

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	AL64c
V. E.	
TOMBO B.	30941
PREC.	28/197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECIO	R\$11,00
DATA	02/07/97
N.º CPO	

CM-00098888-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Almeida, Julieta Andréa Silva de

AL64c Caracterização e brotação do órgão subterrâneo de *Kohleria sp*
Julieta Andréa Silva de Almeida. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.
158f: ilus.

Orientadora: Maria de Fátima Domingos Aleixo Pereira
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

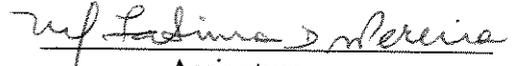
1. Fisiologia vegetal. 2. Etileno. 3. Ácido abscísico.
4. Biologia do desenvolvimento. 5. Morfogenese. 6. Crescimento.
I.Pereira, Maria de Fátima Domingos Aleixo. II. Universidade
Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 9 de maio de 1997

Banca examinadora:

Titulares:

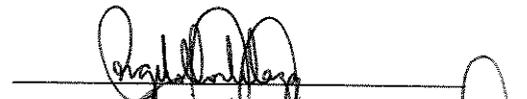
Profª. Dra. Maria de Fátima Domingos Aleixo Pereira


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro


Assinatura

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortellazo


Assinatura

Prof. Dr. Ivany Ferraz Marques Válio


Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek


Assinatura

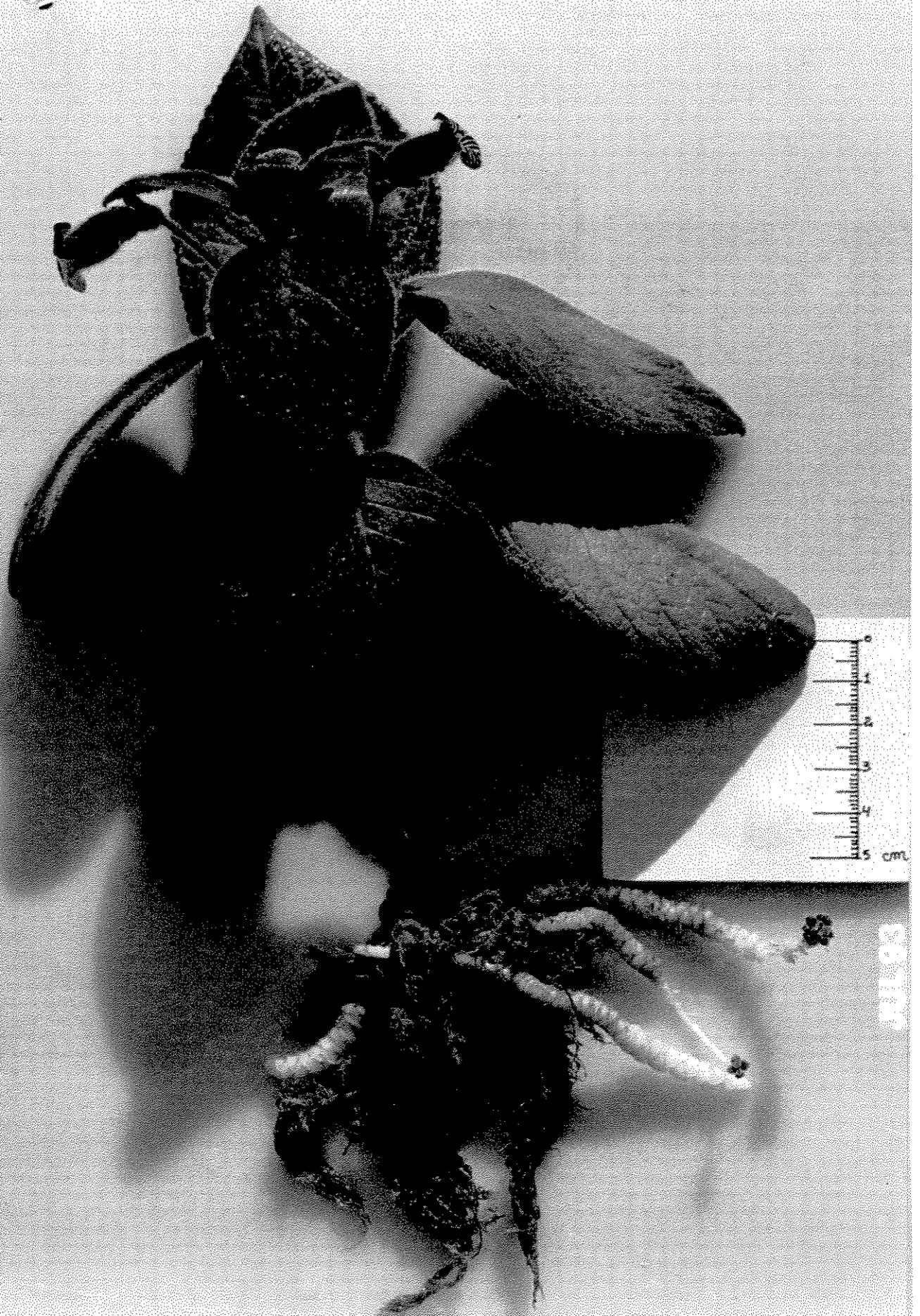
Suplentes:

Profª. Dra. Marlene Schiavinatto

Assinatura

Prof. Dr. Jorge Vega

Assinatura



*A cada minuto que passa você fica diferente,
e após quatro ou cinco anos...*

*À memória de meu pai, Hugo.
À minha querida mãe, Lecy.
Aos meus irmãos Carlos, Fábio, Thoba e Hilda
+ Rommel, Marta, Antie, Isabela e Isadora*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria de Fátima D.A. Pereira, pela orientação, ensinamentos e amizade.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior), pela bolsa concedida.

Ao Prof. Ladasval Sodek, pela atenção dada quando precisei durante a condução deste estudo.

Aos Professores Marlene Schiavinatto, Ivany F. M. Válio e Ladasval Sodek pelas correções e sugestões feitas na fase de pré-banca.

Aos Professores João Semir e Alain Chautems, do Depto. de Botânica, pela preciosa atenção na identificação da planta deste estudo.

Aos Professores Maria das Graças Sajo e Antonio Carlos Gabrielli, pela colaboração com a realização do estudo de anatomia.

À Profa. Consetta Kascheres, do Instituto de Química da UNICAMP, pelo uso do espectrômetro de massas e sugestões feitas para análise do ácido abscísico.

Ao Prof. Paulo Mazzafera, pela realização da análise preliminar das substâncias fenólicas e sugestões dadas.

Ao Marco Aurélio Boselli, pela colaboração com alguns cálculos matemáticos.

À todos os funcionários, do Depto. de Fisiologia Vegetal, pela atenção dada quando precisei.

À todos os Professores, do Depto. de Fisiologia Vegetal, que me acompanharam direta ou indiretamente e contribuíram com o meu aprendizado.

À todos os alunos do Depto. de Fisiologia Vegetal, pelos momentos compartilhados e muitos ensinamentos proporcionados por cada um com sua maneira especial de ser.

À Leda, Célio e Vanessa, que de longe, muito contribuíram com minha pessoa.

Ao Rommel, por tudo, pelo sempre bom humor em todos os momentos e carinho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
MATERIAL.....	22
MÉTODOS.....	22
CULTIVO.....	22
1.0 - Caracterização do órgão subterrâneo.....	23
1.1 - Caracterização anatômica do órgão subterrâneo.....	23
1.2 - Caracterização histoquímica das células do rizoma.....	23
1.3 - Caracterização das reservas do rizoma.....	24
1.4 - Caracterização preliminar das substâncias fenólicas.....	26
2.0 - Estudo do processo de brotação das secções do rizoma.....	26
2.1 - Brotação.....	26
2.2 - Número de folhas modificada por secção do rizoma.....	27
2.3 - Tratamento de luz e temperatura.....	27
2.4 - Teor de hidratação do substrato.....	29
3.0 - Caracterização das brotações desenvolvidas pelas secções do rizoma.....	30
3.1 - Tratamento de luz e temperatura.....	30
3.2 - Tratamento fotoperiódico.....	30
4.0 - Tratamento com PEG.....	31
5.0 - Dosagem de prolina das secções do rizoma.....	32
6.0 - Tratamento com ETREL.....	34
7.0 - Tratamento com ABA.....	34
8.0 - Tratamentos com auxina e 6BA.....	34
9.0 - Tratamento com ACC.....	35
10.0 - Tratamento com AgNO ₃	35

11.0 - Tratamento com AVG.....	36
12.0 - Dosagem de etileno.....	36
13.0 - Dosagem de ACC.....	38
14.0 - Caracterização anatômica do ápice modificado das brotações das secções do rizoma.....	39
15.0 - Extração de ABA das secções do rizoma.....	40
16.0 - Purificação da fração ácida dos extratos das secções.....	40
17.0 - Bioteste da germinação de semente de alface.....	41
18.0 - Caracterização de ABA por GC/MS.....	42
19.0 - Análise estatística.....	43
RESULTADOS.....	44
1.0 - Caracterização do órgão subterrâneo.....	44
1.1 - Caracterização anatômica do órgão subterrâneo.....	44
1.2 - Caracterização histoquímica das células do rizoma.....	44
1.3 - Caracterização das reservas do rizoma.....	47
1.4 - Caracterização preliminar de substâncias fenólicas.....	49
2.0 - Reprodução vegetativa das plantas de <i>Kohleria</i> sp.....	49
3.0 - Estudo do processo de brotação das secções do rizoma.....	51
3.1 - Efeito do número de folhas modificadas por secção.....	51
3.2 - Efeito de fatores do ambiente na brotação das secções do rizoma.....	54
3.2.1 - Efeito de luz e temperatura.....	54
3.2.2 - Efeito do teor de hidratação do substrato.....	60
4.0 - Efeito de substâncias reguladoras de crescimento no número de brotações por secção do rizoma.....	63
5.0 - Caracterização das brotações desenvolvidas pelas secções do rizoma.....	65
5.1 - Efeito de temperatura e luz.....	65
5.2 - Efeito do fotoperíodo.....	65
6.0 - Estudo do padrão de brotação das secções do rizoma.....	67
6.1 - Efeito de fatores do ambiente no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma.....	70
7.0 - Envolvimento das substâncias de crescimento com o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma pelas secções do rizoma.....	87

7.1 - Efeito de ETREL na brotação do padrão rizoma.....	87
7.2 - Efeito de nitrato de prata no desenvolvimento de brotações do padrão rizoma.....	89
7.3 - Efeito de auxina e 6BA na brotação do padrão rizoma.....	92
7.4 - Efeito de ACC na brotação do padrão rizoma.....	92
7.5 - Efeito de AVG na brotação do padrão rizoma.....	95
7.6 - Efeito de PEG + AgNO ₃ na brotação do padrão rizoma.....	95
7.7 - Efeito de ABA na brotação do padrão rizoma.....	98
8.0 - Dosagem de etileno.....	98
9.0 - Dosagem de ACC das secções do rizoma.....	101
10.0 - Estudo preliminar anatômico do ápice modificado da brotação da secção do rizoma.....	101
11.0 - Determinação de ácido abscísico endógeno das secções do rizoma.....	104
11.1 - Bioensaio da germinação de semente de alface.....	104
11.2 - Caracterização de ABA das frações ácidas de extratos das secções do rizoma por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC/MS).....	106
DISCUSSÃO.....	110
CONCLUSÕES.....	134
LITERATURA CITADA.....	137

ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

ACC: Ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico

AgNO₃: Nitrato de prata

AIA: Ácido indol 3 acético

AVG: Aminoetoxivinilglixina

ETEFON: Ácido 2-cloroetilfosfônico

ETREL: Ácido 2-cloroetilfosfônico

FAA: Formol, álcool etílico e ácido acético

GC/MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

HCL: Ácido clorídrico

HgCl₂: Cloreto de mercúrio

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

M.C.W.: Metanol, clorofórmio e água

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NaOCl: Hipoclorito de sódio

NH₄OH: Hidróxido de amônio

PEG: Polietilenoglicol

6BA: 6 benziladenina

RESUMO

Plantas de *Kohleria* sp pertencem à família Gesneriaceae e estão distribuídas desde o sul do México ao Peru e leste do Suriname. O seu centro de diversidade são as montanhas da Colômbia. Algumas espécies de *Kohleria* possuem órgão subterrâneo, que está associado à sua sobrevivência em estação de seca. O objetivo deste estudo foi o de caracterizar o órgão subterrâneo de *Kohleria* sp em relação à sua anatomia e ao seu processo de brotação. Tentou-se ainda identificar alguns aspectos do controle ambiental e hormonal da brotação destes órgãos subterrâneos.

O órgão subterrâneo de *Kohleria* sp possui natureza caulinar, cujos tecidos do caule apresentam esclerênquima, que lhe conferem rigidez. O caule está envolto por folhas modificadas, que protegem suas gemas. As folhas modificadas possuem epiderme com abundância de tricomas, são vascularizadas e ainda apresentam grande quantidade de reserva, principalmente de amido. O órgão subterrâneo também possui substâncias fenólicas que podem estar associadas à sua defesa contra microorganismos da terra.

A formação do rizoma nas plantas de *Kohleria* sp foi indiferente ao fotoperíodo. No entanto, as plantas que ficaram em condição de dia curto tiveram promoção do crescimento da altura e área foliar em relação àquelas que ficaram em dia longo.

Devido à abundância de gemas, o rizoma de *Kohleria* sp possui alto grau de regeneração o que é realizado através de sua brotação.

Secções do rizoma brotaram tanto na luz quanto no escuro. Por outro lado, o fator temperatura teve influência destacada na brotação das secções. Quando as secções estavam nas temperaturas mais altas o processo foi mais rápido e aquelas nas mais baixas brotaram lentamente. Secções do rizoma foram capazes de brotar em substrato com disponibilidade reduzida de água ou em sua ausência e ainda desenvolveram plenamente suas brotações nestas condições. Entretanto, quando estavam em excesso de água as secções apodreceram, mostrando-se intolerantes ao teor alto de umidade.

Nas secções do rizoma, utilizadas neste estudo, em geral, apenas uma gema brotou as demais permaneciam dormentes. Esta resposta mostrou que o rizoma de *Kohleria* sp possui forte relação de dominância apical. No entanto, quando foram tratadas com 6-benziladenina ou etrel tiveram número maior de brotação por secção.

As gemas das secções do rizoma de *Kohleria* sp apresentaram alto grau de plasticidade, já que poderiam se desenvolver em brotação do padrão rizoma ou o tipo parte aérea. O desenvolvimento de um dos tipos de brotação foi influenciada pelos fatores do ambiente e substâncias reguladoras de crescimento. Brotações do padrão parte aérea se desenvolveram em secções que ficaram em substrato com disponibilidade alta de água e em temperatura de 30°C. As brotações do padrão rizoma ocorreram nas secções que ficaram com disponibilidade reduzida de água ou em sua ausência, tanto em 20°C quanto em 30°C. Brotações do padrão rizoma também se desenvolveram em secções que ficaram em substratos com soluções de PEG, que geraram os potenciais de -3, -6 e -12 MPa. Isto demonstrou que a ocorrência de brotações do padrão rizoma nas secções do rizoma, em substrato com disponibilidade reduzida de água, poderia estar associada à condição de potencial hídrico baixo.

As secções do rizoma de *Kohleria* sp foram bastante resistentes à redução de água, mostrando que possuem mecanismos internos que facilitam a sua sobrevivência nestas condições.

Verificou-se que etileno estava envolvido com o controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma quando as secções do rizoma ficaram com disponibilidade reduzida de água no substrato. Isto foi obtido indiretamente através do tratamento das secções com ETREL, AgNO₃ e AVG, e diretamente pela dosagem de etileno liberado por estas quando estavam em disponibilidade reduzida de água no substrato.

Foi verificado também o envolvimento de ABA com o controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma. Esta evidência foi obtida indiretamente pelo tratamento das secções com ABA e diretamente pela identificação de atividade inibidora através do bioensaio da germinação de sementes de alface. E finalmente pela análise de frações ácidas de extratos das secções do rizoma por espectrometria de massas. Dos resultados obtidos, deste estudo, de que as brotações do padrão rizoma se desenvolveram em secções do rizoma com disponibilidade reduzida de água no substrato, e que etileno e ABA participam do controle do desenvolvimento deste tipo de brotação.

SUMMARY

Plants of *Kohleria* sp belong to the Gesneriaceae family and distributed from southern Mexico to Peru and east of Suriname. The center of diversity is in the Colombian highlands. Some species of *Kohleria* produce subterranean organs which allow the plants to survive under unfavorable dry seasons. The objective of this study was to characterize the subterranean organ of *Kohleria* sp about its anatomy and sprouting. The identification of some aspects of hormonal and environmental control of sprouting of these subterranean organs was studied.

The anatomy of the subterranean organ of *Kohleria* sp evidence that it is a typical stem, whose tissue shows sclerenchyma. The stem is enclosed by modified leaves which protect their buds. The modified leaves have trichomes, are vascularized and present great amount of starch. The phenolic substances were present in the subterranean organ and they can have a role of protection against soil microorganisms.

Rhizome initiation in the plants of *Kohleria* sp was not dependent of photoperiod. Nevertheless, under short days stem elongation and leaf area were promoted.

The rhizome of *Kohleria* sp shows a very high degree of regeneration because it presents abundance of buds. This regeneration is expressed by the sprouting of buds. The sprouting of rhizome sections was not affected by the presence of light, but it was affected by temperature. High temperatures promoted the sprouting of rhizome sections. In a substract with reduction of water content the rhizome sections sprouted resulting in the development of a new organism. However, in a substract with excess of water the rhizome sections did not survive, showing to be intolerant to highly moistened substracts.

Generally, only a bud sprouted by each rhizome section. The others remained dormant. This shows that the rhizome of *Kohleria* sp presents a strong apical dominance. Nevertheless, when 6-benzyladenin or ETHREL were applied to the rhizome sections most of the buds sprouted in the same section.

The buds of rhizome sections of *Kohleria* sp presented high degree of plasticity, they could develop a rhizome pattern or an aerial part parttern. The environmental factors and growth regulators can influence the occurrence of one of these patterns. In the presence of substract with high water level and temperature of 30° C the rhizome sections developed an aerial part pattern. But in the presence of reduced water level, under the temperatures of 20 or

30°C the rhizome sections developed a rhizome pattern. The bud of the rhizome sections developed a rhizome pattern when they were in the presence of PEG solutions (-3, -6, -12MPa). This suggests that the occurrence of the rhizome pattern when the substrate was with reduced water level could be related to the low water potential.

The rhizome sections presented very high resistance to drought. Because of this characteristic it is possible to presume the existence of internal mechanisms which allow its survival under very dry conditions. Ethylene was verified to be involved in the control of the development of the rhizome pattern when the rhizome sections were in substrate with reduced water level. This was indirectly obtained by ETHREL, AgNO₃ and AVG treatments and directly by the determination of ethylene concentration in the rhizome sections when they were in substrate with reduced water level.

ABA was also verified to be involved with the control of development of the rhizome pattern. This evidence was obtained indirectly by the ABA application to the rhizome sections. Also, ABA was detected by the lettuce seeds bioassay in extracts of rhizome sections kept under reduced water conditions. ABA was also detected in those extracts by combined gas chromatography-mass spectrometry.

The obtained results present evidence that the occurrence of the rhizome pattern, which is developed when the substrate presents low water content, is controlled by ethylene and ABA.

INTRODUÇÃO

O gênero *Kohleria* pertence à família Gesneriaceae e conta com dezessete espécies conforme KVIST & SKOG (1992). Atualmente, a identificação das plantas de *Kohleria* em gênero e espécie ainda apresenta certas discordâncias já que existem diversos nomes que foram estabelecidos antes de *Kohleria*. A denominação *Kohleria* foi estabelecida por EDOUARD REGEL em 1847 citado por KVIST & SKOG (1992). Entretanto, após esta classificação outros nomes ainda foram propostos, criando-se, assim, a situação de uso de sinônimos para caracterizar os indivíduos do gênero *Kohleria*. Dentre os gêneros sinônimos de *Kohleria* estão: *Gesneria* Linnaeus, *Gesnera* de Martius, *Brachyloma* de Hanstein, *Isoloma* de Bentham (Decaisne), *Tydaea* Decaisne, *Moussonia* de Regel, *Criptoloma*, *Calycostemna*, *Sciadocalyx* e outros. Finalmente, através dos estudos de FRITSCH (1913) o termo *Kohleria* foi estabelecido como o correto. No entanto, as denominações anteriores geraram equívocos entre os nomes das espécies e os seus sinônimos que perduram até hoje (KVIST & SKOG, 1992).

As plantas de *Kohleria* possuem facilidade para formar híbridos. Conforme BOGGAN & KVIST (1993a) muitos dos membros cultivados de *Kohleria* estão sendo chamados por nomes impróprios, devido ao fato que híbridos naturais e artificiais entre espécies são comuns e várias “espécies” foram descritas a partir de material cultivado sem estudo suficiente de coleções selvagens.

Kohlerias são gesneriaceae do Novo Mundo, cultivadas na América Latina, estão distribuídas desde o sul do México ao Peru e leste do Suriname e o seu centro de diversidade são as montanhas da Colômbia onde ocorrem 14 espécies (KVIST & SKOG, 1992).

Kohlerias são plantas herbáceas, arbustivas, subarbustivas ou raramente arbustivas escandentes, mas nunca lianas ou epífitas, podem ter altura média de 10,0cm a 1,0m ou mais, são perenes e exclusivamente terrestres, ocasionalmente também crescem sobre rochas ou em paredes íngrimes (KVIST & SKOG, 1992). As várias espécies de *Kohleria* podem ser encontradas nas margens ou nas clareiras de florestas úmidas, crescendo em luz do sol filtrada, ou em áreas abertas e completamente ensolaradas (ANÔNIMO, 1991).

Algumas espécies de *Kohleria* possuem órgão subterrâneo de reserva. Uma das mais antigas referências ao órgão subterrâneo de *Kohleria* foi feita por WETTSTEIN (1927) que o descreveu como um rizoma tuberoso. Mais recentemente, KVIST & SKOG (1992) denominaram o órgão subterrâneo de *Kohleria* de rizoma escamoso, um caule com “folhas como escama”, densamente amontoadas, algo como uma estrutura em cone, com diâmetro de aproximadamente um centímetro e comprimento de até 5,0cm. Entretanto, em habitats nativos os “rizomas escamosos” de algumas espécies podem, ocasionalmente, atingir comprimento de até 15,0cm e um diâmetro superior a 2,0cm.

O conhecimento da morfologia interna e externa dos órgãos subterrâneos facilita estudos sobre a sua fisiologia, já que estes podem ser um caule modificado ou uma raiz que armazena reservas. Rizomas são caules subterrâneos, que embora possam parecer superficialmente muito diferentes de ramos aéreos, algumas vezes são pouco modificados, exceto em seu hábito de crescimento (VILLIERS, 1975). Os rizomas podem ser mais delgados, com entrenós alongados, como em grama bermuda, ou comprimidos e suculentos como em *Iris*, *Zingiber* e *Asparagus* (LANGENHEIM & THIMANN, 1987). FIGUEIREDO (1972) caracterizou a morfologia do órgão subterrâneo de *Ocimum nudicale*, mostrando que foi importante ter informações completas de sua anatomia interna para os posteriores estudos de

fisiologia e ecologia. A formação dos órgãos subterrâneos varia bastante e cada espécie o faz com peculiaridades próprias. A iniciação e o desenvolvimento de tubérculos de *Solanum tuberosum* já foi caracterizada em muitos trabalhos. Estolões de *Solanum tuberosum* representam ramos modificados, que surgem de nós na base do sistema de ramos abaixo do solo. Os estolões diferem dos ramos verdes por apresentarem entrenós longos, pontas com ganchos, folhas pequenas e escamosas, aclorofilia e hábito diageotrópico. Finalmente, a partir dos estolões é que se desenvolvem os tubérculos (KUMAR & WAREING, 1972).

A iniciação de órgãos subterrâneos nas plantas pode estar associada ao controle tanto de fatores do ambiente quanto endógenos. O primeiro sinal de tuberização em plantas de *Solanum tuberosum* é o cessamento do alongamento do estolão seguido pelo entumescimento da região apical e a formação de gemas laterais (KODA *et al.*, 1988). Entretanto, o processo de tuberização de *Solanum tuberosum* só é iniciado quando as plantas são expostas a dias curtos (EWING & WAREING, 1978) e é completamente inibido em condição de dias longos (WAREING & JENNINGS, 1980). Além da tuberização do estolão, gemas de estacas do caule de *Solanum tuberosum* também se desenvolveram em batatinhas quando foram submetidas a uma sequência de dez dias curtos (8 horas de luz) (PEREIRA & VÁLIO, 1984).

Muitos estudos têm mostrado que a temperatura também participa do controle da iniciação de órgãos subterrâneos. Em geral, as temperaturas baixas favorecem mais a sua formação que as mais altas. Foi observado, em *Solanum tuberosum*, que a presença de temperatura baixa favoreceu a tuberização e sob temperatura alta houve inibição do processo (MAUK & LANGILLE, 1978). Isto também ocorreu em *Agropyron repens* que, em época de inverno, teve maior formação de seu rizoma que em época de verão (LEAKEY *et al.*,

1977). ALVARENGA & VÁLIO (1989) também encontraram efeito semelhante em *Pachyrhizus tuberosus*, sendo que as temperaturas baixas favoreceram a formação de seu órgão subterrâneo e as altas atrasaram ou inibiram.

As substâncias reguladoras de crescimento estão associadas aos eventos de desenvolvimento das plantas, através do balanço entre as substâncias promotoras e inibidoras. O controle da iniciação de órgão subterrâneo pode estar associado à presença de estímulos provenientes da parte aérea da planta mãe sob condições de ambiente específicas (MELIS & VAN STADEN, 1984). Alguns estudos têm mostrado que as citocininas estão presentes durante a formação de órgãos subterrâneos. MATSUO *et al.* (1988) observaram, em *Ipomea batatas*, que simultaneamente à iniciação de seu órgão subterrâneo houve aumento da concentração endógena de citocinina. O mesmo foi verificado em *Solanum tuberosum*, onde a presença de citocinina foi associada ao espessamento do tubérculo (KODA, 1982).

As giberelinas têm sido identificadas como inibidoras da formação de órgãos subterrâneos de *Solanum tuberosum*. Segundo EWING (1987) a atividade de substâncias giberelínicas diminuiu nas folhas de plantas de *Solanum tuberosum* após ficarem dois dias em dias curtos. OBATA-SASAMOTO & SUZUKI (1979) verificaram que durante a tuberização de *Solanum tuberosum* houve desaparecimento das substâncias giberelínicas. Já, SIMKO (1993) tratando segmentos do caule de *Solanum tuberosum* com paclobutrazol, inibidor da síntese de giberelina, obteve resposta de promoção da tuberização.

Alguns estudos têm mostrado que etileno também pode inibir a formação de órgão subterrâneo. Esta resposta foi verificada nas espécies de *Solanum tuberosum* (ABELES *et al.*, 1992) e em *Raphanus sativus* (VREUGDENHIL & VAN DIJK, 1989a).

A função primária do órgão subterrâneo é a de estocar alimentos e umidade para a estação de crescimento, assim assegurando a sobrevivência das espécies (HERTOGH & LENARD, 1993). Além disto, os órgãos subterrâneos também têm a função de multiplicação de indivíduos novos e ainda podem ser utilizados como forma de resistência da espécie às condições adversas do meio. O rizoma de *Kohleria* foi caracterizado como órgão de propagação vegetativa por WETTSTEIN (1927) e KVIST & SKOG (1992). A regeneração é um tipo de propagação importante para a preservação das plantas já que estas são sedentárias e susceptíveis a mais danos do que os animais que se movem (DOSTÁL, 1967). A perpetuação e a propagação das plantas nem sempre se realizam pelos mesmos mecanismos, algumas exercem suas potencialidades de crescimento vegetativo de forma indefinida pelos seus meristemas (reprodução assexuada) e outras chegam à produção de flores e frutos, perpetuando-se pelas sementes (reprodução sexuada) (TRIPPI, 1982). A maioria das ervas perenes, samambaias, briófitas, algumas espécies de árvores e arbustos é capaz de produzir indivíduos novos assexuadamente por proliferação e subsequente fragmentação da planta mãe, ou através da formação de propágulos vegetativos como bulbilhos, tubérculos ou gemas. Este tipo de regeneração está particularmente relacionado com a consolidação local de populações e tem o efeito de produzir populações de plantas geneticamente uniformes (GRIME, 1983).

O órgão subterrâneo de *Kohleria* sp também parece ter a função de resistência à condição de falta de água no ambiente. Segundo o trabalho de ANÔNIMO (1991) alguns membros da família Gesneriaceae possuem rizomas escamosos que são utilizados como estratégia para sobreviverem às condições desfavoráveis do meio. Na estação de seca as plantas de *Kohleria* se tornam dormentes e com o início da estação chuvosa brotam novamente de

seu órgão subterrâneo (ANÔNIMO, 1991). Observação semelhante foi feita também por I.T.M. PEREIRA (comunicação pessoal, 1993) de plantas de *Kohleria* sp cultivadas em canteiros do Instituto de Botânica de São Paulo. Nos meses de fevereiro, março e abril as plantas apresentaram botões florais, em maio iniciaram a frutificação, em agosto a parte aérea secou e em setembro, com o início das chuvas, apareceram brotações novas. Estas características de multiplicação de indivíduos novos e sobrevivência à condições adversas do meio também foram identificadas em órgãos subterrâneos de outras espécies. Como por exemplo, o xilopódio de plantas do cerrado, estrutura lenhosa e gemífera, que é capaz de sobreviver à estação de seca. Na estação seca a parte aérea desaparece totalmente e rebrota no início da estação chuvosa (RIZZINI, 1965). A sobrevivência de plantas em ambientes adversos deve-se, em geral, a algum tipo de mecanismo que favorece seu estabelecimento. Segundo ASHBY (1969) algumas espécies têm alta tolerância e são encontradas em habitats amplamente diferentes, outras são adaptadas somente a tolerar condições específicas. Estas adaptações podem ser fisiológicas ou estruturais: podem surgir como uma reação direta à condição do ambiente, ou serem formas distintas geneticamente que têm sido selecionadas pelos rigores do habitat.

A propagação de indivíduos novos através de órgãos subterrâneos é realizada pela brotação de suas gemas, quando expostas às condições favoráveis para o processo. Entretanto, se mesmo em condições adequadas, a brotação do órgão subterrâneo não ocorrer, isto deve-se à dormência das gemas. Exemplo disto foi encontrado em tubérculos de *Solanum tuberosum* recém colhidos, cujas gemas estavam dormentes e só brotaram após um período de descanso (EMILSSON, 1949 citado por IVINS & MILTHORPE, 1963). A dormência das gemas pode ser quebrada pela presença de algum fator do ambiente ou pelas

substâncias de crescimento (DIMALLA & VAN STADEN, 1977). As gemas do órgão subterrâneo, de algumas espécies, são sensíveis ao fotoperíodo, podendo ter a sua brotação promovida ou inibida, conforme a quantidade de luz. A brotação de gemas do rizoma de *Calathea allouia* foi promovida pelo fotoperíodo curto (BUENO, 1989). Já em tubérculos de *Solanum tuberosum* foi a condição de dia longo que promoveu a brotação de suas gemas (PELACHO *et al.*, 1994).

Seguramente, a temperatura exerce forte controle na brotação das gemas de órgãos subterrâneos. O efeito da temperatura em quebrar ou inibir a dormência de um órgão subterrâneo está ligado à espécie e ao seu tempo de exposição. A brotação de tubérculos de *Cyperus rotundus* foi inibida por temperaturas baixas de 10, 15 e 20°C, conforme verificado por ALEIXO & VÁLIO (1976). A influência da temperatura também foi encontrada no órgão subterrâneo de *Ocimum nudicale* que ficou dormente durante os meses do ano de temperatura baixa e brotou nos meses de temperatura elevada, sendo que a temperatura baixa foi responsável pela quebra de dormência (FIGUEIREDO-RIBEIRO & DIETRICH, 1981). Outro exemplo da quebra de dormência pela temperatura baixa foi verificada em bulbos de *Lilium speciosum* obtidos a partir de explantes de escamas, nas temperaturas de 15, 20 ou 25°C, onde a porcentagem de brotação foi maior naqueles regenerados em 15°C que naqueles em 20 e 25°C. Neste caso, a temperatura de 15°C foi associada à quebra de dormência dos bulbos (DELVALLÉE *et al.*, 1990). LUDFORD (1987) também observou que bulbos de *Allium cepa* L. necessitaram permanecer por período longo sob temperatura baixa para quebrar a sua dormência. Por outro lado, há espécies que necessitam de temperatura alta para quebrar a sua dormência. Por exemplo, como observado com os rizomas de *Deschampsia*

flexuosa, *Vaccinium myrtillus* e *V. vitis-idaea*, espécies que se estabelecem após queimada e só brotam em temperaturas superiores a 30°C (GRANSTRÖN & SCHIMMEL, 1993).

O teor de umidade do substrato é outro fator que influencia fortemente a capacidade de brotação das gemas de órgãos subterrâneos. Em alguns casos a falta de umidade é prejudicial à brotação. Isto foi verificado em tubérculos de *Cyperus rotundus* cuja intensidade de brotação foi reduzida conforme houve perda de umidade (ALEIXO & VÁLIO, 1976). Entretanto, rizomas de *Agropyron repens* tiveram maior porcentagem de brotação quando foram deixados em substrato com umidade alta (McINTYRE, 1976). Outro exemplo deste tipo de situação ocorreu com bulbos de *Lilium speciosum* que mesmo em meio com manitol, a porcentagem de brotação não foi alterada (KLERK & PAFFEN, 1995).

A dormência de gemas de órgão subterrâneo de algumas espécies, pode ser quebrada pelo tratamento com substâncias reguladoras de crescimento. Este controle da brotação também pode ocorrer por apenas uma substância ou por mais de uma. As citocininas têm sido relacionadas com a promoção da brotação de gemas de órgãos subterrâneos. Tal situação ocorreu com gemas dormentes de tubérculos de *Solanum tuberosum* que brotaram após o tratamento com citocininas. No entanto, a resposta de brotação foi dependente do estágio de desenvolvimento dos tubérculos, aqueles com mais de seis semanas de idade não brotaram em resposta ao tratamento com citocinina (TURNBULL & HANKE, 1985). Há exemplos de órgãos subterrâneos, em algumas espécies, que quando tratados com citocinina tiveram promoção da brotação e simultaneamente houve redução da concentração de uma outra substância de crescimento. Esta situação foi verificada em bulbos de *Allium wakegi* tratados com benzilaminopurina que tiveram promoção da brotação, e ainda foi encontrada redução no conteúdo de ABA (KURASHI *et al.*, 1989). SUKHOVA *et al.*, (1993) também verificou

que as concentrações endógenas de citocinina e auxina se mantiveram constantes na dormência de tubérculos de *Solanum tuberosum* e durante a brotação houve aumento significativo de citocininas e diminuição de auxina.

Alguns estudos têm mostrado também que etileno pode promover ou inibir a brotação de gemas de órgãos subterrâneos, conforme a espécie. Um exemplo de promoção foi o encontrado por RYLSKI *et al.* (1974) em tubérculos de *Solanum tuberosum* que tiveram promoção de brotação quando tratados com etileno. O tratamento de cormos de *Liatris spicata* com ETREL também causou a liberação da dormência das gemas (KEREN-PAZ *et al.*, 1989). Por outro lado, também há referências que etileno pode inibir a brotação. CVIKROVÁ *et al.*, (1994) verificaram em tubérculos de *Solanum tuberosum*, cujas plantas mãe foram previamente tratadas com CEPA, que a brotação foi atrasada.

ABA está fortemente vinculado à dormência de gemas de órgão subterrâneo, e de um modo geral, a sua concentração é alta em órgãos dormentes. KIM *et al.*, (1994) verificaram que ABA foi responsável pela dormência de bulbos de *Lilium speciosum* e quando tratados com fluridona (inibidor da síntese de ABA) houve brotação. Bulbos de *Lilium speciosum* obtidos de explantes de escamas *in vitro*, ficaram dormentes após tratamento com ABA (DJILIANOV *et al.*, 1994).

Os órgãos subterrâneos de natureza caulinar, em geral, podem ou não apresentar dominância apical. Quando a dormência do tubérculo de *Solanum tuberosum* foi quebrada, a brotação desenvolvida na sua porção apical inibiu os meristemas laterais, mostrando um alto grau de dominância apical. No entanto, com o aumento da idade do tubérculo, a dominância foi perdida e as gemas laterais brotaram (KUMAR & KNOWLES, 1993). Além disto, em algumas espécies, a própria planta mãe pode exercer domínio sobre as gemas do órgão

subterrâneo que ainda não foi destacado. ROGAN & SMITH (1976) verificaram que rizomas de *Agropyron repens* ainda ligados à planta mãe tiveram porcentagem baixa de brotação e quando foram destacados tiveram porcentagem maior. A porcentagem também aumentou quando os rizomas destacados foram decapitados, isto mostrou que a planta mãe e o ápice do rizoma exerceram dominância apical sobre as gemas axilares do órgão.

A brotação que se inicia no órgão subterrâneo posteriormente se desenvolverá em um indivíduo novo cuja morfologia estará associada à diferenciação celular. Segundo STEEVES & SUSSEX (1989) a formação do corpo da planta se deve à soma de eventos que caracterizam o seu desenvolvimento. O desenvolvimento está associado aos processos de crescimento e diferenciação, e o crescimento é um aumento irreversível em tamanho. Por outro lado, a diferenciação se deve a mudança que ocorre nas células e levam à sua distinção. Há casos em que o crescimento pode ocorrer sem diferenciação e a diferenciação sem crescimento, mas é quase sempre verdadeiro que estes dois fenômenos ocorrem em associação íntima.

O ápice de uma planta é dotado de uma força de crescimento sem limites (GUPTA & BHAMBIE, 1992) e este crescimento está confinado a certas zonas especiais, as pontas de caule e raiz, conhecidas como meristemas (VILLIERS, 1975; IVANOV, 1989). Deve-se ter atenção em relação aos termos ápice do caule e meristema apical, sendo que o ápice do caule é envolto por primórdios foliares e se forem removidos o meristema apical será exposto (MEDFORD, 1992). Já num órgão subterrâneo, são as suas gemas mais apicais as responsáveis, em grande parte pela iniciação, formação e diferenciação do indivíduo novo. O meristema apical "forma" o caule através de quatro funções: iniciando órgãos novos, iniciando tecidos novos, comunicando sinais ao resto da planta e mantendo o mesmo como uma região

de formação (MEDFORD, 1992). A morfogênese na planta é o resultado da regulação precisa do modelo de divisão celular e da direção e grau do alongamento celular (SHERIDAN, 1988).

As características morfológicas do indivíduo novo que se desenvolve a partir de uma gema podem ser influenciadas pelos fatores do ambiente e fatores endógenos da própria gema.

SHIHIRA-ISHIKAWA *et al.*, (1986) verificaram que a forma do “chapéu” da alga unicelular *Acetabularia calyculus* modificou-se conforme a condição do ambiente em que foi cultivada. Todos os chapéus foram normais sob 2000 lux e em temperatura baixa (22-25°C) e sob luz intensa (4000-5000 lux) e temperatura alta (30-32°C) os chapéus foram anormais. Num outro exemplo, a variação das temperaturas noturna e diurna causou diferença no crescimento do caule de *Lilium longiflorum* (ERWING *et al.*, 1989).

A condição de umidade é outro fator do ambiente que pode influenciar fortemente a morfogênese de um indivíduo novo. Isto pode ser exemplificado em plantas de *Crocus sativus* que normalmente têm crescimento "subsiantus" (as folhas se desenvolvem primeiro e após aparecem as flores), e quando mantidos em condição de seca, passaram a exibir crescimento "histerantus" (as flores se desenvolveram antes das folhas) (KLERK & PAFFEN, 1995).

Considerando as substâncias reguladoras de crescimento, há muitos estudos que evidenciaram o seu papel no controle da morfogênese desenvolvida por uma gema. Além da presença das substâncias de crescimento, a sua concentração também é determinante no tipo morfológico desenvolvido. Tal situação foi observada em calo de corno de *Crocus sativus* que desenvolveram o tipo caule, em maior número, quando estavam em meio com

concentração baixa de auxina e em concentração alta não o fizeram (ILAHÍ *et al.*, 1987). AMASINO & MILLER (1982) também verificaram que o tumor de galha de *Nicotiana tabacum* poderia se desenvolver em três padrões morfológicos em função das concentrações endógenas de auxina e citocinina. No padrão calo desorganizado com células grandes, o tumor tinha concentrações altas de auxina e médias de citocininas. Já no padrão caule a concentração de citocinina era média e a de auxina baixa, e no tipo calo desorganizado com células compactadas, a concentração de citocinina foi alta e a de auxina baixa. Na definição morfológica de um novo indivíduo, o efeito de uma substância de crescimento em influenciar a ocorrência de um determinado tipo, também dependerá do estágio de desenvolvimento das suas gemas e das condições do ambiente em que se encontra o organismo.

Alguns estudos têm mostrado que ABA e etileno também foram capazes de determinar o tipo morfológico desenvolvido por um indivíduo. Um exemplo disto ocorreu quando as gemas de musgos (*Timmiella anomala*) tratadas com ABA se desenvolveram em tipo filamentoso e aqueles sem tratamento tiveram gemas normais (CHOPRA & KAPUR, 1988). O fenótipo de *Spirodela polyrrhiza* também foi influenciado por ABA, quando a sua concentração nos tecidos foi baixa houve a formação do tipo fronde foliácea vegetativa e em concentração maior ocorreu o tipo "turion", que é um indivíduo menor e dormente (SMART *et al.*, 1995).

