

mt
ANA MARIA MONTEIRO

Este exemplar corresponde à Redação Final da Tese defendida pela Sra Ana Maria Monteiro de B. Costa e aprovada pela Comissão julgadora.

Campinas, 14 de junho de 1984
Rosely Rocha Sharif.

PROCESSOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS COM O
DESENVOLVIMENTO DE GEMAS LATERAIS DE MILHO

Impd

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências

mt
Orientadora: Dra. ROSELY ROCHA SHARIF

CAMPINAS

1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A G R A D E C I M E N T O S

À Dra. ROSELY ROCHA SHARIF cuja orientação e incentivo permitiram a realização deste trabalho.

Ao Dr. ALAN CROZIER, do Departamento de Botânica da Universidade de Glasgow, pela sua orientação nas análises de giberelinas.

Aos Professores Dr. G.M. FELIPPE, Dr. I.F.M.VÁLIO e Dra. M.F.A. PEREIRA pelas sugestões feitas por ocasião da pré-banca.

Ao Dr. MOACYR P. MONTEIRO, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelas fotografias feitas para o presente trabalho e colaboração na fase final do mesmo.

Aos amigos, funcionários e professores do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, que de um modo ou outro colaboraram na realização deste trabalho.

À BASF pelo fornecimento do inibidor de biossíntese de giberelinas, BAS 106 .. W (LAB 102883).

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Departamento de Botânica da Universidade de Glasgow, pelo uso dos laboratórios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Pesquisas e ao Conselho Britânico pelo auxílio financeiro.

Í N D I C E G E R A L

	Pág.
I - INTRODUÇÃO -----	1
1. ASPECTOS DO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E REPRODUTIVO DE CEREAIS, PARTICULARIZANDO O MILHO -----	1
2. FATORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DO DESEN- VOLVIMENTO DE GEMAS -----	5
3. BIOSÍNTESE E METABOLISMO DE GIBERELINAS--	13
4. OBJETIVOS -----	17
II - MATERIAL E MÉTODOS -----	20
1. MATERIAL BIOLÓGICO -----	20
2. CONDIÇÕES DE CULTURA NO CAMPO -----	20
3. CONDIÇÕES DE CULTURA EM VASO -----	21
4. CONDIÇÕES DE CULTURA HIDROPÔNICA -----	21
5. NUTRIENTES MINERAIS -----	22
6. FOTOPERÍODO -----	24
7. TRATAMENTOS COM REGULADORES DE CRESCIMENTO	25
7.1. Citocininas -----	25
7.2. Giberelinas -----	25
7.3. Inibidores de biossíntese de gibere- linas -----	26
8. MEDIDAS REALIZADAS COM A PLANTA INTACTA --	27

	Pág.
9. DISSECÇÃO E MEDIDAS EM PLANTAS DISSECADAS	28
10. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO -----	29
11. ANÁLISE DE GIBERELINAS -----	29
11.1. Preparação do material vegetal ----	29
11.2. Extração -----	30
11.3. Purificação -----	31
11.4. Cromatografia líquida de alto desempenho -----	34
11.5. Bioensaios -----	36
12. ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	38
III - RESULTADOS -----	39
1. MORFOLOGIA DOS ÁPICES DE MILHO -----	39
2. ANÁLISE DO CICLO COMPLETO DO DESENVOL- VIMENTO DE PLANTAS DE MILHO -----	43
3. EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS -----	52
3.1. Nutrientes -----	52
3.2. Fotoperíodo -----	55
4. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO -----	64
4.1. Citocininas -----	64
4.2. Giberelinas -----	71
4.3. Inibidores de ^{bios} síntese de gibere- linas -----	84

	Pág.
5. ANÁLISE DE GIBERELINAS ENDÓGENAS -----	93
5.1. Distribuição, Identificação e Quantificação -----	93
5.2. Metabolismo -----	101
IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES -----	110
V - RESUMO -----	127
VI - ABREVIATURAS -----	129
VII - BIBLIOGRAFIA -----	130

* * * *

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ápice principal -----	40
Figura 2. Gemas laterais -----	42
Figura 3. Altura da parte aérea e do eixo principal durante o ciclo completo do desenvolvimento -----	44
Figura 4. Número de folhas e gemas laterais iniciadas, durante o ciclo completo do desenvolvimento -----	45
Figura 5. Aplicação de solução nutritiva: peso seco -----	53
Figura 6. Frequência da aplicação de solução nutritiva: peso seco -----	54
Figura 7. Fotoperíodo: crescimento da parte aérea-----	60
Figura 8. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: número de folhas iniciadas -----	74
Figura 9. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: altura da parte aérea -----	75
Figura 10. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: altura do eixo principal -----	76
Figura 11. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: número de gemas laterais iniciadas -----	78

Figura 12. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: altura da parte aérea de plantas cultivadas em cultura hidropônica -----	82
Figura 13. Tratamento com CCC a 10^{-2} M -----	86
Figura 14. Tratamento com LAB 102883: altura da parte aérea -----	88
Figura 15. Tratamento com LAB 102883: aspecto ge ral da planta -----	92
Figura 16. Perfil cromatográfico de giberelinas radioativas padrão após HPLC-RC -----	94
Figura 17. Atividade giberelínica medida nas fra- ções provenientes da HPLC através do bioensaio da aleurona de cevada -----	96
Figura 18. Atividade giberelínica medida nas fra- ções provenientes da HPLC no bioensaio de alface -----	98
Figura 19. Atividade giberelínica medida nas fra- ções provenientes da HPLC no bioensaio do arroz anão "Tan-gi ^{bu} bozu" -----	99
Figura 20. Perfil cromatográfico da ^3H GA ₂₀ pa- drão (200.000 dpm), após HPLC-RC -----	103
Figura 21. Perfil cromatográfico do extrato das folhas de plantas tratadas com ^3H GA ₂₀ após HPLC-RC -----	105

- Figura 22. Perfil cromatográfico do extrato dos eixos e das raízes de plantas tratadas com ^3H GA₂₀, após HPLC-RC ----- 108
- Figura 23. Estrutura molecular do esqueleto básico das giberelinas, ent-gibereleano, e da GA₁, GA₈, GA₂₀ e C/D-R GA₂₀ e GA₂₉ ----- 123

Í N D I C E D E T A B E L A S

	Pág.
Tabela 1. Composição da solução padrão modificada de HOAGLAND e ARNON (1938) -----	23
Tabela 2. Comprimento das folhas (cm) medido durante o ciclo completo do desenvolvimento -----	46
Tabela 3. Comprimento dos entrenós (cm) medido durante o ciclo completo do desenvolvimento -----	48
Tabela 4. Comprimento das gemas laterais (mm) medido durante o ciclo completo do desenvolvimento -----	49
Tabela 5. Estado das gemas laterais durante o ciclo completo do desenvolvimento -----	50
Tabela 6. Frequência da aplicação de solução nutritiva: comprimento (cm) das quatro primeiras folhas (F1 - F4) -----	56
Tabela 7. Frequência da aplicação de solução nutritiva: comprimento (mm) das gemas laterais (P2 e P3) -----	57
Tabela 8. Fotoperíodo: plantas de milho com 76 dias de idade -----	58

Tabela 9. Fotoperíodo: plantas de milho com 84 dias de idade -----	62
Tabela 10. Fotoperíodo: comprimento (mm) das gemas laterais de plantas com 84 dias de idade -----	63
Tabela 11. Tratamento com 6-BA a 10^{-5} M através das raízes (imersão por 4 horas) : desenvolvimento das plantas -----	65
Tabela 12. Tratamento com 6-BA a 10^{-5} M através das raízes (imersão por 4 horas) : comprimento (mm) das gemas laterais ----	67
Tabela 13. Tratamento com 6-BA através das raízes, em cultura hidropônica: comprimento (mm) das gemas laterais (P2, P3, P4) -----	69
Tabela 14. Tratamento com 6-BA através das raízes em cultura hidropônica: peso seco (mg) -----	70
Tabela 15. Tratamento com 6-BA pela região apical: comprimento (mm) das gemas laterais (P2, P3, P4) -----	72
Tabela 16. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: comprimento (mm) das gemas laterais -----	79

Tabela 17. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: desenvolvimento de plantas cultivadas em cultura hidropônica -----	83
Tabela 18. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: comprimento (mm) das gemas laterais de plantas cultivadas em cultura hidropônica -----	85
Tabela 19. Tratamento com LAB 102 883 -----	89
Tabela 20. Tratamento com LAB 102 883: comprimento (mm) das gemas laterais -----	91
Tabela 21. Análise da distribuição, identificação e quantificação de giberelinas endógenas no eixo principal de milho -----	100
Tabela 22. Análise do metabolismo da ^3H GA_{20} em milho: extrato das folhas-----	106
Tabela 23. Análise do metabolismo da ^3H GA_{20} em milho: extrato dos eixos principais -----	109

I - I N T R O D U Ç Ã O

1. ASPECTOS DO DESENVOLVIMENTO VEGETATIVO E REPRODUTIVO DE CEREAIS, PARTICULARIZANDO O MILHO

O cultivo das gramíneas tem ocupado uma posição de destaque na economia mundial, dada a sua importância na produção de grãos como também na formação de pastagens. Dados fornecidos pela FAO (Food Agricultural Organization) indicaram que, em 1970, os cereais forneciam para a dieta humana mais de dois terços da matéria seca, sendo 80% contribuição de apenas onze espécies. Cinquenta por cento da proteína da dieta humana eram contribuição feita principalmente pelo trigo, arroz e o milho (EVANS, 1978).

Dada a dependência do homem deste grupo de plantas, muitos estudos têm sido feitos sobre o crescimento e desenvolvimento dos cereais.

Além dos estudos do desenvolvimento anatômico destas plantas existem trabalhos a respeito do aumento de produção, sendo analisado neste aspecto, além do componente genético, o papel de fatores ambientais. Aspectos da fisiologia do desenvolvimento como a correlação do crescimento das diferentes partes da planta, o balanço e metabolismo hormonal durante o desenvolvimento, ainda precisam ser esclarecidos.

No estágio vegetativo, a parte aérea das gramíneas é composta por lâminas e bainhas foliares que emergem dos nós na base do caule. Os entrenós, que separam os nós, são

bastante contraídos, fazendo com que o caule verdadeiro seja muito curto e não visível externamente. Aparentemente, o que parece ser o caule, são simplesmente as lâminas e bainhas foliares enroladas umas sobre as outras, formando um cilindro, de onde novas folhas se desenrolam e expandem. A região meristemática apical do caule é a responsável pela formação das folhas, nós e entrenós que constituem a parte aérea da planta. Na axila de cada folha, situada em um nó, é iniciada uma gema lateral que, em condições favoráveis cresce, formando o perfilho ou ramo axilar, de estrutura semelhante a do ramo de origem (LANGER, 1972). Grande parte do recrescimento das pastagens está relacionado ao número e tamanho das gemas de perfilho vegetativas, presentes na base do eixo principal reprodutivo na época da poda (JEWISS, 1972).

Dependendo das condições ambientais e internas da própria planta o ápice principal e o das gemas laterais podem se transformar em órgãos florais. No caso das gramíneas os órgãos florais são inflorescências. Os tipos de inflorescência mais comuns são: a espiga, onde as flores são sésseis e inseridas ao longo de um eixo, muito próximas umas das outras; e a panícula que corresponde a um cacho composto onde os ramos decrescem da base para o ápice (FERRI et al., 1978). A formação de flores é geralmente acompanhada por rápido alongamento dos entrenós, principalmente dos mais apicais, fazendo com que o eixo principal e os ramos laterais se tornem visíveis.

Em milho, as folhas são os primeiros órgãos a emergir, logo após a emergência do coleoptile e constituem ,

durante todo o estágio vegetativo, os únicos órgãos visíveis externamente. De acordo com SASS (1951, in DUNCAN, 1978), na maior parte das variedades de milho, cinco folhas estão formadas no embrião na semente e numa planta de milho normal vinte a vinte e três folhas são formadas durante o período de crescimento vegetativo. No estágio reprodutivo não há formação de novas folhas, sendo apenas notado o desenvolvimento das folhas já iniciadas. O alongamento dos entrenós só ocorre após todos os primórdios de gemas e folhas terem sido formados.

O sistema radicular se desenvolve rapidamente durante o estágio vegetativo e raízes adventícias se formam nos nós mais basais no final do desenvolvimento vegetativo (ALDRICH, 1975).

Todas as gemas laterais em milho são morfologicamente idênticas no início do desenvolvimento (BONNETT, 1953). O primórdio de gema é iniciado no eixo principal da planta, na axila da folha a que ele corresponde. Segundo BONNETT (1953), que fez amplo estudo do desenvolvimento anatômico de plantas de milho, o desenvolvimento da gema lateral se inicia por divisões periclinais da terceira camada celular da região meristemática apical do eixo principal. Esta origem difere da das folhas que se iniciam anteriormente, por divisões periclinais da primeira e segunda camadas celulares do ápice do eixo principal.

Durante a formação da gema, às divisões periclinais seguem-se várias divisões oblíquas e anticlinais. A divisão celular é mais rápida na região basal do primórdio, fazendo com que a gema lateral se curve para cima, paralela -

mente ao eixo principal. A organização dos tecidos da gema lateral está determinada desde o início do desenvolvimento do primórdio e é igual à organização do eixo principal. Geralmente, após este desenvolvimento inicial, as gemas laterais permanecem em estado latente até a planta mudar do estágio vegetativo para o reprodutivo quando seu desenvolvimento é retomado e se transformam em espigas (BONNETT, 1953).

Em alguns casos, as gemas laterais mais basais podem se desenvolver em perfilhos. Estes perfilhos são semelhantes ao eixo principal, podendo inclusive sustentar espigas (DUNCAN, 1978). Os cultivares de milho variam muito no número de perfilhos desenvolvidos. A causa desta variação ainda não está estabelecida, mas de acordo com SEHGAL (1963, *in* DUNCAN, 1978) a tendência para uma variedade perfilhar está provavelmente relacionada ao grau de parentesco com o Teosinte, tipo de gramínea do gênero *Zea* que perfilha profusamente.

A mudança do estágio vegetativo para o reprodutivo, também descrita em detalhe por BONNETT (1953), é notada inicialmente no meristema apical. Este se alonga, sendo que em dois a três dias seu comprimento passa a ser duas vezes seu diâmetro.

Logo após este alongamento, duas saliências ("double ridge") se formam na base do ápice, saliências estas, provavelmente extensões do tecido nodal. Para muitos autores o aparecimento da primeira "double ridge" é considerado o primeiro sinal visível da iniciação floral. Acima destas saliências começam a se formar, acropetamente, os ramos que sustentarão as inflorescências masculinas, no caso do milho,

constituindo a panícula. As "double ridges" precedem cada ramo floral formado, tanto na panícula como nas espigas. Neste momento, o eixo principal começa a se alongar rapidamente e as gemas laterais começam também a se transformar, constituindo as espigas. Existe uma hierarquia no desenvolvimento das espigas, sendo dominantes as mais apicais. Tanto nas flores das espigas como nas da panícula, três estames e um pistilo são iniciados, mas o pistilo é abortado na panícula e os estames o são nas espigas.

DUNCAN (1978) descreve a mudança do estágio vegetativo para o reprodutivo como etapa marcante do desenvolvimento de plantas de milho, determinando o número de folhas, nós e entrenós formados no eixo principal, já que quando ela ocorre estes órgãos param de ser formados.

2. FATORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO DE GEMAS

Há muito tempo se sabe que a gema apical do eixo principal controla o crescimento e desenvolvimento das gemas e ramos laterais em plantas superiores. Geralmente a gema apical cresce mais vigorosamente que as laterais. O grau de dominância apical varia entre as espécies de plantas, sendo que às vezes varia entre cultivares ou variedades da mesma espécie.

Uma vez que a dominância apical é um fenômeno geral em plantas superiores, espera-se um mecanismo comum para o seu controle. Embora esteja sendo feita intensa pesquisa sobre o assunto, até o momento, explicações claras não

foram estabelecidas. A maioria dos estudos feitos a este respeito indicam que fatores nutricionais, bem como hormonais, estão envolvidos no controle da dominância apical. Estes estudos foram feitos principalmente com dicotiledôneas, cuja morfologia facilita a utilização de certos métodos como a remoção do ápice ou a aplicação local de substâncias de crescimento. Além disso, os estudos do crescimento de gemas em monocotiledôneas não podem ser feitos através de observações externas, pelo menos na sua fase inicial.

Grande parte dos trabalhos sobre o desenvolvimento de gemas em monocotiledôneas tem sido feita com o propósito de aumentar a produção de grãos ou de matéria seca. Assim, neste aspecto, conhece-se em mais detalhes o efeito de alguns fatores ambientais, mas o modo de ação destes fatores ainda não está claro. Para isto, estudos detalhados de estádios mais iniciais do desenvolvimento das plantas são necessários.

O crescimento vegetativo dos ramos laterais ou perfilhos é grandemente afetado pelo suprimento de nutrientes minerais. LANGER (1966, in LANGER, 1972) observou em várias gramíneas que o aumento no suprimento de nitrogênio, fósforo e potássio aumenta a produção de perfilhos. STACCIARINI (1984) demonstrou que em sorgo forrageiro, que possui fraca dominância apical, a deficiência ou o excesso de nitrato no substrato, provoca redução no número de perfilhos, enquanto excesso de fosfato promove a iniciação e emergência dos mesmos. Em cevada, o retardamento no fornecimento de nitrato às plântulas atrasa marcantemente a emer -

gência de perfilhos (METIVIER, 1979).

Por outro lado, o perfilhamento em cereais é controlado por substâncias de crescimento como auxinas (LEOPOLD 1946; JEWISS, 1972), giberelinas (JOHNSTON e JEFFCOAT, 1977) e citocininas (LANGER et al., 1973; SHARIF e DALE, 1980). Relacionando a hipótese nutricional com a hormonal, foi proposto por SHARIF e DALE (1979) que, em cevada, a disponibilidade de nutrientes minerais determina os níveis de citocininas endógenas, que por sua vez induzem a liberação das gemas laterais inibidas.

Nutrientes minerais em algumas plantas exercem influência na transição do crescimento vegetativo para o reprodutivo. Na verdade, parece haver um antagonismo entre os dois tipos de crescimento. Tratamentos que favorecem o crescimento vegetativo podem ser desfavoráveis para a indução da floração. Assim, foi demonstrado que baixos níveis de nitrogênio tendem a adiantar a floração em algumas plantas e altos níveis de nitrogênio atrasam a floração em outras, como o *Pisum sativum* (WAREING e PHILLIPS, 1981). Acredita-se que para a maioria das plantas a nutrição mineral é de importância secundária no controle da iniciação floral. Em várias plantas fotoperiódicas e que requerem frio para florescer, mudanças no suprimento de nitrogênio são incapazes de alterar as exigências indutoras (BERNIER et al., 1981). Assim, o suprimento de nitrogênio para estas espécies é apenas um fator modulador quando as outras condições ambientais são determinantes ou não do florescimento.

O fotoperíodo afeta o perfilhamento em gramíneas (EVANS, 1978) sendo que este efeito varia com a espécie. Foi sugerido por EVANS (1978) que, em geral, o perfilhamento é menor sob condições de dias curtos.

O efeito do fotoperíodo na indução da floração é bem mais marcante que no perfilhamento. Segundo LANGER (1972) quase todas as gramíneas são sensíveis ao fotoperíodo. O mesmo autor sugere que plantas que têm as gemas induzidas para florais quando o fotoperíodo excede um certo fotoperíodo crítico, são geralmente espécies de altas latitudes. As gramíneas de regiões tropicais tendem a ser plantas de dias curtos e florescem somente quando os dias são menores do que um certo fotoperíodo crítico. Muitas delas, principalmente as das regiões equatoriais, podem ser sensíveis a mudanças de meia hora por dia no fotoperíodo.

No caso do milho, foi demonstrado que muitas variedades respondem a dias curtos; outras, são indiferentes ao fotoperíodo (VINCE-PRUE, 1975).

O efeito fotoperiódico na indução da floração é fortemente modificado pela temperatura. Assim, em várias gramíneas sensíveis a dias longos, temperaturas noturnas de 12 a 18 °C atrasam ou inibem a iniciação floral, especialmente se o fotoperíodo é somente marginalmente adequado. Contrastando, plantas de dias curtos quase sempre exigem temperaturas acima de 12 a 16 °C para a iniciação floral. Esta suplementação do efeito do fotoperíodo pela temperatura provavelmente tem papel importante na distribuição geográfica das gramíneas (LANGER, 1972).

Após a iniciação floral, o fotoperíodo e a temperatura continuam tendo efeito na taxa de crescimento e desenvolvimento das inflorescências e no alongamento do eixo. Em milho, condições de dias curtos estimulam a iniciação das inflorescências, mas a manutenção das plantas nestas condições prejudica o desenvolvimento normal das espiguetas (HESLOP - HARRISON, 1961). O desenvolvimento de carpelos é intensificado quando plantas de milho, após a indução floral, continuam sob condições de dias curtos, podendo culminar com o aparecimento de flores femininas na panícula (HESLOP-HARRISON 1964, in VINCE-PRUE, 1975).

A participação de substâncias reguladoras de crescimento nos processos de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de gemas tem sido extensivamente estudada. O papel das auxinas intensificando a dominância apical vem sendo sugerido há algum tempo, principalmente em dicotiledôneas, mas ainda existem resultados conflitantes a este respeito. Acreditou-se inicialmente que a auxina, produzida na gema apical, se deslocaria basipetamente alcançando as gemas laterais onde seria responsável pela inibição do desenvolvimento das mesmas (THIMANN e SKOOG, 1934; in PHILLIPS, 1971). Mais recentemente, HILLMAN et al. (1977) mostraram que em feijão o nível de ácido indolil-3-acético nas gemas laterais aumenta após a remoção do ápice principal. Em relação às monocotiledôneas, poucas informações se têm a respeito deste grupo de substâncias controlando a dominância apical. Isto ocorre devido à morfologia das plantas que dificulta o seu manuseio e ao efeito das auxinas que é muito dependente das condições

ambientais, da fase de crescimento em que as plantas se encontram no momento do tratamento com o regulador e da maneira pela qual o regulador é fornecido. Foi mostrado que auxina pode reduzir o perfilhamento em diversas plantas como trigo, cevada, aveia (JOHNSTON e JEFFCOAT, 1977; HARRISON e KAUFMAN, 1980) e sorgo (ISBELL e MORGAN, 1982). O ácido triiodo benzóico (TIBA), inibidor do transporte de auxinas, promove o perfilhamento em várias gramíneas (LEOPOLD, 1946 ; JEWISS, 1972; LANGER et al., 1973 e ISBELL e MORGAN, 1982) . Trabalhando com cevada, ROCHA (1978) notou que o ácido indol il-3-acético promove o crescimento de gemas de perfilhos quando elas estão liberadas da dominância apical e não detectou efeito do TIBA.

As auxinas também estão envolvidas no controle da transformação de gemas vegetativas em florais. Aparentemente, níveis altos de auxinas inibem esta transformação, mas o papel deste composto na floração parece ser mais complexo (BERNIER et al., 1981). Novamente, a ação das auxinas é fortemente dependente de vários fatores que explicam porque influências promotoras e inibidoras podem ser encontradas nas mesmas espécies. O efeito das auxinas está muitas vezes relacionado ao fotoperíodo. Assim, verificou-se que algumas plantas de dias curtos, quando submetidas a condições de dias longos, têm um nível endógeno de auxinas relativamente alto (CHAILAKHYAN e LOZHNIKOVA, 1966).

Em 1967, SACHS e THIMANN (in PHILLIPS, 1971) verificaram, em ervilha, que o crescimento das gemas laterais era promovido por tratamento do ápice das mesmas com cinetina, seguido de aplicação de auxina. LANGER et al. (1973)

mostraram que cinetina estimula a liberação das gemas laterais do controle exercido pelo ápice principal. Estes autores sugeriram que a cinetina poderia agir aumentando o fluxo de fotossintatos em direção às gemas laterais. Vários outros pesquisadores confirmaram o papel das citocininas estimulando o crescimento de gemas laterais em diversas monocotiledôneas, como em *Lolium temulentum* (JEWISS, 1972), *Lolium multiflorum* (CLIFFORD e LANGER, 1975), cevada (JOHNSTON e JEFFCOAT, 1977; SHARIF e DALE, 1980), aveia (JOHNSTON e JEFFCOAT, 1977; HARRISON e KAUFMAN, 1980), trigo (JOHNSTON e JEFFCOAT, 1977) e sorgo (ISBELL e MORGAN, 1982).

O papel do etileno no controle do perfilhamento não é bem claro, contudo, em relação à indução floral, sabe-se que etileno promove floração, principalmente nas bromeliáceas (ZEEVAART, 1978), enquanto nas outras famílias é geralmente inibidor (ABELES, 1967).

Existem algumas evidências de que o ácido abscísico (ABA) inibe o perfilhamento. Em aveia, foi demonstrado por HARRISON e KAUFMAN (1980) que ABA aplicado tanto isoladamente como em combinação com cinetina foi efetivo em inibir a iniciação de perfilhos.

Foi sugerido por WAREING e EL-ANTABLY (1970, in BERNIER, 1981) que inibidores (não conclusivamente identificados como ABA) promoveriam a floração em algumas plantas de dias longos e inibiriam a iniciação floral em plantas de dias curtos. No entanto, existem resultados que contradizem esta afirmação; por exemplo, KING e colaboradores (1977) mostraram que não há modificação nos níveis de ABA de *Lolium temulentum* com o fotoperíodo. Parece que o efeito promotor

do ABA poderia ser não específico para a floração e atribuído à inibição do crescimento vegetativo, que em algumas plantas é requisitado para a indução floral (EL-ANTABLY et al., 1967).

As giberelinas (GAs) estão envolvidas tanto no processo de crescimento vegetativo das gemas laterais (perfilhamento) como na indução floral, sendo que neste último fenômeno seu papel é mais evidente. Ácido giberélico (GA_3) aumenta o alongamento do caule e reduz o perfilhamento em arroz (HARADA e VERGARA, 1972), trigo, aveia e cevada (JOHNSON e JEFFCOAT, 1977) enquanto o cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio (CCC), tem o efeito oposto em cevada, trigo (WUNSCH, 1973) e *Lolium temulentum* (JEWISS, 1972). Enquanto o perfilhamento é restrito em plantas tratadas com GA_3 , o crescimento de perfilhos já emergidos é promovido por esta substância (JEWISS, 1972). Em *Sorghum bicolor*, a aplicação de GA_3 inibiu o perfilhamento, sendo que com a parada de aplicação do regulador, o número de perfilhos aumentou rapidamente (MORGAN et al., 1977; ISBELL e MORGAN, 1982).

As giberelinas são as únicas substâncias de crescimento que, quando aplicadas, são capazes de induzir a floração de plantas (de dias longos), em condições não indutivas. O efeito promotor das GAs é particularmente claro na indução da floração de plantas que crescem em roseta durante a fase vegetativa, como é o caso de *Hyoscyamus* (LANG, 1956 in ZEEVAART, 1983). Estas plantas são normalmente transformadas em florais pelo frio e/ou dias longos e o GA_3 pode normalmente substituir o frio mas nem sempre a fotoindução (LANG, 1965). Apesar destas observações, o papel das

GAs na indução da floração não pode ser generalizado e resultados conflitantes aparecem. Em alguns casos GA₃ pode promover floração e alongamento do eixo em plantas de dias curtos, como foi notado em cana de açúcar por HESLOP-HARRISON (1960). Como a maioria das plantas nas quais as GAs promovem floração apresentam hábito de crescimento em roseta, acreditou-se que estas substâncias afetariam a iniciação floral somente in diretamente, através de reações associadas ao alongamento do eixo (LANG, 1957 in ZEEVAART, 1983). Esta generalização é difícil de ser mantida já que plantas tratadas com GAs quase sempre apresentam alongamento do eixo independente da resposta floral.

3. BIOSÍNTESE E METABOLISMO DE GIBERELINAS

A maioria dos tecidos de plantas superiores examinados até o momento contém várias das sessenta e seis giberelinas conhecidas. Estas giberelinas variam qualitativa e quantitativamente com o tempo, podendo se concluir que GAs são ativamente metabolizadas nos tecidos das plantas. Várias das GAs conhecidas são provavelmente precursoras ou catabolitos de algumas poucas GAs que são as que têm função hormonal "per se" (HEDDEN et al., 1978).

Estudos sobre o metabolismo de reguladores de crescimento em plantas superiores apresentam algumas dificuldades. A quantidade de GAs em plantas superiores, especialmente nos tecidos vegetativos, é muito baixa, portanto deve ser tomado cuidado no fornecimento de precursores às plantas para que sejam aplicadas concentrações fisiológicas. Além

disso, estes precursores devem ser administrados de tal forma que não danifiquem as plantas e permitam adequada absorção. A translocação das substâncias (precursores e metabolitos) dentro da planta pode causar dificuldades na análise. Também aparecem problemas durante a extração e purificação dos metabolitos dificultando sua identificação.

Os trabalhos iniciais sobre a via biossintética de giberelinas foram feitos por BIRCH e colaboradores (1958, 1959 in COOLBAUGH, 1983) que demonstraram que tanto GAs com dezenove (C_{19} -GAs) como com vinte (C_{20} -GAs) átomos de carbono, são formadas pela via biossintética dos isoprenóides, a partir do mevalonato. A via biossintética das GAs pode ser dividida em três estágios. O primeiro constitui a conversão de mevalonato em ent-caureno, feita através de enzimas solúveis. No segundo, o ent-caureno é oxidado por enzimas ligadas às membranas formando as primeiras GAs, que serão oxidadas no terceiro estágio por enzimas solúveis, formando os outros tipos de GAs (HEDDEN, 1983).

A via biossintética do mevalonato até a formação da primeira giberelina, GA_{12} -aldeído, foi demonstrada no fungo *Gibberella fujikuroi* (WEST, 1973) e em sistemas de células livres de várias angiospermas como *Pisum sativum* (COLBAUGH e MOORE, 1971) e *Zea mays* (WURTELE et al., 1982). Esta via biossintética não foi confirmada em plantas superiores intactas devido às dificuldades técnicas do estudo, mas assume-se que a via demonstrada "in vitro" também ocorra "in vivo".

A conversão de GA_{12} -aldeído (C_{20} -GA) em outras GAs foi extensivamente estudada em *G. fujikuroi* (BEARDER,

1983). Estes estudos fornecem a base para o estudo do metabolismo de GAS nas plantas superiores. Assim, notou-se em *G. fujikuroi*, que após hidroxilações e oxidações do GA₁₂-aldeído formando outras GAS de vinte carbonos, ocorre a perda do carbono 20 da molécula dando origem às GAS com dezenove carbonos (BEARDER, 1983). Em plantas intactas as informações sobre as prováveis vias metabólicas partindo do GA₁₂-aldeído formando as C₁₉-GAS são especulativas e se baseiam nos tipos de C₂₀-GAS que ocorrem naturalmente na espécie onde o metabolismo está sendo estudado. Como, nas angiospermas, existe uma série de C₂₀-GAS estruturalmente diferentes das encontradas em *G. fujikuroi*, presume-se que, em plantas superiores, existam vias metabólicas alternativas às encontradas no fungo (SPONSEL, 1983).

A maior parte dos estudos metabólicos feitos com plantas intactas dizem respeito ao metabolismo de C₁₉-GAS aplicadas às plantas. Algumas vezes somente um único passo metabólico foi demonstrado numa espécie em particular. Como existem evidências de que gêneros relacionados possuem C₁₉ e C₂₀-GAS com estruturas semelhantes, tentou-se construir vias metabólicas comuns para grupos relacionados de plantas.

Várias giberelinas endógenas foram identificadas em diferentes grupos da família Gramínea como aveia (KAUFMAN et al., 1976), centeio (DATHE et al., 1978), cevada (GASKIN et al., 1982) e milho (HEDDEN et al., 1982), sendo que muitas delas foram também identificadas em dicotiledôneas. Entretanto, mais estudos são necessários para indicar se existem diferenças na fisiologia das giberelinas nos dois grupos de plantas.

As principais GAS identificadas em milho foram GA_{17} , GA_{19} , GA_{20} , GA_{44} e GA_{53} (HEDDEN et al., 1982). Além disso, também se sugeriu a presença de GA_1 , GA_8 e GA_{29} baseando-se em técnicas de cromatografia gasosa (HEDDEN et al., 1982). Como estas GAS estão também presentes em muitas leguminosas, SPONSEL (1983) sugeriu que em milho a via metabólica de GAS é semelhante a um dos caminhos sugeridos para as leguminosas, no qual a primeira C_{19} -GA formada é a GA_{20} . Neste caminho, chamado "via da hidroxilação precoce na posição 13", o GA_{12} -aldeído é transformado em GA_{53} que por sua vez dá origem a GA_{44} que é convertida em GA_{19} . Esta última dá origem a GA_{17} e a GA_{20} . Os passos metabólicos até a formação da GA_{20} (primeira C_{19} -GA) foram sugeridos baseando-se nos estabelecidos em culturas de células livres de *Pisum sativum* (KAMIYA e GRAEBE, 1983, in SPONSEL, 1983). A GA_{20} através de uma 3β -hidroxilação dá origem a GA_1 e através de uma 2β -hidroxilação dá origem a GA_{29} . GA_{20} pode também se ligar a uma molécula de glicose formando uma GA-conjugada, o GA_{20} -glicosídeo. A GA_1 , por sua vez, através de uma 2β -hidroxilação dá origem a GA_8 . Tanto GA_1 como GA_8 podem se ligar a açúcares, formando as GAS-conjugadas, GA_1 -glicosídeo, ester de GA_1 -glicosídeo e GA_8 -glicosídeo. A via metabólica a partir da GA_{20} (C_{19} -GAS) foi estabelecida através do fornecimento de C_{19} -GAS marcados à plântulas de *Phaseolus vulgaris* (SPONSEL, 1983).

