 LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

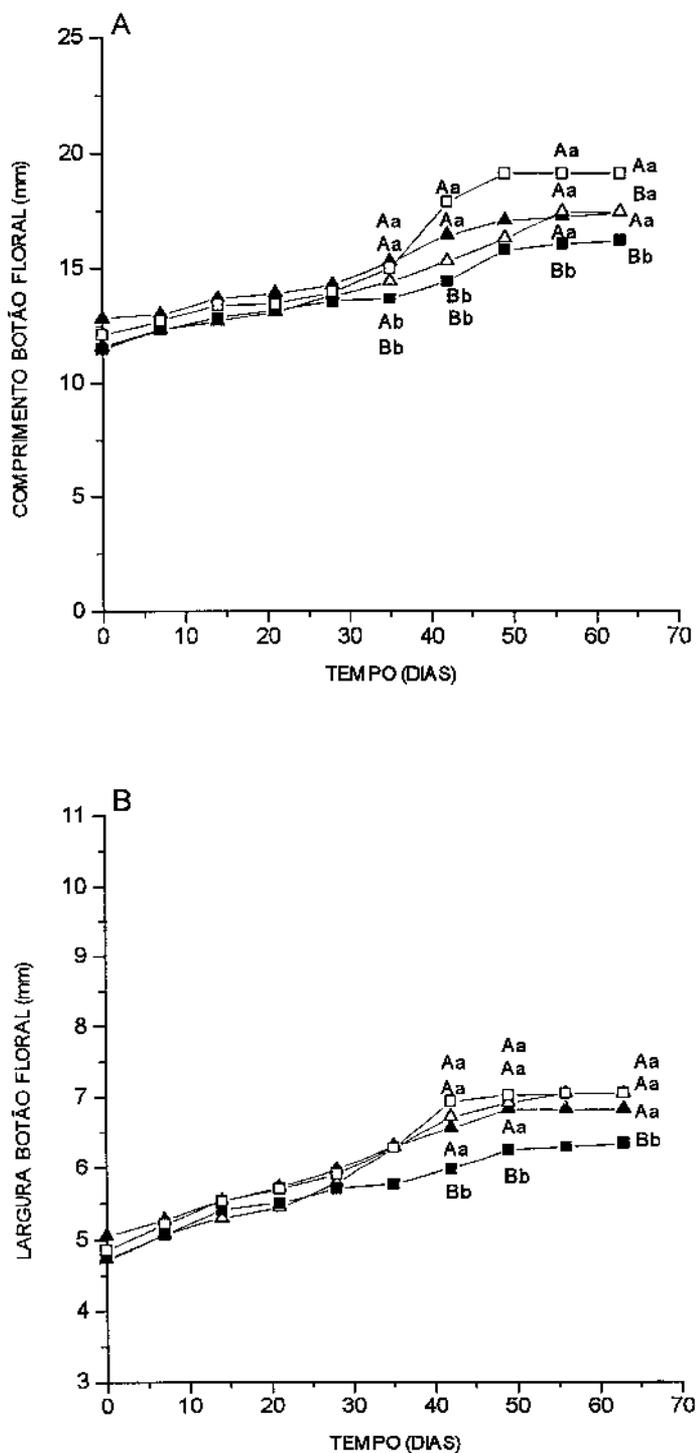


FIGURA 6: EFEITO DA APLICAÇÃO DE GA_3 ($10^{-3}M$) NAS 5 ÚLTIMAS SEMANAS DE TRATAMENTO, COMBINADO COM FOTOPERÍODO: (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *R. simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+ GA_3

--▲-- DC-CONT

--□-- DL+ GA_3

--△-- DL-CONT

LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GA_3 E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.

LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

Em relação à largura (figura 6B), as plantas controle se desenvolveram mais que as tratadas, sob DC. O efeito do fotoperíodo se sobressai em relação ao efeito do tratamento com GA_3 $10^{-3}M$, quando este é realizado muito tarde, sendo que o padrão de resposta é modificado.

O tempo médio de antese do botão floral avaliado sob efeito da aplicação de GA_3 $10^{-3}M$ em diferentes tempos, pode ser observado na tabela 2. Podemos notar que o tempo de aplicação do GA_3 influencia no tempo médio de antese dos botões florais desta espécie, tanto em DC como em DL. Não ocorreu diferença significativa, entre as plantas controle e as plantas que receberam tratamento nas últimas 5 semanas. Quando o GA_3 é aplicado durante as 5 primeiras semanas ou a cada duas semanas, o tempo médio de antese é diminuído comparando com plantas controle.

Diferentes concentrações de GA_3 foram testadas para a análise do seu efeito no desenvolvimento do botão floral e tempo médio de antese.

No experimento onde foi aplicado GA_3 $10^{-4}M$ (figuras 7A e 7B), nenhum dos parâmetros analisados, demonstrou influência do fotoperíodo. Quando analisamos o efeito do tratamento com GA_3 $10^{-4}M$ isolado do fotoperíodo, comparado com plantas controle, observamos que o desenvolvimento do botão, tanto em comprimento quanto em largura é significativamente maior em plantas tratadas. Esses resultados são semelhantes aos obtidos quando as plantas foram tratadas com GA_3 $10^{-3}M$ de 2 em 2 semanas (figura 5).

TABELA 2: EFEITO DO TRATAMENTO COM GA₃, EM DIFERENTES TEMPOS DE APLICAÇÃO, NO TEMPO MÉDIO DE ANTESE DE PLANTAS DE *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

TEMPO DE APLICAÇÃO DE GA ₃ (10 ⁻³ M)	DC	DL
SEM APLICAÇÃO	55,3±6,12	56,0±7,37
PRIMEIRAS 5 SEMANAS	39,9±3,38	35,7±6,64
A CADA 2 SEMANAS	44,1±3,38	44,1±5,76
ÚLTIMAS 5 SEMANAS	58,8±3,61	54,6±4,66

OS VALORES CORRESPONDEM AO TEMPO MÉDIO SEGUIDO DE DESVIO PADRÃO

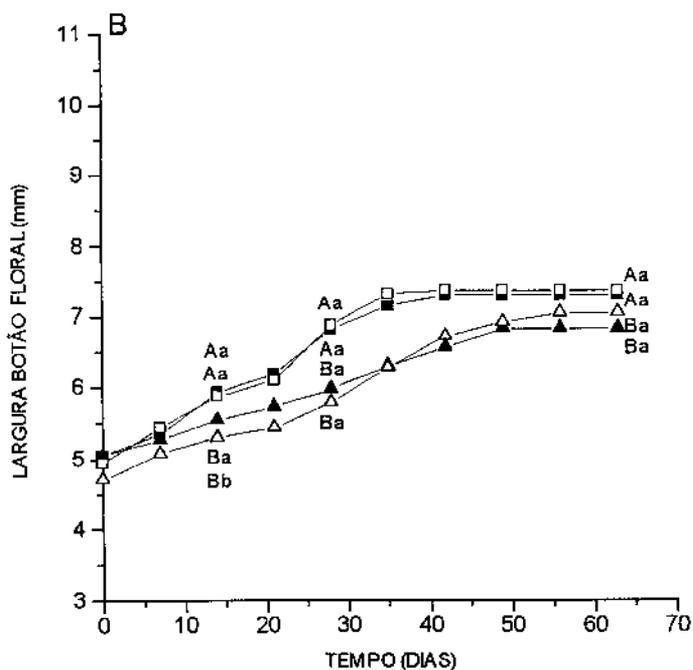
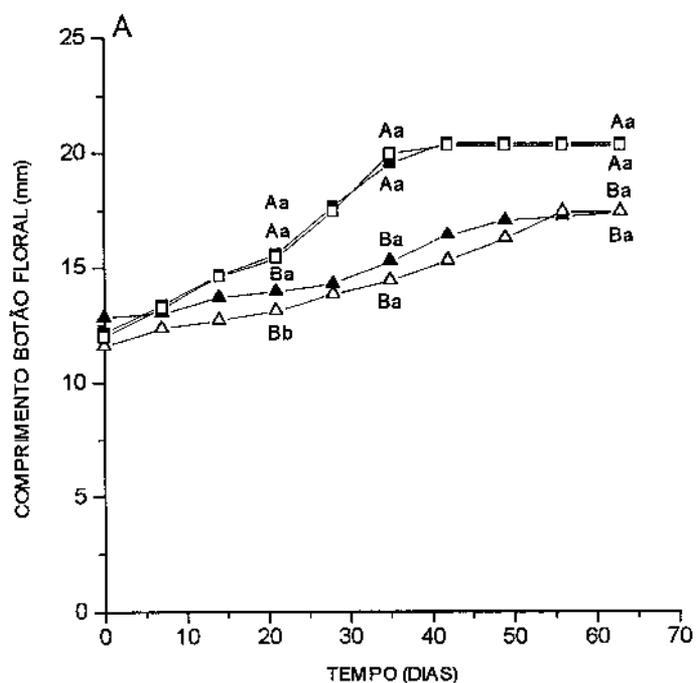