O envolvimento de etileno foi observado em gemas recém brotadas de segmentos de tubérculo de *Solanum tuberosum*, que quando tratadas com ETEFON tiveram inibição de alongamento e aumento do diâmetro dos caules, enquanto as brotações sem tratamento apresentaram alongamento caulinar (VREUGDENHIL & VAN DIJK, 1989b).

Considerando a diferenciação que leva aos diferentes tipos morfológicos observa-se que isto ocorre somente em células em posições específicas e em tempos específicos no meristema apical (LYNDON, 1994). Ressalta-se que é conveniente associar os eventos de determinação e competência celular ao processo de diferenciação celular. Durante a diferenciação um dos eventos iniciais, talvez o primeiro, parece ser a programação de uma célula ou tecido especializado ou seja a sua determinação. Em termos gerais, uma célula ou um grupo de células estão determinados quando exibem o mesmo destino de desenvolvimento se crescido *in situ*, em isolado, ou em um lugar novo ou no organismo (CHRISTIANSON & WARNICK, 1983). Para WAREING (1978) nas plantas há alguns fenômenos conhecidos que são indicativos que o estado de determinação ocorre a nível celular e pode ser transmitido através de muitas gerações celulares. Assim, é característico das espécies que mostram resposta à vernalização que uma vez que as células se tornem completamente vernalizadas é impossível desvernalizá-las, exceto durante uma fase relativamente curta após o término do tratamento de resfriamento (PURVIS, 1961; WAREING & AL-CHALABI, 1985). Embora as células ou tecidos sejam determinados a se diferenciarem numa estrutura específica, é importante observar que isto também está ligado à competência de cada um destes em iniciarem um evento. Para McDANIEL (1984) competência é exibida quando uma célula/tecido/órgão for exposto a um sinal e responder na maneira esperada. Uma célula competente seria aquela que também é determinada. Assim, é possível encontrar células num momento da diferenciação que são determinadas a um desenvolvimento particular mas são incapazes de atingi-lo, porque elas ainda não são competentes a responderem ao sinal. Um exemplo de competência celular ocorreu quando se utilizaram calos de alfafa com diâmetros diferentes, os maiores foram competentes para

iniciarem a organogênese, parte aérea e raízes, e os menores não o fizeram (WALKER *et al.*, 1978). TREWAVAS (1981) discute ainda o aspecto da competência de uma célula/tecido em relação à sua sensibilidade de responder às substâncias de crescimento de planta. O tecido competente se torna determinado a formar novos tecidos/órgãos pela indução. A indução é uma mudança nas concentrações de um ou mais reguladores de crescimento de planta e como resultado novos órgãos podem ser iniciados, mas várias outras características das plantas também podem mudar. Entretanto, indução e iniciação são difíceis de serem distinguidos experimentalmente, uma vez que a indução é detectada pela iniciação (VREUGDENHIL & STRUIK, 1989). A indução, em geral, ocorre quando um sinal gera uma resposta de desenvolvimento única de um tecido competente (McDANIEL, 1984). Hormônios vegetais regulam crescimento, diferenciação e morfogênese da planta provavelmente por exercer sua influência em reações metabólicas específicas (EDDO, 1993). A influência das substâncias de crescimento na formação e morfologia de um órgão ou indivíduo novo pode estar ligada a condições específicas do ambiente.

Desta forma, quando uma planta encontra-se em condições desfavoráveis, provavelmente a sua chance de sobrevivência estará ligada aos eventos de competência e determinação de suas células responderem aos sinais do ambiente. Neste caso, as células meristemáticas da planta podem ser induzidas por algumas das condições desfavoráveis e talvez através das substâncias de crescimento possam responder de tal forma que propicie sua manutenção. Considerando a informação de que o órgão subterrâneo de *Kohleria* sp se mantém em condição de falta de água (KVIST & SKOG, 1992; I.T.M. PEREIRA comunicação pessoal, 1993) pode-se supor que talvez isto também ocorra conforme as observações citadas anteriormente.

A condição de falta de água apresenta características que são bastante peculiares e que podem ser associadas à condição de estresse. Espécies e variedades de plantas diferem em termos de seu ambiente ótimo e sua susceptibilidade a um estresse particular, e ainda a intensidade de seu efeito dependerá do estágio de desenvolvimento da planta (JONES & JONES, 1991). Estresse causa alterações dos processos fisiológicos devido à combinação de fatores do ambiente e biológicos ou por um deles. Além disto, estresse tem potencial de causar injúria, que ocorre como resultado do metabolismo alterado e pode ser expresso com redução de crescimento (HALE & ORCUTT, 1987).

LEVITT (1980) considera a falta de chuva como estresse natural de água e quando é imposto artificialmente denomina de estresse de dessecação, mas somente quando o déficit de água for capaz de causar situação próxima de seca na planta.

LEVITT (1981) discute os tipos de resistência da planta ao estresse: escape de estresse e tolerância ao estresse. No primeiro caso a planta poderá eliminar o estresse completa ou parcialmente por meio de uma barreira física que separa suas células vivas do estresse, ou por meio de substância química. No segundo caso, a planta consegue se manter na condição de estresse, entra em equilíbrio termodinâmico com o estresse, sem sofrer injúria. A planta com tolerância de estresse é capaz de prevenir, reduzir ou reparar a tensão de injúria induzida pelo estresse.

KROCHKO *et al.*, (1987) observaram que algumas espécies podem ser capazes de superar a mais danos que outras devido à sua resistência a estresses mecânicos, por componentes citoplasmáticos. A perda lenta de água pode levar a mudanças graduais na configuração de moléculas que evitam a perda de água.

A resposta mais sensível à falta de água parece ser sobre o crescimento celular que responde imediatamente a uma diminuição da turgescência dos tecidos (CIAMPOROVÁ, 1987). Isto ocorreu em plantas de milho submetidas a estresse de água que tiveram redução da expansão foliar após o quarto dia do tratamento (SHARP & DAVIES, 1979). Outro exemplo é o de plântulas de trigo que tiveram redução em crescimento quando submetidas à falta de água tanto por tratamento com PEG 6000 quanto por ficarem sem qualquer umidade no substrato (MORGAN, 1988).

Um mecanismo importante para tolerância à falta de água é o ajustamento osmótico. Quando as plantas estão sujeitas a estresse, induzido pela perda de água das células, solutos são concentrados e levam à diminuição do potencial osmótico. O ajustamento osmótico pode prover a manutenção completa ou parcial da turgescência celular (MEYER & BOYER, 1972).

No reino vegetal, a tolerância à dessecação ocorre numa ampla variação de taxa e estruturas. Sementes de angiospermas são as mais óbvias estruturas tolerantes, e o primeiro tecido a perder a tolerância à dessecação é a radícula (LEOPOLD, 1990). Ainda, num mesmo órgão da planta pode haver diferença na sensibilidade à falta de água. Como é o caso da folha de *Hordeum*, que sob falta de água, a região da lâmina expandida ainda apresentou crescimento e a região de crescimento não o teve, estas diferenças se devem também primariamente às características anatômicas que regulam o movimento de água nos tecidos (MATSUDA & RAYAN, 1990).

Talvez o exemplo extremo de tolerância seja o das plantas de *Crasterostigma monroi*, da África subtropical, que perdem toda a água existente nos tecidos em época da seca e quando há uma chuva de até 0,6mm a 10,0mm de água elas reidratam e retomam suas atividades

(GAFF, 1977). No Brasil, há no Estado da Bahia, uma região com características físicas de deserto, chamada de Raso da Catarina. Neste local, encontram-se alguns espécimes das Velloziaceae adaptados a sobreviver à condição de falta de água. ROSSETO (1997) trabalhando com a Velloziaceae *Barbacenia elegans* verificou que esta espécie ficou completamente dessecada e após ser hidratada recuperou sua atividade metabólica.

Há muitos estudos mostrando que etileno e ácido abscísico podem estar relacionados com organismos vegetais em condição de falta de água. Algumas informações sustentam a hipótese de que ácido abscísico, citocininas e etileno estejam envolvidos em interações que controlam o balanço hídrico (HALE & ORCUTT, 1987).

Quando déficit hídrico se desenvolve devido à seca, há aumento da produção de etileno (HYODO, 1991). Todos os tecidos das plantas são capazes de produzir etileno embora a taxa de produção seja normalmente baixa (YANG & HOFFMAN, 1984).

A integridade da membrana celular pode ser um importante fator de regulação da biossíntese de etileno (MATTOO & WHITE, 1991). Isto se tornou mais claro com os experimentos com células de *Malus*, quando incubadas com uma mistura de enzimas que especificamente digerem parede celular causaram perda da produção de etileno; e quando as células regeneraram suas paredes celulares houve recuperação da produção de etileno (MATTOO & LIEBERMAN, 1977; MATTOO *et al.*, 1977). Na via de síntese de etileno, a enzima que converte o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a etileno, é dependente da presença de oxigênio (LIEBERMAN, 1979; SARQUIS *et al.*, 1992). A síntese de etileno pode ser induzida por condições de distúrbios como temperaturas extremas, seca e hipoxia ou ferimento mecânico nas plantas (YU & YANG, 1980).

Exemplo da influência da temperatura na produção de etileno foi verificada em discos de folhas de *Phaseolus vulgaris* que tiveram aumento da produção deste hormônio quando incubados em temperatura acima de 25°C (FIELD, 1981). A produção de etileno por embriões de *Elalis guineensis* também foi maior em temperatura de 27°C e permaneceu reduzida em temperaturas baixas (12 e 18°C) (CORBINEAU *et al.*, 1990).

A disponibilidade reduzida de água no substrato tem sido evidenciada como um fator desencadeador da produção de etileno por tecidos vegetais. Inúmeros são os exemplos desta relação. Como verificado em folhas destacadas ou não de diferentes espécies que tiveram produção elevada de etileno quando submetidas a umidade relativa baixa (BEN-YEHOSHUA & ALONI, 1974; AHARONI, 1978; APELBAUM & YANG, 1981). Trabalho de EL-BELTAGY & HALL (1974) mostrou que plantas de *Vicia faba* em déficit de água tiveram produção elevada de etileno. Isto também foi encontrado com uma espécie de metabolismo ácido *Kalanchoe daigremontiana* e uma hidrófita *Caltha polypetala*, em condição de excesso ou falta de água (KAPUYA & HALL, 1984).

A liberação de etileno também pode ocorrer por via indireta, através de auxina. Isto foi inicialmente visto por ZIMMERMAN & WILCOXON (1935) citado por YANG, (1987). Esta observação tem levado à descoberta de que alguns efeitos atribuídos ao etileno poderiam ser em resposta ao tratamento com auxina. Auxina promove a formação de etileno, por induzir a síntese de ACC sintase, que converte o intermediário S-adenosilmetionina para ACC (McKEON & YANG, 1987). Alguns trabalhos ilustram o efeito de auxina na produção de etileno como: discos de folha de *Lactuca* (AHARONI, 1989), plântula estiolada de *Vigna radiata* (KIM *et al.*, 1992), fatias de fruto de *Malus*, *Lycopersicum* e *Persea* (LIEBERMAN *et al.*, 1977), explantes de *Nicotiana* (SMULDERS, *et al.*, 1990), coleóptiles de *Oryza*

(HOSON *et al.*, 1990), gemas de plântulas de *Phaseolus* (YEANG & HILLMAN, 1982), segmentos de hipocótilo de *Vigna radiata* (YOSHII & IMASEKI, 1981; ARTECA *et al.*, 1988), discos de folhas de *Nicotiana* e *Beta* (AHARONI & YANG, 1983), raízes de *Lycopersicum* (BRADFORD *et al.*, 1982), flor de *Annona hybrida* (BLUMENFELD, 1975) e plantas de tomate mutante diageotrópica (BRADFORD & YANG, 1980).

CHANDLER (1988) esclarece que a entrada em estado de tolerância à dessecação requer a síntese de alguns componentes celulares como ácido abscísico. ABA tem sido implicado no controle de inúmeros processos de plantas. Há evidência, abundante, que ABA também tem papel em mediar respostas de planta a estresse do ambiente (TREWAVAS, 1981; NEILL & HORGAN, 1984; NEILL *et al.*, 1986 ; ZHANG & DAVIES, 1987).

Muitos são os exemplos mostrando que o conteúdo endógeno de ABA pode aumentar quando a planta ou um de seus órgãos são expostos à falta de água, por exemplo: plantas de *Salix viminalis* (BARROS & NEILL, 1987), folhas de plantas de *Craterostigma plantagineum* (BARTELS *et al.*, 1990), plântulas de *Glycine max* (CREELMAN *et al.*, 1990), células de *Solanum tuberosum* (LEONE *et al.*, 1994) e *Fatsia japonica* (LOPEZ-CARBONELL *et al.*, 1994). WERNER *et al.*, (1991) também verificaram que o musgo *Funaria hygrometrica* foi capaz de tolerar a seca quando tratado com ABA. Já musgos pré-tratados com 10 μ M de ABA, por duas semanas, foram capazes de tolerar a dessecação por mais tempo (BOPP & WERNER, 1993). Quando folhas de plantas mesofíticas são submetidas à falta de água o conteúdo de ABA pode aumentar de 10 a 50 vezes dentro de 4 a 8 horas, aparentemente devido ao aumento de sua síntese (WALTON, 1987).

CORNISH & RADIN (1990) discutem uma das possíveis vantagens da síntese intensa de ABA que ocorre durante o estresse. Quando ABA é aplicado às raízes, o volume de fluxo de

água através destas é frequentemente aumentado, isto pode melhorar o balanço hídrico da planta.

Além da falta de água, as plantas também podem estar sujeitas às variações máximas e mínimas de temperatura que não são favoráveis. Apesar disto, algumas espécies conseguem sobreviver por meio de mecanismos estruturais ou bioquímicos. A injúria de resfriamento depende não só da espécie e tipo de tecido mas também da severidade e duração de exposição à temperatura baixa. ABA pode ter um papel em melhorar o nível de água interno dos tecidos durante o resfriamento (LYNCH, 1990).

Muitos trabalhos têm demonstrado que o conteúdo endógeno de ABA aumentou em plantas que foram submetidas à temperatura baixa. Isto foi verificado em plântulas de *Phaseolus vulgaris* (VERNIERI *et al.*, 1994) e frutos de *Lycopersicum esculentum* (KUBIK *et al.*, 1992). A tolerância ao resfriamento por ABA também foi evidenciada indiretamente pela sua aplicação em plântulas de *Vigna radiata* (CHEN & LIN, 1993) e em suspensão celular de *Zea mays* (XIN & LI, 1992). Há exemplos indicando que etileno também pode estar envolvido com a resistência de algumas espécies ao resfriamento. O etileno foi produzido quando o tecido resfriado foi colocado em temperatura mais alta (ABELES *et al.*, 1992). Quando frutos de *Cucumis sativus* ficaram em temperatura baixa de 2,5°C o conteúdo endógeno de ACC e a produção de etileno permaneceram baixos e após a sua transferência para 25°C houve aumento da concentração de ambos (WANG & ADAMS, 1982).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi caracterizar o órgão subterrâneo de *Kohleria* sp em relação à sua anatomia e ao seu processo de brotação. Tentou-se ainda identificar alguns aspectos do controle ambiental e hormonal da brotação destes órgãos subterrâneos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Foram utilizados, neste estudo, órgãos subterrâneos de plantas de *Kohleria* sp, cuidadosamente retirados da terra de canteiros do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, com auxílio de uma pá. Após foram lavados e escovados sob água corrente para remoção de restos de terra e finalmente segmentados com auxílio de bisturi.

O material testemunho, espécime coletado por J.A.S.Almeida, número de coleta 27040, foi depositado no Herbário da UEC do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

MÉTODOS

CULTIVO

A multiplicação do órgão subterrâneo de *Kohleria* sp foi obtida através de sua segmentação em secções pequenas, colocadas para brotar em bandejas com vermiculita, em temperatura de 30°C e em câmara de crescimento por seis dias. Após este período foram transferidas para umidificador até que suas brotações se estabelecessem e finalmente transplantadas para canteiros, onde se desenvolveram até o estágio de planta adulta produzindo novos órgãos subterrâneos.

1.0 - CARACTERIZAÇÃO DO ÓRGÃO SUBTERRÂNEO

1.1 - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO ÓRGÃO SUBTERRÂNEO

Segmentos do órgão subterrâneo foram fixados em solução de FAA50 (formol, ácido acético e álcool etílico 50%) (JOHANSEN, 1940) por vinte e quatro horas e quando necessário mantidos em etanol 70% (JENSEN, 1962). Foram feitos cortes do material (transversais e longitudinais) à mão livre, corados com azul astra e fucsina e montados entre lâmina e lâminula com gelatina glicerinada derretida. Da visualização destes cortes anatômicos em microscópio óptico foram feitos desenhos em câmara clara e micrografias.

1.2 - CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS DO RIZOMA

Cortes anatômicos do órgão subterrâneo, obtidos como descrito no item anterior, foram submetidos a testes histoquímicos. A identificação de amido foi feita pela solução de Lugol (SASS, 1958), as substâncias lipídicas (cutícula, cutina e suberina) foram evidenciadas pelo Sudan IV (FOSTER, 1950), a presença de lignina por floroglucina (JOHANSEN, 1940), as paredes lignificadas foram detectadas pelo teste com cloreto de zinco férrico (NAGELI, 1863 citado por STRASBURGER & KOERNICKE, 1913) e os taninos identificados por cloreto férrico (10%) (JOHANSEN, 1940). Os cortes anatômicos ficaram imersos em cada uma das soluções por tempos diferentes conforme o teste, após lavados com água destilada para remoção do excesso dos reagentes e corantes e montados entre lâmina e lamínula para sua visualização em microscópio óptico.

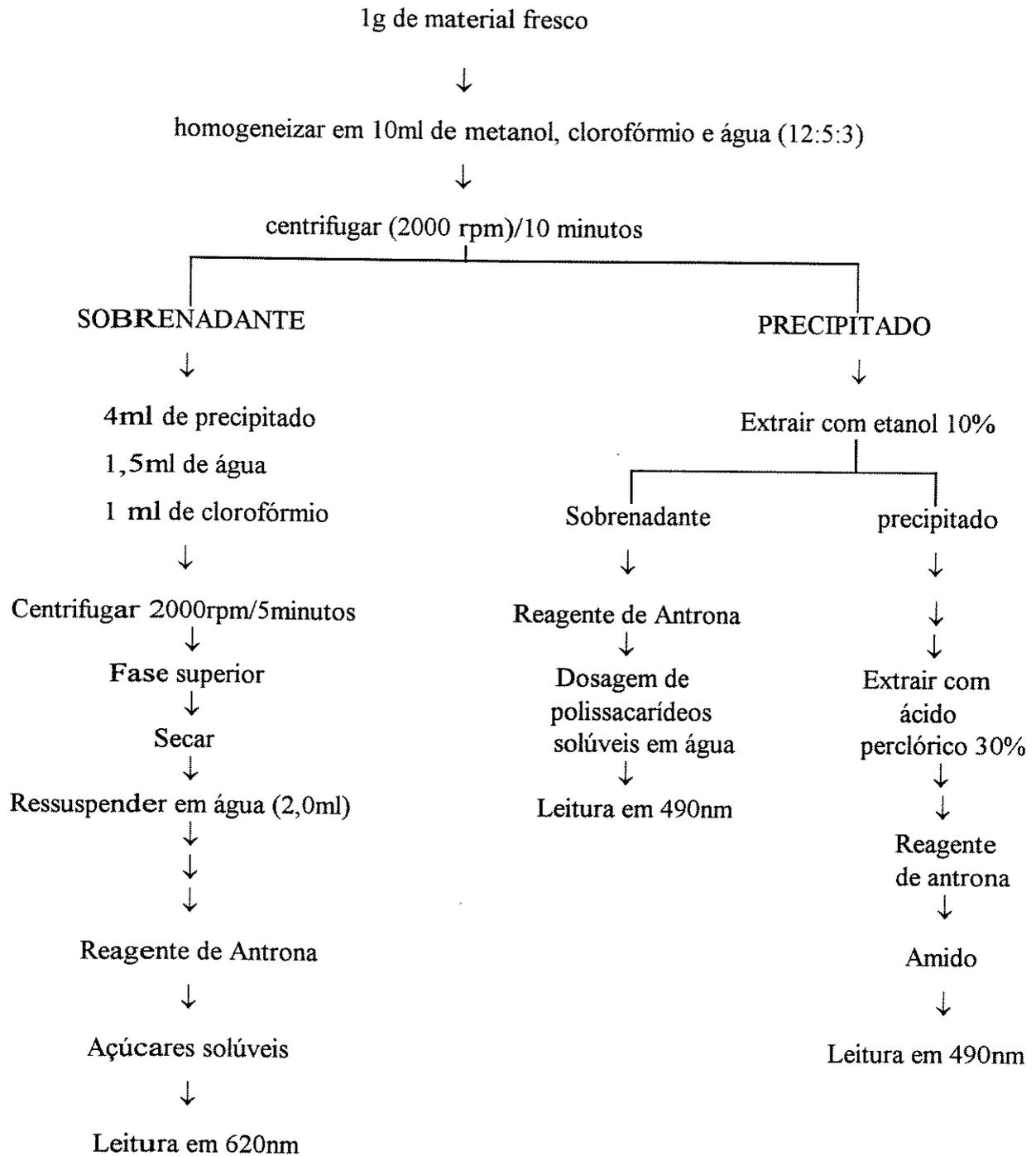
Para cada teste utilizaram-se vinte cortes anatômicos. Os grãos de amido foram visualizados por meio de luz polarizada, onde se adaptou um filme de polaróide na fonte de luz do microscópio e outro na ocular.

1.3 - CARACTERIZAÇÃO DAS RESERVAS DO RIZOMA

Na extração e dosagem de carboidratos foram verificados os conteúdos de açúcares solúveis, polissacarídeos solúveis em água e amido, conforme descrito por DUBOIS *et al.* (1956) (esquema 1). Estas determinações foram realizadas partindo de 1g de tecido fresco do órgão subterrâneo jovem e adulto. O órgão jovem tinha coloração clara e o órgão adulto apresentava aspecto coriáceo e com coloração escura. Foram feitas seis repetições para cada tipo de órgão e cada uma destas analisadas com três repetições. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, sendo os açúcares solúveis em 620nm e os polissacarídeos solúveis em água e o amido em 490nm.

1.4 - CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

A extração de substâncias fenólicas foi feita conforme o método descrito por SWAIN & HILLS (1959). Para tanto, utilizaram-se segmentos do órgão subterrâneo (10g), que foram extraídas com etanol 70% por 12 horas. O extrato foi filtrado e depois seco sob pressão reduzida (40°C). Após isto, o extrato foi ressuspenso em 2,0ml de água destilada. A uma aliquota de 10µl do extrato foram adicionados os volumes de 3,0ml de água destilada, 0,25ml de reagente de Folin Ciocalteu e 0,5ml de bicarbonato de sódio. A mistura foi centrifugada e



Esquema 1 - Extração e dosagem de carboidratos conforme o método de DUBOIS *et al.*, (1965).

deixada reagir por uma hora. Logo após fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 725nm.

Com uma alíquota de 10µl do extrato fez-se a caracterização de fenóis totais em cromatografia de papel, através de corrida bidimensional. O solvente da primeira corrida foi BAW (butanol, ácido acético e água) 4:1:5, sendo utilizando só a fase superior desta mistura e da segunda corrida foi o ácido acético (15%). Para a revelação, as placas de papel foram borrifadas com KOH (5%) e deixadas em estufa a 80°C por 30 segundos. Após observou-se as manchas através de luz ultra violeta.

Uma alíquota desse extrato foi testada também em cromatografia de camada delgada, em placa de sílica, de tamanho 20 x 20cm e espessura de 30µm. Os solventes utilizados na corrida foram BAW (6:1:2) e ácido acético (2%) e como revelador utilizou-se KOH (5%).

2 - ESTUDO DO PROCESSO DE BROTAÇÃO DAS SECÇÕES DO RIZOMA

2.1 - BROTAÇÃO

Na maioria dos experimentos, deste estudo, as secções do rizoma foram colocadas para brotar em placas de Petri com 9,0cm de diâmetro, forradas com três folhas papel de filtro e umedecidas com água destilada. As placas ficaram dentro de sacos plásticos transparentes para evitar perda de umidade e em câmara de crescimento. Quando os tratamentos ficaram em luz branca contínua, utilizaram-se lâmpadas fluorescentes com intensidade de 320µW.cm⁻².

2.2 - NÚMERO DE FOLHAS MODIFICADAS POR SECÇÃO DO RIZOMA

Neste experimento utilizaram-se secções do rizoma (figura 1) com uma ou seis folhas modificadas que foram mantidas em temperaturas de 25 e 30°C e em luz contínua. Cada tratamento constou de quatro repetições com dez secções em cada placa de Petri. As secções foram avaliadas quanto à porcentagem de brotação.

2.3 - TRATAMENTO DE LUZ E TEMPERATURA

Secções do rizoma foram mantidas em temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35°C, com 1,0ml de água no substrato e em luz contínua.

As secções do rizoma que ficaram nas temperaturas de 20 e 30°C também foram submetidas ao escuro contínuo. No tratamento de escuro as placas de Petri foram colocadas dentro de sacos plásticos pretos e as observações feitas em sala escura com luz verde de segurança. Os tratamentos foram avaliados quanto à porcentagem de brotação das secções.

Secções também foram mantidas por trinta dias nas seguintes condições: temperaturas de 20 ou 30°C, com 1,0 ou 12,0ml de água destilada no substrato e em luz contínua. Após este período, quando suas brotações já estavam desenvolvidas, as secções que estavam em temperatura de 20°C foram transferidas para 30°C e aquelas que estavam em temperatura de 30°C transferidas para 20°C e mantidas por mais trinta dias nestas condições. Na segunda parte deste experimento, devido ao tamanho das brotações, as secções foram deixadas em caixa plástica GERBOX forradas com três folhas de papel de filtro, em luz contínua, em volumes correspondentes a 1,0 e 12,0ml de água no substrato. As secções foram avaliadas

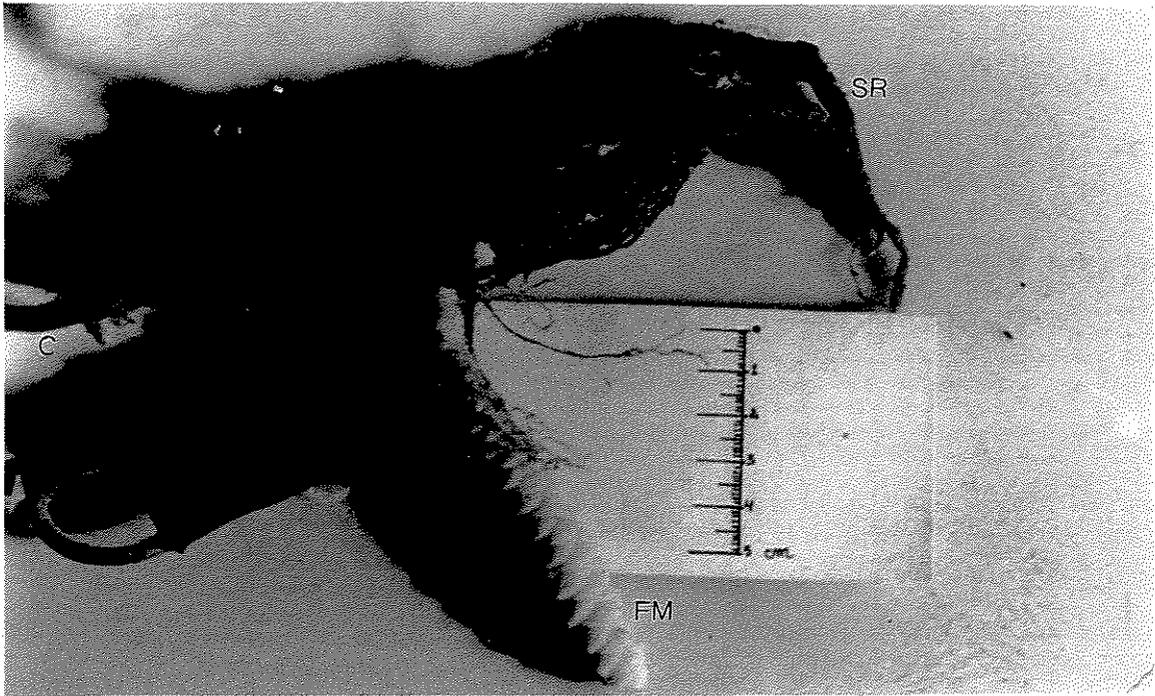


Figura 1 - Órgão subterrâneo de *Kohleria* sp, junto ao caule (C) e sistema radicular (SR) da planta-mãe, mostrando suas folhas modificadas (FM).

quanto ao tipo morfológico desenvolvido pelas suas brotações, após 20 dias do início do experimento.

Nos experimentos de luz e temperatura cada tratamento constou de quatro repetições, com dez secções em cada uma.

2.4 - TEOR DE HIDRATAÇÃO DO SUBSTRATO

Secções do rizoma foram mantidas em placas de Petri com adição de volumes diferentes de água destilada, sendo 1,0, 12,0 e 20,0ml e em temperatura de 30°C. Quando o volume foi de 1,0ml de água as folhas de papel de filtro ficaram levemente umedecidas, o que foi considerado como uma condição de disponibilidade reduzida de água. Os volumes de 12,0 ou 20,0ml formaram uma lâmina de água sobre o papel de filtro, que foram caracterizadas como condição de disponibilidade alta de água. O volume de 20,0ml foi considerado também uma condição de excesso de água.

Testaram-se ainda os volumes de: 2, 3, 4 e 5ml de água no substrato, nas temperaturas de 20 e 30°C e em luz contínua.

Avaliou-se também o número de raízes desenvolvidas pelas secções do rizoma que ficaram em placas de Petri com 1,0 ou 12,0ml de água, em temperatura de 30°C e em luz contínua. A massa seca das secções do rizoma e de suas brotações que ficaram nestas condições também foi avaliada. A determinação da massa seca foi realizada após as secções terem permanecido em estufa em temperatura de 80°C, por 72 horas.

A perda de umidade pelo sistema placa de Petri, papel de filtro e secções do rizoma foi verificada através da pesagem das placas de Petri à cada dois dias, durante dezenove dias.

Foi adicionado em cada placa de Petri o volume de água perdido, que foi determinado através da diferença entre a massa final e a massa inicial dos sistemas. Esta perda de umidade foi verificada em sistemas com 1,0 e 12,0ml de água no substrato, nas temperaturas de 20 e 30°C e que ficaram em luz contínua.

3.0 - CARACTERIZAÇÃO DAS BROTAÇÕES DESENVOLVIDAS PELAS SECÇÕES DO RIZOMA

3.1 - TRATAMENTO DE TEMPERATURA E LUZ

As brotações desenvolvidas pelas secções do rizoma foram avaliadas quanto ao comprimento do caule e número de folhas formadas. Estas determinações foram feitas em brotações com quinze dias de idade cujas secções ficaram nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, na luz e no escuro. Para o tratamento de escuro as placas de Petri com as secções ficaram dentro de três sacos plásticos pretos. Cada tratamento constou de quatro repetições e cada uma destas com cinco secções.

3.2 - TRATAMENTO FOTOPERIÓDICO

Brotações desenvolvidas pelas secções do rizoma, quando estavam com 6 pares de folhas, foram transplantadas para vasos com terra (1,3L) e cultivadas em fotoperíodos de oito e dezoito horas de luz. Para o fotoperíodo de 8 horas, após o período de luz as plantas foram deixadas no escuro, através do uso de cortina de tecido negro. Quando estavam em fotoperíodo de 18 horas de luz, o dia natural foi prolongado com iluminação fornecida por

lâmpadas incandescentes ($0,53\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Após três meses de cultivo, nestas condições, as plantas foram analisadas quanto à formação de rizomas, comprimento de caule, número de folhas formadas e área e massa seca foliares. A área e a massa seca foliares foram determinadas do 3º par de folhas das plantas. As avaliações constaram sempre de dez repetições.

4.0 - TRATAMENTO COM PEG

Secções do rizoma foram colocadas em soluções de PEG, nas concentrações de 161,2, 235,2 e 340,0g/L, que geraram respectivamente os potenciais de -3, -6 e -12 MPa. As soluções de PEG foram preparadas conforme MICHEL & KAUFMANN (1973). Cada uma das soluções foi usada em volume de 12,0ml e as secções controle ficaram em 1,0 ou 12,0ml de água no substrato. O experimento foi conduzido em placas de Petri conforme explicado no item 2.1, em temperatura de 30°C. Cada tratamento constou de quatro repetições e cada uma com dez secções.

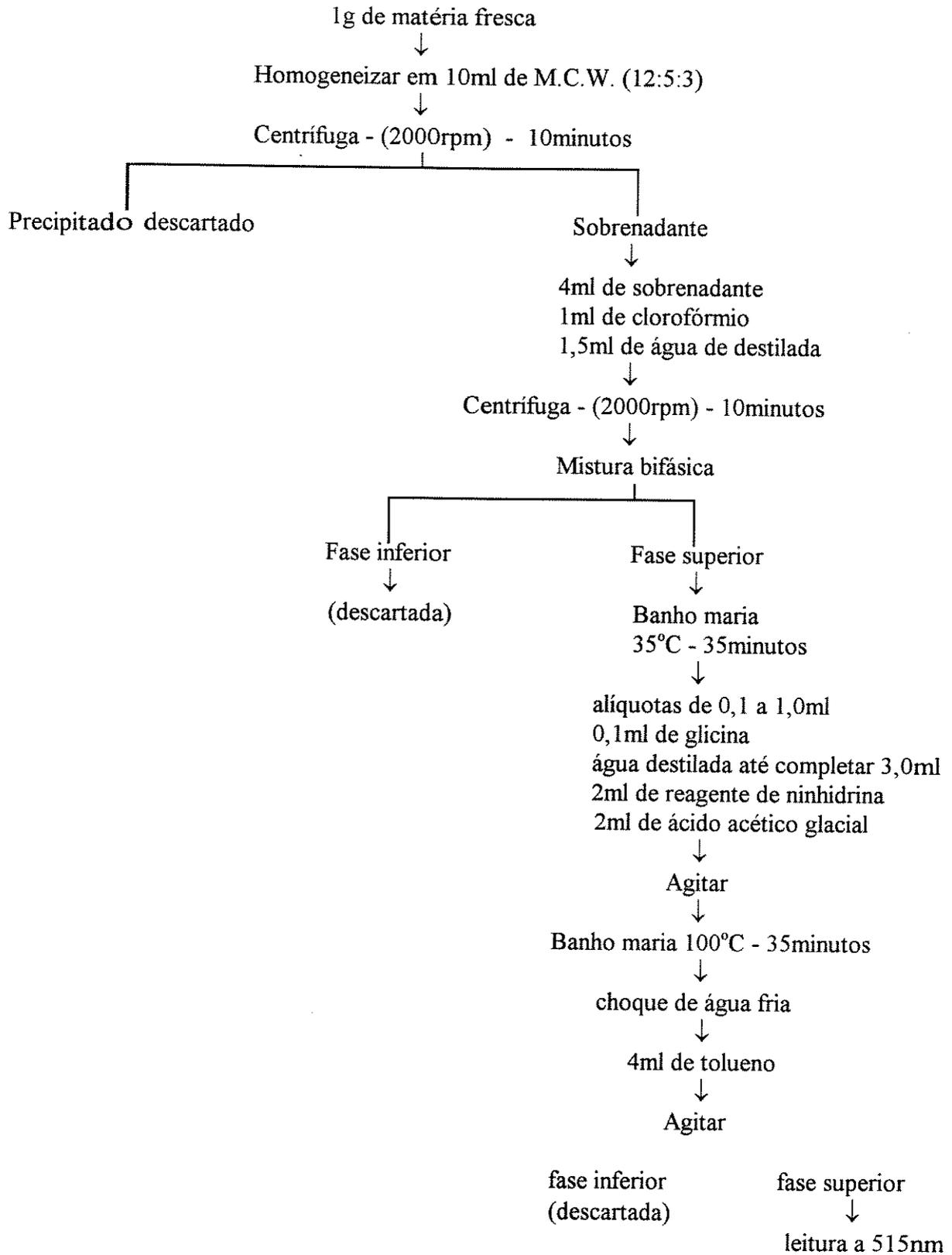
Todos os tratamentos, testando a influência do teor de hidratação do substrato, foram conduzidos em luz contínua. Em todos os experimentos as secções do rizoma foram avaliadas quanto à porcentagem de brotação e quanto ao tipo morfológico desenvolvido por suas brotações.

5.0 - DOSAGEM DE PROLINA DAS SECÇÕES DO RIZOMA

A extração e dosagem de prolina foram feitas conforme RENA & MASCIOTTI (1976), (esquema 2). O extrato foi obtido a partir de 1g de secções do rizoma, que foram maceradas em solução de metanol, clorofórmio e água (12:5:3) e centrifugadas a 2000rpm por dez minutos. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante (4ml) adicionou-se clorofórmio (1,0ml) e água destilada (1,5ml). O sobrenadante foi centrifugado a 2000rpm por 10 minutos. A fase superior da mistura foi mantida em banho-maria (35°C) por 30 minutos para evaporação do clorofórmio. Em aliquotas de 0,1 ml da fase superior da mistura anterior adicionou-se 0,1ml de glicina (12,6 μ moles), água destilada (2,8ml) para completar volume de 3,0ml, 2,0ml de reagente de ninhidrina e 2,0ml de ácido acético glacial. O reagente de ninhidrina foi preparada a partir de 600mg de ninhidrina, 12ml de ácido acético e 10ml de ácido ortofosfórico (6M).

A solução obtida anteriormente foi agitada e mantida em banho-maria (100°C) por 35 minutos, após isto foi imediatamente resfriada em banho de gelo e também adicionado 4,0ml de tolueno. A partir do sobrenadante desta mistura fez-se a dosagem de prolina através de leitura em espectrofotômetro (515nm).

A extração de prolina foi feita de secções do rizoma que ficaram em 1,0 ou 12,0ml de água no substrato, em temperatura de 30°C e em luz contínua, por 14 dias. As secções foram amostradas a cada dois dias, sendo que cada uma constou de três repetições. Para a leitura, o extrato de cada coleta constou de três repetições. Para esta análise só foi utilizada a secção, a brotação foi descartada.



Esquema 2 - Método para extração e dosagem de prolina (RENA & MASCIOTTI, 1976).

6.0 - TRATAMENTO COM ETREL

Secções do rizoma foram tratadas com solução de ETREL (10^{-3}M). ETREL foi aplicado na forma de gota ($20\mu\text{l}$) sobre as secções que ficaram com 12,0ml de água no substrato. As secções foram tratadas durante dez dias, sendo uma aplicação a cada dois dias. Como controle secções sem tratamento ficaram em 1,0 e 12,0ml de água no substrato.

7.0 - TRATAMENTO COM ABA

Solução de ácido abscísico foi aplicada em secções do rizoma que ficaram com 12,0ml de água no substrato. ABA (10^{-3}M) foi aplicado na forma de gota ($25\mu\text{l}$) sobre cada uma, a cada dois dias, durante 10 dias. Como controle secções sem tratamento ficaram em 1,0 e 12,0ml de água no substrato.

8.0 - TRATAMENTOS COM AUXINA E 6BA

Secções do rizoma foram tratadas com as soluções de ácido indol-3-acético (AIA) (10^{-3}M), 6-benziladenina (6BA) (10^{-3}M) e uma mistura de AIA e 6BA (10^{-3}M). As soluções foram aplicadas em secções que estavam com 1,0 e 12,0ml de água no substrato. Cada solução foi aplicada na forma de gota ($25\mu\text{l}$) sobre cada secção, durante 10 dias, diariamente. Como controle secções foram mantidas sem tratamento nestes mesmos volumes de água.

9.0 - TRATAMENTO COM ACC

Solução de ACC foi aplicada nas secções do rizoma que ficaram em placas de Petri com 12,0ml de água. Cada secção foi tratada com uma gota de 20 μ l de ACC (10^{-3} M), a cada dois dias, num período de 10 dias. Como controle secções sem tratamento ficaram em 1,0 e 12,0ml de água no substrato.

10.0 - TRATAMENTO COM AgNO₃

Solução de AgNO₃ foi aplicada em secções do rizoma que ficaram em placas de Petri com 1,0ml de água. AgNO₃ foi utilizado nas concentrações de 1, 10, 50, 100, 200 e 500mg.L⁻¹ e cada solução foi aplicada sobre cada secção, uma única vez, na forma de gota (50 μ l), no dia da montagem do experimento. Como controle secções sem tratamento ficaram em placas de Petri com 1,0 e 12,0ml de água no substrato.

Secções do rizoma também foram mantidas em placas de Petri com 12,0ml de solução de PEG (-6MPa) e ainda tratadas com uma gota (50 μ l) de nitrato de prata de 500mg.L⁻¹ que foi aplicado sobre cada secção, uma única vez. Nitrato de prata também foi aplicado, uma única vez, em secções que ficaram com 1,0ml de água no substrato e como controle secções sem tratamento ficaram em 1,0 e 12,0ml de água.