Confirmado esta possível via metabólica sugerida para o milho, PHINNEY em 1984, trabalhando com quatro mutantes de milho anão, demonstrou existir apenas uma única via metabólica de GA_{12} -aldeído até GA_1 e que a GA_1 é a única gi

berelina natural ativa "per se" no alongamento do eixo de plantas de milho. Um diagrama desta via, de acordo com PHINNEY (1984), é apresentado a seguir.

Parece que esta via metabólica, da "hidroxilação precoce na posição 13", levando à formação da C_{19} -GA, GA_{20} , é de ocorrência geral em plantas superiores (BEARDER, 1983). Outras vias formadoras de C_{19} -GAs provavelmente existem. Estas vias são fundamentalmente semelhantes, diferindo apenas no grau e posição das hidroxilações das C_{20} -GAs (SPONSEL, 1983).

Fatores ambientais como luz, fotoperíodo, disponibilidade de água, etc., podem alterar o metabolismo das C_{19} -GAs fornecidas às plantas durante um estudo do metabolismo. A maior parte dos trabalhos mostraram desativação das GAs aplicadas, tanto por 2- β hidroxilação como por conjugação. Estes passos metabólicos não ocorrem em *G. fujikuroi* onde estas GAs não têm função (SPONSEL, 1983). Assim, SPONSEL (1983) sugere que estes processos de desativação devem estar especificamente relacionados ao controle dos níveis de GA biologicamente ativos nos tecidos das plantas superiores.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo o estudo do desenvolvimento de plantas de milho, com especial atenção às gemas laterais e aos processos fisiológicos que estão relacionados às transformações que elas possam sofrer.

Numa primeira etapa, procura-se correlacionar alguns processos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvi

DIAGRAMA 1

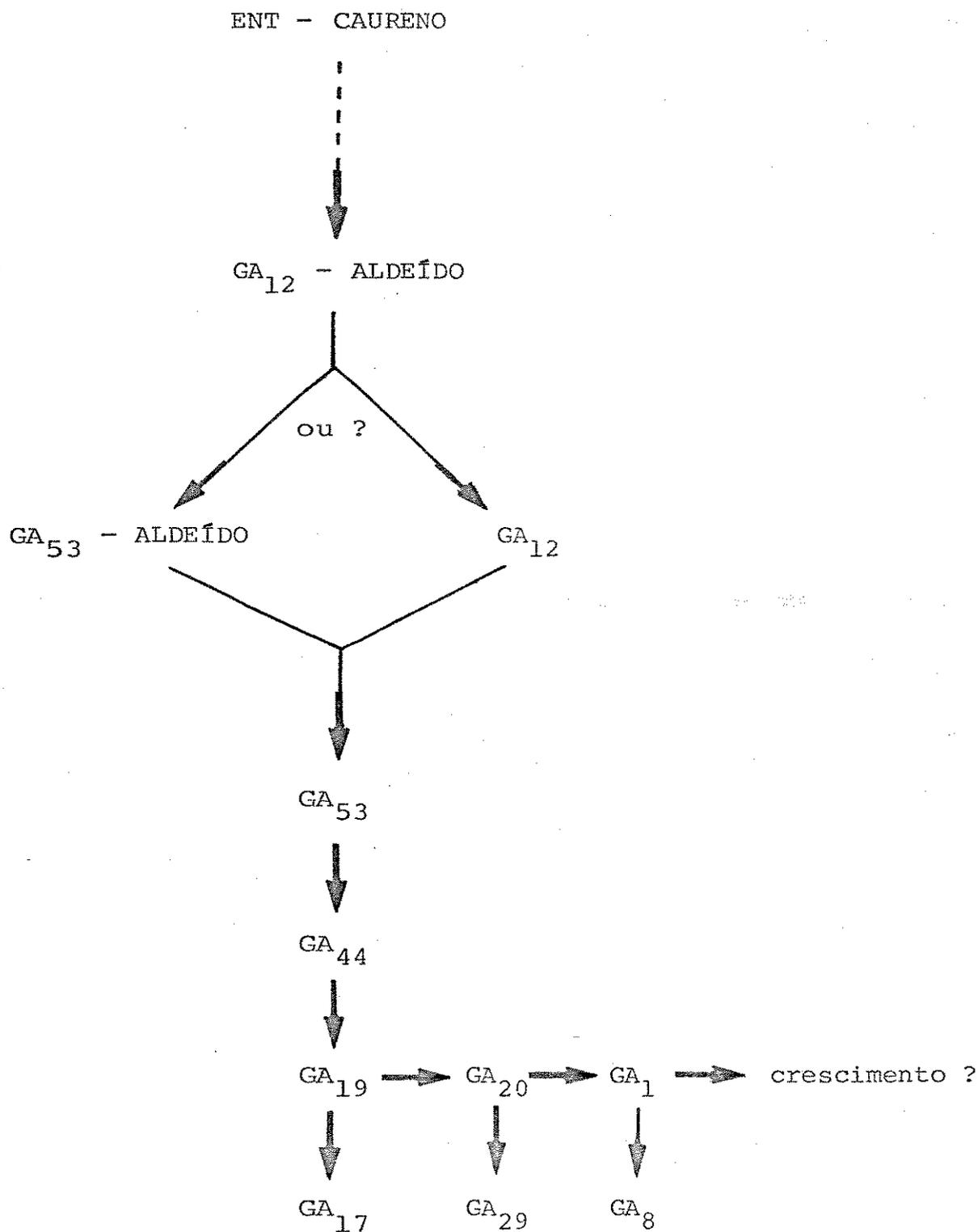


DIAGRAMA 1. Via hipotética da "hidroxilação precoce na posição 13" em milho, levando à formação da GA₁, biologicamente ativa

mento da planta, principalmente durante a transição vegetativo-floral, etapa onde as gemas laterais se transformam em espigas.

A seguir, para se estabelecerem correlações entre os diferentes processos fisiológicos, analisa-se o efeito de fatores ambientais bem como de substâncias reguladoras de crescimento no desenvolvimento das plantas.

Levando-se em consideração o possível envolvimento das giberelinas no relacionamento dos principais eventos que ocorrem em milho durante a transformação vegetativo-floral, analisa-se o conteúdo endógeno destes hormônios vegetais e procura-se sugerir possíveis conversões sofridas pelas giberelinas nesta etapa marcante do desenvolvimento de milho.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Na maior parte dos experimentos, as plantas estudadas foram de um cultivar de milho (*Zea mays* L.) híbrido isogênico, proveniente do cruzamento da linhagem pura L 720 (usada como planta masculina) com a linhagem pura 423-1 wx. Estas linhagens foram obtidas através de vários retrocruzamentos, garantindo a homogeneidade do genótipo. O cultivar e as linhagens puras parentais nos foram fornecidos pelo Dr. William J. da Silva, do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Além destes, foram utilizados dois outros cultivares híbridos, o HMD 7974 e o HMD 6999, da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. Estes dois últimos cultivares foram usados apenas nos experimentos de nutrição mineral.

2. CONDIÇÕES DE CULTURA NO CAMPO

Grãos homogêneos foram selecionados e plantados num campo de 10 m de largura por 20 m de comprimento. Este campo fazia parte do campo de cultivo de milho utilizado pelo Departamento de Genética da UNICAMP. Antes do plantio o campo foi tratado com adubo mineral e inseticida, segundo a rotina do Departamento de Genética da UNICAMP, e foram fei

tas covas (15 cm de profundidade por 5 cm de largura) em 10 linhas (com um intervalo de 1 m entre cada linha) sendo que na linha, cada cova foi feita com um intervalo de 40 cm. Foram colocados dois grãos por cova. A limpeza do campo e a irrigação foram feitas regularmente durante o período de análise também seguindo a rotina do Departamento de Genética da UNICAMP.

3. CONDIÇÕES DE CULTURA EM VASO

Grãos homogêneos, selecionados, foram colocados para embeber por 3 h em água destilada e a seguir foram plantados em vasos plásticos com terra ou vermiculita previamente hidratadas.

Durante o crescimento, as plantas foram mantidas em casa de vegetação sem controle de temperatura ou luz, com exceção dos experimentos onde se analisou o efeito do fotoperíodo. As plantas foram regadas com água (destilada nos experimentos de nutrição) geralmente uma vez por dia. Quando não especificada, a nutrição foi feita com adubo orgânico ou granulado mineral (N, P, K) que foram misturados à terra antes do plantio.

4. CONDIÇÕES DE CULTURA HIDROPÔNICA

Grãos selecionados foram colocados para embeber por 3 h em água destilada. A seguir foram transferidos para rolo de germinação que foi mantido em casa de vegetação,

sob condições naturais, até as raízes das plântulas terem atingido cerca de 3 cm e o coleoptile ter emergido. O rolo de germinação consistia em duas folhas de papel de filtro em bebidas em água destilada, sobre as quais dispunha-se os grãos de milho. Sobre os grãos, colocava-se outra folha de papel de filtro umedecida. As folhas eram enroladas e colocadas em becker com água. Após terem recebido ou não o tratamento com reguladores de crescimento, dependendo do experimento, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 3 litros, contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1938), modificada (tabela 1) com ou sem substância reguladora de crescimento, conforme o experimento. Foram colocadas 3 plântulas por vaso, presas cuidadosamente a orifícios existentes na tampa dos mesmos. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, sob aeração constante e em condições naturais de temperatura e luz.

5. NUTRIENTES MINERAIS

Nos experimentos onde foi observado o efeito de nutrientes minerais, solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1938), modificada foi fornecida às plantas cultivadas em vermiculita (40 ml de solução por vaso de 500 ml).

Num primeiro experimento a aplicação de nutrientes foi feita semanalmente a partir do segundo dia após o plantio. Plantas controle foram regadas apenas com água destilada.

Quando se testou o efeito da frequência de aplicação de nutrientes no desenvolvimento das plantas, estas

TABELA 1 - Composição da solução nutritiva padrão modificada.

- A solução de concentração normal (100%) foi preparada com 5 ml de cada solução de macro e micronutrientes por litro de água destilada e 1 ml da solução de ferro

TABELA 1

SOLUÇÕES ESTOQUES	QUANTIDADE (g) UTILIZADA PARA A PREPARAÇÃO DE 1 LITRO DE CADA ESTOQUE
Macronutrientes:	
- KH_2PO_4	27,22
- KNO_3	101,11
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	236,10
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	98,60
Micronutrientes:	
- H_3BO_3	0,57
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,36
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,04
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,02
- H_2MoO_4	0,02
Solução de Ferro:	
- EDTA Na_2	33,20
- NaOH	3,65
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	25,00

receberam solução nutritiva uma ou duas vezes por semana, dependendo do tratamento, a partir do nono dia após o plantio, quando o coleoptile tinha 2 a 3 cm de comprimento e a primeira folha ainda não estava emergida.

6. FOTOPERÍODO

Grãos selecionados, após terem sido colocados para embeber em água por 3 h, foram plantados em vasos (3 l) com terra e submetidos a três tratamentos fotoperiódicos: 8 h de luz; 18 h de luz e 8 h de luz com o período de escuro interrompido por um choque de luz. As plantas dos três tratamentos foram submetidas, em cada dia, a 8 h de luz natural em casa de vegetação, com temperatura não controlada. Após este período, as que deveriam receber somente 8 h de luz, eram transferidas para câmara escura onde permaneciam por 16 horas. As plantas do tratamento de 18 h de luz também passaram para câmara escura onde o período de 8 h de luz natural era complementado, imediatamente, por 10 h de luz de baixa intensidade, fornecida por lâmpada incandescente de 60 w; o ciclo de 24 h era completado com escuro. As plantas do terceiro tratamento também passaram para câmara escura, onde receberam um choque de meia hora de duração, no meio do período escuro de 16 horas, dado também com lâmpada incandescente de 60 w.

7. TRATAMENTOS COM REGULADORES DE CRESCIMENTO

7.1. Citocininas

A 6-benziladenina (6BA) foi fornecida às plantas através de três métodos diferentes. No primeiro, as raízes de plântulas germinadas em rolo de germinação e com coleoptile medindo de 2 a 3 cm (plântulas com três a quatro dias de idade) foram mergulhadas na solução de 6BA a 10^{-5} M ou em água destilada (controle) onde permaneceram durante quatro horas. Após este período, foram retiradas, lavadas com água destilada e replantadas (vasos de 500 ml) em vermiculita. No segundo método, plântulas com a mesma idade fisiológica que as do tratamento descrito acima e germinadas da mesma maneira, foram colocadas em cultura hidropônica com solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1938) modificada, a 10%, pura (controle) ou com 6BA, nas concentrações de 10^{-6} M, 10^{-7} M e 10^{-8} M. As raízes destas plantas permaneceram mergulhadas na solução durante cinco dias, quando esta foi trocada por solução na concentração normal (tabela 1) sem a ~~substância~~ substância reguladora de crescimento. No terceiro método, a aplicação de uma gota de 10 μ l da solução de 6BA em diferentes concentrações (10^{-4} M, 10^{-5} M e 10^{-6} M) ou água destilada (controle) foi feita no interior do cilindro formado pela bainha das folhas, em diversas etapas do desenvolvimento de plantas mantidas em vasos (500 ml) com terra. Esta aplicação foi feita com uma microsseringa.

7.2. Giberelinas

Ácido giberélico (GA_3) foi fornecido às plantas através da aplicação de uma gota de 50 μ l de uma solução de

10^{-3} M no interior do cilindro formado pelas bainhas das folhas das plântulas. Desta forma, cada planta recebeu cerca de $17,3 \mu\text{g}$ de GA_3 em cada aplicação. Plantas controle receberam uma gota ($50 \mu\text{l}$) de água destilada. As fases do desenvolvimento das plantas nas quais as aplicações foram feitas variaram conforme o experimento, bem como a frequência destas aplicações. Durante estes experimentos as plantas foram mantidas em vasos (de 3 l) com terra ou em cultura hidropônica.

As plantas que foram tratadas com giberelina radioativa ($^3\text{H}|\text{GA}_{20}$) foram cultivadas em cultura hidropônica até possuírem oito folhas emergidas. Nesta fase, uma gota de $50 \mu\text{l}$ de solução de $^3\text{H}|\text{GA}_{20}$ ($\approx 5.000 \text{ kdpm}$) em etanol e água foi aplicada no interior do cilindro formado pela bainha das folhas.

7.3. Inibidores de biossíntese de giberelinas

Dois inibidores de biossíntese de giberelinas foram testados. O primeiro, cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio (CCC) inibe a ciclização do geranylgeranylpirofosfato em ent-caureno (BARNES et al., 1969). O segundo, 5-(4-clorofenil)-3,4,5,9,10 - pentaaza-tetraciclo 5,4,10^{2,6}, 0^{8,11} dodeca - 3,9 - dieno (Tetacyclacis ou LAB 102883) inibe a reação oxidativa do caureno para ácido caurenóico (RADEMACHER et al., 1983).

As plantas tratadas com CCC foram plantadas em vasos (3 l) com terra adubada; 200 ml de CCC, na concentração de 10^{-2} M foram aplicados no solo duas vezes por semana. As aplicações iniciaram-se quando as plantas tinham

cinco folhas emergidas. Plantas controle foram regadas apenas com água.

O LAB 102883 foi fornecido às plantas mantidas em cultura hidropônica, dissolvido na solução nutritiva (tabela 1). As concentrações usadas foram: $7,9 \cdot 10^{-10}$ M e $7,9 \cdot 10^{-9}$ M. Este inibidor foi fornecido às plantas desde o dia em que foram transferidas para a cultura hidropônica, quando tinham apenas o coleoptile emergido, até o final do experimento. Plantas controle permaneceram em cultura hidropônica com solução nutritiva (tabela 1) pura.

8. MEDIDAS REALIZADAS NA PLANTA INTACTA

A altura da parte aérea foi medida com auxílio de régua de plástico transparente milimetrada, desde a inserção da primeira folha no eixo até o ápice da maior folha.

Foram contadas as folhas emergidas (todas as que eram visíveis sem manuseio da planta) e as distendidas (as que possuíam o limbo totalmente desenrolado). Como o desenvolvimento cronológico das plantas variou muito, dependendo das condições ambientais existentes em cada experimento, adotou-se o número de folhas emergidas para se estabelecer a idade fisiológica das plantas, o que possibilitou a comparação de plantas cultivadas em diferentes épocas do ano.

Foram contados como perfilhos, todos os eixos axilares visíveis externamente, quer eles tivessem emergido acima da bainha foliar correspondente, quer a sua emer-

gência tivesse ocorrido por rompimento desta bainha foliar.

9. DISSECÇÃO E MEDIDAS EM PLANTAS DISSECADAS

Geralmente, no final de cada experimento, as plantas foram dissecadas sob lupa (Wild M3). À medida que se removiam as folhas o comprimento das mesmas era medido. Foi considerado comprimento da folha, a medida desde a inserção no eixo principal até o ápice. Após a remoção de cada folha, fazia-se a medida do comprimento da gema axilar correspondente; em alguns casos as gemas eram também dissecadas para se determinar o estado (vegetativo ou floral) de seu ápice. Nesta mesma etapa mediam-se também os comprimentos dos entrenós. Foi contado o número de folhas iniciadas, considerando-se até o primórdio mais jovem que aparecia como uma saliência, logo abaixo do domo apical. Foram também contadas as gemas laterais iniciadas na axila de cada folha ou no primórdio foliar. As folhas, gemas e entrenós, foram numerados acropetamente. As folhas são indicadas pela letra F e as gemas de perfilho pela letra P. No final da dissecção, após remoção de todas as folhas e gemas presentes no eixo principal, o comprimento deste foi medido, desde a base (inserção da primeira folha) até o domo apical ou inflorescência masculina. Nesta mesma etapa da dissecção o estado do ápice principal (vegetativo ou floral) foi observado.

Para a padronização dos estados (vegetativos ou reprodutivos) do ápice principal e gemas laterais, fotografias dos mesmos, em diferentes etapas do desenvolvi -

mento, foram feitas num fotomicroscópio Zeiss (usando - se filme Panatomic-X-Kodak ASA 32, 120mm).

10. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

O peso seco de diferentes partes da planta (raízes, endosperma e escutelo e parte aérea) foi medido em balança analítica (sensibilidade 0,1 mg). O material vegetal foi previamente mantido por 24 horas em estufa a 80 °C. O material usado para dosagem de giberelinas endógenas foi liofilizado.

11. ANÁLISE DE GIBERELINAS

11.1. Preparação do material vegetal

Plantas mantidas em condições de campo foram coletadas em três diferentes fases do desenvolvimento. As plantas da fase 1 foram coletadas bem antes do início do alongamento do eixo principal (6 folhas emergidas), as da fase 2, pouco antes do início do alongamento (10 folhas emergidas) e as da fase 3, durante o alongamento (15 folhas emergidas). Na fase 1, 205 plantas foram coletadas, na fase 2, 82 e 150 plantas na fase 3. Logo após a coleta, as raízes e folhas foram removidas e descartadas. O eixo principal foi ou não seccionado em diferentes regiões, dependendo da fase, e foi imediatamente congelado em gelo seco. Na fase 1 não se seccionou o eixo principal. Na fase 2 o eixo foi seccionado em duas regiões: dois entrenós mais basais (5º e 6º), onde se observou maior alongamento, e região apical

(entrenões acima do 6º nó, incluindo o ápice). Na fase 3 o eixo foi dividido em três regiões: região basal (9º entrenó), região apical (acima do 9º nó, mas sem a inflorescência masculina) e inflorescência masculina.

O material, assim preparado, foi guardado no congelador (-20°C) até ser liofilizado. Após a liofilização foram feitas a extração, purificação e análise das giberelinas endógenas do eixo principal de milho.

Para se analisar possíveis interconversões das giberelinas durante o desenvolvimento de plantas de milho, principalmente na transição do estado vegetativo para o floral, outro experimento foi realizado. Neste, quatro plantas, mantidas em cultura hidropônica e tratadas com $^3\text{H}|GA_{20}$ foram coletadas quatro dias após o tratamento. Imediatamente após a coleta, as plantas foram dissecadas e foram preparados três extratos: das folhas, do eixo principal e das raízes. A extração foi feita imediatamente após a coleta e dissecção. Um outro lote de quatro plantas, não tratado com giberelina radioativa, mas mantido sob as mesmas condições de crescimento que o anterior e dissecado da mesma maneira, foi usado para a determinação do peso seco. Isto pode ser feito pois as plantas foram dissecadas apenas quatro dias após o tratamento quando algum efeito da GA_{20} sobre o peso seco não seria evidente.

11.2. Extração

A extração das giberelinas dos tecidos (tanto as endógenas como as radioativas) foi feita com base no método descrito por CROZIER e DURLEY (1983) como é mostra

do no diagrama 2. No processo de extração das giberelinas das plantas que não foram tratadas com giberelina radioativa, foi adicionada, ao extrato metanólico, uma pequena quantidade de giberelina radioativa padrão. Isto foi feito para se localizar, durante a purificação dos extratos, as frações que continham giberelinas. A solução padrão adicionada aos extratos continha uma mistura de $|^3\text{H}|GA_1$ e $|^3\text{H}|GA_9$ (com aproximadamente 705 kdpm) numa concentração baixa, que não era capaz de provocar resposta nos bioensaios.

O peso do material para cada extrato onde o conteúdo de giberelinas foi analisado foi: fase 1: 4,01 g; fase 2: 6,51 g na região basal e 3,16 g na região apical; fase 3: 10,24 g na região basal; 13,57 g na região apical e 0,19 g na inflorescência.

O peso seco do material extraído de plantas tratadas com $|^3\text{H}|GA_{20}$ foi: folhas: 7,76 g; eixos: 0,47 g e raízes: 2,49 g.

11.3. Purificação

As frações ácidas em acetato de etila (diagrama 2), foram evaporadas e cada uma ressuspensa em 5 ml de metanol (MeOH): ácido acético 0,2 M (1:1). A purificação destes extratos foi feita de acordo com a metodologia de CROZIER (comunicação pessoal) que é descrita a seguir. Os extratos em MeOH - ácido acético foram aplicados numa coluna de dietilaminoetil (DEAE) - Sephadex A-25 para a purificação inicial. O processo cromatográfico utilizado foi a cromatografia de troca iônica usando-se a seguinte sequência de solventes: 1º solvente: 160 ml de ácido acético 0,2 M: MeOH

DIAGRAMA 2

Macerar o tecido e extrair 3 vezes com excesso de metanol (100%); combinar os extratos metanólicos e reduzir à fase aquosa em vácuo; adicionar volume equivalente de tampão fosfato pH 8,0; 0,5 M, se necessário ajustar o pH do extrato para 8,0 (com NaOH) (quando necessário adicionar padrão radioativo)

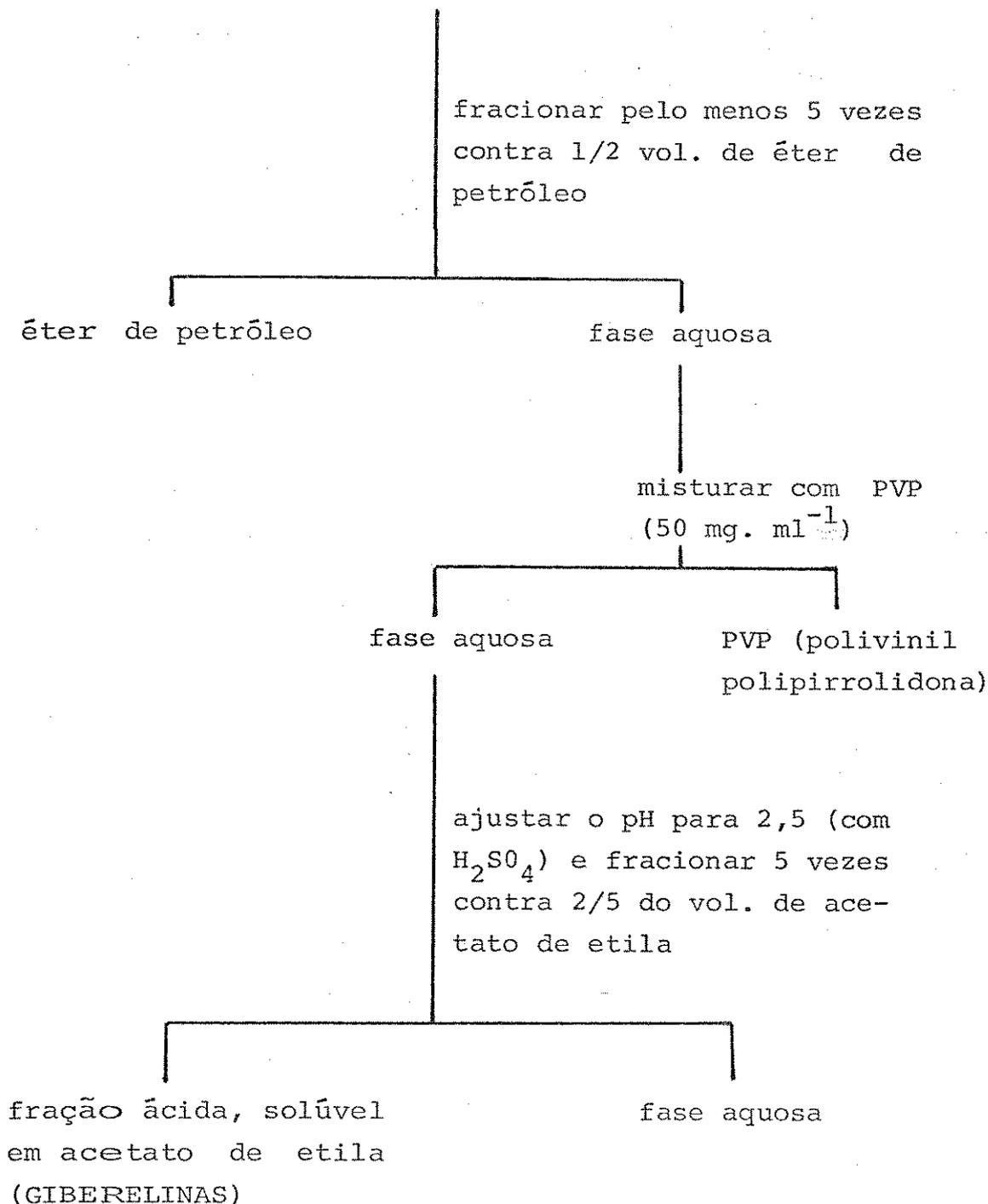


DIAGRAMA 2. Diagrama de extração e fracionamento das gibberelinas

(1:1); 2º solvente: 160 ml de ácido acético 2,0 M: MeOH (1:1) e 3º solvente: 50 ml de ácido acético 6,0 M : MeOH (1:1).

Trinta e sete frações de 10 ml foram coletadas durante o processo cromatográfico. A radioatividade das frações coletadas foi medida num contador de cintilação (LKB Wallac 1211 Minibeta). Em cada extrato, as frações que apresentaram radioatividade foram agrupadas e evaporadas. Tampão fosfato 0,5 M pH 8,0 foi adicionado ao extrato (4 vezes o volume do extrato) e o pH foi ajustado para 2,5 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 50%. Os extratos foram então fracionados em acetato de etila (EtAc) (5 vezes com dois quintos do volume do extrato). Eram deixados no congelador por 12 h (para congelar o excesso de água), a seguir secados com sulfato de sódio e evaporados. Estes extratos foram ressuspensos em EtAc: MeOH (1:1), transferidos para frascos pequenos de vidro e secados totalmente para serem submetidos à cromatografia líquida de alto desempenho ("high performance liquid chromatography" - HPCL).

O mesmo sistema cromatográfico (cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE Sephadex A-25, utilizando-se os mesmos três solventes indicados acima, porém 200 ml de cada) foi usado para a purificação dos extratos ácidos (ressuspensos em 4 ml MeOH: ácido acético 0,2 M (1:1)) das folhas das plantas tratadas com $|^3H| GA_{20}$. Neste caso, porém, coletou-se cada solvente como um todo e não em diferentes frações, já que no experimento anterior todas as frações que continham giberelinas saíram no segundo solvente, como era esperado. A radioatividade de cada solven

te foi medida para se confirmar a eficiência dos solventes durante o processo cromatográfico. Os 200 ml coletados, correspondentes ao segundo solvente, foram evaporados até secar e ressuspensos em EtAc: MeOH (1:1) para posteriormente serem submetidos à HPCL. Os extratos ácidos dos eixos e raízes das plantas tratadas com $^3\text{H} \text{ GA}_{20}$ não foram submetidos à cromatografia de troca iônica pois não apresentavam tantas impurezas como o extrato das folhas. O acetato de etila destes extratos foi evaporado e os extratos foram ressuspensos em EtAc: MeOH (1:1) para serem submetidos à HPCL.

11.4. Cromatografia líquida de alto desempenho

O sistema cromatográfico usado, para uma segunda purificação dos extratos usados para as determinações das giberelinas endógenas que seriam submetidos a bioensaios, foi o de fase reversa em gradiente líquido de metanol (de 20 a 100%) e tampão de acetato de amônia 0,02 M, pH 3,5. Os solventes eram injetados na coluna ($0,5 \text{ ml min}^{-1}$) por meio de duas bombas controladas por um computador (Altex, modelo 332). A coluna utilizada foi de 250 . 5 mm de diâmetro constituída de ODS-Hypersil (5 μm).

Os diferentes extratos, após terem sido secos, foram ressuspensos em 250 μl de metanol: tampão acetato de amônia 0,02 M, pH 3,5 (1:4) e injetados na coluna com uma microseringa.

Trinta frações de 1 ml foram recolhidas para serem submetidas aos bioensaios.

Giberelinas radioativas padrão (GA_1 , GA_4 , GA_5 , GA_8 , GA_9 e GA_{20}) também foram aplicadas à coluna e cromatografadas da mesma maneira que os extratos. Isto foi feito para se tentar identificar as giberelinas que seriam detectadas nos bioensaios, comparando-se os picos de atividade obtidos nos bioensaios com os picos de giberelinas radioativas padrão obtidos na cromatografia. Durante o processo cromatográfico destas giberelinas, a radioatividade emitida em cada uma das frações foi medida por um medidor analítico de radioatividade acoplado ao sistema cromatográfico (REEVE e CROZIER, 1977). Chamou-se este processo de HPLC-RC ("high performance liquid chromatography - radio counting").

Para a análise dos metabolitos radioativos presentes nos extratos das plantas tratadas com 3H GA_{20} , o mesmo sistema cromatográfico foi utilizado.

À medida que as frações (de 1 ml) saiam da coluna, eram misturadas com o líquido de cintilação (bombeado numa taxa de $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) e analisadas pelo medidor analítico de radioatividade como foi feito no caso das giberelinas radioativas padrão (HPLC-RC).

Para a identificação dos metabolitos radioativos presentes nos extratos das folhas, raízes e eixos das plantas, foram feitas co-cromatografias com giberelinas (GAs) radioativas conhecidas.

Para isso, o padrão de GA radioativo adequado foi misturado a uma alíquota do extrato e analisado por HPLC-RC. O metabolito e o padrão tiveram desta forma o mesmo tempo de retenção na coluna.

11.5. Bioensaios

Os bioensaios realizados estão descritos a seguir.

O primeiro foi o da produção de alfa-amilase pela camada de aleurona de grãos de cevada. O método usado foi o de JONES e VARNER (1967) sendo que as metades dos grãos sem embrião foram usadas secas (sem pré-incubação em areia). A casca foi removida previamente por embebição em ácido sulfúrico 50% durante 2 horas. Foram usadas quatro metades de grão por frasco. Cada frasco continha 1 ml de solução a ser testada (0,25 ml da amostra, já secos, mais 1 ml de água destilada ou 1 ml da solução padrão de GA₃). Cada solução foi ensaiada duas vezes. As metades das sementes foram incubadas a 30 °C por 42 horas. O conteúdo de açúcar redutor foi então medido pelo método de NELSON (1944). Sete cultivares de cevada ("Midas", "Kym", "Flare", "Korn", "Dragon", "Havilla" e "Golden Promise") foram testados inicialmente a fim de se escolher o que produzia melhor resposta às giberelinas. O que apresentou melhor resposta foi o "Flare" que foi então utilizado para a análise das giberelinas dos extratos. As soluções padrão de GA₃ (ácido giberélico) usadas foram de 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 4. 10⁻³ e 10⁻³ µg. ml⁻¹.

O segundo bioensaio foi o do alongamento do hipocótilo de alface (FRANKLAND e WAREING, 1960). O cultivar "Arctic King" foi o escolhido, pela sua sensibilidade às giberelinas. As sementes foram incubadas em água destilada, no escuro, por 4 horas. Após este tempo, o excesso de água foi removido e as sementes foram deixadas ger

minar por 24 horas a 25 °C em câmara de crescimento sob luz contínua fluorescente, branca. As sementes germinadas foram colocadas em placas de Petri (5 cm de diâmetro) sobre papel de filtro com 3 ml da solução a ser testada (0,5 ml da amostra, já seca + 3 ml de água destilada ou 3 ml da solução padrão de GA₃). Foram usadas 10 sementes por placa de Petri. As plântulas foram incubadas a 25 °C por 60 horas em câmara de crescimento sob luz fluorescente, branca, contínua. Após este período o hipocotilo de cada uma foi medido, com auxílio de régua de plástico transparente, milimetrada. As soluções padrão de GA₃ usadas foram de 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 4. 10⁻³ e 10⁻³ µg . ml⁻¹.

