

VICTOR JULIO FLÓREZ RONCANCIO



ESTUDO DO CONTROLE FOTOPERIÓDICO E HORMONAL DA FLORAÇÃO EM *Solidago x luteus*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) Victor Julio Flórez Roncancio e aprovada pela Comissão Julgadora.

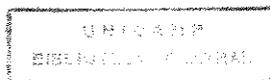
14/04/97
M. Fátima D. A. Pereira

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

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

Campinas - SP

1997



9407834

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	F664e
V.	Ex.
T.º MOBO BC/	30.937
PROC.	284/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/07/97
N.º CPD	

CM-00 098947-7

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

Flórez Roncancio, Victor Julio

F664e Estudo do controle fotoperiódico e hormonal da floração em *Solidago x luteus* / Victor Julio Flórez Roncancio. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.
168f: ilus.

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

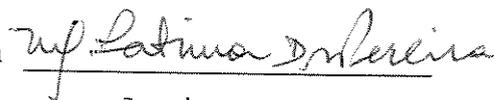
1. Fotoperiodismo.* 2. Plantas - Floração.* 3. Regulador de crescimento.* I. Pereira, Maria de Fátima Domingos Aleixo.* II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 14 de abril de 1997

Banca Examinadora:

Titulares:

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



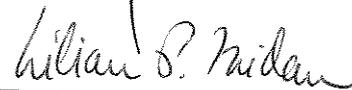
Assinatura

PqC. Dra. Taís Tostes Graziano



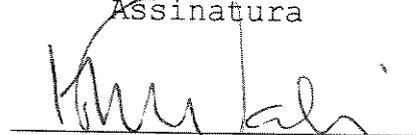
Assinatura

PqC. Dra. Lilian B. P. Zaidan



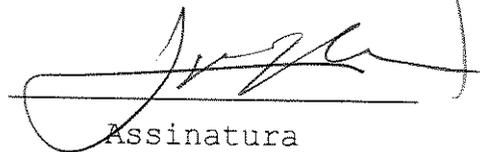
Assinatura

Prof. Dr. Ivany F. M. Válio



Assinatura

Prof. Dr. Jorge Vega



Assinatura

Suplentes:

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Assinatura

Profa. Dra. Marlene A. Schiavinato



Assinatura

A mis hijos Letícia y Luís Felipe

A mis padres Maria y Laurentino

A mis hermanos

A Marisa

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, por intermédio do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PEC-PG), pela concessão da bolsa de estudo.

À Dra. Maria de Fátima D. A. Pereira pela orientação.

Aos Professores Dr. Ladaslav Sodek e Dr. Jorge Vega pelas sugestões e colaboração.

À Dra. Lilian B. P. Zaidan, ao Dr. Ivany F. M. Válio e ao Dr. Jorge Vega pelas sugestões dadas por ocasião da pré-banca.

À empresa Klaas Schoenmaker & filhos (Holambra, SP) em nome do Engenheiro Agrônomo Jairo Schimth pelo fornecimento de material vegetal.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, na pessoa da Dra. Lilian B. P. Zaidan pela colaboração e cessão das câmaras fotoperiódicas.

Ao Lázaro E. P. Peres pela amizade, colaboração e incentivo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela colaboração e amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que o presente trabalho se tornasse realidade.

Conteúdo

	página
Abreviaturas.....	i
Resumo.....	ii
Summary.....	iv
1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	16
2.1. Material botânico.....	16
2.2. Método geral de crescimento de plantas.....	16
2.2.1. Experimentos preliminares.....	16
2.2.2. Experimentos com <i>S. x luteus</i>	17
2.3. Condições fotoperiódicas.....	18
2.4. Medidas de crescimento.....	18
2.5. Experimentos com fotoperíodo.....	19
2.5.1. Ensaio preliminares.....	19
2.5.2. Experimento com diferentes fotoperíodos e antese floral.....	20
2.5.3. Experimento sazonal da indução floral em diferentes fotoperíodos.....	21
2.5.4. Experimento com temperaturas de vernalização e fotoperíodos de DL e DC.....	22
2.6. Cálculo do tempo médio de antese.....	22
2.7. Aplicação de giberelinas e citocininas.....	23
2.8. Análise de substâncias reguladoras de crescimento.....	23
2.8.1. Caracterização das amostras.....	23
2.8.2. Extração e fracionamento.....	25
2.8.3. Cromatografia em camada delgada.....	27
2.8.4. Cromatografia em papel.....	27
2.8.5. Biotestes.....	28
2.8.5.1. Alongamento do hipocótilo de alface..	28
2.8.5.2. Aumento de área de cotilédones de rabanete.....	29
2.8.5.3. Germinação de sementes de alface.....	30
2.8.5.4. Revelação para compostos fenólicos...	31
2.8.5.5. Detecção de citocininas.....	31
2.9. Análise de reguladores de crescimento por HPLC.....	32
2.9.1. Separação dos hormônios padrão por HPLC.....	32
2.9.2. Extração, purificação e dosagem das amostras..	33
2.10. Análise de reguladores de crescimento por imunoensaio.....	36

2.10.1. Ensaio imunoenzimático.....	36
2.10.2. Tampões.....	38
2.10.3. Curva padrão e cálculo dos resultados.....	38
2.11. Delineamento estatístico.....	39
3. Resultados.....	41
3.1. Ensaio preliminares.....	41
3.1.1. <i>Solidago x luteus</i>	41
3.1.2. <i>Solidago chilensis</i> Meyu.....	45
3.1.3. <i>Aster ericoides</i> cv. Montecasino.....	49
3.2. Efeito das condições fotoperiódicas e da temperatura sobre a indução e o desenvolvimento floral em <i>S. x luteus</i>	54
3.2.1. Efeito do fotoperíodo de 8h sobre o desenvolvimento floral.....	54
3.2.2. Efeito de diferentes fotoperíodos em interação com a temperatura sobre a indução floral.....	57
3.2.3. Efeito do fotoperíodo e do tratamento de vernalização sobre a indução floral.....	66
3.2.4. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento floral.....	68
3.3. Efeito de aplicações de giberelinas e citocininas sobre o desenvolvimento floral.....	72
3.4. Efeito de aplicações da fração ácida de folhas de plantas em DL sobre o desenvolvimento floral.....	82
3.5. Análise de substâncias endógenas em folhas e botões florais de plantas em diferentes fotoperíodos e estádios de desenvolvimento.....	85
3.5.1. Substâncias promotoras e inibidoras detectadas na fração ácida.....	85
3.5.1.1. Análise de AIA e ABA por HPLC.....	95
3.5.1.2. Análise de ABA por imunensaio.....	99
3.5.2. Atividade citocinínica.....	102
3.5.2.1. Análise de citocininas por HPLC.....	108
3.5.2.2. Análise de citocininas por imunensaio.....	112
4. Discussão.....	116
5. Literatura Citada.....	145

Abreviaturas

6-BA	6-Benzilaminopurina
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol-3-acético
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BSA	Albumina de Soro Bovino
DHZ	Diidrozeatina
GA₃	Ácido giberélico
IgG	Imunoglobulina G
iP	Isopentenil adenina
iPA	Isopentenil adenosina
KI	Cinetina
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PVP	Polivinilpirrolidona
Z	<i>trans</i> -Zeatina
ZR	<i>trans</i> -Zeatina ribosídeo
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RIA	Radio Imuno Ensaio
DC	Dias Curtos
DL	Dias Longos
LC	Luz Contínua
NI	Noite Interrompida
PDC	Planta de Dias Curtos
PDL	Plantas de Dias Longos

RESUMO

O efeito do fotoperíodo sobre o desenvolvimento vegetativo e a indução floral em *Aster ericoides* cv. Montecasino, *Solidago chilensis* M. e *Solidago x luteus* foi estudado em experimentos preliminares. Verificou-se que, de forma geral, os DL (20h) promoveram a indução floral e o aumento no número de ramificações laterais e de folhas, ao passo que, sob DC (8h), as plantas de *S. chilensis* permaneceram em roseta, as de *S. x luteus* tiveram indução e antese floral, enquanto que em *A. ericoides* havia plantas em roseta e plantas induzidas. Em experimento sazonal com *S. x luteus* em diferentes fotoperíodos observou-se interação fotoperíodo-temperatura, pois, em fotoperíodos curtos (8h a 14h) e em NI prevaleceu o efeito da temperatura, permanecendo as plantas em roseta em "temperaturas baixas" (outono-inverno) e havendo indução floral em "temperaturas altas" (verão-outono), porém, com altura de caule inferior a 0,45m; ao passo que, em fotoperíodos longos (16h, 18h, 20h e LC), prevaleceu o efeito de indução floral do fotoperíodo, havendo alongamento caulinar próximo a 0,90m mesmo em "temperaturas baixas". O tratamento de vernalização das estacas manteve as plantas em roseta em DC e retardou a indução floral nas plantas sob DL. Quando há "bolting" no verão-outono, nas plantas mantidas em fotoperíodos de 8h e NI, há um acúmulo de massa seca na raiz, semelhante ao da parte aérea. Em fotoperíodos, onde foi observada uma menor intensidade da resposta indutiva de floração (8h, 10h, 12h, 14h e NI) e "temperatura baixa", ocorreu direcionamento preferencial de assimilados para a raiz. Nas melhores condições indutoras de floração (16h, 18h e 20h), que independem da temperatura, verificou-se direcionamento de fotoassimilados para a parte aérea. Como a indução floral ocorreu sob todos os fotoperíodos estudados, verificando-se diferenças quantitativas entre os diferentes fotoperíodos, o híbrido em estudo ficou caracterizado

como uma PDL quantitativa, com fotoperíodo mais favorável para indução floral em torno de 16h; contudo, a antese floral foi antecipada em fotoperíodos curtos (8h, 10h e 12h), refletindo também uma resposta quantitativa no desenvolvimento floral. Não foi detectada atividade giberelínica em nenhum dos tratamentos estudados. Foi constatada maior concentração de AIA em folhas e botões florais de plantas em DL em comparação aos DC, o que poderia estar relacionado à maior velocidade de antese floral em plantas sob DC. As maiores concentrações de ABA, em relação ao início dos tratamentos fotoperiódicos ocorreram em folhas e botões florais de plantas em DC; assim, no balanço AIA:ABA, estes estariam em concentrações opostas, principalmente no botão floral em DC, onde se observou a maior quantidade de ABA e a ausência de AIA. A atividade citocinínica, detectada nos extratos provenientes de folhas de plantas sob DC e de botões florais de plantas no início dos tratamentos, sob DL e DC, associado ao fato de o tratamento com KI, em botões florais de plantas em DL, ter acelerado a antese floral, foram as evidências de que citocininas endógenas estariam envolvidas no processo; porém, entre as quatro citocininas dosadas (Z, ZR, iP e iPA), somente o iP e iPA foram detectados. Uma diminuição significativa de iP em folhas de plantas sob DC pode estar sendo estimulada por uma taxa de transporte mais ativa na forma de iPA para o botão floral, o que, por sua vez, estimularia a maior velocidade de antese floral observada sob DC.

SUMMARY

The effect of photoperiod on vegetative development and floral induction in *Aster ericoides* cv. Montecasino, *Solidago chilensis* M. and *Solidago* x *luteus* was studied in the preliminary experiments. Floral induction was generally promoted, and the number of lateral branches and leaves increased under long days (20h). The *S. chilensis* plants remained rosettes, while in *S. x luteus* floral induction occurred under short days (8h). However, *A. ericoides* showed both responses, rosettes and floral induction. In seasonal experiments with different lengths of photoperiods the habit of *S. x luteus* changed as a result of interaction photoperiod-temperature. In plants under short photoperiods (8h to 14h) and night break the temperature effect prevailed: the plants remained rosettes in the autumn-winter period, and the bolting was promoted by the summer-autumn temperatures with stem elongation not superior to 0.45m. In the longer photoperiods (16h, 18h, 20h and continuous light) the photoperiodic effect prevailed, promoting floral induction with stem elongation near to 0.90m even in the autumn-winter temperatures. The vernalization of cuttings kept the plants as rosettes under 8h, and delayed the floral induction in plants under 18h. In plants in which bolting was promoted in summer-autumn temperatures, under photoperiods of 8h and night break, root and shoot partitioning of dry matter occurred. Autumn-winter season and photoperiods with less intensive induction response (8h, 10h, 12h, 14h and night break) resulted in accumulation of dry matter in the roots, while in both seasons, autumn-winter and summer-autumn, shoot diversion of assimilates was found under longer photoperiods (16h, 18h and 20h). As floral induction occurred under all photoperiods, but with a more rapid and intense response being recorded under photoperiods next to 16h, this hybrid was characterized as a quantitative long-day plant, although the rate of flower bud development to anthesis was more rapid in the shorter photoperiods (8h, 10h, 12h). In any

treatment, the activity of gibberellin-like substances was not detected. In long-day (18h) plants, it was observed a higher concentration of AIA in leaves and floral buds than in short-day (8h) plants, suggesting that it may be related to a more rapid anthesis in plants kept in short days. In extracts from leaves and flower buds in short-day plants the higher levels of ABA were found in relation to the beginning of the photoperiodic treatments. Therefore, it seems to exist an indirect relation between the levels of AIA and ABA mainly in the flower buds under 8h, in which the higher amount of ABA is coincident to disappearance of AIA. Substances with cytokinin activity were detected in leaves of plants kept in short days, and in flower buds of plants at the beginning of the photoperiodic treatments, and plants kept in long days and in short days, along with the fact that the kinetin treatment accelerated the development of anthesis of flower buds of plants under long days, point to a possible role of the endogenous cytokinins in the process. The levels of zeatin-type (Z, ZR) and isopentenyladenosine-type (iP, iPA) cytokinins were examined but only iP and iPA were detected. The decrease in the iP content of plants kept in short days could be the consequence of a more active transport rate of iPA, speeding up the flower bud anthesis in the plants under short days.

1. INTRODUÇÃO

A tribo *Astereae* é formada por 135 gêneros com aproximadamente 2500 espécies, sendo o seu principal centro de distribuição nas Américas e na África do Sul. *Aster* L. é considerado um gênero cosmopolita, ao qual pertencem aproximadamente 250 espécies, consideradas ervas e arbustos anuais ou perenes e distribuídas principalmente no hemisfério norte, presumivelmente seu centro de origem. O gênero *Solidago* L. é originário da América do Norte. A este gênero são atribuídas cerca de 1000 espécies, entre arbustos e ervas perenes. Algumas espécies também ocorrem na Eurásia e na América do Sul (GRAU, 1977).

Solidago x luteus (M. L. Greene) Brouillet & Semple (= *x Solidaster hybridus*, *x S. luteus*) é um híbrido interespecífico entre *Solidago ptarmicoides* (= *Aster ptarmicoides*) e *Solidago canadensis* (BROUILLET & SEMPLE, 1981), que desenvolve o caule a partir de uma planta em forma de roseta. O caule é único e ereto, terminando em botão floral. No terço superior, originam-se numerosas ramificações com formação de inflorescências nos respectivos ápices. Os capítulos florais de aproximadamente 5mm de comprimento e 10mm de diâmetro apresentam coloração amarelo-limão. As folhas são ásperas, lanceoladas e apresentam bordo serrilhado no ápice. É uma planta perene explorada principalmente para flor de corte (GELEIN, 1990; GONZALES BENAVENTE-GARCIA, 1992).

Para GONZALES BENAVENTE-GARCIA (1992) *S. x luteus*, resultado da hibridação entre *Solidago* sp. e *Aster ptarmicoides*, junta as características das espécies envolvidas no híbrido, como a forma e a cor amarela das inflorescências e a extrema sensibilidade à luz. Podendo desenvolver 4 a 5 caules a partir de uma planta em forma de roseta, segundo o vigor e as condições de plantio, embora, no primeiro ciclo após o plantio, somente se desenvolva um caule floral. De forma geral, a planta adulta pode atingir 1m de altura no estágio de colheita.

Conforme WERNER *et al.* (1980) ao gênero *Solidago* atribuem-se propriedades medicinais, daí o seu nome, o qual provém do latim *Solidus* e *ago* - "para tudo". Além de servir como importante fonte de néctar para abelhas, cultivares de várias espécies de *Solidago*, incluindo *S. canadensis*, são cultivados em grande escala, na Europa Ocidental, com propósitos ornamentais.

Considerando que todos os indivíduos de uma espécie precisam sincronizar o florescimento para garantir o cruzamento e que devem completar sua reprodução sexual sob condições externas favoráveis, a maioria das plantas usa os sinais ambientais para regular sua transição para o florescimento. Os fatores potenciais para controlar esta transição são as variáveis ambientais que mostram mudanças sazonais regulares. Os fatores mais importantes são o fotoperíodo, a temperatura e a disponibilidade de água. As denominadas "plantas autônomas", que não requerem um fotoperíodo determinado ou uma temperatura específica para o florescimento, são normalmente sensíveis à

irradiância. Os fatores ambientais são percebidos pelas diferentes partes da planta. O fotoperíodo e a irradiância são percebidos principalmente pelas folhas maduras das plantas intactas. A temperatura é percebida pela planta inteira, embora a temperatura baixa (vernalização) seja percebida principalmente pelo ápice vegetativo. A disponibilidade de água é percebida pelo sistema radicular. Há uma forte interação entre os diferentes fatores, sendo que cada fator pode modificar o valor limite para a ação efetiva dos outros fatores (BERNIER *et al.*, 1993).

Para designar a resposta das plantas ao comprimento do dia GARNER & ALLARD (1923) sugeriram o termo "fotoperiodismo", classificando as espécies por eles estudadas em PDL e PDC, onde o florescimento é causado pela ação de DL ou DC, respectivamente.

Definem-se como PDL aquelas que somente florescem ou florescem mais rapidamente ou com maior intensidade quando recebem luz por certo número de horas maior do que um determinado período (fotoperíodo crítico) em cada ciclo de 24h. Em plantas de resposta fotoperiódica quantitativa um determinado comprimento de dia promove, mas não é essencial para o florescimento (VINCE-PRUE, 1975; METZGER, 1987; THOMAS, 1993). Na resposta quantitativa o florescimento é retardado mas não é inibido em fotoperíodos de menor intensidade que os da resposta indutiva (ROBERTS & SUMMERFIELD, 1987).

Independente da classe fotoperiódica a que pertencem para a indução floral, plantas cultivadas em DL geralmente são mais

altas, de entrenós mais longos, folhas maiores, às vezes com formato diferente daquelas cultivadas sob DC (VINCE-PRUE, 1975).

De acordo com VINCE-PRUE (1975) os eventos bioquímicos da iniciação floral podem ser divididos em aqueles que ocorrem nas folhas e levam à produção do estímulo (ou inibidor) floral e os que ocorrem na chegada do estímulo floral ao ápice. O termo indução fotoperiódica, seria usado para o processo que ocorre na folha e evocação, para os eventos que ocorrem no ápice, no período entre a chegada do estímulo floral e o aparecimento do primeiro sinal morfológico que caracteriza o florescimento.

Para KINET & SACHS (1984) o termo florescimento é usado intercambiavelmente com iniciação floral, portanto, os estádios de desenvolvimento pós-iniciação até antese são freqüentemente negligenciados porque são vistos como uma consequência inevitável da iniciação, contudo, o desenvolvimento floral consiste de numerosos passos seqüenciais, cada um com requerimentos específicos afetados diferentemente pelas condições ambientais e químicas. A luz desempenha um papel central na iniciação e desenvolvimento floral. O fotoperíodo e a irradiância afetam o desenvolvimento das estruturas reprodutivas, independentes ou combinadamente, desde que contribuem para o total da radiação fotossinteticamente ativa.

O papel do fotoperíodo no controle do desenvolvimento floral foi reconhecido nos primeiros trabalhos de GARNER & ALLARD (1920, 1923) que verificaram que a iniciação floral ocorria após um número mínimo de ciclos indutivos em soja, fumo e em

Callistephus, mas, quando as plantas foram colocadas sob condições não indutivas, os botões florais abortaram prematuramente.

O fotoperíodo afeta, além da taxa de desenvolvimento e aborto das estruturas reprodutivas, vários processos morfogénéticos. É potente fator determinante da expressão sexual e fertilidade em várias espécies monóicas, dióicas e hermafroditas; controla em algumas plantas a produção de flores cleistógamas e casmógamas e afeta o começo da dormência de gemas florais em várias espécies lenhosas (KINET & SACHS, 1984).

Ainda não há um esquema unificado para o modo de ação do estímulo floral. Sua presença no ápice leva a um aumento global na síntese de ácidos nucléicos e proteína, com maior incremento em certas zonas quiescentes. Pode atuar na transcrição, ativando um *locus* de um gene específico nas células alvo. Mudanças citoplasmáticas estariam na seqüência, levando à ativação de outros genes. Uma vez alcançado um determinado estágio de desenvolvimento no ápice, a formação floral é desencadeada e as mudanças subseqüentes no meristema são inevitáveis; contudo, a reversão de um ápice diferenciado a crescimento vegetativo é possível sob certas condições. Assim, a transição para a organização reprodutiva do meristema, não constitui uma mudança irreversível (VINCE-PRUE, 1975).

Os eventos que ocorrem no ápice após a chegada do estímulo floral não estão restritos às plantas sensíveis ao fotoperíodo. A presença do estímulo floral no ápice resulta em mudanças

morfológicas associadas com a iniciação e subsequente desenvolvimento do primórdio floral: o ápice é reorganizado e produz os órgãos florais, os quais surgem de diferentes sítios no domo apical. Os tecidos alvo do estímulo floral que iniciam a morfogênese em dicotiledôneas e em algumas monocotiledôneas incluem as zonas central e periférica do meristema apical; em gramíneas, as áreas alvo primárias estão em sítios de gemas axilares do primórdio foliar. Assim, a concepção da floração é um processo de diferenciação que envolve a distribuição de sítios de atividade no ápice (VINCE-PRUE, 1975).

Conforme KINET *et al.* (1985) uma das dificuldades na determinação da exigência fotoperiódica para o desenvolvimento floral é que um fotoperíodo apropriado não é usualmente necessário durante todo o processo. Em muitas espécies o fotoperíodo influencia o desenvolvimento somente durante uma determinada época, apenas para o complemento de algum estágio crítico. Dependendo da espécie ou do cultivar, pode existir a resposta fotoperiódica qualitativa ou quantitativa. Em espécies fotoperiódicas quantitativas, a abertura floral é retardada em fotoperíodos desfavoráveis. Assim, a taxa de desenvolvimento floral, medida pelo tempo desde a iniciação até a antese, é uma resposta quantitativa, já a ocorrência ou ausência de flores atingindo antese é uma resposta qualitativa.

Em um número limitado de espécies a iniciação floral e seu posterior desenvolvimento têm mostrado exigências fotoperiódicas opostos. Em *Delphinium ajacis* e *Callistephus chinensis* os DL

promovem a iniciação e os DC favorecem o desenvolvimento floral. Na gramínea perene *Bouteloua eriopoda*, a iniciação é favorecida por DC e o desenvolvimento por DL; quase todas as plantas florescem em fotoperíodo constante de 13h; sob DC ocorre a iniciação floral, mas o ápice reprodutivo degenera e em DL contínuos (maiores do que 13h) o florescimento é parcial, desuniforme e atrasado, de tal maneira que os novos ramos da maioria das plantas morrem enquanto o ápice ainda está no estágio vegetativo. Em um ecotipo de *Poa pratensis* os DC e a baixa temperatura são capazes, independentemente, de causar iniciação floral, enquanto que o desenvolvimento de flores normais requer DL e é estimulado por alta temperatura (KINET et al., 1985).

ALLARD & GARNER (1940) apud SCHWABE (1986b) relataram o comportamento fotoperiódico do florescimento em diferentes espécies de *Solidago*, classificando *S. altissima*, *S. fistulosa*, *S. graminifolia*, *S. rugosa* e *S. nemorales* como PDC; *S. juncea*, *S. sempervirens* e *S. ulmifolia* como plantas indiferentes ao fotoperíodo e *S. cutleri* e um cultivar de *S. sempervirens* como PDL. Com relação à época de antese, HURLBERT (1970) apud SCHWABE (1986b) comparou dez espécies de *Solidago* e todas apresentaram exigência de DC, diferindo no fotoperíodo crítico.

Conforme GONZALES BENAVENTE-GARCIA (1992), uma vez instalado o cultivo deve-se colocar a iluminação artificial quando as plantas estão no estágio de brotações novas; isto ocorre 2 a 3 semanas após o plantio. *Solidago* responde a DL

(±18h) com crescimento e desenvolvimento e a DC com antese após a formação de botão. Na iluminação artificial deve-se ter o cuidado de ter uma lâmpada incandescente de 100W a uma altura de 1,8m para cada 9m² de superfície de cultivo. Nestas condições, a planta pode desenvolver a fase vegetativa em 8 a 10 semanas e a reprodutiva em 4 - 5 semanas.

O fotoperíodo e os reguladores de crescimento são fatores que afetam as respostas fotomorfogênicas das plantas. Estas respostas podem ser de crescimento vegetativo, tais como o alongamento caulinar, crescimento foliar e tipo de ramificação, ou de reprodução, como a indução e o desenvolvimento floral. O alongamento caulinar em PDL em forma de roseta parece depender parcialmente de um incremento na biossíntese de giberelinas e parcialmente de um aumento na sensibilidade a giberelinas em fotoperíodos longos (VINCE-PRUE, 1975). Entre os reguladores de crescimento, as giberelinas e as citocininas podem estar envolvidas no desenvolvimento floral. Embora as aplicações de substâncias reguladoras de crescimento afetem o desenvolvimento floral como um todo, algumas respostas específicas podem ser enfatizadas. De forma geral, a aplicação de giberelinas e citocininas teriam efeito acelerando o desenvolvimento do botão floral até a antese e/ou na quebra de dormência do botão floral e/ou no aumento do tamanho final da flor ou inflorescência. As citocininas têm sido apontadas como fatores responsáveis por

aumento da força do dreno por fotoassimilados para o botão floral (KINET et al., 1985).

Nos processos de morfogênese procura-se encontrar os fatores que governam a formação dos órgãos, seu crescimento e desenvolvimento. A teoria de uma substância formadora de órgãos foi definitivamente abolida quando SKOOG & MILLER (1957), em experimentos com calos e tecidos de caule de tabaco, em cultura *in vitro*, demonstraram interações quantitativas entre fatores de crescimento, AIA e KI, estabelecendo um mecanismo comum de regulação dos tipos de crescimento por eles investigados, desde o alongamento celular até a formação do órgão.