11.0 - TRATAMENTO COM AVG

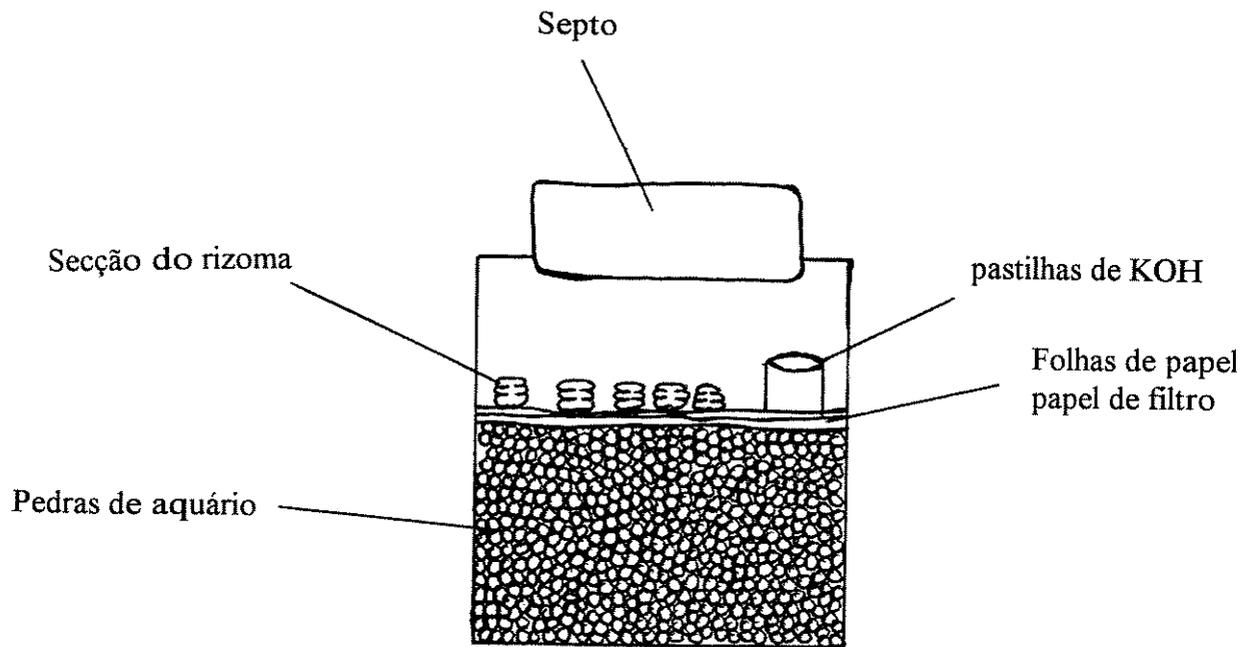
Secções do rizoma foram tratadas com AVG na concentração de $10^{-3}M$, que foi aplicado na forma de gota ($15\mu l$), no 1º e 3º dia do início do experimento. As secções tratadas ficaram em placas de Petri com 1,0ml de água e a secções controle em 1,0 e 12,0ml.

Todos os tratamentos constaram de quatro repetições e cada uma destas com dez secções.

Após vinte dias as secções foram avaliadas quanto ao tipo morfológico desenvolvido pelas suas brotações.

12.0 - DOSAGEM DE ETILENO

Para a dosagem de etileno utilizaram-se frascos transparentes, com volume de 65,0ml que foi reduzido para 21,0ml com adição de pedras de aquário (esquema 3). Sobre as pedras foram colocadas três folhas de papel de filtro e também um frasco pequeno de vidro contendo três pedras de KOH para redução do nível de CO_2 do meio (TAN & THIMANN, 1989). Secções do rizoma foram colocadas sobre o papel de filtro, previamente umedecido, os frascos foram vedados com septos, mantidos em temperatura de $30^{\circ}C$ e em luz contínua. Amostras de 1ml de gás foram coletadas dos frascos a cada 24 horas da montagem do experimento, com o auxílio de uma seringa. Os tratamentos constaram de secções do rizoma que ficaram em frascos com 3,0 e 15,0ml de água no substrato, simulando as condições de 1,0 e 12,0ml de água, nas placas de Petri, respectivamente. Cada tratamento, constou de quatro repetições e cada uma com 7 secções. Dosagens de etileno foram feitas em cromatógrafo a gás "VARIAN - modelo 2440" equipado com detetor de ionização de chama.



Esquema 3 - Modelo do frasco utilizado para dosagens de etileno de secções do rizoma de *Kohleria* sp. Os frascos foram vedados com septos, mantidos em temperatura de 30°C e em luz contínua.

Utilizou-se coluna 'Pyrex' de 6 x 1/4 , sendo a fase sólida constituída de Porapak T com malha de 80/100. Para a fase móvel usou-se o gás nitrogênio. As temperaturas do aparelho foram as seguintes: coluna, 100°C; injetor, 140°C e detetor, 190°C. Como padrão foi utilizado etileno (White Martins). A avaliação quantitativa do etileno nos frascos foi feita comparando-se as alturas dos picos da amostra com o pico do padrão.

13.0 - DOSAGEM DE ACC

A extração e dosagem de ACC foi feita conforme o método descrito por YOSHI & IMASEKI (1981). O extrato foi obtido a partir de 1g de secções do rizoma, que foram maceradas com 4,0ml de ácido sulfosalicílico (3%), que após foi subdivido em quatro partes de 1,0ml e cada uma centrifugada em Ependorf a 16000x, em minicentrífuga. O sobrenadante de cada amostra centrifugada foi recolhido e o precipitado foi reextraído outras quatro vezes com ácido sulfosalicílico (3%). Todos os sobrenadantes recolhidos foram misturados, tendo-se um único volume, o qual foi passado em mini-coluna com 1,0ml de DOWEX 50W. A coluna de DOWEX foi acidificada com HCl 2N (9,0ml) e depois lavada com água destilada até que o pH da água que passava por esta coluna ficasse neutro. Para evitar o entupimento da coluna DOWEX, devido à presença de uma substância gomosa de coloração laranja no sobrenadante recolhido, fez-se antes a filtração do mesmo em fibra de vidro. Logo após a passagem do extrato na coluna DOWEX passou-se por ela uma solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) e recolheu-se o filtrado. O filtrado foi seco sob pressão reduzida (40°C) e ressuspendido com 1,0ml de água destilada. Uma alíquota de 0,7ml do ressuspendido foi colocada em tubo de ensaio de volume de 25ml. A seguir, foram acrescentados 0,1ml de água

e 0,1ml de HgCl_2 (10mM) e o tubo foi vedado com septo, que ficou em banho de gelo por 5 minutos e a reação foi inibida com 0,1ml de uma solução saturada de NaOH e NaOCl 5% (1:2 em volume de 1,0ml). O tubo foi então agitado por cinco minutos e após isto coletou-se uma amostra de 1,0ml de ar que foi injetada em cromatógrafo a gás. A dosagem de etileno, proveniente da degradação química de ACC, foi realizada como descrita no item 12.0.

O extrato de ACC foi obtido de secções do rizoma que ficaram, previamente, em placas de Petri com 1,0 ou 12,0ml de água no substrato, em temperatura de 30°C e em luz contínua. As amostragens foram feitas de secções que foram mantidas por 2, 6, 8, 10 e 14 dias após o início do experimento. Cada tratamento constou de três repetições. As brotações das secções do rizoma não foram utilizadas para a obtenção do extrato.

14.0 - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO ÁPICE MODIFICADO DAS BROTAÇÕES DAS SECÇÕES DO RIZOMA

No experimento de dosagem de etileno liberado das secções do rizoma estas foram mantidas em frascos fechados, conforme visto anteriormente no esquema 3, para acumulação de etileno. As brotações desenvolvidas pelas secções apresentaram modificações em seus ápices. Estes ápices foram coletados e fixados em FAA50 por 24 horas e em seguida estocados em etanol 70%. Após foram desidratados pela série butílica (álcool butílico terciário - ABT) e incluídas em parafina (SASS, 1958). As amostras incluídas em blocos de parafina (orientadas nas posições vertical ou horizontal) foram cortadas em micrótomo rotativo com espessura de 8 μm . O método de coloração utilizado foi o da safranina (uma hora) - "fast-green" (SASS, 1958) e posteriormente a coloração pelo azul astra (um minuto e

meio). As lâminas foram depois fixadas em Permont. Os cortes anatômicos foram observados e caracterizados em microscópio óptico e depois fotografados.

15.0 - EXTRAÇÃO DE ABA DAS SECÇÕES DO RIZOMA

A extração de ABA foi obtida de secções do rizoma ou de suas brotações, com idades diferentes após a montagem do experimento e em quantidades diferentes de tecidos, sendo: 60 dias (2g de tecidos de secção ou de brotação), 30 dias (1g de tecidos de secção ou de brotação) e 10 dias (5g de tecido de secção). As secções utilizadas para a extração de ABA foram previamente mantidas em placas de Petri com 1,0 e 12,0ml de água, em temperatura de 30°C e em luz contínua. Para a obtenção do extrato, o tecido foi macerado com metanol 80% (50ml) e deixado extrair por mais 24 horas. A seguir, o metanol foi removido por pressão reduzida (35°C) e a solução aquosa restante acidificada com HCl (1N) a pH 3. Após fez-se fracionamento com acetato de etila (3 vezes) obtendo-se a fração orgânica I. Esta fração foi extraída três vezes com NaHCO₃ (5%) e a fração aquosa obtida acidificada a pH 3 com HCl puro e extraída 3 vezes com igual volume de acetato de etila, obtendo-se a fração ácida.

16.0 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ÁCIDA DOS EXTRATOS DAS SECÇÕES DO RIZOMA

A fração ácida do extrato, obtida anteriormente, foi seca por pressão reduzida (35°C) e ressuspensa em 2,0ml de metanol. No próximo passo da purificação o extrato

ressuspendido foi passado em mini-coluna Sep pak e após passou-se mais 8,0ml de metanol que foi recolhido junto com o extrato. A coluna Sep-pak havia sido previamente estabilizada com metanol. O filtrado recolhido foi seco novamente por pressão reduzida (35°C) e ressuspendido em 1,0ml de metanol. Esta solução foi seca em nitrogênio e ressuspendida em uma mistura de metanol e ácido acético (0,5%) que foi centrifugada em uma minicentrífuga a 10.000rpm. A seguir o sobrenadante foi passado em um filtro com malha de 25µm. Uma solução de ácido abscísico padrão ($10^{-3}M$) também foi purificada e uma alíquota de 25µl desta solução foi injetada em cromatografo para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Utilizou-se, em coluna C18 ODS-Hypersil (5µm, 250mm x 5mm), gradiente de 40 a 85% de metanol, 30 minutos, em solução aquosa de ácido acético 0,5%, com fluxo de 1ml/minuto e monitorado em 260nm. A seguir as frações ácidas purificadas dos extratos das secções também foram injetadas em HPLC, nas mesmas condições da solução padrão de ABA. Os eluatos das frações ácidas correspondentes ao tempo de retenção do isômeros de ABA padrão foram recolhidos.

17.0 - BIOTESTE DA GERMINAÇÃO DE SEMENTE DE ALFACE

As frações ácidas obtidas da extração e fracionamento dos extratos das secções do rizoma foram colocadas em placas de Petri de 4,0cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel de filtro. A seguir a remoção de todo o acetato de etila do papel de filtro por evaporação, as placas foram umedecidas com 500µl de água destilada e após colocadas as sementes de alface "Grands rapids". As placas de Petri ficaram em câmara de crescimento, em temperatura de 25°C e em luz contínua. Após 24 horas avaliou-se a porcentagem de

germinação das sementes. Cada tratamento constou de quatro repetições com 20 sementes de alface em cada uma.

18.0 - CARACTERIZAÇÃO DE ABA POR GC/MS

Os eluatos das frações ácidas dos extratos das secções do rizoma recolhidos em HPLC, foram secos sob pressão reduzida (35°C). A seguir, nos próprios balões onde foram secas, as amostras foram metiladas, com a adição de 10,0ml de solução de diazometano em cada balão. A solução de diazometano foi preparada conforme SCHLENK & GELLERMAN (1960). Após a reação de metilação, os extratos foram novamente secos sob pressão reduzida (35°C) e ressuspensos em 500µl de metanol, o qual foi, em seguida, concentrado com nitrogênio para volume de 200µl. Uma alíquota de 1µl de cada extrato foi injetada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (HP 5988A). Para o padrão, 1,0mg de ABA (SIGMA) em pó foi metilado com a adição de 1,0ml de solução de diazometano, que depois da reação foi seco sob pressão reduzida (35°C) e ressuspensado em 500µl de metanol, cujo volume também foi reduzido para 200µl e uma alíquota de 1µl foi injetada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. Utilizou-se a coluna 'HP-1 fused silica capillary - 25m x 0,2mm'. As condições de cromatografia foram: temperatura inicial do forno do cromatógrafo a gás de 50°C e a temperatura final de 230°C, taxa de aquecimento de 30°C /minuto, injetor a 230°C, detector a 280°C e faixa de varredura: 40-400uma (unidade de massa atômica).

19.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos que tiveram uma variável foram analisados por Análise de Variância (SNEDECOR, 1962), e a diferença mínima significativa foi calculada pelo Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade (PIMENTEL, 1985).

Quando os dados tiveram duas ou mais variáveis utilizou-se a análise fatorial e quando o teste F foi significativo fez-se a comparação entre médias pelo teste de Tukey a nível de 5% (PIMENTEL, 1985).

Para os resultados em porcentagem, os dados foram transformados em arco seno $\sqrt{\%/100}$.

O cálculo do tempo médio de brotação foi feito conforme LABOURIAU (1983):

$$t = \frac{\sum (Gn \cdot Dn)}{\sum Gn}$$

Gn: número médio de seções que brotaram naquele dia
Dn: dia da brotação

A velocidade média de brotação foi calculada por: $V = 1/t$

E para o cálculo do desvio padrão utilizou-se a equação, conforme LABOURIAU (1983).

$$S_t = \sqrt{(\sum ni (t_i - t)^2) \cdot (-1 + \sum ni)^{-1}}$$

RESULTADOS

1.0 - CARACTERIZAÇÃO DO ÓRGÃO SUBTERRÂNEO

1.1 - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DO ÓRGÃO SUBTERRÂNEO

O estudo anatômico do órgão subterrâneo de *Kohleria* sp mostrou que este sistema possui natureza mista, caulinar e foliar (figura 2). O eixo central é de estrutura caulinar, caracterizado pelo xilema que fica na parte interna do córtex e floema para fora deste. Foi encontrada também nas células das regiões dos parênquimas cortical e medular a presença de esclerênquima.

As estruturas dispostas ao redor do caule do rizoma são “folhas modificadas” e cada uma se dispõem de forma a proteger uma gema. Nota-se na figura 2 que as folhas modificadas também se apresentaram vascularizadas.

1.2 - CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS DO RIZOMA

Cortes anatômicos da secção do rizoma de *Kohleria* sp, compreendendo as regiões do caule e das folhas modificadas, foram submetidos a testes histoquímicos. Na região da folha modificada verificou-se abundância de grãos de amido e completa ausência na região do caule (figura 3A). Nos grãos visualizou-se a presença de “cruz de malta”, devido a sua birrefringência, que é característica de grãos de amido (figura 3B). Esta observação foi realizada através do uso de luz polarizada em microscópio óptico.

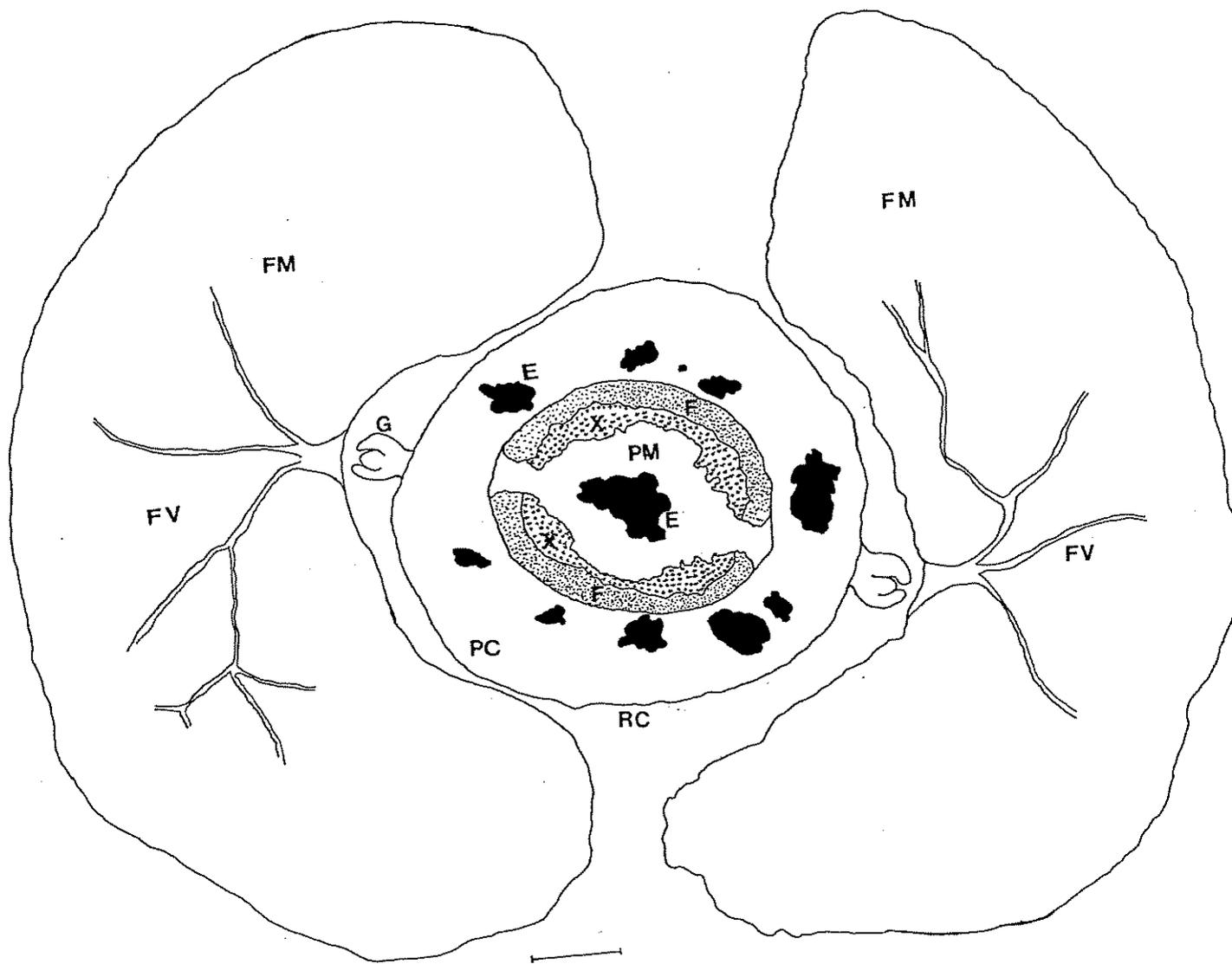


Figura 2 - Diagrama de corte transversal do órgão subterrâneo de *Kohleria* sp caracterizando sua natureza mista: caulinar e foliar. Região do caule (RC), folha modificada (FM), parênquima cortical (PC), esclerênquima (E), gema (G), floema (F), xilema (X), feixe vascular (FV) e parênquima medular (PM). Barra= 0,3mm.

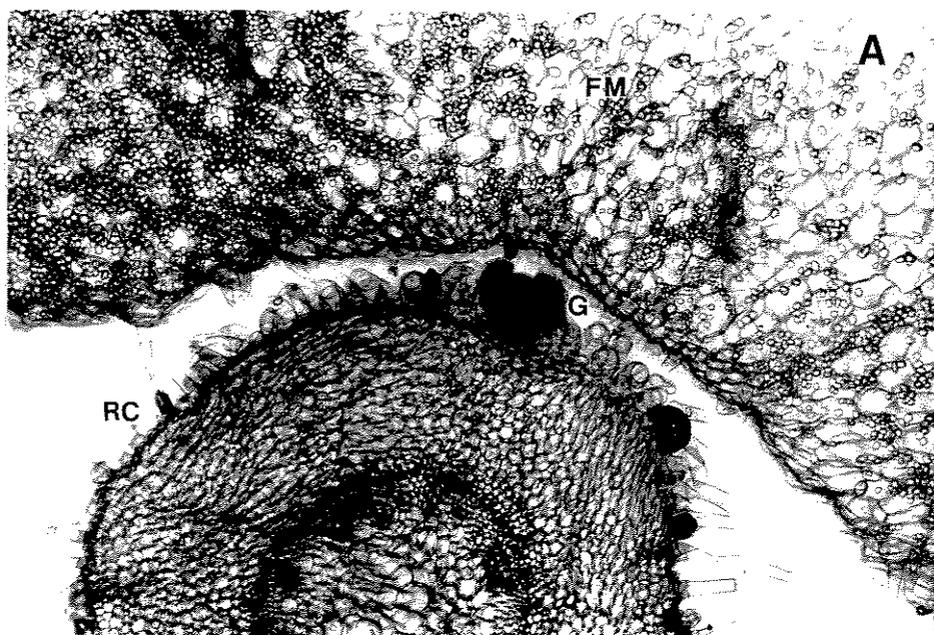


Figura 3A - Micrografia de corte transversal da secção do rizoma de *Kohleria* sp, obtida em microscópio óptico, mostrando: a região do caule (RC), folha modificada (FM), gema (G) e grãos de amido (GA). (Aumento de 10X).

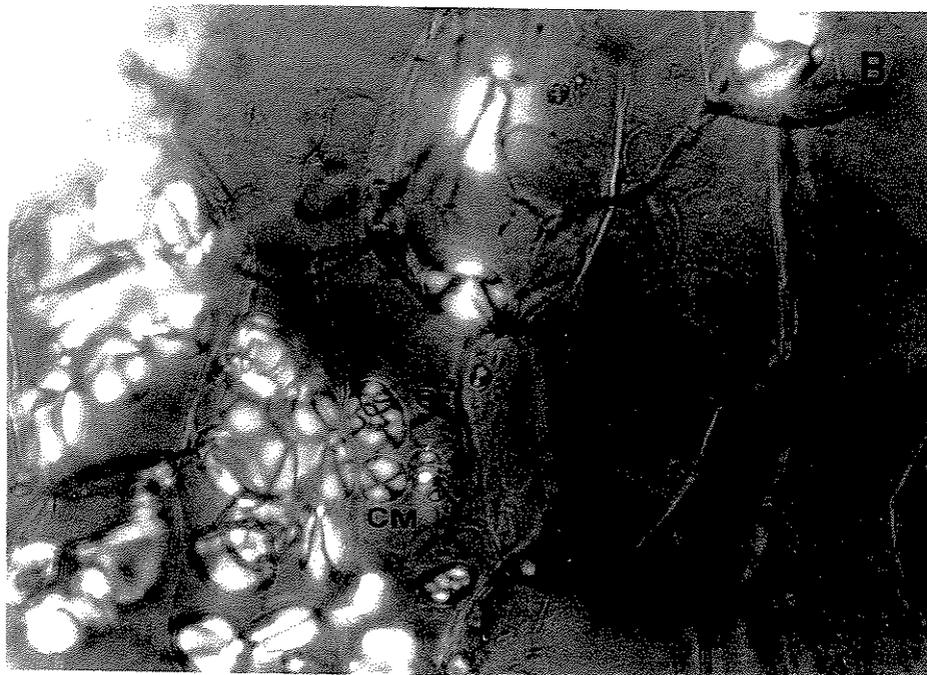


Figura 3B - Detalhe de birrefringência dos grãos de amido das células da folha modificada do rizoma de *Kohleria* sp. Notam-se figuras típicas em cruz-de-malta (CM). (Aumento de 20X).

Quando os cortes anatômicos foram tratados com solução de cloreto férrico não se identificou a presença de tanino em suas células. Já, com o teste de floroglucina observou-se a presença de lignina (reforço de parede celular) somente nas paredes das células da região do caule. Nas células dos parênquimas cortical e medular identificou-se a presença de esclerênquima. O teste com SUDAN IV caracterizou a presença de cutícula tanto na epiderme do caule quanto na epiderme das folhas modificadas do rizoma. Além disto, através da coloração com SUDAN IV foi possível observar a presença de corpúsculos que também ficaram corados de vermelho. Os corpúsculos estavam situados próximos às paredes celulares tanto das células do caule quanto da folha modificada.

1.3 - CARACTERIZAÇÃO DAS RESERVAS DO RIZOMA

A reserva predominante encontrada no rizoma de *Kohleria* sp foi o amido, que estava em maior quantidade nos órgãos jovens do que nos adultos (tabela 1).

Foi verificada ainda a presença de açúcares solúveis e polissacarídeos solúveis em água, ambos em quantidades significativamente menores que do amido. A quantidade de açúcares solúveis encontrada nos órgãos adultos foi próxima do dobro da verificada nos órgãos jovens. A quantidade verificada de polissacarídeos solúveis em água foi semelhante tanto nos órgãos jovens quanto nos adultos.

Tabela 1 - Dosagem de amido, açúcares solúveis e polissacarídeos solúveis em água de tecidos frescos de secções do rizoma de *Kohleria* sp (mg/g de tecido fresco).

Estádio de desenvolvimento do rizoma	Amido	Açúcares solúveis	Polissacarídeos solúveis em água
jovem	108,6 a	4,3 a	1,7 a
adulto	49,7 b	7,9 b	1,8 a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

1.4 - CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

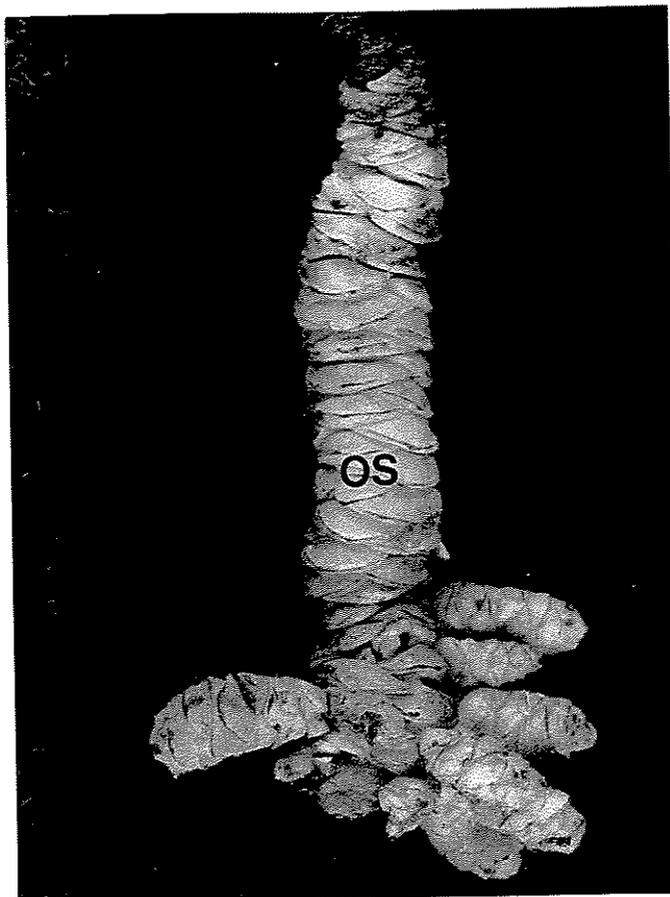
A análise preliminar do extrato etanólico de segmentos do rizoma evidenciou a presença de substâncias fenólicas que foi de 12,5mg/ml. Através de cromatografia de papel bidimensional, revelada com KOH (5%), observou-se a presença de manchas amarelas que foram identificadas como pertencentes ao grupo das antraquinonas, de acordo com VAN DEN BERG & LABADIE (1989). As manchas amarelas também foram encontradas quando se utilizou cromatografia de camada delgada (sílica) também revelada com KOH (5%).

2 - REPRODUÇÃO VEGETATIVA DAS PLANTAS DE *Kohleria* sp

A reprodução vegetativa de *Kohleria* sp ocorre principalmente por meio de seu rizoma. Na figura 4A observa-se o rizoma com brotações na sua porção apical. No detalhe do rizoma, na figura 4B, nota-se que a presença das brotações deve-se ao desenvolvimento das gemas localizadas nas axilas de cada folha modificada. Os rizomas eram aclorofilados e quando foram expostos à luz tornavam-se verdes.

Observou-se também a multiplicação de *Kohleria* sp por meio de estacas de seu caule ou de suas folhas destacadas. As gemas das axilas das folhas das estacas do caule começaram a brotar após o 7º dia que ficaram em vermiculita e no 13º dia iniciaram a formação de raízes. Já, as folhas destacadas passaram a enraizar após o 18º dia que estavam em vermiculita (dados não apresentados).

A



B

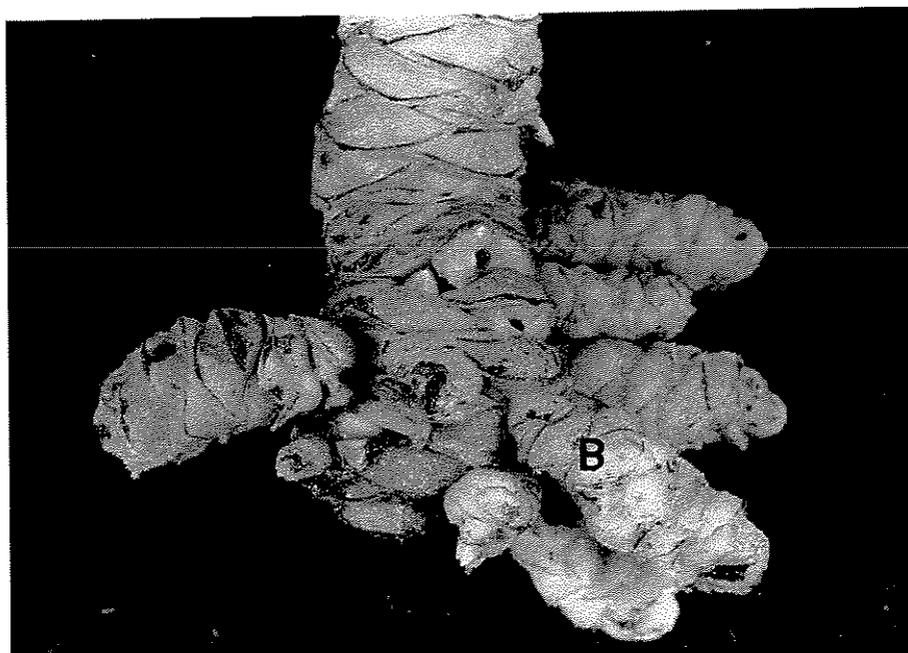


Figura 4 - A. Órgão subterrâneo (OS) de *Kohleria* sp com brotações (B). B. Detalhe das brotações caracterizando a sua emergência entre as folhas modificadas.

3.0 - ESTUDO DO PROCESSO DE BROTAÇÃO DAS SECÇÕES DO RIZOMA

3.1- EFEITO DO NÚMERO DE FOLHAS MODIFICADAS POR SECÇÃO

Considerando a abundância de folhas modificadas no rizoma, verificou-se, inicialmente, se o número destas por secção do rizoma poderia influenciar o processo de brotação. Para tanto testaram-se a brotação de secções com uma ou seis folhas modificadas. A figura 5 mostra que, quando o processo foi examinado ao longo do tempo, as secções com seis folhas modificadas tiveram sempre porcentagens maiores de brotação que aquelas com apenas uma folha, nas duas temperaturas testadas. Nas secções com uma folha modificada a brotação apresentou porcentagem mais elevada na temperatura de 30°C. Já, para as secções com seis folhas, as temperaturas de 25 e 30°C levaram a porcentagens semelhantes de brotação. Os resultados mostraram que a presença de número maior de folhas modificadas por secção favoreceu mais o processo de brotação do que apenas uma e a temperatura de 30°C foi mais favorável à brotação das secções só com uma folha modificada.

O tempo médio de brotação foi significativamente maior nas secções que estavam em temperatura de 25°C e só com uma folha modificada (tabela 2). Isto mostrou que a presença de seis folhas modificadas e a temperatura de 30°C também favoreceram as secções a terem menor tempo médio de brotação.

A partir dos resultados acima utilizaram-se secções do rizoma com seis folhas modificadas durante a condução deste estudo.

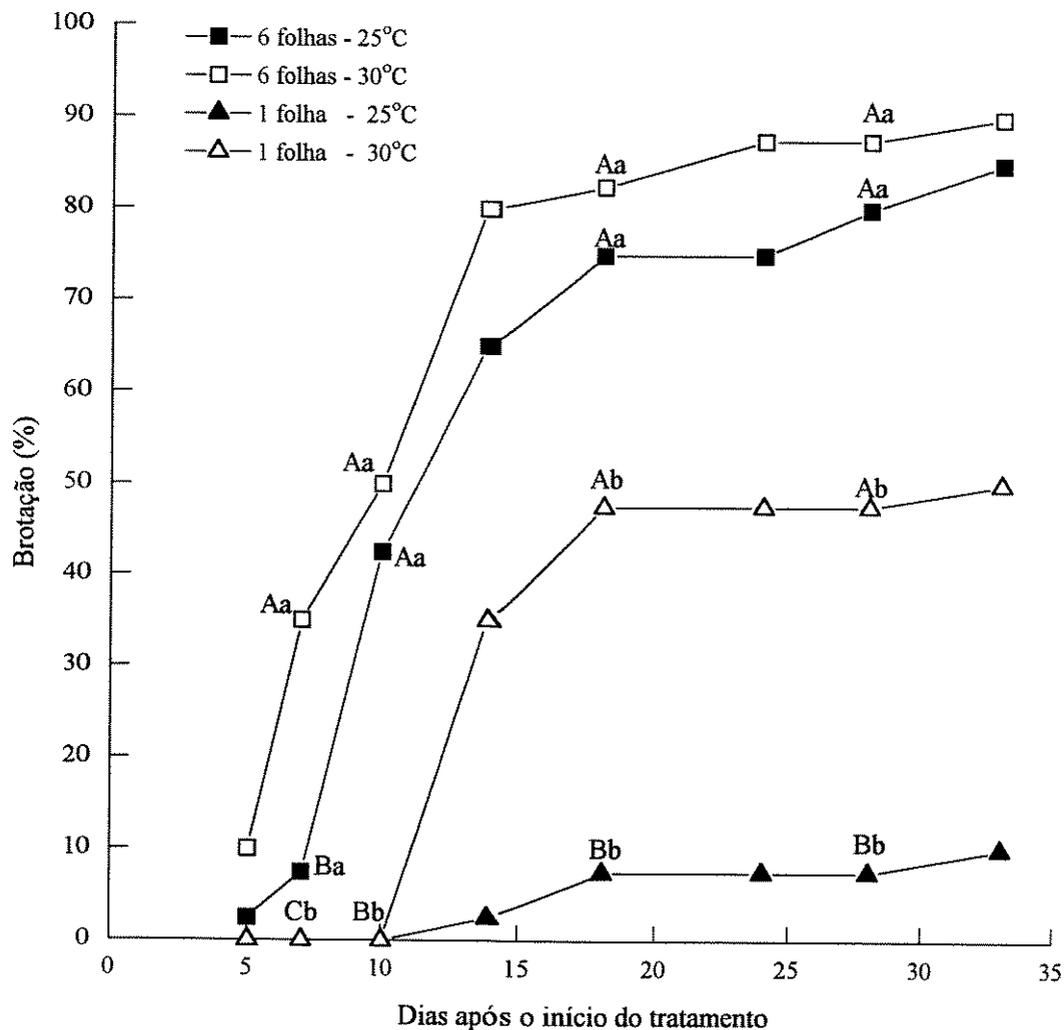


Figura 5 - Efeito do número de folhas modificadas por secção do rizoma de *Kohleria* sp no processo de brotação. As secções do rizoma ficaram em diferentes temperaturas e em luz contínua.

Letras maiúsculas: Comparam médias entre as temperaturas.

Letras minúsculas: Comparam médias entre número de folhas.

Tabela 2 - Tempo médio de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp, com uma ou seis folhas modificadas. As secções foram mantidas em temperaturas diferentes e em luz contínua.

Temperatura (°C)	Número de folhas/secção	Tempo médio de brotação (dias)*
25	1	20,8 ± 7,3
	6	14,1 ± 7,3
30	1	12,7 ± 6,6
	6	11,6 ± 5,8

(*)Valores seguidos de desvio padrão.

3.2 - EFEITO DE FATORES DO AMBIENTE NA BROTAÇÃO DAS SECÇÕES DO RIZOMA

3.2.1 - EFEITO DE LUZ E TEMPERATURA

As secções do rizoma brotaram tanto na luz quanto no escuro, nas temperaturas de 20 e 30°C (figura 6). Quando as secções permaneceram em temperatura de 30°C atingiram porcentagens maiores de brotação em menor tempo do que aquelas que ficaram em 20°C. Analisando-se o processo na temperatura de 30°C, nota-se que na presença de luz as secções alcançaram mais cedo porcentagem maior de brotação que aquelas que estavam no escuro. Na temperatura de 20°C a resposta não foi tão acentuada quanto em 30°C, mas a partir do 8º dia as secções na luz tiveram porcentagem maior de brotação do que aquelas no escuro. No entanto, no final do experimento as diferenças existentes entre os tratamentos desapareceram, todos atingiram porcentagens semelhantes de brotação. As respostas encontradas indicaram que as condições testadas causaram influência maior nos primeiros dias da brotação das secções e que a presença de luz e a temperatura de 30°C favoreceram o processo.

Na tabela 3 observa-se o tempo médio de brotação das secções do rizoma que ficaram em temperatura de 30°C, na luz e no escuro. O tempo médio de brotação foi menor nas secções que ficaram em 30°C e na presença de luz, mostrando que estas condições favoreceram a velocidade de brotação.

A influência da temperatura no processo de brotação ficou melhor evidenciada quando as secções do rizoma foram submetidas às temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35°C (figura 7). Nas temperaturas de 25 e 30°C as secções atingiram mais cedo as maiores

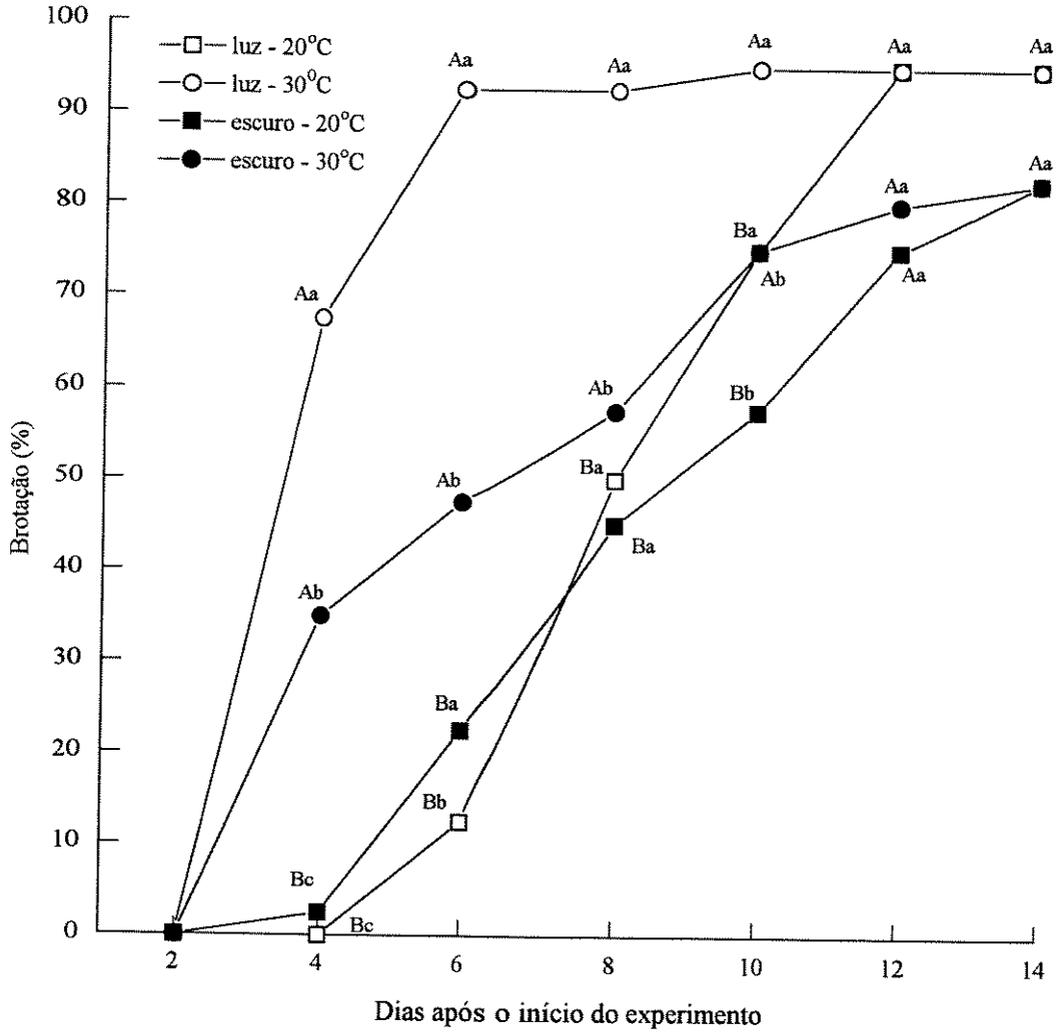


Figura 6 - Efeito de diferentes temperaturas na porcentagem de brotação de secções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram na luz e no escuro.
Letras maiúsculas: Comparam médias entre as temperaturas.
Letras minúsculas: Comparam médias entre os tratamentos de luz.

Tabela 3 - Tempo médio de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp que ficaram em temperaturas diferentes, na luz e no escuro.

Temperatura (°C)	Condição de luz	Tempo médio de brotação (dias)*
20	luz	9,1 ± 2,0
	escuro	7,8 ± 3,2
30	luz	4,7 ± 1,3
	escuro	6,9 ± 3,2

(*) Valores seguidos do desvio padrão.