Foi também utilizado o bioteste do alongamento da bainha da segunda folha de arroz anão "Tan ^ugibozu" (método da microgota). O método utilizado foi o de MURAKAMI (1968). As concentrações de GA₃ padrão foram 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻⁴ µg . µl⁻¹. Foi aplicada uma gota de 1 µl das soluções dos extratos a serem testados ou das soluções padrão. Em cada plântula a gota foi apoiada na lâmina da 2ª folha já emergida. Foram usadas 5 plântulas por solução. Após 3 dias de incubação em câmara de crescimento sob luz fluorescente, branca, contínua a 32 °C, a bainha da segunda folha foi medida com auxílio de régua de plástico transparente milimetrada.

12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando as diferenças entre médias de dois diferentes tratamentos não foram claramente evidentes, aplicou-se o teste "t" para comparação destas médias. Quando se analisaram experimentos com mais de dois tratamentos, usou-se o teste F e calculou-se a diferença mínima significativa (DMS) a 5% pelo teste de Tukey (SNEDECOR, 1962). Valores diferentes foram indicados por letras diferentes que acompanham os números nas tabelas e os pontos nos gráficos.

Nos experimentos onde giberelinas endógenas foram analisadas através de bioensaios, o conteúdo de GAS, expresso em nanogramas equivalentes a GA_3 (ng eq. GA_3) foi calculado nas frações cuja resposta média foi significativamente diferente do controle. Para os bioensaios do arroz anão e da alfaca, calcularam-se as retas de regressão dos extremos inferiores e superiores dos intervalos de confiança da média das respostas das soluções padrão. Determinou-se graficamente o conteúdo mínimo e máximo de giberelina em cada fração, levando-se em conta os intervalos de confiança das médias. Para os bioensaios da aleurona de cevada apenas as retas de regressão dos padrões foram calculadas e a média das frações plotadas sobre estas retas determinando-se também graficamente o conteúdo de GA na fração. Para o cálculo das retas de regressão usou-se o logaritmo natural da concentração de GA_3 usada no padrão.

III - R E S U L T A D O S

1. MORFOLOGIA DOS ÂPICES DE MILHO

Fotografias dos ápices do eixo principal e das gemas laterais de milho estão nas figuras 1 e 2.

A figura 1A mostra o ápice do eixo principal no estágio vegetativo, que foi denominado estágio \underline{y} . Na figura 1B, que é o estágio \underline{y}^+ , o ápice principal está se alongando, um pouco antes da transformação em floral. Na figura 1C, pode-se ver que os primeiros ramos florais (os basais) estão começando a se formar - este é o estágio \underline{f} . As figuras 1D e 1E mostram ápices florais com quase todos os ramos florais iniciados - é o estágio \underline{f}^+ . Após este estágio, o ápice apresenta flores totalmente maduras, abertas, com anteras emergidas. Denominou-se este estágio \underline{f}^a (do qual não se apresenta aqui nenhuma ilustração).

Os mesmos estádios definidos para ápices do eixo principal, são definidos para os das gemas laterais.

A figura 2 mostra um ápice vegetativo e um reprodutivo de gemas laterais. A figura 2A é o estágio \underline{y} e a 2B apresenta o estágio \underline{f}^+ .

FIGURA 1. Ápice principal.

A. Vegetativo; estágio \underline{v} .

Aumento: 110,59 x.

B. Vegetativo alongado, com a formação da "double ridge"; estágio \underline{v}^+ .

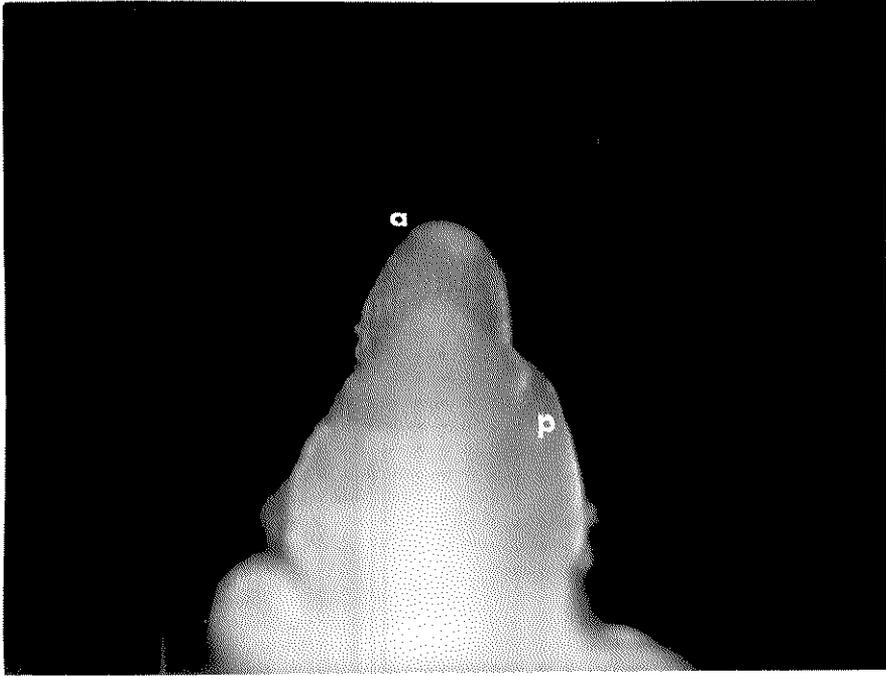
Aumento: 54,86 x.

a= ápice

p= primórdio foliar

d= "double ridge"

A



B

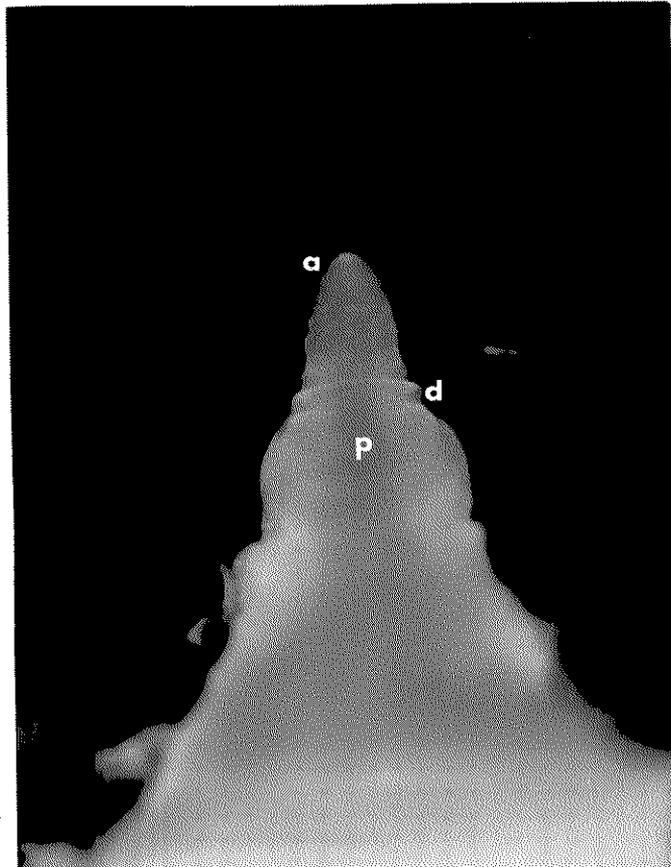


FIGURA 1. Ápice principal.

C. Floral; estágio \underline{f} .

Aumento: 34,29 x.

D. Floral: estágio \underline{f}^+ .

Aumento: 34,29 x.

E. Floral: estágio \underline{f}^+ .

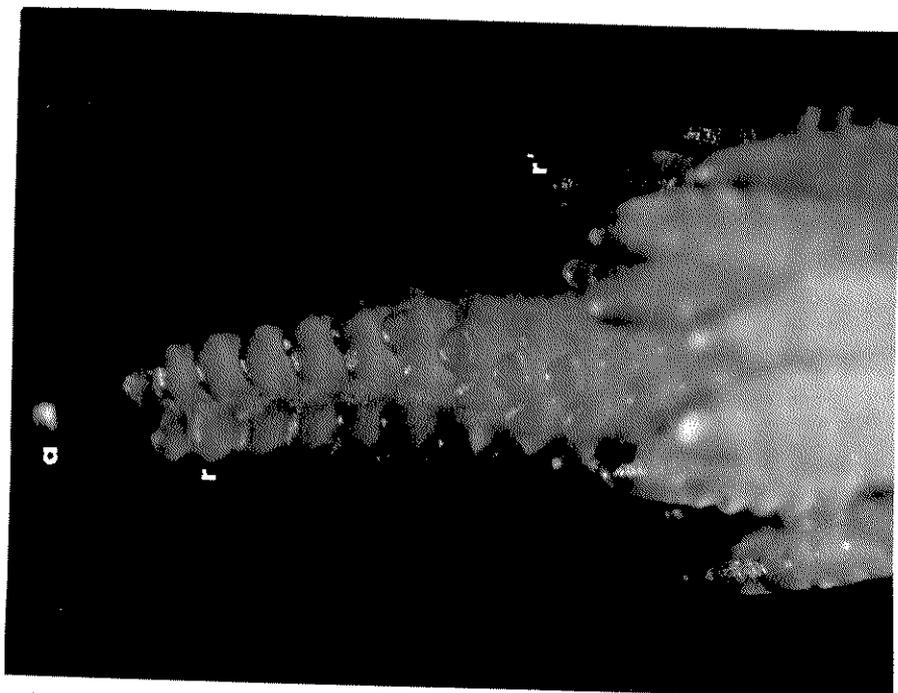
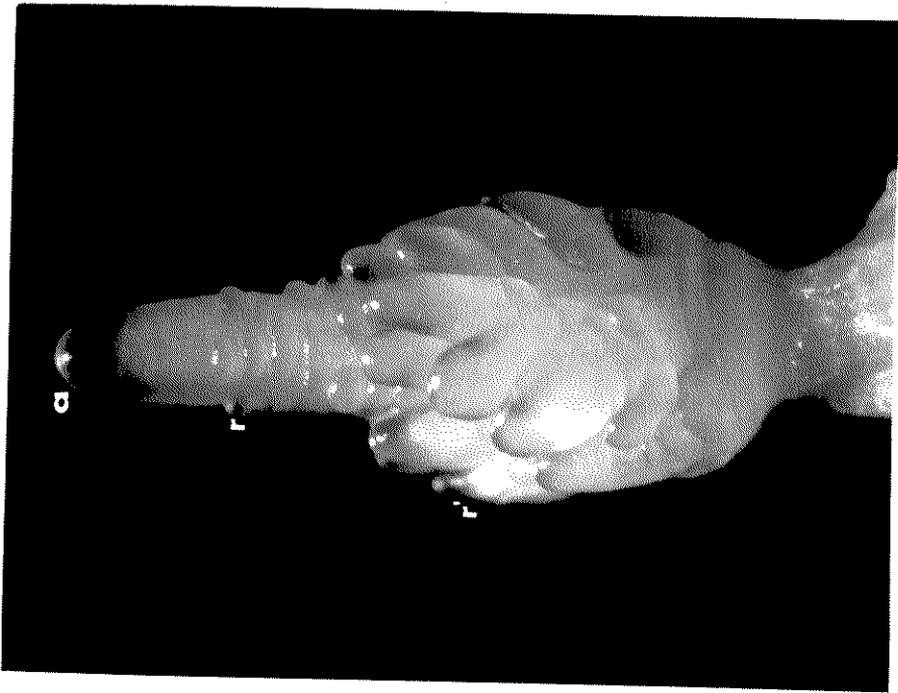
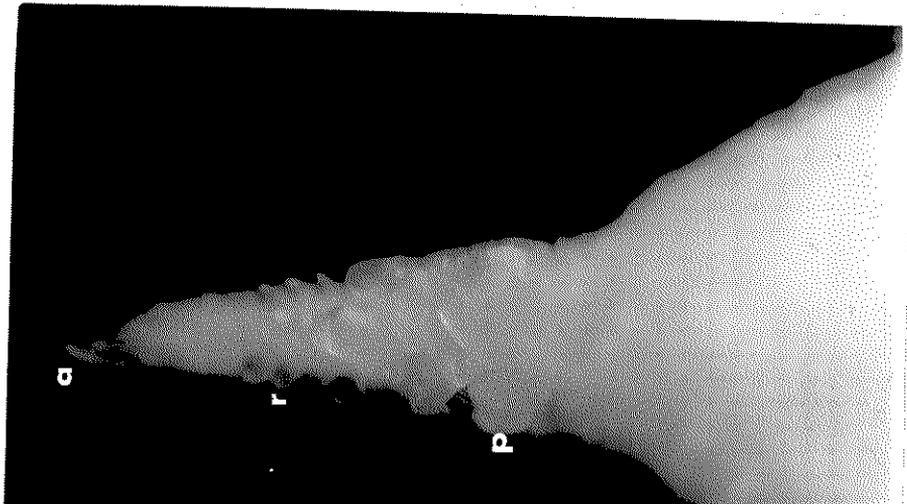
Aumento: 34,29 x.

a= ápice

r= ramo formador de espiguetas

r'= ramo longo onde se formarão ramos formadores de espiguetas

Figura 1



D

E

FIGURA 2. Gemas laterais.

A. Vegetativa; estágio y.

Aumento: 67,50 x.

B. Floral; estágio f⁺.

Aumento: 54,86 x.

a= ápice

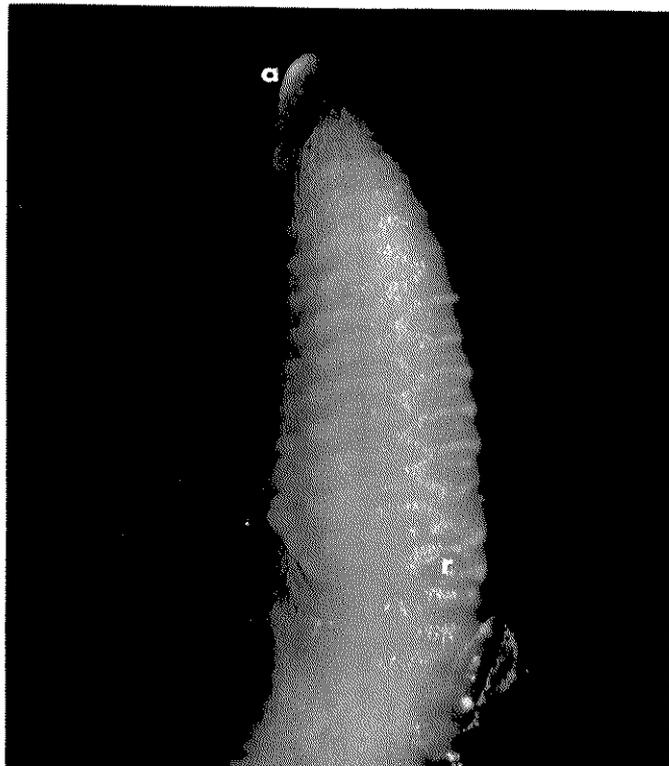
p= primórdios foliares

r= ramo formador de espiguetas (protuberância)

A



B



2. ANÁLISE DO CICLO COMPLETO DO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE MILHO

Em um experimento de campo, foram tomadas 11 a mostras (com 10 plantas cada) durante 109 dias.

A curva obtida para a altura da parte aérea (fig. 3) foi uma sigmóide, o que era esperado num padrão normal de crescimento. Assim, obteve-se até o 28º dia, uma taxa de crescimento de $3,5 \text{ cm} \cdot \text{dia}^{-1}$; entre o 38º e o 56º a taxa foi máxima ($5,7 \text{ cm} \cdot \text{dia}^{-1}$), diminuindo após este período para $2,5 \text{ cm} \cdot \text{dia}^{-1}$, entre o 56º e o 81º dia. Em relação à altura do eixo principal (fig. 3) notou-se que até o 28º dia quase não houve alongamento ($0,3 \text{ cm} \cdot \text{dia}^{-1}$); após este período, a taxa de alongamento aumentou bruscamente, sendo de $5,2 \text{ cm} \cdot \text{dia}^{-1}$ entre os dias 28 e 56 e de $3,8 \text{ cm} \cdot \text{dia}^{-1}$ entre os dias 56 e 81. Este aumento brusco do alongamento do eixo coincidiu com a iniciação da floração (setas na fig. 3), já que se observou que no 28º dia de cres cimento, 50% dos ápices principais estavam induzidos para a floração, apresentando a "double ridge" (fig. 1B).

Outro fato interessante foi observado neste mesmo período, quando se analisou o número de folhas e o número de gemas laterais iniciadas (fig. 4). Assim, coincidindo com o brusco alongamento do eixo observou-se uma parada na diferenciação de primórdios foliares e de gemas late-rais, sendo que o número máximo de folhas formadas foi em média 23,5 no dia 28 e o de gemas foi 17,5 no dia 39.

FIGURA 3. Altura da parte aérea e do eixo principal, durante o ciclo completo do desenvolvimento.

● = altura da parte aérea

■ = altura do eixo principal

† = pelo menos 50% dos ápices principais induzidos para a floração, apresentando a "double ridge" (fig. 1B)

Figura 3

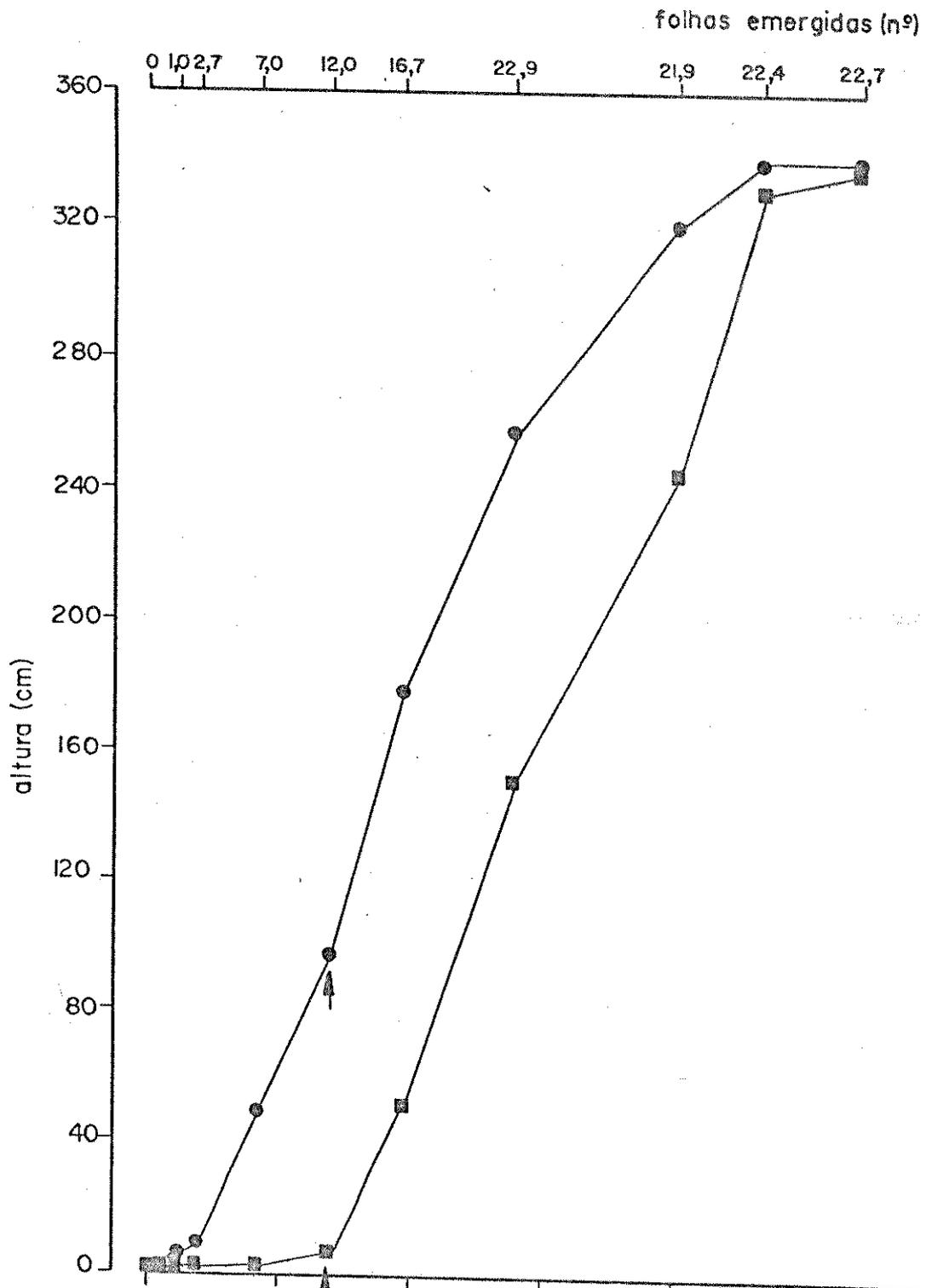


FIGURA 4. Número de folhas e gemas laterais iniciadas, durante o ciclo completo de desenvolvimento.

● = folhas iniciadas

■ = gemas laterais iniciadas

↑ = pelo menos 50% dos ápices principais induzidos para a floração

Figura 4

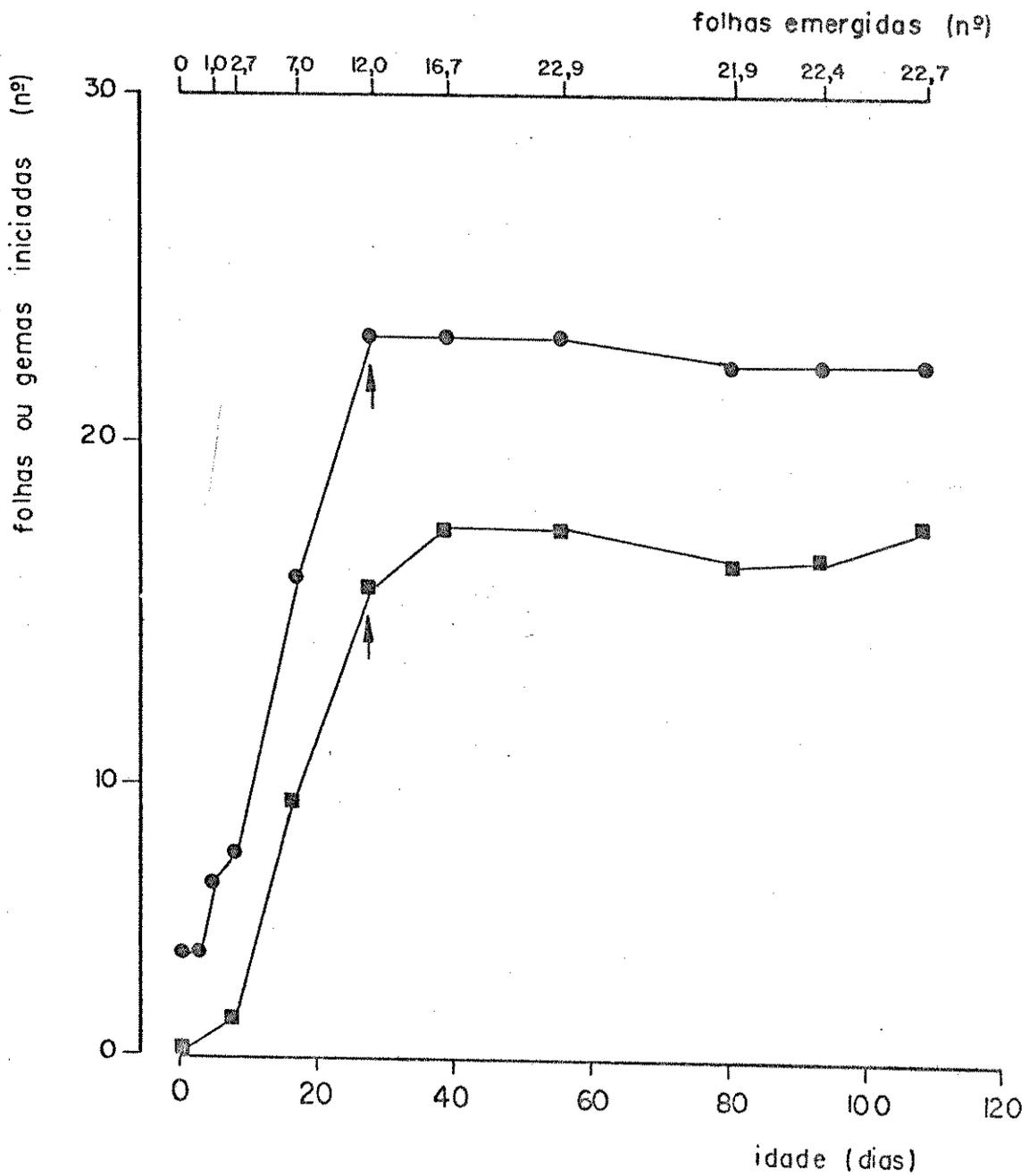


TABELA 2 - Comprimento das folhas (cm) medido durante o ciclo completo do desenvolvimento.

+ = folha presente, mas não mensurável (seca)

* = folha presente, mas não mensurável (menor que 0,5 cm)

- = folha não iniciada

TABELA 2

folhas	dias						
	17	28	39	56	81	95	109
F1	10,0	+	+	+	+	+	+
F2	20,5	17,9	+	+	+	+	+
F3	32,9	28,8	+	+	+	+	+
F4	46,9	42,7	+	+	+	+	+
F5	47,3	57,0	56,5	+	+	+	+
F6	34,3	71,1	69,8	+	+	+	+
F7	20,1	82,7	78,6	52,1	+	+	+
F8	11,4	91,8	99,5	93,6	107,2	+	+
F9	3,8	84,1	108,4	111,1	113,0	115,5	+
F10	0,9	69,3	120,7	117,1	127,1	126,2	120,5
F11	*	54,2	128,1	129,0	133,1	128,5	125,1
F12	*	38,9	132,5	138,3	136,7	136,3	134,1
F13	*	24,6	131,0	143,0	136,3	140,3	139,1
F14	*	12,4	116,8	143,8	131,3	137,9	140,1
F15	*	5,4	97,4	142,6	124,4	134,6	136,9
F16	*	2,2	78,9	139,1	118,0	127,4	126,7
F17	-	0,6	60,4	129,0	110,6	121,0	122,3
F18	-	*	42,7	122,0	102,3	113,9	116,7
F19	-	*	33,2	109,9	94,6	103,6	107,0
F20	-	*	21,7	97,3	88,4	95,7	98,9
F21	-	*	13,4	84,0	74,9	87,9	89,9
F22	-	*	7,0	72,0	59,6	74,7	75,4
F23	-	*	7,3	50,6	-	64,3	61,2

folhas F1, F2, F3 e F4 já tinham completado o seu crescimento. As folhas F5, F6, F7 e F8 pararam de crescer ao redor do 28º dia e as F9, F10, F11 e F12 o fizeram ao redor do 39º dia. Pareceu que todas as folhas restantes pararam de crescer ao redor do 56º dia, fato este que coincidiu com a época em que todas as folhas acabaram de emergir.

O alongamento dos entrenós (tab. 3) começou a ocorrer após o 28º dia do experimento, sendo que, após este dia, os primeiros cinco entrenós não alongaram. Os 6º, 7º e 8º entrenós alongaram entre os dias 28 e 39. O alongamento do 9º ao 14º ocorreu entre os dias 39 e 95 e o dos últimos após o 56º dia, sendo que após o 95º dia este crescimento diminuiu. Os entrenós que mais alongaram foram os 13, 14, 15, 16 e 17.

O desenvolvimento das gemas laterais (comprimento e estado) é mostrado nas tabelas 4 e 5. A gema do coleoptile não foi observada em nenhuma etapa do desenvolvimento, concluindo-se que ela não existe neste cultivar de milho. A gema P1 (gema lateral localizada na axila da folha 1), só pode ser dissecada, mas não foi mensurável, no 8º dia de crescimento, quando constatou-se estar ainda vegetativa (estádio v). Só foi possível dissecar P2 até o 17º dia de crescimento, sendo também vegetativa neste período. A gema P3 foi dissecada e medida até o 28º dia e não se notou crescimento entre o 17º e o 28º dia; o mesmo foi mínimo para P4 e P5. P6 e P7 cresceram durante o período em que puderam ser dissecadas (do 17º ao 39º dia), mas sempre

TABELA 3 - Comprimento dos entrenos (cm) medido durante o ciclo completo do desenvolvimento.

+ = entreno presente, mas não mensurável (não facilmente delimitado devido à presença de raízes adventícias)

* = entreno presente, mas não mensurável (menor que 0,1 cm)

TABELA 3

dias	28	39	56	95	109
entrenõs					
1	+	+	+	+	+
2	0,5	+	+	+	+
3	0,8	+	+	+	+
4	0,9	+	+	+	+
5	1,3	+	+	+	+
6	0,8	3,5	+	+	+
7	0,4	6,7	6,0	111,0	+
8	0,2	9,8	8,7	11,9	11,3
9	*	9,6	11,8	14,4	14,2
10	*	9,1	14,2	16,1	16,1
11	*	2,4	15,6	17,3	17,6
12	*	1,1	16,7	18,1	18,5
13	*	0,5	18,4	19,4	19,1
14	*	0,2	18,9	20,4	20,7
15	*	*	14,9	20,3	20,6
16	*	*	8,3	19,1	20,3
17	*	*	4,0	18,4	19,0
18	*	*	1,8	16,8	17,9
19	*	*	0,9	15,9	16,9
20	*	*	0,6	14,5	15,0
21	*	*	0,5	13,6	14,4
22	*	*	0,3	12,7	14,4
23	*	*	0,1	*	*

TABELA 4 - Comprimento das gemas laterais (mm) medido durante o ciclo completo do desenvolvimento.

+ = gema presente, mas não dissecável (escondida pelas raízes adventícias)

* = gema presente, mas não mensurável (menor que 0,1 mm)

- = gema não iniciada

TABELA 4

dias	17	28	39	56	95	109
gemas						
P1	+	+	+	+	+	+
P2	2,3	+	+	+	+	+
P3	3,7	3,7	+	+	+	+
P4	2,7	5,5	+	+	+	+
P5	1,1	6,0	+	+	+	+
P6	0,4	11,8	44,5	+	+	+
P7	0,2	6,2	58,7	+	+	+
P8	-	4,4	125,8	83,8	+	+
P9	-	2,9	105,8	81,2	56,2	+
P10	-	1,7	79,3	97,9	98,7	+
P11	-	1,1	55,5	132,9	135,7	135,0
P12	-	0,8	35,2	175,0	167,9	167,9
P13	-	0,3	19,3	200,0	197,1	196,4
P14	-	0,1	9,8	209,3	235,7	216,4
P15	-	*	7,5	214,3	337,8	252,1
P16	-	-	5,7	207,1	417,1	414,3
P17	-	-	5,7	152,1	415,0	448,6
folhas emergidas (nº)	7,0	12,0	16,7	22,9	22,4	22,7

TABELA 5 - Estado das gemas laterais durante o ciclo completo do desenvolvimento.

+ = gema presente, mas não dissecável (escondida pelas raízes adventícias)

- = gema não iniciada

v = gema vegetativa

v⁺ = gema se alongando

f = gema floral - formação das primeiras flores

f⁺ = gema floral - quase todas as flores formadas

f^a = gema floral - com estigmas emergidos

TABELA 5

dias gemas	dias							
	8	17	28	39	56	81	95	109
P1	v	+	+	+	+	+	+	+
P2	v	v	+	+	+	+	+	+
P3	v	v	v	+	+	+	+	+
P4	-	v	v	+	+	+	+	+
P5	-	v	v	+	+	+	+	+
P6	-	v	v	v	+	+	+	+
P7	-	v	v	v	+	+	+	+
P8	-	-	v	v	v	v	seca	+
P9	-	-	v	v	v	v	seca	seca
P10	-	-	v	v ⁺	v ⁺	f	seca	seca
P11	-	-	v	v ⁺	f	f	f	seca
P12	-	-	v	v ⁺	f	f	f ⁺	seca
P13	-	-	v	v ⁺	f ⁺	f ⁺	f ⁺	f ⁺
P14	-	-	v	f	f ⁺	f ⁺	f ⁺	f ⁺
P15	-	-	v	f	f ⁺	f ⁺	f ⁺	f ⁺
P16	-	-	-	f	f ⁺	f ^a	f ^a	f ^a
P17	-	-	-	f	f ⁺	f ^a	f ^a	f ^a
folhas emergidas (nº)	2,7	7,0	12,0	16,7	22,9	21,9	22,4	22,7

28º dia. Notou-se que P8 e P9 cresceram até o 39º dia e depois começaram a secar, permanecendo sempre vegetativas. As últimas gemas que chegaram a ser iniciadas foram P16 e P17 no 39º dia. No 39º dia todas as gemas formadas a partir de P10 estavam se transformando em florais, apresentando a "double ridge" (estádio v^+) ou já estavam totalmente florais (estádio f), sendo que a diferenciação foi basípeta, ou seja, as gemas mais apicais estavam mais adiantadas na transformação para o estado floral do que as mais basais. Notou-se que as gemas de P10 até P14 cresceram até o 56º dia, estabilizando, após este dia, o seu crescimento. As gemas P16 e P17 foram as que mais cresceram e foram também as que atingiram o estágio floral mais desenvolvido (f^a), estando as duas já abertas (com estigmas emergidos) no 81º dia de crescimento. Relacionando o crescimento das gemas laterais com o dos entrenós, observou-se que cada gema cresce simultaneamente ao seu entrenó (o entrenó imediatamente abaixo dela).

Em relação ao mostrado até aqui pode-se dizer que durante o ciclo completo do desenvolvimento de plantas de milho, ~~pode-se dizer que~~ a indução floral inicia-se no ápice do eixo principal, formando a panícula e progride basipetamente nas gemas laterais, formando as espigas, até a décima gema (P10). O período de indução coincide com o de alongamento do eixo e com o de inibição de diferenciação de novas gemas laterais sugerindo um relacionamento fisiológico entre estes eventos.