FIGURA 7: EFEITO DA APLICAÇÃO DE GA₃ (10⁻⁴M), COMBINADO COM TRATAMENTO FOTOPERIÓDICO NO (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+GA₃ --▲-- DC-CONT --□-- DL+GA₃ --△-- DL-CONT
 LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE GA₃ E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.
 LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

Quando a concentração de GA_3 aplicada foi de $10^{-5}M$, o comprimento do botão floral aumentou por influência do fotoperíodo de 18 horas (DL). Plantas mantidas sob DC, não demonstraram efeito do tratamento. O comprimento dos botões florais de plantas mantidas sob DL aumentou significativamente, somente quando tratadas com ácido giberélico (figura 8A). A largura do botão não foi influenciada por nenhum tratamento (figura 8B).

A tabela 3 mostra a influência da concentração de GA_3 no tempo médio de antese. A concentração de $10^{-5}M$ não causou qualquer efeito em relação ao controle em nenhum dos fotoperíodos. Plantas tratadas com GA_3 $10^{-3}M$ ou $10^{-4}M$ mantidas sob DC mostraram antecipação da antese em relação ao controle. As plantas mantidas sob DL demonstraram diminuição no tempo médio de antese somente quando tratadas com GA_3 $10^{-3}M$.

Baseado nos resultados obtidos anteriormente, onde ficou demonstrada a influência da vernalização e de GA_3 exógeno no desenvolvimento do botão floral, foi realizado um teste, tratando as plantas com 2 semanas de vernalização, seguida da aplicação de GA_3 $10^{-3}M$ combinado com tratamento fotoperiódico. Analisando-se o efeito destes tratamentos em relação ao comprimento do botão floral (figura 9A), verificou-se que o fotoperíodo somente teve influência significativa em plantas controle (plantas parcialmente vernalizadas) a partir do 28^o dia de avaliação, sendo que DL promoveu o desenvolvimento do botão floral.

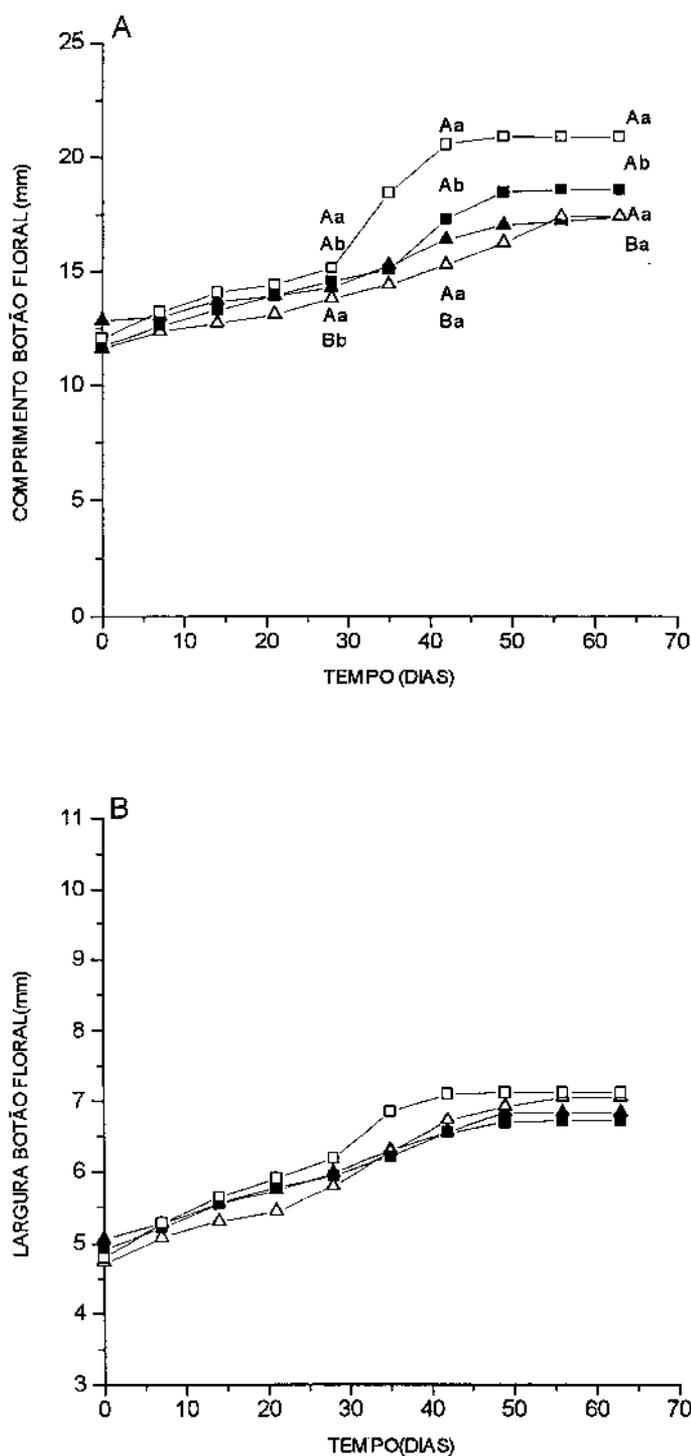


FIGURA 8: EFEITO DA APLICAÇÃO DE GA₃ (10⁻⁵M), COMBINADO COM TRATAMENTO FOTOPERIÓDICO NO (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--■-- DC+GA₃ --▲-- DC-CONT --□-- DL+GA₃ --△-- DL-CONT

LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO GA₃ E CONTROLE DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.

LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

TABELA 3: EFEITO DO TRATAMENTO COM GA₃, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, NO TEMPO MÉDIO DE ANTESE DE PLANTAS DE *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL.

(GA ₃)	DC	DL
0	55,3± 6,12	56,0± 7,37
10 ⁻⁵ M	54,6± 5,52	49,0± 4,66
10 ⁻⁴ M	44,1± 4,72	45,4± 4,95
10 ⁻³ M	39,9± 3,38	35,7± 6,64