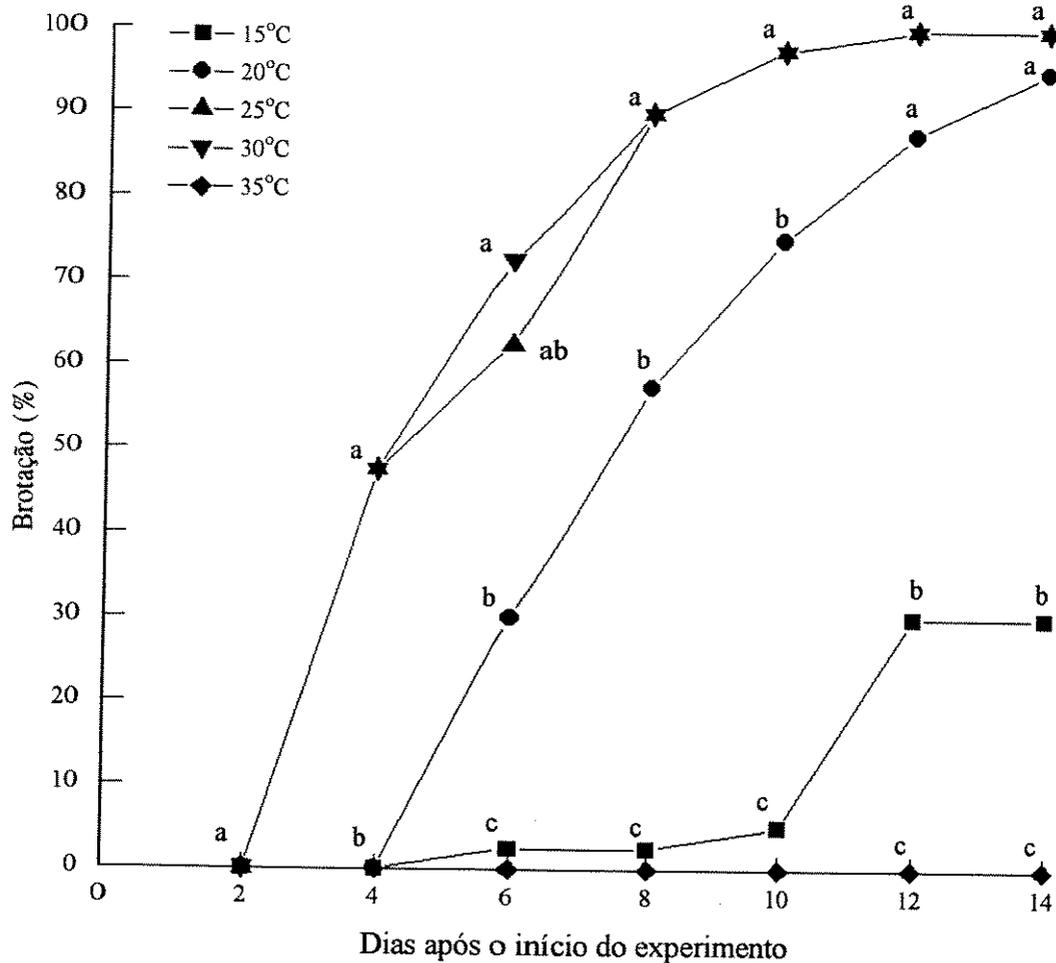


Figura 7 - Efeito de diferentes temperaturas na porcentagem de brotação de secções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram com 1,0ml de água no substrato e em luz contínua.

Letras diferentes dentro do mesmo dia de avaliação indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

porcentagens de brotação e ainda observa-se que as respostas dos dois tratamentos foram semelhantes ao longo de todo o experimento.

Na temperatura de 20°C as secções tiveram porcentagem menor de brotação do que aquelas que ficaram em 25 e 30°C, até por volta do 10º dia do experimento, e a partir do 12º dia esta diferença desapareceu entre os tratamentos. Isto mostrou que a temperatura de 20°C apenas atrasou o processo de brotação das secções em relação àquelas que ficaram em temperaturas mais altas. Já, a temperatura de 15°C causou uma redução significativa da brotação em relação às respostas das secções que ficaram a 20, 25 e 30°C, não atingindo porcentagem de brotação acima de 30%, até o final do experimento. As secções que permaneceram a 35°C não brotaram, mas quando foram transferidas para a temperatura de 30°C recuperaram a capacidade de brotação e atingiram 95% de brotação na luz e 30% no escuro.

Na tabela 4 também se evidencia a sensibilidade das secções do rizoma à influência da temperatura na sua brotação. Onde o tempo médio de brotação foi significativamente maior nas secções que ficaram a 15°C, mostrando que esta temperatura atrasou a brotação, enquanto os tempos médio de brotação daquelas que ficaram nas temperaturas de 25 e 30°C foram menores e ainda estatisticamente semelhantes.

Observa-se que as secções do rizoma quando estavam nas temperaturas 25 ou 30°C atingiram porcentagem significativamente alta de brotação já a partir do 4º dia do processo, o que mostrou que as gemas das secções estavam sensíveis para brotarem assim que fossem submetidas a condições favoráveis à brotação.

Tabela 4 - Tempo médio de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp que foram submetidas à temperaturas diferentes e em luz contínua.

Temperatura (°)	Tempo médio de brotação (dias)*
15	12,7 ± 2,4
20	9,1 ± 3,2
25	5,1 ± 1,9
30	6,4 ± 2,0
35	--

(--) Ausência de brotação. (*) Valores seguidos de desvio padrão.

3.2.2 - EFEITO DO TEOR DE HIDRATAÇÃO DO SUBSTRATO

Para testar a influência do teor de hidratação do substrato na brotação das secções do rizoma estas foram colocadas em placas de Petri com volumes de 1,0, 12,0 ou 20,0ml de água (figura 8). As secções em presença de 12,0ml de água no substrato atingiram mais cedo porcentagem significativamente maior de brotação que aquelas em apenas 1,0ml. No entanto, esta diferença não foi permanente, uma vez que ambos os tratamentos tiveram porcentagens semelhantes de brotação no final do experimento.

Embora o tempo médio de brotação não tenha sido estatisticamente diferente entre os tratamentos (tabela 5), pode-se destacar que as secções foram sensíveis ao volume de água do substrato, considerando que o processo foi favorecido quando havia disponibilidade maior de água. A sensibilidade ao volume de água disponível no substrato, também ficou evidenciada pela ausência de brotação quando as secções ficaram em 20,0ml de água. Verificou-se, que em substrato com volume de água superior a 12,0ml as secções tendiam a apodrecer. Isto mostrou que a brotação ocorreu satisfatoriamente quando as secções estavam em volume de até 12,0ml. Destaca-se também, deste experimento, que as secções na presença de 1,0ml de água no substrato alcançaram porcentagem alta de brotação numa condição que representou disponibilidade bastante reduzida de umidade, uma vez que este volume apenas umedeceu levemente o papel de filtro.

Nota-se ainda, dos resultados obtidos da influência do teor de hidratação, quando as secções estavam em condições ótimas, que foram as temperaturas de 25 ou 30°C e em substrato com disponibilidade maior de umidade, atingiram porcentagem alta de brotação entre o 3º e 4º dia do processo e por volta do 6º dia já atingiram quase 100%. Isto mostrou

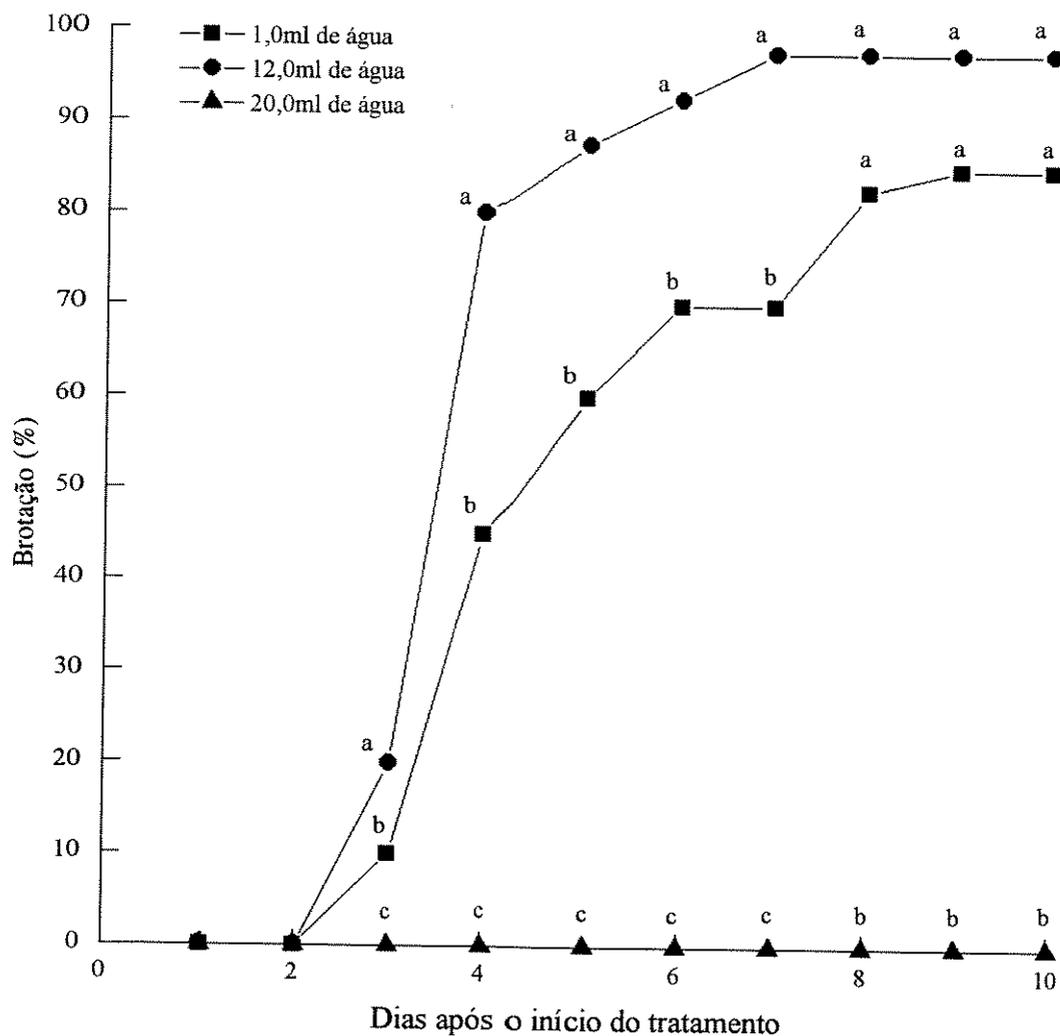


Figura 8 - Porcentagem de brotação de secções do rizoma de *Kohleria* sp que foram mantidas em diferentes volumes de água no substrato, em temperatura de 30°C e em luz contínua.

Letras diferentes dentro do mesmo dia de avaliação indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

Tabela 5 - Efeito do volume de água do substrato no tempo médio de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp, que foram mantidas em temperaturas diferentes e em luz contínua.

Volume de água do substrato (ml)	Tempo médio de brotação (dias)*
1,0	5,0 ± 1,7
12,0	4,1 ± 1,0
20,0	--

-- Ausência de brotação. (*) Valores seguidos de desvio padrão.

que as gemas das secções do rizoma foram sensíveis a brotarem logo que fossem expostas aos tratamentos e ainda que este processo foi bastante rápido.

4.0 - EFEITO DE SUBSTÂNCIAS REGULADORAS DE CRESCIMENTO NO NÚMERO DE BROTAÇÕES POR SECÇÃO DO RIZOMA

Durante os experimentos anteriores de brotação, notou-se que em geral em todas as condições testadas de temperatura, umidade e luz, houve o desenvolvimento de apenas uma brotação por secção do rizoma. No entanto, quando as secções foram tratadas com substâncias reguladoras de crescimento o número de brotação por secção foi maior.

O tratamento com ETREL ($10^{-3}M$) promoveu em média 4,3 brotações por secção do rizoma e aquelas sem tratamento tiveram 1,3. No entanto, a resposta de promoção de brotação só ocorreu nas secções mantidas em substrato com 12,0ml de água. Nas secções tratadas e sem tratamento em presença de 1,0ml de água as respostas foram semelhantes (tabela 6).

As secções do rizoma também responderam com número maior de brotação quando tratadas com 6BA ($10^{-3}M$). Entretanto, neste caso, a promoção ocorreu tanto nas secções que ficaram em substrato com 1,0ml de água quanto com 12,0ml (tabela 7). Nesta tabela, também se observa que o tratamento das secções com AIA não causou efeito estatisticamente significativo no número de brotações por secção.

Quando as secções do rizoma foram tratadas com a solução de 6BA + AIA ($10^{-3}M$) tiveram promoção estatisticamente significativa de brotação, e ainda nos dois teores de umidade testados.

Tabela 6 - Efeito da aplicação de ETREL ($10^{-3}M$) no número de gemas que brotaram por secção do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram com 1,0 ou 12,0ml de água no substrato. ETREL foi aplicado na forma de gota ($20\mu l$), todos os dias, durante dez dias. As secções foram avaliadas vinte dias após o início do experimento.

	Volume de água no substrato (ml)			
	1,0	12,0	1,0 + ETREL	12,0 + ETREL
Número de brotações por secção	1,0 b	1,3 b	1,9 b	4,3 a

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

Tabela 7 - Efeito da aplicação de 6BA ($10^{-3}M$), AIA ($10^{-3}M$) e AIA + 6BA ($10^{-3}M$) no número de gemas que brotaram por secção do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram com 1,0 ou 12,0ml de água no substrato. Cada solução foi aplicada na forma de gota ($20\mu l$), a cada dois dias, durante dez dias. As secções foram avaliadas vinte dias após o início do experimento.

Volume de água no substrato (ml)	CONTROLE	AIA	6BA	AIA+6B A
1,0	1,6 b	1,8 b	4,5 a	4,5 a
12,0	1,5 b	1,8 b	4,1 a	4,3 a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

5.0 - CARACTERIZAÇÃO DAS BROTAÇÕES DESENVOLVIDAS PELAS SECCÕES DO RIZOMA

5.1 - EFEITO DE TEMPERATURA E LUZ

Caracterizou-se o comprimento do caule e o número de folhas das brotações desenvolvidas pelas secções do rizoma, quando ficaram nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, na luz e no escuro (figura 9). Na figura 9A observa-se que o comprimento do caule foi maior nas brotações das secções que estavam em 25°C, tanto na luz quanto no escuro. Por outro lado, o comprimento de caule das brotações das secções que ficaram em 20 e 30°C foi semelhante, na luz e no escuro.

Já, o número de folhas foi semelhante entre as brotações das secções que ficaram na luz, em todas as temperaturas testadas. Entretanto, no escuro o número de folhas foi maior só nas brotações em 25°C. Destes resultados, observa-se que dentre as temperaturas testadas, 25°C foi ótima, favoreceu o comprimento de caule e número de folhas desenvolvidas pelas brotações, tanto na luz quanto no escuro.

5.2 - EFEITO DO FOTOPERÍODO

Secções do rizoma cujas brotações estavam com quinze dias de idade, que haviam sido previamente desenvolvidas em temperatura de 25°C e em luz contínua, foram transplantadas para vasos com terra e mantidas em casa de vegetação, em condições de dias curtos e longos. As brotações desenvolveram-se até o estágio de planta adulta nos dois fotoperíodos testados.

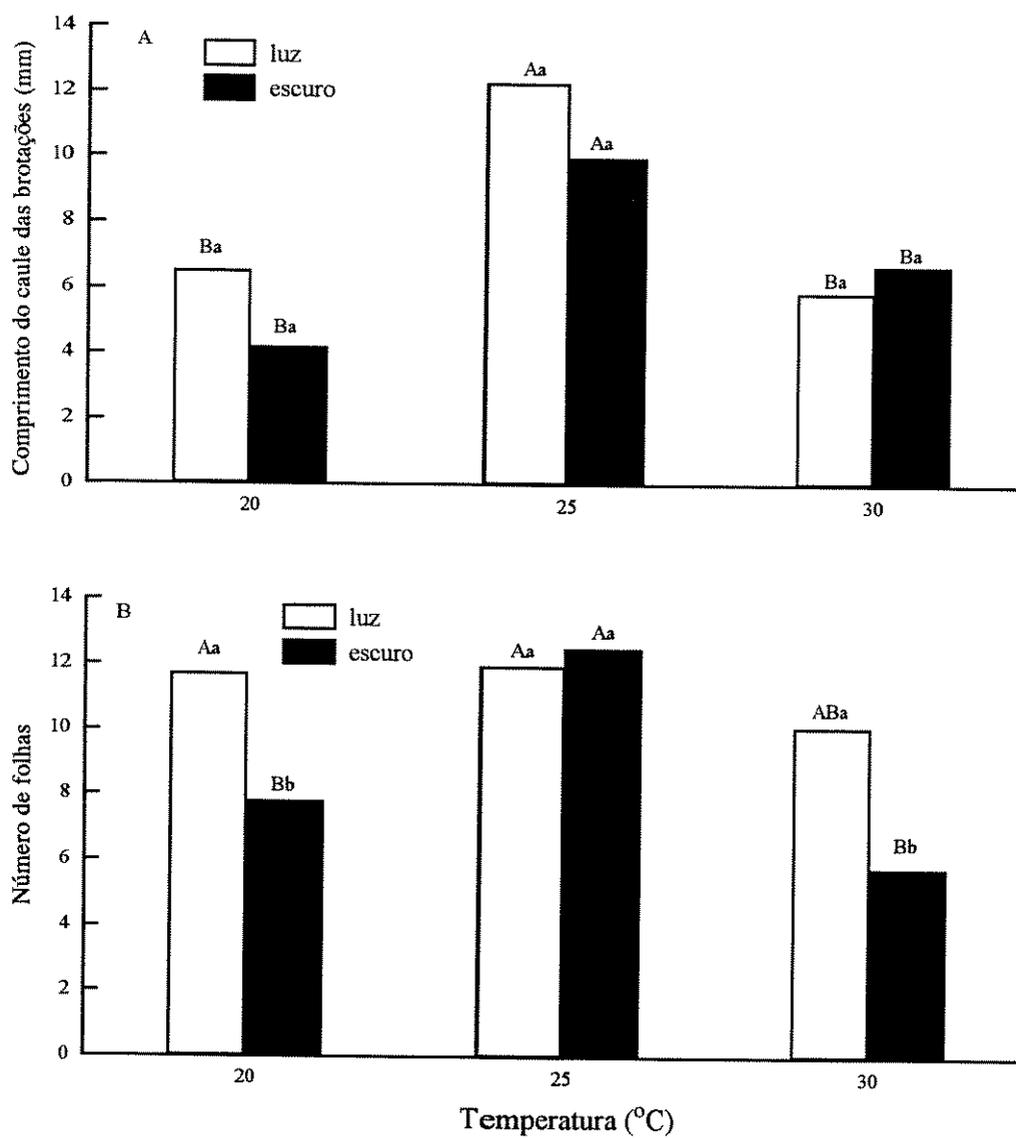


Figura 9 - Efeito de temperatura e luz no crescimento de caule (A) e no número de folhas (B) formados pelas brotações das secções do rizoma de *Kohleria* sp. As secções foram avaliadas com quinze dias de idade.

Letras maiúsculas: comparam os tratamentos de temperatura.

Letras minúsculas: comparam os tratamentos de luz.

As plantas desenvolvidas nas duas condições de luz formaram rizomas após três meses de cultivo (tabela 8). Isto mostrou que a iniciação dos rizomas em plantas de *Kohleria* sp foi indiferente ao fotoperíodo. Porém, o tamanho dos rizomas desenvolvidos foi bastante reduzido nas plantas de ambos os tratamentos.

Observou-se ainda que a condição de dia curto favoreceu o crescimento da parte aérea das plantas. A altura do caule das plantas, em dia curto, foi o dobro da atingida pelo caule das plantas em dia longo. A área foliar e a massa seca do 3º par de folhas das plantas em dia curto foram maiores do que daquelas em dia longo. Isto evidenciou a influência do dia curto no crescimento da parte aérea. O número de folhas foi semelhante entre as plantas nos dois fotoperíodos. Finalmente, verificou-se também que as plantas floresceram nas duas condições fotoperiódicas (tabela 8).

6.0 - ESTUDO DO PADRÃO DE BROTAÇÃO DAS SECÇÕES DO RIZOMA

As brotações das secções do rizoma de *Kohleria* sp podem se desenvolver em dois padrões morfológicos (figura 10). Na figura 10A observa-se o padrão parte aérea, onde a brotação se desenvolveu como a parte aérea de *Kohleria* sp. No outro tipo, a brotação se desenvolveu em um novo rizoma (figura 10B), que possui estrutura semelhante como a do rizoma.

Tabela 8 - Efeito do fotoperíodo no desenvolvimento vegetativo e floral de plantas de *Kohleria* sp cultivadas em vasos por três meses. As plantas foram obtidas a partir de brotações desenvolvidas das secções do rizoma.

	8 horas de luz	18 horas de luz
Presença de rizoma	+	+
Massa seca de rizoma (g)	0,2 a	0,25 a
Comprimento de caule (cm)	11,8 a	6,1 b
Área foliar do 3º par de folha (cm ²)	65,2 a	28,7 b
Massa seca do 3º par de folha (g)	1,0 a	0,7 b
Número de folhas/planta	9,6 a	7,8 a
Presença de flores	+	+

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

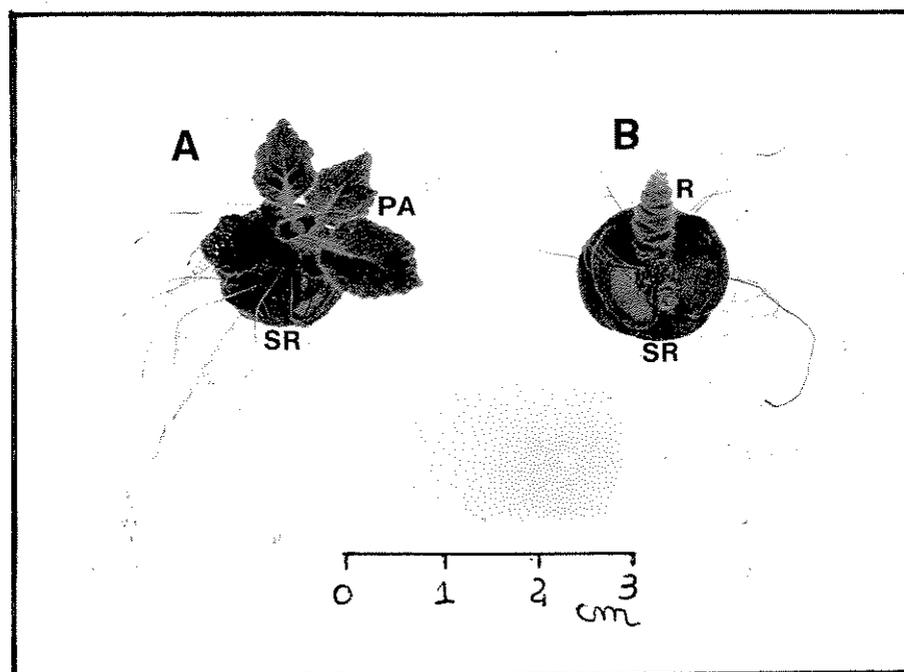


Figura 10 - Padrão de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp. A: Brotação do padrão parte aérea e B: Brotação do padrão rizoma. Secção do rizoma (SR), parte aérea (PA) e rizoma (R).

6.1 - EFEITO DE FATORES DO AMBIENTE NO PADRÃO DE BROTAÇÃO DESENVOLVIDO PELAS SECÇÕES DO RIZOMA

Inicialmente, avaliaram-se nas condições experimentais utilizadas, para a brotação das secções do rizoma, de quanto poderia ser a perda de água. Para tanto, observou-se a perda de água pelo sistema placa de Petri, folhas de papel de filtro e secção nas presenças de 1,0 e 12,0ml de água e ainda nas temperaturas de 20 e 30°C (tabela 9). A perda de água pelo sistema foi bastante reduzida tanto nas duas temperaturas testadas quanto com os volumes de 1,0 ou 12,0ml ao longo de dezenove dias. Durante todas as avaliações o volume de água perdido foi adicionado novamente em cada placa de Petri. Esta observação de perda reduzida de água mostrou que as condições iniciais de hidratação, neste sistema, tiveram alterações pequenas, ao longo da condução dos experimentos.

O volume de água do substrato determinou o padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma (figura 11). Secções que ficaram em substrato com 12,0ml de água desenvolveram o padrão parte aérea (figura 11A) e aquelas em 1,0ml de água tiveram o tipo rizoma (figura 11B). Notou-se também em todos os experimentos realizados, que as gemas de algumas secções que brotaram permaneciam com crescimento reduzido durante todas as observações feitas, o que foi quantitativamente menor que 10%. Isto impediu a identificação do tipo de brotação desenvolvida e foram então classificadas como indefinidas. Para evidenciar se o volume reduzido de água no substrato causaria alguma influência nas massas fresca e seca, as secções foram deixadas em 1,0 e 12,0ml de água no substrato, por 96 dias. Na tabela 10, observa-se que a massa fresca das secções e das brotações que ficaram em substrato com 12,0ml de água foi maior que das secções em presença de 1,0ml de água. No entanto, não houve diferença entre as massas seca das secções que

Tabela 9 - Determinação da perda de umidade (%) pelo sistema placa de Petri, papel de filtro e as secções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram em volumes de 1,0 e 12,0ml de água no substrato, em temperaturas 20 e 30°C e em luz contínua.

Dias após a montagem do experimento	Temperatura			
	20°C		30°C	
	Volume de água		Volume de água	
	1,0ml	12,0ml	1,0ml	12,0ml
3	0,3	0,4	0,2	0,1
6	0,6	0,6	0,1	0,1
9	0,4	0,3	0,2	0,1
11	0,3	0,3	0,2	0,02
13	0,2	0,3	0,1	0,04
15	0,04	0,6	0,1	0,1
17	0,03	0,1	0,2	0,1
19	0,01	0,04	0,1	0,1

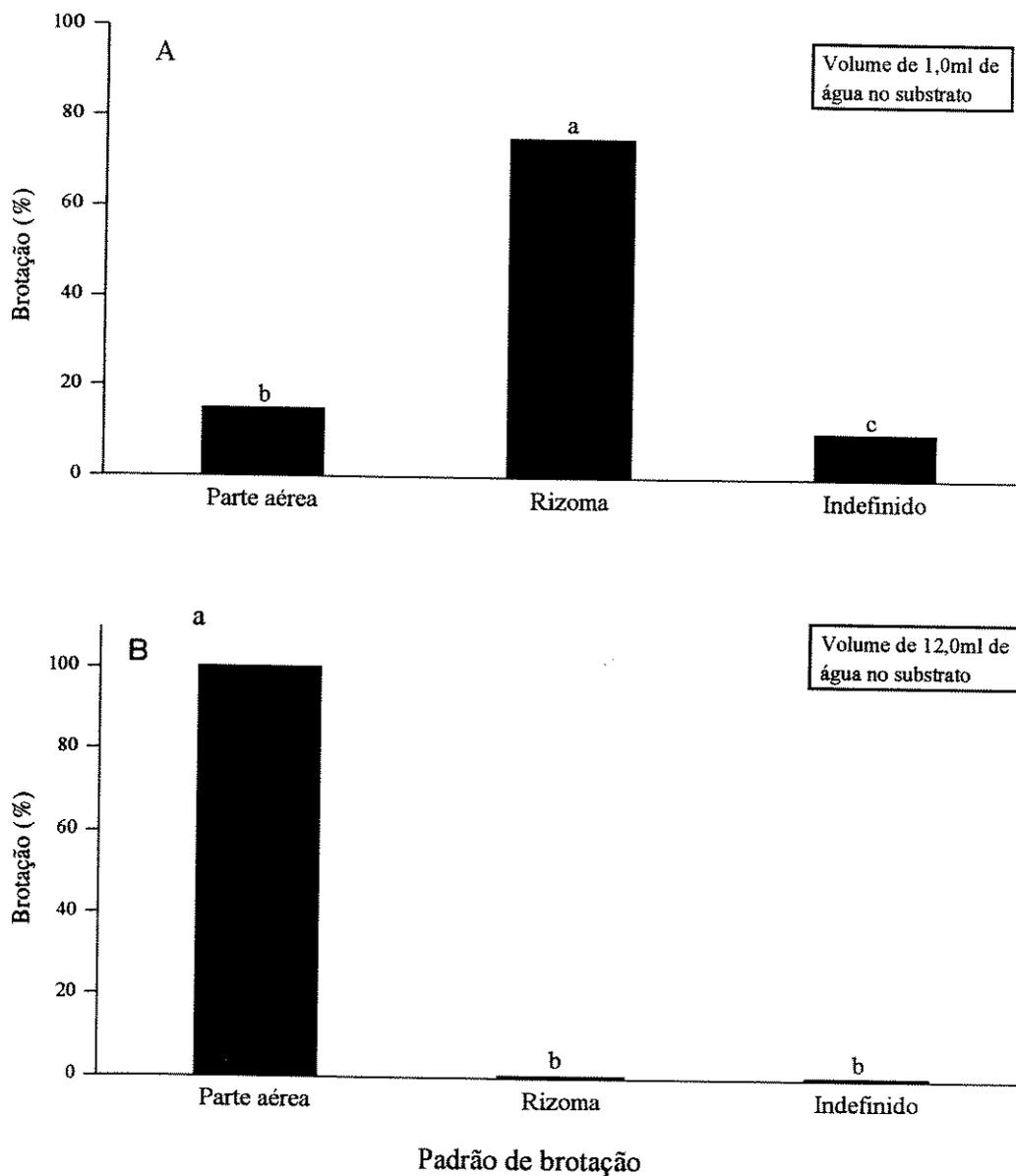


Figura 11- Efeito de diferentes volumes de água no substrato, 1,0 ml (A) e 12,0ml (B), no padrão de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp, que foram mantidas em temperatura de 30°C e em luz contínua. As secções foram avaliadas após vinte dias do início do experimento.

Letras diferentes em cada figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

Tabela 10 - Massas fresca (MF) e seca (MS) (g) de secções do rizoma de *Kohleria* sp e de suas brotações que foram mantidas por 96 dias em volumes diferentes de água no substrato, em temperatura de 30°C e em luz contínua. Sendo que as brotações das secções que ficaram em 12,0ml de água eram do tipo parte aérea e aquelas em 1,0ml tinham o padrão rizoma.

Volume de água no substrato (ml)	Secção do rizoma		Brotação da secção	
	MF	MS	MF	MS
1,0	0,5 b	0,1 a	0,1 b	0,009 b
12,0	0,8 a	0,1 a	0,5 a	0,028 a

Letra diferentes dentro de cada coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

permaneceram em 1,0 e 12,0ml de água no substrato. Quanto a massa seca das brotações esta foi maior nas secções que ficaram em substrato com 12,0ml de água que naquelas em 1,0ml.

Num outro experimento, observa se, de um modo geral, que a massa seca das secções em presença de 1,0ml de água não foi muito diferente das secções que permaneceram em 12,0ml de água, ao longo dos quatorze dias (tabela 11). Isto mostrou que as secções em substrato com 1,0ml de água não perderam muito de sua reserva.

Outra característica observada nas secções do rizoma foi quanto a presença de raízes. Quando as secções estavam com 1,0ml de água no substrato tiveram número menor de raízes do que as secções em 12,0ml (figura 12). As raízes que se desenvolveram nas secções em 12,0ml de água também apresentaram maior comprimento que das secções em 1,0ml. As raízes se formaram na própria secção entre as folhas modificadas e também em suas brotações.

O desenvolvimento de brotação do padrão rizoma esteve associado ao volume de até 1,0ml de água no substrato. Considerando que esta condição representou disponibilidade reduzida de água para as secções do rizoma, testou-se se esta resposta ocorreria em secções que fossem deixadas em solução de concentração osmótica baixa, simulando condição de potencial hídrico baixo. Para tanto, as secções foram mantidas em solução de polietilenoglicol em volume de 12,0ml, simulando a condição de excesso de água (figura 13). Utilizaram-se soluções de PEG que geraram os potenciais -3, -6 e -12MPa. As secções em todas as soluções de PEG desenvolveram brotações do padrão rizoma em porcentagem alta como as secções que estavam com 1,0ml de água no substrato (figura 13B). Na figura 13C observa-se que a porcentagem de brotação do tipo parte aérea foi significativamente

Tabela 11 - Massa seca de secções do rizoma de *Kohleria* sp, cuja massa fresca inicial foi sempre de 1g, mantidas em 1,0 e 12,0ml de água no substrato, em temperatura de 30°C e em luz contínua, durante 14 dias.

Dias após o início do tratamento	Massa seca das secções do rizoma (g)	
	Volume de água do substrato	
	1,0ml	12,0ml
2	0,2 a	0,1 b
4	0,2 a	0,1 a
6	0,2 a	0,1 b
8	0,2 a	0,2 a
10	0,2 a	0,2 a
12	0,2 a	0,1 b
14	0,2 a	0,1 b

Letras diferentes em cada linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

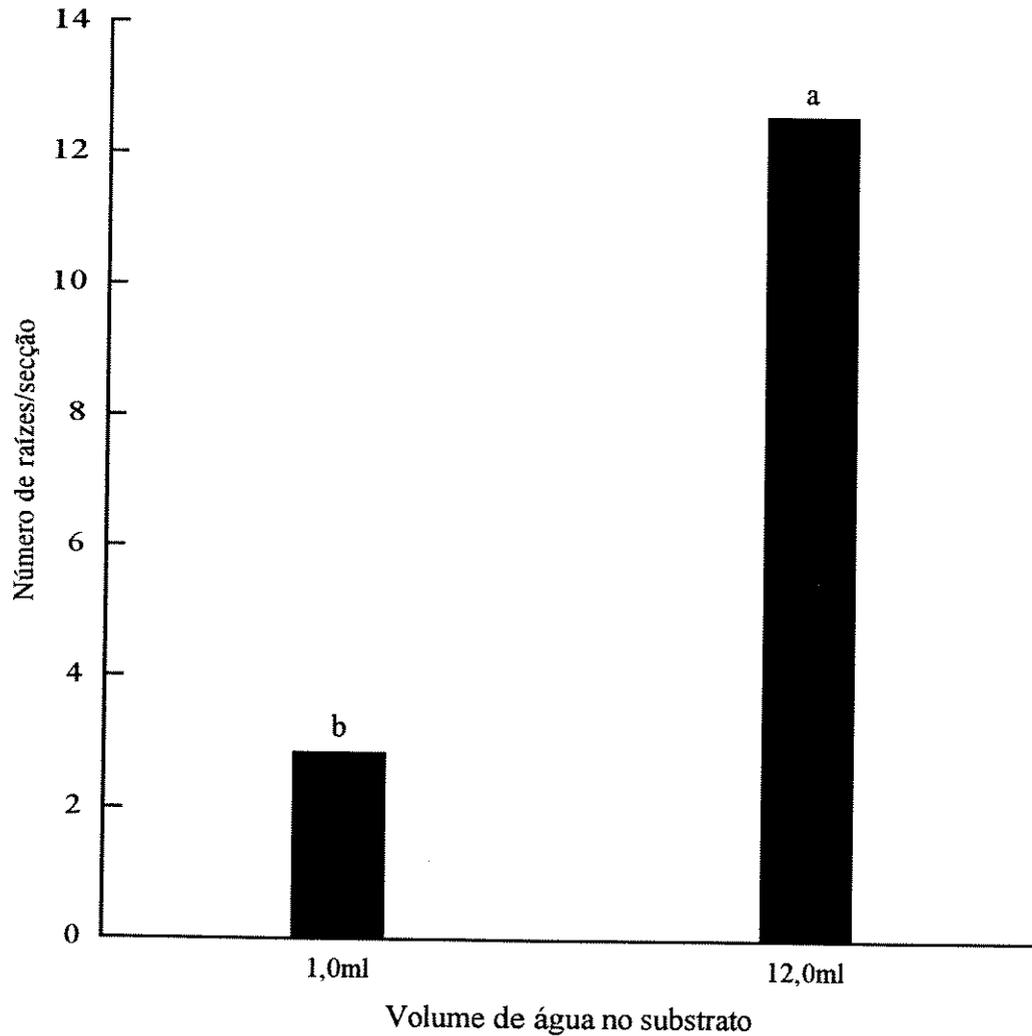


Figura 12 - Número de raízes formadas pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp e por suas brotações quando mantidas em substrato com 1,0 e 12,0ml de água, em temperatura de 30°C e em luz contínua.

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

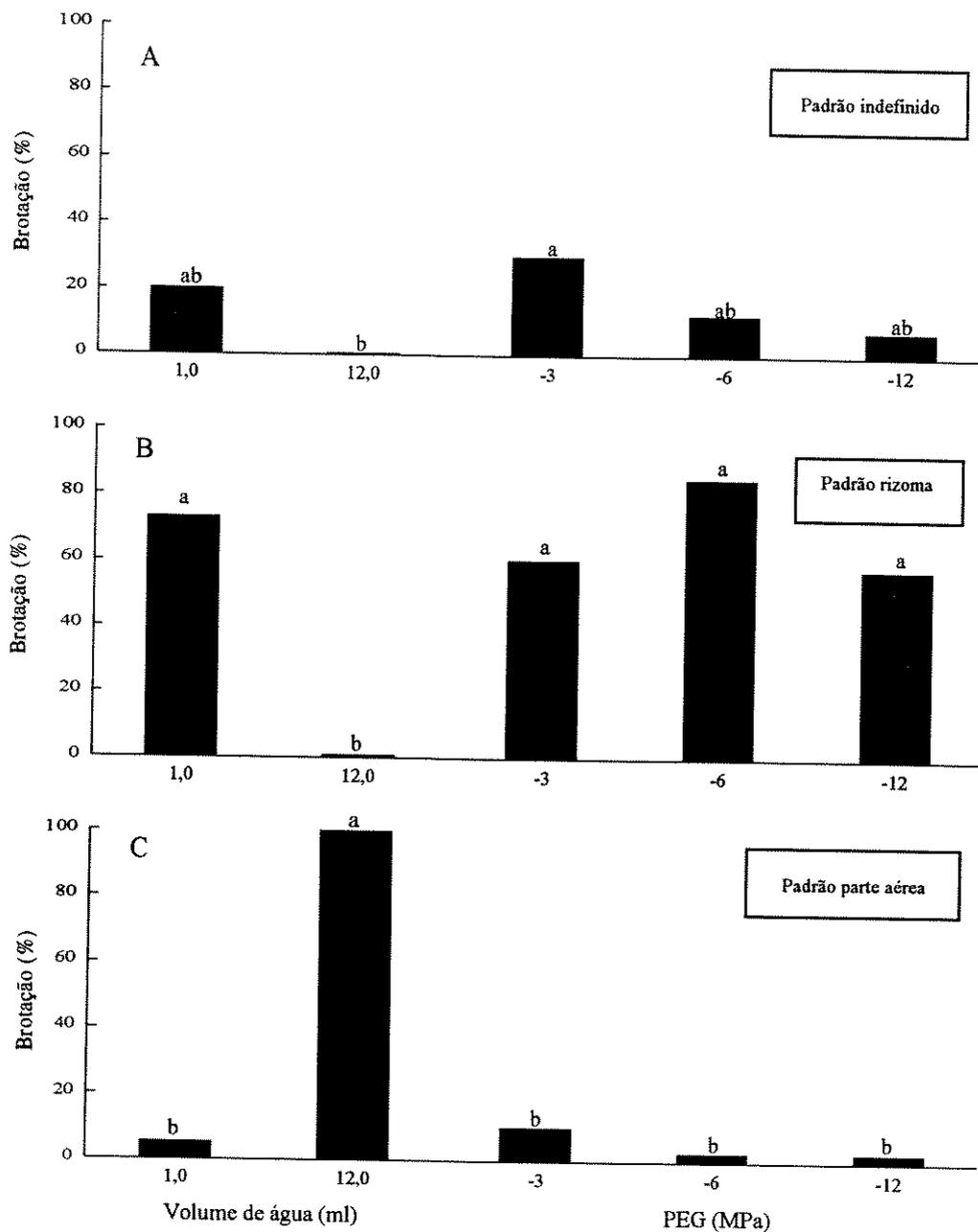


Figura 13 - Efeito de PEG no padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram em temperatura de 30°C e em luz contínua.

Secções controle ficaram em 1,0 e 12,0ml de água no substrato. Cada solução de PEG foi utilizada em volume de 12,0ml. As secções foram avaliadas vinte dias após o início do experimento.

Letras diferentes em cada figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

maior nas secções que ficaram com 12,0ml de água no substrato do que nos outros tratamentos. Embora as secções em presença de solução de PEG de -12MPa tenham desenvolvido brotação, após vinte dias a maioria delas apodreceu, mostrando portanto, ser esta uma concentração elevada. Com o efeito de PEG e a resposta das secções do rizoma com 1,0ml de água no substrato, pode-se relacionar o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma à presença de potencial hídrico baixo, já que este tipo de brotação ocorreu nas duas condições.

Conhecendo-se que 1,0ml de água no substrato representou disponibilidade reduzida de água, foi verificado se esta condição poderia causar algum tipo de ajustamento osmótico nas secções do rizoma. Para tanto foi feita a dosagem de prolina de secções do rizoma que ficaram em substratos com volumes de água de 1,0 e 12,0ml (figura 14). A prolina foi encontrada nos dois tratamentos e ainda em quantidades bastante reduzidas e semelhantes.