3. EFEITOS DE FATORES AMBIENTAIS

3.1. Nutrientes

Dois experimentos foram realizados para analisar o efeito da nutrição mineral em plantas de milho.

No primeiro foi comparado o desenvolvimento de plantas com ou sem fornecimento de solução nutritiva. Foram feitas quatro coletas, com 8 plantas em cada, durante esta análise. A diferença no peso seco entre plantas com ou sem nutrição foi sempre evidente, mas aumentou bruscamente a partir do dia 13 do experimento, quando as reservas do endosperma se esgotaram (fig. 5). O peso total da planta, bem como da parte aérea e do sistema radicular foram significativamente maiores nas plantas com nutrição (no oitavo dia a diferença entre os pesos secos totais não foi significativa). O peso seco do escutelo e endosperma foi estatisticamente menor, no dia 8, nas plantas tratadas. Diferenças significativas não foram notadas para estes órgãos, nos outros dias da análise. O fornecimento de solução nutritiva não afetou o desenvolvimento das gemas laterais pois as plantas tratadas ou não se comportaram da mesma maneira neste aspecto.

No segundo experimento foi testado o efeito da frequência de aplicação de solução nutritiva no desenvolvimento das plantas. Para isto, plantas tratadas com solução nutritiva duas vezes por semana foram comparadas com outras tratadas apenas uma vez por semana. Três análises foram feitas, usando-se 7 plantas em cada uma, durante os 26 dias que

FIGURA 5. Aplicação da solução nutritiva: peso seco.

○● = planta inteira

□■ = parte aérea

▽▼ = raiz

△▲ = endosperma + escutelo

símbolos cheios = solução nutritiva aplicada
semanalmente

símbolos vazios = sem solução nutritiva

A análise estatística destes dados é comen -
tada no texto.

Figura 5

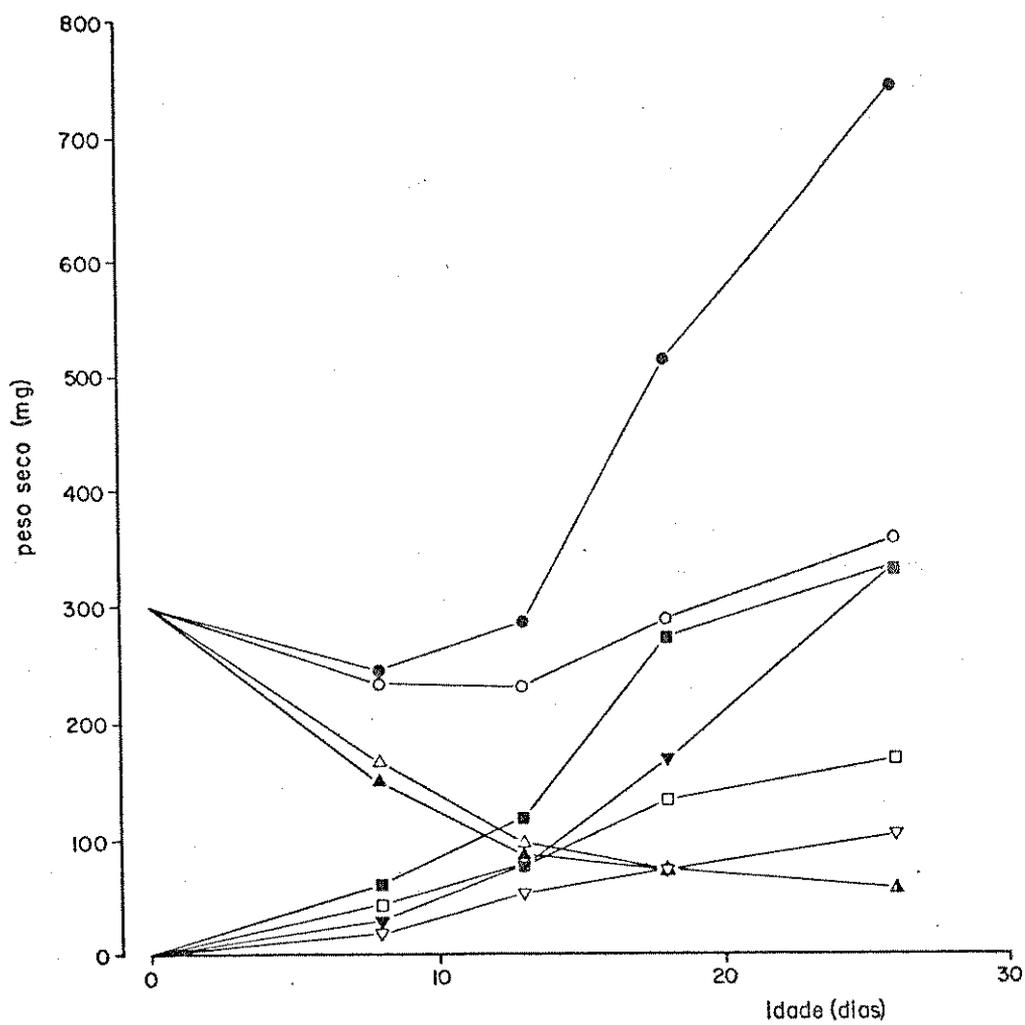


FIGURA 6. Freqüência da aplicação de solução nutritiva:
peso seco.

○● = planta inteira

□■ = parte aérea

▽▼ = raiz

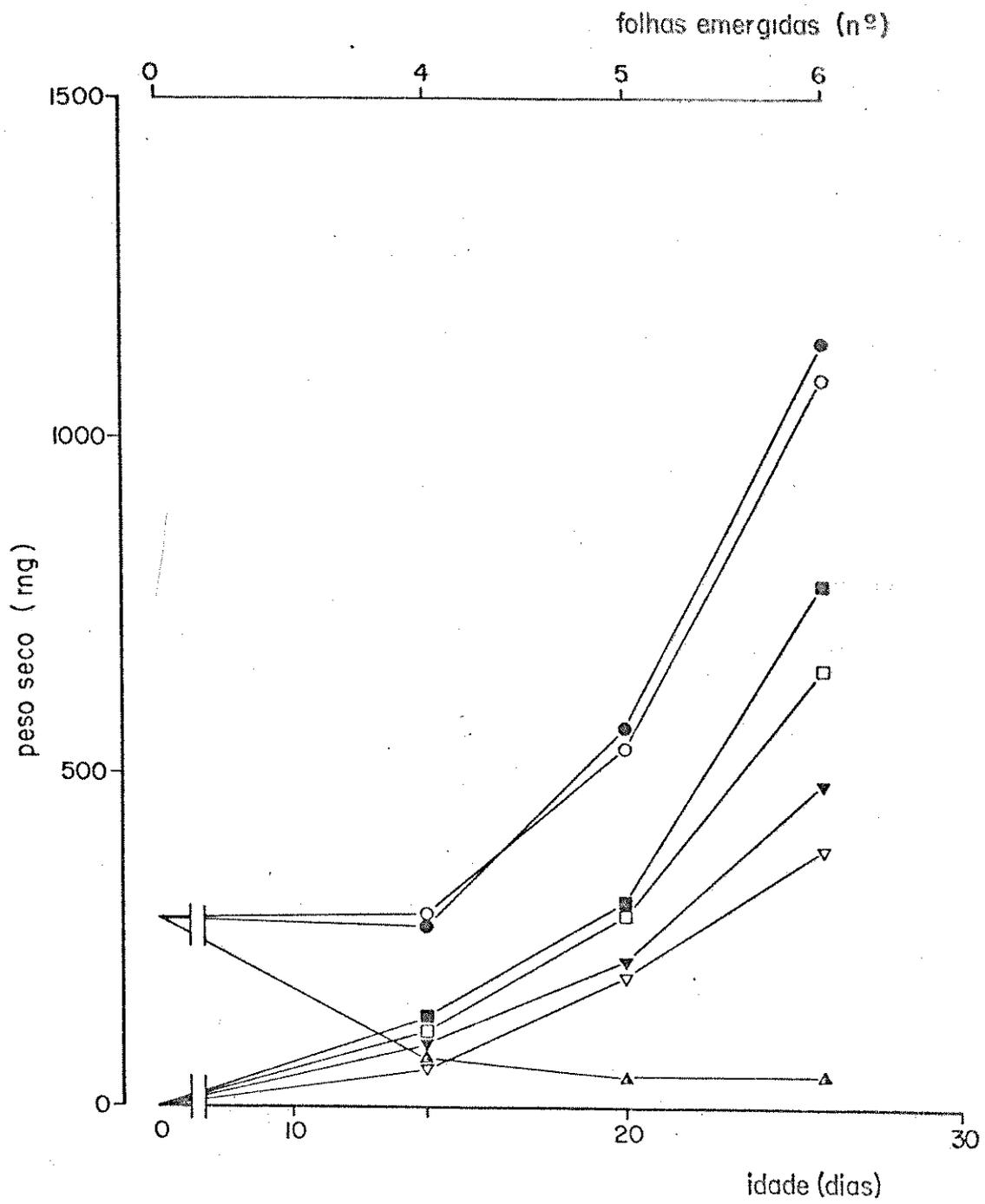
△ = endosperma + escutelo

símbolos cheios = solução nutritiva aplicada duas vezes por semana

símbolos vazios = solução nutritiva aplicada uma vez por semana

Não se notou diferenças estatísticas entre os tratamentos em todos os parâmetros analisados.

Figura 6



taticamente significativa entre os dois tratamentos. Também, quando se comparou o comprimento das quatro primeiras folhas (tab. 6) e das gemas P2 e P3 (tab. 7) não foram observadas diferenças significativas entre plantas que receberam nutrição duas vezes por semana ou uma vez por semana. Somente as quatro primeiras folhas foram medidas já que estas são possivelmente as mais relacionadas ao desenvolvimento das gemas P2 e P3, que foram as escolhidas para a análise pois estavam entrando na fase de latência e em crescimento ativo, respectivamente.

Através das observações feitas em relação à aplicação de solução nutritiva pode-se determinar que o fornecimento de nutrientes é necessário para um bom desenvolvimento da planta e deve-se iniciar logo no início do crescimento, quando o coleoptile tem de 2 a 3 cm de comprimento, para que seu efeito se evidencie quando as reservas do endosperma se esgotam (plantas com 4 a 5 folhas emergidas). Conclui-se que a nutrição mineral não tem um papel específico no crescimento e desenvolvimento das gemas laterais.

3.2. Fotoperíodo

Três tratamentos fotoperiódicos foram realizados: 18 h de luz (dias longos - DL), 8 h de luz (dias curtos - DC) e 8 h de luz com noite interrompida (NI). A tabela 8 mostra os resultados do primeiro experimento em que foi estudado o efeito do fotoperíodo, onde cinco plantas, com 76 dias de idade e com 13 a 17 folhas emergidas foram dissecadas -

TABELA 6 - Frequência da aplicação de solução nutritiva :
comprimento (cm) das quatro primeiras folhas
(F1-F4).

- Não houve diferença significativa entre os
tratamentos

TABELA 6

folhas	dias	20	26	33
	tratamentos			
F1	1x	8,8	8,3	8,3
	2x	9,0	8,5	8,4
F2	1x	17,3	16,4	16,0
	2x	17,7	17,8	16,6
F3	1x	28,7	27,3	25,9
	2x	28,6	30,6	29,2
F4	1x	27,7	38,4	36,5
	2x	26,4	42,1	41,7
folhas emergidas (nº)		5	6	7

TABELA 7 - Frequência da aplicação de solução nutritiva:
comprimento (mm) das gemas laterais (P2 e P3).

1x = solução nutritiva aplicada uma vez por
semana

2x = solução nutritiva aplicada duas vezes
por semana

- A comparação entre os tratamentos foi feita
para cada gema e em cada dia de análise

TABELA 7

gemas	P2		P3		folhas emergi- das (nº)
	trata- mentos	lx	2x	lx	
dias					
14	0,5 ^a	0,5 ^a	0,2 ^a	0,2 ^a	4
20	2,1 ^a	2,0 ^a	1,5 ^a	1,3 ^a	5
26	2,2 ^a	3,1 ^a	2,9 ^a	3,6 ^a	6
33	3,3 ^a	2,1 ^a	4,3 ^a	3,0 ^a	7

TABELA 8 - Fotoperíodo: plantas de milho com 76 dias de idade.

DC = dias curtos (8 h luz)

DL = dias longos (18 h luz)

NI = 8 h de luz com noite interrompida

TABELA 8

parâmetros	tratamentos		
	DC	DL	NI
folhas iniciadas (nº)	18,0 ^a	18,6 ^a	20,2 ^b
gemas iniciadas (nº)	13,0 ^a	13,6 ^a	16,8 ^b
altura do eixo (cm)	35,8 ^a	24,7 ^b	19,7 ^b
estado do ápice principal	100% f ⁺	100% f ⁺	100% f ⁺
altura da inflo- rescência mascu- lina (cm)	19,5 ^a	2,8 ^b	0,5 ^b
folhas emergidas (nº)	16,2 ^a	14,8 ^b	13,6 ^b

ficativa no alongamento (altura) do eixo, na altura da inflorescência masculina e no número de folhas emergidas. Apenas no tratamento de 8 h de luz com noite interrompida notou-se promoção significativa no número de folhas e gemas iniciadas. Em todos os tratamentos ocorreu indução para a floração. Embora ápices principais se encontrassem no mesmo estágio f^+ de desenvolvimento floral, a iniciação ocorreu provavelmente antes, no tratamento com 8 h de luz, uma vez que as inflorescências neste tratamento eram bem maiores.

No segundo experimento, onde os mesmos fotoperíodos foram utilizados, mediu-se a altura da planta (fig.7) desde sete dias de idade, com 2 folhas emergidas, até o 84º dia do experimento quando as plantas tinham em média 14,4; 12,2 e 11,7 folhas emergidas nos tratamentos de 8 h, 18 h e 8 h com noite interrompida, respectivamente. Neste experimento, apesar da idade cronológica das plantas, ter sido maior que a do experimento anterior, a idade fisiológica (número de folhas emergidas) foi menor. Este estágio mais jovem foi escolhido para se verificar possíveis diferenças na indução floral do ápice principal. Usaram-se oito plantas em cada análise. Notou-se que até o 14º dia do experimento (plantas com quatro folhas emergidas) não houve diferença entre os tratamentos, mas a partir do 21º dia (plantas com cerca de 5 folhas emergidas) o tratamento de 8 h de luz com noite interrompida começou a inibir o crescimento das plantas. Após o 55º dia tanto 8 h de luz com noite interrompida como 18 h de luz inibiram o crescimento das plantas quan

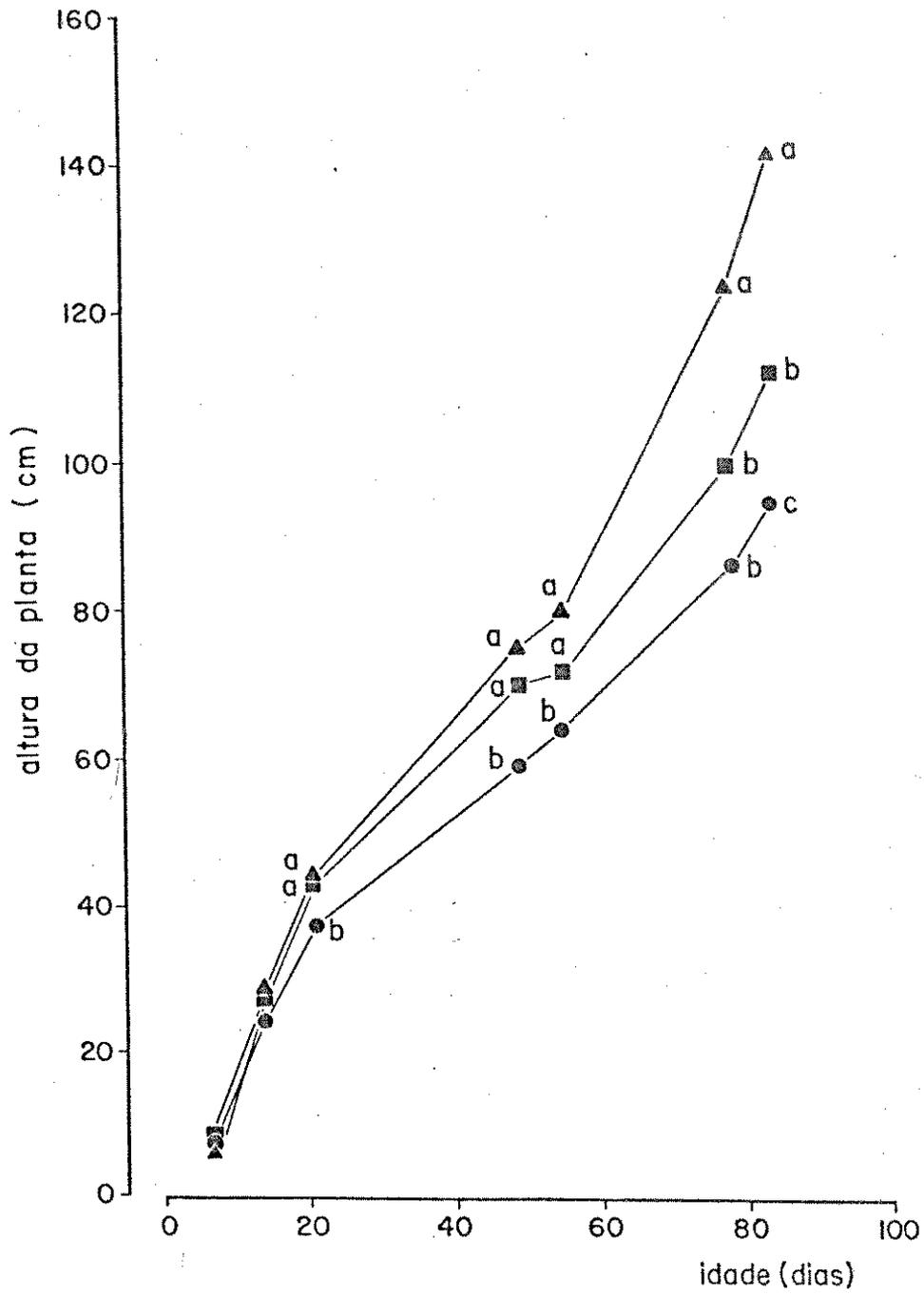
FIGURA 7. Fotoperíodo: crescimento da parte aérea.

▲ = 8 h de luz

■ = 18 h de luz

● = 8 h de luz com noite interrompida

Figura 7



foram menores que no de 18 h de luz, mas esta diferença só foi significativa no final do experimento. Confirmando os resultados do primeiro experimento, a tabela 9 mostra inibição significativa no alongamento do eixo e no número de folhas emergidas nos tratamentos de 18 h de luz e 8 h de luz com noite interrompida quando comparadas ao tratamento de dias curtos (8 h de luz). Neste experimento, no tratamento de dias longos e de noite interrompida, notou-se promoção significativa na iniciação de gemas laterais e folhas (tab. 9), e inibição no desenvolvimento reprodutivo masculino, sendo esta mais forte no tratamento com noite interrompida onde 37,5% dos ápices principais continuaram vegetativos (estádio v) até o 84º dia do experimento. Medidas do comprimento das gemas laterais (tab. 10) indicaram que dias longos bem como dias curtos com noite interrompida, ^{iram} ~~inibem~~ significativamente o crescimento das mesmas, apesar de, como já foi mostrado na tabela 9, ^{terem promovido} ~~promoverem~~ a iniciação delas. As gemas laterais das plantas submetidas a dias longos e dias curtos com noite interrompida estavam todas no estágio vegetativo (v) no dia da análise. Nas submetidas a 8 h de luz, foram observadas gemas vegetativas até a 7ª gema. A gema 8 estava vegetativa (v) em 62,5% das observações e alongando-se (v⁺) em 37,5%. A gema 9 estava vegetativa em 25% dos casos, alongando-se em também 25% das observações e floral (f) nas 50% restantes. As gemas P10 a P13 estavam todas florais.

Complementando-se esta análise, três plantas do segundo experimento, com 97 dias de idade e submetidas a 8 h de luz e a 8 h de luz com noite interrompida foram dia-

TABELA 9 - Fotoperíodo : plantas de milho com 84 dias de
idade.

TABELA 9

tratamentos	parâmetros		
	DC	DL	NI
folhas iniciadas (nº)	17,7 ^a	19,5 ^b	20,0 ^b
gemas iniciadas (nº)	12,4 ^a	14,1 ^b	14,1 ^b
altura do eixo (cm)	32,4 ^a	9,2 ^b	6,1 ^b
estado do ápice principal	100% f	62,5% f	12,5% f
		37,5% v ⁺	50,0% v ⁺
			37,5% v
folhas emergidas (nº)	14,4 ^a	12,2 ^b	11,7 ^b

TABELA 10 - Fotoperíodo: comprimento (mm) das gemas laterais de plantas com 84 dias de idade.

+ = gema presente, mas não dissecável (escondida pelas raízes adventícias)

* = gema presente, mas não mensurável (menor que 0,1 mm)

- = gema não iniciada

TABELA 10

tratamentos gemas	DC	DL	NI
P1 a P5	+	+	+
P6	2,5	1,3	+
P7	4,1 ^a	1,4 ^b	1,5 ^b
P8	7,2 ^a	1,9 ^b	2,1 ^b
P9	13,7 ^a	2,0 ^b	1,9 ^b
P10	15,2 ^a	1,7 ^b	1,2 ^b
P11	13,5 ^a	1,1 ^b	0,8 ^b
P12	11,7 *	*	*
P13	37,5% *	*	*
P14	-	*	*
P15	-	12,5% *	25,0% *
P16	-	-	12,5% *

já estava floral e notou-se acentuação das diferenças, entre os dois tratamentos, em relação às observadas nas plantas com 84 dias. Assim, a altura do eixo medida em plantas submetidas a 8 h de luz foi 70,5 cm enquanto no tratamento de 8 h de luz com noite interrompida foi 8,3 cm.

Resumindo o observado em relação ao efeito de fotoperíodo no desenvolvimento de plantas de milho tem-se que condições de dias longos ou dias curtos com noite interrompida, prolongam o crescimento vegetativo das plantas, atrasando o alongamento do eixo e a indução floral. Além disso, estas condições promovem a iniciação de folhas e gemas quando comparadas com condições de dias curtos.

4. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO

4.1. Citocininas

Testou-se inicialmente a aplicação de citocininas através das raízes. Dois métodos diferentes foram utilizados. No primeiro as raízes das plântulas foram mergulhadas em solução de 6-BA a 10^{-5} M ou em água por 4 horas.

Dez plantas foram dissecadas em cada análise. Estas foram feitas quando as plantas estavam com 4, 6 e 12 folhas emergidas. A tabela 11 mostra os resultados obtidos neste experimento. Em plantas com 4 folhas emergidas (cerca de 4 dias após o tratamento) não se notou diferença significativa entre plantas tratadas com 6-BA e as controle em

TABELA 11 - Tratamento com 6-BA a 10^{-5} M através das raízes (imersão por 4 horas): desenvolvimento das plantas.

TABELA 11

dias	8		17		45	
tratamentos	cont.	6-BA	cont.	6-BA	cont.	6-BA
parâmetros						
folhas iniciadas (nº)	9,4 ^a	9,5 ^a	13,3 ^a	12,6 ^b	18,8 ^a	18,7 ^a
gemas iniciadas (nº)	2,9 ^a	3,8 ^a	5,6 ^a	5,3 ^a	14,0 ^a	14,0 ^a
altura do eixo (cm)	0,5 ^a	0,6 ^a	0,9 ^a	0,7 ^a	22,1 ^a	18,5 ^b
estado do ápice principal	v	v	v	v	f ⁺	f ⁺
altura da parte aérea (cm)	19,1 ^a	17,8 ^a	46,1 ^a	41,8 ^b	111,9 ^a	107,5 ^a
folhas emergidas (nº)	4		8		12	

cimento da parte aérea, sendo que estas inibições não se repetiram em plantas com 12 folhas emergidas. Nesta fase (12 folhas emergidas), observou-se inibição no alongamento do eixo principal, inibição esta que não foi notada em plantas com 4 e 6 folhas emergidas. O número de gemas iniciadas não foi afetado pela citocinina durante toda a análise e o mesmo ocorreu com a transformação do ápice principal de vegetativo para floral. O número de folhas emergidas foi sempre igual no controle e nas plantas tratadas com 6-BA. Em plantas mais jovens, com 4 e 6 folhas emergidas, não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos, em relação ao comprimento das gemas laterais (tab. 12). Já em plantas com 12 folhas emergidas, apesar de não se ter notado diferença significativa, entre os tratamentos, nas gemas mais basais (P6, P7 e P8), constatou-se inibição significativa nas gemas mais apicais (P9 a P14) das plantas tratadas com 6-BA (tab. 12).

Plantas com 4 e 6 folhas emergidas possuíam gemas laterais no estágio vegetativo. Nas plantas com 12 folhas emergidas as gemas P12, P13 e P14 estavam, em ambos os tratamentos, transformando-se em florais. As plantas controle pareceram estar um pouco mais adiantadas nesta transformação. Assim, a gema P12 estava no estágio v^+ em 40% das observações feitas nas plantas controle e em 30% das observações feitas nas plantas tratadas com 6-BA. A gema P13, no controle, estava 40% no estágio v^+ e 20% no estágio f e nas plantas tratadas com 6-BA observou-se apenas gemas no estágio v^+ (60%). O controle teve 20% das P14 no estágio v^+ ; 60% no estágio f e

TABELA 12 - Tratamento com 6-BA a 10^{-5} M através das raízes (imersão por 4 horas): comprimento (mm) das gemas laterais.

+ = gema presente, mas não dissecável (escondida pelas raízes adventícias)

* = gema presente, mas não mensurável (menor que 0,1 mm)

- = gema não iniciada

TABELA 12

dias	8		17		45	
	tratamentos cont.	6-BA	cont.	6-BA	cont.	6-BA
gemas						
P1	0,7	+	+	+	+	+
P2	0,5 ^a	0,5 ^a	1,1 ^a	1,0 ^a	+	+
P3	*	0,3	1,2 ^a	1,2 ^a	+	+
P4	-	-	0,9 ^a	0,9 ^a	+	+
P5	-	-	*	0,4	+	+
P6	-	-	*	-	2,7 ^a	2,5 ^a
P7	-	-	-	-	3,1 ^a	3,0 ^a
P8	-	-	-	-	2,9 ^a	2,5 ^a
P9	-	-	-	-	3,2 ^a	2,8 ^b
P10	-	-	-	-	3,1 ^a	2,5 ^b
P11	-	-	-	-	2,4 ^a	1,8 ^b
P12	-	-	-	-	1,9 ^a	1,3 ^b
P13	-	-	-	-	1,8 ^a	1,3 ^b
P14	-	-	-	-	1,8 ^a	1,3 ^b
folhas emergidas(nº)						
		4		6		12

No segundo método, um tratamento com citocininas através de cultura hidropônica foi utilizado para verificar se submetendo as plantas ao regulador de crescimento, por um período mais prolongado (5 dias), seus efeitos seriam mais evidentes. Neste caso, foi fornecida às plantas 6-BA nas concentrações de 10^{-6} M, 10^{-7} M e 10^{-8} M. A dissecação das plantas (7 plantas por tratamento) foi feita quando as controle tinham 6 folhas emergidas e as tratadas cerca de 5 folhas emergidas. Em relação ao comprimento das gemas laterais analisadas (P2, P3 e P4), notou-se que houve uma diminuição significativa quando 6-BA, nas três concentrações usadas, foi aplicada (tab. 13). O peso seco das diferentes partes destas plantas também foi medido (tab. 14). Notou-se que houve uma diminuição da translocação das reservas do endosperma e escutelo para as raízes e parte aérea, principalmente nas plantas tratadas com 6-BA a 10^{-6} M. Isto porque, comparando-se as plantas tratadas com as controle observou-se, nas primeiras, maior peso seco do endosperma e escutelo. Diminuição significativa do peso seco das raízes e parte aérea também foi constatada em todos os tratamentos com 6-BA, sendo que quanto maior a concentração de 6-BA, maior a diminuição observada (tab. 14).

Além de ter sido testado o efeito da aplicação de citocininas através das raízes, ainda testou-se o efeito das mesmas quando aplicadas na região apical do eixo. Neste caso, foram aplicadas soluções de 6-BA nas concentrações de 10^{-4} M, 10^{-5} M e 10^{-6} M. As aplicações foram feitas nos dias

TABELA 13 - Tratamento com 6-BA através das raízes, em cultura hidropônica: comprimento (mm) das gemas laterais (P2, P3, P4)

- Plantas com 17 dias de idade

TABELA 13

gemas			
tratamentos	P ₂	P ₃	P ₄
controle	1,0 ^a	1,0 ^a	0,4 ^a
6-BA 10 ⁻⁸ M	0,7 ^b	0,7 ^b	0,2 ^b
6-BA 10 ⁻⁷ M	0,5 ^b	0,6 ^b	0,2 ^b
6-BA 10 ⁻⁶ M	0,8 ^b	0,5 ^b	0,2 ^b

TABELA 14 - Tratamento com 6-BA através das raízes, em cultura hidropônica: peso seco (mg).

- Plantas com 17 dias de idade

TABELA 14

partes da planta	raízes	parte aérea	endosperma + escutelo
tratamentos			
controle	134,0 ^a	340,7 ^a	16,4 ^a
6-BA 10 ⁻⁸ M	110,1 ^b	247,3 ^b	23,9 ^{ab}
6-BA 10 ⁻⁷ M	106,7 ^{bc}	193,7 ^{bc}	22,9 ^{ab}
6-BA 10 ⁻⁶ M	82,0 ^c	162,3 ^c	38,7 ^b

das (10 plantas por tratamento) com 5 folhas emergidas e foi analisado o comprimento das gemas laterais (tab. 15). Através deste método verificou-se que a 6-BA, nas diferentes concentrações usadas não afetou significativamente o crescimento das gemas laterais.

Concluindo-se pode-se dizer que no geral o 6-BA inibe o crescimento das plantas em todos os parâmetros analisados, sendo que esta inibição não é muito evidente em plantas jovens. Os tratamentos só são efetivos quando a 6-BA foi aplicada através das raízes.

4.2. Giberelinas

Ácido giberélico (GA_3) foi fornecido às plantas na concentração de 10^{-3} M. Três experimentos foram realizados variando apenas a época do crescimento em que as aplicações foram feitas e a frequência destas aplicações em plantas envasadas. No experimento 1, a aplicação de GA_3 foi feita a partir da emergência da quinta folha e no dia da emergência de cada folha subsequente. Cinco plantas (por tratamento) foram dissecadas com 5, 7, 9 e 11 folhas emergidas. No experimento 2, a primeira aplicação foi feita na emergência da quarta folha e no dia da emergência de cada folha subsequente. Dez plantas foram dissecadas por tratamento, quando as plantas tinham cerca de 4, 6, 8 a 9, 10 a 11 e 13 a 14 folhas emergidas. No experimento 2 notou-se que as medidas dos parâmetros de crescimento analisados (altura da parte aérea (fig. 9A) e do eixo (fig. 10B) e comprimento das gemas laterais (tab. 16) foram maiores que as obtidas nos outros

TABELA 15 - Tratamento com 6-BA pela região apical: comprimento (mm) das gemas laterais (P2, P3, P4).

- Plantas com 18 dias de idade
- Não houve diferença significativa entre os tratamentos

TABELA 15

gemas	P2	P3	P4
tratamentos			
controle	0,9	0,6	0,3
6-BA 10^{-6} M	0,9	0,6	0,2
6-BA 10^{-5} M	0,8	0,5	0,2
6-BA 10^{-4} M	0,7	0,4	0,2

tas com idades fisiológicas (número de folhas emergidas) semelhantes. Isto provavelmente ocorreu devido às condições ambientais em que foram realizados os três experimentos, já que plantas do primeiro e do terceiro cresceram durante o inverno (junho e julho) e do segundo durante o início do verão (novembro). No experimento 3, a aplicação foi feita na emergência da terceira folha e duas aplicações foram realizadas entre a emergência de uma folha e sua subsequente. Dez plantas foram dissecadas por tratamento, com cerca de 3, 7, 11 a 12 e 13 a 14 folhas emergidas.

No geral não se observou diferença no número de folhas emergidas entre plantas tratadas e controle e adotou-se este parâmetro para determinar a idade fisiológica das plantas durante a análise dos outros parâmetros (fig. 8, 9, 10, 11, 12 e tab. 16). Em relação ao número de folhas iniciadas (fig. 8) pareceu que o GA_3 quando efetivo, provocou uma redução significativa. Esta redução no número de folhas iniciadas só pode ser encontrada em plantas com 9 e 11 folhas emergidas no experimento 1 (fig. 8A) e com 11 a 12 folhas emergidas no experimento 3 (fig. 8C). O efeito do tratamento com GA_3 foi bem mais evidente quando se analisou a altura da parte aérea (fig. 9) que foi promovida significativamente pelo tratamento com GA_3 em todas as datas de dissecção. No alongamento do eixo, notou-se promoção acentuada nas plantas tratadas com GA_3 em relação às controle (fig. 10). Assim, independente da data de início de aplicação do regulador, notou-se, nos três experimentos, promoção do alongamen-

FIGURA 8. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: número de folhas iniciadas.