Baseando-se no efeito antagônico citocininas-ABA em vários fenômenos morfogênicos, principalmente no controle da germinação de sementes e na quebra da dominância apical, KHAN (1975) estabeleceu um modelo de ação que atribui funções aos hormônios. Neste modelo, um determinado hormônio teria um papel primário para a germinação ou o crescimento, enquanto que as demais classes hormonais teriam papéis secundários, essencialmente preventivos e permissivos. Assim, os hormônios atuariam seletivamente no controle do processo em questão.

CHAIŁAKHYAN (1985) mantém a hipótese de que a regulação hormonal do florescimento é baseada no conceito do florigeno, como um sistema complementar constituído de dois grupos de hormônios: as giberelinas influenciando a formação de caules florais e as antesinas influenciando a formação das flores; no entanto, se desconhece a natureza química e estrutural das

antesinas. A teoria mais recente e mais aceita para o controle da transição floral é a do controle multifatorial proposta por BERNIER et al. (1993), onde várias substâncias químicas, assimilados e fitormônios conhecidos participam da indução floral. No modelo fisiológico proposto pelos autores com a PDL *Sinapis alba*, os compostos envolvidos são carboidratos, citocininas, auxinas, poliaminas e Ca^{++} . Evidentemente, estes sinais podem não estar envolvidos em outras espécies, por exemplo, em *Lolium temulentum*, uma PDL, o acúmulo de sacarose parece não fazer parte do sistema de sinalização floral, enquanto que algumas giberelinas estão entre os sinais promotores produzidos e exportados pelas folhas induzidas. No modelo genético *Arabidopsis*, também PDL, a mobilização de amido e conseqüentemente a disponibilidade de sacarose parece essencial, mas a sacarose não estaria atuando isoladamente. Uma ou mais giberelinas estariam incluídas entre os sinais primários responsáveis pela transição. Outros fatores, como ABA, poderiam também estar envolvidos.

Da mesma forma que a planta usa os sinais ambientais e as substâncias químicas para a indução floral, também mantém um complexo sistema para garantir o desenvolvimento da estrutura floral até antese e subseqüente formação de frutos e sementes.

O conteúdo de auxina aumenta durante o crescimento ativo das estruturas reprodutivas, provavelmente como resultado da síntese nos órgãos sexuais, especialmente no ovário. As anteras seriam a principal fonte de auxina nos primeiros estádios do

desenvolvimento do botão floral e o ovário produziria mais auxina nos estádios tardios (LANG, 1961 *apud* KINET *et al.*, 1985). A taxa máxima de crescimento do caule floral em *Papaver* está associada com o alto nível de auxina (KATUNSKIJ, 1936 *apud* KINET *et al.*, 1985). A produção de auxina em *Fritillaria meleagris* aumenta antes da antese, diminuindo em seguida e aumentando novamente no vingamento do fruto (KALDEWEY, 1957 *apud* KINET *et al.*, 1985).

ZIESLIN & HALEVY (1976) observaram que, em rosas "Baccara", no estágio de botão floral pequeno, a atividade citocinínica total era maior em extratos de folha de ramos florais do que em extratos dos ramos não florais. Em roseira e em tomateiro, o desenvolvimento normal da flor está associado com níveis altos de citocininas. Em tomate "King Plus", o aborto das inflorescências está relacionado a uma deficiência severa de citocininas (LEONARD & KINET, 1982). Em *Phaseolus* P47, a concentração de citocininas é maior sob condições de DC, que estimulam o desenvolvimento do botão floral até a antese, do que em DL, que causam abscisão do botão floral (BENTLEY *et al.*, 1975). Os DC que promovem o desenvolvimento das inflorescências em *Bouganvillea* "San Diego Red", causam uma diminuição no nível de citocininas na planta inteira. Este decréscimo é menos pronunciado nos ápices, estabelecendo-se uma relação crescente da atividade citocinínica ápices-folhas, o que aumentaria a força do dreno dos ápices (VAN STADEN & DIMALLA, 1980). Caules florais destacados de *Yucca* que foram

supridos com iP radioativo o convertem em nucleotídeos de iP e Z e as partes florais hidrolizam [¹⁴C]-Z a ZR, indicando que as citocininas são metabolizadas nas partes reprodutivas (VONK, 1978).

O ABA tem sido detectado em botões florais de algumas plantas. Em *Vicia* está localizado principalmente no gineceu, com níveis altos na antese (DATHE & SEMBDNER, 1980). As concentrações de ABA também aumentam em botões florais de café poucos dias antes da antese (BROWNING, 1973 *apud* KINET *et al.*, 1985). Os níveis de ABA são maiores nas folhas e botões de *Phaseolus* P47 cultivados sob DL (favorecem aborto floral), do que sob DC, que promovem o desenvolvimento floral. As maiores concentrações de ABA livre e ABA conjugado estão nos botões abortados (BENTLEY *et al.*, 1975). Em rosas, o nível do inibidor é maior nas folhas dos ramos não florais do que nos ramos florais, particularmente após a iniciação dos órgãos florais (ZIESLIN & HALEVY, 1976).

O termo auxina é igualmente usado para descrever tanto as substâncias naturais como as sintéticas que estimulam o alongamento em coleóptiles e, em caules jovens, a formação de raízes laterais, além do desenvolvimento de frutos, estando envolvidas também em outros processos fisiológicos como os tropismos, a dormência em gemas laterais e a abscisão foliar. Embora existam outras auxinas de ocorrência natural em plantas superiores, o AIA é a mais importante (DAVIES, 1987).

As citocininas que foram primeiramente reconhecidas pela sua habilidade em induzir divisão celular em tecidos de plantas em cultura asséptica, são agora conhecidas por evocar uma diversidade de respostas em plantas. A visão geral de que as citocininas são produzidas na raiz e transportadas via xilema para a parte aérea, aonde participam do controle do desenvolvimento e da senescência, é amplamente aceita. Os ribosídeos são importantes formas de transporte de citocininas no xilema e as bases livres, as formas ativas *per se* (LETHAM & PALNI, 1983).

Em contraste com as auxinas e as citocininas que atuam principalmente como promotores do crescimento, o ABA é um dos hormônios mais comuns que atuam como inibidores do crescimento e de processos metabólicos. A forma *cis* (+) ABA que ocorre naturalmente em plantas é sintetizada em quase todas as células que contêm plastídios, sendo transportado via xilema e floema. Além de mediar o crescimento, a inibição e a dormência, o ABA regula o balanço de água em plantas sob estresse pelo fechamento estomático e pela manutenção da absorção de água pelas raízes (TAIZ & ZEIGER 1991).

As aplicações de hormônios em órgãos de plantas intactas podem indicar a possibilidade de um ou mais hormônios estarem envolvidos no processo em estudo; contudo, conforme KHAN (1975), a interpretação desses resultados estaria sujeita a considerar se as substâncias aplicadas atingiriam os mesmos centros metabólicos das substâncias endógenas. Os hormônios *in*

situ, podendo estar compartimentalizados, não teriam acesso aos sítios ativos tão rapidamente quanto os hormônios aplicados; há incerteza de quanto do hormônio aplicado atinge os centros ativos e se sua ação seria mais ou menos rápida em relação aos hormônios endógenos. As interpretações das respostas fisiológicas também devem considerar que as mudanças na quantidade de um hormônio, ou de uma classe hormonal, não é a indicação do seu potencial em afetar o crescimento ou do seu papel fisiológico, o que estaria mais relacionado com a atividade e a idade do órgão. Em muitos processos não somente a relação entre hormônios muda constantemente durante o crescimento e desenvolvimento, mas a mudança também ocorre em relação à forma ativa (livre) e inativa (ligada) do mesmo hormônio.

Também é preciso considerar que não há uma relação obrigatória entre o efeito de uma substância aplicada e seus níveis endógenos, assim como pode não existir uma correlação entre os níveis endógenos de uma substância e o fenômeno de desenvolvimento estudado. A análise de reguladores de crescimento requer processos de extração que destroem a compartimentalização *in vivo*, podendo afetar as estimativas da fração biologicamente ativa. Além do que, a sensibilidade do tecido ao regulador de crescimento pode ser uma variável fisiologicamente mais significativa do que a concentração do hormônio (KINET *et al.*, 1985).

Considerando as limitações das aplicações de hormônios em órgãos de plantas intactas, as limitações nos processos de extração e as inerentes aos ensaios biológicos e às análises quantitativas, deve-se procurar estudar o balanço hormonal ao invés de analisar a concentração de um único hormônio, pois nos permite uma melhor compreensão do processo em estudo.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer preliminarmente algumas características vegetativas e reprodutivas de *Solidago x luteus*, *S. chilensis* Meyu e *Aster ericoides* cv. Montecasino sob condições fotoperiódicas de DL (20h) e de DC (8h), com a finalidade de selecionar o material de melhor desempenho quanto à floração. Uma vez selecionado o híbrido *S. x luteus*, realizaram-se estudos subseqüentes de comportamento fotoperiódico da indução e do desenvolvimento floral, assim como, do envolvimento de substâncias reguladoras de crescimento no desenvolvimento do botão floral até a antese nas plantas mantidas em fotoperíodos de DL e de DC.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material botânico

Foram utilizadas plantas de *Aster ericoides* cv. Montecasino, *Solidago x luteus* e *Solidago chilenses* Meyu, registradas no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, SP, (UEC) como V. J. Flórez-Roncancio números 27018, 26173 e 27019, respectivamente.

Para os experimentos com fotoperíodo, foram utilizadas plantas obtidas de estacas com raiz fornecidas pela empresa Klass Schoenmaker & Filhos (Holambra, SP). Nos experimentos subseqüentes, as plantas foram obtidas por estacas basais, enraizadas sem adição de hormônio, em vermiculita, na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas.

A planta desenvolve inflorescências em forma de capítulos que serão, ao longo deste trabalho, denominadas de flores.

2.2. Método geral de crescimento de plantas

2.2.1. Experimentos preliminares

As plantas das três espécies, provenientes de estacas com raiz, cresceram em vasos com capacidade de 1L, contendo uma mistura de partes iguais de solo, areia e composto orgânico, em casa de vegetação. As plantas foram mantidas em fotoperíodos de

DC (8h) e de DL (20h) até as transferências programadas nos diferentes experimentos entre DL e DC ou vice-versa. Foram utilizadas 8 estacas por tratamento.

2.2.2. Experimentos com *S. x luteus*

As plantas, provenientes de estacas com raiz, cresceram em vasos com capacidade de 2L, contendo uma mistura de partes iguais de solo, areia e composto orgânico, em casa de vegetação. As plantas foram adubadas quinzenalmente com Solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1938) e mantidas sob o fotoperíodo de 18h até o estágio de formação de botão floral (botões florais com $1,5 \pm 0,12$ mm de diâmetro e $736 \pm 159,5$ botões florais/g), quando foram iniciados os diferentes experimentos. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento.

No experimento de fotoperíodo para indução floral no período de outono-inverno, as plantas cresceram em vasos com capacidade de 1L, contendo terra de mata. Foram aplicadas adubações líquidas, segundo a formulação NPK 10-10-10 (1g.L^{-1}), aos 63, 77 e 94 dias após o plantio.

Nos experimentos subseqüentes, as variações quanto ao fotoperíodo de DL (18h ou 20h) e ao número de plantas por tratamento serão citadas no texto.

2.3. Condições fotoperiódicas

Os ensaios foram desenvolvidos em casa de vegetação nas condições fotoperiódicas de DC e DL. DC de 8h foram obtidos cobrindo-se com uma cortina de tecido preto as bancadas onde foram colocados os vasos; as condições de DL (18h e 20h) foram obtidas completando-se o fotoperíodo natural com iluminação artificial fornecida por lâmpadas incandescentes ($53\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$).

Os experimentos de indução floral no período de outono-inverno e o de desenvolvimento da flor foram efetuados em casa de vegetação anexa às câmaras fotoperiódicas controladas por temporizadores que permitem a obtenção concomitante de diferentes fotoperíodos, no Instituto de Botânica de São Paulo. Todas as plantas, independentemente do fotoperíodo, receberam 8h diárias de luz natural em casa de vegetação, e extensão do fotoperíodo em câmaras individuais por meio de uma lâmpada fluorescente "luz do dia" de 40W ($1,6\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), e uma lâmpada incandescente de 100W ($1,6\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), fornecendo uma densidade de fluxo de ftons de $3,5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.4. Medidas de crescimento

O comprimento de caule foi medido com o auxílio de régua da base até a região apical do caule. Foram contados o número de folhas do caule, o número de brotações basais (brotações vegetativas na base da planta), o número de ramificações laterais (ramificações vegetativas e florais do caule) e o de ramificações

florais (ramificações florais do caule); também foram contados o número de plantas induzidas (plantas com alongamento caulinar), o número de plantas com botão floral e o de plantas em antese, em relação ao número total de plantas, para o cálculo das respectivas porcentagens. Foi considerada em antese a planta que possuía pelo menos uma flor completamente aberta, conforme explicado adiante.

A altura de planta observada foi medida com o auxílio de régua da base até o ponto mais alto da planta, quando as folhas do caule foram esticadas.

A área foliar da 35ª folha a contar do ápice do caule para a base foi medida com o auxílio de medidor portátil de área foliar LI-3000 A (LI-COR).

Para a determinação da massa seca, a parte aérea e o sistema radicular foram secos em estufa com ventilação a 80°C, durante 48h, quando se obteve massa constante.

O número de flores em antese total foi contado considerando as que apresentavam as flores liguladas mais externas do capítulo floral, formando ângulo de aproximadamente 90° com o respectivo pedúnculo. A cada contagem as flores foram removidas da planta com o auxílio de tesoura.

2.5. Experimentos com fotoperíodo

2.5.1. Ensaio preliminares

As observações nas plantas de *S. x luteus* sob DL foram feitas até 120 dias após o plantio, em *S. chilensis*, até 151

dias e em *A. ericoides*, até 182 dias. Metade das plantas do ensaio com *A. ericoides* foi transferida para DC, 77 dias após o plantio e metade das plantas dos ensaios com *S. chilensis* e *S. x luteus* foram transferidas para 8h, 87 dias após o plantio. Nesta condição (8h), as plantas de *A. ericoides* e *S. chilensis* foram observadas até 111 dias e as de *S. x luteus* até 120 dias. As plantas de *A. ericoides*, que permaneceram sob 20h, também foram transferidas para fotoperíodos de 8h 145 dias após o plantio e observadas até 182 dias.

As observações nas plantas de *S. x luteus* sob DC foram feitas até 120 dias após o plantio; nas plantas de *S. chilensis* até 151 dias e nas de *A. ericoides* até 182 dias. Metade das plantas de cada um dos ensaios com *A. ericoides* e com *S. chilensis* foi transferida para o fotoperíodo de 20h, 77 e 79 dias após o plantio, respectivamente. As plantas de *S. x luteus* não foram transferidas para o fotoperíodo de 20h, pois todas elas floresceram sob 8h. As plantas de *S. chilensis* e *A. ericoides*, transferidas para o fotoperíodo de 20h, foram observadas até 151 e 225 dias após o plantio, respectivamente. Todas as plantas transferidas foram escolhidas por sorteio.

2.5.2. Experimento com diferentes fotoperíodos e antese floral

Um lote de 50 plantas de *S. x luteus* foi mantido durante 41 dias sob o fotoperíodo de 20h; a seguir, o lote de plantas foi subdividido por sorteio em cinco grupos iguais: o primeiro

grupo de plantas foi mantido sob o fotoperíodo de 20h, o segundo, o terceiro e o quarto grupo de plantas, foram mantidos 5, 10 e 15 dias sob 8h, respectivamente, sendo em seguida transferidos para 20h. O quinto grupo de plantas foi mantido até o fim do experimento sob 8h.

Nos experimentos de desenvolvimento floral até antese, as plantas foram mantidas sob 18h até o estágio de formação de botão floral, quando foram transferidas para os diferentes tratamentos fotoperiódicos. Foram testados os fotoperíodos de 8h, 10h, 12h, 14h, 16h e 20h.

2.5.3. Experimento sazonal da indução floral em diferentes fotoperíodos

As observações realizadas de março a agosto foram consideradas como ensaio de outono-inverno (um período do ano quando predominam os dias com baixas temperaturas) e as de janeiro a junho, consideradas como ensaio de verão-outono (período do ano cujos dias, via de regra, são mais quentes do que os do outro período). Foram utilizadas 10 estacas por tratamento no ensaio de outono-inverno e 15 estacas por tratamento no ensaio de verão-outono.

Foram testados fotoperíodos abrangendo uma faixa de 8h a 20h, em intervalos de 2h, além de LC e NI (8h de luz com interrupção de 1h no meio da noite longa) durante o período de outono-inverno; 8h, 20h e NI no verão-outono.

2.5.4. Experimento com temperaturas de vernalização e fotoperíodos de DL e DC

Um lote de 20 estacas com raiz foi submetido a temperaturas de vernalização durante 30 dias e um segundo lote, também de 20 estacas, foi enraizado simultaneamente ao período de vernalização do primeiro lote de estacas.

A temperatura média mínima diária foi $1,0 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ e a temperatura média máxima diária de $3,7 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$.

Metade de ambos os lotes de estacas foi plantada sob DL (18h) e a outra metade sob DC (8h). As estacas foram enraizadas e as plantas crescidas durante o período de outono-inverno (março a agosto).

2.6. Cálculo do tempo médio de antese

A estimativa da velocidade média de antese floral foi feita pelo cálculo do tempo médio de antese floral de acordo com a expressão:

$$\bar{t} = \frac{\sum n_i t_i}{\sum n_i}$$

onde:

t_i = tempos de antese;

n_i = número de flores abertas nos intervalos equidistantes sucessivos $t_{i-1} \leftrightarrow t_i$

descrita por LABOURIAU (1983) para germinação de sementes.

2.7. Aplicação de giberelinas e citocininas

As plantas de *S. x luteus* foram mantidas sob o fotoperíodo de 20h até o estágio de formação de botão floral, quando foram divididas em dois lotes. Um deles foi transferido para o fotoperíodo de 8h e o outro mantido em 20h.

As aplicações de substâncias reguladoras de crescimento foram iniciadas no dia da transferência pelo pincelamento dos botões florais da metade das plantas mantidas em DL.

Os reguladores de crescimento foram aplicados em solução aquosa nas seguintes concentrações e freqüências de aplicação: **primeiro experimento:** GA₃ 10⁻³M a cada 5 dias; **segundo experimento:** GA₃ 10⁻³M a cada 10 dias e GA₃ 10⁻⁴M a cada 5 dias; **terceiro experimento:** GA₃ 10⁻⁴M, 6-BA 4x10⁻⁴M e GA₃ 10⁻⁴M mais 6-BA 4x10⁻⁴M, a cada 7 dias; **quarto experimento:** GA₃ 10⁻⁴M, KI 4x10⁻⁴M e GA₃ 10⁻⁴M mais KI 4x10⁻⁴M, a cada 7 dias; **quinto experimento:** KI 4x10⁻⁴M a cada 4 e a cada 7 dias.

2.8. Análise de substâncias reguladoras de crescimento

2.8.1. Caracterização das amostras

O número de dias transcorridos entre o estágio de botão floral no início dos tratamentos e as amostragens de folhas e botões florais sob DL e DC foi de 15 ± 2,3 dias.

As amostras de folhas correspondentes às ramificações florais foram colhidas do caule, no terço superior da planta e

simultaneamente com as amostras de botões florais nos estádios pré-estabelecidos.

Os estádios de desenvolvimento do botão floral de plantas foram caracterizados no início dos tratamentos (BIT), em plantas sob DL (BDL) e em plantas sob DC (BDC), como ponto de referência para a montagem dos experimentos e para a coleta de amostras (tabela 1).

O diâmetro dos botões florais foi medido com o auxílio de um paquímetro.

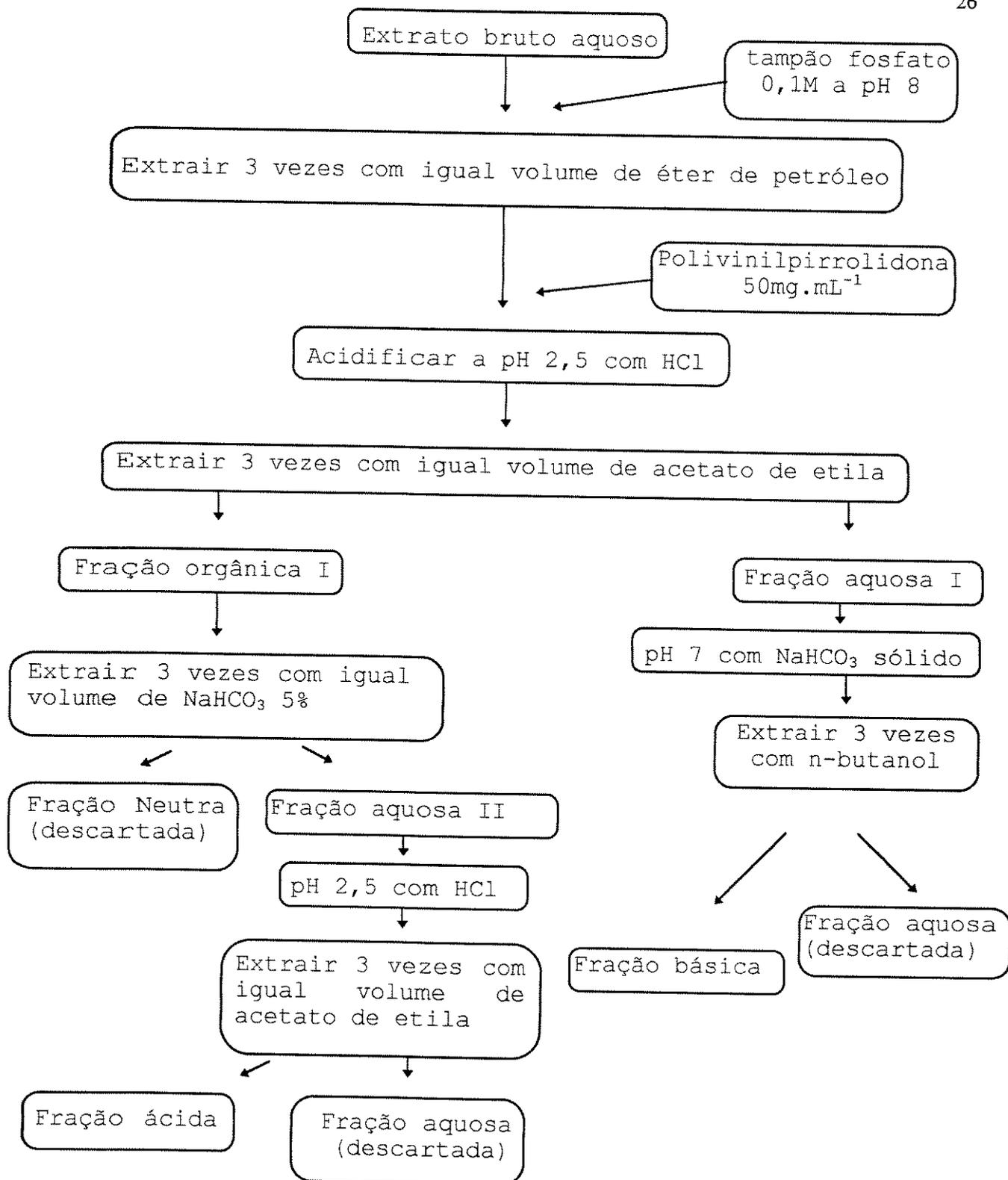
Tabela 1. Médias do diâmetro e do número de botões florais em plantas de *S. x luteus* no início dos tratamentos (BIT) e 15±2,3 dias depois, em plantas sob DL (BDL) e em plantas sob DC (BDC).

Diâmetro de botão floral (mm)			
	BIT	BDL	BDC
$\bar{x} \pm SD$	1,5 ± 0,12 ¹	2,1 ± 0,10	2,4 ± 0,17
Número de botões florais/g			
$\bar{x} \pm SD$	736,3 ± 159,5	196 ± 34,9	122 ± 16,4

1 - Valores médios seguidos de desvio padrão

2.8.2. Extração e fracionamento

Para a extração e fracionamento do extrato utilizaram-se 2g e 3g de folhas ou botões florais recém-colhidos. O material vegetal foi triturado com gral e pistilo, adicionando-se metanol 80% na proporção de 1g de tecido para 10mL de metanol 80%. Em seguida, o extrato foi homogeneizado em "polytron" e resfriado durante 24h. O extrato foi então filtrado e ao resíduo foi acrescentado um volume igual ao inicial de metanol 80%, sendo resfriado por mais 24h. Após este período, o resíduo foi novamente filtrado e este acrescentado ao filtrado anterior. Após a remoção do metanol por evaporação, em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura de 30 a 35°C, procedeu-se ao fracionamento do extrato aquoso bruto, para a obtenção das frações ácida e básica, de acordo com o esquema 1 (FELIPPE *et al.* (1985) modificado).



Esquema 1. Extração e fracionamento de substâncias reguladoras de crescimento.

2.8.3. Cromatografia em camada delgada

As frações ácida e básica obtidas pelo método descrito no esquema 1 foram cromatografadas sobre placas de vidro de 0,20 x 0,20m, com uma camada de 0,5mm de suspensão de sílica gel e água na proporção de 1:2 (g de sílica/mL de água destilada), com ativação de 30min a 105°C antes do uso. As placas cromatográficas foram desenvolvidas, num percurso de 0,15m, com isopropanol:amônia:água 10:1:1 v/v/v para a fração básica e benzeno:n-butanol:ácido acético 14:5:1 v/v/v para a fração ácida.

Os padrões de AIA e ABA foram desenvolvidos em placa de sílica gel PF₂₅₄ Merck com benzeno:n-butanol:ácido acético 14:5:1 v/v/v, sendo detectados por irradiação com lâmpada de ultravioleta e pulverização com solução de Salkowski (FeCl₃ 1,5M:H₂O:H₂SO₄; 3:100:60) e anisaldeído modificado (anisaldeído:etanol:ácido sulfúrico:ácido acético glacial; 0,5:9:0,5:0,1) seguido de aquecimento durante 5 a 10min a aproximadamente 70°C (MERCK, 1971).