Para se identificar, nas condições experimentais deste estudo, até que volume de água as secções do rizoma de *Kohleria* sp desenvolveriam o padrão rizoma, testaram-se diferentes teores de umidade do substrato, nas temperaturas de 20 e 30°C. Verificou-se que a resposta do padrão de brotação desenvolvida pelas secções foi influenciada também por variações pequenas do volume de água do substrato (figura 15). Na figura 15B, nota-se que as secções que ficaram nos menores volumes, 1 e 2ml, desenvolveram brotações do padrão rizoma em porcentagem significativamente alta, tanto em temperatura de 20°C quanto em 30°C. A medida que o volume de água aumentou houve redução no desenvolvimento do tipo rizoma, principalmente nas secções que estavam em 30°C. Já, nas secções em 20°C, embora também tenham tido redução, ainda mantiveram a formação do padrão rizoma. Considerando o padrão parte aérea, nas figuras 15C e 15D, a sua ocorrência foi

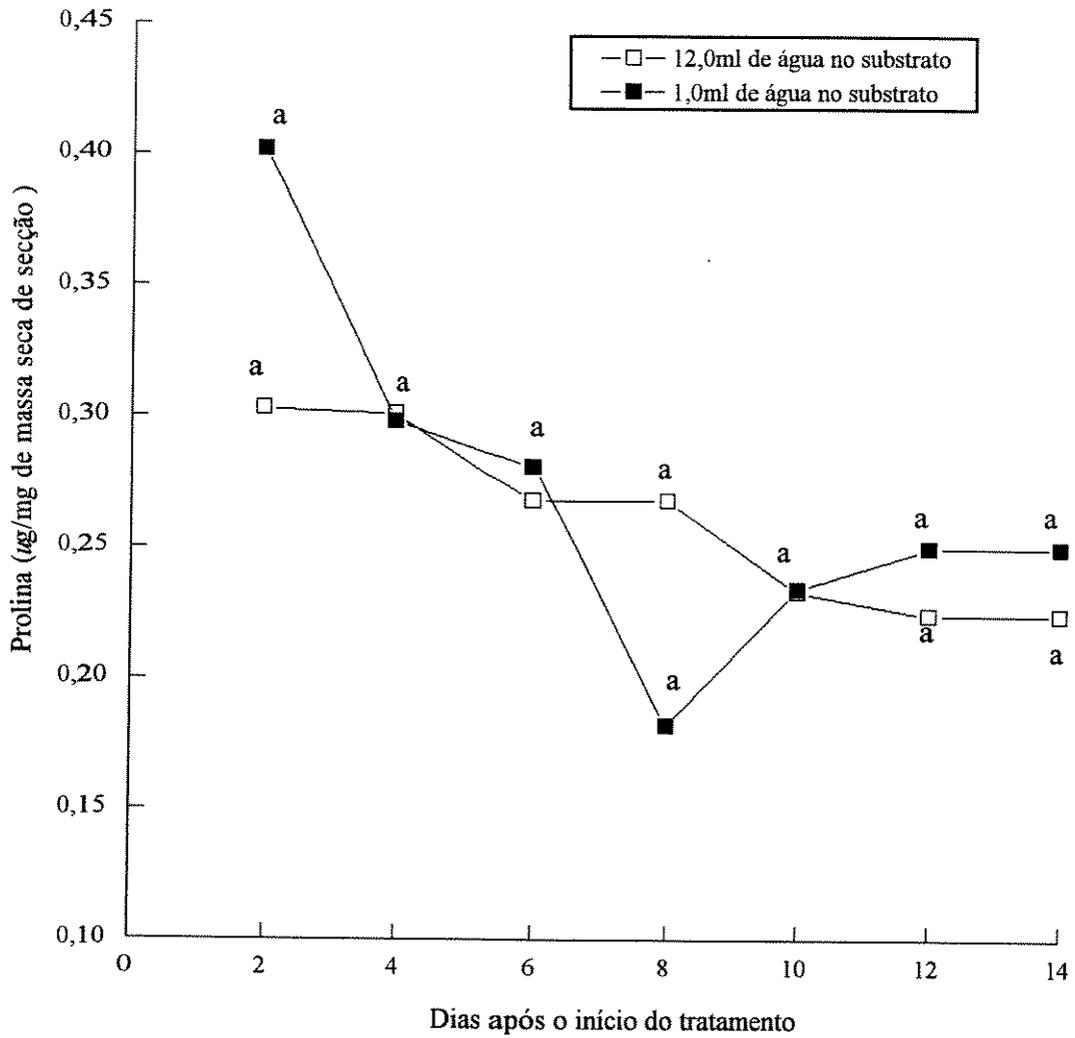


Figura 14 - Dosagem de prolina de secções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram com 1,0ml e 12,0ml de água no substrato, em temperatura de 30°C e em luz contínua. Letras diferentes no mesmo dia da coleta indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

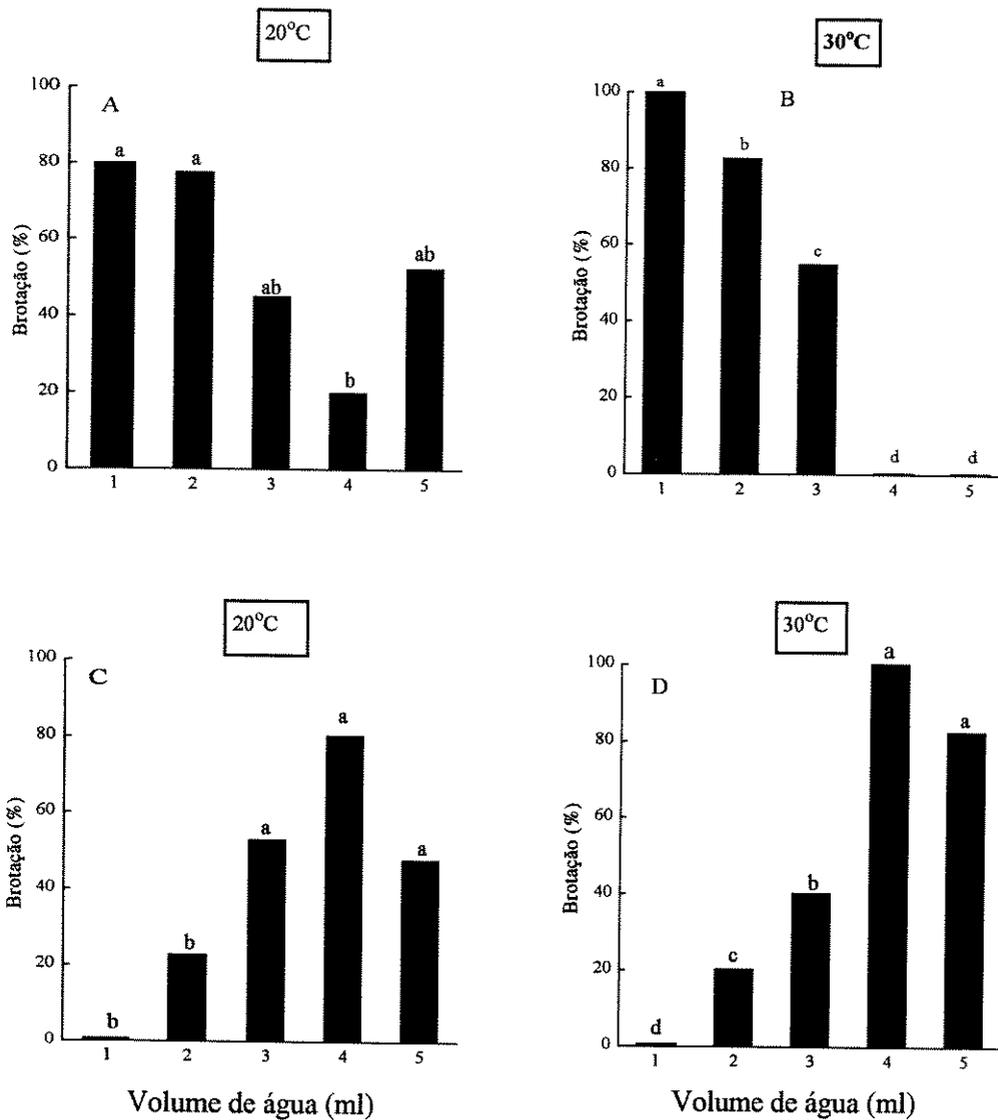


Figura 15 - Efeito de diferentes volumes de água no substrato no padrão de brotação desenvolvida pelas seções do rizoma de *Kohleria* sp, em temperaturas de 20 e 30°C. As seções ficaram em luz contínua e foram avaliadas após trinta dias do início do experimento.

A e B: Padrão Rizoma - C e D: Padrão Parte Aérea

Letras diferentes em cada figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

significativamente maior nas secções que ficaram em 4 e 5ml de água na temperatura de 30°C. Quando a temperatura foi de 20°C a ocorrência do tipo parte aérea foi menor. Por outro lado, nos volumes inferiores a 3ml de água a ocorrência de brotações do padrão parte aérea foi reduzida, tanto em 20°C quanto em 30°C. Os resultados da figura 15 evidenciaram novamente que o tipo de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma foi fortemente influenciado pelo teor de umidade do substrato. Outro aspecto observado foi que as secções foram sensíveis a variações pequenas no volume de água disponível no substrato. Assim, observa-se dos resultados que além do teor de umidade do substrato, a temperatura também influenciou o tipo de brotação desenvolvida pela secção. As secções em presença de volume maior de água (4 e 5ml) em 30°C desenvolveram o tipo parte aérea, e no mesmo volume de água mas em 20°C tiveram o padrão rizoma.

Num outro experimento, testou-se a influência da temperatura no padrão de brotação quando as secções do rizoma ficaram em 1,0 e 12,0ml de água no substrato. Brotações do padrão rizoma ocorreram em porcentagem significativamente maior nas secções que ficaram em 1,0ml de água, tanto em 20°C quanto em 30°C e ainda naquelas que estavam em 12,0ml de água, mas somente em 20°C (figura 16B). A figura 16C mostra a ocorrência de brotações do padrão parte aérea, em porcentagem alta somente nas secções que ficaram em 12,0ml de água e em temperatura de 30°C. Os resultados encontrados confirmaram a influência da temperatura de 20°C no desenvolvimento de brotações do padrão rizoma.

A influência da temperatura de 20°C no desenvolvimento de brotações do padrão rizoma foi confirmada novamente quando as secções do rizoma ficaram só com 12,0ml de água no substrato (figura 17). Através das figuras 17B e 17C nota-se que as secções em 20°C desenvolveram em porcentagem alta o tipo rizoma, e em 30°C tiveram maior

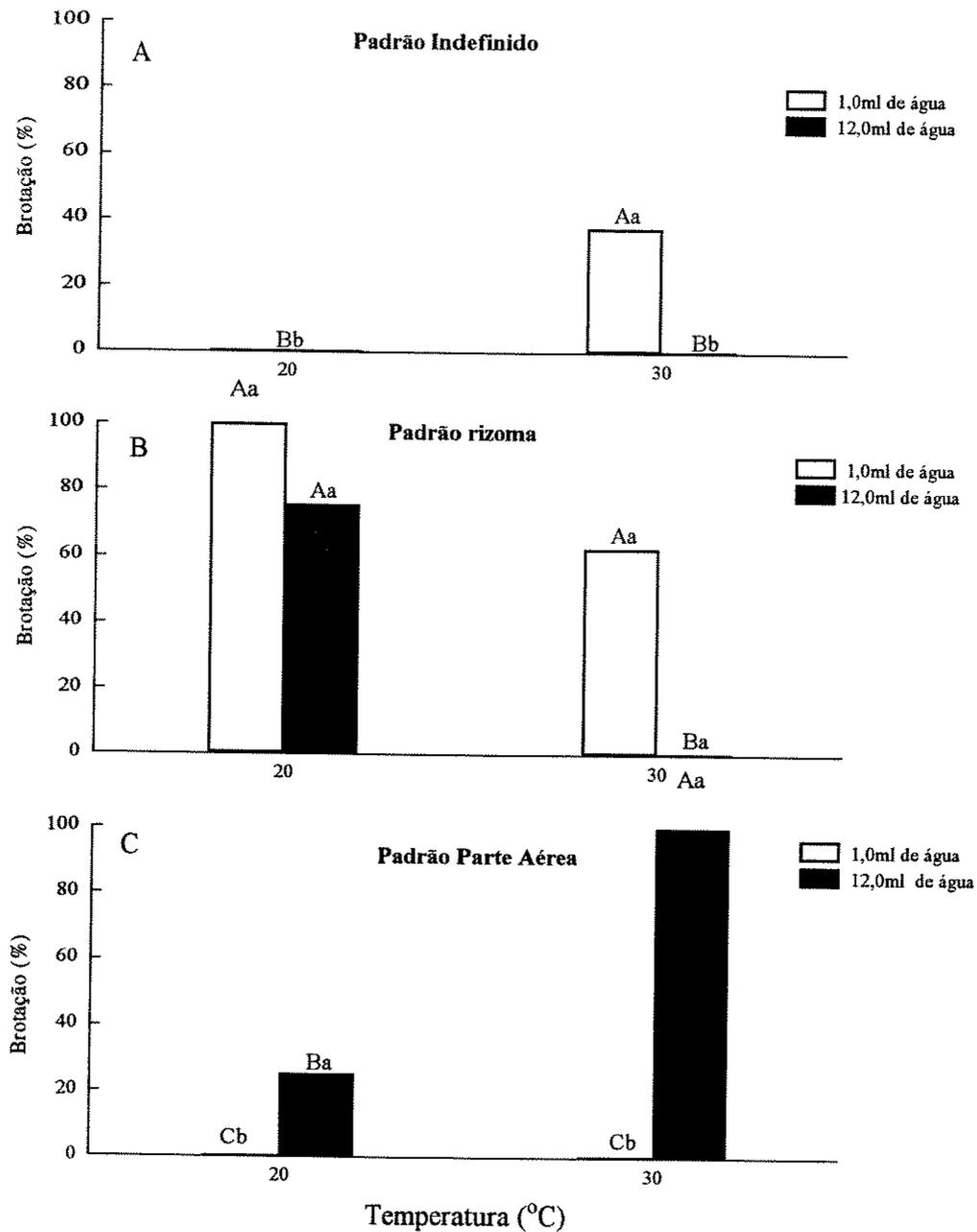


Figura 16 - Efeito das temperaturas de 20 e 30°C no padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp. As secções foram mantidas em substrato com 1,0 e 12,0ml de água e em luz contínua. A Avaliação das brotações foi feita após vinte dias do início do experimento.

Letras maiúsculas: Comparam tratamento de volume de água.

Letras minúsculas: Comparam tratamento de temperatura.

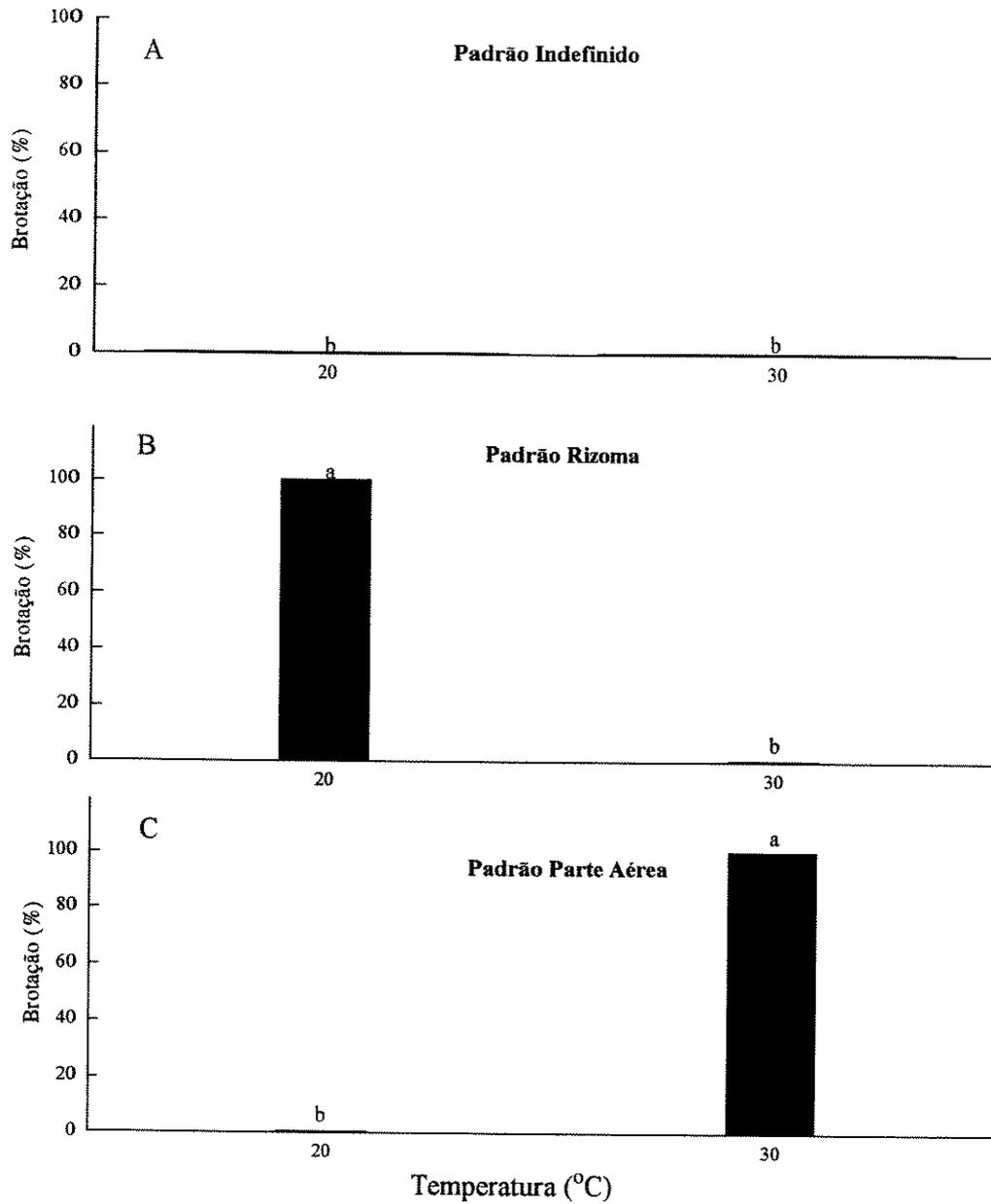


Figura 17 - Efeito de temperaturas diferentes no padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp quando mantidas em 12,0ml de água no substrato e em luz contínua. A avaliação foi feita após 20 dias do início do experimento.

Letras diferentes na mesma figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

porcentagem do padrão parte aérea, respectivamente. Isto evidenciou que a temperatura de 20°C pode exercer alguma influência na formação de brotações do padrão rizoma e que a ocorrência do tipo parte aérea está ligada à disponibilidade maior de água no substrato e à temperatura de 30°C.

Outra evidência da influência da temperatura no padrão de brotação foi encontrada quando se transferiram secções mantidas por trinta dias em temperatura de 30°C para 20°C e secções de 20°C para 30°C, que estavam em 1,0 e 12,0ml de água (tabela 12). As secções que estavam inicialmente em temperatura de 30°C e em 12,0ml de água tinham 100% de parte aérea e quando transferidas para 20°C os ápices de 20% destas brotações passaram a desenvolver o padrão rizoma. As secções que inicialmente ficaram em 20°C e também em 12,0ml de água tiveram 87,5% do padrão rizoma e quando foram transferidas para 30°C, o ápice de 55% destas brotações passaram a desenvolver o padrão parte aérea. Já, as secções em 1,0ml de água no substrato, nas duas temperaturas testadas, desenvolveram brotações do padrão rizoma. Neste caso, a transferência de temperatura causou mudança somente nos ápices das brotações que estavam inicialmente em 20°C e quando transferidas para 30°C, 40% das brotações do padrão rizoma passaram a desenvolver o tipo parte aérea. Os resultados do experimento de transferência de temperatura, ressaltaram a sua influência no tipo de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma.

A presença ou ausência de luz não causou influência no tipo de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma, quando nas temperaturas de 20 e 30°C (figura 18). Na figura 18B, nota-se que as secções que ficaram na temperatura de 20°C tiveram maior porcentagem de brotação do padrão rizoma do que as secções que ficaram em 30°C. No entanto, nas duas temperaturas testadas a presença de luz favoreceu porcentagem maior de brotação.

Tabela 12 - Efeito da transferência de secções do rizoma de *Kohleria* sp, das temperaturas de 30 e 20°C, para as de 20 e 30°C, respectivamente, no padrão de brotação desenvolvida por estas. As secções estavam em 1,0 ou 12,0ml de água, em luz contínua e ficaram por 30 dias em cada temperatura

Volume de água no substrato (ml)	Temperaturas (°C)	
	30 → 20	20 → 30
1,0	100,0% de rizoma	100,0% de rizoma
	↓	↓
	100,0% de rizoma	40,0% de parte aérea
12,0	100,0% de parte aérea	87,5% rizoma
	↓	↓
	20,0% de rizoma	55,0% parte aérea

A seta indica o padrão de brotação formado na temperatura inicial e o padrão de brotação formado após sua transferência para a outra temperatura.

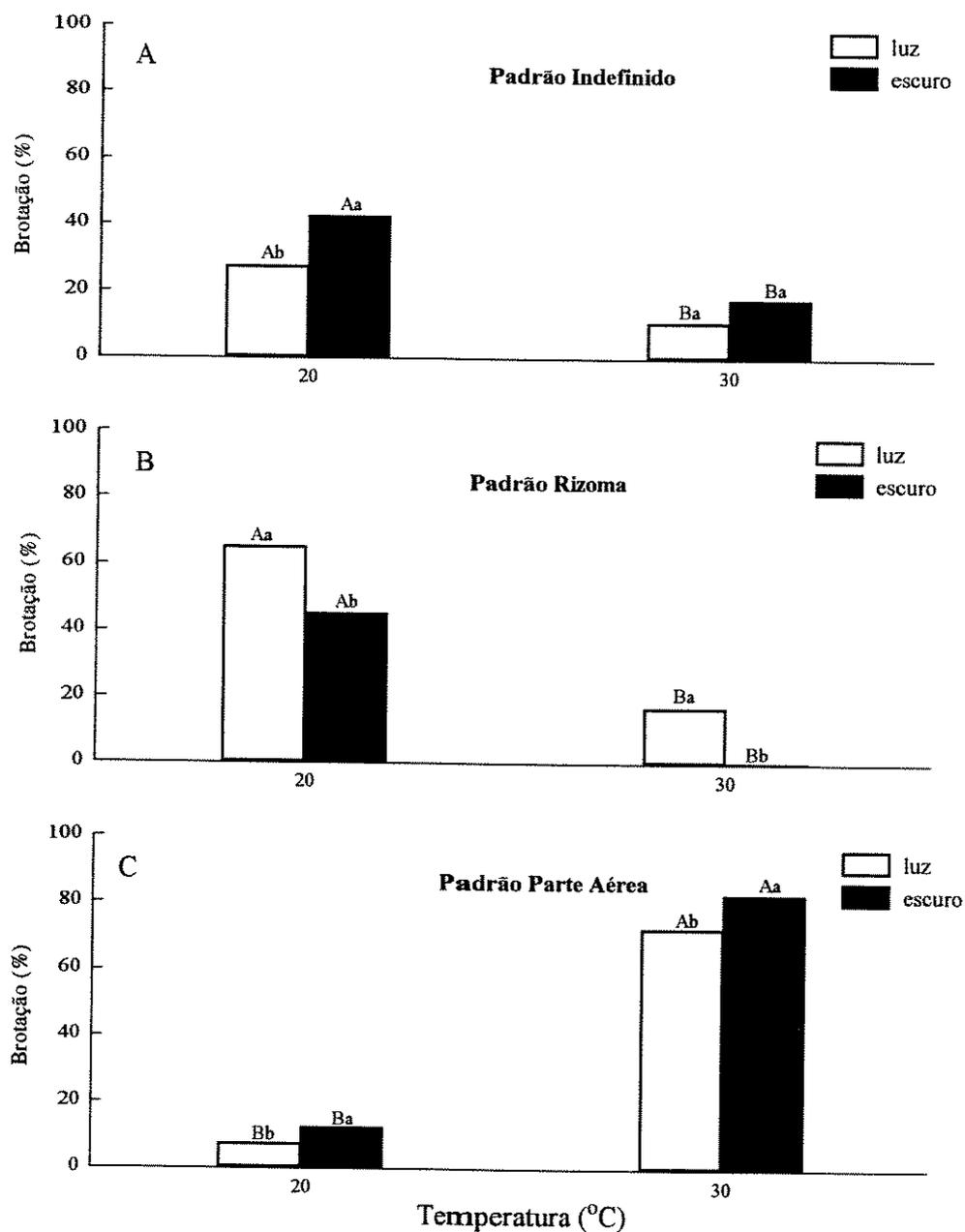


Figura 18 - Efeito das temperaturas de 20 e 30°C no padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp. As secções ficaram em substrato com 5ml de água, na luz e escuro e foram avaliadas vinte dias após o início do experimento. Letras maiúsculas: Comparam tratamento de temperatura. Letras minúsculas: Comparam tratamento de iluminação.

7.0 - ENVOLVIMENTO DE SUBSTÂNCIAS DE CRESCIMENTO COM O DESENVOLVIMENTO DO PADRÃO RIZOMA PELAS SECÇÕES DO RIZOMA

Do estudo do padrão de brotação caracterizou-se que, independentemente da temperatura utilizada, quando as secções do rizoma estavam em 1,0ml de água no substrato tiveram o desenvolvimento do padrão rizoma. O mesmo padrão também se desenvolveu quando as secções estavam em soluções de polietilenoglicol, que geraram os potenciais hídrico de -3, -6 e -12 MPa.

Etileno e ácido abscísico são substâncias de crescimento conhecidas por mediar as respostas das plantas em condição de falta de água e as soluções de PEG (-3, -6 e -12 MPa) causaram uma situação de disponibilidade reduzida de água para as secções do rizoma de *Kohleria* sp. A partir das considerações acima verificou-se o envolvimento de etileno e ABA com o controle do desenvolvimento de brotação do padrão rizoma pelas secções do rizoma.

7.1 - EFEITO DE ETREL NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

ETREL é uma substância conhecida por liberar etileno. Secções do rizoma quando em substrato com 12,0ml de água e tratadas com ETREL (10^{-3} M) desenvolveram brotações do padrão rizoma em porcentagem significativamente maior que aquelas sem tratamento, no mesmo volume de água (figura 19B). Por outro lado, esta resposta foi semelhante à das secções sem tratamento que estavam em 1,0ml de água. Já, na figura 19C, nota-se que as secções em 12,0ml de água, sem tratamento, tiveram porcentagem alta de brotações do padrão parte aérea.

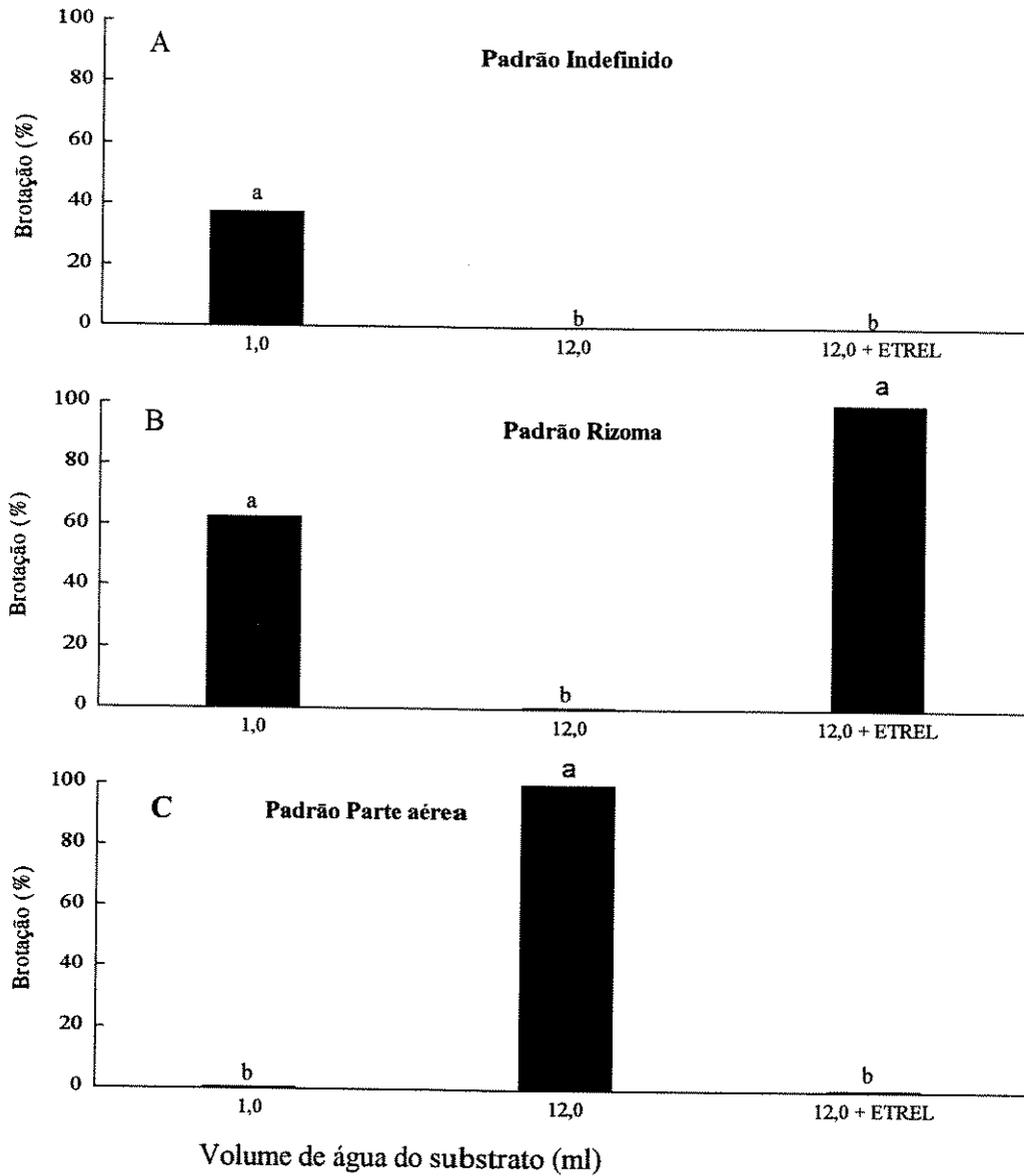


Figura 19 - Efeito de ETREL (10^{-3} M) no padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp. As secções ficaram em substrato com 1,0 e 12,0ml de água, em temperatura de 30°C e em luz contínua. ETREL foi aplicado na forma de gota (20 μl), a cada dois dias, durante dez dias. As secções foram avaliadas vinte dias após o início do experimento.

Letras diferentes em cada figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

7.2 - EFEITO DE NITRATO DE PRATA (AgNO_3) NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

Nitrato de prata é conhecido por inibir a ação de etileno em tecido vegetal. AgNO_3 foi aplicado uma única vez, nas concentrações de 1, 10, 50, 100, 200 ou 500mg.L^{-1} em secções do rizoma que ficaram em substrato com 1,0ml de água (figura 20). Quando se comparam os resultados das secções que ficaram com 1,0ml de água no substrato sem tratamento com as tratadas, nota-se que AgNO_3 inibiu significativamente o desenvolvimento de brotações do tipo rizoma (figura 20B). O efeito de inibição do AgNO_3 foi mais intenso nas concentrações mais altas, de 50 a 500mg.L^{-1} . Já na figura 20C, observa-se que as secções tratadas com AgNO_3 , que estavam em 1,0ml de água, passaram a desenvolver em porcentagem significativamente alta o padrão parte aérea como aquelas sem tratamento que estavam em 12,0ml de água no substrato. As concentrações menores ($1,0$ e 10mg.L^{-1}) de AgNO_3 foram menos eficiente em inibir o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma.

As respostas das secções do rizoma aos tratamentos com ETREL e AgNO_3 evidenciaram que etileno poderia estar associado ao controle do desenvolvimento de brotação do padrão rizoma.

A maioria das brotações das secções do rizoma tratadas com nitrato de prata desenvolveu um botão floral no seu ápice (figura 21). O botão floral estava ligado à brotação através de um pedúnculo. A flor se desenvolveu completamente até a antese e tinha características semelhantes à flor de uma planta adulta de *Kohleria* sp, tanto em tamanho quanto em coloração. O desenvolvimento desta flor ocorreu após 60 dias do início do experimento.

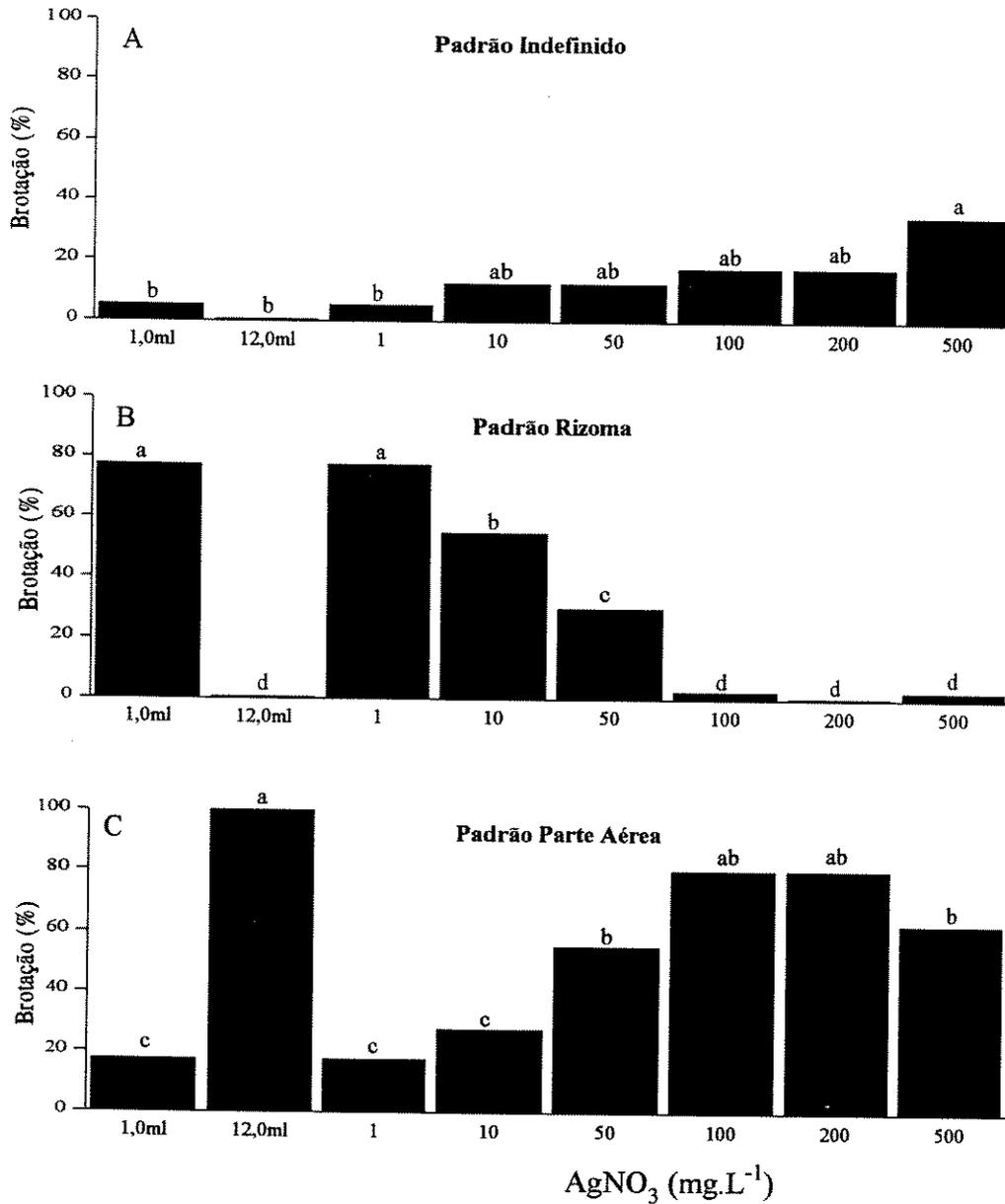


Figura 20 - Efeito de AgNO₃ no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com 1,0ml de água e secções controle em 1,0 e 12,0ml. Os tratamentos ficaram na temperatura de 30°C, em luz contínua e foram avaliados 20 dias após o início do experimento. AgNO₃ foi aplicado na forma de gota (50µl) em cada secção, uma única vez. Letras diferentes em cada figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

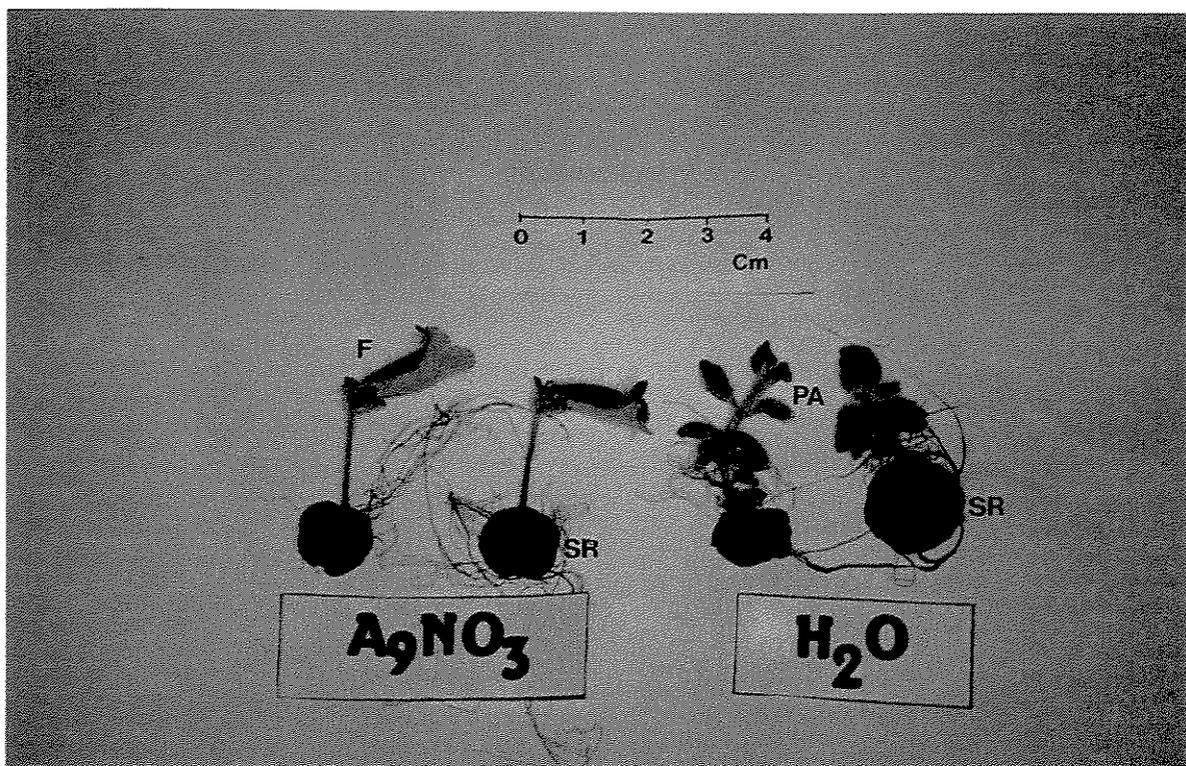


Figura 21 - Flor desenvolvida no ápice da brotação de secções de rizoma de *Kohleria* sp tratadas com nitrato de prata ($200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A observação foi feita após 60 dias da montagem do experimento. Secção do rizoma (SR), flor (F), brotação do tipo parte aérea (PA).

7.3 - EFEITO DE AUXINA E 6BA NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

Alguns estudos indicam que auxinas e citocininas podem estimular, por via indireta, a produção de etileno em tecido vegetal. Verificou-se se esta relação poderia ter ocorrido e influenciado o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma pelas secções do rizoma. As secções tratadas com as soluções de AIA ($10^{-3}M$), 6BA ($10^{-3}M$) e AIA + 6BA ($10^{-3}M$), ficaram em substrato com 1,0 ou 12,0ml de água (tabela 13). Estas substâncias não causaram qualquer efeito no padrão de brotação desenvolvida pelas secções que estavam em 12,0ml de água. No entanto, quando o teor de umidade do substrato foi de 1,0ml de água as secções tratadas desenvolveram brotações do padrão parte aérea, enquanto aquelas sem tratamento desenvolveram o tipo rizoma.

7.4 - EFEITO DE ACC NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

ACC é o precursor imediato da síntese de etileno. A aplicação de ACC ($10^{-3}M$), na forma de gota, nas secções do rizoma que ficaram em 12,0ml de água no substrato não causou qualquer efeito no tipo de brotação desenvolvida (figura 22). As secções que ficaram em 1,0ml de água no substrato desenvolveram brotações do tipo rizoma (figura 22B) e o tipo parte aérea ocorreu nas secções que estavam em 12,0ml de água no substrato, tanto nas controle quanto nas tratadas (figura 22C).

Tabela 13 - Efeito da aplicação de 6BA (10^{-3} M), AIA (10^{-3} M) e 6BA + AIA (10^{-3} M) no padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram em 1,0 ou 12,0ml de água no substrato e em temperatura de 30°C. Cada solução foi aplicada na forma de gota (25µl) a cada dia, em cada secção, durante dez dias. As secções foram avaliadas após vinte dias da montagem do experimento.