OS VALORES CORRESPONDEM AO TEMPO MÉDIO SEGUIDO DE DESVIO PADRÃO

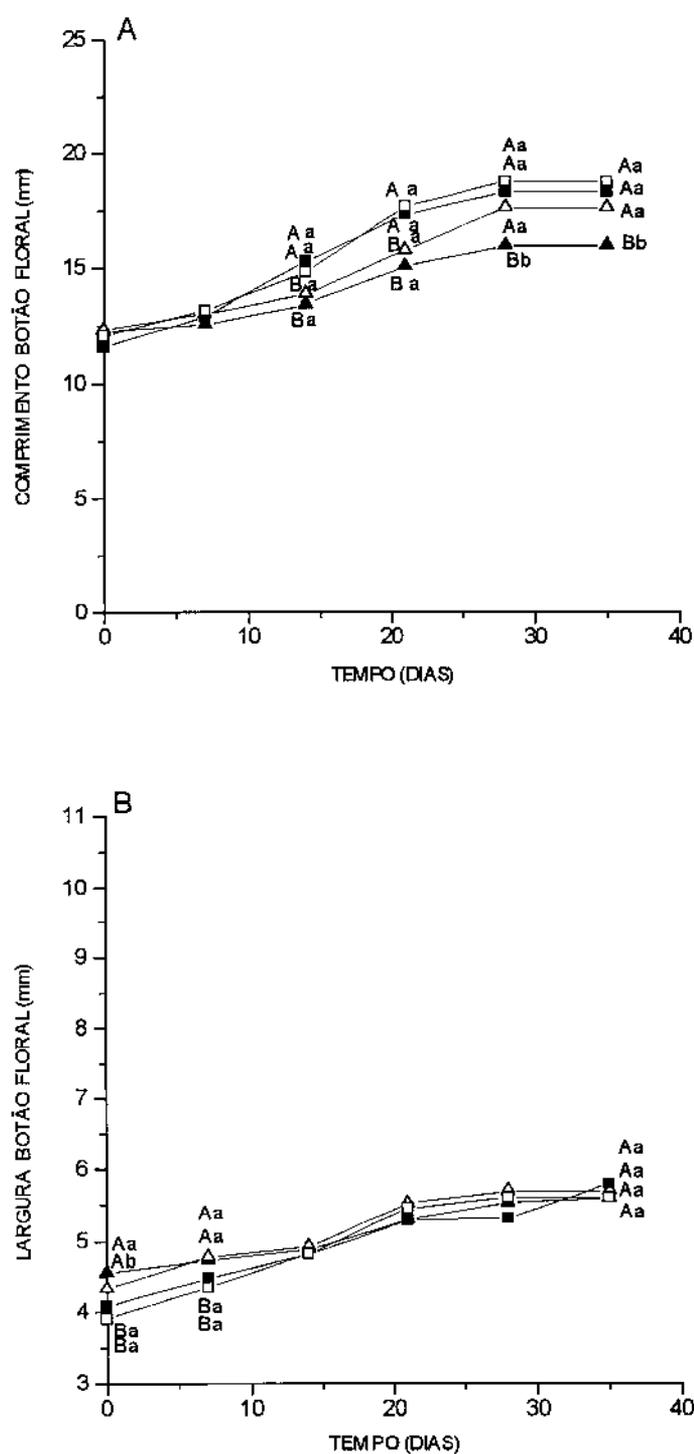


FIGURA 9: EFEITO DO TRATAMENTO DE GA_3 ($10^{-3}M$), COMBINADO COM FOTOPERÍODO: (A) COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (B) LARGURA DO BOTÃO FLORAL DA PLANTA *R. simsii* CV Helmut Vogel.

--■-- DC+FRIO+GA --▲-- DC+FRIO --□-- DL+FRIO+GA --△-- DL+FRIO
LETRAS MAIÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO GA_3 E FRIO DENTRO DE CADA FOTOPERÍODO.

LETRAS MINÚSCULAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO DE FOTOPERÍODO DENTRO DE CADA TRATAMENTO.

O tratamento foi promotor sob DC, quando comparamos com plantas controle sob esse mesmo fotoperíodo.

Plantas tratadas e controle não demonstraram diferença significativa sob DL.

Observando-se a figura 9B referente à largura do botão floral, nota-se, no início do experimento, uma variação dos dados devido possivelmente a uma grande heterogeneidade do material, pois as plantas não estavam ainda em diferentes fotoperíodos. Ao longo do experimento não foi observado efeito de nenhum dos tratamentos.

4 - EFEITO DO CICOCCEL

Devido ao íntimo envolvimento do cicocel com a inibição da síntese de giberelinas, estudou-se o efeito do mesmo no desenvolvimento do botão floral de azaléias. As observações foram feitas do início do tratamento até a antese. No início da aplicação de cicocel, os botões foram dissecados e avaliados, com auxílio de microscópio estereoscópico, quanto aos seus estádios de desenvolvimento. Essa classificação se deu de acordo com a figura 1.

Foi verificado durante essas observações (0 a 22 dias), que não houve diferença no desenvolvimento do botão entre plantas tratadas e controle, ou seja, o cicocel, nesta fase do desenvolvimento não apresentou qualquer efeito promotor ou inibidor (tabela 4).

A partir do 21^o dia de tratamento, os botões já mensuráveis, foram avaliados quanto ao seu comprimento e largura.

Não houve diferença significativa do comprimento do botão floral entre plantas tratadas e controle aos 22 dias de experimento (figura 10A e 10B). Esse resultado coincide com o obtido pela avaliação feita dos estádios de desenvolvimento, onde não havia diferença significativa. Nas semanas seguintes observou-se a inibição do desenvolvimento dos botões em plantas tratadas com cicocel. Após 41 dias de experimento as plantas foram mantidas por 35 dias em câmara fria (vernalização) e depois foram novamente avaliadas. O efeito inibidor se manteve, mesmo após a vernalização das plantas, até o final do experimento (antese) (figura 10B). A largura do botão floral, não foi afetada significativamente pelo tratamento com cicocel, tanto antes (figura 11A) como após a vernalização (figura 11B). A porcentagem de botões florais que atingiram a antese, em função do tempo (em dias), pode ser observada na figura 12. Nas plantas controle, 100% das flores abriram (antese) no 114^o dia após o início do tratamento. Neste mesmo período de tempo, apenas 10% das plantas tratadas com cicocel estavam abertas, atingindo 100% de abertura das flores somente 15 dias depois das plantas controle.

TABELA 4 - ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DO ÁPICE DE *Rhododendron simsii* CV. HELMUT VOGEL TRATADOS COM CICOCEL.

TEMPO (DIAS)	COM CICOCEL	SEM CICOCEL
0	2,3	2,3
8	2,8	3,7
14	4,1	4,0
22	4,2	4,7

*NÃO FOI ENCONTRADA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA A NÍVEL DE 5%

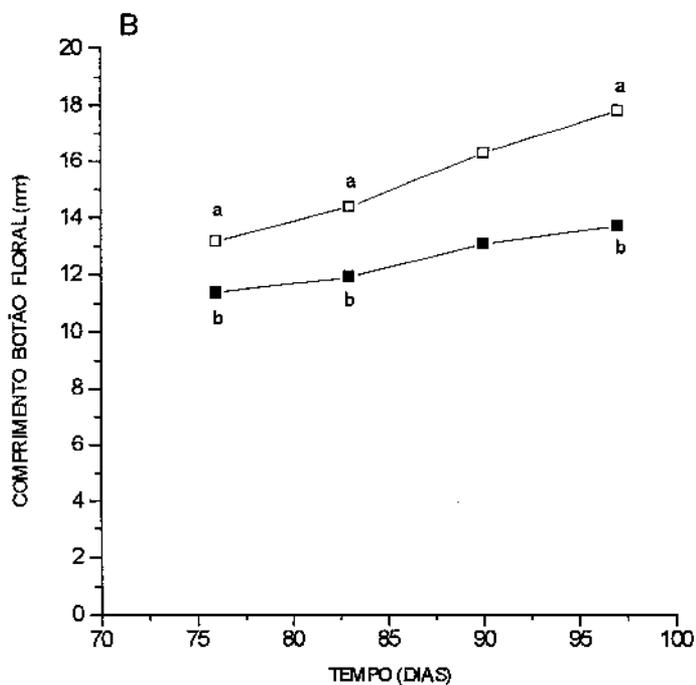
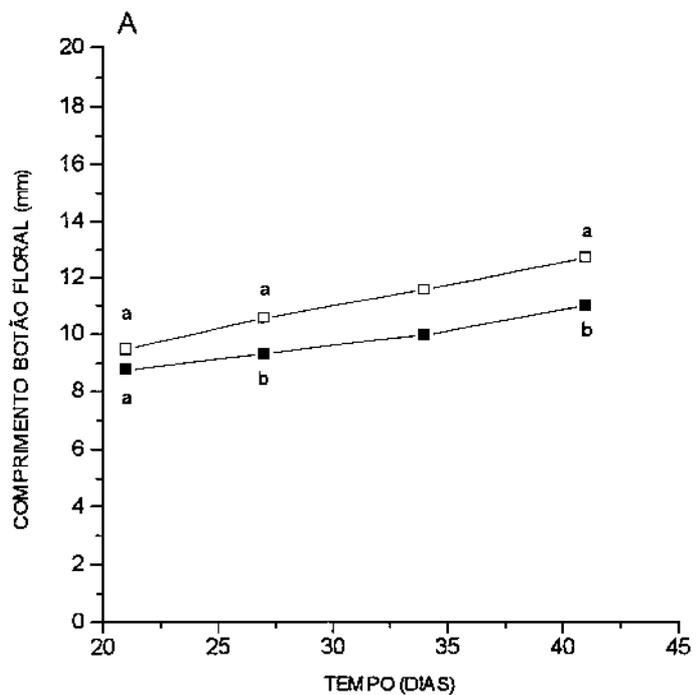