2.8.4. Cromatografia em papel

A fração ácida do extrato de folhas e de botões florais de plantas mantidas sob DL também foi cromatografada em papel de cromatografia Whatman 3MM. A cromatografia em papel foi desenvolvida de forma ascendente num percurso de 0,15m em cuba de vidro, usando-se como fase móvel o sistema de solventes isopropanol:amônia:água 10:1:1 v/v/v.

2.8.5. Biotestes

Para a execução dos biotestes os cromatogramas foram divididos em faixas transversais, correspondentes a 10 faixas de Rf, entre o ponto de aplicação e a frente. Estas faixas foram divididas em quatro partes correspondentes a quatro repetições para cada faixa entre Rfs. No caso de cromatografia de camada delgada, de cada uma das repetições foi removida a sílica e colocada ao acaso em cubetas de forma de plástico para gelo ou em placas de Petri de 50mm de diâmetro. Em cada cubeta foi colocada uma folha de papel de filtro e 1,2mL de água destilada e em cada placa de Petri, uma folha de papel de filtro e 2mL de tampão fosfato 2mM a pH 5,8 a 6,0. Como controle utilizou-se a quantidade de sílica correspondente à usada nos tratamentos provenientes de placas percorridas só pelo solvente.

No caso de cromatografia em papel, cada uma das repetições foi recortada e distribuída de forma homogênea em uma placa de Petri de 50mm de diâmetro, coberta com uma folha de papel de filtro e acrescida de 2 mL de água destilada. Como controle utilizou-se o papel recortado proveniente de um cromatograma percorrido só pelo solvente.

Após 30min foi montado o bioensaio.

2.8.5.1. Alongamento do hipocótilo de alface

Este bioteste foi realizado de acordo com a descrição de FRANKLAND & WAREING (1960), para detecção de substâncias

giberelínicas. Foram utilizadas sementes de alface do cultivar "Grand Rapids", fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), postas para germinar em placas de Petri a 25°C por 24h, sob luz contínua. Após este período, foram selecionadas as plântulas pela homogeneidade do comprimento da radícula e colocadas em grupos de quatro nas cubetas para gelo, onde já estavam distribuídas cada uma das repetições de sílica correspondentes às faixas de Rf do cromatograma em estudo. Como padrão foi utilizada uma solução de GA₃ 10⁻³M.

As formas de gelo foram colocadas em bandejas com uma folha de papel de filtro umedecida e recobertas por polipropileno transparente. Este sistema foi mantido em câmaras de crescimento a 25°C e luz branca contínua (18,2 μmol.m⁻².s⁻¹) por 72h. Após este período, foram medidos os hipocótilos das plântulas e os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

2.8.5.2. Aumento de área de cotilédones de rabanete

As frações básicas foram biotestadas segundo o método de LETHAM (1971), para detecção de substâncias citocinínicas. Sementes de rabanete cv. Vermelho Redondo, fornecidas pelo IAC, foram colocadas para germinar no escuro a 25°C durante 35h. Após este período, foi retirado o cotilédone interno de cada plântula e os cotilédones mais uniformes foram transferidos para as placas de Petri de 50mm de diâmetro, com o cuidado de

colocar a face superior do cotilédone em contato com a solução, sendo quatro cotilédones por placa. As placas de Petri foram colocadas em bandejas com uma folha de papel de filtro umedecida, cobertas com polipropileno transparente e mantidas em câmaras de crescimento a 25°C e luz branca contínua ($18,2\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) durante 72h.

O aumento de área cotiledonar de rabanete foi medido com o auxílio do programa "Área II" (CALDAS *et al.*, 1992) e com o "scanner" Hewlett Packard modelo Scanjet IIP acoplado a um microcomputador compatível com o padrão IBM-PC.

Como padrão utilizou-se 6-BA ou KI $4 \times 10^{-4}\text{M}$. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

2.8.5.3. Germinação de sementes de alface

O extrato obtido para a detecção do possível inibidor foi testado pelo bioteste da inibição da germinação de sementes de alface (WEBB & WAREING, 1972).

Sementes do cultivar "Grand Rapids" foram colocadas para germinar em placas de Petri de 50mm de diâmetro, contendo o papel correspondente a uma repetição de cada faixa de Rf, uma folha de papel de filtro e acrescida de 2mL de água destilada. Foram utilizadas quatro repetições com 20 sementes por placa. As placas foram colocadas em bandejas com uma folha de papel de filtro umedecida, cobertas com polipropileno transparente e mantidas em câmaras de germinação a 25°C e luz branca contínua

($18,2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Após 24h e 48h foi contado o número de sementes germinadas.

2.8.5.4. Revelação para compostos fenólicos

O cromatograma em papel correspondente ao extrato da fração ácida de botões florais de plantas sob DL foi subdividido em faixas verticais de aproximadamente 10mm, as quais foram reveladas individualmente com NaOH a 2%, vapor de amônia e lâmpada de UV (254nm e 366nm).

2.8.5.5. Detecção de citocininas

Para detecção química de citocininas nas frações básicas, usou-se o reagente de Wood, que desenvolve uma cor azul em presença de substâncias purínicas (WOOD, 1955).

A técnica usada foi a de nebulizar com o reagente de Wood (solução A: solução de azul de bromofenol 0,4% em acetona e solução B: solução de nitrato de prata 2% em água, misturando-se volumes iguais das soluções A e B no momento do uso) um cromatograma correspondente, tanto no tamanho da faixa de aplicação como no volume de extrato aplicado e no sistema de solventes usado, a uma repetição de cada faixa entre Rfs utilizada no bioteste.

2.9. Análise de reguladores de crescimento por HPLC

2.9.1. Separação dos hormônios padrão por HPLC

Os hormônios padrão Sigma: zeatina isômero *trans* (Z), zeatina ribosídeo isômero *trans* (ZR), isopentenil adenina (iP), isopentenil adenosina (iPA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido abscísico mistura de isômeros (ABA) foram preparados separadamente na concentração de 100 μ M.

Foi usado um cromatógrafo para HPLC da Pharmacia LKB, constituído das seguintes partes: controlador de sistema modelo LKB 2152 LC; duas bombas modelo LKB 2150 de pistão duplo com misturador de alta pressão estático modelo LKB 2152-400; detector de UV-vis modelo LKB 2141 e integrador LKB modelo 2121. Foi usada uma coluna analítica Sephasil C18, 5 μ m, 4x250mm da Pharmacia, mantendo-se um fluxo de 0,8mL.min⁻¹ e tendo como fase móvel água milliQ acidificada com 0,5% de ácido acético (solvente A) e metanol grau HPLC (solvente B).

Foi estabelecido um cromatograma padrão para as citocininas (Z, ZR, iP e iPA), misturando-se partes iguais destes padrões e aplicando-se esta mistura sucessivamente no cromatógrafo, variando-se as proporções da mistura de solventes, até que se obteve um gradiente (solvente A:solvente B) que separou adequadamente os picos dos hormônios padrão (tabela 2). Para a identificação de cada um dos picos, cada hormônio padrão foi injetado separadamente com o gradiente pré-estabelecido (ANDERSEN & KEMP, 1979).

O cromatograma padrão para AIA e ABA foi obtido em gradiente linear de 5% a 100% do solvente B em 55min.

Tabela 2. Gradiente obtido para a separação dos padrões de citocininas. Coluna Sephasil C18, 5 μ m, 4x250mm e fluxo de 0,8mL.min⁻¹.

tempo (min)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
0	5	95
15	20	80
40	50	50
55	100	0
70	100	0

2.9.2. Extração, purificação e dosagem das amostras

Foram injetados 100 μ L da mistura de padrões de citocininas no cromatógrafo, considerando o solvente A = água milliQ, solvente B = MeOH, fluxo = 0,8mL.min⁻¹, atenuação = 128, área mínima = 50.000, λ = 254nm e o gradiente pré-estabelecido.

A fração básica obtida conforme o esquema 1 e após a evaporação do n-butanol, do último passo da extração, foi ressuspensa em 500 μ L de água milliQ esterilizada. O extrato foi filtrado em filtro millipore 0,22 μ m e em seguida, injetou-se no cromatógrafo a totalidade da amostra, nas mesmas

condições acima e coletou-se o eluente nos picos (1,5 min antes e depois) conforme o cromatograma padrão.

As frações coletadas foram combinadas, concentradas em rotavapor a temperatura inferior a 40°C e o resíduo ressuspendido em 2mL de água milliQ esterilizada acrescida de 0,02% de NaN_3 e filtrado em filtro millipore 0,22 μm .

Depois disso, foram injetados 100 μL da mistura de hormônios padrão no cromatógrafo, usando solvente A = água milliQ acidificada com 0,5% de ácido acético, solvente B = MeOH, atenuação = 64, $\lambda_1 = 254\text{nm}$, $\lambda_2 = 280\text{nm}$ e as demais condições como já descritas.

Em seguida, foram injetados 250 μL da amostra ressuspendida e na seqüência mais 250 μL da mesma amostra misturada com 100 μL da mistura de padrões, com atenuação = 64, área mínima = 10000 e as demais condições como já descritas

A fração ácida, também obtida de acordo com esquema 1 e após a evaporação do acetato de etila do último passo da extração foi ressuspendida em 500 μL de água milliQ esterilizada acrescida de 0,5% de ácido acético. Após a filtragem do extrato em filtro millipore 0,22 μm , injetou-se a totalidade da amostra no cromatógrafo e foram colhidas as frações correspondentes aos tempos de retenção dos padrões de AIA e ABA, previamente eluídos.

Os padrões AIA e ABA, ambos na concentração de $100\mu\text{M}$, foram misturados na proporção de 2:1 e eluídos em gradiente de 5% a 100% de solvente B em 55 min, considerando o solvente A = água milliQ acidificada com 0,5% de ácido acético, solvente B = MeOH, fluxo $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, atenuação de 32, área mínima = 10000, $\lambda_1 = 254\text{nm}$ e $\lambda_2 = 280\text{nm}$ (DURLEY *et al.*, 1978).

As frações coletadas correspondentes a AIA e ABA foram concentradas separadamente em rotavapor à temperatura inferior a 40°C e o resíduo ressuspendido em 2mL de água milliQ esterilizada acrescida de 0,02% de NaN_3 .

Para efeito de quantificação foram cromatografados nas condições já descritas para os padrões a seguinte seqüência: $10\mu\text{L}$ da mistura de padrões de AIA e ABA (2:1); $100\mu\text{L}$ da fração ácida correspondente a cada um dos tratamentos sendo $50\mu\text{L}$ da fração correspondente a AIA e $50\mu\text{L}$ da fração correspondente a ABA e mais $100\mu\text{L}$ da mesma fração ácida acrescida de $5\mu\text{L}$ da mistura de padrões AIA e ABA.

As medidas obtidas na integração pelo cálculo das áreas dos picos foram relacionadas com a concentração das substâncias reguladoras de crescimento na amostra comparando-se as áreas obtidas no cromatograma da amostra com as áreas obtidas no cromatograma dos padrões, de acordo com os respectivos tempos de retenção.

2.10. Análise de reguladores de crescimento por imunoenensaio

2.10.1. Ensaio imunoenzimático

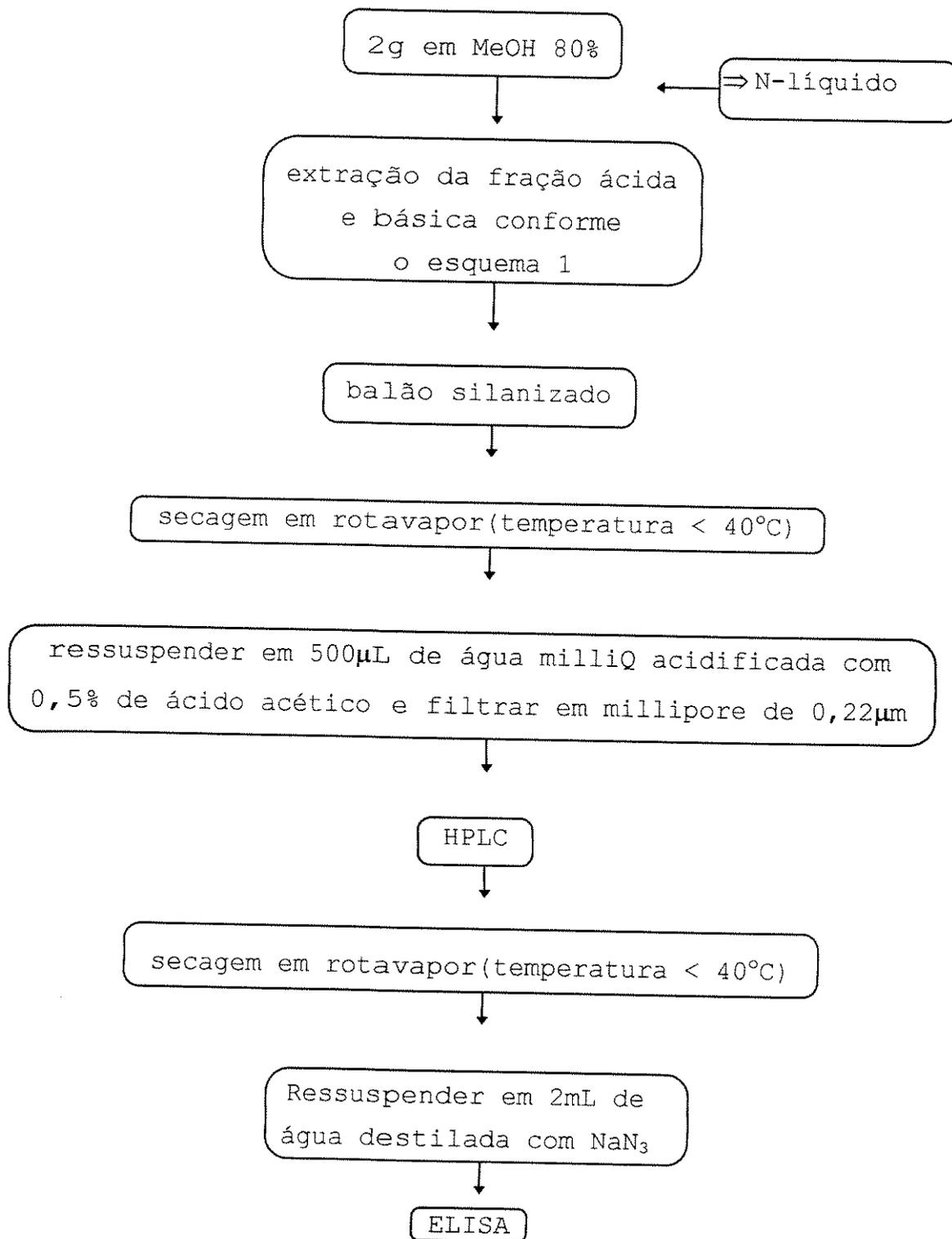
As frações básica e ácida obtidas conforme o esquema 2 foram dosadas fazendo-se 4 repetições por tratamento, pela técnica do ELISA competitivo como descrito a seguir (CLARK & ENGVALL, 1985), utilizando-se "kits" Mayoly Spindler:

Fixação do conjugado: os conjugados (OVA-ABA ou OVA-iPA) foram diluídos com tampão carbonato-bicarbonato e fixados à placa (200 μ L/pocinho) mantendo-os durante a noite a 4°C;

Bloqueio: após 3 lavagens com aproximadamente 400 μ L/pocinho de PBS-Tween foi feito o bloqueio com 250 μ L/pocinho de 2% de caseína em PBS, durante 30min a 37°C;

Competição: após 3 lavagens com aproximadamente 400 μ L/pocinho de PBS-Tween, foram colocados 50 μ L de tampão PBS-Tween, 100 μ L de padrão ou a amostra e 50 μ L do anticorpo monoclonal específico (anti-ABA ou anti-iPA,) por pocinho. Manteve-se a placa durante 2h a 4°C e em seguida fizeram-se mais 5 lavagens com aproximadamente 400 μ L/pocinho de PBS-Tween;

Segundo Anticorpo: foram distribuídos 200 μ L/pocinho do anticorpo conjugado com peroxidase (anti-mouse IgG), dissolvido em PBS + Tween. Incubou-se a placa por 1h a 37°C e em seguida fizeram-se 5 lavagens com aproximadamente 400 μ L/pocinho de PBS-Tween;



Esquema 2. Purificação do extrato para dosagem imunoenzimática

Substrato: adicionaram-se 200 μ L/pocinho da solução substrato, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e H₂O₂ em partes iguais. Incubou-se a placa por 1h a 37°C e fez-se a leitura da absorbância em leitora de placa a 405nm.

As leituras foram feitas no leitor de ELISA Labsystems MutiScan MS.

2.10.2. Tampões

Tampão carbonato-bicarbonato, carbonato de sódio 0,05M a pH 9,6; **Tampão PBS**, tampão fosfato 0,01M + NaCl 0,15M a pH 7,4; Os tampões foram armazenados a 4°C e nos que contêm Tween-20, este foi adicionado a 0,05%.

2.10.3. Curva padrão e cálculo dos resultados

Afim de se estabelecer as curvas padrão para ABA e iPA prepararam-se diluições em série: na faixa de 100pmoles a 30fmoles para cada 100 μ L de solução, partindo-se de uma solução 100 μ M de hormônio padrão ABA; na faixa de 1nmol a 1pmol para cada 100 μ L de solução, partindo-se de uma solução 1mM de hormônio padrão iPA.

A média da densidade ótica dos pocinhos contendo 100pmol/0,1mL de hormônio, hormônio livre em excesso, foi considerada como controle de coloração não específica (CNE) e a

média da densidade ótica dos pocinhos contendo 0,1mL de água destilada (sem hormônio livre) foi considerada como B_0 . Assim:

$$\% \left(\frac{B}{B_0} \right) = \frac{B - CNE}{B_0 - CNE} \times 100$$

onde,

B = densidade ótica do padrão ou amostra.

B_0 = densidade ótica da ligação máxima do anticorpo anti-hormônio, na ausência de hormônio livre (coloração forte).

CNE = densidade ótica de coloração não específica, ligação residual do anticorpo anti-hormônio em excesso de hormônio livre (coloração fraca).

A relação entre a porcentagem B/B_0 e a concentração do hormônio da curva padrão foi transformada em uma relação linear usando a função Logit, permitindo extrapolar a concentração de hormônio na amostra do valor da sua densidade ótica usando uma curva padrão linear (WEILER *et al.*, 1981).

$$\text{Logit} \left(\% \frac{B}{B_0} \right) = \text{Ln} \frac{\frac{B}{B_0}}{100 - \frac{B}{B_0}}$$

Os cálculos dos resultados levaram em consideração os valores obtidos nas dosagens pelas curvas padrão, o fator de diluição e a massa inicial da amostra.

2.11. Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com número de tratamentos e de repetições (plantas) por

tratamento conforme cada experimento. Após a análise de variância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando considerados dois tratamentos foi utilizado o teste t, também a 5% de probabilidade.

Os dados de germinação foram transformados em valor angular = arco seno \sqrt{p} , onde p corresponde à proporção de sementes germinadas, e estes valores foram utilizados para a análise estatística subsequente.

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio preliminares

Os resultados apresentados a seguir referem-se às medidas de desenvolvimento feitas nas plantas de *S. x luteus*, *S. chilensis* e *A. ericoides* em condições fotoperiódicas de DL (20h) e de DC (8h), com o intuito de verificar a influência destas condições fotoperiódicas no padrão de desenvolvimento das plantas.

3.1.1. *Solidago x luteus*

As medidas de desenvolvimento feitas nas plantas de *S. x luteus* mantidas em DC são apresentadas na tabela 3. Foi observado pelas medidas de altura de caule que a planta alcançou em média 0,36m de altura e que houve indução floral em todas as plantas. Observou-se também que houve antese floral na totalidade das plantas, que o número de ramificações laterais foi maior do que o de brotações basais e que a planta tinha cerca de 53 folhas ao final do experimento. A pequena diferença observada entre a altura do caule e a altura da planta indica que as folhas apicais das plantas eram de apenas 0,01m.

Pelas medidas de altura de planta e de caule feitas nas plantas mantidas em DL (tabela 4-A,B) verificou-se que estas atingiram 0,83m de altura e que houve indução floral em todas elas. Observou-se também antese floral em todas as plantas,

número de ramificações laterais maior do que o de brotações basais e 54 folhas, no final do experimento.

Nas plantas crescidas em DL e que no estágio de botão floral, ou seja, 87 dias após o plantio, foram transferidas para DC (tabela 4-A,C) constatou-se 0,82m de altura de planta e 0,80m de altura de caule, aumento até 100% de plantas em antese já na segunda semana após a transferência, um pequeno aumento no número de ramificações laterais e de brotações basais em relação às plantas mantidas em DL (tabela 4-B,C) e cerca de 53 folhas por planta no final do experimento.

Independentemente da condição de DC ou DL houve indução e antese floral na totalidade das plantas, sendo a indução floral mais rápida em DL (tabela 4) e a antese floral mais rápida em DC (tabela 3 e tabela 4-C). O número de folhas e de brotações basais foram semelhantes em DC (tabela 3) e em DL (tabela 4), entretanto, a planta apresentou menor porte e menor número de ramificações laterais sob DC (tabelas 3 e 4-B). A altura do caule foi 2,3 vezes maior sob DL (tabela 4-B) em relação aos DC (tabela 3).

Tabela 3. Medidas de desenvolvimento de plantas de *S. x luteus* crescidas sob DC (8h).

Dias após o plantio	Altura de planta (m)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Nº. de ramificações laterais	Nº. de brotações basais	Número de folhas
21	0,14	0,00	0	-	0,4	0	15,1
28	0,16	0,01	0	-	1,9	0	19,6
36	0,18	0,05	38	0	5,6	0	25,7
42	0,21	0,12	75	0	9,1	0	33,0
49	0,26	0,20	88	0	16,7	0	39,7
57	0,32	0,28	88	13	27,3	0	46,1
63	0,33	0,30	88	25	28,4	0	47,3
70	0,34	0,32	100	75	27,9	5,1	49,0
77	0,35	0,33	100	75	28,9	6,4	49,9
84	0,36	0,35	100	88	30,7	6,6	52,3
92	0,37	0,36	100	88	32,3	6,9	52,6
98	0,37	0,36	100	100	32,7	8,1	52,7
105	0,37	0,36	100	100	32,7	8,1	52,7
111	0,37	0,36	100	100	32,7	8,1	52,7
120	0,37	0,36	100	100	32,7	8,1	52,7

- não ocorrência de antese.

Tabela 4. Medidas de desenvolvimento de plantas de *S. x luteus* crescidas sob DL (20h) (A), mantidas neste fotoperíodo (B) e transferidas para DC (8h) 87 dias após o plantio (C).

Dias após o plantio	Altura de planta (m)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Nº. de ramificações laterais	Nº. de brotações basais	Número de folhas
A. Plantas crescidas sob DL							
21	0,19	0,06	75	0	0,1	0,0	15,4
28	0,30	0,19	100	0	0,6	0,0	20,4
36	0,43	0,35	100	0	8,4	0,0	28,5
42	0,54	0,49	100	0	17,8	0,0	36,4
49	0,64	0,61	100	0	25,3	0,0	43,0
57	0,72	0,71	100	0	29,3	0,0	46,6
63	0,78	0,77	100	0	34,3	0,0	48,5
70	0,80	0,80	100	0	33,6	1,8	49,6
77	0,81	0,81	100	0	36,1	2,3	51,1
84	0,82	0,81	100	0	37,1	5,1	50,3
B. Plantas mantidas sob DL							
91	0,83	0,82	100	0	37,3	6,0	51,0
98	0,83	0,82	100	25	38,0	6,0	53,8
105	0,83	0,82	100	25	38,0	6,8	53,8
111	0,83	0,83	100	100	38,8	6,8	53,8
120	0,83	0,83	100	100	38,8	6,8	54,0
C. Plantas transferidas para DC							
91	0,81	0,80	100	0	39,3	6,3	50,8
98	0,81	0,80	100	100	40,0	7,3	52,0
105	0,82	0,80	100	100	40,3	7,3	52,8
111	0,82	0,80	100	100	40,3	7,3	52,8
120	0,82	0,80	100	100	40,3	7,3	52,8

3.1.2. *Solidago chilensis* Meyu

Pelas medidas de desenvolvimento feitas nas plantas de *S. chilensis* mantidas em DC (tabela 5-A,B), observou-se que as plantas permaneceram em roseta, pois a altura do caule não ultrapassou 0,09m, refletindo um comprimento de 0,19m das folhas apicais, pois a altura da planta alcançou 0,28m. Conseqüentemente, não se constatou indução floral nem plantas em antese. O número de ramificações laterais foi crescente e ligeiramente maior do que o número de brotações basais. Observaram-se 44 folhas por planta no final do experimento.

Nas plantas mantidas em DC e após 79 dias transferidas para DL, (tabela 5-A,C) houve alongamento caulinar e desta forma indução floral na totalidade das plantas. Aos 151 dias após o plantio, quando o experimento foi encerrado, havia 7 ramificações laterais e cerca de 9 brotações basais por planta (tabela 5-C), ao contrário do observado em DC (tabela 5-B). A altura do caule aumentou para 0,39m e o número de folhas por planta para cerca de 65.

Nas plantas de *S. chilensis* crescidas em DL (tabela 6-A,B) verificou-se pelas medidas de altura de caule que houve um rápido alongamento caulinar, sendo atingida a altura de 1,45m aos 84 dias após o plantio. Aos 21 dias após o plantio todas as plantas já estavam induzidas. Também se constatou antese floral em todas as plantas, um número abundante de ramificações laterais, em função da ramificação do terço superior do caule,

e inibição de brotações basais. Ao final do experimento havia cerca de 98 folhas por planta.

Nas plantas crescidas em DL e transferidas 87 dias após o plantio para DC (tabela 6-A,C) foi observado um pequeno aumento na altura de planta e de caule e, embora o início da antese tenha sido antecipado, o processo até 100% de plantas em antese foi mais lento (tabela 6-C) em relação às plantas em DL (tabela 6-B). Também se observou um incremento menos acelerado no número de ramificações laterais e um ligeiro aumento em brotações basais (tabela 6-C) em relação às plantas em DL (tabela 6-B). Ao final do experimento havia cerca de 100 folhas por planta.