Volume de água no substrato (ml)	Substância aplicada	Tipo de brotação desenvolvida pela secção (%)		
		Parte aérea	Rizoma	Indefinido
1,0	Água	15,0 b	75,0 a	10,0 a
	AIA	100,0 a	0,0 b	0,0 b
	6BA	100,0 a	0,0 b	0,0 b
	AIA + 6BA	100,0 a	0,0 b	0,0 b
12,0	Água	100,0 a	0,0 b	0,0 b
	AIA	92,5 a	7,5 b	0,0 b
	6BA	80,0 a	20,0 b	0,0 b
	AIA + 6BA	97,5 a	7,5 b	0,0 b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

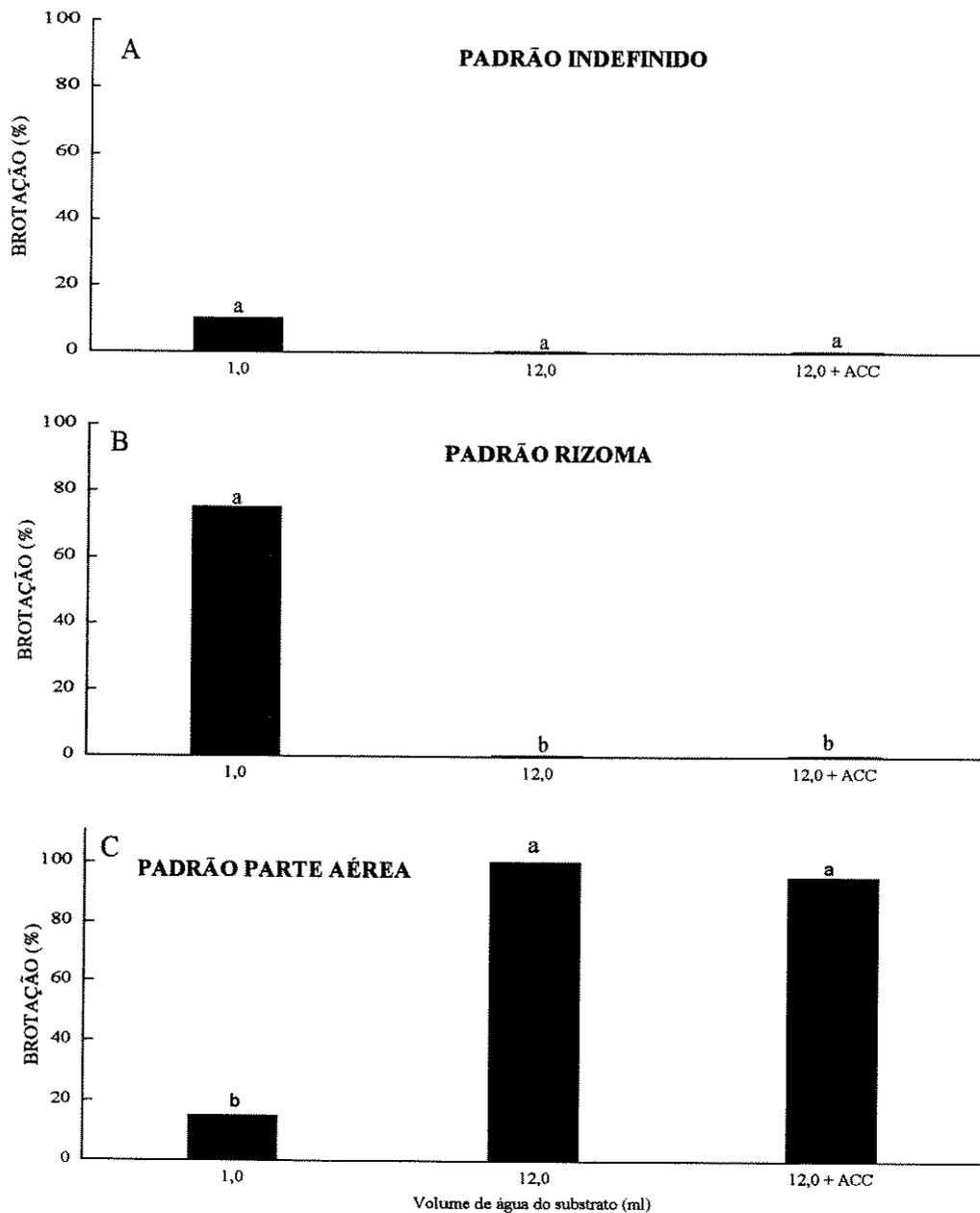


Figura 22 - Efeito de ACC (10^{-3} M) no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com 12,0ml de água e secções controle em 1,0 e 12,0ml. Todos os tratamentos ficaram em temperatura de 30°C, em luz contínua e foram avaliados 20 dias após o início do experimento. ACC foi aplicado na forma de gota (20 μ l) a cada dois dias, durante dez dias.

Letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

7.5 - EFEITO DE AVG NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

Aminoetoxivinilglicina é inibidor da síntese de etileno. O tratamento de secções do rizoma com AVG impediu o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma (figura 23). Comparando-se as secções que estavam em 1,0ml de água no substrato, tratadas e sem tratamento, nota-se que AVG impediu o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma, já que aquelas sem tratamento tiveram porcentagem alta do tipo rizoma (figura 23B). A resposta das secções ao AVG evidenciou que talvez etileno seja uma das substâncias de crescimento associada com o controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma. Na figura 23C, verifica-se que as secções em 1,0ml de água e tratadas com AVG desenvolveram brotações do padrão parte aérea em porcentagem alta em relação àquelas sem tratamento. Por outro lado, as secções em 12,0ml de água, sem tratamento desenvolveram o tipo parte aérea em porcentagem alta.

7.6 - EFEITO DE PEG + AgNO₃ NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

Os resultados do experimento da figura 24 caracterizaram, novamente, que etileno pode estar fortemente associado ao controle do desenvolvimento de brotação do padrão rizoma e também à condição de potencial hídrico baixo do substrato. Observa-se na figura 24B que as secções do rizoma que ficaram em substrato com solução de PEG ou com 1,0ml de água tiveram porcentagem alta de brotações do padrão rizoma. Entretanto, pelos resultados da figura 24C, observa-se que as secções quando estavam também em solução de PEG ou em 1,0ml de água e foram tratadas com AgNO₃ passaram desenvolver brotações do padrão parte aérea. Este resultado mostrou que AgNO₃ foi capaz de impedir o

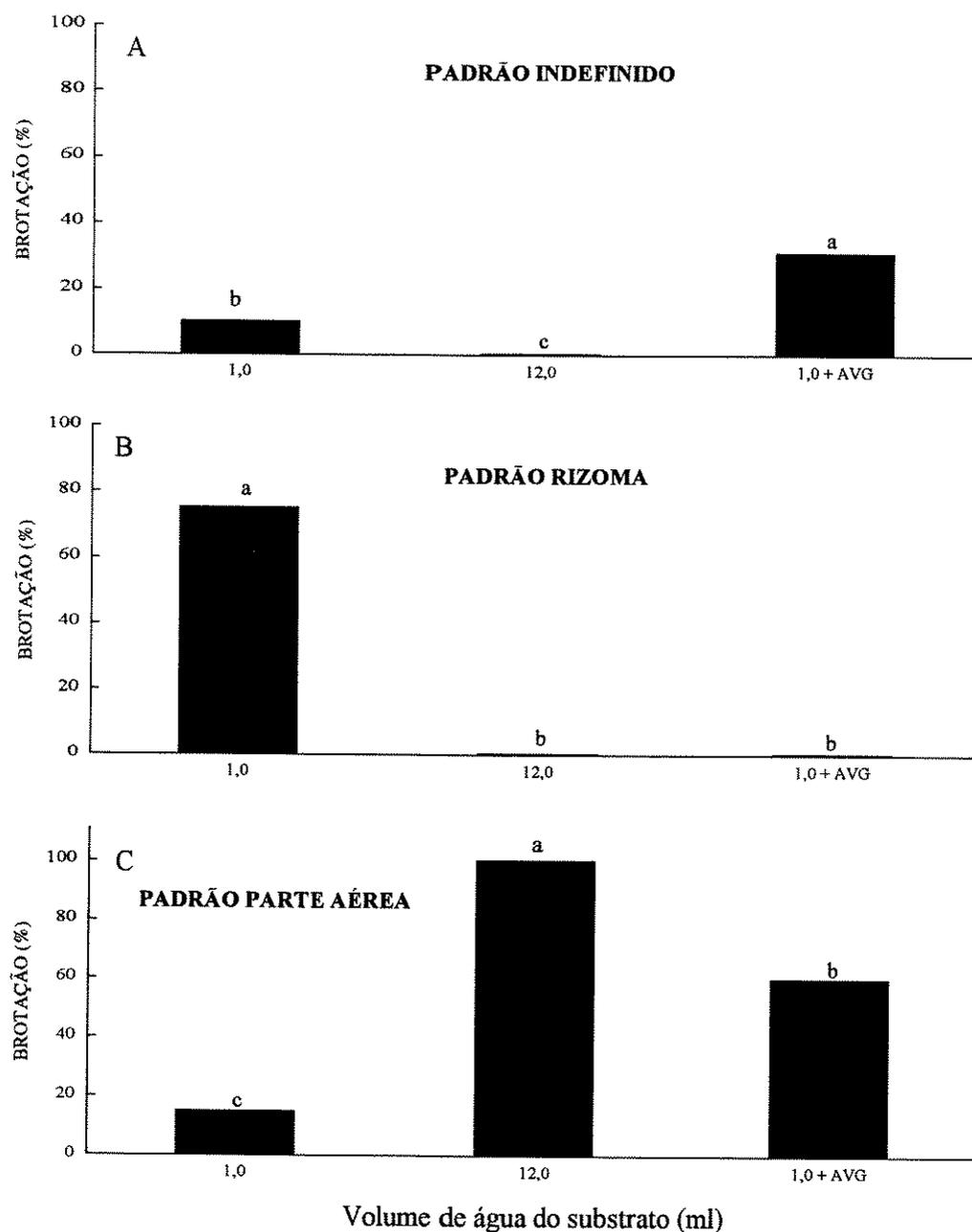


Figura 23 - Efeito de AVG (10^{-3} M) no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com 1,0ml de água e secções controle em 1,0 e 12ml. Todos os tratamentos ficaram em temperatura de 30°C, em luz contínua e foram avaliados 20 dias após o início do experimento. AVG foi utilizado na forma de gota (15ul), no 1º e 3º dia após o início experimento. Letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

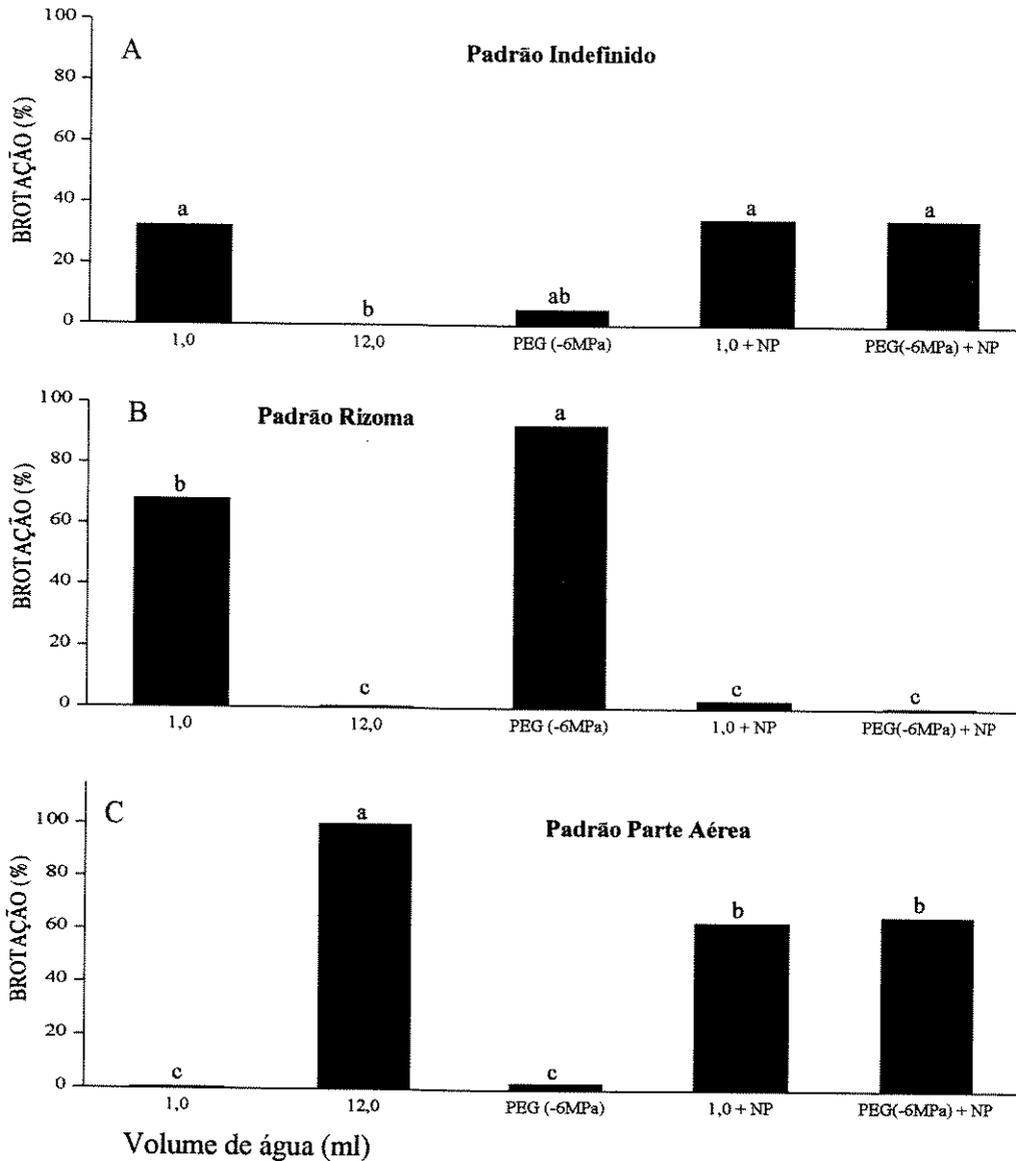


Figura 24 - Efeito de nitrato de prata (NP) ($500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com 12,0ml de solução PEG (-6 MPa). Como controle secções ficaram em substrato com 1,0 e 12,0ml de água e em PEG (12,0ml). As secções ficaram em temperatura de 30°C e em luz contínua e foram avaliadas após 20 dias do início do experimento. Letras diferentes na mesma figura indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

desenvolvimento de brotações do tipo rizoma. A resposta das secções tratadas com AgNO_3 foi semelhante à das secções sem tratamento em presença de 12,0ml de água, que desenvolveram o tipo parte aérea. Desta forma, a resposta das secções ao PEG mostrou novamente que as condições de disponibilidade reduzida de água ou de potencial hídrico baixo favoreceram o desenvolvimento de brotação do padrão rizoma pelas secções do rizoma

7.7 - EFEITO DE ABA NA BROTAÇÃO DO PADRÃO RIZOMA

A figura 25B mostra que as secções do rizoma que estavam em 12,0ml de água no substrato e tratadas com ABA (10^{-3}M) desenvolveram brotações do padrão rizoma, como ocorreu com as secções em 1,0ml de água sem tratamento. O padrão parte aérea só ocorreu nas secções que ficaram em 12,0ml de água, sem ABA (25C). A resposta das secções do rizoma ao ABA indicou indiretamente que esta substância também pode estar participando do controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma.

8.0 - DOSAGEM DE ETILENO DAS SECÇÕES DO RIZOMA

Foram feitas dosagens de etileno liberado pelas secções do rizoma que ficaram em frascos vedados, com volumes de 3,0 ou 15,0ml de água no substrato (figura 26). Verificou-se que houve liberação de etileno pelas secções do dois tratamentos. No entanto, a concentração do hormônio foi maior nas secções que estavam com disponibilidade menor de água no substrato que naquelas com disponibilidade maior.

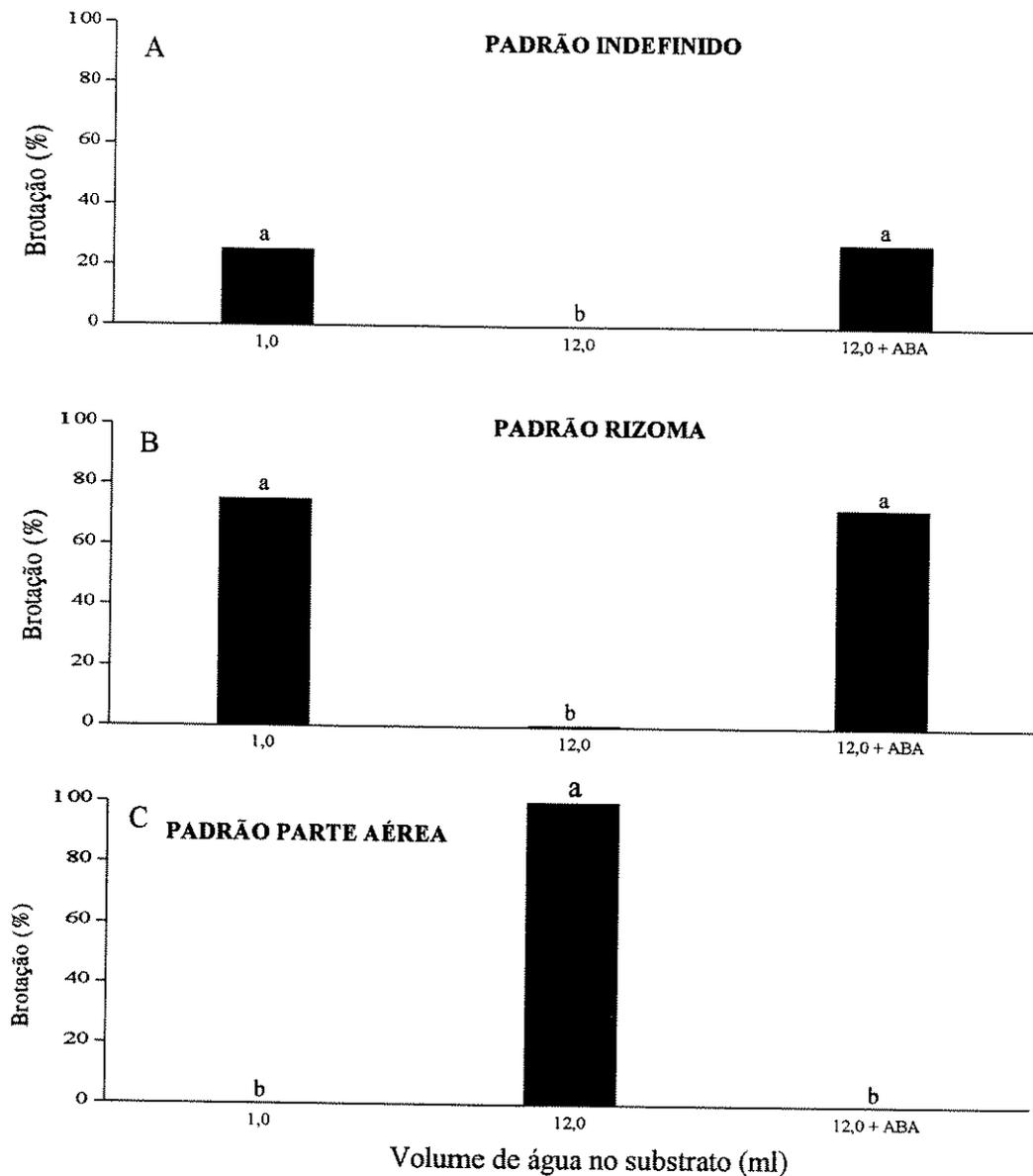


Figura 25 - Efeito de ABA (10^{-3} M) no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com 12,0ml de água e secções controle em 1,0 e 12,0ml. Todos os tratamentos ficaram em temperatura de 30°C, em luz contínua e foram avaliados 20 dias após o início do experimento. ABA foi aplicado na forma de gota (20 μ l) a cada dois dias, durante 10 dias.

Letras diferentes em cada gráfico indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

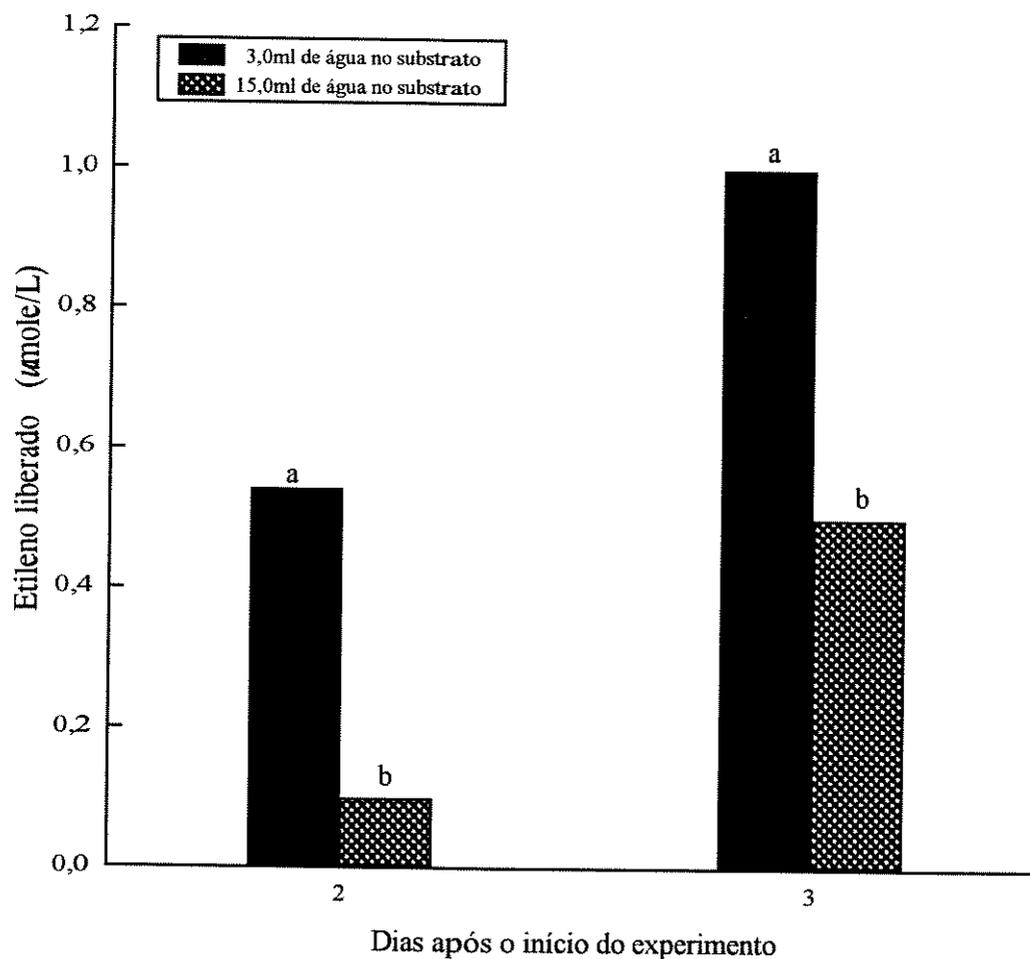


Figura 26 - Etileno liberado pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com 3,0 ou 15,0ml de água. As secções ficaram em frascos fechados, em temperatura de 30°C e em luz contínua. Cada frasco tinha sete secções.

Letras diferentes no dia da observação indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

9.0 - DOSAGEM DE ACC DAS SECÇÕES DO RIZOMA

ACC é o precursor imediato da síntese de etileno. O objetivo deste experimento foi verificar se houve diferença na produção de ACC entre as secções que ficaram em 1,0 ou 12,0ml de água no substrato. Assim, evidenciando indiretamente a presença de etileno nas secções do rizoma quando estavam nestas condições. A avaliação de ACC foi feita através da medida de etileno proveniente da degradação química do ACC existente nos extratos das secções do rizoma (figura 27). A liberação de etileno, via ACC, foi maior nos extratos das secções que ficaram em 1,0ml de água no substrato do que nos extratos daquelas que ficaram em 12,0ml. Observa-se ainda que a liberação de etileno foi maior do 2º ao 6º dia, da condução do experimento, nas secções que ficaram em 1,0ml de água no substrato.

10.0 - ESTUDO PRELIMINAR ANATÔMICO DO ÁPICE MODIFICADO DA BROTAÇÃO DA SECÇÃO DO RIZOMA

Secções do rizoma quando ficaram nos frascos para a dosagem de etileno (esquema 3) desenvolveram brotações que após cerca de 20 dias apresentaram alterações estruturais em seus ápices (figura 28A). Os ápices se desenvolveram numa forma arredondada, de tamanho macroscópico e aclorofilados. A avaliação de cortes anatômicos dos ápices modificados em microscópio óptico mostrou se tratar de uma estrutura com tecidos parenquimático, meristemático e vascular (figura 28B). A estrutura em forma de cabeça ou calo apresentou epiderme de uma camada que envolveu o tecido parenquimático onde estavam os tecidos vasculares em diferenciação. O tecido vascular primário correspondeu à

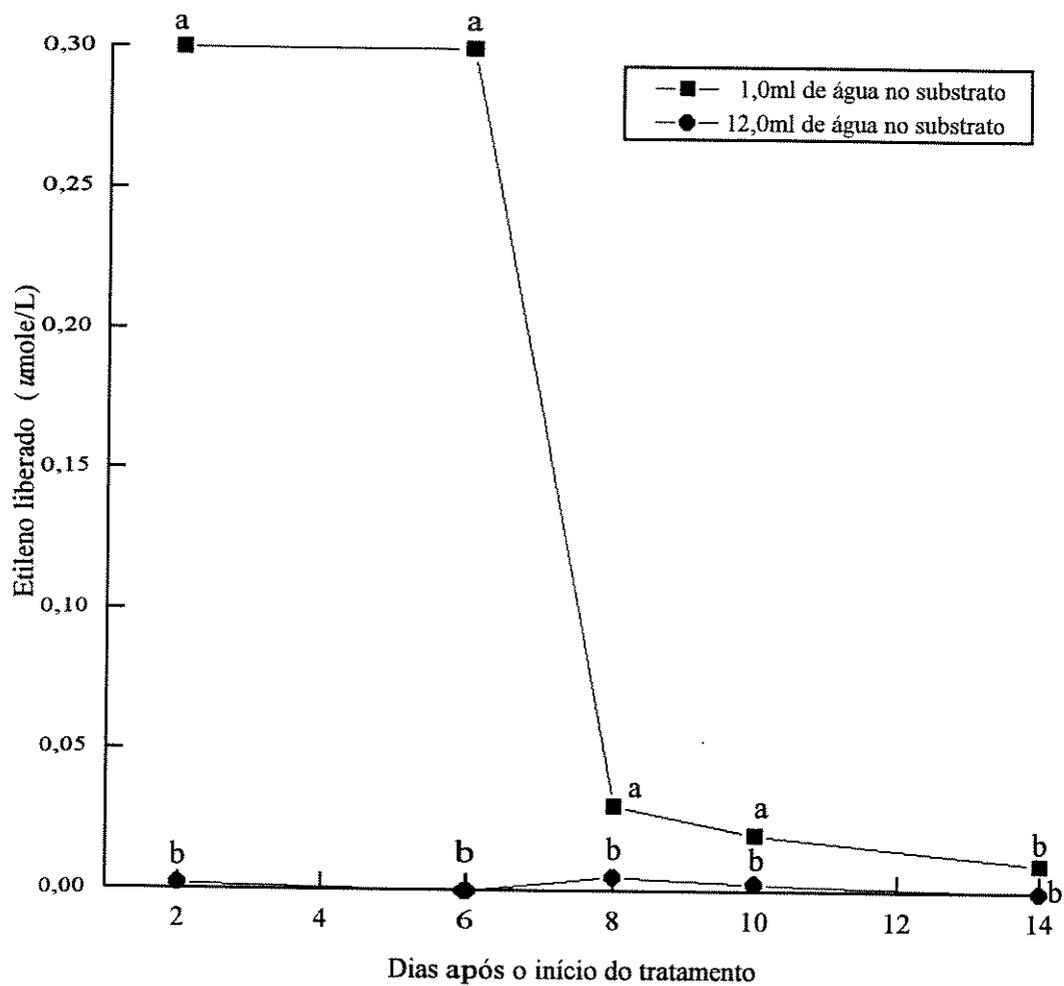


Figura 27 - Dosagem de ACC através de etileno liberado pela degradação química de ACC de extrato de seções do rizoma de *Kohleria* sp, que ficaram em substrato com 1,0 e 12,0ml de água no substrato. As seções ficaram previamente em temperatura de 30°C e em luz contínua.

Letras diferentes no mesmo dia da observação indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

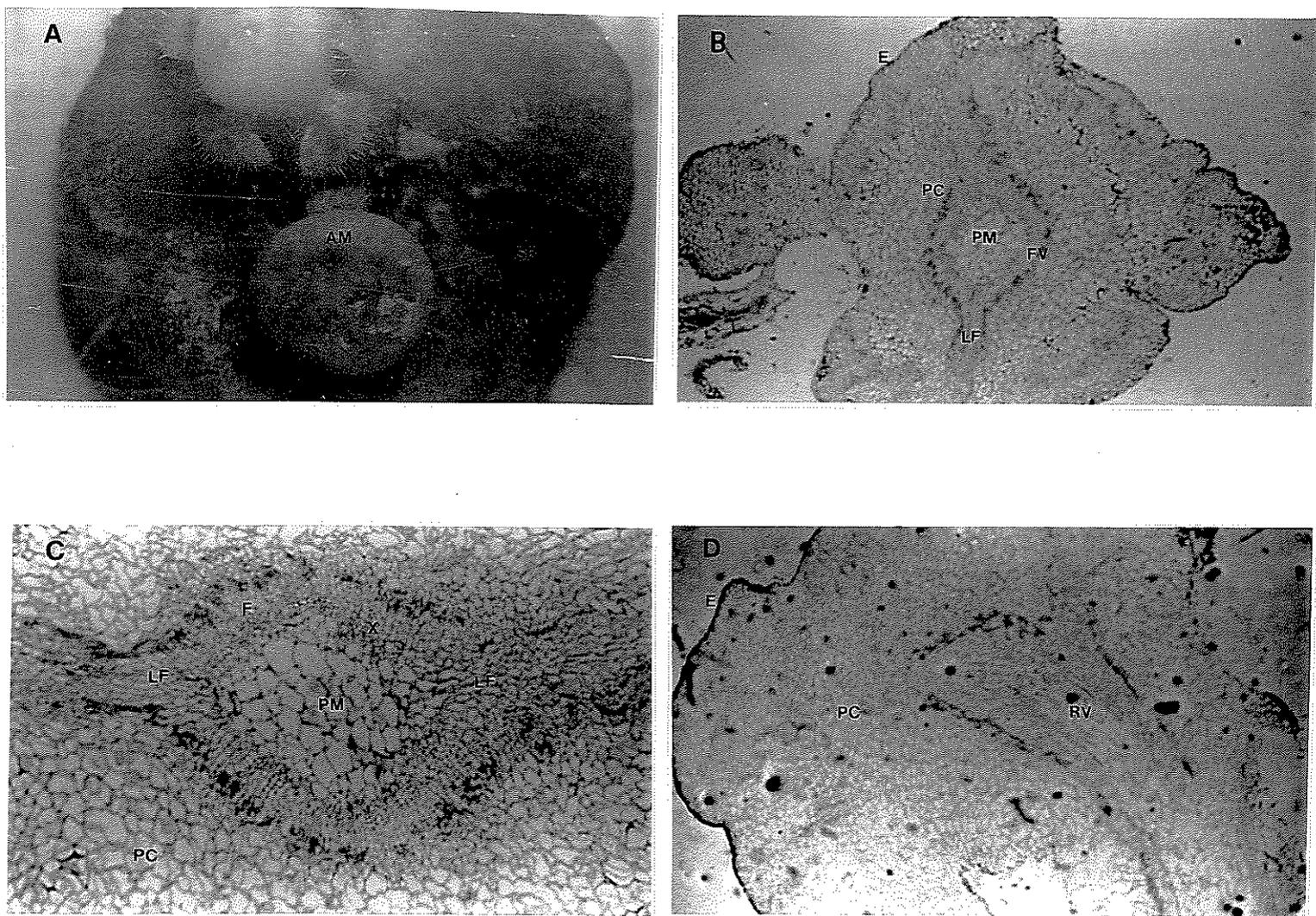


Figura 28 - Caracterização do ápice modificado das brotações de seções do rizoma de *Kohleria* sp. **A.** Ápice modificado da brotação. **B.** Corte transversal do ápice modificado da brotação (aumento de 6,3 x 1,25). **C.** Detalhe da região vascular do ápice modificado da brotação (aumento 2,5 x 1,25). **D.** Corte longitudinal do ápice da brotação (aumento de 1,6 x 1,25). Ápice modificado (AM), secção do rizoma (SR), feixe vascular (FV), xilema (X), floema (F), parênquima medular (PM), parênquima cortical (PC), lacuna foliar (LF), epiderme (E) e região vascular (RV).

estrutura de caule já que apresentou xilema na parte interna do córtex e floema para fora deste.

11.0 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ABCÍSIICO ENDÓGENO DAS SECÇÕES DO RIZOMA

11.1 - BIOENSAIO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTE DE ALFACE

Preliminarmente, para a verificação da possível presença de ABA com o controle do desenvolvimento do padrão rizoma, foram obtidos extratos metanólicos das secções ou de suas brotações, previamente deixadas com 1,0 e 12,0ml de água no substrato. Os extratos foram obtidos de secções e brotações, com 10, 30 e 60 dias após a montagem do experimento. As frações ácidas obtidas dos extratos foram testadas na germinação de sementes de alface Grand Rapids.

Na tabela 14 verifica-se que as frações ácidas das secções que ficaram com 1,0ml de água no substrato, causaram inibição significativa da germinação quando comparado com o controle. Já, as sementes nas frações ácidas das secções que ficaram em 12,0ml de água no substrato tiveram resposta semelhante ao controle. Por outro lado, as respostas de germinação das sementes nas frações ácidas das secções com 30 e 60 dias, nas duas condições de umidade também foram semelhantes.

As sementes na presença das frações ácidas das brotações tiveram a mesma resposta encontrada anteriormente pelas frações ácidas das secções com 30 e 60 dias (tabela 14). Estes resultados evidenciaram a presença de um inibidor nas frações ácidas tanto das secções quanto das brotações que ficaram em 1,0ml de água no substrato.

Tabela 14 - Efeito da fração ácida de extrato metanólico de secções do rizoma de *Kohleria* sp e de suas brotações na germinação de sementes de alface “Grand Rapids”, em temperatura de 25°C e em luz contínua. O extratos foram obtidos de secções com diferentes tempos de tratamento. As secções do rizoma ficaram previamente em substrato com 1,0 ou 12,0ml de água, em temperatura de 30°C e em luz contínua.

EXTRATO DA SECÇÃO DO RIZOMA				
Dias após o início do tratamento	Massa de tecido (g)	FRAÇÃO ÁCIDA A	FRAÇÃO ÁCIDA B	Controle
60	2	33,8 b	65,0 ab	96,3 a
30	1	70,0 b	72,5 ab	95,0 a
10	5	66,3 b	92,5 a	96,3 a

EXTRATO DA BROTAÇÃO				
Dias após o início do tratamento	Massa de tecido (g)	FRAÇÃO ÁCIDA A	FRAÇÃO ÁCIDA B	Controle
60	2	76,3 b	91,3 ab	96,3 a
30	1	86,3 b	81,3 ab	95,0 a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a nível de 5%.

A - Fração ácida das secções ou de suas brotações que ficaram com 1,0ml de água no substrato.

B - Fração ácida das secções ou de suas brotações que ficaram com 12,0ml de água no substrato.

11.2 - CARACTERIZAÇÃO DE ABA DAS FRAÇÕES ÁCIDAS DE EXTRATOS DAS SECÇÕES DO RIZOMA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTÔMETRO DE MASSAS (GC/MS)

Verificou-se a possível presença de ácido abscísico nas frações ácidas obtidas dos extratos das secções do rizoma com dez dias de idade. As secções foram previamente mantidas em substratos com 1,0 e 12,0ml de água.

Inicialmente, na caracterização, determinou-se o tempo de retenção dos isômeros (cis e trans) de uma solução de ABA padrão por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que foram de 26,2 e 27,8 minutos do tempo de corrida do gradiente, respectivamente (figura 29). As frações ácidas purificadas dos extratos das secções foram injetadas também em HPLC e recolheram-se as frações correspondentes ao tempo de retenção dos isômeros da solução de ABA padrão.

As frações recolhidas, após terem sido metiladas, foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (figura 30). Na figura 30A é mostrado o espectro do padrão, onde se observa os sinais característicos dos seus dois isômeros e os seus respectivos espectros de massas (figura 30A2 e 30A3), com a predominância do fragmento de m/z 190. Nas figuras 30B e 30C se observa os espectros das frações ácidas dos extratos injetadas, onde com o objetivo de aumentar a sensibilidade da análise foi monitorado o íon de m/z 190. O íon de m/z 190 foi detectado no cromatograma das frações ácidas dos extratos das secções em presenças de 1 e 12ml de água no substrato conforme as figuras 30B1, 30B2 e 30C1 e 30C2, respectivamente. Embora o íon de m/z 190 tenha sido encontrado nas duas amostras, a injeção do mesmo volume de amostra de 1 μ l e o emprego das mesmas condições de análise permitem dizer que a abundância deste foi maior no

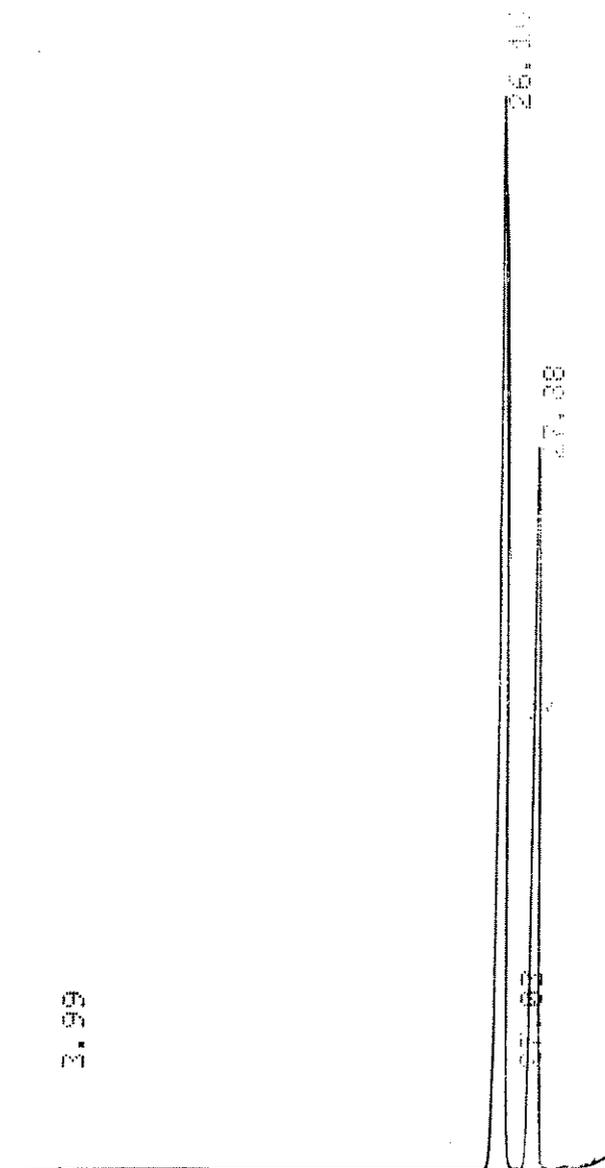


Figura 29 - Cromatograma da mistura dos isômeros (cis e trans) da solução de ABA padrão (10^{-3}M), que foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando coluna C18 ODS- Hypersil ($5\mu\text{m}$, $250\text{mm} \times 5\text{mm}$), gradiente de 30 minutos de 40 a 85% de metanol em solução aquosa de ácido acético a 0,5%, com fluxo de 1ml/minuto.

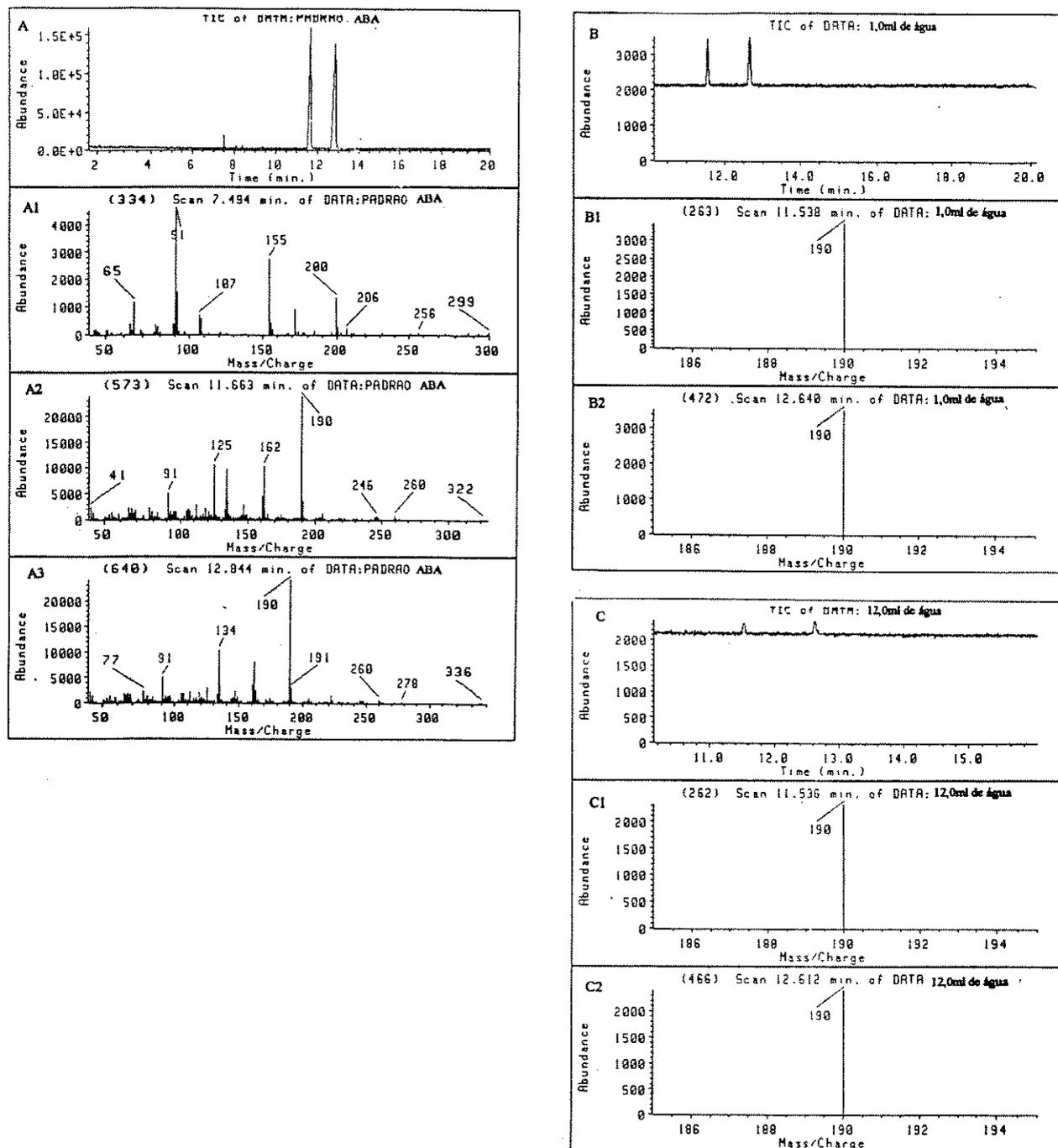


Figura 30 - Espectros de GC/MS massas de impacto de elétrons de ácido abscísico padrão e espectro do íon selecionado de m/z 190 das amostras da fração ácida de extrato de secções do rizoma de *Kohleria* sp.