FIGURA 10: EFEITO DO TRATAMENTO COM CICOCCEL NO COMPRIMENTO DO BOTÃO FLORAL, (A) ANTES DA VERNALIZAÇÃO E (B) APÓS A VERNALIZAÇÃO DE *R. simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--□-- CONTROLE

--■-- TRATADAS

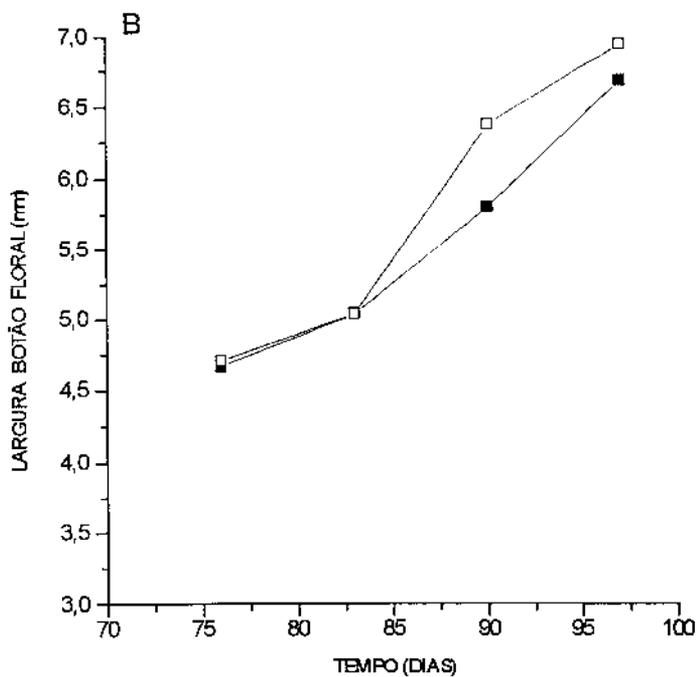
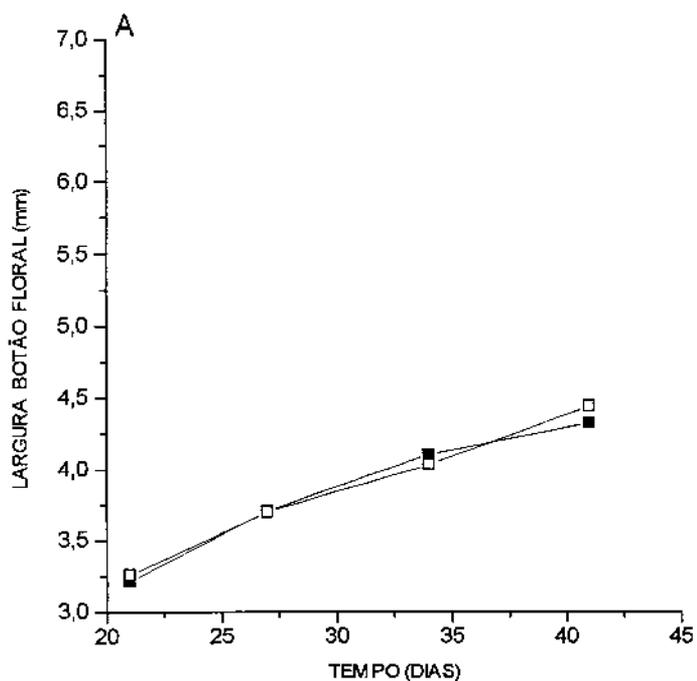


FIGURA 11: EFEITO DO TRATAMENTO COM CICOCCEL NA LARGURA DO BOTÃO FLORAL, (A) ANTES DA VERNALIZAÇÃO E (B) APÓS A VERNALIZAÇÃO DE *R. simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--□--CONTROLE

--■-- TRATADAS

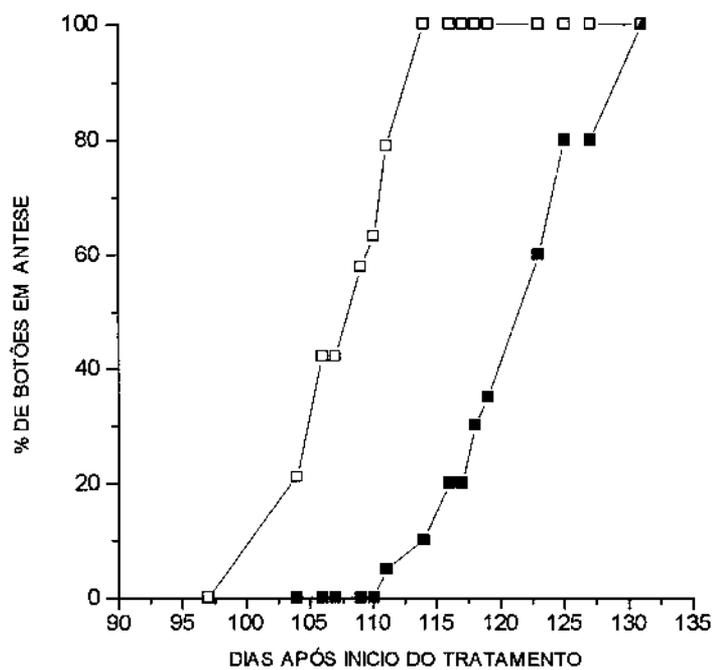


FIGURA 12: EFEITO DO CICOCCEL NA ANTESE DAS PLANTAS DE *R. simsii* CV. HELMUT VOGEL.

--□-- CONTROLE

--■-- TRATADAS

5 - EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS GIBERELÍNICAS

Pelo fato de GA₃ influenciar o desenvolvimento e tempo médio de antese de botões florais de azaléia, como evidenciado pelos experimentos anteriores, foram feitos extratos de folhas ou botões, para análise de substâncias endógenas com atividade giberelínica.

Substâncias giberelínicas foram evidenciadas em extrato de folhas de plantas vernalizadas. O cromatograma foi pulverizado com H₂SO₄ revelando uma mancha fluorescente azulada, sob luz ultra violeta, no Rf 0,66. Essa mancha caracteriza a presença de substâncias giberelínicas.

Este teste também foi realizado com ácido giberélico (padrão), confirmando o resultado anterior.

Na figura 13, são mostrados os resultados da atividade giberelínica, observados em extratos de folhas (A e B) ou botões (C e D), logo após o tratamento de vernalização, que foram cromatografados em TLC em 2 sistemas de solventes: solvente 1 (isopropanol:amônia:água), solvente 2 (benzeno:n butanol:ácido acético) e em seguida biotestados. A figura 13A, evidencia atividade giberelínica significativa nas faixas de Rfs 0,7 e 0,8 de extrato de folhas cromatografado com o solvente 1.

Quando o extrato de folhas foi cromatografado com o solvente 2, ficou evidente a atividade giberelínica nas faixas de Rfs 0,5 e 0,6, confirmando a atividade giberelínica nas folhas nestas condições (figura 13B).

Nos extratos de botões, figuras 13 C e D, cromatografados respectivamente com solventes 1 e 2, não foi evidenciada atividade giberelínica significativa.

Um experimento realizado com extratos de folhas cromatografados por HPLC, e em seguida biotestado para evidenciar substâncias com atividade giberelínica, pode ser observado na figura 14. Nas figuras 14A e 14C, extratos obtidos de plantas não vernalizadas e 20 dias após a vernalização, respectivamente, não apresentaram atividade giberelínica. O bioteste realizado com extratos de plantas, extraídos logo após a vernalização (figura 14B), apresentou atividade giberelínica significativa na fração 2.