Na comparação entre as plantas em DC e em DL observou-se que sob DC permaneceram em roseta sem indução floral (tabela 5-A,B), enquanto que, sob DL houve alongamento caulinar característico das plantas induzidas (tabelas 5-C e 6-A) e posterior antese em todas elas (tabela 6-B). O número de brotações basais foi maior em DC (tabela 5) e de ramificações laterais em DL (tabela 6). A altura do caule foi 16,3 vezes maior sob DL (tabela 6-B) em relação aos DC (tabela 5-B), o número de folhas foi 2,2 vezes maior sob DL (tabela 6-B) do que sob DC (tabela 5-B) e o número de brotações basais foi 5,4 vezes maior sob DC (tabela 5-B) do que sob DL (tabela 6-B).

Tabela 5. Medidas de desenvolvimento de plantas de *S. chilensis* crescidas sob DC (8h)(A), mantidas neste fotoperíodo (B) e transferidas para DL (20h) 79 dias após o plantio (C).

Dias após o plantio	Altura de planta (m)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Nº. de ramificações laterais	Nº. de brotações basais	Número de folhas
A. Plantas crescidas sob DC							
21	0,20	0,07	0	-	0,0	0,0	16,9
28	0,25	0,08	0	-	0,6	0,1	21,0
36	0,27	0,08	0	-	1,4	0,1	24,4
42	0,28	0,08	0	-	1,5	0,1	26,5
49	0,29	0,09	0	-	1,5	0,1	30,4
57	0,28	0,09	0	-	1,5	0,1	33,1
63	0,29	0,09	0	-	1,8	0,1	35,5
70	0,28	0,09	0	-	1,5	1,0	36,9
77	0,28	0,09	0	-	1,9	1,9	38,4
B. Plantas mantidas sob DC							
84	0,28	0,09	0	-	2,5	2,5	42,0
92	0,28	0,09	0	-	5,0	2,5	42,5
98	0,28	0,09	0	-	8,3	3,0	42,8
105	0,28	0,09	0	-	8,5	3,0	43,3
111	0,28	0,09	0	-	10,5	4,5	43,3
120	0,28	0,09	0	-	10,0	5,8	43,5
127	0,28	0,09	0	-	10,0	6,3	43,8
136	0,28	0,09	0	-	9,8	6,5	43,8
144	0,28	0,09	0	-	9,8	7,0	44,3
151	0,28	0,09	0	-	9,8	7,0	44,3
C. Plantas transferidas para DL							
84	0,29	0,09	0	-	2,0	2,5	36,8
92	0,28	0,10	0	-	3,8	3,3	38,0
98	0,28	0,10	0	-	7,5	4,3	40,8
105	0,29	0,10	25	0	8,5	5,0	44,8
111	0,29	0,14	50	0	8,8	5,0	49,3
120	0,33	0,20	100	0	8,3	5,0	51,5
127	0,39	0,26	100	0	8,5	6,3	55,0
136	0,42	0,30	100	0	8,0	8,3	57,5
144	0,48	0,37	100	0	7,5	9,0	62,0
151	0,50	0,39	100	0	7,0	9,3	64,8

- não ocorrência de antese.

Tabela 6. Medidas de desenvolvimento de plantas de *S. chilensis* crescidas sob DL (20h) (A), mantidas neste fotoperíodo (B) e transferidas para DC (8h) 87 dias após o plantio (C).

Dia após o plantio	Altura de planta (m)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Nº. de ramificações laterais	Nº. de brotações basais	Número de folhas
A. Plantas crescidas sob DL							
21	0,39	0,24	100	0	0,0	0,0	17,5
28	0,53	0,38	100	0	0,5	0,0	20,8
36	0,68	0,52	100	0	1,4	0,3	25,9
42	0,77	0,67	100	0	1,5	0,3	33,1
49	0,92	0,83	100	0	1,4	0,3	40,6
57	1,11	1,05	100	0	1,0	0,4	54,0
63	1,26	1,22	100	0	11,6	0,8	69,0
70	1,35	1,32	100	0	20,0	1,0	79,3
77	1,42	1,41	100	0	29,4	1,0	87,8
84	1,46	1,45	100	0	42,6	1,3	91,0
B. Plantas mantidas sob DL							
92	1,46	1,46	100	0	64,3	1,0	93,3
98	1,47	1,47	100	0	83,5	1,3	95,8
105	1,47	1,47	100	100	96,0	1,3	97,8
111	1,47	1,47	100	100	96,0	1,3	97,8
C. Plantas transferidas para DC							
92	1,48	1,48	100	0	56,8	1,5	95,0
98	1,49	1,49	100	25	71,8	1,5	97,8
105	1,49	1,49	100	50	80,8	2,5	98,3
111	1,50	1,49	100	100	81,3	2,5	99,5

3.1.3. *Aster ericoides* cv. Montecasino

As plantas de *A. ericoides* mantidas em DC (tabela 7-A,B) permaneceram em roseta e mesmo com indução floral em 75% das plantas no final do experimento, a altura de caule foi de apenas 0,12m. A altura de planta chegou a 0,19m indicando um comprimento de 0,07m para as folhas apicais. Não houve indução floral até os 120 dias após o plantio, aos 165 dias apenas 25% das plantas tinham sido induzidas, porém, aos 182 dias após o plantio havia 75% de plantas induzidas, contudo, somente 25% das plantas chegaram a antese floral. Não foram observadas brotações basais, o número de ramificações laterais foi crescente, mais acentuadamente nas épocas de aumento na porcentagem de indução floral e havia, ao final do experimento, 69 folhas por planta.

Nas plantas mantidas em DC e após 77 dias transferidas para DL (tabela 7-A,C) houve alongamento caulinar e conseqüentemente indução floral na totalidade das plantas, embora, somente 25% das plantas atingiram a antese aos 225 dias. Neste tratamento (DC/DL) houve formação esporádica de botões florais pouco desenvolvidos e antese ocasional. O número de ramificações laterais foi crescente, acompanhando a ramificação do terço superior do caule nas plantas induzidas; também houve aumento no número de brotações basais e no número de folhas (tabela 7-C) em relação às plantas mantidas em DC (tabela 7-B).

Nas plantas de *A. ericoides* crescidas em DL (tabela 8-A,B) verificou-se, pelas medidas de altura de caule, um rápido crescimento e indução floral em todas as plantas, contudo, a antese somente se deu aos 165 dias após o plantio. Houve aumento de até 74 ramificações laterais, 2,3 brotações basais e cerca de 75 folhas por planta.

Nas plantas mantidas em DL e após 77 dias transferidas para DC (tabela 8-A,C) observou-se uma diferença menor entre a altura de caule e de planta, indicando folhas apicais de comprimento menor e, embora, a altura do caule ligeiramente menor do que em DL (tabela 8-B), alcançou 0,70m de altura (tabela 8-C). A antese floral se deu aos 111 dias após o plantio (tabela 8-C), ou seja, 54 dias antes do que sob DL (tabela 8-B). O número de ramificações laterais, embora crescente foi menor do que sob DL, ao contrário do número de brotações basais que foi promovido em DC (tabela 8-B,C). Observaram-se cerca de 76 folhas por planta.

Embora tenha sido observada indução floral nas plantas mantidas em DC, houve a tendência de as plantas permanecerem em roseta (tabela 7-A,B), apresentando antese floral ocasional nas plantas induzidas, menor altura de planta e menor número de ramificações laterais e de folhas do que as plantas mantidas em DL (tabela 8-A,B). Contudo, as plantas crescidas em DC (tabela 7-A) responderam rapidamente em crescimento vegetativo e indução floral quando transferidas para DL (tabela 7-C) e as plantas em DL/DC (tabela 8-A,C) diminuíram ligeiramente o ritmo

de crescimento caulinar e o número de ramificações laterais, promovendo brotações basais e principalmente a antese floral, em relação às plantas em DL (tabela 8-B). A altura do caule foi 5,9 vezes maior sob DL (tabela 8-B) em relação aos DC (tabela 7-B) e o número de brotações basais foi 2,3 vezes maior em DL (tabela 8-B) do que em DC (tabela 7-B).

Tabela 7. Medidas de desenvolvimento de plantas de *A. ericoides* crescidas sob DC (8h) (A), mantidas neste fotoperíodo (B) e transferidas para DL (20h) 77 dias após o plantio (C).

Dias após o plantio	Altura de planta (m)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Nº. de ramificações laterais	Nº. de brotações basais	Número de folhas
A. Plantas crescidas sob DC							
21	0,14	0,02	0	-	7,8	0,0	14,1
28	0,15	0,02	0	-	11,0	0,0	16,9
36	0,15	0,02	0	-	13,6	0,0	19,5
42	0,16	0,02	0	-	15,1	0,0	22,4
49	0,16	0,02	0	-	16,1	0,0	23,6
57	0,16	0,03	0	-	18,1	0,0	24,9
63	0,16	0,03	0	-	21,3	0,0	26,8
70	0,16	0,03	0	-	23,5	0,0	28,3
77	0,16	0,03	0	-	24,8	0,0	28,3
B. Plantas mantidas sob DC							
84	0,16	0,04	0	-	27,0	0,0	30,0
92	0,16	0,04	0	-	29,5	0,0	32,3
98	0,16	0,04	0	-	32,3	0,0	34,3
105	0,16	0,04	0	-	35,3	0,0	37,0
111	0,16	0,04	0	-	37,3	0,0	39,3
120	0,15	0,04	0	-	39,3	0,0	42,5
127	0,15	0,04	25	0	41,0	0,0	45,3
136	0,15	0,04	25	0	41,5	0,0	47,3
145	0,15	0,05	25	0	45,3	0,0	51,0
152	0,14	0,05	25	0	48,5	0,0	53,3
165	0,16	0,08	25	0	54,8	0,0	60,5
182	0,19	0,12	75	25	60,8	0,0	69,0
C. Plantas transferidas para DL							
84	0,16	0,04	25	0	28,0	0,0	34,8
92	0,18	0,07	50	0	33,5	0,0	37,8
98	0,22	0,11	50	0	41,3	0,0	41,3
105	0,29	0,19	50	0	47,3	0,0	47,0
111	0,35	0,28	75	0	53,0	0,0	52,8
120	0,41	0,34	75	0	56,5	0,8	58,0
127	0,46	0,42	100	0	61,0	0,8	61,0
136	0,52	0,50	100	0	66,8	0,8	68,5
145	0,61	0,60	100	0	75,8	0,8	75,3
152	0,66	0,66	100	0	82,0	0,8	79,5
165	0,72	0,71	100	0	87,8	0,8	85,8
225	0,90	0,78	100	25	104,0	10,0	97,5

- não ocorrência de antese.

Tabela 8. Medidas de desenvolvimento de plantas de *A. ericoides* crescidas sob DL (20h) (A), mantidas neste fotoperíodo (B) e transferidas para DC (8h) 77 dias após o plantio (C).

Dias após o plantio	Altura de planta (m)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Nº. de ramificações laterais	Nº. de brotações basais	Número de folhas
A. Plantas crescidas sob DL							
21	0,22	0,08	88	0	9,0	0,0	16,4
28	0,31	0,22	100	0	20,1	0,0	22,8
36	0,43	0,40	100	0	28,8	0,0	29,3
42	0,51	0,49	100	0	33,9	0,0	35,6
49	0,55	0,55	100	0	36,8	0,0	38,5
57	0,61	0,61	100	0	38,8	0,0	41,1
63	0,64	0,64	100	0	45,0	0,0	46,4
70	0,66	0,65	100	0	48,0	1,9	48,8
77	0,67	0,67	100	0	51,6	2,3	57,5
B. Plantas mantidas sob DL							
84	0,67	0,66	100	0	54,3	3,5	57,8
92	0,68	0,67	100	0	59,0	2,3	64,8
98	0,72	0,68	100	0	66,5	2,3	67,5
105	0,74	0,69	100	0	68,8	2,3	69,3
111	0,75	0,70	100	0	70,3	2,3	70,8
120	0,78	0,70	100	0	70,8	2,3	72,5
127	0,78	0,70	100	0	71,5	2,3	73,0
136	0,79	0,71	100	0	71,5	2,3	73,5
145	0,79	0,71	100	0	72,0	2,3	74,0
152	0,79	0,71	100	0	73,8	2,3	74,8
165	0,79	0,71	100	100	74,3	2,3	74,8
182	0,80	0,71	100	100	74,3	2,3	74,5
C. Plantas transferidas para DC							
84	0,70	0,69	100	0	56,5	1,0	60,3
92	0,71	0,69	100	0	55,3	2,8	67,5
98	0,72	0,69	100	0	59,0	3,0	68,8
105	0,72	0,70	100	0	62,0	3,5	73,5
111	0,72	0,70	100	100	62,5	4,0	75,8

3.2. Efeito das condições fotoperiódicas e da temperatura sobre a indução e o desenvolvimento floral em *S. x luteus*

Considerando que todas as plantas de *S. x luteus* foram induzidas e atingiram o estágio de antese floral tanto em DC (8h) como em DL (20h), foram feitos experimentos com o objetivo de se conhecer o fotoperíodo mais apropriado para a indução floral, assim como o efeito de diferentes fotoperíodos no desenvolvimento floral da espécie.

3.2.1. Efeito do fotoperíodo de 8h sobre o desenvolvimento floral

Nos experimentos preliminares foi evidenciado que o fotoperíodo de DC (8h) acelera o desenvolvimento do botão floral e a antese em relação ao fotoperíodo de DL (20h).

Na tabela 9 estão apresentadas as porcentagens de plantas com botão floral e de plantas em antese para as plantas mantidas em DL (20h) e para as plantas transferidas para DC (8h) por 5, 10, 15 dias e até o final do experimento.

Na medida em que se prolongou o tempo de permanência das plantas em DC verificou-se um aumento na porcentagem de plantas em antese (tabela 9). As plantas que receberam 5 e 10 DC apresentaram maiores porcentagens de antese floral em relação às mantidas em DL. As porcentagens de antese nas plantas que receberam 15 DC, se equivaleram às das plantas que permaneceram em DC até o final do experimento.

As plantas que receberam 15 DC e as que permaneceram sob DC até o final do experimento apresentavam 80% das plantas em antese aos 27 dias após o início dos tratamentos, ao passo que, as que receberam 5 e 10 DC apresentavam 30 e 90% de antese, respectivamente, aos 37 dias após o início do experimento. As plantas em DL apresentavam apenas 10% de antese floral aos 49 dias após o início dos tratamentos (tabela 9).

Houve um ligeiro atraso para atingir 100% de plantas com botão floral quando mantidas em DL em relação às plantas nos tratamentos de DC (tabela 9).

Tabela 9. Efeito do número de DC (8h) sobre o desenvolvimento do botão floral e a antese em plantas de *S. x luteus*, transferidas após 41 dias sob DL (20h).

Dias após o plantio	Planta com botão floral (%)				
	Dias longos	5 Dias curtos	10 Dias curtos	15 Dias curtos	Dias curtos
41	0	0	0	10	10
51	40	90	70	80	80
59	70	100	90	100	90
68	100	100	90	100	100
72	100	100	90	100	100
78	100	100	100	100	100
85	100	100	100	100	100
90	100	100	100	100	100
	Plantas com antese (%)				
41	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0
68	0	0	0	80	80
72	0	0	0	80	80
78	0	30	90	100	90
85	0	100	90	100	100
90	10	100	90	100	100

3.2.2. Efeito de diferentes fotoperíodos em interação com a temperatura sobre a indução floral

Os experimentos foram feitos em duas épocas do ano, procurando-se associar o efeito da temperatura às condições fotoperiódicas estudadas.

Nas plantas mantidas no período de outono-inverno houve a tendência a se formarem dois padrões de resposta. Não houve diferença na intensidade de resposta nas plantas em fotoperíodos de 8h a 14h, e nas plantas em fotoperíodo de 16h a NI, a intensidade de resposta foi decrescente (fig. 1-A,C,D). Houve maior número de folhas (fig. 1-A) e promoção de ramificações laterais (fig. 1-C) e florais (fig. 1-D) nos fotoperíodos mais longos, contudo, as plantas mantidas nos fotoperíodos de 20h, LC e NI não diferiram das plantas sob fotoperíodos curtos (8h a 14h). Ao contrário, houve maior número de brotações basais nos fotoperíodos curtos (fig. 1-B), entretanto, as plantas mantidas no fotoperíodo de 8h não diferiram das mantidas sob fotoperíodos longos (16h a NI).

Em média, aos 138 dias após o plantio, no final do ensaio de outono-inverno, observaram-se 4,9 brotações basais por planta nos fotoperíodos curtos (8h a 14h) e 1,7 nos fotoperíodos acima de 16h (fig. 1-B). Inversamente, foram encontradas em média 8,2 ramificações laterais nas plantas mantidas nos fotoperíodos curtos e 19,9 nos fotoperíodos longos (fig. 1-C).

No ensaio de verão-outono não houve diferença no número de folhas (fig. 2-A), número de brotações basais (fig. 2-B) e

ramificações laterais (fig. 2-C) entre as plantas mantidas nos fotoperíodos de 8h, 20h e NI, porém, houve diferença no número de ramificações florais entre as plantas mantidas em 8h e em NI e as plantas em 20h (fig. 2-D). Ao final do ensaio, observou-se uma média de 7,7 brotações basais por planta em 8h, 9,8 em 20h e 9,5 em NI (fig. 2-B), contra 35,4 ramificações laterais em 8h, 41,7 em 20h e 35,2 em NI (fig. 2-C).

No ensaio de verão-outono, no final do experimento, não houve diferença entre 8h, 20h e NI quanto ao número de ramificações laterais (fig. 2-C), em concordância com o número de nós, representado pelo número de folhas (fig. 2-A). A diferença observada no número de ramificações florais (fig. 2-D) ocorreu em função do fato de um número maior de ramificações laterais ter florescido em 20h.

Sob fotoperíodos mais longos (16h, 18h, 20h e LC) o comprimento do caule foi maior do que sob fotoperíodos curtos (8h a 14h) e NI, tanto nas observações feitas nas plantas mantidas no período de outono-inverno (fig. 3-A), como nas de verão-outono (fig. 3-C).

No outono-inverno, registraram-se porcentagens de indução floral superiores a 50% nas plantas mantidas sob os fotoperíodos mais longos, observando-se ainda que, nas plantas em fotoperíodo de 16h houve 100% de indução floral (fig. 3-B). Por outro lado, nos fotoperíodos abaixo de 14h e em NI, a porcentagem de indução não passou de 20%, permanecendo as plantas em roseta. No ensaio

de verão-outono, o aumento na porcentagem de plantas induzidas ocorreu mais lentamente sob fotoperíodos de 8h e NI do que sob 20h, embora, no final do experimento, a porcentagem de plantas induzidas nos três tratamentos foi semelhante (fig. 3-D).

As plantas respondem mais rapidamente às condições de verão-outono (fig. 3-D) do que às de outono-inverno (fig. 3-B) para a indução floral, entretanto, as plantas induzidas sob DC (8h a 14h) e NI não ultrapassaram o comprimento de caule de 0,45m nas condições de verão-outono (fig. 3-C) e outono-inverno (fig. 3-A), ao passo que, o comprimento do caule foi de até aproximadamente 0,90m em DL (16h a LC) tanto no outono-inverno (fig. 3-A) como no verão-outono (fig. 3-C).

A indução floral ocorreu sob todos os fotoperíodos estudados tanto no ensaio de outono-inverno (fig. 3-B) como no de verão-outono (fig. 3-D), verificando-se, no entanto, diferenças quantitativas entre os diferentes fotoperíodos (fig. 3-B,D).

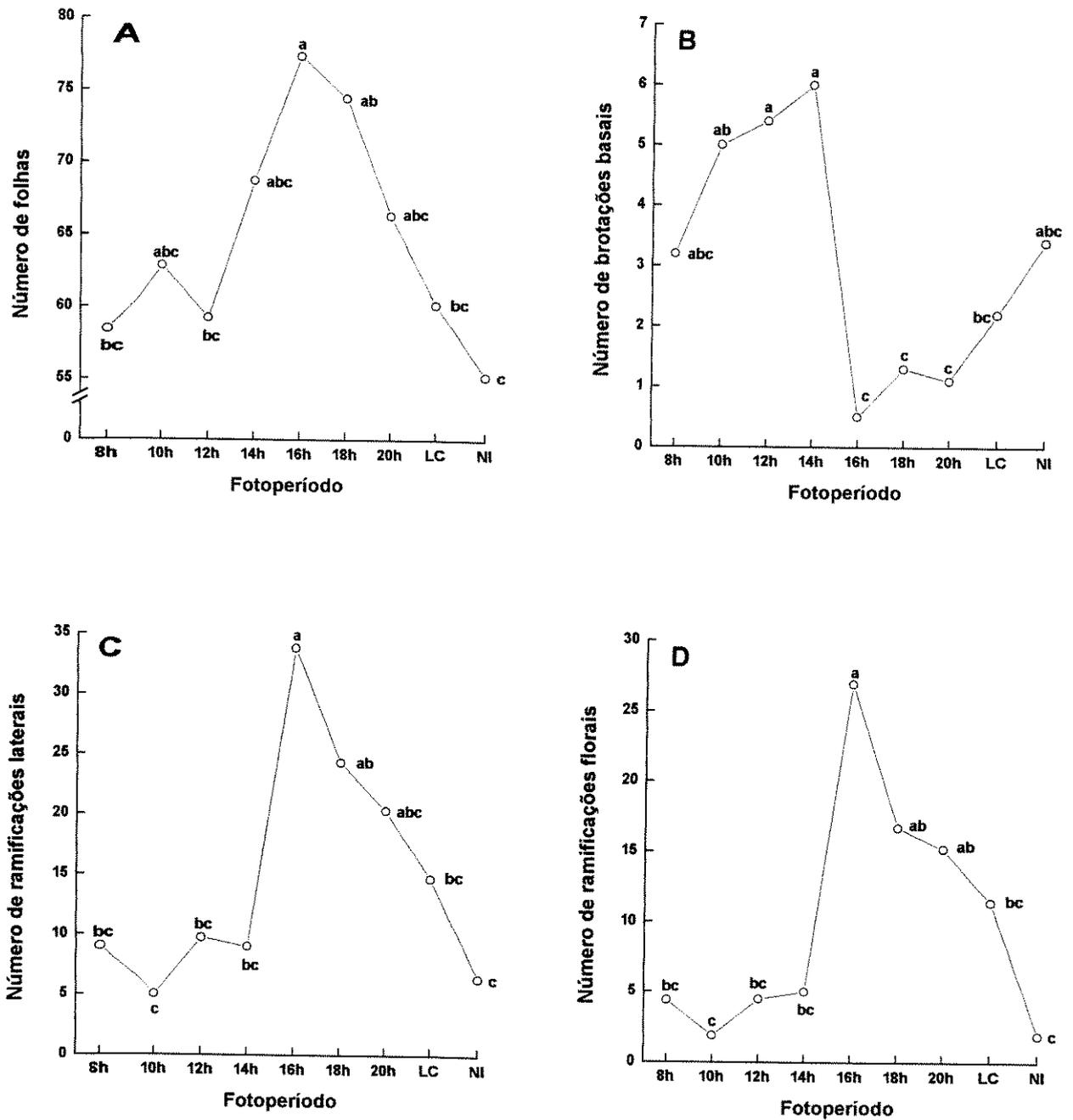


Figura 1. Número de folhas (A), número de brotações basais (B) e número de ramificações laterais (C) e florais (D) em plantas de *S. x luteus*, crescidas durante 138 dias sob diferentes tratamentos fotoperiódicos, no ensaio de outono-inverno (LC = luz contínua; NI = noite interrompida).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

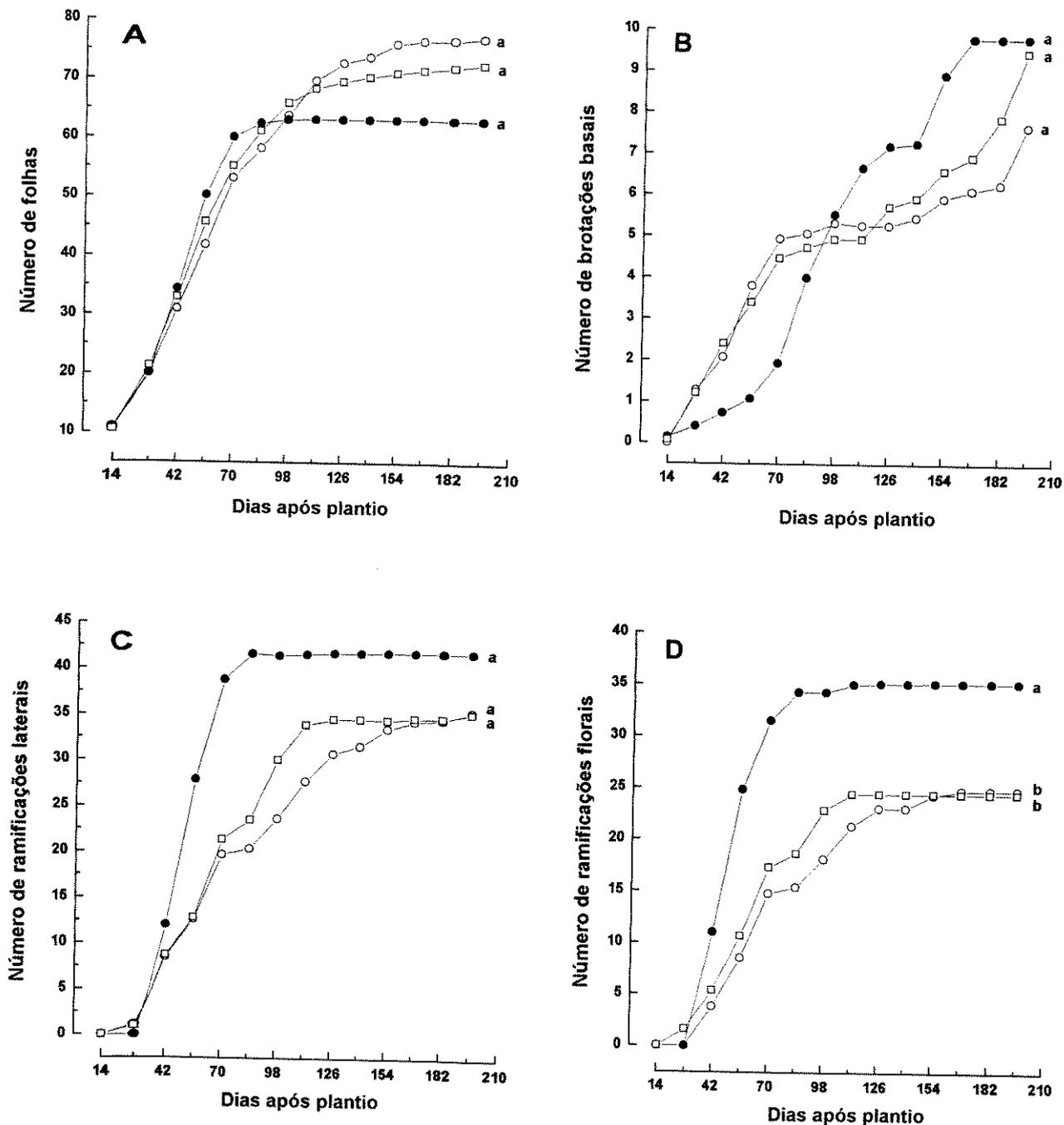


Figura 2. Número de folhas (A), número de brotações basais (B) e número de ramificações laterais (C) e florais (D) em plantas de *S. x luteus* crescidas sob diferentes fotoperíodos no ensaio de verão-outono (NI = noite interrompida).