A. experimento 1

B. experimento 2

C. experimento 3

símbolos cheios = plantas tratadas com GA_3

símbolos vazios = plantas controle

Figura 8

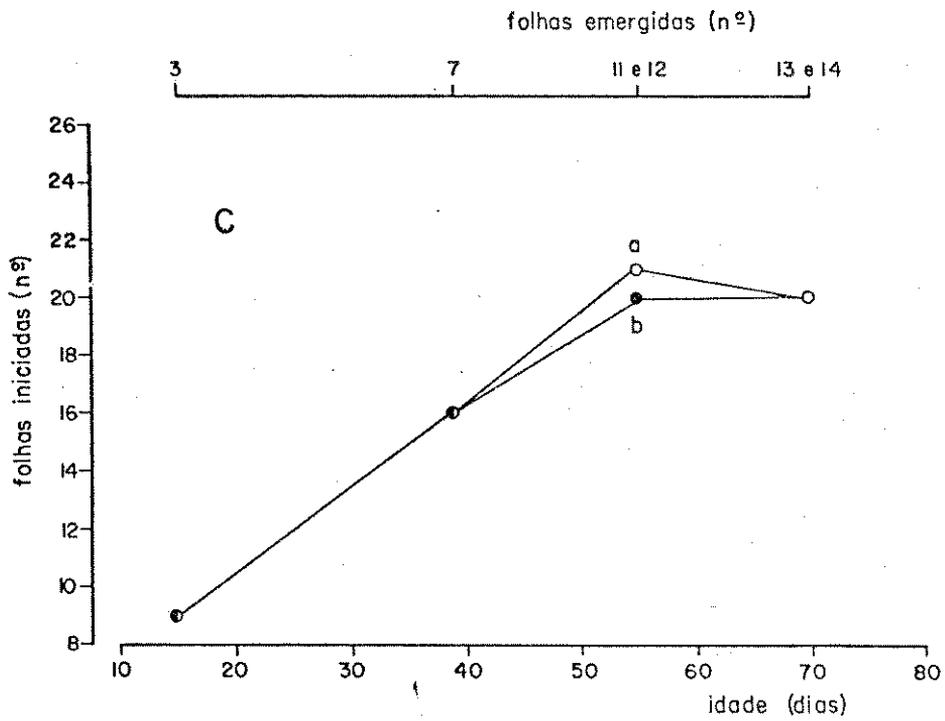
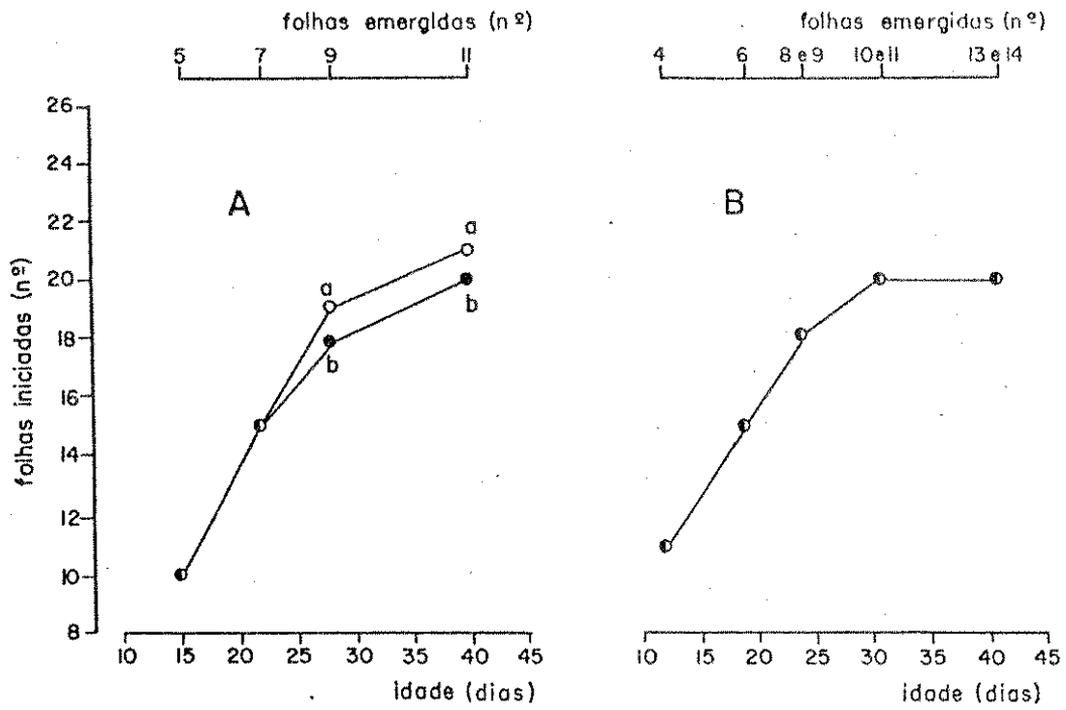


FIGURA 9. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: altura da parte aérea.

A. experimento 2

B. experimento 3

símbolos cheios = plantas tratadas com GA_3

símbolos vazios = plantas controle

Figura 9

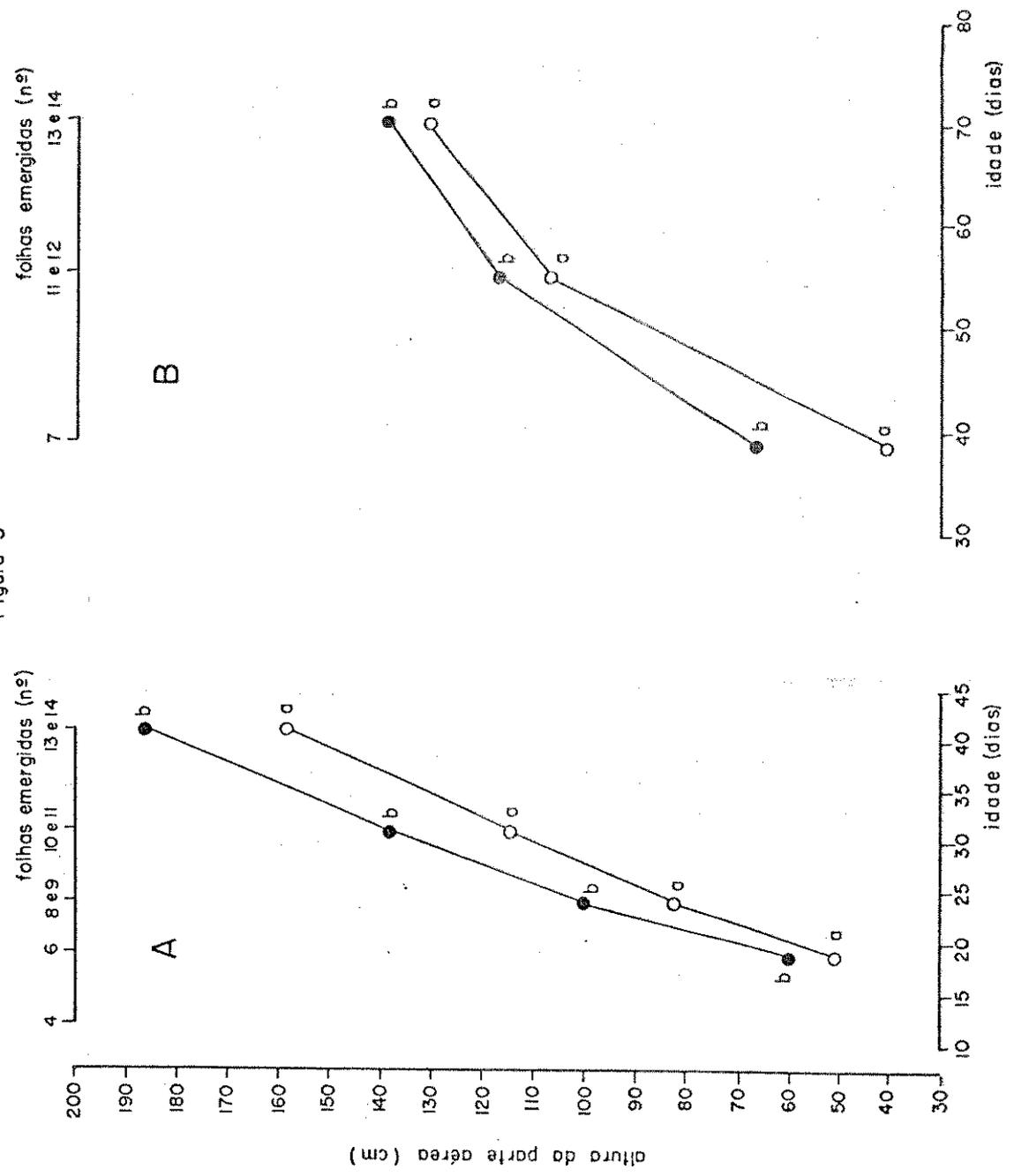


FIGURA 10. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: altura do eixo principal.

A. experimento 1

B. experimento 2

C. experimento 3

símbolos cheios = plantas tratadas com GA_3

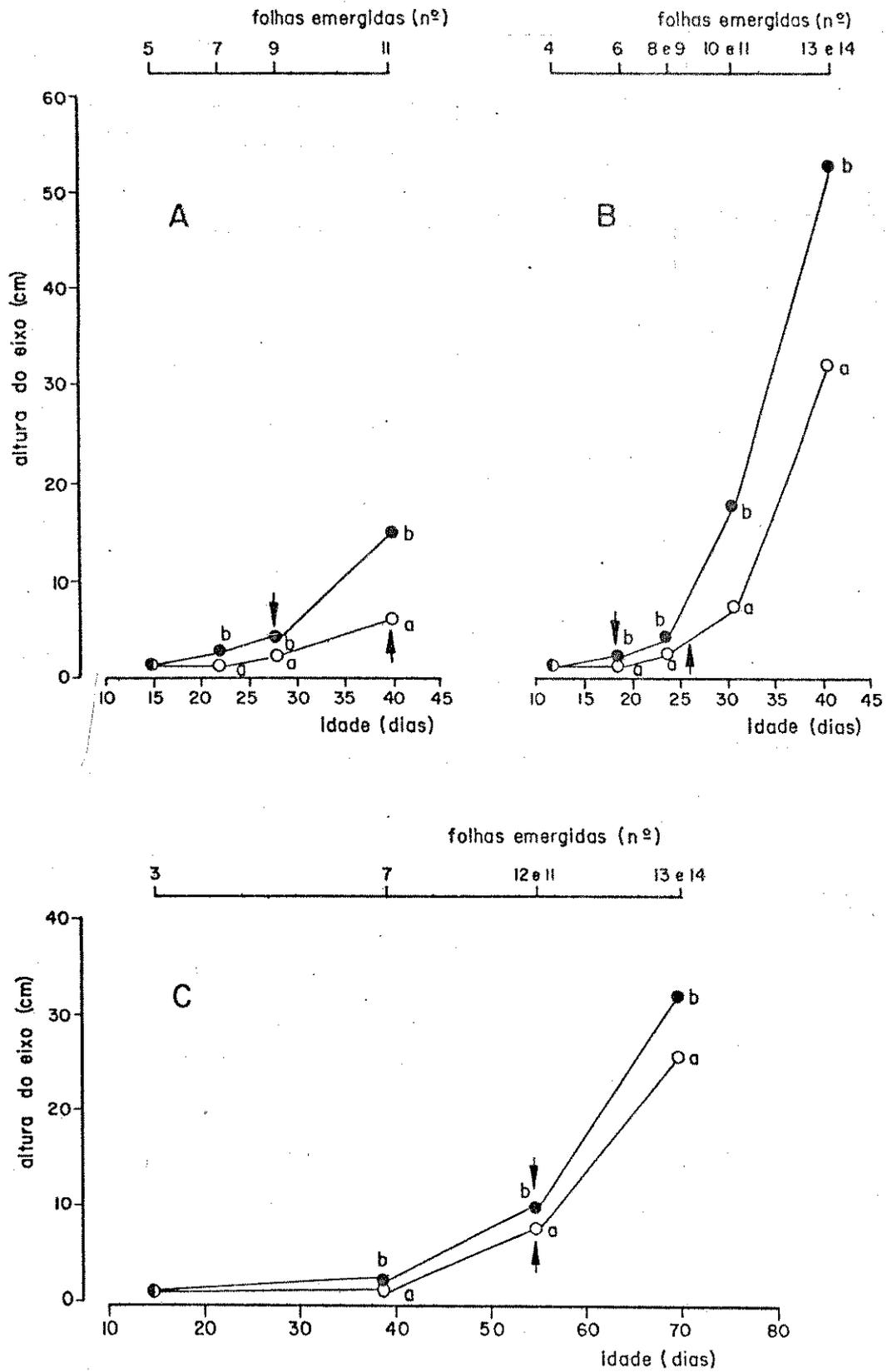
símbolos vazios = plantas controle

▲ ou ▼ = ápices principais florais

A e B = pelo menos 50% no estágio \underline{v}^+

C = 100% no estágio \underline{f}^+

Figura 10



ral (setas na fig. 10) coincidiu, nos experimentos 1 e 2 (fig. 10 A e B) com o aumento pronunciado na taxa de alongamento, evento este que só ocorreu mais tarde nas plantas controle quando o ápice destas também se transformou em floral. No experimento 3 (fig. 10C) não foi possível determinar o momento da iniciação floral e do alongamento propriamente dito pois ele aconteceu num período onde não foram feitas dissecções. Plantas com sete folhas emergidas ainda possuíam o ápice principal no estágio v e não tinham iniciado o alongamento pronunciado característico da mudança do estágio vegetativo para floral. Em plantas com 11 a 12 folhas emergidas o ápice principal já estava induzido para floral há algum tempo (estádio f⁺).

Verificou-se também que a iniciação de gemas laterais foi fortemente reduzida em plantas submetidas ao tratamento com GA₃ (fig. 11). Nos três experimentos, as plantas tratadas tiveram somente 9 a 12 gemas formadas, enquanto as controle formaram de 15 a 16 gemas. O número reduzido de gemas laterais iniciadas em plantas tratadas pelo GA₃ foi devido, não somente à supressão da formação de novas gemas a partir de uma determinada etapa do crescimento (como no experimento 1), mas também à inibição da formação de algumas determinadas gemas durante o desenvolvimento (experimentos 2 e 3). Este fato pode ser visualizado na tabela 16, onde é mostrado o comprimento das gemas laterais. Assim, na dissecção feita no experimento 1 notou-se que só foram formadas as gemas de P1 até P11 nas plantas tratadas e

FIGURA 11. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: número de gemas laterais iniciadas.

A. experimento 1

B. experimento 2

C. experimento 3

símbolos cheios = plantas tratadas com GA_3

símbolos vazios = plantas controle

↑ = ápices principais florais

A e B = pelo menos 50% no estágio \underline{v}^+

C = 100% no estágio \underline{f}^+

Figura II

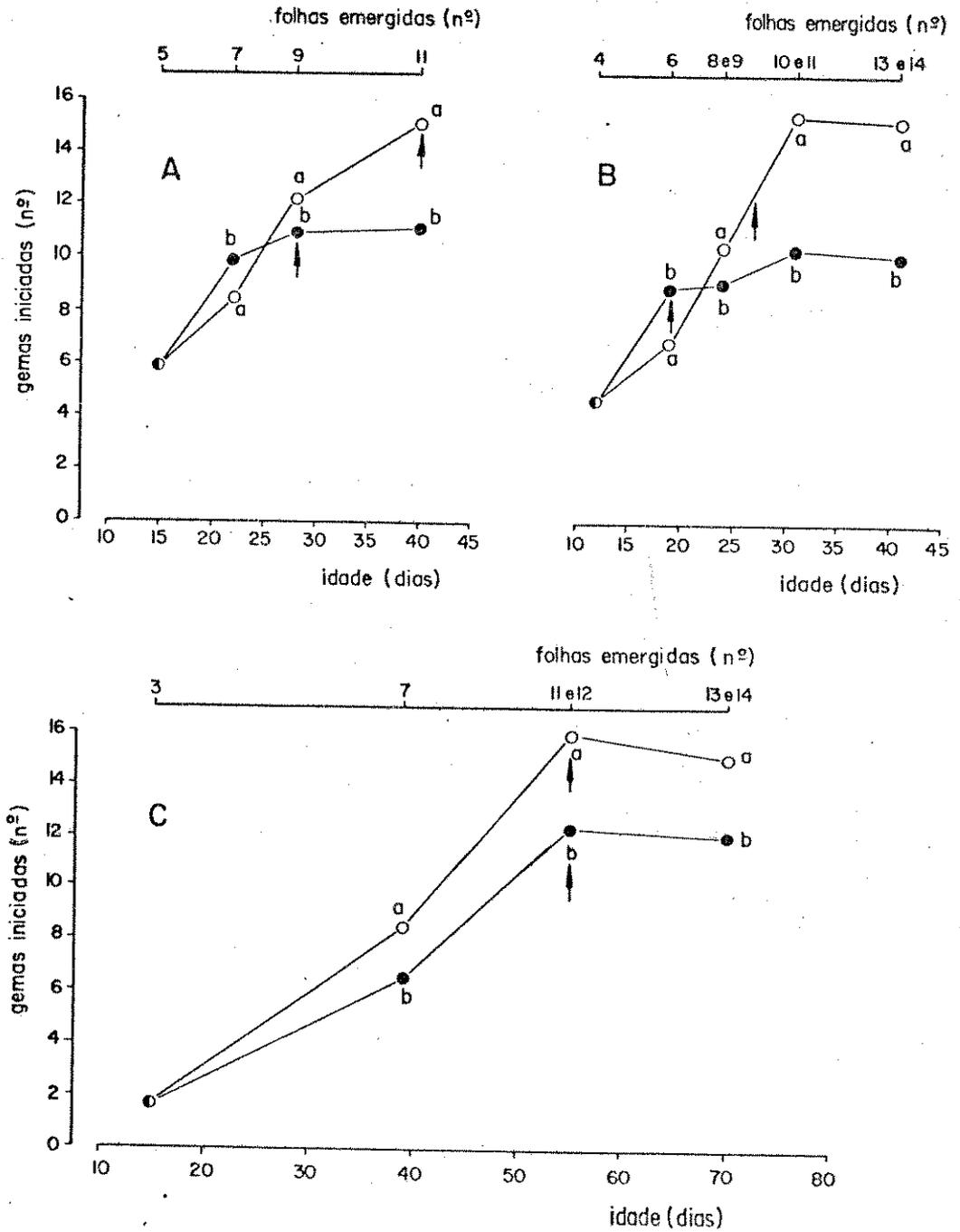


TABELA 16 - Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: comprimento (mm) das gemas laterais.

C = controle

GA₃ = ácido giberélico

+ = gema presente, mas não dissecável (escondida pelas raízes adventícias)

* = gema presente, mas não mensurável (menor que 0,1 mm)

- = gema não iniciada

TABELA 16

EXPERIMENTO 1			EXPERIMENTO 2						EXPERIMENTO 3							
folhas energizadas (nr)			6		8 e 9		10 e 11		13 e 14		7		11 e 12		13 e 14	
trat.	C	GA ₃	C	GA ₃	C	GA ₃	C	GA ₃	C	GA ₃	C	GA ₃	C	GA ₃	C	GA ₃
P1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2	5,3	+	3,4 ^a	2,6 ^b	3,3 ^a	2,4 ^b	+	+	+	+	3,2 ^a	1,6 ^b	+	+	+	+
P3	9,5	+	2,9 ^a	2,7 ^a	6,9 ^a	5,2 ^a	+	+	+	+	3,5 ^a	3,0 ^a	+	+	+	+
P4	8,0 ^a	1,7 ^b	1,8 ^a	2,1 ^a	5,0 ^a	6,1 ^a	22,5 ^a	8,3 ^b	+	+	2,7 ^a	2,3 ^a	2,1 ^a	1,7 ^a	+	+
P5	3,9 ^a	2,8 ^a	1,0 ^a	1,1 ^a	3,4 ^a	3,8 ^a	24,5 ^a	19,1 ^a	12,4 ^a	24,1 ^b	1,2 ^a	1,7 ^b	1,1 ^a	1,1 ^a	0,5 ^a	1,7 ^a
P6	1,4 ^a	1,1 ^a	0,4 ^a	0,7 ^b	2,2 ^a	2,8 ^b	12,6 ^a	14,7 ^a	9,4 ^a	21,0 ^b	0,2 ^a	0,9 ^b	0,7 ^a	0,8 ^a	0,5 ^a	1,5 ^a
P7	0,6 ^a	1,1 ^b	*	*	1,2 ^a	2,3 ^b	6,9 ^a	10,7 ^b	9,7 ^a	28,0 ^b	*	-	0,5 ^a	0,5 ^a	0,6 ^a	1,9 ^a
P8	0,4 ^a	0,7 ^b	-	*	1,8	4,8 ^a	8,7 ^b	12,2 ^a	32,4 ^b		*	-	0,4	-	0,9	-
P9	0,3 ^a	0,6 ^b	-	*	1,0	3,2	-	11,3	-		-	-	0,3	-	0,7	-
P10	0,2 ^a	0,4 ^b	-	-	*	-	2,0	-	8,1	-	-	-	0,2	*	0,7 ^a	1,2 ^b
P11	*	*	-	-	*	-	1,2	*	5,8	*	-	-	0,1	*	0,4 ^a	0,8 ^b
P12	*	-	-	-	-	-	*	*	4,0	*	-	-	*	*	0,3 ^a	0,5 ^b
P13	*	-	-	-	-	-	*	-	3,5	-	-	-	*	*	0,2 ^a	0,3 ^b
P14	*	-	-	-	-	-	*	-	3,2	-	-	-	*	*	0,2 ^a	0,3 ^b
P15	*	-	-	-	-	-	*	-	3,0	-	-	-	*	*	0,2	-
P16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-
Idade (dias)	40		19		24		32		41		38		55		68	

P10 não se formaram, P11 e P12 se iniciaram, mas a partir de P12 não se formaram mais gemas. As mesmas falhas na formação de gemas laterais foram observadas nas duas últimas dissecções do experimento 3 onde formaram-se de P1 até P7; P8 e P9 falharam; P10 a P14 se iniciaram e não se formaram mais gemas a partir de P14. Nos experimentos onde foi possível demarcar o momento da iniciação floral (setas na fig. 11 A e B) notou-se que a formação de novas gemas foi reduzida a partir desta data. Observou-se também, nos experimentos 1 e 2 (fig. 11 A e B), que inicialmente o tratamento com GA_3 acelerou a formação de novas gemas. Nos dois casos, o número de gemas formado em plantas com 6 e 7 folhas emergidas (experimentos 2 e 1 respectivamente) foi significativamente maior nas plantas tratadas com GA_3 . Quando se analisou o efeito do GA_3 sobre o crescimento das gemas laterais, notou-se que no geral houve inibição do crescimento das gemas mais basais e promoção do das mais apicais (tab. 16).

Assim, pode-se constatar inibição significativa no crescimento da gema P2 em plantas com 6, 7 e 8 a 9 folhas emergidas (experimentos 2 e 3, tab. 16). Nestas mesmas plantas o GA_3 não afetou significativamente o crescimento das gemas P3 e P4. A gema P5 ^{não} foi afetada pelo GA_3 nas plantas com 6 e 8 a 9 (experimento 2) folhas emergidas, mas teve seu crescimento promovido pelo regulador nas plantas com 7 folhas emergidas (experimento 3). A mesma promoção foi observada, nestas plantas (com 6, 7 e 8 a 9 folhas emergidas) na gema P6. A gema P7 foi também significativamente maior em

Em plantas mais velhas (com 10 a 11; 11; 11 a 12 e 13 a 14 folhas emergidas) o efeito de inibição das gemas mais basais não foi tão evidente (observou-se inibição significativa no crescimento da gema P4 apenas em plantas com 10 a 11 e 11 folhas emergidas nos experimentos 2 e 1 respectivamente), mas o de promoção das mais apicais continuou a aparecer. Assim, apesar de, para estas plantas mais velhas, não se ter notado diferença significativa, entre os tratamentos, no comprimento das gemas P5 e P6 nos experimentos 1 e 3, o mesmo foi significativamente maior em plantas com 13 a 14 folhas emergidas tratadas com GA_3 (experimento 2). Notou-se promoção no crescimento de P7 e P8, nos experimentos 1 e 2, em plantas com 10 a 11; 11 e 13 a 14 folhas emergidas. Apenas no experimento 1 foi constatada promoção significativa do crescimento das gemas P9 e P10 pelo tratamento com GA_3 . Promoção significativa foi causada pelo tratamento com GA_3 nas gemas de P10 a P14 no experimento 3.

Resolveu-se verificar, se também em cultura hidropônica a aplicação do GA_3 teria o mesmo efeito que o obtido em plantas envasadas. Uma gota de 50 μ l de GA_3 a 10^{-3} M foi aplicada às plantas por ocasião da emergência de cada folha, a partir da segunda emergida. Os mesmos efeitos do GA_3 observados anteriormente em plantas envasadas foram notados. Assim, houve uma promoção do alongamento da parte aérea (fig. 12). A indução floral ocorreu mais cedo em plantas tratadas de modo, que na dissecção seus ápices estavam num estádio mais próximo ao floral (tab. 17). Novamente observou-se ini

FIGURA 12. Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: altura da parte aérea de plantas cultivadas em cultura hidropônica.

símbolos cheios = plantas tratadas com GA_3

símbolos vazios = plantas controle

Figura 12

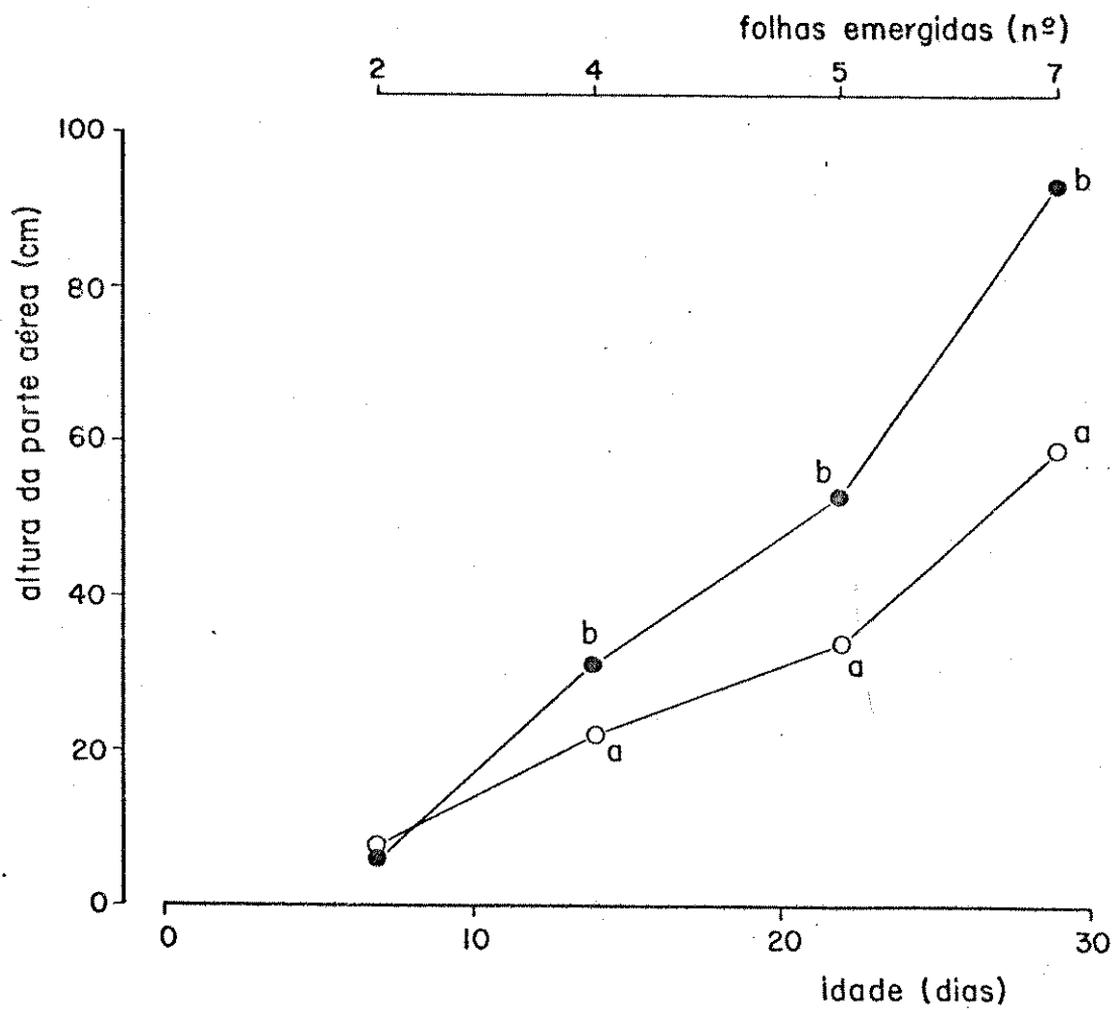


TABELA 17 - Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: desenvolvimento de plantas cultivadas em cultura hidropônica.

- Plantas dissecadas com 7 folhas emergidas
(29 dias de idade)

TABELA 17

tratamentos	controle	GA ₃
parâmetros		
folhas iniciadas (nº)	15,8 ^a	15,6 ^a
gemas iniciadas (nº)	8,3 ^a	6,0 ^b
altura do eixo (cm)	1,3 ^a	7,0 ^b
estado do ápice	100% v	100% v ⁺
folhas emergidas (nº)	7,0 ^a	7,0 ^a

não foi afetado (tab. 17), confirmando o observado anteriormente em plantas envasadas tratadas com GA_3 . Em relação ao crescimento das gemas laterais também os mesmos resultados, ou seja, inibição do alongamento das mais basais e promoção das mais apicais, foram observados (tab. 18).

Constatou-se, portanto, que o GA_3 promove o crescimento da parte aérea e do eixo principal de milho. O alongamento pronunciado do eixo principal se inicia antes, juntamente com a transformação do ápice principal de vegetativo para floral, nas plantas tratadas com GA_3 . Juntamente com este alongamento propriamente dito do eixo principal e com a floração ocorre uma diminuição da iniciação de gemas. A iniciação destas é promovida pelo GA_3 nas fases iniciais do desenvolvimento, mas é fortemente inibida após a indução floral. O tratamento com ácido giberélico inibe o crescimento das gemas laterais mais basais e promove o das mais apicais.

4.3. Inibidores de biossíntese de giberelinas

Com base nos resultados obtidos nos experimentos onde se forneceu ácido giberélico às plantas, que sugeriram que as giberelinas podem estar envolvidas no interrelacionamento dos eventos: alongamento do eixo principal, inibição da iniciação de gemas laterais e iniciação floral, resolveu-se usar inibidores de biossíntese de giberelinas para verificar se estes eventos estão relacionados a um aumento no nível endógeno das mesmas. A figura 13 mostra os resulta

TABELA 18 - Tratamento com ácido giberélico a 10^{-3} M: comprimento (mm) das gemas laterais de plantas cultivadas em cultura hidropônica.

- Plantas dissecadas com 7 folhas emergidas
(29 dias de idade)

+ = gema presente, mas não dissecável (escondida pelas raízes adventícias)

* = gema presente, mas não mensurável (menor que 0,1 mm)

- = gema não iniciada

TABELA 18

tratamentos	controle	GA ₃
gemas		
P1	+	+
P2	2,9 ^a	2,1 ^b
P3	3,1 ^a	2,4 ^b
P4	3,2 ^a	3,0 ^a
P5	2,0 ^a	2,2 ^a
P6	0,9 ^a	1,2 ^b
P7	0,4	-
P8	*	-

FIGURA 13. Tratamento com CCC a 10^{-2} M.