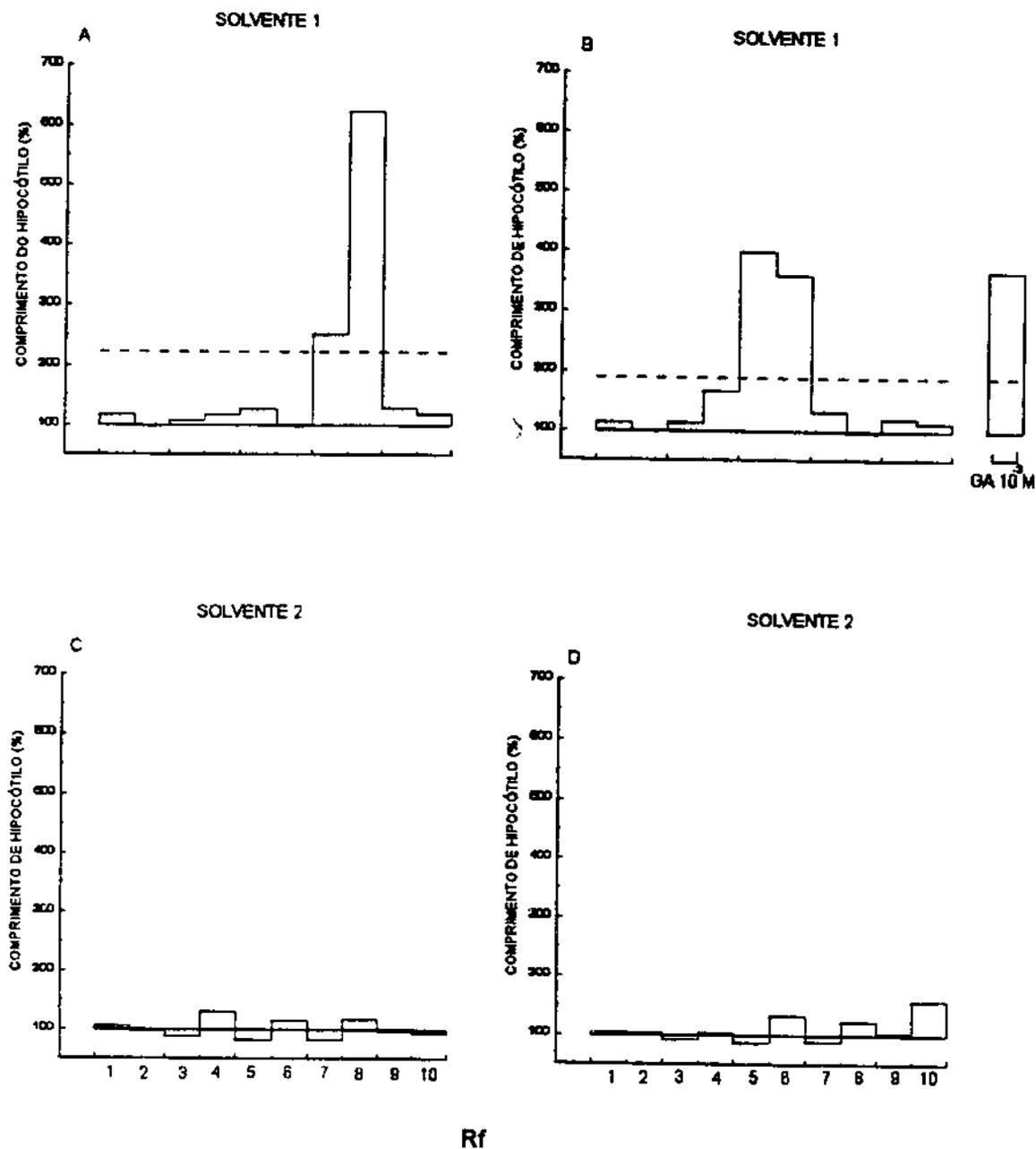


Figura 13: Atividade giberelínica em extratos de folhas (A e B) e botões (C e D) de plantas de *R. simsii* cv. Helmut Vogel, coletadas logo após a vernalização. Bioteste do alongamento de hipocótilo de alface. (TLC).

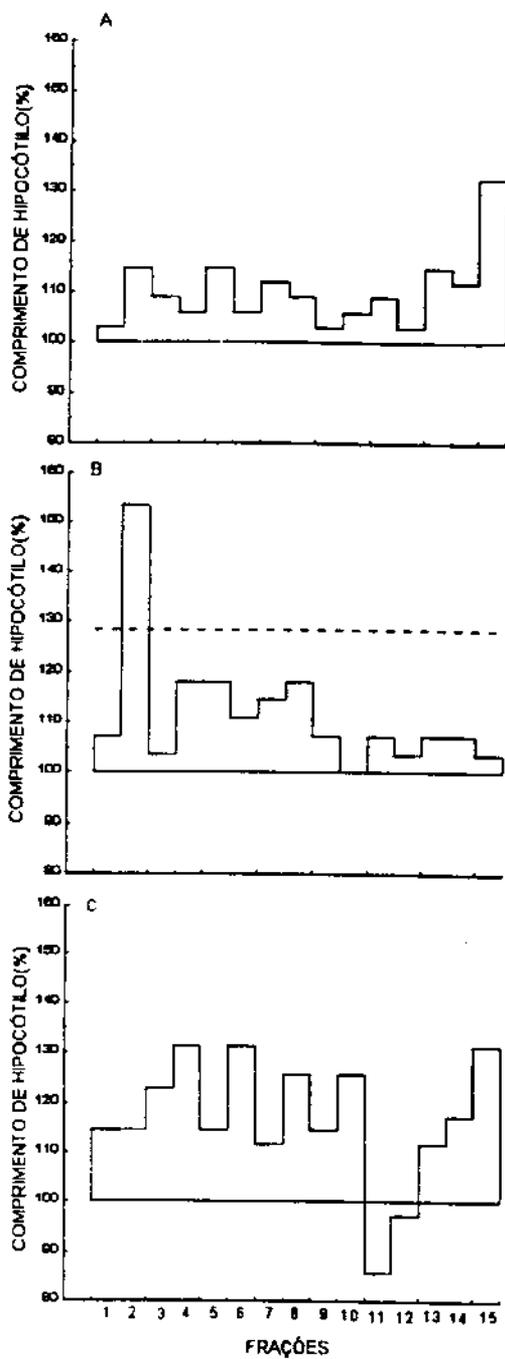


Figura 14: Atividade giberelínica em extratos de folhas de *R. simsii* cv. Helmut Vogel coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento: (A) Antes da vernalização, (B) logo após a vernalização e (C) 20 dias após a vernalização. Bioteste do alongamento de hipocótilo de alface. (HPLC).

Discussão

A passagem do estágio vegetativo para reprodutivo, é acompanhada de diversas modificações sequenciais, morfológicas, celulares e moleculares no ápice do ramo (SEIDLOVÁ, 1985; BODSON, 1989; MACDANIEL et al., 1992). Dentre essas modificações, as mudanças morfológicas são muito estudadas, sendo que o tamanho e a forma que o meristema do ramo assume com a iniciação floral são as mais evidentes. Essas modificações diferem de espécie para espécie (VINCE-PRUE, 1975).

A iniciação floral e o desenvolvimento do ápice até que o botão floral seja macroscopicamente visível em azaléas tem sido examinados em vários cultivares. Foram identificados vários estádios de acordo com o desenvolvimento morfológico (CRILEY, 1969; GODKIN & BALLANTYNE, 1970; PETTERSEN, 1972; BODSON, 1983).

Em *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel, o padrão de mudanças morfológicas foi semelhante ao citado por outros autores para outras cultivares. O ápice vegetativo apresenta-se com o domo achatado. Em seguida, por ocasião da transição floral, três ápices axilares começam a se desenvolver originando 3 flores, o ápice terminal não continua seu desenvolvimento. O mesmo foi encontrado por GODKIN & BALLANTYNE (1970) para a cultivar Red Wing. Ao contrário em *Rhododendron*

obtusum "Coral Bells", foi descrita a iniciação de uma flor terminal perfeita (NASKALI, 1961 citado por BODSON, 1989).

Foi construída uma escala de 6 estádios de acordo com as mudanças morfológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento do ápice. Estes estádios abrangem desde o ápice vegetativo até todas as partes florais terem sido formadas. Essa escala é de grande importância para futuras consultas, bem como para situar o início de alguns experimentos com transição e desenvolvimento floral.