○ - 8h, ● - 20h e □ - NI

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

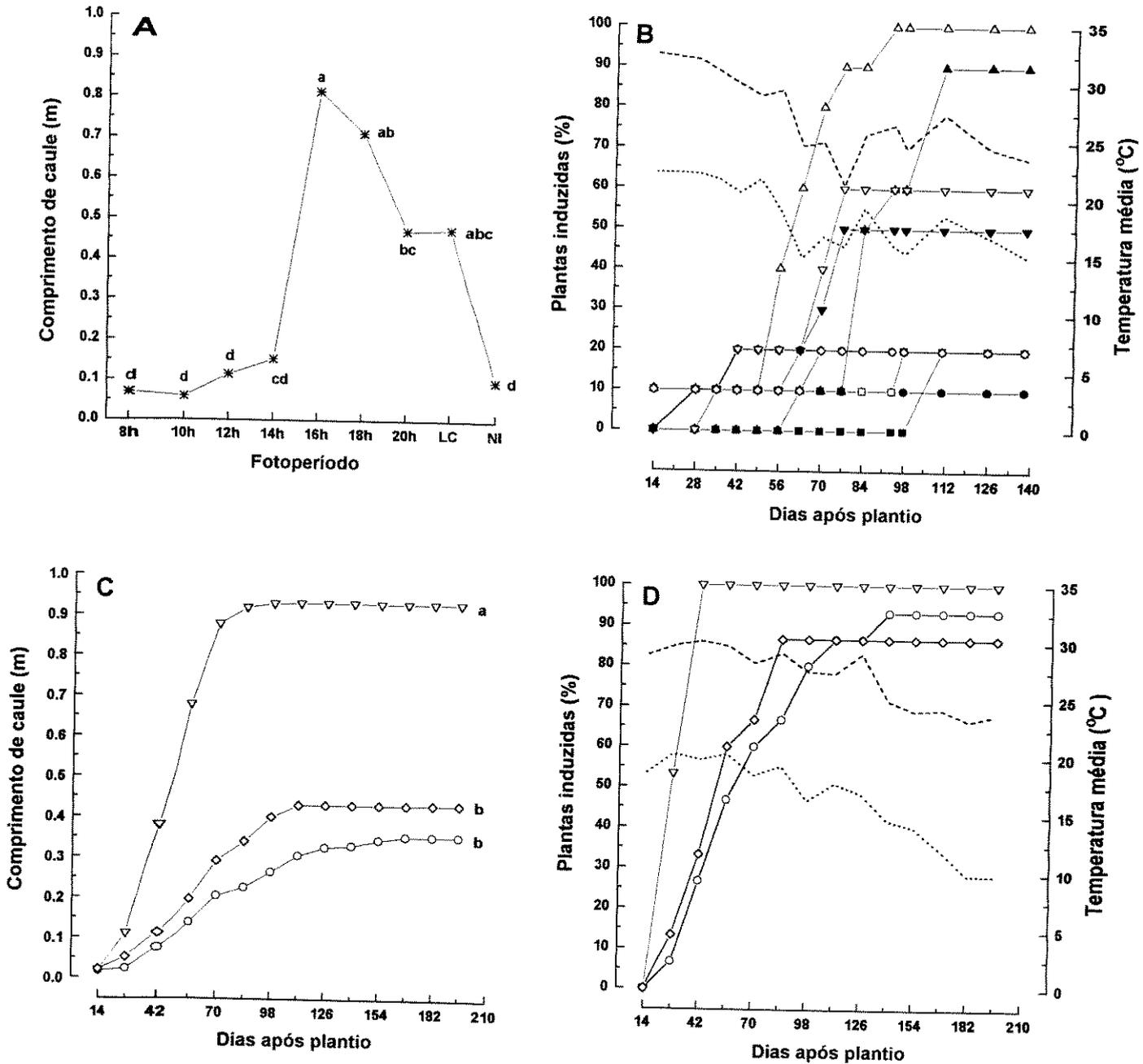


Figura 3. Comprimento de caule (A e C) e porcentagem de plantas induzidas em função da interação fotoperíodo-temperatura (B e D) em plantas de *S. x luteus*, crescidas sob diferentes tratamentos fotoperiódicos, nos ensaios de outono-inverno (A e B) e verão-outono (C e D) (LC = luz contínua; NI = noite interrompida).

○ - 8h, ● - 10h, □ - 12h, ■ - 14h,

△ - 16h, ▲ - 18h, ▽ - 20h, ▼ - LC, ◇ - NI

temperaturas médias máximas ----

temperaturas médias mínimas ...

A - 138 dias após o início dos tratamentos fotoperiódicos.
Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No ensaio de outono-inverno nas plantas mantidas em fotoperíodos curtos (8h, 10h, 12h e 14h) ocorreu direcionamento preferencial de assimilados para a raiz (fig. 4-B), enquanto que, nas plantas mantidas em fotoperíodos longos (16 h, 18h e 20h) houve partição equivalente de fotoassimilados entre raiz e parte aérea, porém, nas plantas sob LC e NI houve direcionamento significativo de massa seca para a raiz, fazendo com que estes tratamentos fotoperiódicos não difiram com o grupo dos fotoperíodos curtos (fig. 4-B).

Nas plantas mantidas em 8h e NI no verão-outono houve um acúmulo de massa seca na raiz semelhante ao da parte aérea, ao passo que, nas plantas em 20h verificou-se direcionamento significativo de fotoassimilados para a parte aérea (fig. 4-A).

Nas medidas de área foliar feitas na 35ª folha das plantas no ensaio de outono-inverno também houve a tendência a se formarem dois padrões de resposta (tabela 10). Não houve diferença de área foliar entre as plantas mantidas em fotoperíodos curtos (8h, 10h e 12h) e entre as plantas em fotoperíodos longos (16h, 18h, 20h e LC), porém, de maneira geral, a área foliar das plantas em fotoperíodos longos foi maior do que em fotoperíodos curtos.

As plantas mantidas no tratamento fotoperiódico de 14h apresentaram uma área foliar intermediária entre os fotoperíodos curtos e longos, enquanto que, não houve diferença em área foliar entre as plantas em NI e em fotoperíodos curtos (tabela 10).

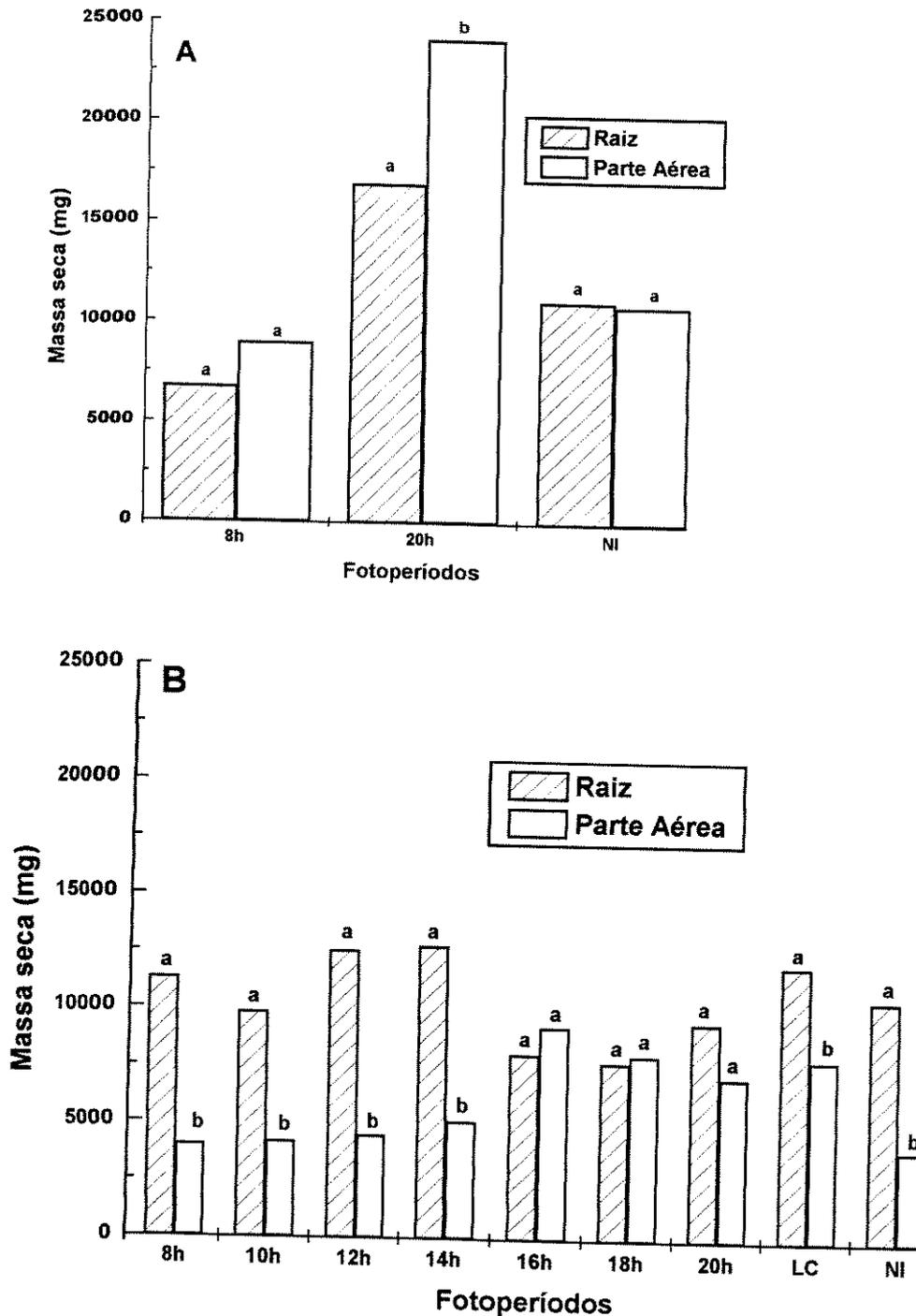


Figura 4. Massa seca da raiz e da parte aérea, no estágio de antese floral, no ensaio de verão-outono (A) e após 138 dias, no ensaio de outono-inverno (B), em plantas de *S. x luteus* crescidas sob diferentes tratamentos fotoperiódicos (LC = luz contínua; NI = noite interrompida).

Letras diferentes indicam diferenças significativas, pelo teste *t* a 5% de probabilidade, dentro do mesmo fotoperíodo.

Tabela 10 - Área foliar da 35ª folha em plantas de *S. x luteus* mantidas por 138 dias em diferentes tratamentos fotoperiódicos (LC = luz contínua; NI = noite interrompida).

Fotoperíodo	Área Foliar (mm ²)
8h	1262 a ¹
10h	1335 ab
12h	1543 ab
14h	1696 bc
16h	1969 cd
18h	2212 d
20h	2085 cd
LC	2262 d
NI	1461 ab

1 - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.3. Efeito do fotoperíodo e do tratamento de vernalização sobre a indução floral

Estacas com raiz foram submetidas a temperaturas de vernalização com o objetivo de verificar sua influência na indução floral de plantas mantidas sob DL (18h) e sob DC (8h) no período de outono-inverno.

Na tabela 11 são mostradas as medidas de crescimento feitas nas plantas mantidas em DL (tabela 11-A) e em DC (tabela 11-B) provenientes de estacas vernalizadas e sem vernalizar.

Verificou-se que independentemente do tratamento de vernalização todas as plantas mantidas sob DL foram induzidas e atingiram a antese, contudo, o tratamento de vernalização das estacas retardou em 28 dias os processos para atingir 100% de plantas induzidas e de plantas em antese floral (tabela 11-A). Enquanto que 80% das plantas mantidas sob DC provenientes de estacas sem vernalizar alcançaram indução e antese floral, respectivamente, aos 64 e 106 dias após o plantio, não se observou indução nem antese nas plantas mantidas em DC provenientes de estacas vernalizadas (tabela 11-B).

Embora o alongamento caulinar tenha sido mais lento nas plantas mantidas em DL, provenientes de estacas vernalizadas, a altura do caule foi de aproximadamente 0,90m no final do experimento tanto nas plantas provenientes de estacas vernalizadas quanto nas sem vernalizar (tabela 11-A). No entanto, nas plantas mantidas sob DC, provenientes de estacas

Tabela 11. Efeito do tratamento de vernalização em estacas com raiz de *S. x luteus* sobre a indução floral nas plantas mantidas em DL (18h) (A) e em DC (8h) (B).

Dias após o plantio	Estacas vernalizadas			Estacas não vernalizadas		
	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	Plantas em antese (%)	Altura de caule (m)	Plantas induzidas (%)	plantas em antese (%)
A. plantas mantidas sob DL						
22	0,01	0	-	0,01	0	-
36	0,02	10	0	0,11	80	0
50	0,09	40	0	0,33	100	0
64	0,19	70	0	0,56	100	0
78	0,44	100	0	0,81	100	0
92	0,69	100	10	0,88	100	30
106	0,85	100	30	0,88	100	100
120	0,89	100	70	0,88	100	100
134	0,89	100	100	0,88	100	100
B. plantas mantidas sob DC						
22	0,01	0	-	0,01	0	-
36	0,01	0	-	0,02	0	-
50	0,01	0	-	0,06	50	0
64	0,02	0	-	0,17	80	0
78	0,02	0	-	0,28	80	20
92	0,03	0	-	0,32	80	50
106	0,03	0	-	0,32	80	80
120	0,03	0	-	0,32	80	80
134	0,04	0	-	0,32	80	80

- não ocorrência de antese

sem vernalizar, e mesmo apresentando 80% de indução floral, a altura do caule não passou de 0,32m e nas plantas de estacas vernalizadas a altura do caule ficou em apenas 0,04m, pois, não houve indução floral (tabela 11-B).

3.2.4. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento floral

Foram feitos experimentos com o objetivo de detectar o(s) fotoperíodo(s) que aceleram o desenvolvimento do botão até antese floral.

Na fig. 5 e na tabela 12 são mostrados os resultados correspondentes aos experimentos com os fotoperíodos de 8h, 12h, 14h e 20h (experimento I) e com os fotoperíodos de 8h, 10h, 12h, 14h, 16h e 20h (experimento II). Observou-se em ambos experimentos que o processo até antese floral é mais lento em fotoperíodos longos (16h e 20h) e rápido em fotoperíodos curtos (8h, 10h, 12h e 14h) (fig. 5-A,B). Ao final do experimento I constatou-se que a planta produziu um número significativamente maior de flores abertas em 20h em relação aos fotoperíodos mais curtos (8h, 12h e 14h) (fig. 5-A), porém, no experimento II não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de flores abertas (fig. 5-B).

O número de flores abertas no experimento I foi significativamente maior sob 20h, possivelmente pela extensão do experimento até 77 dias após o início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 5-A), portanto, como observado na fig. 5-

B, é pouco provável, que nestas condições, o comprimento do dia influencie o número de flores abertas por planta.

No experimento I constatou-se maior velocidade média de antese floral (t-médio) nas plantas mantidas nos fotoperíodos curtos (8h, 12h e 14h) em relação às plantas em 20h (tabela 12-A), ao passo que, no experimento II, que abrangeu um número maior de fotoperíodos, confirmou-se uma velocidade média de antese floral significativamente maior nas plantas mantidas nos fotoperíodos curtos (8h, 10h e 12h) em relação às plantas em fotoperíodos longos (16h e 20h), verificando-se que houve um aumento numérico crescente no t-médio com o aumento do fotoperíodo (tabela 12-B).

Não se verificou a influência de nenhum dos fotoperíodos estudados em ambos experimentos sobre a porcentagem de flores malformadas, pois, esta ficou na faixa de 5 a 12% (tabela 12-A,B).

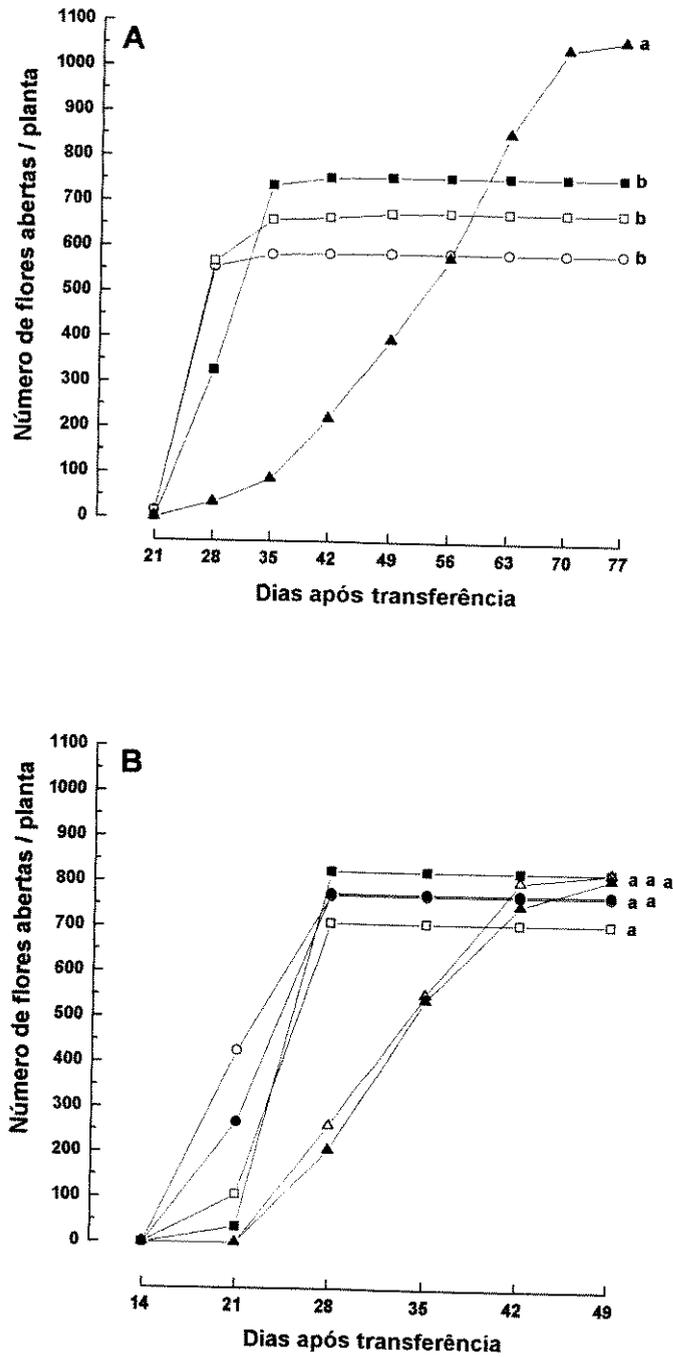


Figura 5. Efeito de diferentes fotoperíodos sobre o número de flores e a velocidade de antese floral em *S. x luteus*.

A = experimento I: 4 fotoperíodos;

B = experimento II: 6 fotoperíodos.

○ - 8h, ● - 10h, □ - 12h, ■ - 14h, △ - 16h e ▲ - 20h

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 12. Número de flores abertas, porcentagem de flores normais e tempo médio de antese (t - médio) em *S. x luteus* sob diferentes fotoperíodos.

Tratamento	Nº. de flores abertas por planta	Flores normais (%)	t - médio (dias)
A. Experimento I (4 fotoperíodos)			
8h	588,0 a ¹	92,9	28,3 a
12h	677,2 a	94,9	29,1 a
14h	756,3 a	91,3	32,1 a
20h	1061,8 b	92,7	56,0 b
B. Experimento II (6 fotoperíodos)			
8h	771,6 a ¹	93,7	24,1 a
10h	776,8 a	95,5	25,5 ab
12h	711,0 a	87,9	26,8 ab
14h	825,9 a	92,8	27,6 b
16h	825,7 a	96,5	35,0 c
20h	813,7 a	88,3	35,5 c

1 - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Efeito de aplicações de giberelinas e citocininas sobre o desenvolvimento floral

Foram feitos experimentos com aplicações de reguladores de crescimento nos botões florais de plantas mantidas em DL (18h ou 20h), na tentativa de se associar o efeito de giberelinas e citocininas com a velocidade de antese floral nas plantas em DC (8h).

Na figura 6 e na tabela 13 estão apresentados os resultados correspondentes às aplicações de GA_3 $10^{-3}M$ e $10^{-4}M$ em botões florais de plantas mantidas em DL (20h).

Constatou-se que as plantas no tratamento de DL produziram um número de flores significativamente maior em relação aos tratamentos de DC e de aplicações de GA_3 $10^{-3}M$ em botões florais de plantas em DL (fig. 6-A). Todavia, não houve diferença entre os tratamentos quanto ao número de flores no experimento com GA_3 $10^{-3}M$ aplicado em botões florais de plantas a cada 10 dias, GA_3 $10^{-4}M$ aplicado a cada 5 dias e as plantas controle em DL e em DC (fig. 6-B).

A velocidade média de antese floral, inferida pelo cálculo do t-médio, foi significativamente maior nos tratamentos de DC e de GA_3 $10^{-3}M$ aplicado em botões florais de plantas mantidas em DL em relação às plantas controle em DL (tabela 13-A). Observou-se ainda, uma porcentagem alta de flores anormais nas plantas dos três tratamentos avaliados, porém, esta porcentagem foi maior nas plantas em DL que receberam GA_3 $10^{-3}M$ (tabela 13-A).

No experimento com GA_3 $10^{-3}M$ aplicado a cada 10 dias e GA_3 $10^{-4}M$ aplicado a cada 5 dias em botões florais de plantas em DL, verificou-se uma velocidade média de antese floral significativamente maior somente nas plantas sob DC (tabela 13-B). Entretanto, o tratamento de GA_3 $10^{-3}M$ aplicado em botões florais de plantas sob DL, mesmo a cada 10 dias, continuou apresentando uma porcentagem maior de flores anormais (tabela 13-B).

Não houve efeito do tratamento de GA_3 $10^{-4}M$ aplicado a cada 5 dias em botões florais de plantas sob DL sobre a velocidade média de antese floral, nem ocasionou dano floral em relação aos demais tratamentos (tabela 13-B).

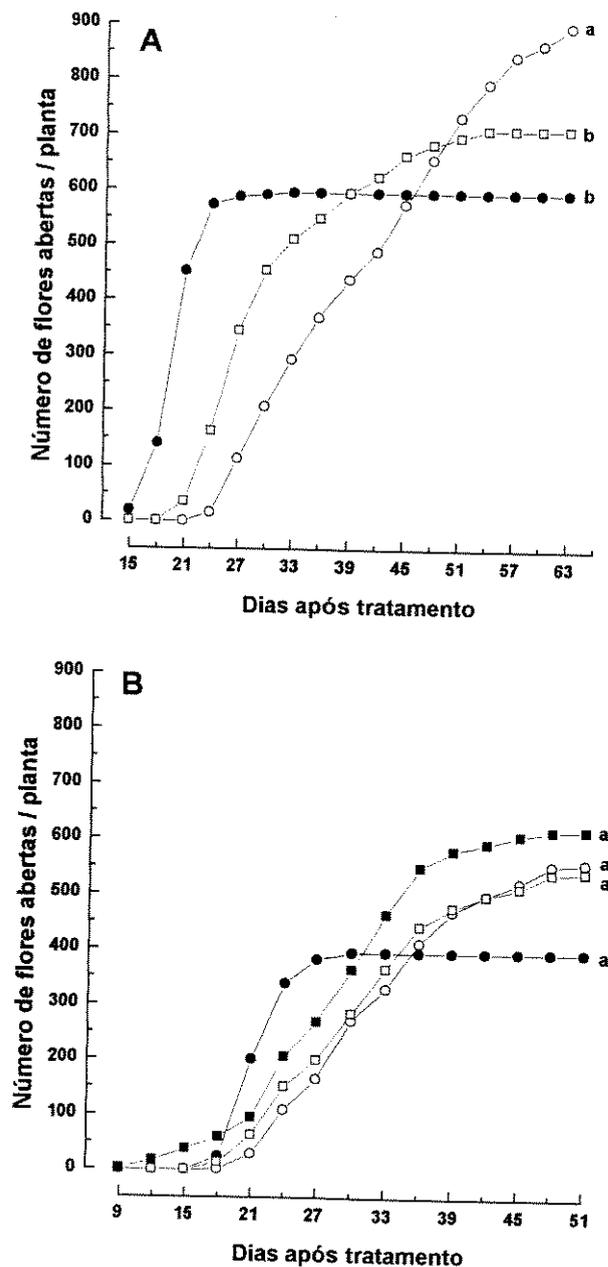


Figura 6. Efeito do fotoperíodo e de aplicações de GA₃ em botões florais de plantas em DL no desenvolvimento floral em *S. x luteus* (DL = 20h; DC = 8h).

A = GA₃ 10⁻³M a cada 5 dias;

B = GA₃ 10⁻³M a cada 10 dias e GA₃ 10⁻⁴M a cada 5 dias.

○ - DL, ● - DC, □ - DL + GA₃ 10⁻³M, ■ - DL + GA₃ 10⁻⁴M

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13. Número de flores abertas, porcentagem de flores normais e tempo médio de antese (t - médio) em *S. x luteus* sob diferentes tratamentos (DL = 20h; DC = 8h).