A. altura do eixo principal

B. número de folhas emergidas

C. número de folhas iniciadas

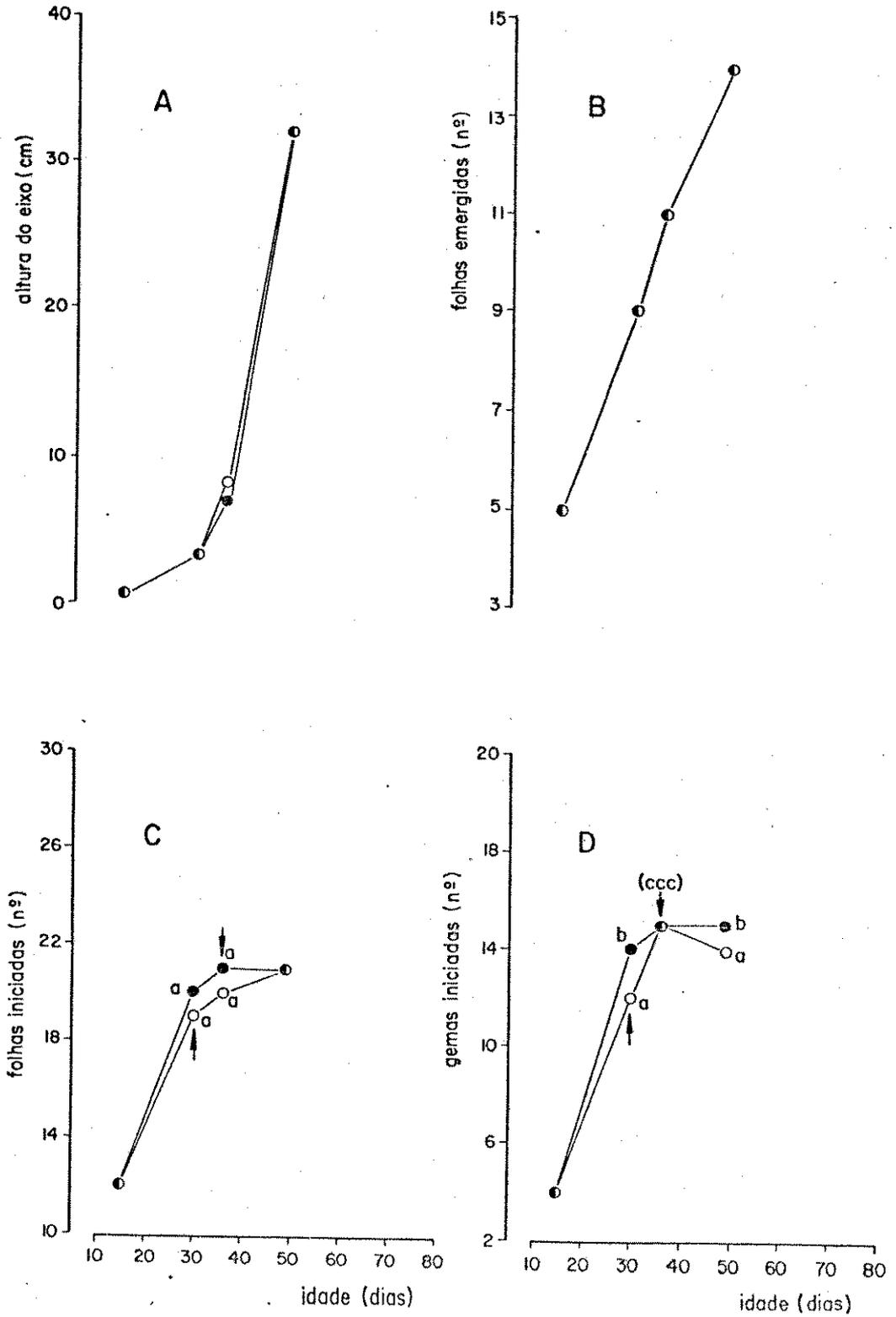
D. número de gemas laterais iniciadas

▲ ou ▼ = pelo menos 50% dos ápices principais
induzidos para a floração

símbolos cheios = plantas tratadas com CCC

símbolos vazios = plantas controle

Figura 13



efeito do tratamento no alongamento do eixo principal até o 50º dia do experimento (fig. 13A) nem no número de folhas emergidas (fig. 13B) e iniciadas (fig. 13C). O tratamento com CCC promoveu, significativamente, a iniciação de gemas axilares no 30º e 50º dias (fig. 13D) e retardou a iniciação floral (setas na fig. 13C e D) do 30º para o 36º dia do experimento.

Para a análise do efeito do LAB ($7,9 \cdot 10^{-10}$ M e $7,9 \cdot 10^{-9}$ M) 15 plantas foram dissecadas em cada análise feita. A altura da parte aérea foi medida durante todo o experimento, desde que as plantas tinham 3 a 4 folhas emergidas até 9 a 10 folhas emergidas (fig. 14). Nas primeiras medidas feitas não se notou efeito significativo do LAB, mas a partir da emergência da sexta folha já se notou inibição significativa do crescimento da parte aérea pelo LAB. Em plantas com, em média, 6,5 e 7,5 folhas emergidas, apenas a concentração de $7,9 \cdot 10^{-9}$ M foi inibitória. Em plantas com, em média, 9,5 folhas emergidas, ambas as concentrações ($7,9 \cdot 10^{-9}$ M e $7,9 \cdot 10^{-10}$ M) foram inibitórias (fig. 14). A tabela 19 mostra os parâmetros medidos em plantas que foram dissecadas com 23 dias, quando possuíam de 9 a 10 folhas emergidas. Não se observaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos em relação à emergência de folhas. Apenas no tratamento com LAB na concentração de $7,9 \cdot 10^{-9}$ M notou-se inibição do número de folhas iniciadas. Observou-se também, nas plantas tratadas, inibição tanto no alongamento do eixo como no número de gemas formadas e na iniciação floral. Notou-se que enquanto no controle não ocorreu emer-

FIGURA 14. Tratamento com LAB 102 883: altura da parte aérea.

● = plantas controle

▲ = plantas tratadas com LAB a $7,9 \cdot 10^{-10}$ M

■ = plantas tratadas com LAB a $7,9 \cdot 10^{-9}$ M

Figura 14

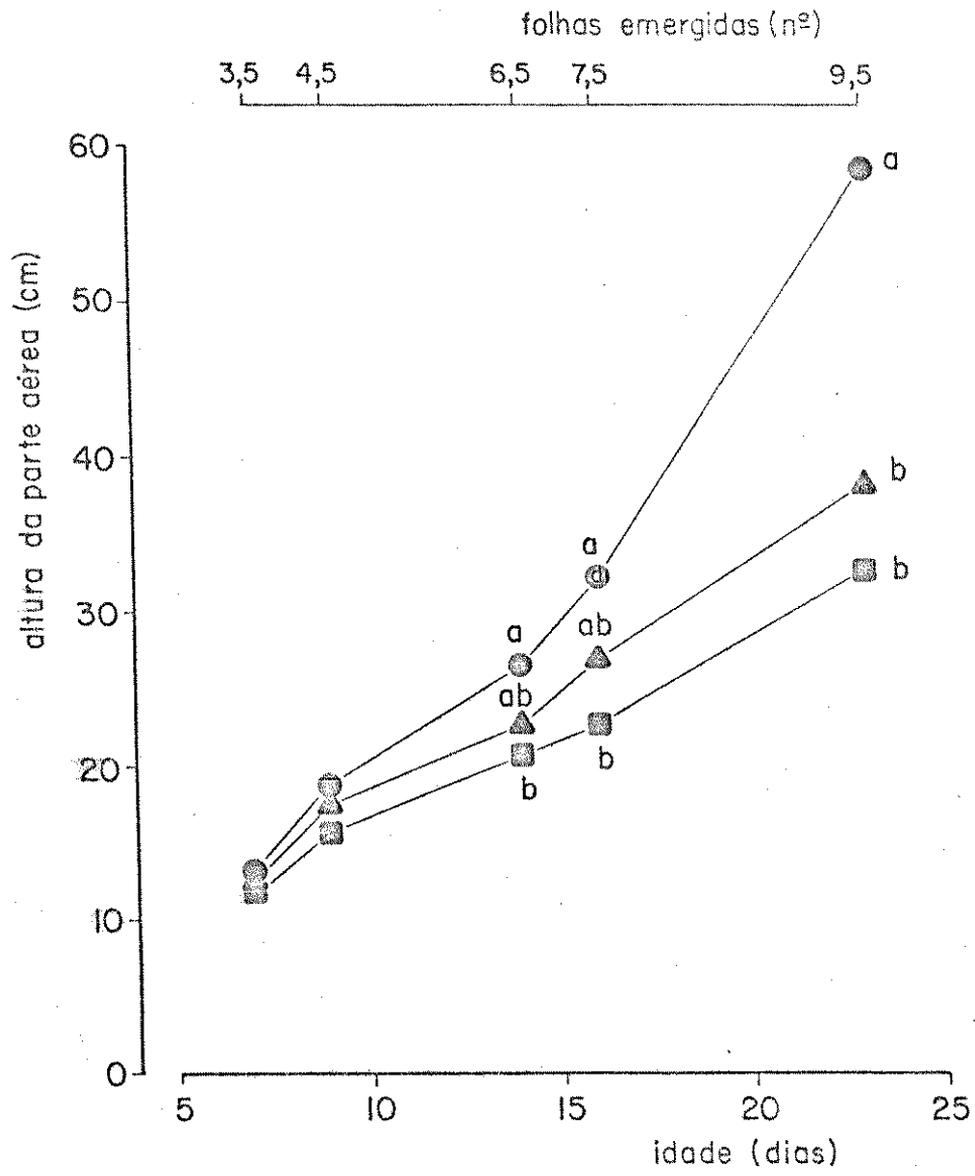


TABELA 19 - Tratamento com o LAB 102883.

- Plantas com 23 dias de idade (9 a 10 folhas
emergidas)

TABELA 19

tratamentos parâmetros	controle	LAB $7.9.10^{-10}$ M	LAB $7.9.10^{-9}$ M
folhas iniciadas (nº)	19,3 ^a	19,3 ^a	17,9 ^b
gemas iniciadas (nº)	11,3 ^a	10,0 ^b	10,1 ^b
altura do eixo (cm)	2,4 ^a	1,6 ^b	1,6 ^b
estado do ápice principal	42,9% v	100% v	71,4% v
	57,1% v ⁺		28,6% v ⁺
folhas emergidas (nº)	9,5 ^a	9,9 ^a	9,6 ^a
perfilhos emergi- dos (nº)	0,0 ^a	0,6 ^a	1,7 ^b

tas tratadas com LAB, sendo a promoção no número de perfis -
lhos emergidos estatisticamente maior no tratamento com mai -
or concentração de LAB. Além de promover o crescimento das
gemas laterais que se transformaram em perfilhos (P2 e P3),
o LAB promoveu significativamente o crescimento de todas
as outras gemas laterais medidas em plantas com 9 a 10 fo -
lhas emergidas (tab. 20). Os comprimentos das gemas late -
rais P2 e P3, nas plantas tratadas com a concentração mais
alta de LAB ($7,9 \cdot 10^{-9}$ M), não puderam ser comparados atra -
vés dos testes estatísticos usuais, já que, como é indicado
na tabela 20, a resposta ao tratamento não obedeceu a uma
distribuição normal. Assim, o LAB, quando efetivo, liberou
as gemas da dominância apical e portanto o comprimento de -
las é bem diferente do das do controle. Em algumas plantas
o LAB não foi efetivo na desrepressão do crescimento das ge -
mas laterais e portanto o comprimento destas não foi muito
diferente do das gemas das plantas controle. A figura 15
mostra o aspecto geral de uma planta, com 23 dias de idade,
tratada com o LAB e o de uma controle. Nota-se claramente
a inibição no alongamento da parte aérea, bem como a promo -
ção no perfilhamento.

Concluindo, pode-se dizer que enquanto o tra -
tamento com GA_3 adianta a iniciação floral, os dois inibido -
res de biossíntese de giberelinas testados, atrasam-na. Al -
guns outros efeitos opostos aos provocados pelo GA_3 são no -
tados nas plantas tratadas com os dois inibidores, mas es -
tes efeitos não são comuns para os dois nos mesmos parâme -

TABELA 20 - Tratamento com o LAB 102883: comprimento (mm)
das gemas laterais.

- Plantas com 23 dias de idade (9 a 10 folhas
emergidas)

+ = gemas presentes, mas não dissecáveis (es-
condidas pelas raízes adventícias)

TABELA 20

gemas	tratamentos controle	LAB $7,9 \cdot 10^{-10}$ M	LAB $7,9 \cdot 10^{-9}$ M
P1	+	+	+
P2	7,22 ^a	146,20 ^a	4,1 51,0 (1)
P3	9,98 ^a	34,67 ^b	15,6 39,0 (2)
P4	5,91 ^a	19,31 ^b	11,89 ^a
P5	5,40 ^a	11,75 ^b	12,03 ^b
P6	4,17 ^a	9,00 ^b	10,57 ^b
P7	2,51 ^a	5,60 ^b	4,51 ^b
P8	2,02 ^a	3,56 ^b	3,54 ^b

(1) O primeiro valor corresponde à média de 40% das plantas.

(2) o primeiro valor corresponde à média de 70% das plantas.

FIGURA 15. Tratamento com LAB 102883: aspecto geral das plantas.

- plantas tratadas com LAB a $7,9 \cdot 10^{-9}$ M e
controle, com 23 dias de idade

P2 = perfilho da segunda folha

P3 = perfilho da terceira folha

Figura 15



to é constatada nas plantas tratadas com o LAB. Este inibidor também reduz o crescimento da parte aérea. O CCC é antagonístico ao GA_3 promovendo a iniciação de gemas laterais, já o LAB, como o GA_3 , reduz o número de gemas formadas. O comprimento de todas as gemas laterais é promovido pelo LAB. Fato interessante é que esta promoção é mais acentuada, formando perfilhos, nas gemas P2 e P3 que são as gemas inibidas pelo tratamento com GA_3 . O número de folhas iniciadas, no geral, não é fortemente alterado pelo GA_3 ou pelos inibidores de biossíntese de giberelinas.

5. ANÁLISE DE GIBERELINAS ENDÓGENAS

5.1. Distribuição, Identificação e Quantificação

As giberelinas do eixo principal de plantas em três diferentes fases do desenvolvimento (fases 1, 2 e 3 descritas em Material e Métodos, item 11.1) foram extraídas, purificadas e analisadas através de bioensaios e comparação com giberelinas radioativas padrão.

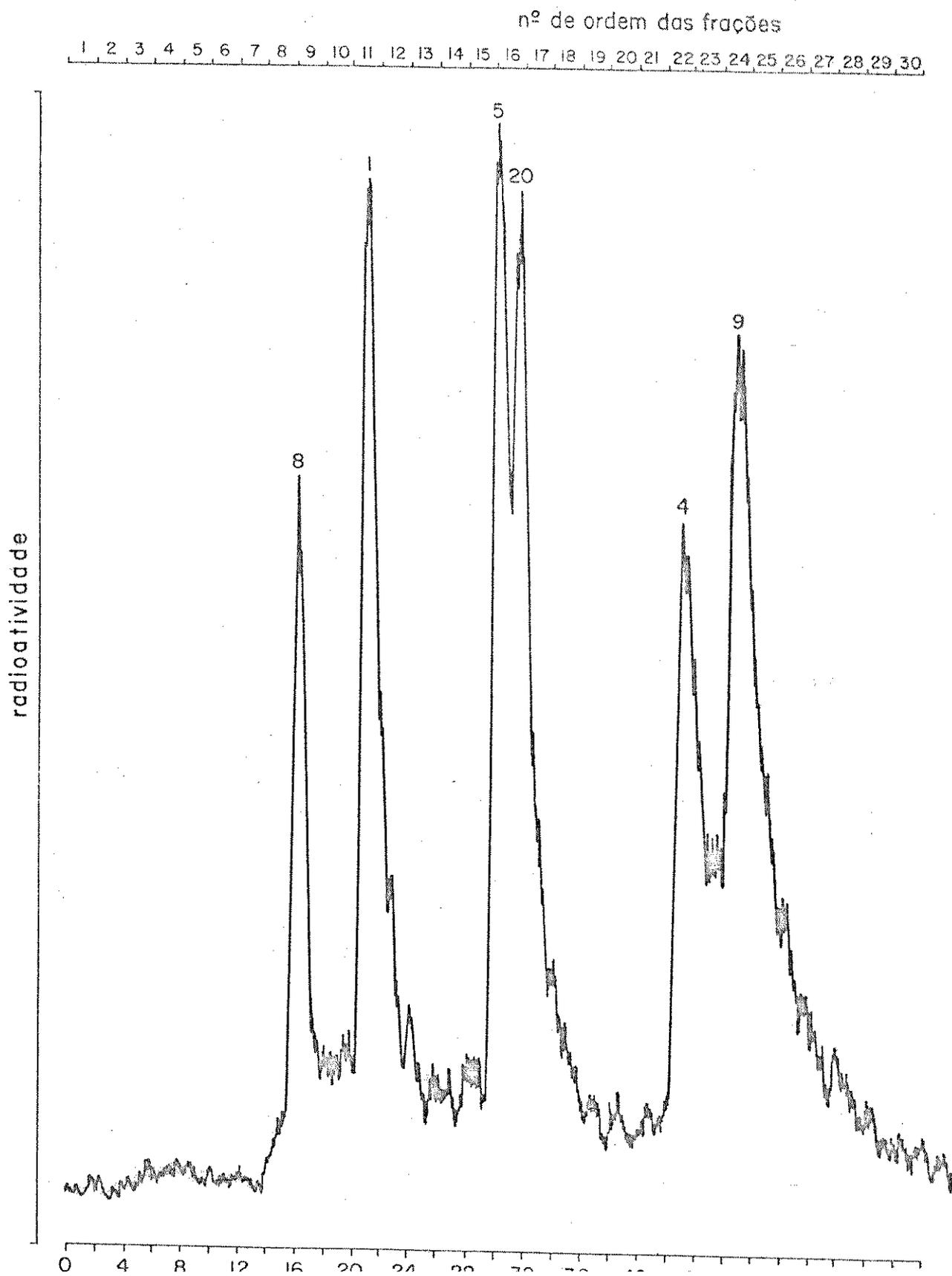
A figura 16 mostra os picos de radioatividade obtidos para cada giberelina padrão após a HPLC. Notou-se que de acordo com a polaridade de cada giberelina elas foram assim separadas: a GA_8 saiu na fração nove, GA_1 nas frações onze e doze, GA_5 e GA_{20} ficaram um pouco misturadas nas frações quinze, dezesseis e dezessete, GA_4 nas vinte e dois e vinte e três e GA_9 nas vinte e quatro e vinte e cinco.

FIGURA 16. Perfil cromatográfico de giberelinas radioativas padrão após HPLC-RC.

fluxo do solvente = $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

- Números sobre cada pico identificam os picos correspondentes a cada giberelina radioativa padrão cromatografada.

Figura 16



Assim, para o extrato da fase 1 usaram-se os bioensaios da cevada e do arroz anão. O mesmo par de bioensaios foi usado para as duas regiões do eixo (basal e apical) da fase 2 e para a região basal da fase 3. Para a região apical e in florescência da fase 3 foram usados os bioensaios do alface e da cevada.

Na figura 17 é mostrada a atividade biológica, das frações de cada um dos extratos, medida no bioensaio da aleurona de cevada. Foi possível, em todos os extratos medir-se alguma atividade giberelínica, embora as frações que apresentaram atividade significativa (regiões sombreadas do histograma) tenham sido diferentes. Durante a HPLC da região basal da fase 3 a coleta das frações foi atrasada em 2 minutos perdendo-se a fração correspondente à primeira nos outros extratos. Assim, a fração 1 do extrato da região basal da fase 3 corresponde à fração 2 dos outros extratos, e assim por diante.

A região basal da fase 2 (fig. 17B), bem como a inflorescência (fig. 17F) e região apical (fig. 17E) da fase 3, apresentaram atividade de giberelinas nas frações em que saíram GA_8 e GA_1 . Tanto na fase 1 (fig. 17A), como na região basal (fig. 17D), apical (17E) e inflorescência (fig. 17F) da fase 3, mediu-se atividade significativa em frações anteriores à nona, frações estas que não corresponderam a nenhuma das giberelinas radioativas padrão usadas para comparação. Não se observou atividade giberelínica significativa na região apical da fase 2 (fig. 17C).

Apenas as frações dos extratos da região apical

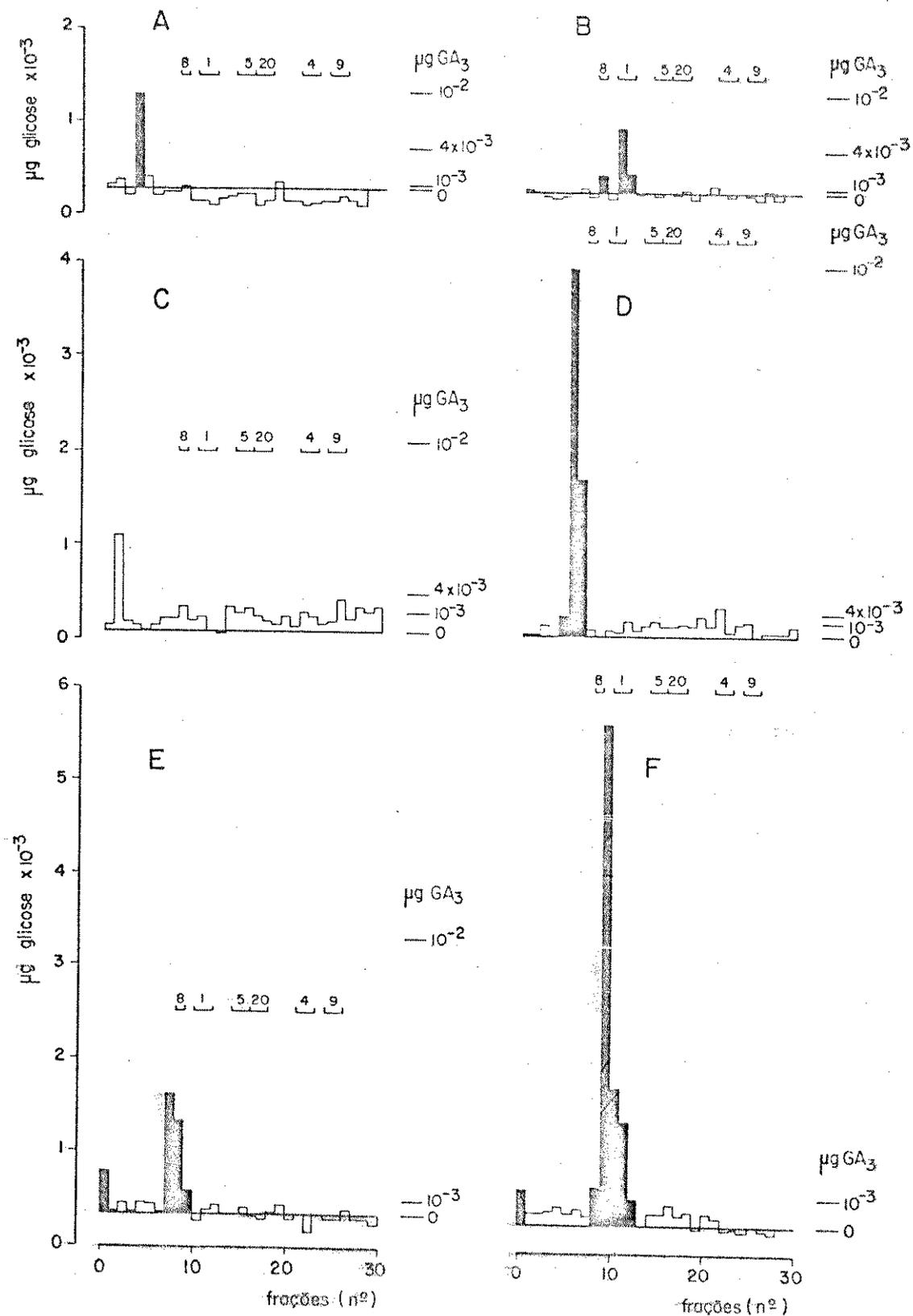
FIGURA 17. Atividade giberelínica medida nas frações provenientes da HPLC através do bioensaio de aleurona de cevada.

- A. fase 1 - eixo inteiro
- B. fase 2 - região basal
- C. fase 2 - região apical
- D. fase 3 - região basal
- E. fase 3 - região apical
- F. fase 3 - inflorescência

- Barras na parte superior da figura correspondem às frações onde foram encontradas as giberelinas padrão.

- As zonas cheias são significativamente diferentes do controle. Considerou-se a medida significativa, quando a média menos o desvio padrão superou a média mais o desvio padrão do controle.

Figura 17



de cada uma das frações nos dois extratos são mostrados na figura 18. Na região apical da fase 3 (fig. 18A) observou-se um pico de atividade giberelínica significativa na fração 11 que correspondeu à fração na qual saiu a GA_1 . Alguma atividade foi medida no extrato da inflorescência (fig. 18B) mas estas medidas não foram significativamente diferentes do controle.

A figura 19 mostra a atividade giberelínica medida em cada uma das frações do extrato do eixo inteiro na fase 1 (fig. 19A); da fase 2 (região basal, fig. 19B e região apical, fig. 19C) e da região basal do eixo na fase 3 (fig. 19D) no bioensaio do arroz anão "Tan ginbozu". Notou-se alguma atividade semelhante à de giberelina em todos os extratos, sendo a maior, observada na região basal da fase 3 (fig. 19D). Na fase 1 (fig. 19A) o pico de atividade obtido apareceu nas frações dezessete e dezoito que corresponderam às frações onde saiu a GA_{20} . Na região apical da fase 2 (fig. 19C) pico semelhante apareceu, apesar de estar um pouco deslocado, na fração dezenove. Na região basal da fase 2 (fig. 19B) observou-se um pico na fração nove, região da GA_8 e outro nas frações vinte e vinte e um, entre a GA_{20} e a GA_4 . Na região basal da fase 3 (fig. 19D) mediu-se atividade significativa nas frações dezoito e dezenove, na região da GA_{20} , sendo o pico, também, um pouco deslocado.

A tabela 21 mostra um resumo dos resultados obtidos nestas análises de distribuição, identificação e quantificação de giberelinas endógenas no eixo principal de plan

FIGURA 18. Atividade giberelínica medida nas frações provenientes da HPLC no bioensaio do hipocótilo de alface.

A. fase 3 - região apical

B. fase 3 - inflorescência

- Barras na parte superior da figura correspondem às frações onde foram encontradas as giberelinas padrão.
- A zona cheia é significativamente diferente do controle ao nível de 5%.

Figura 18

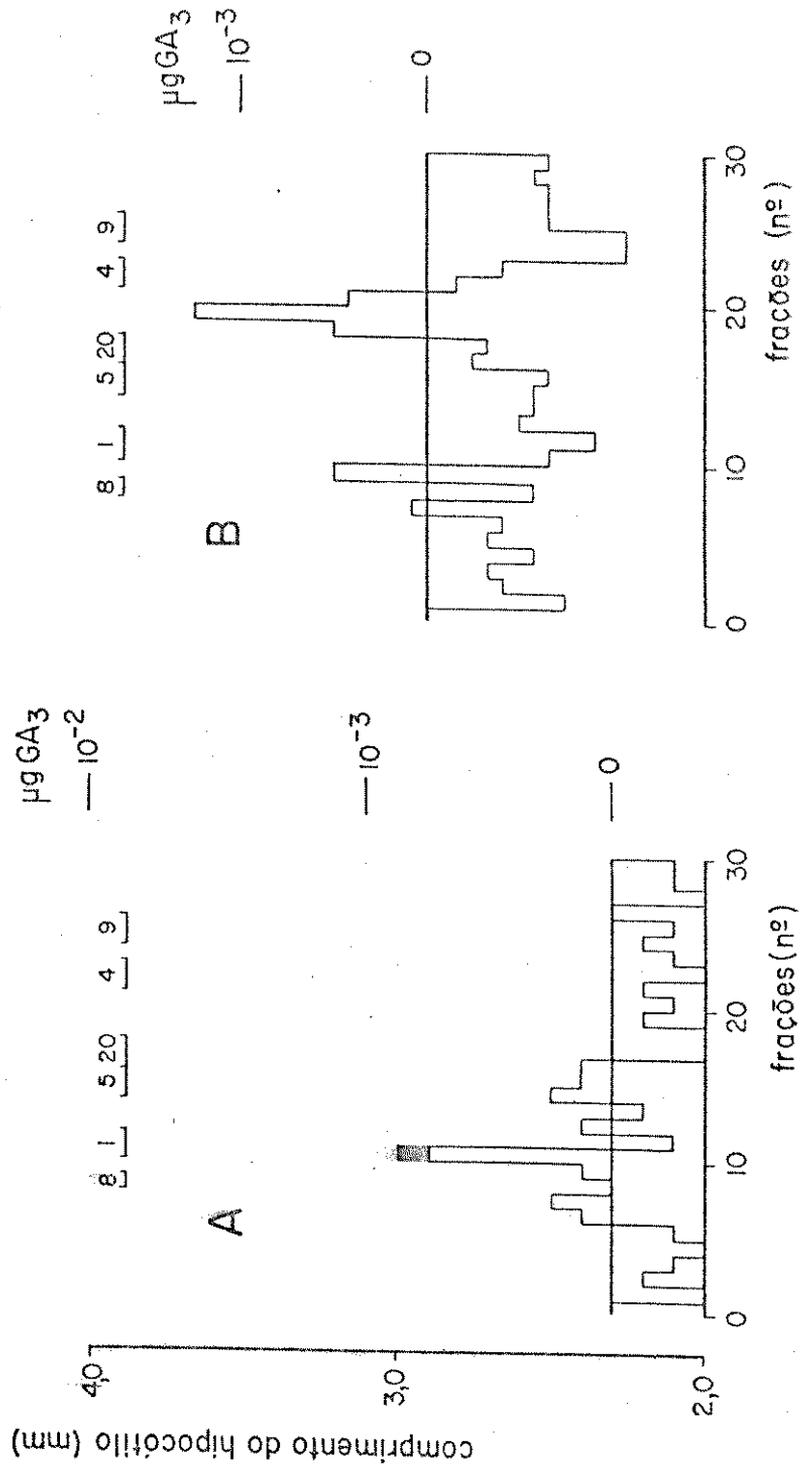


FIGURA 19. Atividade giberelínica medida nas frações provenientes da HPLC no bioensaio do arroz anão "Tan ^{ny} gibozu".

- A. fase 1 - eixo inteiro
- B. fase 2 - região basal
- C. fase 2 - região apical
- D. fase 3 - região basal

- Barras na parte superior da figura correspondem às frações onde foram encontradas as giberelinas padrão
- As zonas cheias são significativamente diferentes do controle ao nível de 5%

Figura 19

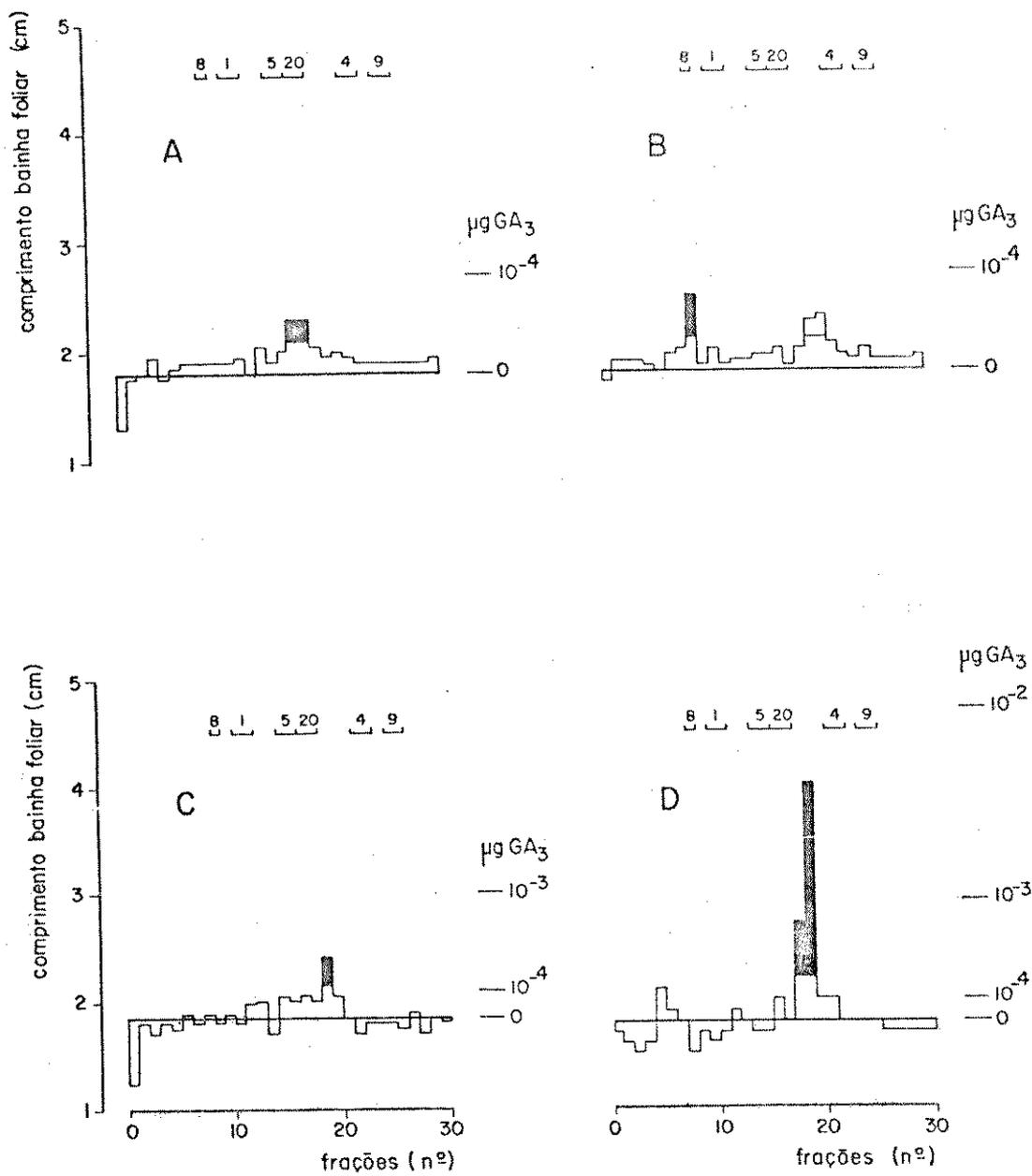


TABELA 21 - Análise da distribuição, identificação e quan-
tificação de giberelinas endógenas no eixo
principal de milho.