Alguns autores, construíram escalas do desenvolvimento do ápice de *Rhododendron* com técnicas diferentes, fotografando ápices dissecados em microscópio estereoscópico ou seccionando o material e fotografando em microscópio óptico (CRILEY, 1969; GODKIN & BALLANTYNE, 1970; PETERSEN, 1972; BODSON, 1983).

SAITO *et al.* (1995) observando tricomas glandulares de *Humulus lupulus* e FALK *et al.* (1971) observando ápice de *Tropaeolum majus*, demonstram diferenças de qualidade da imagem, quando são comparados os materiais em microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura, já que este último oferece muito mais detalhes tridimensionais, o que é de grande importância para estudos sobre morfogênese e morfologia do ápice.

FALK *et al.* (1971), testaram vários métodos de preparação de material, para a observação em microscópio eletrônico de varredura, dentre eles, a observação de material fresco, não

fixado, com uma excelente preservação celular. SAITO *et al.* (1995), consideram vantajoso trabalhar com material a fresco, pela simplicidade, rapidez e economia, além de eliminar o risco de encontrar deformações do material decorrentes das técnicas de fixação.

Em azaléia cultivar "Helmut Vogel" os ápices foram fotografados a fresco (sem fixação e sem qualquer outra preparação), em microscópio eletrônico de varredura, para determinação dos estádios de desenvolvimento, após observações e disseções feitas em microscópio estereoscópico. Este método foi mais eficiente, possibilitando a observação de detalhes tridimensionais nas micrografias, com maior nitidez do que as apresentadas por outros autores.

As azaléias passam por um período de dormência do botão floral. O estágio de desenvolvimento do botão floral e a temperatura ótima para quebra da dormência variam entre espécies e cultivares (KINET *et al.*, 1985).

Segundo BODSON (1989), em azaléia a dormência tem que ser quebrada por um tratamento apropriado, evitando o aborto da inflorescência e a não uniformidade do desenvolvimento dos botões até a antese.

No cultivo de azaléias para fins comerciais, um dos tratamentos realizados para quebra da dormência do botão floral e para garantir antese uniforme entre todas as plantas, é a vernalização.

PETTERSEN & KRISTOFFERSEN (1969) e FRENCH & ALSBURY (1988) verificaram que, tanto a duração do tratamento de vernalização como a temperatura eficiente, dependem da cultivar estudada.

Os dados aqui apresentados mostram que em *R. simsii* cv. Helmut Vogel, 6 semanas de vernalização a 4°C é um tratamento efetivo nas condições adotadas.

Tem sido sugerido que o tratamento de vernalização influencia a biossíntese e o metabolismo de giberelinas (HAZEBROEK et al., 1993; ZANEWICH & ROOD, 1995). A aplicação de giberelina pode substituir pelo menos em parte a necessidade de vernalização em botões florais de damasco e pêsego (HATCH & WALKER, 1969 citado por POWEL, 1987). Segundo BROWING (1973 citado por KINET et al., 1985), giberelinas são as substâncias que estimulam a quebra da dormência de gemas florais em café.

A quebra da dormência do botão floral de azaléias para o seu desenvolvimento até a antese, tem sido também relacionada com substâncias de crescimento como giberelinas (CRILEY, 1985).

No presente trabalho a aplicação de GA₃ 10⁻³M sob DC e DL, substituiu o tratamento de vernalização, sendo que tanto em comprimento como na largura do botão floral o efeito promotor de GA₃ foi observado. Esse efeito foi acentuado sob DL.

Esses dados sugerem que substâncias giberelínicas estão envolvidas no desenvolvimento do botão floral. A vernalização, pode, portanto, estar influenciando a biossíntese e o metabolismo de giberelinas, e a aplicação destas substâncias

substituem a necessidade de um período de tratamento de vernalização para a quebra da dormência, também nesta espécie.

Em outras espécies, tem sido sugerida uma relação entre tratamento de DL e um estímulo da biossíntese de giberelinas (ZEEVAART, 1971; VINCE-PRUE, 1975; TALON & ZEEVAART, 1990). BROWN & BOX (1971) observaram que tratamento com DL seguido de DC, quebra a dormência do botão floral de azaléia sem o tratamento de vernalização. Segundo BODSON (1992) em azaléia, o efeito de GA₃ na quebra da dormência é maior sob DC, mas quando as plantas são previamente tratadas com retardante de crescimento o fotoperíodo de 16 horas demonstra efeito promocional.

Observando os resultados de plantas vernalizadas ou tratadas com ácido giberélico, pode-se notar que a manutenção de plantas em DL acentuou a resposta somente quando combinada com a aplicação de GA₃. Ao longo deste trabalho o efeito do fotoperíodo foi esporádico.

A diminuição do tempo médio de antese, bem como sua uniformização, foram notados tanto em plantas vernalizadas como em plantas tratadas com GA₃, não sendo observada diferença significativa entre esses dois tratamentos. Plantas que não receberam os tratamentos, demonstraram um atraso significativo da antese.

É interessante notar que em plantas tratadas com GA₃, por volta de 5 semanas de tratamento, já se inicia a antese, enquanto as plantas vernalizadas, receberam 6 semanas de

tratamento, e após esse período, são necessárias mais 5 semanas para que se inicie a antese. Desta forma, para fins comerciais, quando se considera o fator tempo de produção, o tratamento com ácido giberélico é mais vantajoso, embora BLACK et al. (1990), tenham concluído que para azaléia cultivar Glória, o tratamento de baixa temperatura aumenta o diâmetro das flores e sua longevidade.

Tanto plantas que receberam 2 semanas de vernalização como as que foram vernalizadas e em seguida tratadas com GA_3 $10^{-3}M$, entraram em antese ao mesmo tempo, indicando que 2 semanas de vernalização, já foram suficientes para antecipar a antese. O crescimento do botão floral, avaliado através de medidas de comprimento, foi significativamente promovido pelo tratamento posterior de ácido giberélico. Neste caso, as medidas em relação à largura do botão floral ficaram prejudicadas pela heterogeneidade do material.

Podemos assim concluir que na cultivar Helmut Vogel, o tratamento com ácido giberélico promove o desenvolvimento do botão floral principalmente em comprimento, além de estar envolvido com a quebra da dormência, antecipando e garantindo uma boa uniformidade da antese. Por outro lado, plantas vernalizadas demonstram também esses efeitos, mas não tão acentuados.

BLACK et al. (1990), concluíram que o tratamento de 4 semanas de frio seguidas de aplicação de giberelina antecipa o tempo de produção das plantas, sendo também vantajoso devido ao

menor tempo de tratamento de frio. Em relação ao tratamento de vernalização, estes autores citaram como vantagens o aumento do número de botões abertos, o aumento do diâmetro das flores e a maior longevidade pós colheita.

Em relação ao desenvolvimento do botão floral (comprimento e largura) de *Rhododendron simsii* cultivar Helmut Vogel, o momento de aplicação de GA₃ é importante, pois os tratamentos iniciados no momento em que as plantas seriam vernalizadas, demonstraram efeito promotor independentemente do fotoperíodo, tanto para aplicações semanais como a cada duas semanas. Por outro lado, quando o tratamento se inicia 5 semanas mais tarde, o efeito do fotoperíodo (DL) combinado com tratamento de GA₃ é mais marcante, sugerindo que DL, pode estar alterando os níveis endógenos de giberelinas e com as aplicações de GA₃ o efeito se acentua.

A quebra da dormência e a antecipação da antese também dependem do momento de aplicação de ácido giberélico, já que os tratamentos realizados nas primeiras 5 semanas de experimento, diminuíram consideravelmente o tempo médio de antese, quando comparados com plantas controle ou tratadas tardiamente.

A concentração de GA₃ combinado com o fotoperíodo, foi testada para verificação do seu efeito no desenvolvimento do botão floral e antecipação da antese. Os tratamentos com GA₃ 10⁻³ M ou GA₃ 10⁻⁴ M, foram efetivos para acelerar o desenvolvimento do botão floral independentemente do fotoperíodo.