Tratamento	Nº. de flores abertas por planta	Flores normais (%)	t - médio (Dias)
A. GA₃ 10⁻³M aplicado a cada 5 dias			
DC	5950 a ¹	71,5	27,2 a
DL + GA ₃ 10 ⁻³ M	7170 a	42,4	31,5 a
DL	8980 b	68,5	41,9 b
B. GA₃ 10⁻³M aplicado a cada 10 dias e GA₃ 10⁻⁴M a cada 5 dias.			
DC	3957 a	95,2	22,6 a
DL + GA ₃ 10 ⁻³ M	5416 a	85,8	31,6 b
DL + GA ₃ 10 ⁻⁴ M	6180 a	92,7	29,5 b
DL	5587 a	91,1	32,6 b

1 - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na fig. 7 e nas tabelas 14 e 15 são mostrados os resultados correspondentes às aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$, 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ e GA_3 $10^{-4}M$ mais 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ (fig. 7-A e tabela 14-A); às aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$, KI $4 \times 10^{-4}M$ e GA_3 $10^{-4}M$ mais KI $4 \times 10^{-4}M$ (fig. 7-B e tabela 14-B); e às aplicações a cada 4 e a cada 7 dias de KI $4 \times 10^{-4}M$ (fig. 7-C e tabela 15) em botões florais de plantas mantidas em DL (18h).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao número médio de flores por planta ao final do experimento com as aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$, 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ e GA_3 $10^{-4}M$ mais 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ (fig. 7-A) e do experimento com aplicações a cada 4 e a cada 7 dias de KI $4 \times 10^{-4}M$ (fig. 7-C) em botões florais de plantas em DL. Entretanto, verificou-se que ao final do experimento com aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$, KI $4 \times 10^{-4}M$ e GA_3 $10^{-4}M$ mais KI $4 \times 10^{-4}M$ em botões florais de plantas em DL, os tratamentos com GA_3 $10^{-4}M$ e GA_3 $10^{-4}M$ mais KI $4 \times 10^{-4}M$ e o tratamento controle de plantas em DL produziram um número de flores significativamente maior do que o tratamento controle de plantas sob DC, contudo, o tratamento com KI $4 \times 10^{-4}M$ produziu um número intermediário de flores (fig. 7-B).

Verificou-se aumento significativo na velocidade média de antese floral nos tratamentos de aplicações semanais de 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ e de GA_3 $10^{-4}M$ mais 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ em botões florais de plantas em DL em relação aos tratamentos de GA_3 $10^{-4}M$ e de

plantas controle em DL (tabela 14-A), indicando que houve um efeito promotor na velocidade média de antese floral nos tratamentos que incluíram 6-BA e que este efeito não seria estimulado pelas aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$, pois, quando aplicado como tratamento único não diferiu das plantas controle em DL. Contudo, a antese floral significativamente mais rápida ainda foi no tratamento controle de plantas em DC (tabela 14-A).

Nos tratamentos de aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$ e de GA_3 $10^{-4}M$ mais 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ em botões florais de plantas sob DL houve aumento na porcentagem de flores anormais em relação às plantas controle sob DL e sob DC, porém, a maior porcentagem de dano floral foi observada no tratamento de aplicações semanais de 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ em botões florais de plantas sob DL (tabela 14-A).

Quando se aplicou semanalmente KI $4 \times 10^{-4}M$ aos botões florais das plantas sob DL, verificou-se que este tratamento diferiu significativamente das plantas controle em DL, evidenciando seu efeito promotor em relação à velocidade média de antese floral (tabela 14-B). Os tratamentos de aplicações semanais de GA_3 $10^{-4}M$ e GA_3 $10^{-4}M$ mais KI $4 \times 10^{-4}M$ nos botões florais das plantas sob DL não diferiram das plantas controle sob DL, mostrando novamente que o tratamento com GA_3 $10^{-4}M$ não teria efeito sobre a velocidade média de antese floral e que poderia estar interferindo no efeito promotor da KI. Contudo, a

maior velocidade de antese floral foi nas plantas controle sob DC (tabela 14-B).

Observou-se uma porcentagem baixa de flores anormais nos tratamentos efetuados (tabela 14-B).

No experimento em que foram testadas duas frequências de aplicação de KI $4 \times 10^{-4}M$ (tabela 15), não houve diferença significativa entre as plantas controle sob DC e o tratamento de aplicações de KI $4 \times 10^{-4}M$ a cada 4 dias em botões florais de plantas sob DL; também não houve diferença significativa entre as plantas controle em DL e o tratamento de aplicações de KI $4 \times 10^{-4}M$ a cada 7 dias em botões florais de plantas sob DL. Todavia, não se verificou diferença significativa entre as duas frequências de aplicação (4 e 7 dias), mostrando uma tendência decrescente entre o tratamento controle de DL, os tratamentos com frequência de aplicação de 7 e 4 dias e o tratamento controle em DC, evidenciando um possível efeito promotor da KI em interação com a frequência de aplicação.

Praticamente não se observou a formação de flores anormais em nenhum dos tratamentos estudados (tabela 15).

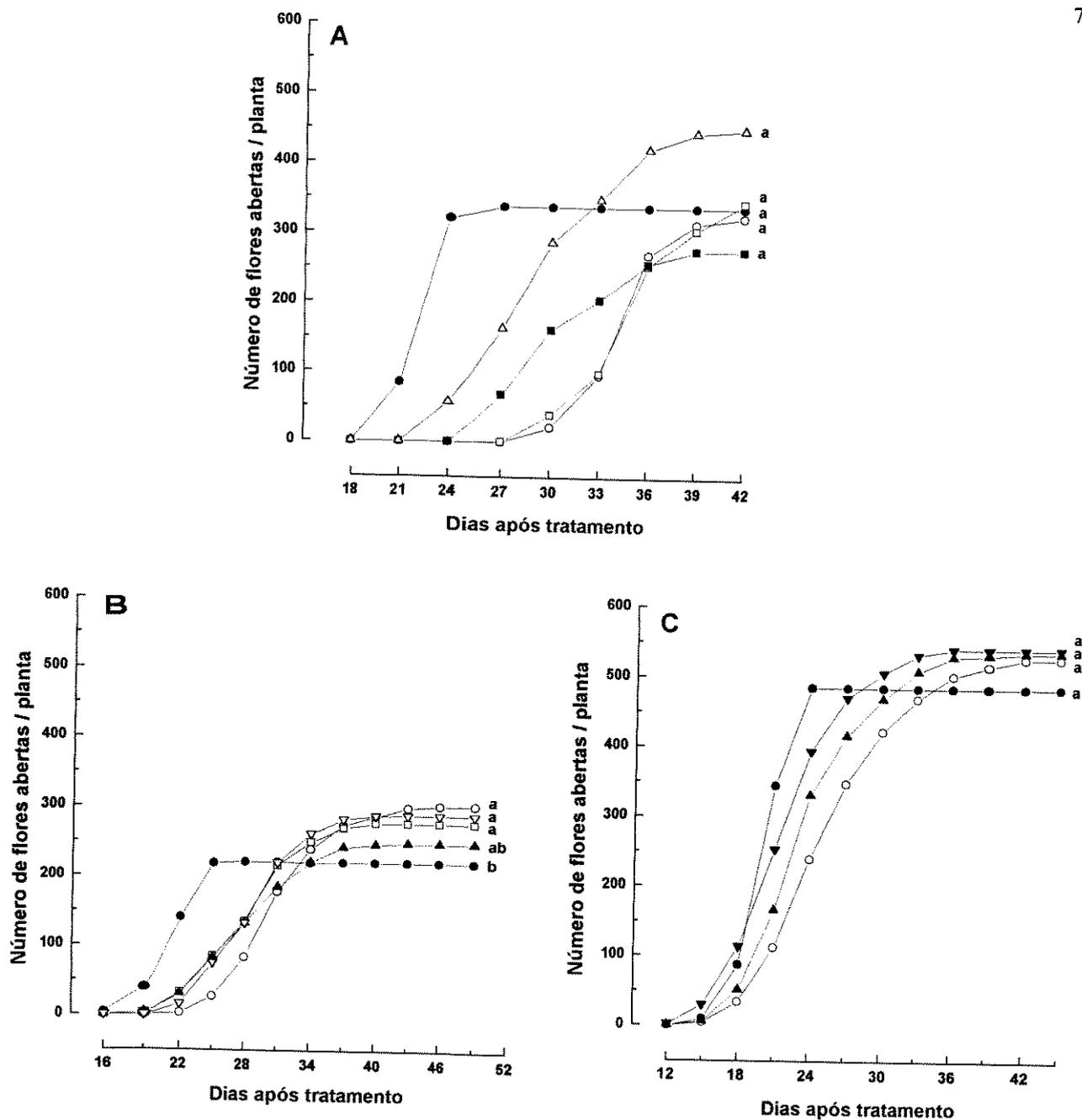


Figura 7. Efeito do fotoperíodo e de aplicações de GA_3 , 6-BA e KI em botões florais de plantas sob DL no desenvolvimento floral de *S. x luteus* (DL = 18h; DC = 8h).

A = aplicação semanal de GA_3 $10^{-4}M$, 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ e GA_3 + 6-BA;

B = aplicação semanal de GA_3 $10^{-4}M$, KI $4 \times 10^{-4}M$ e GA_3 + KI;

C = aplicação a cada 4 e a cada 7 dias de KI $4 \times 10^{-4}M$.

○ - DL, ● - DC, □ - DL + GA_3 $10^{-4}M$, ■ - DL + 6-BA $4 \times 10^{-4}M$,

△ - DL + (GA_3 $10^{-4}M$ + 6-BA $4 \times 10^{-4}M$), ▲ - DL + KI $4 \times 10^{-4}M$ - 7 dias,

▽ - DL + (GA_3 $10^{-4}M$ + KI $4 \times 10^{-4}M$), ▼ - DL + KI $4 \times 10^{-4}M$ 4 dias.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 14. Número de flores abertas, porcentagem de flores normais e tempo médio de antese (t - médio) em *S. x luteus* sob diferentes tratamentos (DL = 20h; DC = 8h).

Tratamento	Nº. de flores abertas por planta	Flores normais (%)	t - médio (dias)
A. Interação GA₃/6-BA com aplicações a cada 7 dias			
DC	3375 a ¹	93,4	23,5 a
DL + GA ₃ 10 ⁻⁴ M	3453 a	80,3	35,3 c
DL + 6-BA 4x10 ⁻⁴ M	2765 a	70,3	31,2 b
DL + (GA ₃ + 6-BA)	4503 a	81,2	31,0 b
DL	3250 a	91,0	35,5 c
B. Interação GA₃/KI com aplicações a cada 7 dias			
DC	2199 a	99,6	22,5 a
DL + GA ₃ 10 ⁻⁴ M	2775 b	98,1	29,3 bc
DL + KI 4x10 ⁻⁴ M	2482 ab	98,4	26,3 b
DL + (GA ₃ + KI)	2891 b	98,8	29,6 c
DL	3033 b	96,9	32,3 c

1 - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 15. Número de flores abertas, porcentagem de flores normais e tempo médio de antese (t - médio) em *S. x luteus* sob diferentes tratamentos. A KI $4 \times 10^{-4}M$ foi aplicada a cada 4 e cada 7 dias (DL = 18h; DC = 8h).

Tratamento	Nº. de flores abertas por planta	Flores normais (%)	t- médio (Dias)
DC	486 a ¹	99,9	21,2 a
DL + KI 4 dias	542 a	99,7	22,9 ab
DL + KI 7 dias	537 a	99,8	24,9 bc
DL	528 a	99,9	27,0 c

1 - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4. Efeito de aplicações da fração ácida de folhas de plantas em DL sobre o desenvolvimento floral

Sabendo-se que a velocidade média de antese floral foi mais lenta em fotoperíodos longos (16h, 18h e 20h) do que em fotoperíodos curtos (8h, 10h e 12h), foi aplicado o extrato proveniente da fração ácida de folhas de plantas sob DL (18h) nos botões florais de plantas sob DC (8h), com a finalidade de se obter indícios do possível envolvimento de reguladores de crescimento da fração ácida no desenvolvimento floral em plantas sob DL.

Não houve diferença significativa, na velocidade média de antese floral, entre o tratamento de aplicações do extrato da fração ácida de folhas de plantas sob DL nos botões florais de plantas sob DC e o tratamento controle de plantas em DC; entretanto, como esperado, houve uma menor velocidade de antese floral nas plantas controle sob DL (tabela 16).

Não se observou malformação floral nos tratamentos estudados (tabela 16) e também não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao número de flores (tabela 16 e fig. 8).

Desta forma, não foi possível obter indícios da presença de substância(s) na fração ácida de folhas de plantas sob DL responsável pela menor velocidade de antese floral em plantas sob DL, que atuasse retardando a antese floral em plantas sob DC.

Tabela 16. Número de flores abertas, porcentagem de flores normais e tempo médio de antese (t- médio) em *S. x luteus* sob diferentes tratamentos. As três primeiras aplicações do extrato de folhas de plantas em DL (EFDL) foram a cada 5 dias e as cinco aplicações restantes a cada 2 dias (DL = 18h; DC = 8h).

Tratamento	Nº. de flores abertas por planta	Flores normais (%)	t- médio (dias)
DC	525 a ¹	99,9	18,9 a
DC + EFDL	561 a	99,9	20,0 a
DL	512 a	99,9	25,4 b

1 - Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

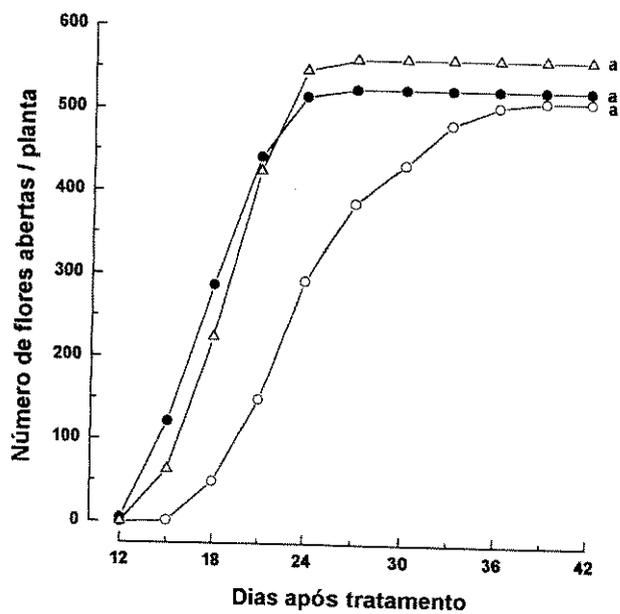


Figura 8. Efeito do fotoperíodo e das aplicações do extrato de folhas de plantas sob DL (EFDL) em botões florais de plantas sob DC no desenvolvimento floral de *S. x luteus* (DL = 18h; DC = 8h).

○ - DL, ● - DC, △ - DC + EFDL

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.5. Análise de substâncias endógenas em folhas e botões florais de plantas em diferentes fotoperíodos e estádios de desenvolvimento

3.5.1. Substâncias promotoras e inibidoras detectadas na fração ácida

Foram analisadas folhas e botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos e folhas e botões florais de plantas no estágio de botão floral antes do início da antese floral sob DC (8h) e DL (18h), com a finalidade de se verificar o envolvimento de reguladores de crescimento no desenvolvimento do botão até antese floral.

Nas fig. 9, 10 e 11 são mostrados os resultados do bioteste do hipocótilo de alface para as frações ácidas de folhas e botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos e de folhas e botões florais de plantas em DC e em DL.

Nos extratos obtidos partindo-se de 2g de massa fresca de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 9A) e de botões florais de plantas sob DC (fig. 9B), não se detectou atividade promotora ou inibidora do alongamento do hipocótilo de alface.

Nos extratos provenientes de 3g de massa fresca de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 10-A) e de folhas de plantas sob DC (fig. 10-C) não se detectou atividade promotora ou inibidora do alongamento do hipocótilo de

alface, porém, no extrato de 3g de massa fresca de folhas de plantas sob DL (fig. 10-B) constatou-se uma inibição significativa do crescimento do hipocótilo de alface, na faixa entre os Rfs 0,9 e 1,0.

Também não foi detectada atividade promotora ou inibidora do alongamento do hipocótilo de alface no extrato correspondente a 3g de massa fresca de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 11-A), contudo, nos extratos correspondentes a 3g de massa fresca de botões florais de plantas em DL e em DC também foi observada inibição significativa do crescimento do hipocótilo de alface, compreendida na faixa entre os Rfs 0,3 e 0,6 e Rfs 0,7 e 1,0 no extrato de botões florais de plantas sob DL (fig. 11-B) e na faixa entre os Rfs 0,9 e 1,0 no extrato de botões florais de plantas sob DC (fig. 11-C).

Nos extratos correspondentes a 2g e a 3g de massa fresca tanto de folhas quanto de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, não foi detectada atividade promotora ou inibidora do alongamento do hipocótilo de alface.

A atividade inibidora do alongamento do hipocótilo de alface foi detectada em folhas somente em plantas sob DL, ao passo que, em botões florais tanto em plantas sob DL quanto em plantas sob DC, porém, com maior número de picos de atividade em botões florais de plantas sob DL.

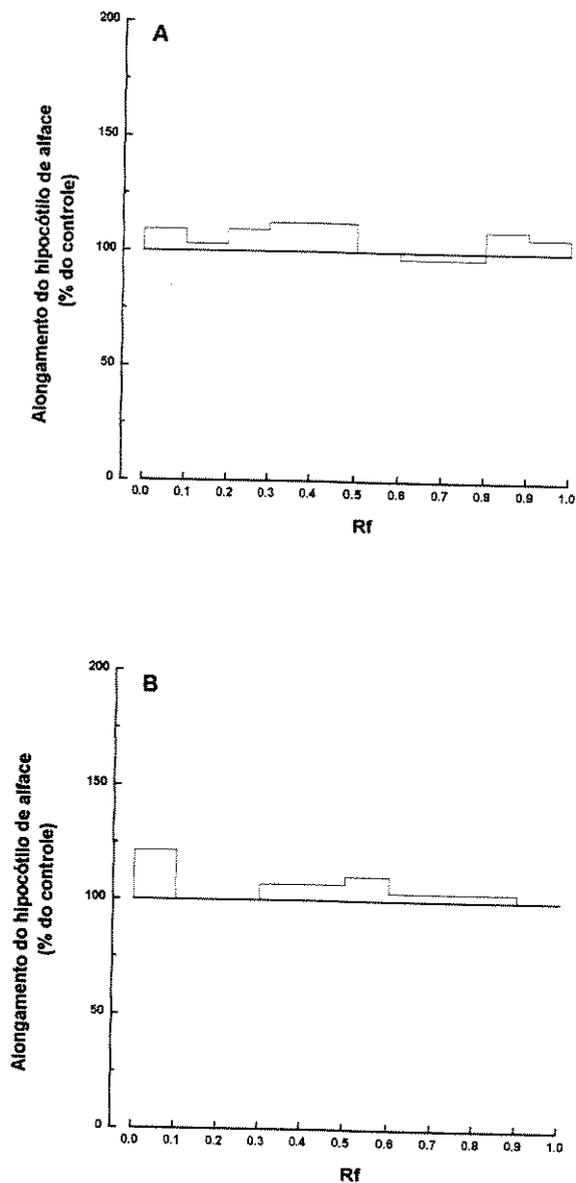


Figura 9. Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida, pelo bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface, em extratos de 2g de massa fresca de botões florais de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (18h);

B = extrato de botões florais de plantas sob DC (8h).

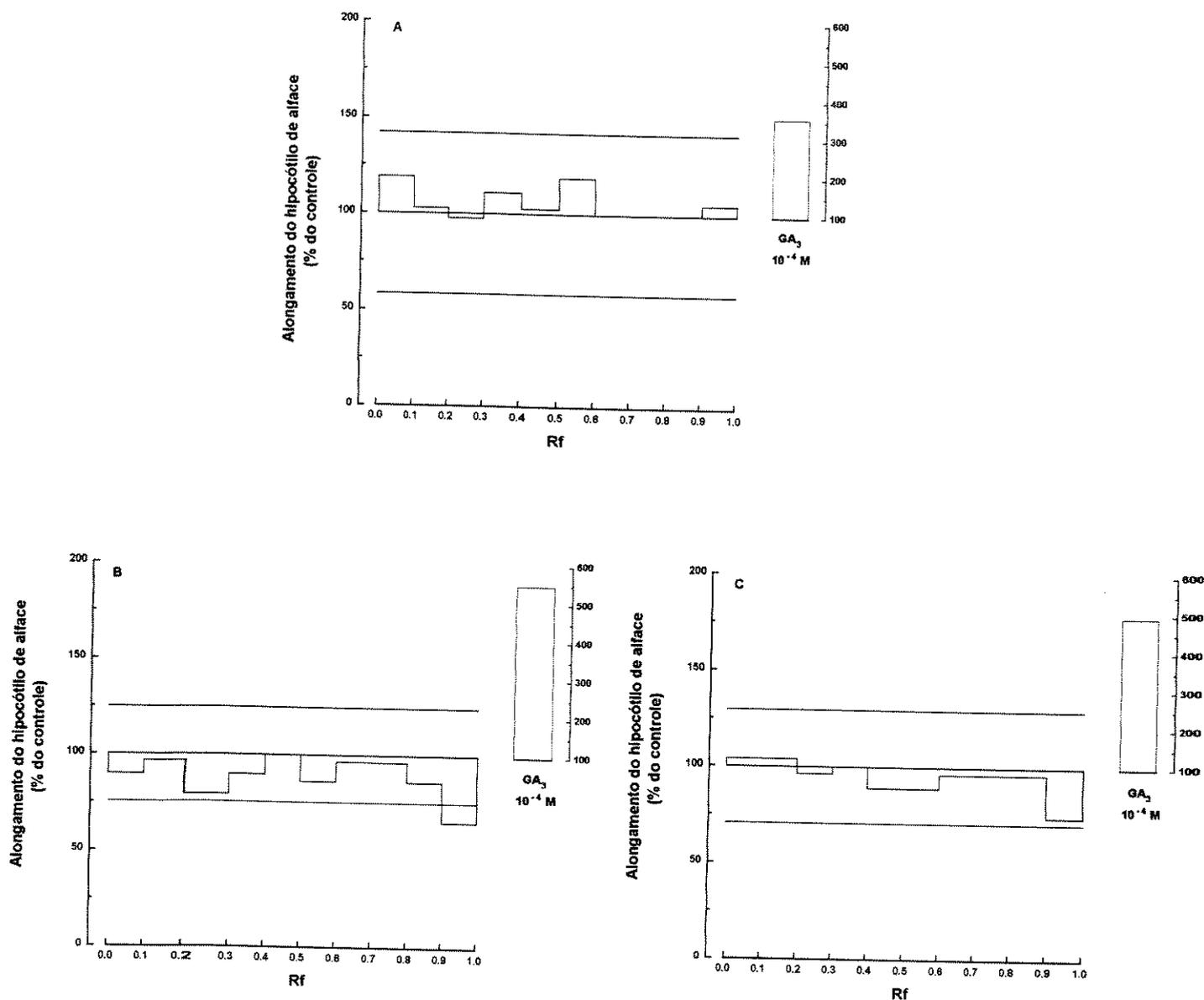


Figura 10. Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida, pelo bioensaio do alongamento do hipocótilo de alfaca, em extratos de 3g de massa fresca de folhas de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (18h);

B = extrato de folhas de plantas em DL (18h);

C = extrato de folhas de plantas em DC (8h).

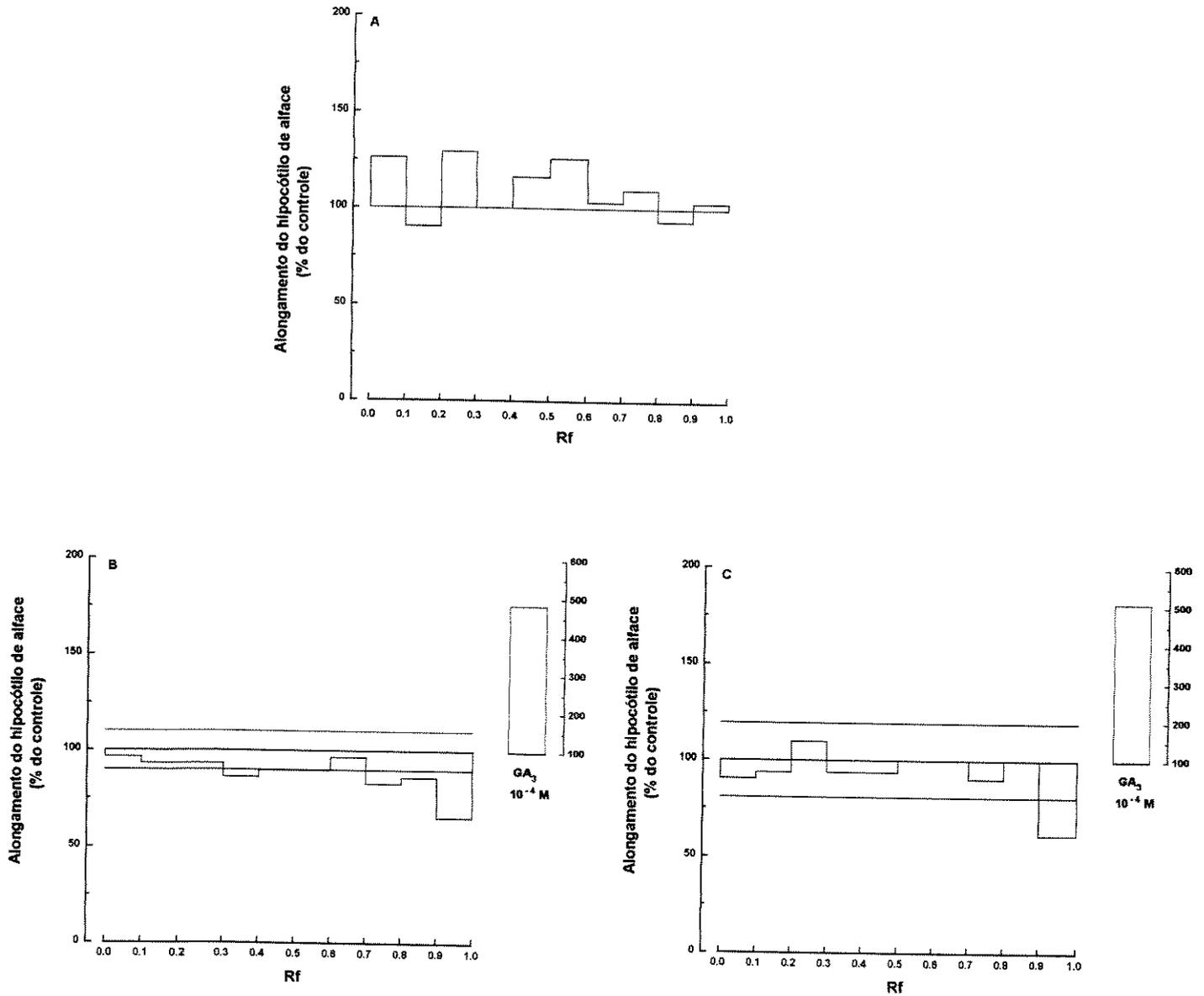


Figura 11. Substâncias de crescimento detectadas na fração ácida, pelo bioensaio do alongamento do hipocótilo de alface, em extratos de 3g de massa fresca de botões florais de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (18h);

B = extrato de botões florais de plantas em DL (18h);

C = extrato de botões florais de plantas em DC (8h).