A. Espectro de GC/MS de ABA padrão após análise em HPLC. A1. Espectro de massas de partícula desconhecida, A2 e A3. Espectro de massas dos isômeros cis e trans de ABA.

B. Espectro de GC/MS utilizando o íon selecionado de m/z 190 de ABA da fração ácida de extrato de secções que ficaram em substrato com 1,0ml de água. B1 e B2. Espectro de massas dos isômeros cis e trans de ABA encontrados no extrato.

C. Espectro de GC/MS utilizando o íon selecionado m/z 190 de ABA da fração ácida de extrato de secções que ficaram em substrato com 12,0ml de água. C1 e C2. Espectro de massas dos isômeros cis e trans de ABA encontrados no extrato.

cromatograma da fração ácida do extrato das secções que estavam em 1 ml de água (figura 30B) que na fração do extrato das secções em 12ml de água (figura 30C). De um modo geral, as respostas de inibição da germinação de sementes de alfaca, encontrada pelas frações ácidas dos extratos das secções e de suas brotações em 1,0 e 12,0ml de água estão de acordo com os resultados da análise das frações ácidas em espectrômetro de massas.

DISCUSSÃO

Na classificação das plantas utilizadas, neste trabalho, em gênero e principalmente em espécie encontrou-se certa dificuldade, as referências disponíveis para sua identificação apresentaram diversos nomes. Isto confirmou as observações de KVIST & SKOG (1992) de que ainda há confusão em relação à classificação destas plantas ou seja outras denominações têm sido atribuídas à *Kohleria* sp. BATCHELLER (1985) apresentou uma relação de nomes extintos, correntes, errôneos e corretos de cultivares de espécies de *Kohleria*, evidenciando a dificuldade encontrada para sua classificação.

J.SEMIR (comunicação pessoal, 1992) identificou as plantas deste estudo como pertencentes ao gênero *Kohleria*, o que também foi caracterizado por A. CHAUTEMS (comunicação pessoal, 1993). No entanto, A.CHAUTEMS examinou o material J.A.S. Almeida 27040 localizado no Herbário UEC do Instituto de Biologia da UNICAMP e sugeriu que as plantas deste estudo são um híbrido de *Kohleria*. Esta informação confirmou também as observações de BOGGAN & KVIST (1993a) de que as plantas do gênero *Kohleria* possuem facilidade para formar híbridos. A existência, atualmente, de grande número de híbridos de *Kohleria* também foi evidenciada pelo trabalho de BOGGAN (1993b) em que o autor lista os híbridos novos e os seus parentais. Recentemente, KVIST & SKOG (1996) reafirmaram a existência de forte hibridização no gênero *Kohleria*, e ainda que isto enfraquece o esforço para sua identificação em espécie. Desta forma, neste estudo as plantas foram classificadas somente em gênero, como *Kohleria* sp.

As plantas de *Kohleria* sp apresentam flores pequenas, em forma de tubo de cor vermelha e a face interna das pétalas possui manchas pequenas de coloração amarela.

Considerando a sua beleza e delicadeza, pode-se sugerir que as plantas de *Kohleria* sp possuem potencial como ornamental.

Através de estudo anatômico, caracterizou-se o órgão subterrâneo de *Kohleria* sp como um caule envolto por folhas modificadas, que protegem delicadamente suas gemas. KVIST & SKOG (1992) denominaram o órgão subterrâneo de *Kohleria* sp como rizoma escamoso. Entretanto, neste trabalho, observando as suas características morfológicas, sugere-se que este órgão poderia ser denominado de “rizoma bulboso”. Rizoma, considerando que o órgão apresentou natureza caulinar conforme denominado pelos autores. Bulboso, pela observação do arranjo de suas folhas modificadas, que estão dispostas de forma embricada e é nelas que se acumulam as reservas, o que caracteriza a estrutura de um bulbo. A denominação de rizoma escamoso não pareceu ser a mais adequada, considerando ainda que a escama constitui-se numa folha modificada cuja função é a de proteção de gemas ou meristemas e que não possui reserva.

Os testes histoquímicos realizados, com cortes anatômicos do rizoma de *Kohleria* sp mostraram que as substâncias encontradas em suas células ocorrem, em geral, na parte aérea das plantas. As folhas modificadas são vascularizadas, o caule possui rigidez devido à presença de esclerênquima. As epidermes do caule e da folha modificada possuem abundância de tricomas que podem ter a função de manter espaços para trocas gasosas, considerando que os rizomas estão sob a terra, ou ainda, que sirvam como proteção contra o atrito com as partículas da terra. Verificou-se também a saída de raízes adventícias do cilindro vascular do caule do órgão subterrâneo de *Kohleria* sp. Não se observou a presença de taninos nas células dos cortes anatômico do órgão subterrâneo, embora esta substância tenha sido

encontrada amplamente em tecidos vegetais e seja de importância ecológica como proteção contra predadores (HABERLANDT, 1965).

Quando o rizoma de *Kohleria* sp estava na terra era pouco susceptível ao ataque de microorganismos, em geral, mantinha-se bem preservado. Talvez a característica de preservação encontrada esteja associada à presença das substâncias fenólicas, que foram detectadas no rizoma e preliminarmente identificadas como quinonas pertencentes ao grupo das antraquinonas. Quinonas frequentemente exercem efeitos bactericidas conforme VAN DER BERG & LABADIE (1989). THOMSON (1978) ainda comenta que a presença das quinonas em plantas lenhosas tropicais as protege contra decomposição fúngica e ataque de cupins.

A reserva principal encontrada no rizoma de *Kohleria* sp foi o amido. Os grãos de amido foram observados, através de cortes anatômico, somente na região da folha modificada do rizoma. Estes também foram evidenciados pela presença da “cruz de malta” que é característica de grãos de amido quando examinados em luz polarizada (KAHL, 1974).

Da caracterização do órgão subterrâneo de *Kohleria* sp se conclui que o rizoma é um sistema bastante organizado devido à quantidade alta de reservas em suas folhas modificadas e à abundância de gemas presentes em seu caule, que ficam eficientemente protegidas pelas folhas modificadas.

As plantas de *Kohleria* sp apresentam grande capacidade regenerativa por meio da reprodução vegetativa, através de seu rizoma que possui atividade contínua de formação de folhas modificadas. Na terra as gemas do rizoma podem brotar e quando destacado da planta mãe também emitem brotações novas, formando indivíduos novos. Segmentos destacados do rizoma representam formas de dispersão das plantas de *Kohleria* sp. GRIME (1983)

classificou as estratégias regenerativas das plantas em cinco tipos e dentre estas, a estratégia utilizada pelas plantas de *Kohleria* sp foi a expansão vegetativa. Segundo o autor, esta estratégia envolve a expansão e subsequente fragmentação da planta vegetativa através da formação de rizomas, estolões ou broto de raiz persistente. Em *Kohleria* sp, além da multiplicação pelo rizoma, estacas de seu caule e folhas também representam meios de formação de indivíduos novos. Ainda, em relação à reprodução vegetativa pelo rizoma, verificou-se que quando um segmento destacado da planta mãe foi mantido sem qualquer adição de água e/ ou nutrientes no substrato teve capacidade de brotar e desenvolver a sua brotação, utilizando somente suas reservas. Destas observações pode-se afirmar que o rizoma de *Kohleria* sp possui eficiência alta de multiplicação, mesmo em condições adversas. MENEZES *et al.*, (1979) verificaram comportamento semelhante em rizóforos de *Vernonia*, que após dois meses sem nenhum suprimento de água ou nutrientes todas as gemas brotaram, originando ramos aéreos. Os autores reconheceram o rizóforo como um possível órgão de resistência. FISCHER *et al.*, (1995) também verificaram que pedaços de tubérculos de *Cyperus rotundus* brotaram sem qualquer adição de nitrogênio. No entanto, as suas brotações só conseguiram sobreviver por duas semanas, nestas condições.

O evento de dormência de gemas é característico de órgãos de reserva. RANALLI *et al.*, (1994) observaram que microtubérculos de *Solanum tuberosum*, obtidos por meio de cultura *in vitro*, tiveram dormência que foi quebrada pelo seu armazenamento em temperatura baixa e no escuro. O rizoma de *Kohleria* sp não apresentou qualquer dormência. Após a coleta, em geral, uma de suas gemas brotou imediatamente, sem haver necessidade de qualquer tratamento de quebra de dormência. Segundo KVIST & SKOG (1992) as plantas de *Kohleria* possuem uma estação de dormência, mas os autores não definem qual é a

estação. Neste trabalho, observou-se que as reservas do rizoma de *Kohleria* sp se esgotavam em época de inverno (temperatura baixa), provavelmente para a manutenção da planta. No final do inverno as plantas apresentavam brotações novas e de tamanho reduzido, durante a primavera as brotações se desenvolviam e na época de verão estavam totalmente desenvolvidas.

A resposta de brotação foi favorecida quando as secções do rizoma de *Kohleria* sp tinham seis folhas modificadas do que com apenas uma. Talvez a diferença na porcentagem de brotação se deva à disponibilidade maior de gemas nas secções com seis folhas, o que aumentaria a chance de brotação.

Embora a brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp tenha ocorrido indiferente à condição de luz, a sua presença favoreceu mais o processo do que a sua ausência. Tal resposta está de acordo com o comportamento do rizoma na natureza, que também brota sob a terra em ausência de luz.

As temperaturas testadas, neste estudo, exerceram controle da brotação das secções do rizoma, principalmente quanto à velocidade do processo. As secções atingiram porcentagens elevadas de brotação (próximo de 100%), mais cedo, nas temperaturas mais altas do que nas mais baixas. De um modo geral, este tipo de comportamento é verificado em órgãos subterrâneos de outras espécies. Exemplo disto foi encontrado por ALEIXO & VÁLIO (1976) em tubérculos de *Cyperus rotundus*, que alcançaram porcentagens maiores de brotação nas temperaturas mais altas (25°C e 30°C) e nas mais baixas (15°C e 20°C) tiveram redução de brotação. Por outro lado, as secções do rizoma também se mostraram intolerantes a temperaturas elevadas, já que em 35°C as secções não brotaram.

Secções do rizoma de *Kohleria* sp foram capazes de brotar em substrato com disponibilidade reduzida de água ou em sua ausência total. Destaca-se também que, na condição de disponibilidade reduzida de água, as secções além de brotarem desenvolveram plenamente suas brotações. No entanto, as secções não foram tolerantes ao excesso de água. As secções brotaram plenamente em volume de até 12,0ml de água no substrato e quando o volume foi superior tenderam a apodrecer. Conforme verificado quando as secções ficaram em 20,0ml de água no substrato, provavelmente isto se deva à disponibilidade reduzida de oxigênio. A ocorrência de brotação do rizoma de *Kohleria* sp em substrato com disponibilidade reduzida de água, parece estar de acordo com o seu comportamento na natureza. Segundo as informações disponíveis, o rizoma de *Kohleria* sp consegue se manter em época de inverno que corresponde à estação de seca e no final deste período observa-se neste órgão a presença de brotações novas e pequenas.

O estudo da brotação mostrou que o rizoma de *Kohleria* sp pode se manter em condições bastante amplas de luz, temperatura e umidade do substrato. Finalmente, com a observação da tolerância das secções do rizoma de manter-se em substrato com disponibilidade reduzida de água e ainda simultaneamente responder com o desenvolvimento de uma brotação, mostrou que o rizoma deve ter mecanismos internos que permitem a sua manutenção nesta condição.

O rizoma de *Kohleria* sp possui relação de dominância apical forte. As secções do rizoma utilizadas, neste estudo, tinham seis folhas modificadas isto implicou em seis gemas por secção e, em geral, só uma gema brotou em cada uma, as demais ficaram dormentes. A resposta de dominância apical é clássica. O ápice do caule principal de uma planta exerce domínio sobre as demais gemas existentes. Sabe-se que a dominância apical se deve à

presença de auxina em concentração alta na gema mais apical e na liberação das gemas laterais há aumento da concentração de citocinina (KRISHNAMOORTHY, 1981; TAMAS, 1987). A liberação da brotação das gemas laterais da dominância apical pode ser superada pela remoção do ápice ou pelo tratamento destas gemas com citocinina (MOORE, 1979). GLINE (1991) relaciona a dominância apical não só ao antagonismo entre auxina e citocinina, mas a um balanço entre as substâncias de crescimento de planta.

Embora os fatores do ambiente tenham influenciado o processo de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp, não causaram qualquer efeito no número de gemas que se expressaram por secção, que foi de uma brotação. No entanto, os tratamentos com 6BA e ETREL causaram número maior de brotação por secção do rizoma. Destaca-se ainda que a promoção de brotação por 6BA ocorreu nas secções que ficaram com disponibilidade reduzida ou alta de água no substrato. Já, o tratamento com ETREL só causou promoção no número de brotações das secções que ficaram em disponibilidade alta de água no substrato. Sabe-se que etileno e citocinina podem influenciar a brotação de gemas de órgãos subterrâneos. Foi verificado por ALEIXO & VÁLIO (1976) que benziladenina promoveu a brotação de tubérculos de *Cyperus rotundus* L. RYLSKI *et al.*, (1974) obtiveram promoção da brotação de gemas de tubérculos de *Solanum tuberosum* quando foram tratados com etileno. Considerando os exemplos anteriores e o resultado do rizoma de *Kohleria* sp pode-se supor que o efeito de 6BA e etileno em promover número maior de brotações por órgão subterrâneo, ocorra pelos mesmos mecanismos, independente da espécie.

O desenvolvimento das brotações das secções do rizoma de *Kohleria* sp foi influenciado pela temperatura. A temperatura de 25°C foi ótima para o desenvolvimento das brotações que atingiram maior altura de caule e número de folhas. Observa-se ainda que a

temperatura de 30°C que foi ótima para o processo de brotação das secções, não o foi para o desenvolvimento de suas brotações.

Considerando o desenvolvimento das brotações até o estágio de planta adulta, verificou-se que o fotoperíodo influenciou fortemente o crescimento de sua parte aérea. As plantas que ficaram em dia curto tiveram maior altura de caule e área foliar que aquelas em presença de dia longo. Por outro lado, foi verificado que a formação do rizoma de *Kohleria* sp foi indiferente ao fotoperíodo. Embora seja conhecido que o fotoperíodo pode controlar a iniciação de órgãos subterrâneos em outras espécies. AAMLID (1992) verificou que dia longo contribuiu para a formação de número maior de rizomas em plantas de *Poa pratensis*. Já, as estacas de plantas de *Solanum tuberosum* tuberizaram quando foram submetidas a fotoperíodo de 8 horas de luz (EWING & WAREING, 1978). Talvez em *Kohleria* sp o controle da formação de seu rizoma se deva ao balanço entre as substâncias de crescimento promotoras e inibidoras, uma vez que o fotoperíodo não teve efeito. Em plantas de *Solanum tuberosum* é conhecido que o estímulo para a tuberização é proveniente da parte aérea. EWING (1987) discute que a formação do tubérculo de batata é mediada pelos hormônios vegetais e quando as plantas são submetidas ao fotoperíodo curto há declínio da atividade das substâncias giberelínicas.

Quando a gema de uma secção do rizoma de *Kohleria* sp brotou esta poderia se desenvolver em dois tipos morfológicos: brotação do padrão parte aérea que tinha caule e folhas expandidas semelhante à parte aérea das plantas de *Kohleria* sp ou brotação do padrão rizoma semelhante à secção do rizoma que a originou. A diferenciação entre um dos padrões de brotação ocorreu no meristema da gema da secção que brotou. A região do meristema das plantas é o sítio de processos morfogenéticos (STEEVES & SUSSEX, 1989). Na

diferenciação morfológica, o meristema passa por atividade bioquímica intensa, suas células se dividem e as novas se diferenciam e se especializam. As alterações bioquímicas invisíveis sempre precedem as alterações morfológicas visíveis (CUTTER, 1986). Considerando o processo de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp pode-se dizer que o estabelecimento entre um dos padrões de brotação foi bastante rápido. Quando as secções estavam em condições ótimas atingiram porcentagem significativamente alta de brotação a partir do 4º dia e já no 6º dia foi possível identificar o tipo de brotação. Desta forma, nos três primeiros dias após a embebição das secções, deve ocorrer o estabelecimento entre um dos tipos de brotação. Isto mostrou que o meristema da gema foi competente a desenvolver um dos tipos de brotação, assim que a secção do rizoma foi exposta à situação indutora. Para McDANIEL (1984) a competência pode ser exibida se uma célula/tecido/órgão/ é exposto a um sinal e a este responde da forma esperada. Associada à competência está a determinação, isto é, uma célula ou um grupo de células é determinado quando exibe o mesmo caminho de desenvolvimento se crescido *in situ*, isolado, ou num lugar novo, ou no organismo (McDANIEL, 1984). Assim, a competência e a determinação respondem a um sinal (fator de ambiente) e a sua tradução numa resposta.

O estudo do controle da ocorrência dos padrões de brotação desenvolvidos pelas secções do rizoma, mostrou que nenhum dos tipos foi influenciado pela luz. Entretanto, a diferenciação entre um dos padrões de brotação foi fortemente controlada pelo volume de água do substrato. A brotação do padrão rizoma se desenvolveu em secções que ficaram com disponibilidade reduzida de água, enquanto a brotação do padrão parte aérea ocorreu naquelas que ficaram em disponibilidade alta. Outra observação foi que as secções foram

bastante sensíveis a alterações pequenas no volume de água do substrato para a resposta do tipo morfológico desenvolvido por suas brotações.

A temperatura exerceu influência forte no padrão de brotação desenvolvido pelas secções do rizoma. O efeito da temperatura também esteve associado ao volume de água do substrato em que as secções ficaram. Quando as secções estavam em substrato com disponibilidade alta de água e em presença de temperatura de 30°C desenvolveram brotações do padrão parte aérea e quando em 20°C tenderam a desenvolver brotações do padrão rizoma. Por outro lado, quando a condição foi de disponibilidade reduzida de água no substrato, as secções desenvolveram brotações do padrão rizoma, independente da temperatura (20 e 30°C). Estes resultados mostraram que as gemas das secções do rizoma de *Kohleria* sp possuem alto grau de plasticidade. A resposta expressiva de plasticidade das gemas foi confirmada quando se fez o experimento de transferência das secções do rizoma, entre as temperaturas de 20 e 30°C. As secções que ficaram com disponibilidade maior de água no substrato e em temperatura de 30°C desenvolveram brotações do padrão parte aérea e quando transferidas para 20°C o ápice de uma parte das brotações passou a desenvolver o padrão rizoma. As secções que inicialmente ficaram em temperatura de 20°C e também com disponibilidade alta de água tiveram brotações do tipo rizoma e quando transferidas para 30°C o ápice de algumas destas brotações passou a desenvolver o padrão parte aérea. Já, as secções com disponibilidade reduzida de água no substrato, em temperatura de 20°C, desenvolveram o tipo rizoma e quando transferidas para 30°C o ápice de parte destas brotações passou a desenvolver o tipo parte aérea. Isto mostrou que o fator temperatura teve influência forte na definição do padrão morfológico desenvolvido pelas brotações das secções do rizoma, pois quando transferidas de temperatura, os ápices de suas brotações se

mostraram sensíveis à nova condição e passaram a responder com outro padrão de brotação. Assim, além das gemas das secções do rizoma apresentarem alto grau de plasticidade, o ápice de suas brotações também apresentou comportamento semelhante. De acordo com BUVAT (1989) o desenvolvimento das plantas é caracterizado por um alto grau de plasticidade em resposta aos sinais do ambiente. Como organismos sésseis as plantas não podem se mover ativamente das fontes de estresse, nem podem procurar local com fontes de luz e nutrientes ótimos. Pelo contrário, elas devem tecer um modelo de desenvolvimento de tal forma que maximize suas chances de sobrevivência e reprodução. Segundo TAYLOR & AARSSSEN (1988) a plasticidade em plantas é fator importante de adaptação a fatores de estresse do ambiente e às suas alterações imprevisíveis. Assim, cada um dos padrões de brotação desenvolvidos pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp deve possuir características especiais tanto bioquímicas quanto morfológicas para sobreviver às influências do meio.

Observou-se ainda a influência da temperatura de 20°C no desenvolvimento de brotações do padrão rizoma e relacionando isto com o processo de brotação das secções do rizoma, que foi mais lento nesta condição, pode-se sugerir que 20°C não foi ótima para as secções. Algumas espécies de plantas são sensíveis à temperatura baixa de não congelamento, que é chamada de temperatura de resfriamento e está na faixa de 0 a 15°C. Quando as plantas são expostas a esta condição podem desenvolver mecanismos internos que aumentam sua resistência (LYNCH, 1990). Embora, 20°C esteja fora da faixa de temperatura de resfriamento citada por LYNCH (1990) e não se tenha feito estudo mais detalhado de sua influência, pode-se sugerir que talvez 20°C tenha causado algum efeito semelhante ao da temperatura de resfriamento. Neste caso, em resposta a esta condição as secções responderam com brotações do padrão rizoma. Desta forma, o padrão rizoma poderia ser

uma forma morfológica de “resistência” que a secção do rizoma de *Kohleria* sp passou a expressar quando as condições do meio não foram favoráveis para o seu estabelecimento. Estudos têm associado a presença de etileno e ácido abscísico à resistência das plantas à temperatura baixa. WANG & ADAMS (1982) verificaram aumento na produção de etileno em frutos de *Cucumis sativus* submetidos à temperatura alta, após terem permanecido em temperatura baixa. SALISBURY & ROSS (1992) comentam que há evidências que sugerem que os níveis de ABA também aumentam nas plantas quando são submetidas à temperatura de resfriamento ou congelamento.

Quando as secções do rizoma de *Kohleria* sp ficaram em substrato com soluções de PEG (-3, -6 e -12 MPa) desenvolveram brotações do padrão rizoma, como aquelas em presença de disponibilidade reduzida de água. Isto mostrou que a condição de disponibilidade reduzida de água no substrato poderia ser ou estar próxima à situação de potencial hídrico baixo para as secções e como resposta desenvolveram brotações do padrão rizoma. As plantas têm desenvolvido mecanismos para se acomodar à perda de água para o ambiente e muitas escapam da seca através do desenvolvimento de atributos morfológicos e ou fisiológicos que limitam a perda de água (BEWLEY *et al.*, 1993).

Outra observação relacionada a esta condição, foi que a massa seca das brotações das secções do rizoma que ficaram em substrato com disponibilidade reduzida de água foi menor do que das brotações das secções que estavam em disponibilidade alta. Esta resposta reforçou a hipótese de que a condição de disponibilidade reduzida de água no substrato poderia causar situação de déficit hídrico para as secções do rizoma e suas brotações, pois uma das manifestações de um tecido vegetal sob condição de falta de água é a redução de crescimento. Segundo LEVITT (1980) a inibição de alongamento celular deve ser a

resposta mais sensível da planta ao estresse hídrico, desde que o crescimento celular está relacionado à turgescência celular e a turgescência celular diminui com a desidratação. KRAMER (1983) explica que o alongamento celular, geralmente, começa a ser inibido nas plantas que estão em potencial hídrico de apenas -0,2 a -0,4 MPa. Entretanto, o valor do potencial hídrico que leva à inibição de crescimento não é fixo, isto é pode ser diferente conforme a espécie da planta e em função de suas características estruturais. Por exemplo, em *Triticum* foi de 0,5 MPa (BARLOW *et al.*, 1977), em *Helianthus annuus* L. de -4 MPa (BOYER, 1970) e cevada esteve entre -0,5 a - 0,9MPa (MATSUDA & RIAZI, 1981). Desta forma, relacionando a redução de crescimento das brotações à utilização de PEG que gerou potenciais baixos, pode-se supor que a condição de disponibilidade reduzida de água no substrato tenha causado deficiência hídrica ou situação próxima a esta para as secções do rizoma de *Kohleria* sp.

Observou-se, ainda, que a massa seca das secções do rizoma que ficaram em substrato com disponibilidade reduzida de água foi maior ou igual a das secções em volume maior de água. Esta resposta foi diferente da verificada anteriormente com as brotações, cuja massa seca foi maior nas brotações das secções que ficaram em substrato com maior disponibilidade de água. Talvez as secções em presença de disponibilidade reduzida água tenham economizado a água de seus tecidos e para tanto tiveram metabolismo menor, consumindo menos as suas reservas. Considerando ainda que as secções, nesta condição, conseguiram desenvolver suas brotações, pode-se classificar o rizoma de *Kohleria* sp como órgão resistente à falta de água. Outra evidência da resposta de resistência foi que as secções só apresentaram sinal de murcha após 120 dias sem qualquer adição de água e ainda desenvolveram brotação nesta condição (dados não apresentados). Há espécies que

conseguem sobreviver à dessecação total. Exemplo disto são as plantas africanas *Craterostigma nanum* e *Craterostigma monroi* Engl. que conseguem passar por dessecação total por 3 a 5 anos e restauram sua atividade metabólica quando reidratadas lentamente (GAFF, 1977). As secções do rizoma de *Kohleria* sp não atingiram este grau de tolerância à dessecação, mas pode-se sugerir que possuem tolerância alta à dessecação, pelo menos da ordem de meses. Muitos organismos no estado tolerante à dessecação contêm quantidade grande de açúcares solúveis e sacarose, geralmente acompanhada por oligossacarídeos maiores rafinose e estaquiose. A acumulação destas substâncias poderia prover componentes hidrofílicos, que poderiam recolocar a água celular. Estas observações mostram que os açúcares são essenciais para a sobrevivência de tecidos vegetais em estado de dessecação. Disto, pode-se supor que as secções do rizoma de *Kohleria* sp talvez tenham usado os açúcares nesta situação de falta de água, considerando ainda que a sua reserva principal é o amido. KOSTER & LEOPOLD (1988) verificaram que o conteúdo de sacarose e oligossacarídeos nos eixos embrionários de sementes de *Glycine max* L., *Pisum sativum* L. e *Zea mays* L., aumentaram durante o estágio de tolerância à dessecação e na ausência das substâncias a tolerância desapareceu.

Sabe-se que plantas em condição de falta de água utilizam-se dos solutos para adquirirem a situação de ajustamento osmótico e um dos solutos conhecidos é o aminoácido prolina. Entretanto, a prolina não foi o soluto utilizado pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp. A quantidade encontrada de prolina foi reduzida e ainda verificada tanto nas secções que ficaram em substrato com disponibilidade reduzida de água quanto naquelas em volume maior. Talvez a concentração de prolina só venha aumentar mais tarde, isto é, em secções que ficassem por mais tempo nesta condição. Pode-se ainda supor que açúcares possam estar

envolvidos no ajustamento osmótico das secções do rizoma nesta condição, levando em conta que sua reserva principal é o amido. MATSUDA & RAYAN (1990) mostraram que em estudos cinéticos de curta duração houve aumento de glicose em tecidos submetidos a potencial osmótico baixo.

Outra observação foi que as secções do rizoma em substrato com disponibilidade reduzida de água tiveram número menor de raízes que aquelas em disponibilidade maior. Este resultado difere das observações mais gerais verificadas em outras espécies, quando submetidas à falta de água, que tiveram número maior de raízes para aumentar a superfície de assimilação de água, como observado nas espécies de *Lolium perene* (JUPP & NEWMAN, 1987) e *Zea mays* (CIAMPOROVÁ, 1987). O crescimento maior de raízes é particularmente importante para o estabelecimento da plântula devido à facilidade das camadas da superfície do solo secarem (SHARP *et al.*, 1988). No entanto, talvez a redução de raízes encontrada nas secções do rizoma de *Kohleria* sp que ficaram em disponibilidade reduzida de água no substrato tenha sido uma estratégia para economizar energia e o consumo de água. De acordo com HALL (1981) um sistema de raiz bem desenvolvido pode explorar substancialmente o ambiente do solo, mas os custos de energia associado com o desenvolvimento e a sua manutenção podem ser excessivos. Por outro lado, a redução de crescimento de raízes em plantas em condição de falta de água pode estar associada às substâncias reguladoras de crescimento. WATTS *et al.*, (1981) discutem que um efeito comum de estresse hídrico é o aumento da taxa raiz/parte aérea e esta relação pode ser mediada pela concentração endógena de ABA. No entanto, também há evidências de que etileno pode inibir o desenvolvimento de raízes, por inibir o transporte polar de auxina no caule e isto por sua vez causaria inibição do desenvolvimento das raízes. O tratamento de

estacas de *Pisum sativum* L. com ACC reduziu o número de raízes formadas. Este efeito foi atribuído ao etileno proveniente do ACC, que inibiu o transporte polar de auxina (NORDSTROM & ELIASSON, 1993). Resposta de inibição do transporte polar de auxina por etileno também foi encontrada em outras espécies: em estolões de *Solanum tuberosum* (MINGO-CASTEL *et al.*, 1974) e em segmentos internodais de *Pisum sativum* (SUTTLE, 1988).

Assim, com a caracterização do efeito da condição de 1,0ml de água no substrato pode-se sugerir que as secções do rizoma de *Kohleria* sp foram capazes de brotar e desenvolver suas brotações com economia de água, por apresentarem resistência à perda de água. As secções do rizoma nesta situação funcionaram como uma reserva perfeita de água e nutrientes para o desenvolvimento de sua brotação.

Do estudo dos fatores do ambiente verificou-se que a temperatura e o volume de água do substrato influenciaram fortemente o padrão de brotação desenvolvida pelas secções do rizoma de *Kohleria* sp. A brotação do padrão parte aérea ocorreu em secções em substrato com disponibilidade alta de água e em temperatura de 30°C e o tipo rizoma em secções que ficaram com disponibilidade reduzida de água, nas temperaturas de 20 e 30°C.

A plasticidade das gemas das secções do rizoma de *Kohleria* sp em desenvolver se no padrão rizoma também foi verificada ser fortemente controlada pelo etileno e ácido abscísico.

O estudo do controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma mostrou que o etileno esteve fortemente envolvido com a sua ocorrência em secções do rizoma de *Kohleria* sp que ficaram em disponibilidade reduzida de água no substrato. Isto foi inicialmente evidenciado pelo tratamento com ETREL, que promoveu o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma nas secções com maior disponibilidade de água no substrato,

enquanto as secções sem tratamento e em disponibilidade reduzida de água também formaram o mesmo padrão de brotação. Esta evidência foi confirmada com o tratamento das secções com inibidores de etileno. Nitrato de prata é conhecido por inibir ação de etileno (BEYER, 1976; VEEN, 1987; ABELES *et al.*, 1992). O tratamento das secções do rizoma de *Kohleria* sp com AgNO_3 que estavam em situação de disponibilidade reduzida de água no substrato, causou o desenvolvimento de brotações do tipo parte aérea. O efeito de AgNO_3 em inibir a ação de etileno é bastante conhecido e já foi visto em *Lycopersicon esculentum* (DAVIES *et al.*, 1988), *Brassica campestris* (CHI *et al.*, 1991), *Brassica juncea* (PUA & CHI, 1993) e citrus (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1993).

Secções do rizoma que ficaram em substrato com solução de PEG, simulando condição de potencial hídrico baixo e tratadas simultaneamente com nitrato de prata, desenvolveram brotações do padrão parte aérea e aquelas só com PEG tiveram o tipo rizoma. Este experimento mostrou que em condição de disponibilidade reduzida de água, o etileno pode exercer ou ser uma das substâncias que controlam o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma, já que o nitrato de prata foi capaz de impedir o desenvolvimento do tipo rizoma.

AVG é inibidor da síntese de etileno (WANG, 1987). O tratamento de secções do rizoma com AVG constitui-se em outra evidência do envolvimento de etileno com o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma. AVG promoveu o desenvolvimento de brotação do padrão parte aérea em secções com disponibilidade reduzida de água no substrato, inibindo a formação de brotações do tipo rizoma, provavelmente por inibir a síntese de etileno. BERGLUND & OHLSSON (1992) trataram com AVG tecido de *Digitalis lanata* que estava em meio de cultura e obtiveram acúmulo da substância cardenolida, através

da inibição da síntese de etileno. O efeito de inibição da síntese de etileno por AVG foi visto também em *Lycopersicum esculentum* Mill (FUGINO *et al.*, 1989) e em explantes de folhas de citrus (GOREN *et al.*, 1993). Considerando que a ocorrência de brotações do padrão rizoma esteve fortemente associada à disponibilidade reduzida de água no substrato e ao uso de PEG para redução do potencial hídrico utilizado, pode-se sugerir que o padrão rizoma seria uma resposta morfológica das secções do rizoma de *Kohleria* sp à condição de déficit hídrico e seu controle é exercido pelo etileno. De acordo com HALE & ORCUTT, (1987) a condição de estresse de água promove a produção de etileno em tecido vegetal.

Além de inibir o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma, AgNO₃ também influenciou o ápice das brotações a desenvolverem um botão floral. O botão floral da brotação atingiu o estágio de antese completa. Provavelmente, a ausência da ação de etileno ou outra substância influenciada pelo etileno possa ser um dos fatores que estão relacionados com o controle do processo de floração das plantas de *Kohleria* sp. O nitrato de prata inibindo a ação de etileno pode ter alterado a sensibilidade das gemas das secções do rizoma tratadas e este fator talvez tenha sido posteriormente transmitido também para as brotações e as suas gemas apicais devem ter adquirido estado de competência e determinação que conduziu à diferenciação floral.

Tratamentos com auxina ou citocinina podem promover a produção de etileno, por via indireta, em tecidos vegetais, como verificada em *Oriza sativa* (GROSSMANN & KWIATROWSKI, 1993a) e *Helianthus annuus* (GROSSMANN *et al.*, 1993b). No entanto, o tratamento das secções do rizoma de *Kohleria* sp com auxina e/ou citocinina não promoveu a produção de etileno como se esperava, causando o desenvolvimento de brotação do padrão rizoma. Talvez 6BA e auxina na concentração usada não promoveram o

desenvolvimento do tipo rizoma, porque a quantidade de etileno produzida foi insuficiente ou ainda porque o etileno envolvido com a formação do padrão rizoma seja formado de outra maneira.

Embora, o ACC exógeno não tenha influenciado o padrão de brotação, foi detectado em extratos de secções do rizoma que ficaram em disponibilidade reduzida de água no substrato, caracterizando de forma indireta a presença de etileno. ACC é o intermediário da via de síntese de etileno e a sua determinação endógena é usada para identificar a produção de etileno (SAFTNER, 1992; ROTHAN & NICOLAS, 1994).

A dosagem de etileno mostrou que a sua liberação foi significativamente maior nas secções do rizoma de *Kohleria* sp que ficaram em disponibilidade reduzida de água no substrato que naquelas em disponibilidade maior. A liberação de etileno encontrada comprovou diretamente o seu envolvimento com o desenvolvimento de brotação do padrão rizoma e ainda está de acordo com os resultados obtidos indiretamente através dos tratamentos das secções do rizoma com ETREL, AgNO₃ e AVG. Assim, indicando que o etileno teve ação moduladora nas gemas do rizoma de *Kohleria* sp em condição de falta de água. A presença de etileno em tecido vegetal em falta de água tem sido evidenciada em outras espécies. Folhas destacadas de *Lycopersicon esculentum* Mill. e *Triticum aestivum* quando foram submetidas à murcha produziram mais etileno do que aquelas mantidas umedecidas (NEILL *et al.*, 1986; WRIGHT (1977).

Analisando-se a resposta de padrão de brotação das secções do rizoma de *Kohleria* sp, sugere-se que a gema da cada secção que brotou possuía competência e determinação conforme McDANIEL (1984) para responder logo que foram submetidas a uma das condições de umidade do substrato. Isto pode ser comprovado também pelo processo de

brotação que atingiu porcentagem alta no 4º dia, e por volta do 6º dia a morfologia das brotações já era identificada. Com o resultado de liberação de etileno, que ocorreu no 2º dia, pelas secções em substrato com disponibilidade reduzida de água, pode-se sugerir que a competência e determinação das gemas em se diferenciarem no padrão rizoma foi modulada pela presença de etileno. Pode-se ainda sugerir que talvez a definição padrão rizoma pode ter ocorrido já no 2º dia que as secções foram deixadas em disponibilidade reduzida de água.

Portanto, logo após o início do experimento, nos primeiros dias, o padrão morfológico da brotação foi definido e muito provavelmente etileno participou do seu controle.

Caracterizado que as secções do rizoma de *Kohleria* sp em disponibilidade reduzida de água no substrato produziram etileno, pode-se ainda relacionar esta evidência ao número reduzido de raízes formadas quando as secções estavam, nesta condição. Talvez a produção de etileno nas secções em disponibilidade reduzida de água tenha impedido que auxina fosse destinada à formação de raízes. Isto estaria de acordo com as observações levantadas anteriormente nos experimentos, onde etileno inibiu o transporte polar de auxina causando a inibição da formação de raízes.

A análise do ápice modificado das brotações, das secções do rizoma de *Kohleria* sp que ficaram nos frascos para dosagem de etileno, sugere a hipótese de que o ápice “em forma de cabeça”, poderia ser na verdade o caule da brotação que continuou a ser formado mas não se alongou. Isto em função que no ápice modificado a disposição do cilindro vascular deixou um espaço que poderia corresponder a uma lacuna foliar e as células do tecido parenquimático serem pouco diferenciadas devido à presença de meatos aeríferos. Finalmente, também pela presença de grupos de células parenquimáticas pequenas, que

parecem ter potencial para se diferenciarem em gemas e que talvez viessem a ser as gemas laterais do caule da brotação. Observou-se, neste caso, novamente a característica forte de plasticidade que o meristema destas brotações possui.

Verificou-se que ácido abscísico promoveu o desenvolvimento de brotação do padrão rizoma nas secções do rizoma de *Kohleria* sp que ficaram em substrato com disponibilidade maior de água. Esta resposta das secções mostrou que o ABA também pode participar do controle do desenvolvimento de brotação do padrão rizoma. ABA é conhecido por modular as respostas das plantas em condição de falta de água. Segundo CORNISH & RADIN (1994) um dos efeitos da presença de ABA poderia ser em integrar respostas das plantas ao estresse hídrico. Quando ABA é aplicado em raízes o volume de fluxo de água através destas é frequentemente maior, melhorando o balanço hídrico da planta. Outra evidência de sua ação mediadora foi obtida quando embriões de *Daucus carota* tratados com ácido abscísico tiveram tolerância à dessecação (IILDA *et al.*, 1992; TETTEROO *et al.*, 1995).

Para se caracterizar o possível envolvimento de ABA endógeno com o controle do desenvolvimento do padrão rizoma foram avaliados extratos metanólicos das secções do rizoma de *Kohleria* sp. Para tanto as secções do rizoma foram previamente deixadas em substrato com disponibilidade alta ou reduzida de água. Nos bioensaios das frações ácidas dos extratos caracterizou-se a presença significativa de atividade inibidora, principalmente nos extratos das secções que ficaram com 1,0ml de água no substrato.

Identificou-se também a presença de inibição da germinação das sementes pelas frações ácidas dos extratos das brotações. O teste de germinação de sementes é um bioensaio utilizado para detectar a presença de substâncias inibidoras de germinação. HIRAI (1986) explica que a germinação de sementes como as de *Lepidium sativum*, *Lactuca* e *Raphanus* é

inibida por ABA. Mas, este efeito inibidor não é específico para ABA, muitos outros compostos, como derivados fenólicos e toxinas patogênicas fúngicas podem causar inibição de crescimento e germinação. Talvez a presença do inibidor em todas as frações ácidas das brotações possa ser devido à presença de outros compostos como as substâncias fenólicas, já que, neste trabalho, identificou-se a presença destas substâncias no rizoma de *Kohleria* sp.

A atividade de inibição da germinação das sementes pela fração ácida das secções do rizoma que ficaram em 1,0ml de água no substrato pode ser associada à possível presença de um inibidor que poderia ser ABA.

O resultado indicativo de atividade de ABA pela fração ácida do extrato das secções do rizoma de *Kohleria* sp foi confirmado também com a sua análise por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS). O ABA padrão utilizado nesta análise foi de uma mistura de isômeros (cis e trans), que foram caracterizados por HPLC.

Para tanto monitorou-se o íon de m/z 190 que é o pico base nos espectros de massas de ABA. NEILL & HORGAN (1984) observaram que a caracterização de ABA por GC/MS mostrou que, no espectro de massas de impacto de elétrons, os íons que ocorreram foram de m/z 222, 190, 162, 134, 106 e 91. O íon de m/z 190 foi o pico base, o mais abundante no espectro e foi caracterizado como tendo quatro átomos de oxigênio originalmente presentes na molécula da solução de ABA padrão.