O fotoperíodo de 18 horas (DL), promoveu o crescimento do botão floral quando as plantas foram tratadas com GA_3 $10^{-5}M$. Essa promoção não foi verificada em plantas sob DL sem GA_3 $10^{-5}M$, nem em plantas mantidas sob DC mesmo com tratamento de ácido giberélico. O início do desenvolvimento do botão floral ocorreu após a 4^a semana de experimento sugerindo que com concentração menor a quebra da dormência atrasa. É provável que a promoção do desenvolvimento do botão floral precise de uma concentração de giberelina crítica e o fotoperíodo de 18 horas (DL) parece ser uma condição favorável para que esta concentração seja alcançada em plantas que foram tratadas com GA_3 menos concentrado ou aplicado tardiamente.

TREWAVAS (1983) sugere que não é só a concentração da substância de crescimento que está envolvida nas respostas, mas as mudanças na sensibilidade do tecido em relação a uma determinada substância.

Algumas substâncias consideradas como retardantes de crescimento são capazes de inibir a biossíntese de giberelinas, agindo como antimetabólitos, mas não competindo com sua ação (CATHEY, 1964).

Retardantes de crescimento são comumente aplicados em azaléias cultivadas para diminuir crescimento da parte aérea, inibindo alongamento dos entrenós (STUART, 1961).

Segundo BODSON (1986), as giberelinas promovem desenvolvimento do botão floral somente quando estes se encontram em estádios mais avançados.

O tratamento com cicocel em *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel, não provocou atraso no desenvolvimento dos ápices florais em estádios iniciais. Esses resultados sugerem que, nesta fase de desenvolvimento do botão floral, não há envolvimento de substâncias giberelínicas.

O tratamento com cicocel, aplicado em plantas a partir do estágio 5 de desenvolvimento, inibiu o desenvolvimento do botão floral e atrasou a antese, em relação as plantas não tratadas. Isto pode ser devido à influência do cicocel inibindo a biossíntese de substâncias giberelínicas. Esses dados sugerem que em um determinado estágio de desenvolvimento do botão de *R. simsii*, substâncias giberelínicas são efetivas no desenvolvimento e quebra da dormência do botão floral. A avaliação da largura do botão floral, nem sempre foi uma boa metodologia. Neste caso não foi observada diferença entre plantas tratadas e controle.

O desenvolvimento floral e a antese em *R. obtusum* "Gloria", foram atrasadas por daminozide, CCC e combinação dos dois, mas tratamentos com paclobutrazol e fluometralin não mostraram atraso no desenvolvimento floral e antese das flores (WHEALY et al., 1988).

A presença de substâncias reguladoras de crescimento influenciando o desenvolvimento de flores tem sido registrada em numerosas ocasiões, mas existem poucos trabalhos, nos quais mudanças nos níveis endógenos de reguladores de crescimento tem

sido associadas ao crescimento e desenvolvimento de flores (JEFFCOAT & COCKSHULL, 1972).

Os extratos de folhas mostraram atividade giberelínica, quando as substâncias testadas foram extraídas logo após o tratamento de vernalização. Esses resultados indicam que o tratamento de vernalização promove a síntese e/ou liberação de giberelinas. Quando a extração foi feita com folhas de plantas que não foram vernalizadas, não foi observada atividade de substâncias giberelínicas, nem em extrato de plantas 20 dias após a vernalização.

Em extrato de botões, não foi observada atividade de substâncias giberelínicas. Estes resultados sugerem a ausência deste fitormônio nos botões ou a sua presença em concentrações muito baixas para serem detectadas pelo bioensaio utilizado.

Em *Tanacetum cinerariaefolium* L., foi observado que a concentração de giberelinas aumenta durante a vernalização (temperatura noturna de 6°C) (BROWN & MENARY, 1994).

Os resultados sugerem que o controle do desenvolvimento do botão floral em *Rhododendron simsii* cv. Helmut Vogel, pode ser controlado pelo tratamento de vernalização e a ação deste envolve alterações nos níveis de substâncias giberelínicas.

BIBLIOGRAFIA

- ABDUL, K. S., CANHAM, A. E., HARRIS, G. P., 1978. Effects of CCC on the formation and abortion of flowers in the first inflorescence of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Ann. Bot. 42:617-625.
- ALMEIDA, J. A. S., 1992. Controle da iniciação floral em *Helianthus annus* L.(girassol). UNICAMP, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- ALMEIDA, J. A. S. & PEREIRA, M. F. D. A., 1996. The control of flower initiation by gibberellin in *Helianthus annuus* L. (sunflower), a non-photoperiodic plant. Plant Growth Regulation, (no prelo).
- ARMANDO Jr., J., 1990. Floração em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). UNICAMP, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- BASCONSUELO, S., REINOSO, H., LORENZO, E., BOTTINI, R., 1995. Dormancy in peach (*Prunus persica* L.) flower buds. IV - Morphogenesis of excised buds as influenced by chilling and gibberellin A₃. Plant Growth Regul. 16:113-119.
- BERNIER, G., 1971. Structural and metabolic changes in the shoot apex in transition to flowering. Can.J.Bot. 49:803-819.
- BERNIER, G., 1988. The control of floral evocation and morphogenesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:175-219.
- BERNIER, G., KINET, J.M., SACHS, R.M., 1981. The physiology of flowering. Vol. 2, CRC, Florida, 231P.

- BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA, C., PETITJEAN, A., LEJEUNE, P., 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*. 5:1147-1155.
- BLACK, L. A., NELL, T. A., BARRET, J. E., 1990. Dormancy breaking method effects on Azalea longevity. *Hort. Sci.* 25(7):810.
- BODSON, M., 1983. Effect of photoperiod and irradiance on floral development of Young plants of a semi-early and a late cultivar of azalea. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108(3):382-386.
- BODSON, M., 1986. Effect of GA_{4,7} on the initiation and development of the inflorescence bud of evergreen azalea. *Tree Physiol.* 1:95-99.
- BODSON, M., 1989. Régulation et mécanismes de contrôle du développement reproducteur de l'azalée (*Rhododendron sp.*). Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.), Bruxelles, 134p.
- BODSON, M., 1992. Interaction between growth regulators and photoperiod in the control of the reproductive development of *Rhododendron simsii*. *Acta Hort.* 305:97-102.
- BROWN, W. L., 1972. Flowering of Azaleas with controlled photoperiods and gibberellic acid. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 98(3):300-303.
- BROWN, W. L. & BOX, C. O., 1971. Effects of succinic acid 2,2 dimethylhydrazide and photoperiod, temperature manipulation

- on flowering and vegetative by passing in Azalea cvs. RedWing and Alaska. J. Am. Soc. Hort. Sci. 96(6):823-825.
- BROWN, P. H. & MENARY, R. C., 1994. Flowering in pyrethrum (*Tanacetum cinerariaefolium* L.). II-Changes in plant growth regulator concentrations. J. Hort. Sci. 69(6):985-992.
- CATHEY, H. M., 1964. Physiology of growth retarding chemicals. Annu. Rev. Plant Physiol. 15:271-302.
- CLELAND, C.F., 1978. The flowering enigma. Bio Sci. 28:265-269.
- COEN, E. & CARPENTER, R., 1992. The power behind the flower: what makes a plant flower? New Sci. 134(1818):24-7.
- CRILEY, R. A., 1969. Effect of short photoperiods, cycocel, and gibberellic acid upon flower bud initiation and development in Azalea "Hexe". J. Am. Soc. Hort. Sci. 94:392-396.
- CRILEY, R. A., 1985. Rhododendrons and Azaleas. IN: Handbook of Flowering (A. H. Havelly, ed.), vol IV, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.180-197.
- CROZIER, A., 1983. The Biochemistry and Physiology of gibberellins. vol. 1, Praeger, New York, 569p.
- FALK, R.H., GIFFORD Jr., E. M., CUTTER, E. G., 1971. The effect of various fixation schedules on the scanning letron microscopic image of *Tropaeolum majus*. Am. J. Bot. 58(7):676-680.
- FRANKLAND, B. & WAREING, P. F., 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. Nature 185:255-256.