Também foram analisadas folhas e botões florais de plantas em DL (18h), afim de se verificar o envolvimento do ácido abscísico no desenvolvimento do botão até antese floral.

Na fig. 12 são mostrados os resultados do bioteste de germinação de sementes de alface para as frações ácidas de folhas e botões florais de plantas em DL.

Não se detectou efeito significativo na germinação de sementes de alface nos tratamentos estudados (fig. 12-A,B), entretanto, no extrato correspondente às folhas (fig. 12-A), observou-se inibição significativa da germinação de sementes de alface, na faixa entre os Rfs 0,8 e 0,9.

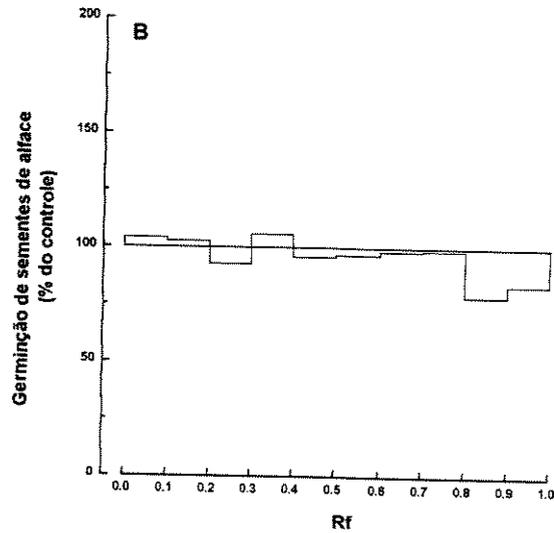
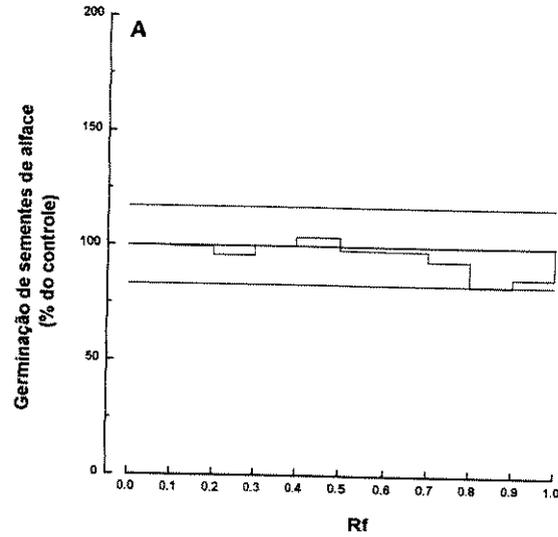


Figura 12. Atividade inibidora detectada na fração ácida, pelo bioensaio de germinação de sementes de alface, em extratos de 3g de massa fresca de folhas e botões florais de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de folhas de plantas em DL (18h);

B = extrato de botões florais de plantas em DL (18h).

A cromatografia em papel correspondente ao extrato de botões florais de plantas em DL percorrida com isopropanol:amônia:água (10:1:1 v/v/v) foi revelada em ultravioleta, com NaOH a 2% e em vapor de amônia (tabela 17), com o intuito de se detectar a presença de fenóis na fração ácida.

Das manchas observadas, as que correspondem aos Rfs 0,11 e 0,94-0,95 foram reveladas tanto com NaOH a 2% quanto com vapor de amônia, e as que correspondem aos Rfs 0,08 e 0,19 foram observadas somente sob luz ultravioleta.

As manchas observadas na revelação para substâncias fenólicas da fração ácida de botões florais de plantas em DL (tabela 17) devem pertencer a outra classe de compostos, pois, os fenóis foram complexados com PVP durante o processo de extração.

Com a finalidade de se conhecer os Rfs dos hormônios padrões AIA e ABA e assim poder associá-los melhor com o fenômeno em estudo, foi feita uma cromatografia de camada delgada de sílica gel com os padrões de AIA e ABA, utilizando-se como sistema de solventes benzeno:n-butanol:ácido acético (14:5:1 v/v/v).

Na tabela 18 são mostrados os Rfs correspondentes ao AIA e ao ABA quando revelados sob UV a 254nm, solução de Salkowski e anisaldeído modificado, verificando-se um Rf de 0,8 tanto para AIA quanto para ABA.

Tabela 17. Rfs correspondentes às manchas quando o extrato de botões florais de plantas em DL foi revelado com NaOH a 2%, com vapor de amônia e sob luz ultravioleta.

Mancha nº	Reveladores		
	NaOH 2%	vapor de amônia	UV
1	-	-	0,08
2	0,11	0,11	-
3	-	-	0,19
4	0,94	0,95	-

Tabela 18. Rfs correspondentes aos padrões de AIA e ABA quando cromatografados em sílica gel usando-se como sistema de solventes benzeno:n-butanol:ácido acético (14:5:1 v/v/v) e revelados em ultravioleta, com a solução de Salkowski e com anisaldeído modificado.

Substâncias	Reveladores			Rfs
	UV 254nm	Solução de Salkowski	Anisaldeído modificado	
AIA	escuro	alaranjado	marrom	0,8
ABA	escuro	amarelo-limão	verde-oliva	0,8

3.5.1.1. Análise de AIA e ABA por HPLC

Os extratos da fração ácida provenientes de folhas e de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de folhas e de botões florais de plantas em DL (18h) e de plantas em DC (8h) foram analisados por HPLC com o objetivo de se detectar AIA e ABA e estabelecer sua possível participação no controle do desenvolvimento do botão até antese floral nestas condições fotoperiódicas.

Na fig. 13 são mostrados os cromatogramas correspondentes a 10 μ L da mistura de padrões AIA e ABA (2:1) na concentração de 100 μ M. Observou-se que o pico de absorção de ABA no UV foi maior no comprimento de onda de 254nm do que em 280nm (fig. 13-A), pois, de acordo com MILBORROW (1974), a sua faixa de absorção máxima ocorre em torno de 262nm em condições ácidas. Enquanto que a absorção no UV para AIA foi maior em 280nm do que em 254nm (fig. 13-B), por causa da estrutura indólica do composto cujo espectro de absorção máxima em metanol está em torno de 282nm (HARBORNE, 1984). Em função disto, a análise dos extratos para ABA foi feita em 254nm e para AIA em 280nm.

Na tabela 19 são mostrados os dados das dosagens de AIA e ABA, referentes aos extratos da fração ácida em nmol/g de tecido fresco de folhas e de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de plantas sob DL (18h) e de plantas

sob DC (8h), obtidos comparando-se as áreas dos cromatogramas das amostras com as dos cromatogramas padrão.

Nas análises de AIA por HPLC verificou-se um aumento da concentração de AIA em folhas de plantas em DL e uma diminuição nas folhas de plantas em DC em relação às folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos; ao passo que, nos extratos de botões florais o conteúdo de AIA diminuiu a 1/7 em botões de plantas sob DL e a níveis não detectáveis em botões de plantas sob DC, em relação aos botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (tabela 19).

Nas análises de ABA feitas por HPLC, verificou-se que as quantidades de ABA permaneceram constantes nos extratos de folhas de plantas em DL e de plantas em DC em relação às folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos; entretanto, houve uma maior concentração de ABA em botões florais de plantas em DC em relação ao extrato de botões florais no início dos tratamentos fotoperiódicos (tabela 19).

A



B



Figura 13 Cromatogramas de 10 μ L de hormônios padrão AIA e ABA (2:1), obtidos em gradiente metanol:água acidificada com 0,5% de ácido acético. Fluxo 0,8mL.min⁻¹ (55min), coluna analítica Sephasil, C18, 5 μ m, 4x250mm Pharmacia, atenuação 32 e comprimento de onda 254nm em (A) e 280nm em (B) (AIA = ácido indol acético e ABA = ácido abscísico).

Tabela 19. Análise de AIA em 280nm e de ABA em 254nm por HPLC dos extratos de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (FIT), em dias longos (FDL) e dias curtos (FDC) e dos extratos de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (BIT), em dias longos (BDL) e em dias curtos (BDC).

Tratamento	nmol/g de tecido fresco	
	AIA	ABA
FIT	968,3	540,5
FDL	1385,7	416,9
FDC	730,5	559,1
BIT	5263,8	389,2
BDL	798,4	343,3
BDC	ND	2196,3

ND = não detectado.

3.5.1.2. Análise da ABA por imunoenensaio

Os extratos da fração ácida obtidos de folhas e de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de folhas e de botões florais de plantas em DL (18h) e de plantas em DC (8h) foram submetidos à separação cromatográfica por HPLC, coletados de acordo com o tempo de retenção do hormônio padrão ABA e dosados pelo ensaio imuno-enzimático de ELISA, visando a determinação do ABA livre e o estabelecimento da sua possível participação no controle do desenvolvimento floral nestas condições fotoperiódicas.

Na fig. 14 são mostradas a curva padrão em função da porcentagem de B/Bo e do logaritmo da concentração de ABA (fig. 14-A) e a mesma curva padrão linearizada usando-se a função logit da porcentagem de B/Bo (fig. 14-B), a qual foi usada na dosagem dos extratos.

Nas análises referentes a ABA por ELISA verificou-se um aumento significativo desta substância nos extratos de folhas de plantas em DL e de plantas em DC em relação ao extrato de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (tabela 20). Nos extratos de botões florais, observaram-se quantidades significativamente maiores de ABA nas plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos e nas plantas em DC em relação ao extrato de botões florais de plantas em DL (tabela 20).

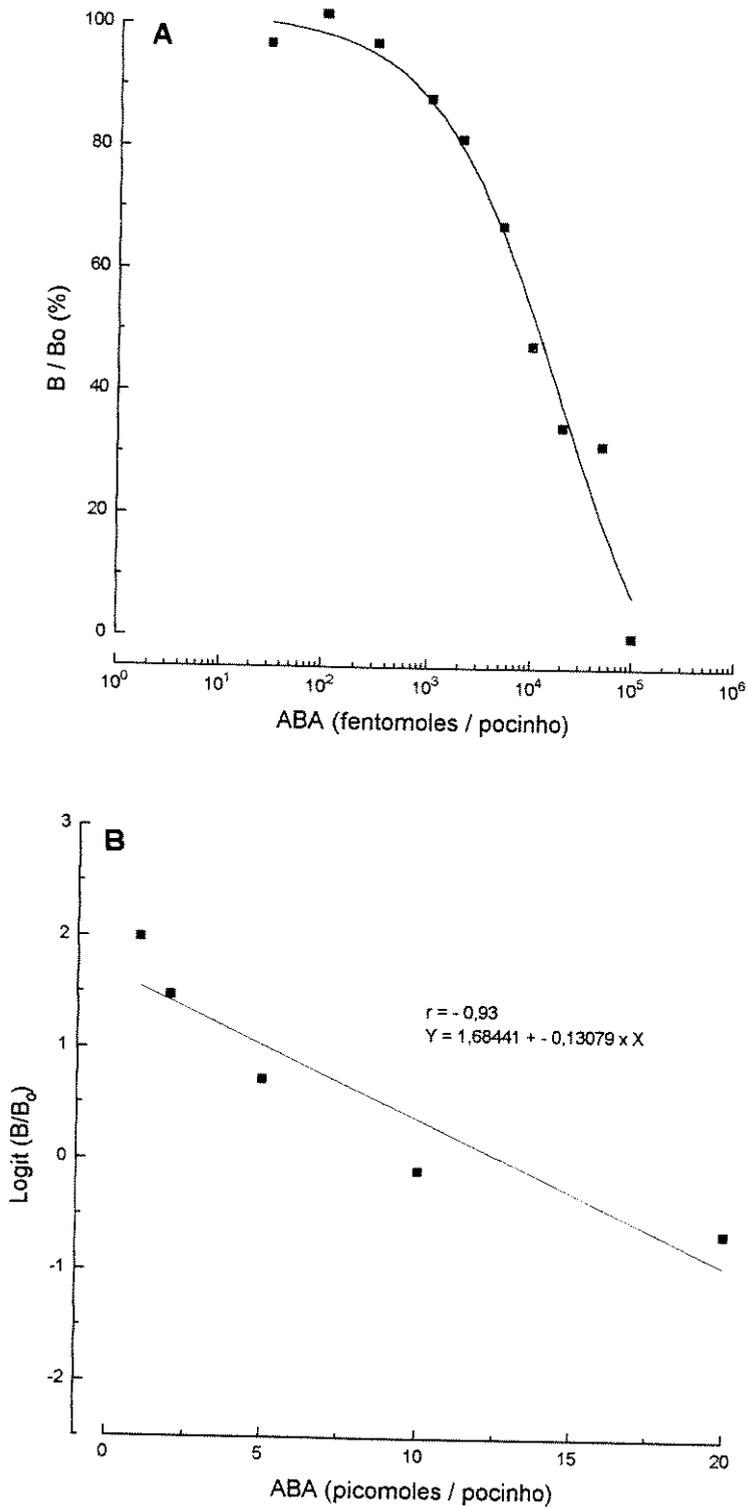


Figura 14. Curva padrão em função da porcentagem B/Bo e do logaritmo da concentração de ABA em fentomoles/pocinho (A) e dados transformados em uma relação linear usando-se a função logit de B/Bo (B).

Tabela 20. Densidade ótica média na dosagem de ABA obtida por ELISA em extratos (diluição 1:1) de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (FIT), em dias longos (FDL) e em dias curtos (FDC) e em extratos de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (BIT), em dias longos (BDL) e em dias curtos (BDC).

Tratamento	Densidade ótica	pmoles/g de tecido fresco
FIT	1,9813 ¹ a	220,1
FDL	1,6275 b	308,8
FDC	1,1545 c	447,6
BIT	0,7247 A	> 600
BDL	1,2262 B	423,2
BDC	0,6812 A	> 600

1 - Médias seguidas da mesma letra, minúsculas para os extratos de folhas e maiúsculas para os extratos de botões florais, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pelos dados obtidos por HPLC para AIA constatou-se que, na condição de DL, há uma concentração maior de AIA nas folhas e uma diminuição menos drástica nos botões florais em relação ao início dos tratamentos fotoperiódicos do que em botões florais de plantas na condição de DC (tabela 19); por outro lado, as maiores concentrações de ABA em extratos de folhas foram observadas em DC, tanto por HPLC (tabela 19) como por ELISA (tabela 20). Nos extratos de botões florais, as maiores concentrações de ABA foram verificadas em DC por HPLC (tabela 19) e no início dos tratamentos fotoperiódicos e sob DC por ELISA (tabela 20).

3.5.2. Atividade citocinínica

Foram analisadas folhas e botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, folhas e botões florais de plantas sob condições fotoperiódicas de DL (18h) e de DC (8h), com o objetivo de se verificar o envolvimento de citocininas no desenvolvimento do botão até antese floral.

Os resultados do bioteste de área cotiledonar de rabanete para as frações básicas de folhas e botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de folhas e botões florais de plantas em DL e de plantas em DC estão apresentados nas fig. 15, 16 e 17.

Não se detectou atividade citocinínica significativa nos extratos feitos a partir de 2g de massa fresca de botões florais

de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 15-A) e de botões florais de plantas sob DC (fig. 15-B).

Nos extratos provenientes de 3g de massa fresca de folhas de plantas no início dos tratamentos (fig. 16-A) e de folhas de plantas em DL (fig. 16-B) não se observou atividade citocinínica significativa, entretanto, no extrato de folhas de plantas em DC (fig. 16-C), verificou-se uma região com atividade citocinínica significativa compreendida na faixa entre os Rfs 0,4 e 1,0.

No extrato de 3g de massa fresca de folhas de plantas em DL também se observaram duas regiões de inibição significativa compreendidas na faixa entre os Rfs 0 e 0,2 e Rfs 0,3 e 1,0 (fig. 16-B).

Nos extratos feitos a partir de 3g de massa fresca de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 17-A) e de botões florais de plantas em DC (fig. 17-C) observaram-se três regiões com atividade citocinínica significativa, na faixa entre os Rfs 0 e 0,1, Rfs 0,2 e 0,3 e Rfs 0,4 e 0,6 no extrato de botões florais de plantas no início dos tratamentos (fig. 17-A) e na faixa entre os Rfs 0 e 0,2, Rfs 0,3 e 0,5 e Rfs 0,6 e 1,0 no extrato de botões florais de plantas em DC (fig. 17-C). Também foi detectada uma região com atividade citocinínica significativa, compreendida na faixa entre os Rfs 0,4 e 0,5 para o extrato de botões florais de plantas em DL (fig. 17-B).

No extrato de 3g de massa fresca de botões florais de plantas em DL foram observadas três regiões de inibição

significativa compreendidas na faixa entre os Rfs 0 e 0,1, Rfs 0,2 e 0,3 e Rfs 0,8 e 1,0 (fig. 17-B).

Não foi verificada atividade citocinínica significativa nos extratos de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 15-A) e de botões florais de plantas em DC (Fig. 15-B) obtidos partindo-se de 2g de massa fresca, entretanto, constatou-se atividade citocinínica significativa quando os extratos de botões florais de plantas nas mesmas condições (fig. 17-A,C) foram feitos partindo-se de 3g de massa fresca.

Não foi observada atividade citocinínica nos extratos de 3g de massa fresca de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (fig. 16-A) e de folhas de plantas em DL (fig. 16-B), porém, no extrato de folhas de plantas em DC houve atividade citocinínica significativa (fig. 16-C), ao passo que, nos extratos de 3g de massa fresca de botões florais registrou-se atividade citocinínica significativa nos três tratamentos efetuados (fig. 17), contudo, constatou-se somente um pico de atividade no extrato de botões florais de plantas sob DL (fig. 17-B).

Nos extratos obtidos de 3g de massa fresca tanto de folhas de plantas sob DL (fig. 16-B) quanto de botões florais de plantas sob DL (fig. 17-B) observaram-se regiões de inibição significativa, sendo esta inibição de maior intensidade no extrato de folhas de plantas sob DL.

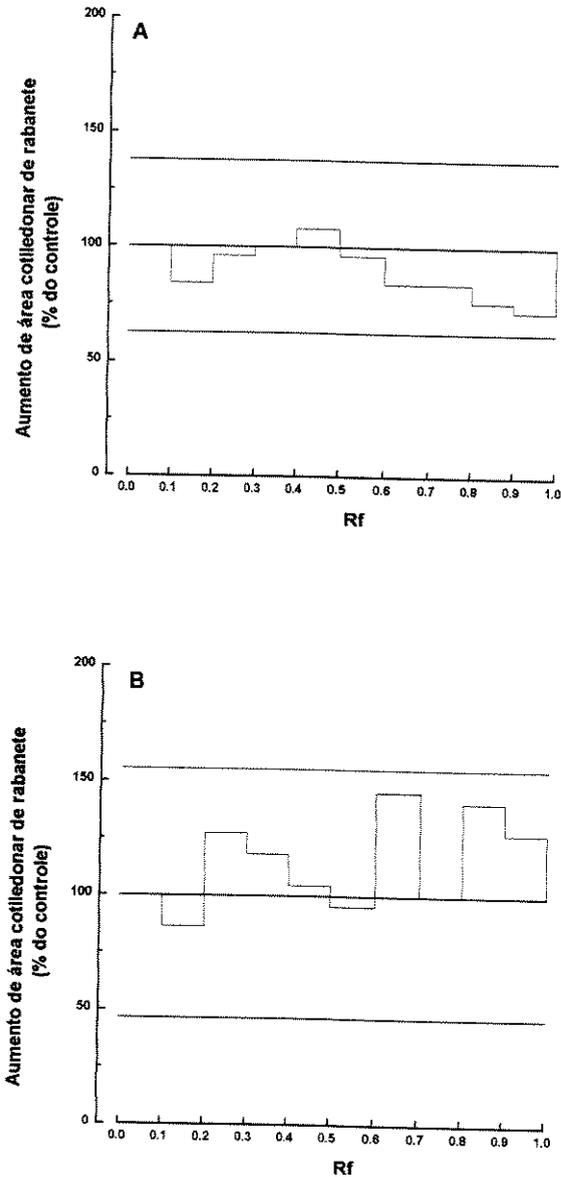


Figura 15 Atividade citocinínica detectada na fração básica, pelo bioensaio de aumento de área cotiledonar de rabanete, em extratos de 2g de massa fresca de botões florais de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (18h);

B = extrato de botões florais de plantas em DC (8h).

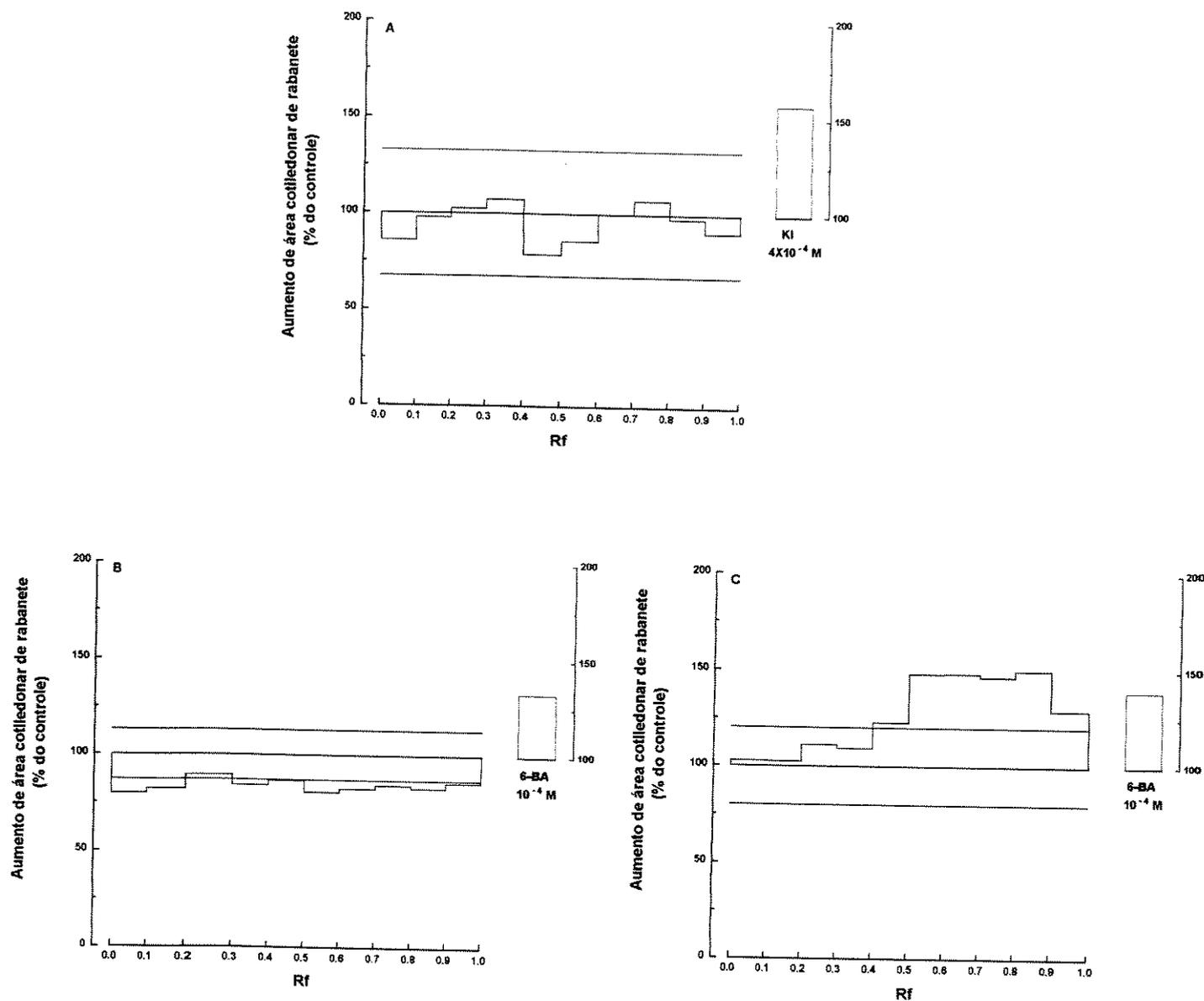


Figura 16. Atividade citocinínica detectada na fração básica, pelo bioensaio de aumento de área cotiledonar de rabanete, em extratos de 3g de massa fresca de folhas de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (18h);

B = extrato de folhas de plantas em DL (18h);

C = extrato de folhas de plantas em DC (8h).