- Frações mostradas foram as cuja atividade
média foi significativamente diferente do
controle a nível da 5%
- Números entre parenteses, na região basal
da fase 3, indicam as frações equivalentes
às dos números fora dos parenteses nos ou-
tros extratos, já que neste caso a coleta
das amostras durante a HPLC foi atrasada
- ? = Giberelinas não identificadas, ou, quan-
do acompanhando um tipo de GA, indicam
que possivelmente este tipo é o da gi-
berelina detectada que teve seu pico um
pouco deslocado

TABELA 21

Fase	Região	Fração ou HPLC	Identifi- cação	eq GA ₃ (ng . gPS ⁻¹)	Bioensalo	
1	planta toda	4	GAconjugada	34,0	cevada	
		17	GA ₂ ou GA ₂₀	0,6-7,1	arroz	
		18	GA ₅ ou GA ₂₀	0,4-9,3	arroz	
2	basal	9	GA ₈	0,3-11,4	arroz	
		9	GA ₈	10,0	cevada	
		11	GA ₁	16,0	cevada	
		12	GA ₁	10,0	cevada	
		20	? ¹	0,2-6,4	arroz	
	21	?	0,2-5,8	arroz		
	apical	-	-	-	-	cevada
		19	GA ₂₀ ?	1,1-80,8	arroz	
	3	basal	5(6)	GA ₈ ou conj.?	8,0	cevada
			6(7)	GA ₈ ou conj.?	71,0	cevada
7(8)			GA ₈ ou conj.?	19,0	cevada	
18(19)			GA ₈ ou GA ₄ ?	2,0-41,4	arroz	
19(20)			GA ₂₀ ou GA ₄ ?	24,8-397,1	arroz	
apical		1	GAconjugada	2,0	cevada	
		8	GA ₈ ?	8,0	cevada	
		9	GA ₈ ?	5,0	cevada	
		10	GA ₁ ?	2,0	cevada	
		11	GA ₁	1,9-6,2	alface	
inflorescência		-	-	-	-	alface
		9	GAconjugada	723,0	cevada	
		10	GA ₈ ou GA ₁ ?	29.198,0	cevada	
		11	GA ₁	1.597,0	cevada	
		12	GA ₁	1.247,0	cevada	
13	? ¹	698,0	cevada			

5627/BC

saios foi significativamente diferente do controle (DMS de Tukey 5% para os bioensaios da alface e arroz e desvio padrão para o da cevada).

Assim, na fase 1 além de pequena quantidade de GA₅ e/ou GA₂₀ (frações 17 e 18 da HPLC) notou-se também a presença (na fração 4) de giberelinas conjugadas que são mais polares que a GA₈ e portanto saíram nas primeiras frações durante a cromatografia. Na fase do início do alongamento do eixo (fase 2) GA₈ e GA₁ (frações 9, 11 e 12, respectivamente) estavam presentes na região basal. Na mesma região pequena quantidade de uma giberelina não identificada, mas com a polaridade entre a de GA₄ e GA₂₀ apareceu nas frações vinte e vinte e um. Nesta fase do desenvolvimento, pareceu que apenas um tipo de GA, possivelmente a GA₂₀, estava presente na região apical do eixo. Durante o alongamento (fase 3), na inflorescência e região apical do eixo, GA₈ e GA₁ puderam ser detectados, sendo que na inflorescência elas estavam presentes em alta quantidade chegando-se a medir 29 198,0 ng eq GA₃ . gPS⁻¹ na fração dez. Nesta fase, giberelinas conjugadas puderam ser detectadas nas três regiões do eixo, sendo novamente encontrada maior quantidade na inflorescência.

5.2. Metabolismo

Resolveu-se estudar quais as possíveis interconversões sofridas pelas giberelinas durante o processo de alongamento do eixo. Para isso, [³H] GA₂₀ foi aplicada na fase do desenvolvimento que antecede o alongamento e as trans-

radioativos encontrados nas raízes, folhas e eixo principal. A $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi escolhida já que pode ser convertida em GA_1 e GA_8 (KAMIYA e GRAEBE, 1983 in CROZIER, 1983) que foram tipos detectados no eixo principal quando se analisou o conteúdo endógeno de giberelinas.

Como se provou que o efeito do GA_3 ocorreu também em condições de cultura hidropônica (item 4.2), usou-se este meio de cultura para o cultivo das plantas onde o metabolismo da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi analisado.

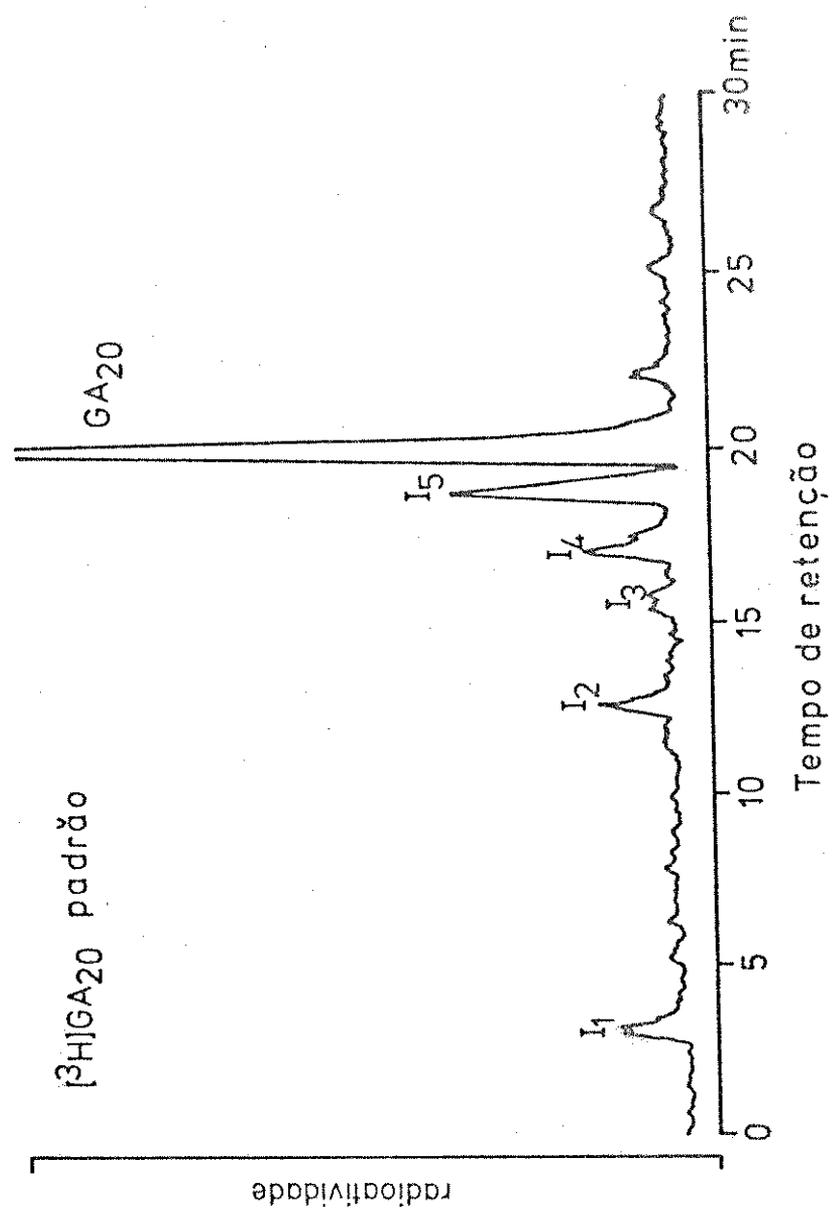
Inicialmente, mediu-se a radioatividade da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão que foi fornecida às plantas. A figura 20 ilustra o perfil cromatográfico da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão, após HPLC-RC. A análise foi feita aplicando-se 0,5 μl da solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ (\approx 200 000 dpm) na coluna de HPLC. Na figura 20, além de pico da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ (tempo de retenção igual a 20,2 minutos), notaram-se outros picos (I_1 a I_5) que foram considerados impurezas presentes na solução radioativa padrão. O tempo de retenção destas impurezas foi, na ordem em que elas saíram da coluna: 3,0; 12,5; 15,6; 17,0; e 18,7 minutos (I_1 a I_5). Após a determinação das impurezas radioativas presentes na solução radioativa padrão, com a qual as plantas foram tratadas, analisou-se a radioatividade presente no extrato das folhas, dos eixos e das raízes das plantas tratadas. A radioatividade recuperada em cada extrato foi inicialmente medida como um todo. Dos aproximadamente 5 000 kdpm aplicados recuperaram-se 4 125 500 dpm nas folhas, 175 000 dpm nos eixos e 47 000 dpm nas raízes.

FIGURA 20. Perfil cromatográfico da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão
(200.000 dpm), após HPLC-RC.

Fluxo do solvente = 1 ml . min⁻¹

I = impurezas presentes na solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$
padrão

Figura 20



radioatividade

$^3\text{HIGA20}$ padrão

Tempo de retenção

30min

GA20

I_5

I_2

I_3

I_4

I_1

Na figura 21 é mostrada a radioatividade medida no extrato das folhas após ter sido submetido a HPLC-RC. Inicialmente (fig. 21A) a alíquota analisada foi 1/400 do extrato (que continha toda a GA₂₀ radioativa original presente nas folhas). O pico principal de radioatividade além de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi a impureza I₅. No entanto, em relação à quantidade de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ o composto I₅ estava presente no extrato das folhas em maior quantidade que na solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão. Uma alíquota maior (1/10) do extrato das folhas foi, então, analisada para se detectar a presença de metabolitos presentes em menor quantidade (fig. 21B). Além da GA₂₀ e da impureza I₅, que ficaram fora de escala, apareceram vários picos menores, alguns dos quais são as impurezas da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ aplicada nas plantas de milho, notadas na figura 20. No entanto, vários picos de metabolitos (M₁ - M₆) também puderam ser detectados e alguns deles puderam ser identificados através de co-cromatografias com GAs conhecidos. A tabela 22 mostra o tempo de retenção dos principais metabolitos radioativos presentes no extrato das folhas (baseado na HPLC-RC da figura 21) e, quando possível, a identificação do metabolito também é indicada. Notou-se a presença de $|^3\text{H}| \text{GA}_8$ (M₁) e $|^3\text{H}| \text{GA}_1$ (M₄) no extrato. $|^3\text{H}| \text{GA}_{29}$ (M_{1a}) também pode estar presente pois o segundo pico obtido no cromatograma teve o tempo de retenção semelhante ao do GA₂₉, mas como não se possuía GA₂₉ radioativo padrão para a co-cromatografia, a identificação não foi precisa. Vários metabolitos desconhecidos também foram detectados.

FIGURA 21. Perfil cromatográfico do extrato das folhas de plantas tratadas com ^3H GA₂₀, após HPLC-RC. Fluxo do solvente = 1 ml . min⁻¹

A. 1/400 (10.300 dpm) do extrato das folhas
B. 1/10 (413.000 dpm) do extrato das folhas

I = impurezas da solução padrão
M = metabolitos da ^3H GA₂₀ (sugerindo-se as possíveis GAs correspondentes)

Figura 21

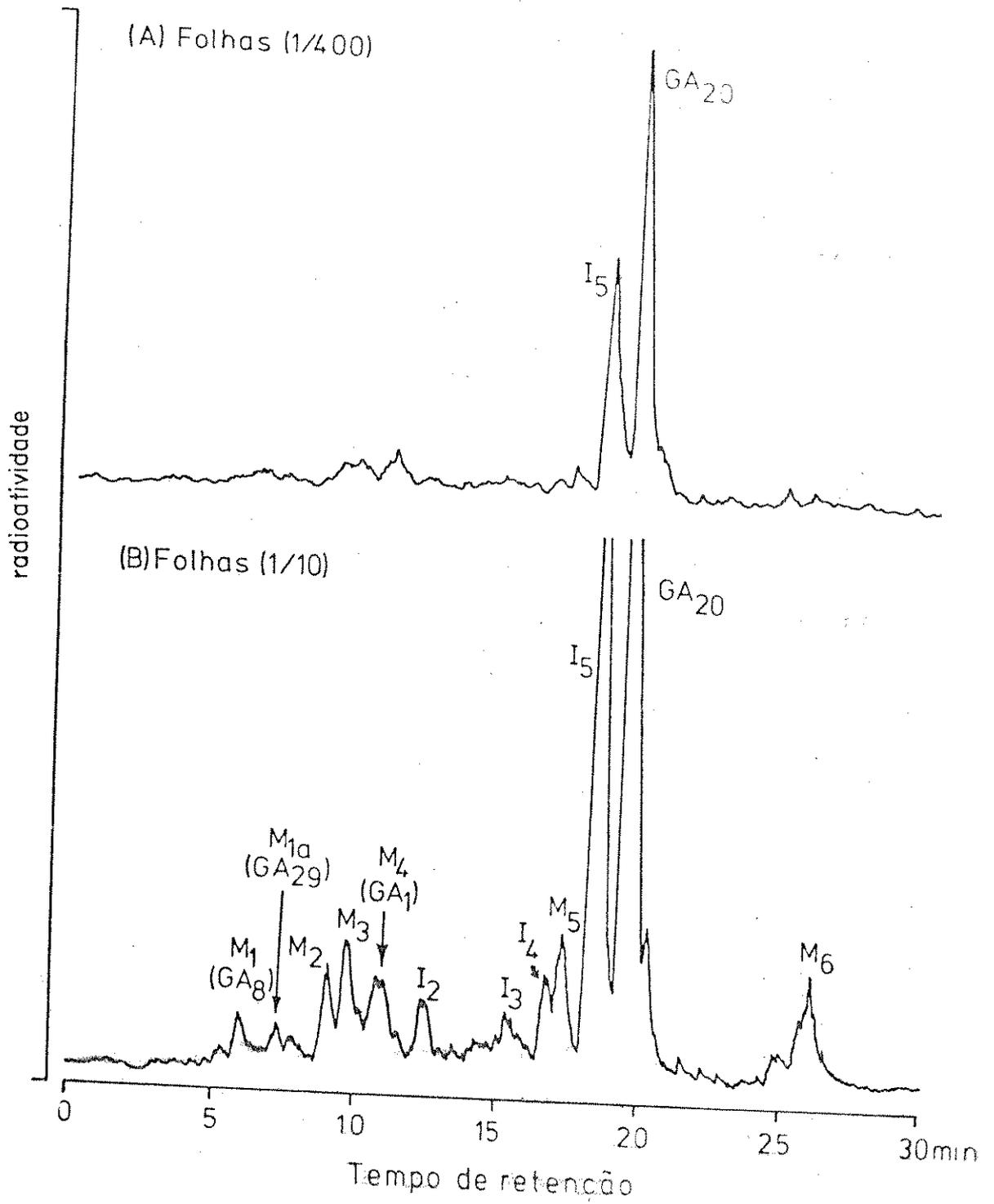


TABELA 22 - Análise do metabolismo da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ em milho: extrato das folhas.

- Tempo de retenção (min) dos principais picos obtidos em HPLC-RC (fig. 21B)

M1 a M6 = metabolitos

? = metabolitos não identificados, ou, quando acompanhando um tipo de GA, indicam que possivelmente esta é a GA presente

I = impurezas da solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão

TABELA 22

Tempo de retenção (min)	Identificação	
6,2	M ₁	GA ₈
7,5	M _{1a}	GA ₂₉ ?
9,2	M ₂	?
9,8	M ₃	?
11,2	M ₄	GA ₁
12,5	I ₂	
15,6	I ₃	
17,0	I ₄	
17,6	M ₅	?
18,7	I ₅	
20,2		GA ₂₀
26,4	M ₆	?

figura 22A. A outra metade foi co-cromatografada com o $|^3\text{H}| \text{GA}_1$, $|^3\text{H}| \text{GA}_8$ e $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$. O tempo de retenção dos principais picos obtidos na HPLC-RC (figura 22) bem como a identificação destes metabolitos são sumarizados na tabela 23. Os resultados mostraram que pequenas quantidades de $|^3\text{H}| \text{GA}_1$, $|^3\text{H}| \text{GA}_8$ e $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ estavam presentes no eixo principal, juntamente com três metabolitos desconhecidos e uma impureza (I_3) da solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão.

Todo o extrato da raiz foi submetido à HPLC-RC devido ao baixo nível de radioatividade medido no extrato como um todo (47.000 dpm). Na figura 22B o perfil cromatográfico obtido indicou a presença de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ e impurezas, uma das quais foi a I_5 . É interessante notar que a $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ estava presente nas raízes em maior quantidade que no eixo principal.

FIGURA 22. Perfil cromatográfico do extrato dos eixos e das raízes de plantas tratadas com $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$, após HPLC-RC.

Fluxo do solvente: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

A. metade do extrato dos eixos (87.500 dpm)

B. todo o extrato das raízes (47.000 dpm)

I = impurezas da solução padrão

M = metabolitos da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ (sugerindo-se as possíveis GAs correspondentes)

Figura 22

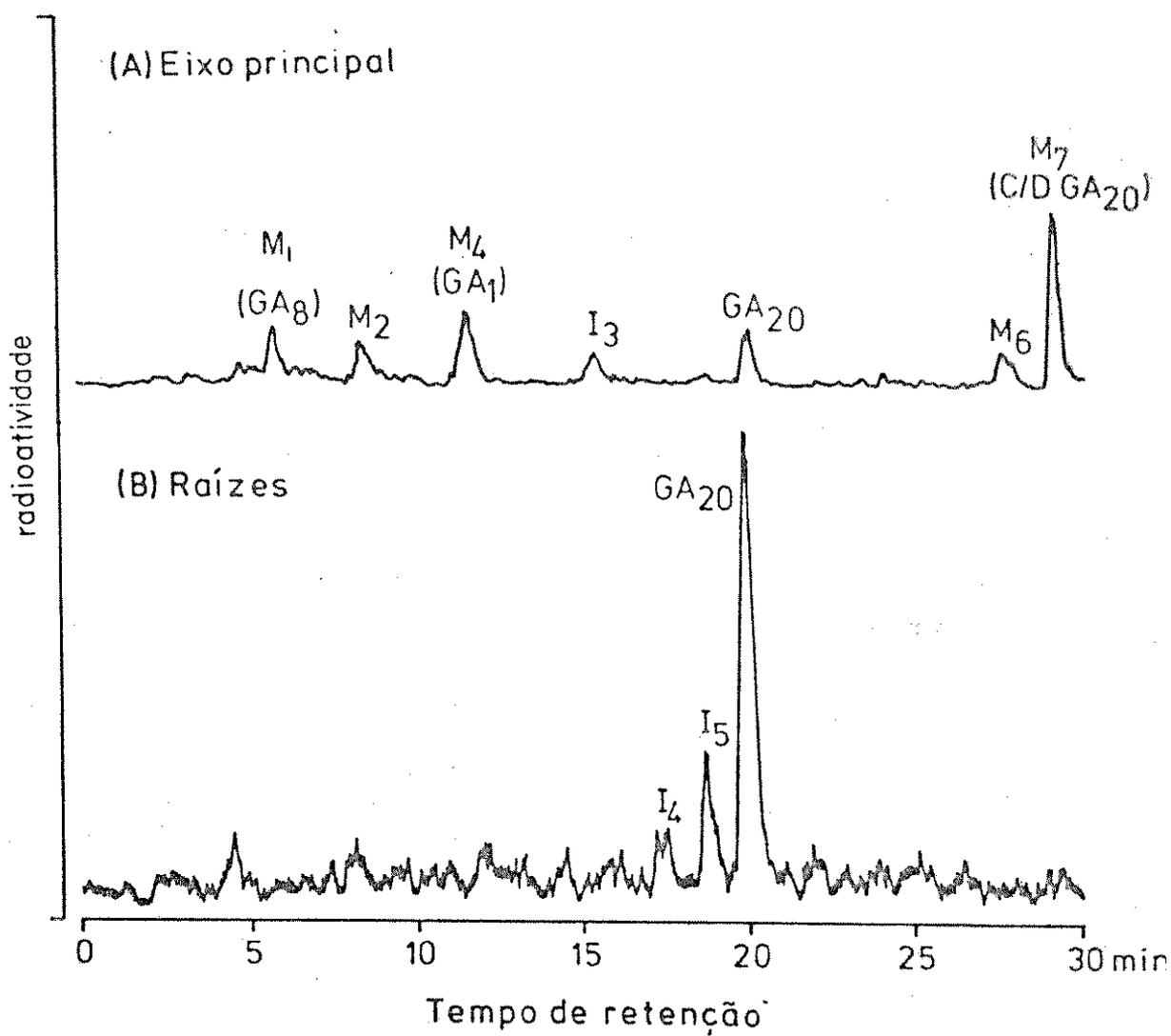


TABELA 23 - Análise do metabolismo da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ em mi -
lho: extrato dos eixos principais.

- Tempo de retenção (min) dos principais pi
cos obtidos em HPLC-RC (fig. 22A)

M1 a M7 = metabolitos

? = metabolitos não identificados

I = impurezas da solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão

TABELA 23

Tempo de retenção (min)	Identificação	
6,0	M ₁	GA ₈
8,6	M ₂	?
11,8	M ₄	GA ₁
15,6	I ₃	
20,2		GA ₂₀
28,0	M ₆	?
29,6	M ₇	?

IV - D I S C U S S Ã O E C O N C L U S Õ E S

A expressão de caracteres fenotípicos em plantas é resultado de interações ambientais com padrões de desenvolvimento controlados geneticamente. Em milho, estes padrões de desenvolvimento foram muito bem descritos por BONNETT (1953). Concordando com o que foi descrito por ele, foi constatada forte dominância apical no cultivar analisado neste trabalho. As gemas laterais, após um curto período de crescimento vegetativo, permaneceram em estado latente até a planta mudar do estágio vegetativo para o reprodutivo. Neste estágio retomaram seu desenvolvimento e se transformaram em espigas.

Resultados interessantes foram obtidos, neste aspecto, quando se analisou o papel do inibidor de biossíntese de giberelinas, LAB 102883, no desenvolvimento das plantas. Este inibidor, quando efetivo, reduziu a dominância apical, promovendo a emergência dos perfilhos P2 e P3 e o crescimento em comprimento das outras gemas laterais.

Em um experimento preliminar, não apresentado neste trabalho, observou-se que plantas de milho submetidas a excesso de água tiveram o crescimento vegetativo das gemas laterais promovido. Esta promoção foi bem evidente nas gemas mais basais, culminando com o perfilhamento, que não é comum em milho.

Foi demonstrado por CROZIER e REID (1971) que em tomate, os níveis de giberelinas diminuíram após o trata

mento das plantas com água em excesso. Sabe-se também, que a aplicação de ácido giberélico reduz o perfilhamento em diversas gramíneas (HARADA e VERGARA, 1972; JOHNSTON e JEFFCOAT, 1977; ISBELL e MORGAN, 1982). Baseando-se nestas informações pode-se sugerir que as giberelinas podem estar envolvidas no controle da dominância apical em milho. Baixos níveis endógenos de giberelinas enfraqueceriam a dominância apical, possibilitando o crescimento de perfilhos.

É bem conhecido o efeito do aumento da nutrição mineral promovendo o perfilhamento durante o desenvolvimento de gramíneas, onde a dominância apical é fraca (LANGER, 1966, in LANGER, 1972). Em milho, onde a dominância apical é forte, não se observou promoção de perfilhamento quando nutrientes foram fornecidos em maiores proporções, indicando que o papel da nutrição mineral no desenvolvimento de gemas de milho é de importância secundária.

Além da constatação da forte dominância apical em milho, outros padrões de desenvolvimento foram analisados. Concordando com o que foi descrito por BONNETT (1953), foi observado que o alongamento dos entrenós do eixo principal, o crescimento das folhas, o desenvolvimento vegetativo das gemas laterais, e a parada do crescimento dos mesmos ocorreram acropetamente, enquanto a iniciação floral foi basípeta. Explicações fisiológicas para parte deste padrão de desenvolvimento serão sugeridas adiante, apesar de serem difíceis de estabelecer, pois exigiriam extensivos e detalhados estudos dos níveis de substâncias reguladoras de crescimento nas diferentes regiões das plantas, durante seu desenvolvimento. Além disso, estudos sobre a correlação do crescimento de di-

ferentes partes da planta e do papel de fatores ambientais neste crescimento, também seriam necessários.

SIEMER e colaboradores (1969) analisaram alguns padrões de desenvolvimento de plantas de milho e sugeriram possíveis correlações entre alguns eventos principais que ocorrem durante o desenvolvimento. Segundo estes autores, existe um interrelacionamento, pelo menos temporal, entre o alongamento do eixo principal e a iniciação floral. Esta mesma relação temporal foi notada no presente trabalho, sendo que, ao mesmo tempo foi também observada inibição da iniciação das folhas e de gemas laterais.

Estudando-se a influência de fatores ambientais no interrelacionamento dos principais eventos que ocorrem durante o desenvolvimento de plantas de milho, analisou-se o papel do fotoperíodo.

VINCE-PRUE (1975), numa tabela de classificação de plantas fotoperiódicas para floração, coloca *Zea mays* como planta de dias curtos ou indiferente. No presente trabalho constatou-se que sob uma condição de pequena duração de período de escuro (18 horas de luz) ou numa condição onde o período longo de escuro é interrompido por um choque de luz (8 horas de luz com noite interrompida) o crescimento vegetativo das plantas foi prolongado, atrasando o alongamento do eixo e a floração. Nestas condições houve também promoção, da formação de novas folhas e gemas. Resultado semelhante foi encontrado por HESLOP-HARRISON (1961) que trabalhando com milho observou que dias curtos são necessários para que ocorra a iniciação da floração e que sob condições de dias longos o crescimento vegetativo é manti -

do. Também no mesmo sentido, foi notado por HESKETH et al. (1969) que dias curtos reduzem o número de folhas formadas em milho.

Como para o cultivar de milho analisado neste trabalho observou-se formação de flores independente da condição fotoperiódica a que as plantas foram submetidas, sugere-se que neste caso, dias curtos aceleram, mas não são essenciais para a floração.

Já que o relacionamento temporal existente entre o alongamento do eixo principal, iniciação floral e parada de formação de folhas e gemas continuou sendo notado em plantas submetidas às diferentes condições fotoperiódicas, analisou-se o efeito de reguladores de crescimento sobre estes eventos. Isto foi feito para se detectar possíveis relações fisiológicas entre eles.

O papel das citocininas durante o desenvolvimento de plantas de milho não ficou esclarecido. Foi notado apenas que a 6-benziladenina inibiu o crescimento geral das plantas. A inibição foi mais evidente em plantas mais velhas, quando o tratamento foi feito através das raízes.

Esta inibição pode ser explicada baseando-se no fato de que citocininas inibem o crescimento de raízes de algumas plantas (GOODWIN, 1978). Isto produziria uma redução no crescimento da parte aérea por possuir menor área para absorção de nutrientes. A translocação de reservas do endosperma para a parte aérea também seria reduzida, já que ela estaria agindo como fraca fonte de consumo. Assim, pelos resultados obtidos, foi difícil atribuir um papel para as citocininas no desenvolvimento de plantas de milho e mais estu -

dos são necessários para que este ponto seja esclarecido.

Entre todos os efeitos das giberelinas no desenvolvimento de plantas o mais marcante é o relacionado ao alongamento do eixo. PHINNEY (1956) notou que aplicação de giberelina em mutantes anões de milho para um único gene, restabeleceu o crescimento normal das plantas e que o nanismo estava associado com o conteúdo extremamente baixo de GAs endógenas.

O papel das giberelinas na indução da floração é interessante considerando-se que elas são o primeiro grupo de substâncias químicas que pode induzir formação de flores em plantas sob condições não indutivas (VINCE-PRUE, 1975; ZEEVAART, 1976 e CHAILAKHIAN, 1979). Levando-se em consideração estes dois principais efeitos de GAs (no alongamento do eixo e na iniciação floral) e que em muitos casos os dois eventos ocorrem simultaneamente, pode-se considerar que os dois fenômenos fazem parte do mesmo processo fisiológico em algumas plantas.

A aplicação de GA_3 em milho promoveu o alongamento do eixo, antecipando a iniciação floral e reduziu fortemente o número de gemas iniciadas. Apesar de ter sido demonstrado por PHINNEY (1984) que em milho, GA_1 é a única giberelina endógena biologicamente ativa, aplicações de GA_3 promovem o alongamento do eixo principal de milho (DAVIES e RAPPAPORT, 1975 a,b). Como as duas giberelinas tem estrutura molecular muito semelhante é possível que o sítio receptor do GA_1 seja incapaz de distinguir as duas moléculas.

Promoção no alongamento do eixo e diminuição do número de perfilhos induzidos por GA_3 também foi notada em

arroz (HARADA e VERGARA, 1972).

Os dois inibidores de biossíntese de gibereli - nas utilizados no presente trabalho, CCC e LAB 102883 tiveram efeito oposto ao GA_3 , atrasando a floração. Apesar do CCC não ter alterado, o LAB inibiu o alongamento do eixo e também reduziu o crescimento da parte aérea. Além disso o LAB promoveu o crescimento vegetativo das gemas mais basais, que foram inibidas pelo tratamento com GA_3 . Em compensação o CCC teve efeito oposto ao GA_3 na iniciação de gemas laterais, promovendo-a, já o LAB, como o GA_3 inibiu a iniciação de gemas. Sabe-se que alguns inibidores de biossíntese de GAS agem de forma relativamente inespecífica e pode-se considerar que a redução do crescimento provocada por estas substâncias não é conseguida apenas por uma diminuição no conteúdo de GAS. Assim, foi demonstrado por DOUGLAS e PALEG (1974) que CCC pode também reduzir a biossíntese de esteróis e outros terpenóides. Eles também notaram que a inibição do crescimento de tabaco pode ser revertida por tratamento com fitoesteróis. REID e CARR (1967) mostraram que extratos de raízes e seiva de plântulas de ervilha tratadas com CCC continham uma variedade de GAS diferente do extrato de plantas controle. REID e CROZIER (1970) mostraram que em plântulas de ervilha o tratamento com CCC aumentou o nível endógeno de GAS quando comparado com o de plantas controle. RADEMACHER e JUNG (1981) comparando a ação de vários inibidores de crescimento, mostraram que a ação do CCC inibindo o alongamento de plântulas de arroz foi bem menos específica que a do LAB 102883. Com base nessas informações a respeito da especificidade destes inibidores de crescimento, pode-se entender

porque em alguns parâmetros analisados durante o crescimento de milho, não se observaram efeitos contrários ao GA₃.

Os resultados obtidos nos experimentos com GA₃ e com inibidores de biossíntese de GAs, juntamente com dados de literatura, dão uma indicação adicional de que, em milho, o alongamento do eixo, a iniciação floral e a parada da formação de gemas estão relacionados ao nível endógeno de giberelinas da planta.

Mesmo parecendo haver uma relação fisiológica entre alongamento do eixo e iniciação da floração, várias evidências indicam que os dois eventos dependem de processos diferentes. Giberelinas podem promover alongamento do eixo em diversas plantas sem promover a formação de flores (ZEEVAART, 1983). Além disso, alguns inibidores de biossíntese de GAs podem inibir o alongamento do eixo, enquanto a formação de flores ocorre normalmente (CLELAND e ZEEVAART, 1970).

Pode-se, então, supor que GAs induzem o alongamento do eixo e associado a isso, mas como um processo separado, ocorre também a floração.

Relacionando o que foi observado nos experimentos de fotoperiodismo com os efeitos da aplicação de GA₃, existem vários trabalhos que mostram que giberelinas podem promover a iniciação floral em diversas plantas de dias curtos, como em *Canabis sativa* (RASUMOV, 1960) e *Impatiens balsamina* (NANDA et al., 1967). Além disto, apesar de evidências indicarem que os níveis endógenos de GAs são fortemente aumentados sob condições de dias longos, inativação concomitante de GAs ocorre nestas condições. Os níveis endóge

nos de GAS podem também aumentar sob condições de dias curtos (ZEEVAART, 1983). Sugere-se, então, que em milho, condições de dias curtos ou de período longo de escuro interrompido promovem um aumento no nível endógeno de giberelinas ativas que determinam o alongamento do eixo, iniciação floral e parada de formação de novas gemas laterais. Reforçando a sugestão que níveis endógenos de GAS podem ser aumentados sob condições de dias curtos ou noites longas interrompidas por choque de Luz, foi mostrado que em milho, tanto dias curtos (SCHAFFNER, in VINCE-PRUE, 1975) como tratamento com giberelinas (NICKERSON, 1959) promovem formação de flores femininas na inflorescência masculina.

Concluindo, apesar da separação do alongamento do eixo e iniciação floral em dois processos distintos, não está claro ainda como um fator ambiental, como o fotoperíodo, induz mudanças no conteúdo de GAS que resultam no alongamento do eixo e floração. Deste modo se tornou interessante analisar tanto níveis absolutos de GAS como o metabolismo das mesmas durante o desenvolvimento da planta, principalmente na fase em que ocorrem estes eventos que se sugere estarem relacionados.

Os níveis endógenos de giberelinas foram estimados através de bioensaios. Isto foi feito, devido à impraticabilidade do uso de outros métodos mais acurados de análise, como a espectrometria de massa, que exige grande quantidade de material vegetal. Apesar de serem sistemas não totalmente livres de interações com impurezas do extrato, os bioensaios são ainda, sistemas muito usados para determinação de giberelinas em tecidos vegetativos, onde e-

las geralmente estão presentes em baixos níveis. No entanto, para que estimativas válidas sejam feitas com base nos bioensaios, extensivas purificações preliminares dos extratos são necessárias, a fim de reduzir-se a contribuição de compostos inibidores, que poderiam mascarar a presença de giberelinas. Por este motivo, neste trabalho, purificou-se inicialmente, a fração ácida (em acetato de etila) obtida do extrato metanólico, por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A-25, seguida pela HPLC em fase reversa em gradiente de metanol e acetato de amônio.

A comparação de dois ou mais bioensaios com diferentes especificidades também ajuda a aumentar a precisão dos resultados, pois diferentes tipos de giberelinas podem se manifestar com maior ou menor intensidade dependendo do bioensaio.

Assim, escolheu-se o bioensaio da cevada, que é sensível à GA₁, GA₂, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆, GA₇, GA₂₂ e GA₂₃ e da alfaca, que é sensível mais ou menos às mesmas giberelinas mas com diferentes intensidades e o do arroz, que é sensível a um maior número de giberelinas (CROZIER et al., 1970).