Na análise do extrato das secções do rizoma com dez dias de idade também foram encontrados componentes que apresentaram picos de m/z 190. Estes componentes foram observados em tempos de retenção de 11,6 a 12,6 minutos, o que foi igual aos tempos observados para os isômeros de ABA padrão. A abundância dos íons de m/z 190 foi maior na fração ácida do extrato das secções do rizoma que estavam em 1,0ml de água no substrato

que na fração do extrato daquelas em 12,0ml. Monitoramentos baseados no íon de m/z 190 foram também aplicados aos extratos de ABA purificados de tecido vegetais de outras espécies, como em exocarpo de *Citrus sinensis* (COWAN & RICHARDSON, 1993), embriões somáticos de *Larix decidua* (LABEL & LELU, 1994), sementes de *Malus domestica* Bokh (SUBBAIAH & POWELL, 1987) e cariopsis de *Zea mays* L. (RIVIER *et al.*, 1977).

Desta forma, os resultados dos bioensaios e a caracterização por espectrometria de massas evidenciaram que ABA também deve participar do controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma, em secções do rizoma de *Kohleria* sp em disponibilidade reduzida de água no substrato.

Caracterizadas as presenças de etileno e ABA em secções do rizoma de *Kohleria* sp em presença de substrato com disponibilidade reduzida de água pode-se inicialmente sugerir que estas substâncias estavam diretamente associadas à resistência do rizoma à falta de água. Talvez ao etileno e ABA também se possa atribuir a capacidade das secções do rizoma de *Kohleria* sp permanecerem em temperatura de 20°C, uma vez que nesta condição também desenvolveram o padrão rizoma.

Considerando as evidências indiretas dos efeitos de etileno e ABA em promoverem o desenvolvimento de brotações do padrão rizoma nas secções com os resultados da caracterização endógena, pode-se sugerir que etileno e ABA participaram dos eventos do controle do desenvolvimento do padrão rizoma em secções do rizoma de *Kohleria* sp quando submetidas à baixa disponibilidade de água no substrato. Talvez etileno e ABA exerçam controle no desenvolvimento do padrão rizoma por caminhos diferentes isto é, cada um poderia atuar por uma via ou poderia haver uma interação entre ambos para atingir o

desenvolvimento deste tipo de brotação. Há evidências indicando que ABA, em condição de estresse hídrico, promoveria a produção de etileno. Assim, sugere-se que esta relação poderia ter ocorrido com o controle do desenvolvimento do padrão rizoma em secções do rizoma que ficaram em substrato com disponibilidade reduzida de água. A produção de etileno pelo ABA foi verificada em explantes de *Gossypium hirsutum* L.(CRACKER & ABELES, 1969), de *Phaseolus vulgaris* (JACKSON & OSBORNE, 1975) e de *Citrus sinensis* (GOREN *et al.*, 1979) e ainda folhas de *Oriza sativa* (YEH, *et al.*, 1995).

Pelas observações de que as plantas de *Kohleria* sp sobrevivem à estação de inverno através de seu órgão subterrâneo, podemos fazer as seguintes considerações. Esta estação, cuja temperatura é baixa, também é a estação de seca. O desenvolvimento de brotação do padrão rizoma ocorreu quando as secções do rizoma estavam em substrato com disponibilidade reduzida de água ou em temperatura de 20°C. Pode-se sugerir que, nas plantas de *Kohleria* sp, o controle da formação de seu órgão subterrâneo está associado além da disponibilidade baixa de água e temperatura baixa, também às substâncias de crescimento etileno e ABA, conforme verificado, neste estudo, com as secções do rizoma.

CONCLUSÕES

Do estudo realizado com o rizoma de *Kohleria* sp pode-se concluir:

- Há a necessidade de maiores estudos para que se possa identificar as plantas de *Kohleria* sp a nível de espécie.
- O rizoma de *Kohleria* sp é um sistema bastante organizado. Trata-se de um caule, devido à disposição de xilema para o interior do córtex e floema para fora, que é envolto por folhas modificadas que armazenam amido.
- Sugere-se, ainda pelo estudo anatômico feito neste trabalho, que o rizoma de *Kohleria* sp poderia ser denominado de “rizoma bulboso”.
- Detectou-se, preliminarmente, a presença de substâncias fenólicas, que podem estar associadas à preservação do rizoma contra o ataque de microorganismos na terra.
- A formação do rizoma de *Kohleria* sp ocorreu indiferente à condição fotoperiódica em que as plantas ficaram.
- O rizoma possui número abundante de gemas que lhe confere um alto grau de capacidade regenerativa.
- O rizoma de *Kohleria* sp não apresentou dormência, brotou imediatamente após sua coleta. Este órgão possui relação de dominância apical forte ocorrendo, em geral, uma brotação por segmento.
- A brotação de secções do rizoma ocorreu tanto na luz quanto no escuro, e ainda nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C, sendo que as mais altas favoreceram a velocidade do processo.

- As secções do rizoma brotaram em substrato com teor de hidratação baixo ou em sua ausência e ainda desenvolveram suas brotações nestas condições. No entanto, as secções apresentaram limite de tolerância ao excesso de água, onde apodreceram.
- A gema das secções do rizoma, após brotar, poderia se desenvolver no padrão parte aérea ou no padrão rizoma. A definição da gema em se desenvolver entre um dos tipos ocorreu rapidamente, por volta do 3º dia que as secções foram submetidas às condições indutoras.
- Observou-se que as gemas do rizoma de *Kohleria* sp possuem alto grau de plasticidade. As gemas responderam, imediatamente, com o desenvolvimento de um dos padrões de brotação. O meristema apical de suas brotações desenvolvidas também apresentou alto grau de plasticidade.
- O padrão rizoma ocorreu em secções que ficaram com disponibilidade reduzida de água no substrato, nas temperaturas de 20 e 30°C. O padrão parte aérea ocorreu em secções do rizoma que ficaram com disponibilidade alta de água no substrato e em temperatura de 30°C. Entretanto, quando estavam em teor alto de hidratação e em temperatura de 20°C tenderam a desenvolver o padrão rizoma.
- As secções do rizoma que ficaram em substrato com solução de PEG, correspondentes aos potenciais de -3, -6 e -12 MPa, também desenvolveram brotações do padrão rizoma, como aquelas que ficaram com disponibilidade reduzida de água no substrato.
- As secções do rizoma que estavam com disponibilidade reduzida de água no substrato ou em sua ausência mantinham se íntegras e ainda desenvolveram suas brotações nestas condições. Esta resposta das secções mostrou que o rizoma é bastante resistente à perda de água.

- Verificou-se o envolvimento de etileno e ácido abscísico no controle do desenvolvimento de brotações do padrão rizoma pelas secções do rizoma, quando estavam com disponibilidade reduzida de água no substrato.
- Considerando que a brotação do padrão rizoma ocorreu nas secções que estavam com disponibilidade reduzida de água no substrato e que na natureza o rizoma é capaz de se manter em estação seca, pode-se sugerir dos resultados obtidos que o controle da iniciação deste órgão nas plantas de *Kohleria* sp está associada ao etileno e ácido abscísico.

LITERATURA CITADA

- AAMLID, T.S., 1992. Effects of temperature and photoperiod on growth and development of tillers and rhizomes in *Poa pratensis* L. ecotypes. **Ann. Bot.** 69:289-296.
- ABELES, F.B., MORGAN, P.W., SALTVEIT, Jr., M. 1992. **Ethylene in plant biology**, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, 414p.
- AHARONI, N. 1978. Relationship between leaf water status and endogenous ethylene in detached leaves. **Plant Physiol.** 61: 658-662.
- AHARONI, N. 1989. Interrelation between ethylene and growth regulators in the senescence of lettuce leaf discs. **J. Plant Growth Regul.** 8:309-317.
- AHARONI, N., YANG, S.F. 1983. Auxin-induced ethylene production as related to auxin metabolism in leaf discs of tobacco and sugar beet. **Plant Physiol.** 73:598-604.
- ALEIXO, M.F., VÁLIO, I.F.M. 1976. Effect of light, temperature and endogenous growth regulators on the growth of buds of *Cyperus rotundus* L. tubers. **Z. Pflanzenphysiol.** 80:336-347.
- ALVARENGA, A.A., VÁLIO, I.F.M. 1989. Influence of temperature and photoperiod on flowering and tuberous root formation of *Pachyrrhizus tuberosus*. **Ann. Bot.** 64:411-414.
- AMASINO, R.M., MILLER, C.O. 1982. Hormonal control of tobacco crown gall tumor morphology. **Plant Physiol.** 69:389-392.
- ANÔNIMO, 1991. GRF Seminar series: The biology of *Kohleria*. **Gesneriad Research Foundation**.

- APELBAUM, A., YANG, S.F. 1981. Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. **Plant Physiol.** 68:594-596.
- ARTECA, RN., BACHMAN, J.M., MANDAVA, N.B. 1988. Effects of indole-3-acetic and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyl segments. **J. Plant Physiol.** 133:430-435.
- ASHBY, M. 1969. **Introduction to plant ecology.** (R. Maclehorse, ed.), R., Co Ltda, Glasgow, pp. 10-13.
- BARLOW, E.E.R., MUNNS, R., SCOTT, N.S., REISNER, A.H. 1977. Water potential, growth, and polyribosome content of the stresses wheat apex. **J.Exp.Bot.** 28: 909-916.
- BARROS, R.S., NEILL, S.J. 1987. Shoot growth in willow (*Salix viminalis*) in relation to abscisic acid, plant water status and photoperiod. **Physiol Plant.** 70:708-712.
- BARTELS, D., SCHNEIDER, K., TERSTAPPEN, G., PIATKOWSKI, D., SALAMINI, F. 1990. Molecular cloning of abscisic acid modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. **Planta.** 181:27-34.
- BATCHELLER, F.N. 1985. The gesneriad register. **Gloxinian.** 35(5):1-15.
- BEN-YEHOSHUA, S., ALONI, B. 1974. Effect of water stress on ethylene production by detached leaves of Valencia orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Physiol.** 53:863-865.
- BERGLUND, T., OHLSSON, A.B. 1992. Effects of ethylene and aminoethoxyvinylglycine on cardenolide accumulation in tissue cultures of *Digitalis lanata*. **J.Plant Physiol.** 140:395-398.
- BEYER, E.M.Jr. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Plant Physiol.** 58:268-271.

- BEWLEY, J.D., REYNOLDS, T.L., OLIVER, M.J. 1993. Evolving strategies in the adaptation to desiccation. In: **Plant responses to cellular dehydration during environmental stress** (J.C. Timothy & E.A. Bray, eds), The American Society of Plant Physiologists, pp. 193-201.
- BLUMENFELD, A. 1975. Ethylene and *Annona* flower. **Plant Physiol.** 55:265-269.
- BOGGAN, J. 1993b. New Kohleria cultivars. **Crosswords.** 17(3):3-4.
- BOGGAN, J., KVIST, L.P. 1993a. The nomenclature of cultivated *Kohlerias*. **Gloxinian.** 43(5):20-24.
- BOPP, M., WERNER, O. 1993. Abscisic acid and desiccation tolerance in mosses. **Bot.Acta.** 106:103-106.
- BOYER, J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rices in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. **Plant Physiol.** 46:233-235.
- BRADFORD, K.J., HSIAO, T.C., YANG, S.F. 1982. Inhibition of ethylene synthesis in tomato plants subjected to anaerobic root stress. **Plant Physiol.** 70:1503-1507.
- BRADFORD, K.J., YANG, S.F. 1980. Stress-induced ethylene production in the ethylene-requiring tomato mutant diageotropica. **Plant Physiol.** 65:327-330.
- BUENO, C.R. 1989. Controle ambiental e ação de reguladores de crescimento no desenvolvimento de plantas de ariá [*Calathea allowia* (Aubl.) Lindl]. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado. 226p.
- BUVAT, R. 1989. **Ontogeny, cell differentiation, and structure of vascular plants.** Springer-Verlag, Berlim, 581p.
- CHANDLER, P.M. 1988. Hormonal regulation of gene expression in the "slender" mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta.** 175:115-120.

- CHEN, Y.Y., LIN, C-H. 1993. Effect of LAB on ABA analogue, on low temperature resistance of mung bean seedlings. **J. Plant Growth Regul.** 12:51-55.
- CHI, G.-L., PUA, E-C., GOH, C.-J. 1991. Role of ethylene on novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp *pekinensis* (sour) olsson in vitro. **Plant Physiol.** 96:178-183.
- CHOPRA, R.N. KAPUR, A. 1988. Effect of abscisic acid and kinetin on protonemal differentiation in *Timmiella anomala*. **Plant Science.** 61:203-206.
- CHRISTIANSON, M.L., WARNICK, D.A. 1983. Competence and determination in the process in vitro shoot organogenesis. **Develop Biol.** 95:288-293.
- CIAMPOROVÁ, M. 1987. The development of structural changes in epidermal cells of maize roots during water stress. **Biol. Plant.** 29(4): 290-294.
- CORBINEAU, F., ENGELMANN, F., COME, D. 1990. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. **Plant Science.** 71: 29-34.
- CORNISH, K., RADIN, J.W. 1994. From metabolism to organism: an integrative view of water stress emphasizing abscisic acid. In: **Environmental injury to plants** (F. Katterman, ed.), San Diego, pp. 89-112.
- CVIKROVÁ, M., SUKHOVA, L.S., EDER, J., KORABLEVA, N.P. 1994. Possible involvement of abscisic acid, ethylene and phenolic acids in potato tuber dormancy. **Plant Physiol. Biochem.** 32(5):685-691.
- COWAN, A.K., RICHARDSON, G.R. 1993. The biosynthesis of abscisic acid from all- β -carotene in a cell-free system from *Citrus sinensis* exocarp. **Plant Cell Physiol.** 34(6):969-972.

- CRACKER, L.E., ABELES, F.B. 1969. Abscission: role of abscisic acid. **Plant Physiol.** 44:1144-1149.
- CREELMAN, R.A., WASON, H.S., BENSON, R.J., BOYER, J.S., MULLET, J.E. 1990. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. **Plant Physiol.** 92:205-214.
- CUTTER, E.G. 1986. **Anatomia vegetal.** 2ª Edição, Livraria Roca Ltda, São Paulo, 304p.
- DAVIES, K.M., HOBSON, G.E., GRIERSON, D. 1988. Silver ions inhibit the ethylene-stimulated production of ripening-related mRNAs in tomato. **Plant Cell Environm.** 11:729-738.
- DELVALLÉE, I., PAFFEN, A., KLERK, G.-J. 1990. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated in vitro. II. the effect of temperature. **Physiol Plant.** 80:431-436.
- DIMALLA, G.G.; VAN STADEN, J. 1977. Effect of ethylene on the endogenous cytokinin and gibberellin levels in tuberizing potatoes. **Plant Physiol.** 60: 218-221.
- DJILIANOV, D., GERRITS, M.M., IVANOVA, A., VAN ONCKLEN, H.A., KLERK, G.-J.M. 1994. ABA content and sensitivity during the development of dormancy in lily bulblets regenerated in vitro. **Physiol Plant.** 91:639-644.
- DOSTÁL, R. 1967. **On integration in plants.** (K.V. Thimann, ed.), Oxford University Press, London, 218p.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28:350-356.

- EDDO, R. 1993. Sensitivity and involvement of plant growth regulators in differentiation and morphogenesis. **Acta Hort.** 329:169-176.
- EL-BELTAGY, A.S., HALL, M.A. 1974. Effect of water stress upon endogenous ethylene levels in *Vicia faba*. **New Phytol.** 73:47-60.
- ERWING, J.E., HEINS, R.D., KARLSSON, M.G. 1989. Thermomorphogenesis in *Lilium longiflorum*. **Amer. J. Bot.** 76(1):45-52.
- EWING, E.E. 1987. The role of hormones in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization. In: **Plant hormones and their role in plant growth and development** (P.J. Davies, ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp.515-538.
- EWING, E.E., WAREING, P.F. 1978. Shoot, stolon and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. **Plant Physiol.** 61:348-353.
- FIELD, R.J. 1981. The effect of low temperature on ethylene production by leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* L. **Ann. Bot.** 47:215-223.
- FIGUEIREDO, R.C.L. 1972. Sobre a anatomia dos órgãos vegetativos de *Ocimum nudicale* Benth. (Labiatae). **An. Acad. brasil. Ciên.** 44(3/4):549-570.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., DIETRICH, S.M.C. 1981. Variações estacionais nos compostos de reserva e no metabolismo do xilopódio de *Ocimum nudicale* Benth.var. *anisifolia* Giul. (Labiatae). **Revta. brasil. Bot.** 4:73-82.
- FISCHER, A., BROUQUISSE, R., RAYMOND, P. 1995. Organic nitrogen reserves and their mobilization during sprouting of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) tubers. **J. Exp. Bot.** 46(293):1803-1808.
- FOSTER, A.S. 1950. **Practical Plant Anatomy**. Van Nostrand, N.York

- FUGINO, D.W.; BURGER, D.W.; BRADFORD, K.J. 1989. Ineffectiveness of ethylene biosynthetic and action inhibitors in phenotypically reverting the epinastic mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **J. Plant. Growth Regul.** 8: 53-61.
- FRITSCH, K. 1913. Beitrag zur Kenntnis der Gesnerioideae. **Bot. Jahrb.** pp. 393-439.
- GAFF, D.F. 1977. Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. **Oecologia** 31:95-109.
- GLINE, M.G. 1991. Apical dominance. **Bot. Rev.** 57(4):318-358.
- GOLDSCHMIDT, E.E., HUBERMAN, M., GOREN, R. 1993. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus fruit with ethylene antagonists. **Plant Growth Regul.** 12:325-329.
- GOREN, R., ALTMAN, A., GILADI, I. 1979. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures. **Plant Physiol.** 63:280-282.
- GOREN, R., DAGAN, E., SAGEE, O., RIOV, J. 1993. Abscission in citrus leaf explants: role of ABA-induced ethylene. **Acta Hort.** 329:43-50.
- GRANSTRÖM, A., SCHIMMEL, J. 1993. Heat effects on seeds and rhizomes of a selection of boreal forest plants and potential reaction to fire. **Oecologia.** 94:307-313.
- GRIME, J.P. 1983. Regenerative strategies. In: **Plant strategies and vegetation process**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, pp.79-119.
- GROSSMANN, K., KWIATROWSKI, J. 1993a. Selective induction of ethylene and cyanide biosynthesis appears to be involved in the selectivity of herbicide quinclorac between rice and barnyardgrass. **J. Plant Physiol.** 142:457-466.
- GROSSMANN, K., SIEFERT, F., KWIATKOSWSKI, J., SCHRAUDNER, M., LANGEEBARTELS, C., SANDERMANN, Jr, H. 1993b. Inhibition of ethylene

- production in sunflower cell suspensions by the plant growth retardant BAS 111.W: possible relations to changes in polyamine and cytokinin contents. **J. Plant Growth Regul.** 12:5-11.
- GUPTA, S., BHAMBIE, S. 1992. Shoot apex organization, leaf development and behaviour of vegetative bud in *Adiantum incisum* FORSK. **Flora.** 187:259-269.
- HALE, M.G., ORCUTT, D.M. 1987. The role of phytohormones in stressed plants. In: **The physiology of plants under stress.** Wiley, Inter science, USA, pp. 145-169.
- HABERLANDT, G. 1965. **Physiological plant anatomy.** 2nd Edition, Jayed Press, New Delhi, 777p.
- HALL, A.E. 1981. Adaptation of annual plants to drought in relation to improvements in cultivars. **Hortscience.** 16(1):15-16.
- HERTOGH, A.A., DE, LE NARD, M. 1993. Botanical aspects of flower bulbs. In: **The physiology of flower bulbs** (A. De Hertogh, M. Le Nard, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 7-20.
- HIRAI, N. 1986. Abscisic acid. In: **Chemistry of plant hormones** (N. Takahashi, ed.), 3rd Edition, CRC Press, Florida, pp. 201-248.
- HOSON, T., MAEDA, S., SAKAGUCHI, K., ONSHI, H., OHTA, H. 1990. Changes in osmotic pressure and cell wall properties during auxin- and ethylene-induced growth of intact coleoptiles of rice. **Physiol Plant.** 78:277-284.
- HYODO, H. 1991. Stress/wound ethylene. In: **The plant hormone ethylene** (A.K. Mattoo, J.C. Suttle, eds.). CRC Press, London, pp. 43-63.

- ILDA, Y., WATABE, K., KAMADA, H., HARADA, H. 1992. Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryos. **J. Plant Physiol.** 140:356-360.
- ILAH, I., JABEEN, M., FIRDOUS, N. 1986. Morphogenesis with saffron tissue culture. **J. Plant Physiol.** 128: 227-232.
- IVANOV, V.B. 1989. Development of the ideas of D.A. SABININ in research on root growth and morphogenesis. **Soviet Plant Physiol.** 36(5):683-760.
- IVINS, J.D., MILTHORPE, F.L. 1963. **The growth of potato.** Butterworths, London, 328p.
- JACKSON, M.B., OSBORNE, D.J. 1975. Abscisic acid, auxin and ethylene in explant abscission. **J.Exp.Bot.** 23(76):849-862.
- JENSEN, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice.** W.H. Freeman, San Francisco.
- JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique.** McGraw-Hill Book Co. inc. N.York.
- JONES, H.G., JONES, M.B. 1991. Introduction: some terminology and common mechanisms. In: **Plants under stress** (Jones, Flowers & Jones, eds), Cambridge Press, pp. 1-10.
- JUPP, A.P., NEWMAN, E.I. 1987. Morphological and anatomical effects of severe drought on the roots of *Lolium perenne* L. **New Phytol.** 105:393-402.
- KAHL, G. 1974. Metabolism in plant storage tissue slices. **Bot.Rev.** 40(3):263-314.
- KAPUYA, J.A., HALL, M.A. 1984. Plant sensitivity to endogenous ethylene in relation to species characteristics. **Z.Pflanzenphysiol.** 113:461-464.

- KEREN-PAZ, V., BOROCHOV, A., MAYAK, S. 1989. The involvement of ethylene in *Liatris* corm dormancy. **Plant Growth Regul.** 8:11-20.
- KIM, W.T., SILVERSTONE, A., YIP, W.K., DONG, J.G., YANG, S.F. 1992. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. **Plant Physiol.** 98:465-471.
- KIM, K.-S., DAVELAAR, E., KLERK, G.-J. 1994. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated in vitro. **Physiol Plant.** 90:59-64.
- KLERK, G.J., PAFFEN, A. 1995. The effects of environmental conditions on sprouting of micropropagated lily bulblets with various levels of dormancy. **Acta Bot. Neerl.** 44(1):33-39.
- KODA, Y. 1982. Changes in levels of butanol and water soluble cytokinins during the life cycle of potato tubers. **Plant Cell Physiol.** 23(5):843-849.
- KODA, Y., OMER, EL-S., YOSHIHARA, T., SHIBATA, H., SAKAMURA, S., OKAZAWA, Y. 1988. Isolation of a specific potato tuber inducing substance from potato leaves. **Plant Cell Physiol.** 29(6):1047-1051.
- KOSTER, K.L., LEOPOLD, A.C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiol.** 88: 829-832.
- KRAMER, P.J. 1983. Water deficits and plant growth. In: **Water relations of plant**, Academic Press, London, pp. 343-389.
- KRISHNAMOORTHY, H.N. 1981. Auxins. In: **Plant growth substances**. Tata Mcgraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi, pp. 3-48.

- KROCHKO, J.E., BEWLEY, J.D., PACEY, J. 1978. The effects of rapid and very slow speeds of drying on the ultrastructure and metabolism of the desiccation - sensitive moss *Crotonuron filicinum* (Hedw.) Spruce. **J. Exp. Bot.** 29(111):905-917.
- KUBIK, M.P., BUTA, J.G., WANG, C.Y. 1992. Changes in the levels of abscisic acid and its metabolites resulting from chilling of tomato fruits. **Plant Growth Regul.** 11:429-434.
- KUMAR, D., WAREING, P.F. 1972. Factors controlling stolon development in the potato plant. **New Phytol.** 71:639-648.
- KUMAR, G.N.M., KNOWLES, N.R. 1993. Involvement of auxin in the loss of apical dominance and plant growth potential accompanying aging of potato seed tubers. **Can. J. Bot.** 71:541-550.
- KURAIISHI, S., YAMASHITA, D., SAKURAI, N., HASEGAWA, S. 1989. Changes of abscisic acid and auxin as related to dormancy breaking of *Allium wakegi* bulblets by vacuum infiltration and BA treatment. **J. Plant Growth Regul.** 8:3-9.
- KVIST, L.P., SKOG, L.E. 1992. **Revision of Kohleria (Gesneriaceae)**. Smithsonian Institution Press, Washington 79: 83p.
- KVIST, L.P., SKOG, L.E. 1996. **Revision of Pearcea (Gesneriaceae)**. Smithsonian Institution Press, Washington 84: 47p.
- LABEL, P., LELU, M.-A. 1994. Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix X leptoeuropaea*). **Plant Growth Regul.** 15:175-182.
- LABOURIAU, L.G. 1983. **A germinação das sementes**. Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Washington, p. 174.

- LANGENHEIM, J.H., THIMANN, K.V. 1987. **Botany**. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 624p.
- LEAKEY, R.R.B., CHANCELLOR, R.J., VINCE-PRUE, D. 1977. Regeneration from rhizome fragments of *Agropyron repens*. **Ann.appl.Biol.** 87:423-431.
- LEONE, A., COSTA, A., TUCCI, M., GRILLO, S. 1994. Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. **Physiol Plant.** 92:21-30.
- LEOPOLD, A.C. 1990. Coping with desiccation. In: **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. Wiley-Liss, p. 37-56.
- LEVITT, J. 1980. Water stress. In: **Responses of plants to environmental stresses**. Academic Press, London, pp. 25-280.
- LEVITT, J. 1981. Stress and strain terminology. In: **Responses of plants to environmental stress**. Academic Press, London, pp. 3-10.
- LIEBERMAN, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 30:533-91.
- LIEBERMAN, M., BAKER, J.E., SLOGER, M. 1977. Influence of plant hormones on ethylene production in apple, tomato, and avocado slices during maturation and senescence. **Plant Physiol.** 60:214-217.
- LOPEZ-CARBONELL, M., ALEGRE, L., VAN ONCKELEN, H. 1994. Changes in cell ultrastructure and endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid concentrations in *Fatsia japonica* leaves under polyethylene glycol induced water stress. **Plant Growth Regul.** 15:165-174.

- LUDFORD, P.M. 1987. **Posthaverst hormone changes in vegetables and fruit** (P.J. Davies, ed.). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 574-592.
- LYNCH, D.V. 1990. Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids. In: **Environmental injury to plants** (F.Katterman, ed.), Academic Press, New York, pp. 17-34.
- LYNDON, R.F. 1994. Control of organogenesis at the shoot apex. **New Phytol.** 128:1-18.
- MATTOO, K.J., WHITE, B.W. 1991. Regulation of ethylene-synthetizing system in apple tissue. **Plant Physiol.** 18:715-719.
- MATTOO, K.J., LIEBERMAN, M. 1977. Localization of the ethylene-synthetizing system in apple tissue. **Plant Physiol.** 60:794-799.
- MATTOO, K.J., BAKER, J.E., CHALUTZ, E., LIEBERMAN, M. 1977. Effect of temperature on the ethylene-synthetizin system in apple, tomato and *Penicillium digitatum*. **Plant Cell Physiol.** 18:715-719.
- MATSUO, T., MITSUZONO, H., OKADA, R., ITOO, S. 1988. Variations in the levels of major free cytokinins and free abscisic acid during tuber development of sweet potato. **J. Plant Growth Regul.** 7:249-258.
- MATSUDA, K., RAYAN, A. 1990. Anatomy: a key factor regulating plant tissue response to water stress. In: **Environmental injury to plants** (F. Katterman, ed.), vol. 4, Academic Press, New York, pp. 63-88.
- MATSUDA, K., RIAZI, A. 1981. Stress induced osmotic adjustment in growing regions of barley leaves. **Plant Physiol.** 68:571-576.

- MAUK, C.S., LANGILLE, A.R. 1978. Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. Ciz-zeatin riboside in the potato plant: its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. **Plant Physiol.** 62:438-442.
- McDANIEL, C.N. 1984. Competence, determination and induction in plant development. In: **Pattern formation a primer in developmental biology**, (Malacinski, G.M. & Bryant, S.V., eds.). Macmillan Publishing Company, New York, pp. 393-412.
- McINTYRE, G.I. 1976. Apical dominace in the rhizome of *Agropyron repens*: the influence of water stress on bud activity. **Can. J. Bot.** 54:2747-2754.
- McKEON, T.A., YANG, S.F. 1987. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: **The plant hormones and teir role in plant growth and development** (P.J. Davies, ed.). Martinus Nijhoff Publishers, Lancaster, pp. 94-131.
- MEDFORD, J.I. 1992. Vegetative apical meristems. **Plant Cell.** 4:1029-1039.
- MELIS, R.J., VAN STADEN, J. 1984. Tuberization and hormones. **Z.pflanzenphysiol.** 113S:271-283.
- MENEZES, M.L., MÜLLER, C., SAJO, M.G. 1979. Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de *Vernonia* da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). **Bol. Botânica**, Univ.S.Paulo, 7:33-38.
- MEYER, R.F., BOYER, J.S. 1972. Sensivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. **Planta.** 108:77-87.
- MICHEL, B.E., KAUFMAN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glicol 6000. **Plant Physiol.** 51:914-916.

- MINGO-CASTEL, A., NEGM, F.B., SMHIT, O.E. 1974. Effect of carbon dioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured in vitro. **Plant Physiol.** 53:798-801.
- MORGAN, J.M. 1988. The use of coleoptile responses to water stress to differentiate wheat genotypes for osmoregulation growth and yield. **Ann. Bot.** 62:193-198.
- MOORE, T.C. 1979. **Biochemistry and physiology of plant hormones.** Springer-Verlag, New York, 274p.
- NEILL, S.J., HORGAN, R. 1984. Biosynthesis of abscisic acid. In: **The biosynthesis of plant hormones** (A. Crozier & J.R. Hillman, eds), Cambridge University Press, Ingleterra, pp. 43-70.
- NEILL, S.J., MCGAW, B.A., HORGAN, R. 1986. Ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production in *flacca*, a wilted mutant of tomato, subjected to water deficiency and pre-treatment with abscisic acid. **J. Exp. Bot.** 37(177):535-541.
- NORDSTRÖM, A.-C., ELIASSON, L. 1993. Interaction of ethylene with indole-3-acetic acid in regulation of rooting in pea cuttings. **Plant Growth Regul.** 12:83-90.
- OBATA-SASAMOTO, H., SUZUKI, H. 1979. Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. **Physiol.Plant.**, 45:320-324.
- PELACHO, A.M., MARTIN-CLOSAS, L., CAMPABADAL, C., TORRES, A., FARRAN,I., MINGO-CASTEL, A.M. 1994. In vitro tuberization of potato: effect of several morphogenic regulators in lighland darkness. **J.Plant Physiol.** 144:705-709.
- PEREIRA, M.F.A., VÁLIO, I.F.M. 1984. Gibberellic acid and the inhibition of aerial tuberisation in *Solanum tuberosum* L. **Plant Growth Regul.** 2:41-47.

- PIMENTEL, G.F. 1984. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. **Associação brasileira de pesquisa potassa e do fosfato**. p. 160.
- PUA,E.-C., CHI, G.-L. 1993. De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. **Physiol Plant**. 88:467-474.
- PURVIS, O.N. 1961. The physiological analysis of vernalization. **Plant Physiol**. 16:76-122.
- RANALLI, 1994. Genotypic influence in vitro induction, dormancy length, advancing age and agronomical performance of potato microtubers (*Solanum tuberosum* L.). **Ann. Appl. Biol**. 125(1):161-72.
- RENA, A.B., MASCIOTI, G.Z. 1976. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Rev.Ceres**. 23(128):288-301.
- RIVIER, L., MILON, H., PILET, P.-E. 1977. Gas chromatography-mass spectrometric determinations of abscisic acid levels in the cap and the apex of maize roots. **Planta**. 134:23-27.
- RIZZINI, C.T. 1965. Estudos experimentais sobre o xilopódio e outros órgãos tuberosos de plantas do cerrado. **An. Acad.brasil. Ciênc**. 37(1):87-113.
- ROGAN, P.G., SMITH, D.L. 1976. Experimental control of bud inhibition in rhizomes of *Agropyron repens* (L.) Beauv. **Z.Pflanzenphysiol**. 78:113-121.
- ROSSETO, E.S. 1997. Comparação ultraestrutural entre folhas hidratadas e dessecadas de três espécies de Velloziaceae: duas revivescentes e uma sensível à dessecação. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado, pp. 88.
- ROTHAN, C., NICOLAS, J. 1994. High CO₂ levels reduce ethylene production in kiwifruit. **Physiol Plant**. 92:1-8.

- RYLSKI, I., RAPPAPORT, L., PRATT, H.K. 1974. Dual effects of ethylene on potato dormancy and sprout growth. **Plant Physiol.** 53:658-662.
- SAFTNER, R.A. 1992. Effects of turgor potential on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid uptake into the vacuolar compartment and ethylene production in tomato pericarp slices. **Physiol Plant.** 85:157-166.
- SALISBURY, F.B., ROSS, C.W. 1992. **Plant Physiology.** Fourth Edition, Wadsworth Publishing Company, California, 682p.
- SARQUIS, J.I., MORGAN, P.W., JORDAN, W.R. 1992. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in etiolated maize seedlings grown under mechanical impedance. **Plant Physiol.** 98:1342-1348.
- SASS, J.E. 1958. **Botanical microtechnique.** 2nd edition, The Iowa State University Press, Iowa.
- SCHENK, H., GELLERMAN, J.L. 1960. Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale. **Anal. Chem.** 32(12):1412-1414.
- SHARP, R.E., DAVIES, W.P. 1979. Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. **Planta.** 147:43-49.
- SHARP, R.E., SILK, W.K., HSIAO, T. 1988. Growth of the maize primary root at low water potentials. **Plant Physiol.** 87:50-57.
- SIMKO, I. 1993. Effects of kinetin, paclobutrazol and their interactions on the microtuberization of potato stem segments cultured in vitro in the light. **Plant Growth Regul.** 12:23-27.
- SHERIDAN, W.F. 1988. Maize developmental genetics: genes of morphogenesis. **Ann.Rev.Genet.** 22:353-385.

- SHIHIRA-ISHIKAWA, I., YANO, D.M.Y., IMAHORI, K. 1985. Morphological variability and plasticity in cultured cells of *Acetabularia calyculus* (Chlorophyceae). In: **Origin and evolution of diversity in plants and plant communities**. (Hara, H., ed.), Japan, pp. 245-256.
- SMART, C.C., FLEMING, A.J., HANKE, D.E. 1995. The physiological role of abscisic acid in eliciting turion morphogenesis. **Plant Physiol.** 108: 623-632.
- SNEDECOR, G.W. 1962. **Statistical methods**. The Iowa State University Press, United States, 422p.
- SUBBAIAH, T., POWELL, L. 1987. Abscisic acid in dormant apple seed tissues - a rapid purification scheme using pre-packed columns and GCMS-SIM quantitation. **Physiol Plant.** 71:203-206.
- SUKHOVA, L.S., MACHÁCKOVA, I., EDER, J., BIBIK, N.D., KORABLEVA, N.P. 1993. Changes in the levels of free IAA and cytokinins in potato tubers during dormancy and sprouting. **Biol. Plant.** 35(3):387-391.
- SMULDERS, M.J.M., KEMP, A., BARENDSE, G.W.M., CROES, A.F., WULLEMS, G.J. 1990. Role of ethylene in auxin-induced flower bud formation in tobacco explants. **Physiol Plant.** 78:167-172.
- STEEVES, T.A., SUSSEX, I.M. 1989. **Patterns in plant development**, 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge, 388p.
- STRASBURGER, E., KOERNICKE, M. 1913. **Das botanisch praktikum**. Verlag Von Gustav Fischer, Iena.

- SUTTLE, J.C. 1988. Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of N-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. **Plant Physiol.** 88:795-799.
- SWAIN, T., HILLS, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **J. Sci. Food Agric.** 10:63-68.
- TAMAS, I.A. 1987. Hormonal regulation of apical dominance. In: **Plant hormones and their role in plant growth and development.** (P.J., Davies, ed.). Martinus Nijhoff Publishers, Lancaster, pp. 393-410.
- TAN, Z., THIMANN, K.V. 1989. The roles of carbon dioxide and abscisic acid in the production of ethylene. **Physiol Plant.** 75:13-19.
- TAYLOR, D.R., AARSSSEN, L.W. 1988. An interpretation of phenotypic plasticity in *Agropyron repens* (Graminae). **Amer.J.Bot.** 75(3):401-413.
- TETTEROO, F.A.A., HOEKSTRA, F.A., KARSSSEN, C.M. 1995. Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota*) embryoides. **J. Plant Physiol.** 145:349-356.
- THOMSON, R.H. 1978. Quinone extractives from durable and non-durable woods. **Rev. Latinoam. Quim.** 913:105-111.
- TREWAVAS, A. 1981. How do plant growth substances work? **Plant Cell Environm.** 4:203-228.
- TRIPPI, V.S. 1982. **Ontogenia y senilidad en plantas.** Universidade Nacional de Cordoba Direccion General de Publicaciones, Argentina. 547p.
- TURNBULL, C.G.N., HANKE, D.E. 1985. The control of bud dormancy in potato tubers. **Planta.** 165:359-365.

- VAN DEN BERG, A.J.J., LABADIE, R.P. 1989. **Quinones. Methods in plant biochemistry.** Academic Press Limited, pp. 451-491.
- VEEN, H. 1987. Use of inhibitors of ethylene action. **Acta Hortic.** 201:213-222.
- VERNIERE, P., PARDOSSI, A., SERRA, G., TOGNONI, F. 1994. Changes in abscisic acid and its glucose ester in *Phaseolus vulgaris* L. during chilling and water stress. **Plant Growth Regul.** 15:157-163.
- VILLERS, T.A. 1975. Structural modifications in dormancy. In: **Dormancy and the survival of plants** (E. Arnold, ed), Camelot Press Ltda, Great Britain, pp. 13-17.
- VREUGDENHIL, D., STRUIK, P.C. 1989. An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). **Physiol Plant.** 75:525-531.
- VREUGDENHIL, D., VAN DIJK, W. 1989a. Effects of ethylene on tuberization in radish (*Raphanus sativus*). **Plant Growth Regul.** 8: 21-30.
- VREUGDENHIL, D., VAN DIJK, W. 1989b. Effects of ethylene on the tuberization of potato (*Solanum tuberosum*) cuttings. **Plant Growth Regul.** 8: 31-39.
- WALKER, K.A., YU, C.P., SATO, S.J., JAWORSKI, E.G. 1979. The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured in vitro. **Amer. J. Bot.** 65: 654-9.
- WALTON, D.C. 1987. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: **Plant hormones and their role in plant growth and development** (P.J. Davies, ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 113-131.
- WANG, C.Y. 1987. Use of ethylene biosynthesis inhibitors in horticulture. **Acta Hortic.** 201:187-194.

- WANG, C.Y., ADAMS, D.O., 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). **Plant Physiol.** 69: 424-427.
- WAREING, P.F. 1978. Determination in plant development. **Bot. Mag.** 1: 3-17.
- WAREING, P.F., AL-CHALABI, T. 1985. Determination in plant cells. **Biol. Plant.** 27(4-5):241-248.
- WAREING, P.F., JENNINGS, A.M.V. 1980. The hormonal control of tuberisation in potato. In: **Plant Growth Substances** (F. Skoog, ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 292-300.
- WATTS, S., RODRIGUES, J.L., EVANS, S.E., DAVIES, W.J. 1981. Root and shoot growth of plants treated with abscisic acid. **Ann. Bot.** 47: 595-602.
- WERNER, O., ESPÍN, R.M.R., BOPP, M., ATZORN, R. 1991. Abscisic-acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. **Planta.** 186:99-103.
- WETTSTEIN, R. 1927. **Botânica sistemática.** Unione Tipografico- Editrice Torinese, 579p.
- WRIGHT, S.T.C. 1977. The relationship between leaf water potential (Ψ leaf) and the levels of abscisic acid and ethylene in excised wheat leaves. **Planta.** 134: 183-189.
- XIN, Z., LI, P.H. 1992. Abscisic acid-induced chilling tolerance in maize suspension-cultured cells. **Plant Physiol.** 99: 707-711.
- YANG, S.F. 1987. Regulation of biosynthesis and action of ethylene. **Acta Hort.** 201: 53-59.
- YANG, S.F., HOFFMAN, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 35:155-89.

- YEANG, H.Y., HILLMAN, J.R. 1982. Lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. and the levels of ethylene in the bud and adjacent tissue. **J. Exp. Bot.** 132(33):111-117.
- YEH, C.C., TSAY, H.-S., YEH, J.H., TSAI, F.Y., SHIH, C.Y., KAO, C.H. 1995. A comparative study of the effects of methyl jasmonate and abscisic acid on some rice physiological process. **J.Plant Growth Regul.** 14: 23-28.
- YOSHII, H., IMASEKI, H. 1981. Biosynthesis of auxin-induced ethylene. Effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. **Plant Cell Physiol.** 22(3):369-379.
- YU, Y., YANG, S.F. 1980. Biosynthesis of wound ethylene. **Plant Physiol.** 66: 281-285.
- ZHANG, J., DAVIES, W.J. 1987. ABA in roots and leaves of flooded pea plants. **J. Exp. Bot.** 38: 649-659.