- FRENCH, C. J. & ALSBURY, J., 1988. Effect of pre-force storage conditions on early flowering of *Rhododendron*. Hort Sci. 23(2):356-358.
- GODKIN, S. E. & BALLANTYNE, D. J., 1970. Inflorescence initiation and endogenous gibberellin content of Red Wing azaleas (*Rhododendron* cv.) as Influenced by succinic acid 2,2-dimethylhydrazide. Can. J. Bot. 48:13-821.
- GOMES, F. P., 1984. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. POTAFOS, 160p.
- GRAEBE, J. E., 1987. Gibberellin biosynthesis and control. Annu. Rev. Plant Physiol. 38:419-465.
- GREPPIN, H.; PENEL, C.; & TACCHINI, P., 1995. Some indicators of flowering and floral stage. Flowering Newsletter 19:20-27.
- GREYSON, R. I., 1994. The Development of Flowers. Oxford University Press, Oxford, 314p.
- HAZEBROEK, J. P., METZGER, J. D., MANSAGER, E. R., 1993. Thermoinductive regulation of gibberellin metabolism in *Thlaspi arvense* L. II - Cold induction of enzymes in gibberellin biosynthesis. Plant Physiol. 102:547-552.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agric. Exp. Stn. (Cir. 347), Berkeley, 39p.
- JEFFCOAT, B. & COCKSHULL, K. E., 1972. Changes in the levels of endogenous growth regulators during development of the

- flowers of *Chrysanthemum morifolium*. J. Exp. Bot. 23(76):722-732.
- JOINER, J. N., WASHINGTON, O., JOHNSON, C. R., NELL, T. A., 1982/1983. Effect of exogenous growth regulators on flowering and cytokinin levels in Azaleas. Sci. Hort. 18:143-151.
- JONES, D. F., MACMILLAN, J., RADLEY, M. 1963. Plant hormones-III- Identification of gibberellic acid in immature barley and immature grass. Phytochemistry 2:307-314.
- KEEVER, G. J. & FOSTER, W. J., 1991. Uniconazole suppresses bypass shoot development and alters flowering of two forcing azalea cultivars. Hort. Sci. 26(7):875-877.
- KINET, J.M., SACHS, R. M., BERNIER, G., 1985. The Physiology of Flowering. Vol.III, CRC Press, Boca Raton, Florida, 274p.
- KONING, R. E., 1984. The roles of plant hormones in the growth of the corolla of *Gaillardia grandiflora* (Asteraceae) ray flowers. Am. J. Bot. 7(1):1-8.
- LARSON, R. A. & SYDNOR, T. D., 1971. Azalea flower bud development and dormancy as influenced by temperature and gibberellic acid. J. Am. Soc. Hort. Sci. 96(6):786-788.
- LUNA, V., LORENZO, E., REINOSO, H., TORDABLE, M. C., ABDALA, G., PHARIS, R.P., BOTTINI, R., 1990. Dormancy in Peach (*Prunus persica* L.) flower buds. Plant Physiol. 93:20-25.
- LYNDON, R. F. & BATTEY, N. H., 1985. The growth of the shoot apical meristem during flower initiation. Biol. Plant. 27:339-349.

- MACDANIEL, C. N.; SINGER, S. R. & SMITH, S. M. E., 1992. Developmental states associated with the floral transition. *Dev. Biol.* 153:59-69.
- MASIA, A., COLAUZZI, M., RAMINA, A., 1993. Hormonal changes during the rest period in fruit buds of *Prunus persica* L. Batsch under three different climatic conditions. *Acta Hort.* 329:281-283.
- METZGER, I.D., 1987. Hormones and reproductive development. In: *Plant hormones and their role in plant growth and development* (P. J. Davies ed.), Martinus Nijhoff Publishers, pp.431-462.
- METZGER, J. D. & ZEEVAART, J. A., 1982. Photoperiodic control of gibberellin metabolism in Spinach. *Plant Physiol.* 69:287-291.
- MONTEIRO, R. W. & GIFFORD Jr., E., 1988. Morphological aspects of the shoot apex of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) during transition to flowering. *Rev. Bras. Bot.* 11:1-10.
- MURAKAMI, Y., 1973. The role of gibberellins in the growth of floral organs of *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.* 14:91-102.
- MURAKAMI, Y., 1975. The role of gibberellins in the growth of floral organs of *Mirabilis jalapa*. *Plant Cell Physiol.* 16:337-345.
- O'NEILL, S.D., 1992. The photoperiodic control of flowering: progress toward understanding the mechanism of induction. *Photochem. & Photobiol.* 56:789-801.

- PEMBERTON, H. B. & WILKINS, H. F., 1985. Seasonal variation on the influence of low temperature, photoperiod, light source, and GA in floral development of the Evergreen Azalea. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110(5):730-737.
- PETTERSEN, H., 1972. The effect of temperature and daylength on shoot growth and bud formation in azaleas. *Am. Soc. Hort. Sci.* 97(1):17-24.
- PETTERSEN, H., KRISTOFFERSEN, T., 1969. The effect of daylength and temperature on flowering in the azalea cultivars "Red Wing" and "Reinhold Ambrosius". *Acta Hort.* 14:27-38.
- POWELL, L. E., 1987. The hormonal control of bud and seed dormancy in woody plants. In: *Plant hormones and their role in plant growth and development* (P. J. Davies, ed.), Martinus Nijhoff Publishers, pp.539-552.
- RAAB, M. M. & KONING, R. E., 1987. Interacting roles of gibberelin and ethylene in corolla expansion of *Ipomoea nil* (Convolvulaceae). *Am. J. Bot.* 74(6):921-927.
- RADEMACHER, W., 1992. Inhibition of gibberellin production in the fungi *Gibberella fujikuroi* and *Sphaceloma manihoticola* by plant growth retardants. *Plant Physiol.* 100:625-629.
- REEVE, D. R. & CROZIER, A., 1978. The analysis of gibberellins by high performance liquid chromatography. In: *Isolation of plant growth substances* (J. R. Hillman, ed.), Cambridge University Press, London, pp.41-47.
- SACHS, R. M. & HACKETT, W. P., 1977. Chemical control of flowering. *Acta Hort.* 68:29-49.

- SAITO, T., HIROSAWA, T., HORIUCHI, S., MURAKAMI, A., MATSUSHIMA, H., 1995. A study of SEM examination on fresh hop (*Humulus Lupulus* L.) peltate glandular trichomes. J. Electron. Microsc. 44:39-44.
- SEIDLOVÁ, F., 1985. Growth regulators in changing apical growth at transition to flowering. Biol. Plant. (PRAHA) 27(4-5):350-359.
- SNEDECOR, G. W., 1965. Structural methods applied to experiments in agriculture and biology.. The IOWA State College, IOWA, 534p.
- SPONSEL, V. M., 1985. Gibberellins in *Pisum sativum* - their nature, distribution and involvement in growth and development of the plant. Physiol. Plant. 65:533-538.
- STUART, N. W., 1961. Initiation of flower buds in *Rhododendron* after application of growth retardants. Science 134:50-52.
- TALON, M. & ZEEVAART, A. D., 1990. Gibberellins and stem growth as related to photoperiod in *Silene armeria* L. Plant Physiol. 92:1094-1100.
- TREWAVAS, A. J., 1983. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? Trends Biochem. Sci. 8:354-357.
- VÁLIO, I. F. M. & SCHWABE, W. W., 1970. Growth and Dormancy in *Lunularia cruciata* (L.) Dum. VII- The Isolation and Bioassay of Lunularic Acid. J. Exp. Bot. 21(66):138-150.

- VINCE-PRUE, D., 1975. Photoperiodism in Plant. McGraw-Hill Publ., London, 444p.
- WHEALY, C. A., NELL, T. A. & BARRETT, J. E., 1988. Plant growth regulator reduction of bypass shoot development in Azalea. Hort Sci. 23(1):166-167.
- WILKINSON, R. I. & RICHARDS, D., 1991. Influence of paclobutrazol on growth and flowering of Rhododendron "Sir Robert Peel". Hort Sci. 26(3):282-284.
- YAMAGUCHI, I., FUJISAWA, S. & TAKKHASHI, N., 1982. Qualitative and semi-quantitative analysis of gibberellins. Phytochemistry 21(8):2049-2055.
- ZANEWICH, K. P. & ROOD, S. B., 1995. Vernalization and gibberellin physiology of Winter Canola. Plant Physiol. 108:615-621.
- ZEEVAART, J. A. D., 1971. Effects of photoperiod on growth rate and endogenous gibberellins in the long-day rosette plant spinach. Plant Physiol. 47:821-827.