Além da especificidade do bioensaio utilizado, dados de literatura, bem como a comparação dos picos de atividade obtidos com giberelinas radioativas padrão, cromatografadas da mesma maneira que os extratos, ajudaram a identificação do tipo de giberelina presente no extrato. Também, levando-se em conta que o sistema cromatográfico utilizado (HPLC em fase reversa) para a coleta das frações a serem bioensaiadas, foi de polaridade decrescente, pode-se

supor o tipo de giberelina que estava presente em cada uma das frações onde se observou atividade biológica. Assim, provavelmente, a atividade observada nas primeiras frações da HPLC, anteriores à fração nove, na qual sai o GA₈, pode ser atribuída a alguma giberelina conjugada, pois estas são mais polares que as simples e portanto passam mais rapidamente pela coluna. Apesar de ter sido demonstrado que giberelinas conjugadas tem baixa ou nenhuma atividade fisiológica "per se" (HIRAGA et al., 1974; SEMBDNER et al., 1976) elas podem exibir atividade biológica nos bioensaios, por serem hidrolizadas por enzimas da planta teste ou de microorganismos contaminantes (SPONSEL, 1983 in CROZIER, 1983).

Os resultados obtidos na análise de GAs endógenas de milho foram, então, interpretados com base em todos estes aspectos, descritos acima, que devem ser considerados numa análise deste tipo.

Antes do alongamento do eixo principal (fase 1) apenas giberelinas conjugadas e a GA₂₀ estavam presentes no eixo. A presença destas GAs numa fase onde não há alongamento está de acordo com as observações de PHINNEY (1984) de que estas GAs são inativas na promoção do alongamento do eixo.

Na fase pouco antes do início do alongamento, notou-se, na região basal, constituída pelos nós que estavam iniciando o alongamento, a presença de GA₁, GA₈ e uma giberelina não identificada com polaridade entre a da GA₄ e a da GA₂₀. A presença de GA₁ nesta região era esperada, já que esta GA é a única GA endógena ativa na promoção do alongamento (PHINNEY, 1984) do eixo de milho. A giberelina não iden-

tificada pode ser alguma das encontradas em milho por HEDDEN et al. (1982) já que as polaridades da GA_{44} , GA_{53} , GA_{19} , e GA_{17} , detectadas por eles, estão compreendidas entre as polaridades da GA_4 e da GA_{20} (CROZIER e DURLEY, 1983). A GA_{53} , GA_{44} e GA_{19} podem ser precursoras da GA_1 na "via da 13- β -hidroxilação precoce", como sugerido por PHINNEY (1984). Era, então, esperado que algumas ou todas estas giberelinas estivessem presentes nesta região do eixo que está iniciando o alongamento, já que elas constituem etapas necessárias da biossíntese da giberelina ativa (GA_1). A presença da GA_8 também pode ser esperada considerando-se que esta GA é proveniente do metabolismo da GA_1 (DAVIES e RAPPAPORT, 1975 a,b).

Na região apical das plantas, na mesma fase do desenvolvimento (fase 2), sugeriu-se a presença de GA_{20} . Esta, através de uma 3- β -hidroxilação, dá origem à GA_1 (ROOD et al., 1982). Esta etapa da biossíntese de GA_1 provavelmente ocorrerá mais tarde, quando esta região do eixo iniciar o alongamento.

Na fase do alongamento propriamente dito (fase 3) detectou-se GA_1 e GA_8 na inflorescência e região apical do eixo, regiões que estavam em ativo alongamento nesta fase do desenvolvimento. GAs conjugadas foram detectadas nas três regiões do eixo analisado (inflorescência, região apical e basal).

Levando-se em consideração o alto conteúdo de GAs encontrado na inflorescência e a presença de GAs conjugadas principalmente na região basal do eixo pode-se levantar a hipótese de que durante o alongamento, na inflorescência, as giberelinas seriam sintetizadas e/ou convertidas na

forma ativa, no caso GA_1 , e se deslocariam, sendo metabolizadas durante este deslocamento, para a região basal do eixo. Desta forma, talvez fosse criado um gradiente de atividade de giberelinas ao longo do eixo; gradiente este responsável pelo alongamento celular dos tecidos desta região bem como pela inibição da formação de novas gemas. Este gradiente de GAS no eixo poderia explicar também a iniciação floral basípeta notada no presente trabalho e por BONNETT (1953). Reforçando esta hipótese, KAUFMAN et al. (1976) mostraram que a inflorescência e região apical de aveia possuíam níveis de GAS maiores que a região basal e raízes.

Ainda neste aspecto, KUROGOCHI et al. (1979) detectaram altos níveis de GA_{19} na fase da iniciação floral e alongamento dos entrenós. Eles sugeriram que a GA_{19} estava envolvida na transição do estágio vegetativo para floral. Observaram também que a atividade da GA_{19} foi bem baixa no crescimento do arroz anão cv. Waito-C, no qual a conversão da GA_{19} em GA_1 é geneticamente bloqueada. Verificaram ainda, que GA_1 promoveu o alongamento do eixo deste cultivar. Concluíram, então, que a GA_{19} poderia agir como um "pool" de giberelinas. O nível da GAS ativas, que realmente regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, seria regulado pela taxa de biossíntese da GA_{19} e pela sua conversão metabólica.

A fim de se obterem mais evidências a respeito da identificação das giberelinas presentes na planta de milho, durante esta fase crítica do alongamento, analisaram-se as transformações sofridas pela 3H GA_{20} fornecida a estas plantas.

No extrato das folhas, o principal pico co-cromatografado com a $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$, I_5 , foi uma impureza que já estava presente na solução radioativa padrão. Entretanto, nas folhas a quantidade de I_5 em relação a de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi maior que a do padrão. Isto pode ter acontecido pelas seguintes razões:

a) $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi metabolizada, dando origem ao composto I_5 .

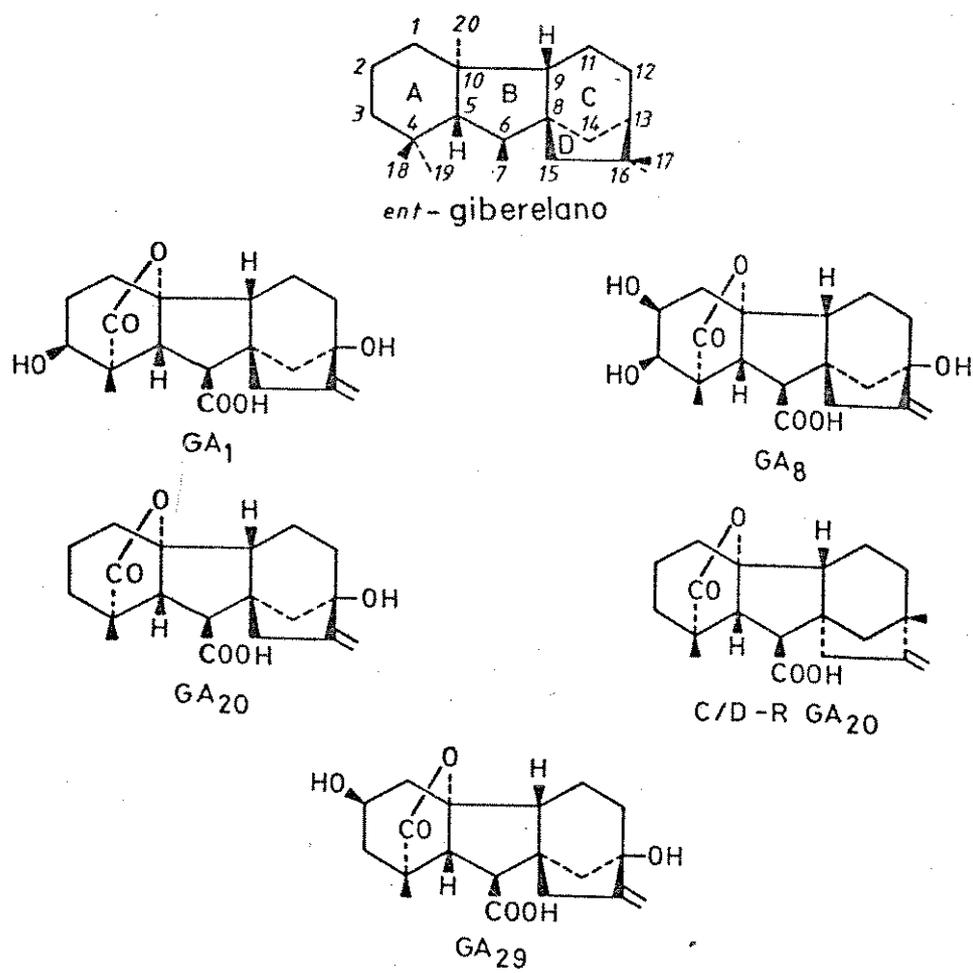
b) $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi quebrada durante a purificação do extrato, dando origem a I_5 . Esta hipótese não é muito provável já que $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ tem sido fornecida a diversas plantas, inclusive milho (ROOD et al., 1982) e não se tem observado quebra dando origem a I_5 .

c) Outra razão para a alta razão $\text{I}_5/\text{GA}_{20}$ no extrato das folhas, e talvez esta seja a explicação mais plausível, é que ela pode ter surgido pois a folha metabolizou a $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ mas não I_5 . Assim, o nível de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ diminuiu enquanto o de I_5 não foi alterado.

Além da própria $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$, da I_5 e outras impurezas menores presentes na solução de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ padrão, foram detectados sete picos de metabolitos. Apesar de alguns deles não terem sido identificados, os resultados indicaram que $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi convertida em $|^3\text{H}| \text{GA}_1$ (M_5), $|^3\text{H}| \text{GA}_8$ (M_1) e possivelmente em $|^3\text{H}| \text{GA}_{29}$ (M_2). As estruturas moleculares destas giberelinas, bem como do esqueleto básico, ent-gibberelano, são mostradas na figura 23, para facilitar o entendimento das interconversões sugeridas.

FIGURA 23. Estrutura molecular do esqueleto das giberelinas, ent-giberelano, e da GA₁, GA₈, GA₂₀ e C/D-R GA₂₀ e GA₂₉.

Figura 23



Os resultados aqui obtidos, concordam com os de ROOD et al. (1982) que, fornecendo $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ a plântulas de milho detectaram $|^3\text{H}| \text{GA}_1$ e $|^3\text{H}| \text{GA}_8$ como metabolitos.

A conversão de GA_{20} em GA_1 , por uma 3- β -hidroxilação, e em GA_{29} , por uma 2- β -hidroxilação, foi também sugerida por PHINNEY (1984).

ROOD et al. (1982) não encontraram $|^3\text{H}| \text{GA}_{29}$ como metabólito da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$. Apesar disto, eles comentam que como a $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ era marcada principalmente nas posições do C-2 e C-3, alguma perda poderia ter ocorrido durante a hidroxilação do C-2 e C-3, dando origem a GA_{24} e GA_1 respectivamente. Assim, tanto o nível de GA_1 como o de GA_{29} detectados, poderiam não ter sido exatamente os reais. No mesmo trabalho, ROOD et al. (1982) detectaram um outro "metabolito" que identificaram como $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ com os anéis C e D rearranjados (C/D-R- GA_{20}).

Com base nesta observação pode-se sugerir que o M_7 presente no extrato das folhas seja C/D-R- GA_{20} (fig. 23). Este composto se forma em condições acídicas (A. CROZIER, comunicação pessoal) podendo, então, ser considerado mais como produto de quebra da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ do que um metabólito.

ROOD et al. (1982) também encontraram $|^3\text{H}| \text{GAS}$ conjugadas nas plantas tratadas com $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$. Estas GAS não foram detectadas no presente trabalho. Isto pode ter ocorrido se elas ficaram retidas na fração aquosa, durante a extração, ou foram retiradas da coluna de Sephadex, pelo primeiro solvente, durante a cromatografia de troca iônica. De fato, quando se mediu a radioatividade presente neste primeiro solvente notou-se quantidade um pouco elevada.

Assim, possivelmente alguma conversão da $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ em $|^3\text{H}| \text{GAs}$ conjugadas (eteres e/ou esterres glicosídeos) pode ter ocorrido.

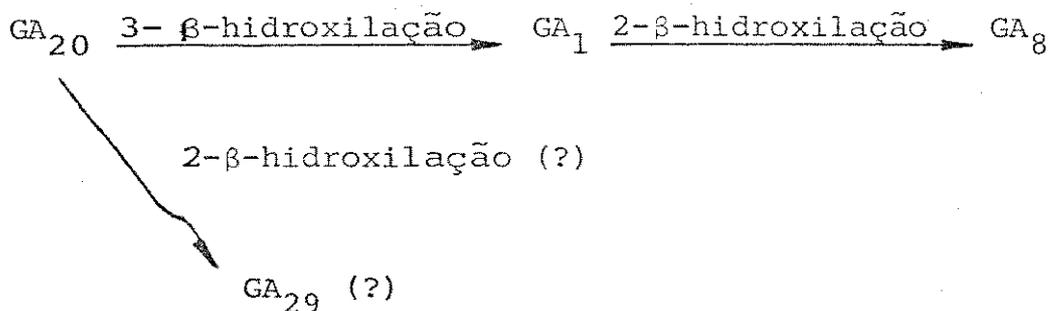
No extrato do eixo principal notou-se a presença de $|^3\text{H}| \text{GA}_1$ e $|^3\text{H}| \text{GA}_8$, além da própria $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ e impurezas. Estes metabolitos encontrados no eixo, poderiam ter sido formados nas folhas e transportados para o eixo, ou a $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ poderia ter sido transportada para o eixo, onde foi convertida em $|^3\text{H}| \text{GA}_1$ e $|^3\text{H}| \text{GA}_8$. Os resultados obtidos não permitiram distinguir entre estas duas possibilidades.

Três metabolitos, diferentes dos presentes nas folhas, foram também detectados no eixo, mas não puderam ser identificados.

No extrato das raízes observou-se apenas acúmulo de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ e como metabolitos não foram detectados sugere-se que esta região da planta não é ativa no metabolismo de GAs.

Como $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi aplicada na região apical do eixo, a presença dela nas raízes sugere que houve transporte de GAs do eixo para as raízes.

A identificação das GAs encontradas no eixo principal de milho, quando se analisaram as giberelinas endógenas do mesmo, foi confirmada pelos resultados obtidos na análise do metabolismo de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$. Baseando-se nos resultados destas análises e no trabalho de PHINNEY (1984) pode-se resumir as seguintes conversões de GAs em milho:



No entanto, a via biossintética real de GAs parece ser mais complexa do que a acima descrita, já que metabolitos desconhecidos foram também detectados. O transporte das GAs também deve ser melhor considerado. Os resultados mostraram o acúmulo de $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ nas raízes. GA_1 e GA_8 foram encontrados tanto no eixo como nas folhas, não sendo possível estabelecer se a $|^3\text{H}| \text{GA}_{20}$ foi transportada para as duas regiões e aí metabolizada ou se foi metabolizada nas folhas dando origem a GA_1 e a GA_8 que foram transportadas para o eixo.

V - R E S U M O

O desenvolvimento vegetativo e reprodutivo das gemas laterais de milho, *Zea mays* L., foi analisado neste trabalho.

Constatou-se forte dominância apical durante o período de crescimento vegetativo das plantas e foi sugerido que giberelinas podem estar envolvidas neste processo.

Nutrientes minerais não afetaram diretamente o desenvolvimento das gemas laterais de milho.

Um relacionamento temporal entre o alongamento do eixo principal, iniciação floral e parada de formação de folhas e gemas foi observado.

Este relacionamento pareceu ser também fisiológico, já que condições de dias curtos promoveram conjuntamente os três eventos e dias longos ou noites longas interrompidas prolongaram o crescimento vegetativo das plantas.

O papel das citocininas na interrelação destes fenômenos não ficou esclarecido.

Os efeitos dos tratamentos com ácido giberélico e com os inibidores de biossíntese de giberelinas sugeriram que este grupo de hormônios poderia ser importante no relacionamento do alongamento do eixo, iniciação floral e parada de formação de gemas.

Análises das giberelinas endógenas indicaram que elas estavam presentes em maior quantidade durante o

alongamento e iniciação floral. A inflorescência e região apical do eixo foram as regiões onde se detectaram os níveis mais altos destes hormônios. Sugeriu-se a presença de GA₂₀ e GAs conjugadas na fase anterior ao alongamento do eixo. Na fase do alongamento e iniciação floral pareceu que GA₂₀, GA₁, GA₈ e GAs conjugadas estavam presentes. Uma giberelina com polaridade compreendida entre a da GA₄ e a da GA₂₀ também foi notada nesta fase. Sugeriu-se que ela poderia ser tanto GA₅₃ como GA₄₄ ou GA₁₉, todas precursoras da GA₁ que é a giberelina ativa no alongamento do eixo de milho. Levantou-se a hipótese que durante o alongamento e iniciação floral, um gradiente decrescente de atividade de giberelinas seria criado ao longo do eixo principal, sendo as giberelinas mais ativas localizadas junto à inflorescência.

Analisando o metabolismo da ^3H GA₂₀, fornecida às plantas no início do alongamento, notou-se que ela foi convertida em GA₁ e possivelmente em GA₂₉. A GA₁ por sua vez, foi convertida em GA₈. Além da ^3H GA₂₀ com os anéis C e D da molécula rearranjados, notou-se também, a presença de metabólitos desconhecidos, sugerindo-se que a via biossintética real das giberelinas é mais complexa que a acima descrita. Metabólitos da ^3H GA₂₀ foram encontrados tanto nas folhas como no eixo principal, não sendo possível distinguir se uma ou ambas as regiões são ativas no metabolismo.

Houve transporte de giberelinas da parte aérea para as raízes, já que pequeno acúmulo de ^3H GA₂₀, fornecido pela região apical, foi detectado nas raízes.

A B R E V I A T U R A S

- ABA - ácido abscísico
- 6-BA - 6-Benziladenina
- CCC - cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio
- C/D-R-GA₂₀ - GA₂₀ com os anéis C e D da molécula rearranjados
- C₁₉-GAs - giberelinas com dezenove átomos de carbono
- C₂₀-GAs - giberelinas com vinte átomos de carbono
- DC - dias curtos - 8 h de luz
- DL - dias longos - 18 h de luz
- dpm - desintegrações por minuto (kdpm = 1.000 dpm)
- Fn - folha - o índice que acompanha indica a posição da folha no eixo principal. As folhas foram numeradas acropetamente
- GAs - giberelinas
- ³H |GA| - giberelina tritiada
- GA₃ - ácido giberélico
- HPLC - "high performance liquid chromatography" - cromatografia líquida de alto desempenho
- LAB - 5,4,5-(4-clorofenil)-3,4,5,9,10 - pentaazatetraciclo 5,4,10^{2,6},0^{8,11} dodeca-3,9-dieno (Tetacyclacis ou LAB 10 2883)
- ng eq. GA₃ - nanogramas equivalentes a GA₃
- NI - noite longa interrompida - 8 h de luz com choque de luz branca no meio da noite
- Pn - perfilho (gema lateral) - o índice que acompanha indica a posição da gema no eixo principal. As gemas foram numeradas acropetamente

VII - B I B L I O G R A F I A

- ABELES, F. B. 1967. Inhibition of flowering in *Xanthium pensylvanicum* Walln. by ethylene. *Plant Physiol.*, 42: 608-609 .
- ALDRICH, S .R.; SCOTT, W.O. and LENG, E.R. 1975. How the corn plant grows. In: *Modern Corn Production*. A. and L. Publ . Illinois.
- BARNES, M. F.; LIGHT, E.N. and LANG, A. 1969. The action of plant growth retardants on terpenoid biosynthesis . *Planta*, 88: 172-182.
- BERNIER, G .; KINET, J.M. and SACHS, R.M. 1981. *The physiology of flowering*. vol. 1 and 2. CRC Press, Florida.
- BEARDER, J.R. 1983. "In vivo" diterpenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: The pathway after ent-kaurene. In: *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*. vol. 1. A. CROZIER. Praeger, USA. pp. 251-388.
- BONNETT, O.T. 1953. Developmental morphology of the vegetative and floral shoots of maize. *Bull.* 568. Univ. of Illinois.
- CHAILAKYAN, M. Kh. 1979. Genetic and hormonal regulation of growth, flowering and sex expression in plants. *Amer. J. Bot.* , 66: 717-737.

- CHAILAKYAN, M. Kh. and LOZHNIKOVA, V.N. 1966. Effect of interruption of darkness by light on plant gibberellins. *Sov. Plant Physiol.*, 13: 833-841.
- CLELAND, C-F. and ZEEVAART, J.A.D. 1970. Gibberellins in relation to flowering and stem elongation in the long-day plant *Silene armeria*. *Plant Physiol.*, 46: 392-400.
- CLIFFORD, F.E, and LANCER, R.H.M. 1975. Pattern and control of distribution of ^{14}C - assimilates in reproductive plants of *Lolium multiflorum* Lam. var. *Westerwoldicum*. *Ann.Bot.* 39: 403-411.
- COOLBAUGH, R.C. 1983. Early stages of gibberellins biosynthesis. In: The Biochemistry and Physiology of Gibberellins. vol. 1. A. CROZIER. Praeger, USA. pp. 53-98.
- COOLBAUGH, R.C. and MOORE, T.C. 1971. Metabolism of kaurene in cell-free extracts of immature pea seeds. *Phytochem.* 10: 2401-2412.
- CROZIER, A. and DURLEY, R.C. 1983. Modern methods of analysis of gibberellins. In: The Biochemistry and Physiology of Gibberellins. vol. 1. A. CROZIER. Praeger, USA. pp. 485-560.
- CROZIER, A. and REID, D.M. 1971. Do roots synthesize gibberellins? *Can. J. Bot.*, 49: 967-975.
- CROZIER, A.; KUO, C.C.; DURLEY, R.C. and PHARIS, R.P. 1970. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. *Can. J. Biol.*, 48: 867-877.

- DATHE, W.; SCHNEIDER, G. and SEMBDNER, G. 1978. Endogenous gibberellins and inhibitors in caryopses of rye. *Phytochem.*, 17: 963-968.
- DAVIES, L.J. and RAPPAPORT, L. 1975a. Metabolism of tritiated gibberellins in d-5 dwarf maize. I. In excised tissues and intact dwarf and normal plants. *Plant Physiol.*, 55: 620-625.
- DAVIES, L.J. and RAPPAPORT, L. 1975b. Metabolism of tritiated gibberellins in d-5 dwarf maize. II. ^3H gibberellin A_1 , ^3H gibberellin A_3 and related compounds. *Plant Physiol.*, 56: 60-66.
- DOUGLAS, T. J. and PALEG, L.G. 1974. Plant growth retardants as inhibitors of sterol biosynthesis. *Plant Physiol.*, 54: 238-245.
- DUNCAN, W.G. 1978. Maize. *In Crop Physiology*. L.T. EVANS ed. Univ. Press, Cambridge. pp. 23-50.
- EL-ANTABLY H.M.M.; WAREING, P.F. and HILLMAN, J. 1968. Some physiological responses to D,L-abscisic acid (dormin.). *Planta*, 73: 74-90.
- EVANS, L.T. 1978. Crops and world food supply, crop evolution and the origins of crop physiology. *In: Crop Physiology*. L.T. EVANS. University Press, Cambridge. pp. 1-22.
- FERRI, M.G.; MENEZES, N.L. e SCANAVACCA, W.R.M. 1978. *Glossário I Zustrado de Botânica*. EDUSP, São Paulo.
- FRANKLAND, B. and WAREING, P.F. 1960. Effect of GA on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature*, 185: 255-256.

- GASKIN, P.; GILMOUR, S.J.; LENTON, J.R.; MACMILLAN, J. and SPONSEL, V.M. 1982. Endogenous gibberellins and related compounds in developing grain and germinating seedlings of barley. *Abstract for the 11th International Conference on Plant Growth Substances.* p. 50.
- GOODWIN, P.B. 1978. Phytohormones and growth and development of organs of the vegetative plant. *In: Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise.* vol. 2. D.S. LEITHAM; P.B. GOODWIN and T.J.V. HIGGINS. Elsevier / North-Holland, Amsterdam. pp. 31-174.
- HARADA, J. and VERGARA, B.S. 1972. Growth pattern of tall and short lines of rice and their response to gibberellin. *Ann. Bot.*, 36: 571-577.
- HARRISON, M.A. and KAUFMAN, P.B. 1980. Hormonal regulation of lateral bud (tiller) release in oats (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol.*, 66: 1123-1127.
- HEDDEN, P. 1983. "In vitro" metabolism of gibberellins. *In: The Biochemistry and Physiology of Gibberellins.* vol.1. A. CROZIER ed. Praeger, USA. pp. 99-149.
- HEDDEN, P.; MACMILLAN, J. and PHINNEY, B.O. 1978. The metabolism of the gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29: 149-192.
- HEDDEN, P.; PHINNEY, B.O.; HEUPEL, R.; FUJII, D.; COHEN, H.; GASKIN, P.; MACMILLAN, J. and GRAEBE, J.E. 1982. Hormones of young tassels of *Zea mays* L. *Phytochem.*, 21 : 391-394.

- HESKETH, J .D.; CHASE, S.S. and NANDA, D.K. 1969. Environmental and genetic modification of leaf numbers in maize, sorghum, and hungarian millet. *Crop Sci.*, 9: 460-463.
- HESLOP - HARRISON, J. 1960. Suppressive effect of 2-thiouracil on differentiation and flowering in *Cannabis sativa*. *Science*, 132: 1934-1944.
- HESLOP-HARRISON, J. 1961. The experimental control of sexuality and inflorescence structure in *Zea mays* L. *Proc. Linn. Soc. Lond.*, 172: 108-123.
- HILLMAN, J .R.; MATH, V.B. and MEDLON, G.C. 1977. Apical dominance and the levels of indole acetic acid in *Phaseolus* lateral buds. *Planta*, 134: 191-193.
- HIRAGA, K. ; YAMANE, H. and TAKAHASHI, N. 1974. Biological activity of some synthetic gibberellin glucosyl esters . *Phytochem.*, 13: 2371-2376.
- HOAGLAND, D.R. and ARNON, D.I. 1938. The water-culture method for growing plant without soil. *Univ. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 347.
- ISBELL, V. R. and MORGAN, P.W. 1982. Manipulation of apical dominance in *Sorghum* with growth regulators. *Crop Sci.*, 22: 30-35.
- JEWISS, O. R. 1972. Tillering in grasses - its significance and control. *J. Br. Grassld. Soc.*, 27: 65-497.
- JOHNSTON, G. F.S. and JEFFCOAT, B. 1977. Effects of some growth regulators on tiller bud elongation in cereals . *New Phytol.*, 79: 239-245.

- JONES, R.L. - and VARNER, J.E. 1967. The bioassay of gibberellins - *Planta*, 72: 155-161.
- KAUFMAN, P - B.; GHOSHEH, N.S.; NAKOSTEEN, L.; PHARIS, R.P.; DURLEY, R.C. and MORF, W. 1976. Analysis of native gibberellins in the internode, nodes, leaves and inflorescence of developing *Avena* plants. *Plant Physiol.*, 58: 131-145.
- KING, R.W. - EVANS, L.T. and FIRN, R.D. 1977. Abscisic acid and xanthoxin contents in the long-day plant *Lolium temulentum* L. in relation to day length. *Aust. J. Plant Physiol.*, 4: 217-223.
- KUROGOCHI, S.; MUROFUSHI, N.; OTA, Y. and TAKAHASHI, N. 1979. Identification of gibberellins in the rice plant and quantitative changes of gibberellin A₁₉ through its life cycle. *Planta*, 146: 185-191.
- LANG, A. 1965. Physiology of flower initiation. In: Differentiation and Development. Encyclopedia of Plant Physiology - vol. 15/1. RUHLAND, W. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1380-1536.
- LANGER, R.H.M. 1972. *How Grasses Grow.* Studies in Biology. n^o 34. Edward Arnold, London.
- LANGER, R.H.M.; PRASAD, P.C. and LAUDE, H.M. 1973. Effects of kinetin on tiller but elongation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann. Bot.*, 37: 565-571.
- LEOPOLD, A.C. 1946. The control of tillering in grasses by auxin. *Am. J. Bot.*, 36: 437-440.

- METIVIER, J.R. 1979. The effect of time of nitrate application upon the growth of barley cultivars of differing endogenous nitrogen levels: longer term experiments. *Ann. Bot.*, 43: 753-764.
- MORGAN, P.W.; MILLER, F.R. and QUIMBY, J.R. 1977. Manipulation of sorghum growth and development with gibberellic acid. *Agron. J.*, 69: 789-793.
- MURAKAMI, Y. 1968. A new rice seedling bioassay for gibberellins, "Microdrop method", and its use for testing extracts of rice and morning glory. *Bot. Mag.*, 83: 33-43.
- NANDA, K.K.; ANARADHA, T.A. and LAL, K. 1967. Floral induction by gibberellic acid in *Impatiens balsamina* L., a qualitative short-day plant. *Planta*, 76: 367-370.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-380.
- NICKERSON, N.H. 1959. Sustained treatment with gibberellic acid of five different kinds of maize. *Ann. Mo. Bot. Gdn.*, 46: 19-37.
- PHILLIPS, I.D.J. 1971. *Introduction to the Biochemistry and Physiology of Plant Growth Hormones*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- PHINNEY, B.O. 1956. Growth response of single gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 42: 185-189.

- PHINNEY, B. O. 1984. Gibberellin A₁, dwarfism and the control of shoot elongation in higher plants. In: The Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones. A. CROZIER and J.R. HILLMAN. Society for Experimental Biology. Seminar Series. no 9. Cambridge University Press, London. pp. 17-41.
- RADEMACHER, W. and JUNG, J. 1981. Comparative potency of various synthetic plant growth retardants on the elongation of rice seedlings. *Z. Acker-und Pflanzenbau*, 150: 363-371.
- RADEMACHER, W.; JUNG, J.; HILDEBRANDT, E. and GRAEBE, J.E. 1983. Influence of the bioregulator tetcyclacis (BAS.. W) on gibberellin biosynthesis and the hormonal status of plants. *Proc. of the tenth Ann. Meeting of Plant Growth Society of America*.
- RASUMOV, V.I. 1960. Hastening of flowering in short-day plants by gibberellin treatment. *Fiziol. Rast.* 7: 354-357.
- REEVE, D.R. and CROZIER, A. 1977. Radioactivity monitor for high performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 137: 271-281.
- REID, D.M. and CROZIER, A. 1970. CCC- induced increase of gibberellin levels in pea seedlings. *Planta*, 94: 95-106.
- REID, D.M. and CARR, D.J. 1967. Effects of a dwarfing compound, CCC, on the production and export of gibberellin-like substances by root systems. *Planta*, 73: 1-11.
- ROCHA, R. 1978. Growth substances and tiller development in barley. Ph.D. Thesis. University of Edinburgh.

- ROOD, S.B.; MASAJI, K.; DOUGLAS, T.J. and PHARIS, R.P. 1982. Metabolism of tritiated gibberellin A₂₀ in maize. *Plant Physiol.*, 70: 1614-1618.
- SEMBDNER, G.; BORGMANN, E.; SCHNEIDER, G.; LIEBISCH, H.-W.; MIERSCH, O.; ADAM, G.; LISCHEWSKI, M. and SCHREIBER, K. 1976. Biological activity of some conjugated gibberellins. *Planta*, 132: 249-257.
- SHARIF, R.R. and DALE, J.E. 1979. The growth of tiller buds and the distribution of radioactivity in barley seedlings treated with ¹⁴C- labelled benzylaminopurine. *Revta. Brasil. Bot.*, 2: 129-132.
- SHARIF, R.R. and DALE, J.E. 1980. Growth-regulating substances and the growth of tiller buds in barley: effects of cytokinins. *J. Exp. Bot.*, 31: 921-930.
- SIEMER, E.G.; LENG, E.R. and BONNETT, O.T. 1969. Timing and correlation of major developmental events in maize, *Zea mays* L. *Agron. J.*, 61: 14-17.
- SNEDECOR, G.W. 1962. *Statistical Methods*. The Iowa State Univ. Press, USA.
- SPONSEL, V.M. 1983. "In vivo" gibberellin metabolism in higher plants. In: The Biochemistry and Physiology of Gibberellins. vol. 1. A. CROZIER ed. Praeger, USA. pp. 151-250.
- STACCIARINI, E. 1984. Estudo do Perfilhamento em *Sorghum vulgare* (Pers.). Tese de Mestrado. Instituto de Biologia. UNICAMP. Campinas, S.P.
- VINCE-PRUE, D. 1975. *Photoperiodism in Plants*. McGraw - Hill Book Company, England.

- WAREING, P.F. and PHILLIPS, I.D.J. 1981. *Growth and Differentiation in Plants*. Pergamon Press. Oxford.
- WEST, C.A. 1973. Biosynthesis of gibberellins. In: *Biosynthesis and Its Control in Plants*. B.V. MILBORROW. Academic Press, London. pp. 473-482.
- WUNSCHÉ, U. 1973. Influence of growth retarding substances on cereals. II. Effects of temperature and light intensity on the influence of CCC on tillering on barley and spring wheat. *Z. Acker- und Pflanzenbau*, 138: 129-136.
- WURTELE, E.S.; HEDDEN, P. and PHINNEY, B.O. 1982. "In vitro" metabolism of the gibberellin-precursors ent-kaurenol and ent-kaurenal in normal maize seedling shoots. *J. Plant Growth Regulation*, 1: 15-24.
- ZEEVAART, J.A.D. 1976. Physiology of flower formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 27: 321-348.
- ZEEVAART, J.A.D. 1978. Phytohormones and flower formation. In: *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*. vol. 2. D.S. LETHAM, P.B. GOODWIN and T.J.V. HIGGINS. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp. 291-327.
- ZEEVAART, J.A.D. 1983. Gibberellins and flowering. In: *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*. vol.2. A. CROZIER ed. Praeger, USA. pp. 333-374.