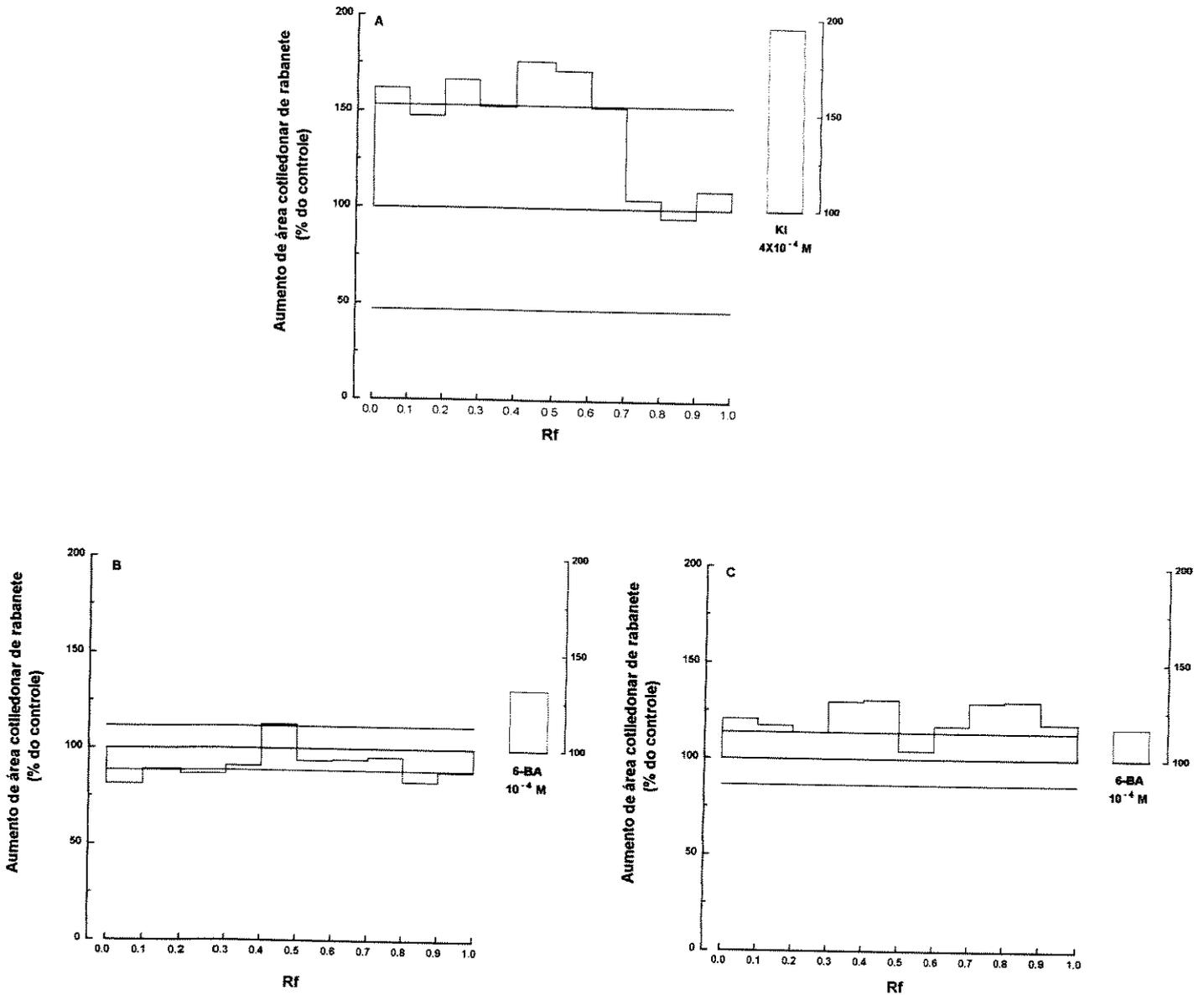


Figura 17. Atividade citocinínica detectada na fração básica, pelo bioensaio de aumento de área cotiledonar de rabanete, em extratos de 3g de massa fresca de botões florais de plantas de *S. x luteus*.

A = extrato de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (18h);

B = extrato de botões florais de plantas em DL (18h);

C = extrato de botões florais de plantas em DC (8h).

3.5.2.1. Análise de citocininas por HPLC

Os extratos da fração básica provenientes de folhas e de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de folhas e de botões florais de plantas em DL (18h) e de plantas em DC (8h), foram analisados por HPLC com o objetivo de se detectar Z, ZR, iP e iPA e estabelecer sua possível participação no desenvolvimento do botão floral nestas condições fotoperiódicas.

Na fig. 18 são mostrados os cromatogramas no comprimento de onda de 280nm (KOSHIMIZU & IWAMURA, 1986) correspondentes a 100 μ L da mistura de padrões Z, ZR, iP e iPA na concentração de 100 μ M. Observa-se que em função da fase móvel metanol:água ou metanol:água ácida (0,5% de ácido acético) mudam-se os tempos de retenção e a ordem de eluição dos padrões. Partindo-se destas observações, coletaram-se as frações correspondentes aos picos em função dos tempos de retenção do primeiro cromatograma (fig. 18-A), sendo a dosagem feita de acordo com o segundo cromatograma (fig. 18-B).

Na tabela 21 são mostrados os dados referentes às dosagens de citocininas feitas por HPLC nos extratos da fração básica em nmol/g de tecido fresco de folhas e de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de plantas sob DL e de plantas sob DC, obtidos comparando-se as áreas dos cromatogramas das amostras com as dos cromatogramas padrão.

As quantidades de iP se mantiveram constantes tanto em folhas quanto em botões florais, porém maiores em folhas do que em botões; e as quantidades de iPA diminuíram nos extratos de folhas e botões florais de plantas em DL e de plantas em DC em relação ao início dos tratamentos fotoperiódicos (tabela 21). Não se verificou a presença de Z em nenhum dos extratos analisados e ZR foi constatado apenas no extrato de folhas de plantas em DC (tabela 21).

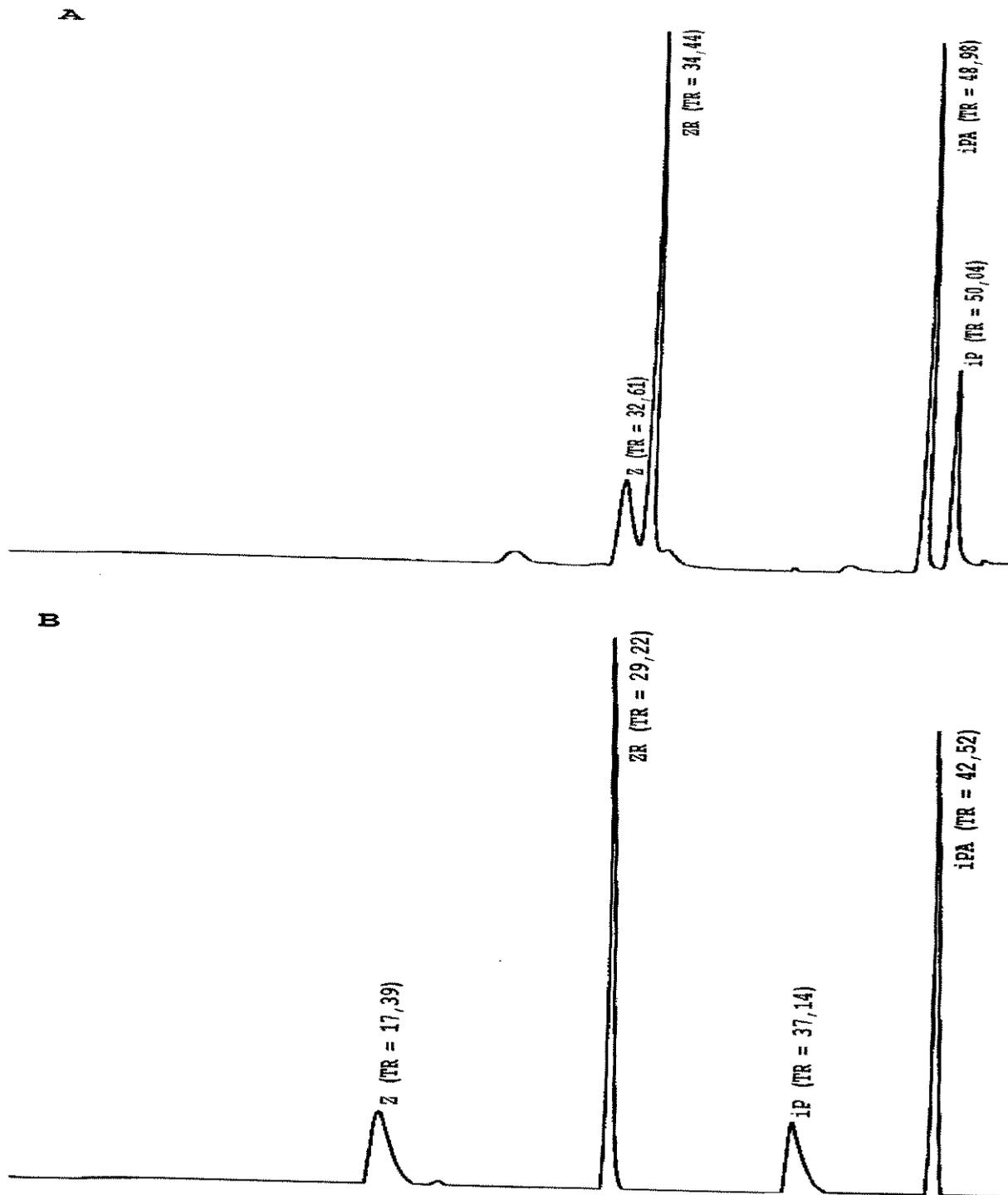


Figura 18. Cromatogramas de 100 μ L de hormônios padrões obtidos em gradiente metanol:água em (A) e metanol:água acidificada com 0,5% de ácido acético em (B). Fluxo 0,8mL.min⁻¹ (55min), coluna analítica Sephasil, C18, 5 μ m, 4x250mm Pharmacia, atenuação 64 e comprimento de onda 280nm. (Z = zeatina, ZR = zeatina ribosídeo, iP = isopentenil adenina e iPA = isopentenil adenosina).

Tabela 21. Análise de citocininas (Z, ZR, iP e iPA) em 280nm por HPLC dos extratos de folhas de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (FIT), em dias longos (FDL) e dias curtos (FDC) e dos extratos de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (BIT), em dias longos (BDL) e em dias curtos(BDC).

Tratamentos	nmol/g de tecido fresco			
	Z	ZR	iP	iPA
FIT	ND	ND	114,1	42,6
FDL	ND	ND	113,1	29,0
FDC	ND	0,2	145,4	4,1
BIT	ND	ND	44,7	7,2
BDL	ND	ND	49,2	1,7
BDC	ND	ND	40,5	4,8

ND = não detectado.

3.5.2.2. Análise de citocininas por imunoenensaio

Os extratos da fração básica, obtidos de folhas e de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos, de folhas e de botões florais de plantas em DL (18h) e de plantas em DC (8h) foram submetidos à separação cromatográfica por HPLC, coletados de acordo com o tempo de retenção dos hormônios padrão iP e iPA e dosados pelo ensaio imuno-enzimático de ELISA, visando o estabelecimento da sua possível participação no controle do desenvolvimento floral nestas condições fotoperiódicas.

Na fig. 19 são mostradas a curva padrão em função da porcentagem de B/Bo e do logaritmo da concentração de iPA (fig. 19-A) e a mesma curva padrão linearizada usando-se a função logit da porcentagem de B/Bo (fig. 19-B), a qual foi usada na dosagem dos extratos.

Nas análises referentes a citocininas feitas por ELISA (tabela 22) verificou-se uma diminuição significativa na quantidade de iP no extrato de folhas de plantas em DC em relação ao início dos tratamentos; porém, nos extratos de botões florais não houve diferença entre os extratos de plantas em DL e de plantas em DC em relação ao início dos tratamentos, apesar do extrato do início dos tratamentos fotoperiódicos estar fora da faixa de sensibilidade do ensaio. Com relação a iPA, observou-se um decréscimo significativo no extrato de botões florais de plantas em DL em relação ao extrato de plantas no início dos tratamentos. Nas folhas, não houve diferença nas quantidades de iPA entre as plantas mantidas em

DL e em DC em relação às plantas no início dos tratamentos, apesar de que no extrato de folhas de plantas em DC as quantidades de iPA foram tão pequenas que ficaram fora da faixa de sensibilidade do teste.

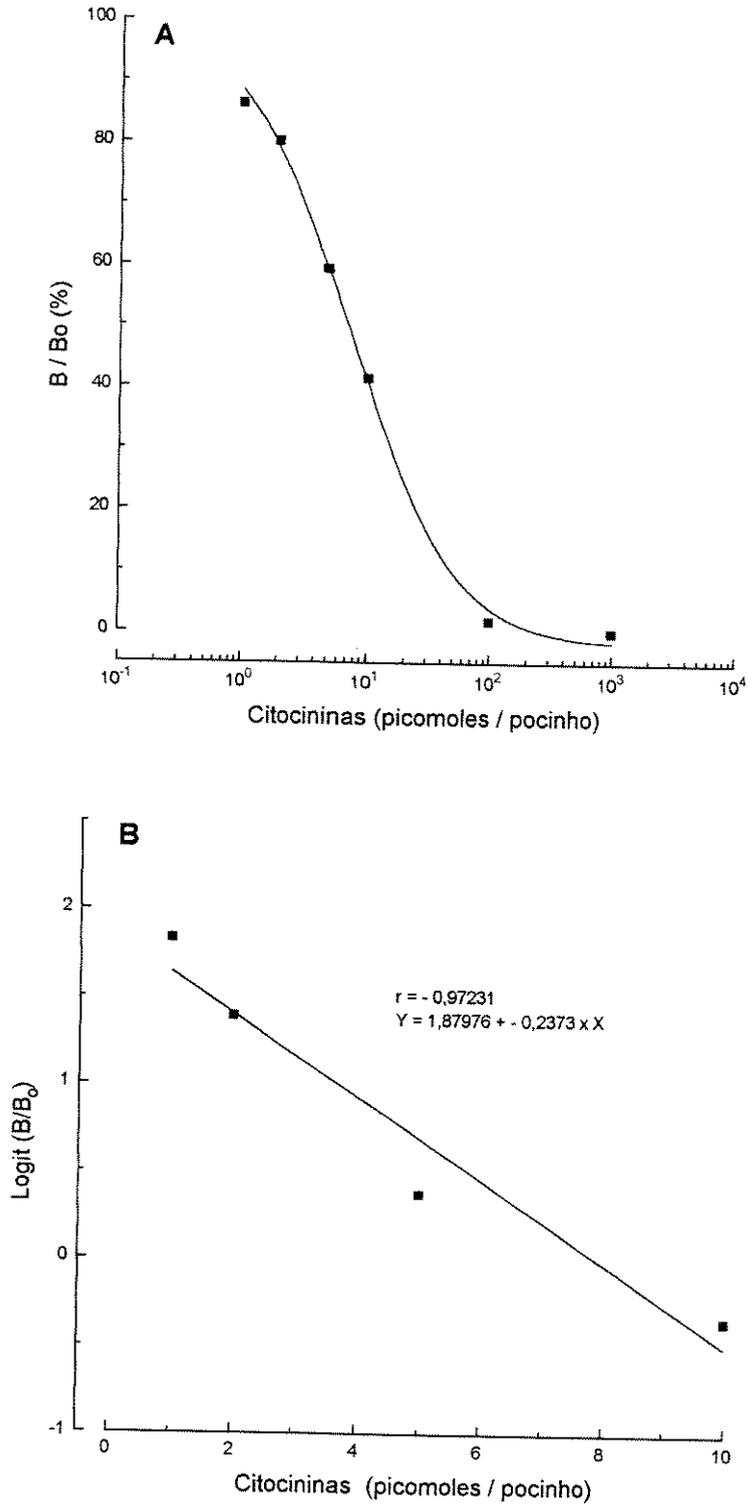


Figura 19. Curva padrão em função da porcentagem B/Bo e do logaritmo da concentração de iPA em picomoles/pocinho (A) e dados transformados em uma relação linear usando-se a função logit de B/Bo (B) .

Tabela 22. Densidade ótica média para iP e iPA obtida por ELISA em extratos de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (FIT), em dias longos (FDL) e em dias curtos (FDC) e em extratos de botões florais de plantas no início dos tratamentos fotoperiódicos (BIT), em dias longos (BDL) e em dias curtos (BDC).

Tratamento	Densidade ótica		pmoles/g de tecido fresco	
	iP	iPA	iP	iPA
FIT	0,5230 ¹ a	0,5058 ¹ a	77,6	57,8
FDL	0,5583 ab	0,5430 a	21,0	27,7
FDC	0,6403 b	0,5738 a	ND	ND
BIT	0,5968 A	0,5083 A	ND	56,4
BDL	0,5233 A	0,6405 B	77,6	ND
BDC	0,5610 A	0,5363 A	14,9	34,1

1 - Médias seguidas da mesma letra, minúsculas para os extratos de folhas e maiúsculas para os extratos de botões florais, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ND = não detectado.

4. DISCUSSÃO

Em plantas de DL com hábito em roseta, o alongamento caulinar está normalmente associado ao florescimento, entretanto, os efeitos do fotoperíodo sobre esses dois processos podem ser separados e provavelmente resultam de eventos metabólicos diferentes (METZGER & ZEEVAART 1980ab; BERNIER, 1988).

Nas três espécies estudadas nos ensaios preliminares observou-se que, de forma geral, DL promoveram alongamento caulinar e conseqüentemente indução floral e aumento no número de ramificações laterais e de folhas. Em DC verificou-se que as plantas de *S. chilensis* permaneceram em roseta e as plantas de *S. x luteus* tiveram indução e antese floral, enquanto que em *A. ericoides* havia plantas em roseta e plantas induzidas, pois mesmo com a maioria das plantas em roseta houve indução floral esporádica e antese ocasional. Também ficou evidente nas três espécies que DL são pré-requisito para o alongamento caulinar e que nas plantas crescidas sob DL e transferidas para DC, estas aceleraram a antese floral, havendo um ligeiro aumento no número de brotações basais em *S. x luteus* e em *S. chilensis*; no caso de *S. x luteus* e *A. ericoides*, houve um menor incremento no crescimento caulinar.

O alongamento caulinar pode ser função do número e do comprimento de entrenós formados, e ambos podem ser influenciados pelo comprimento do dia. A partir do momento em que o meristema sub-apical é sensibilizado, desencadeia-se um aumento marcante na

divisão celular que precede ou acompanha o alongamento caulinar (VINCE-PRUE, 1975). Não houve diferença quanto ao número de folhas das plantas de *S. x luteus* mantidas sob DC (8h) e sob DL (20h), enquanto que o comprimento do caule foi 2,3 vezes maior sob DL com relação aos DC. Em *S. chilensis* a altura do caule e o número de folhas foram, respectivamente, 16,3 e 2,2 vezes maiores sob DL em relação aos DC. Nas plantas de *A. ericoides* houve apenas uma pequena diferença quanto ao número de folhas entre os dois fotoperíodos e o comprimento do caule foi 5,9 vezes maior nas plantas em DL com relação às plantas em DC. Em *S. x luteus* e *A. ericoides* pode-se inferir que as diferenças encontradas no comprimento do caule foram devidas ao alongamento dos entrenós e não a um aumento no número de nós, porém, em *S. chilensis* a diferença no comprimento do caule pode ser atribuído, em parte, ao aumento no número de nós nas plantas sob DL.

As plantas de *S. chilensis* mantidas em DC (8h) permaneceram em roseta apresentando cerca de 5,4 vezes mais brotações basais do que as plantas em DL (20h). Em um dos primeiros trabalhos sobre a influência do fotoperíodo no padrão de ramificação, GARNER & ALLARD (1923) verificaram que plantas em roseta de *Oenothera biennis* L. cultivadas sob DC perderam a dominância apical, resultando no desenvolvimento de numerosas brotações basais, dando à planta uma forma de touceira.

SCHWABE (1986b) verificou que em *Solidago canadensis*, a planta em roseta predomina quando o comprimento do dia é curto

(8h); nas plantas mantidas em fotoperíodo de 14h ocorre florescimento e em 12h, uma situação intermediária entre as duas respostas, havendo plantas em roseta e plantas induzidas. Assim, o crescimento vegetativo é promovido por DL, ocorrendo o florescimento com o encurtamento dos dias, no final do verão-outono.

Analogamente, *Aster novi-belgii* e *Aster pilosus* respondem rapidamente às condições fotoperiódicas. Os DL induzem o alongamento do caule, o que é pré-requisito para a floração, embora a iniciação floral somente seja possível sob DC. Em *A. pilosus*, o alongamento caulinar pode ser induzido a qualquer momento sob condições de DL, enquanto que *A. novi-belgii* requer vernalização (KADMAN-ZAHAVI & YAHEL, 1986).

KADMAN-ZAHAVI & YAHEL (1986) também constataram que plantas jovens de *Aster pilosus* em roseta necessitam 40 DL (fotoperíodo acima de 11h e temperatura mínima de 17°C) para induzir alongamento caulinar em 100% das plantas, as quais floresceram 70 dias após a transferência para DC. As plantas que receberam complementação do período de luz durante 50 noites floresceram 16 dias mais tarde, porém, produziram maior número de ramificações florais. As plantas mantidas sob DC (10h) não mostraram alongamento caulinar.

A evidência de que DC aceleravam a antese floral em plantas de *S. x luteus* induzidas sob DL (20h) ficou fortalecida quando as plantas foram submetidas a tratamentos de diferente duração sob DC (8h), onde verificou-se que com 5, 10 e 15 DC havia um aumento

gradativo na porcentagem de plantas em antese e também um ligeiro aumento na porcentagem de plantas com botão floral em relação às plantas em DL. De forma semelhante, KADMAN-ZAHAVI & YAHEL (1986) constataram que em plantas de *Aster pilosus* mantidas sob DC (10h) durante 7, 14 e 21 dias, o período de 7 DC não induziu formação floral; o de 14 DC causou alguma iniciação floral, mas com subsequente desenvolvimento floral lento. Após 21 DC, os botões florais tornaram-se visíveis e as plantas transferidas neste estágio para DL, floresceram quase simultaneamente com relação às plantas mantidas em DC.

Nos ensaios sazonais de outono-inverno e verão-outono não houve diferença entre os fotoperíodos de 8h, 20h e NI quanto ao número de folhas, da mesma forma que no ensaio preliminar nas plantas em 8h e 20h, podendo-se concluir que a diferença encontrada no comprimento do caule entre as plantas em 8h, NI e 20h foi devida ao alongamento dos entrenós e não ao número de nós.

Como cada folha corresponde a um nó, conseqüentemente quando se observou um maior número de folhas ocorreu um maior número de nós. As diferenças observadas no comprimento do caule e no número de ramificações laterais e florais no ensaio de outono-inverno devem ter ocorrido em função do número de nós. Um maior número de folhas significa um maior número de nós e a possibilidade de maior comprimento do caule. O maior número de

nós também possibilita um maior número de ramificações laterais que poderão eventualmente florescer.

A tendência de ramificação observada tanto no verão-outono como no outono-inverno possivelmente se dá em função de redistribuição de fotoassimilados condicionada à indução floral. Nos tratamentos onde ocorreu maior porcentagem de indução floral (16h a 20h), houve partição equivalente de fotoassimilados entre o sistema radicular e o caule e suas ramificações. Nos tratamentos com menor porcentagem de indução floral (8h a 14h), houve direcionamento para o sistema radicular. O maior número de brotações basais nos fotoperíodos de 8h a 14h pode sugerir utilização de fotoassimilados nestas brotações.

Os efeitos fotomorfogênicos sobre o padrão de ramificação, foram semelhantes aos descritos por SCHWABE (1986a) para *Aster novi-belgii*, quando observou 5,2 brotações basais nas plantas mantidas no fotoperíodo de 8h (20°C) contra 2,7 brotações em 13h; enquanto que, o número de ramificações laterais foi de 1,1 em 8h e 3,9 em 13h. As brotações basais asseguram o caráter perene de *A. novi-belgii*

No híbrido aqui estudado, constatou-se a ocorrência da indução floral pelo alongamento caulinar e a porcentagem de plantas induzidas foi dependente do fotoperíodo e da temperatura. No ensaio de outono-inverno a porcentagem de plantas induzidas não passou de 20% em fotoperíodos abaixo de 14h e em NI. No ensaio de verão-outono ocorreu indução floral em 93,3% das

plantas sob fotoperíodo de 8h. Esta diferença de comportamento pode, possivelmente, ser explicada pelas diferenças de temperatura ocorridas nos dois períodos. No outono-inverno, as médias das temperaturas mínimas e máximas até 56 dias após o plantio foram de 21,3°C e de 30,7°C, diminuindo depois para 16,5°C e 24,8°C, respectivamente. No verão-outono, as médias das temperaturas mínimas e máximas até 126 dias após o plantio foram de 18,7°C e 28,9°C,. Estas observações indicam que a temperatura é um dos fatores envolvidos na promoção da indução floral em fotoperíodos curtos (8h a 14h). Nas plantas sob fotoperíodos longos (16h, 18h, 20h e LC), tanto no outono-inverno como no verão-outono, registraram-se porcentagens de indução floral superiores a 50%, portanto, prevalecendo o efeito do fotoperíodo induzindo a floração. Este comportamento sugere a existência de uma forte interação do fotoperíodo e da temperatura no controle da indução floral.

O alongamento caulinar em *Lythrum salicaria* é pontualmente controlado no fotoperíodo crítico de 13h, caracterizando esta espécie como uma PDL. A resposta em *Epilobium hirsutum* ao fotoperíodo é quantitativa. As plantas de ambas espécies mantidas sob 9h mostraram porte anão e no tratamento de NI *Lythrum* respondeu com uma completa mudança de desenvolvimento da forma de DC para a forma de DL, entretanto, não foram formados frutos nem sementes. Ao passo que, *Epilobium* permaneceu com o mesmo fenótipo apresentado em DC (SHAMSI, 1976); de forma semelhante ao ocorrido

nas plantas de *S. x luteus* mantidas em DC (8h a 14h) e em NI no outono-inverno.

O tratamento de vernalização não surtiu o efeito esperado, pois, nas plantas sob 8h provenientes de estacas vernalizadas não houve indução floral nas mesmas condições em que as plantas controle apresentaram 80% de indução e antese floral e sob DL (18h), a indução e a antese floral foram retardadas em 4 semanas nas plantas provenientes de estacas vernalizadas, em relação às plantas controle. À vista disso, não há indícios da necessidade de vernalização no controle da indução floral, sendo o efeito deste tratamento similar ao de "temperatura baixa", mantendo as plantas em roseta sob DC e retardando a indução floral sob DL.

Assim, em fotoperíodos curtos (8h a 14h), NI e em plantas mantidas sob 8h provenientes de estacas vernalizadas, prevaleceu o efeito da temperatura, mantendo as plantas em roseta em "temperaturas baixas" e havendo indução floral em "temperaturas altas", porém, com altura de caule inferior a 0,45m. Ao passo que, em fotoperíodos longos (16h, 18h, 20h e LC) prevaleceu o efeito de indução floral do fotoperíodo, havendo alongamento caulinar próximo a 0,90m mesmo em "temperaturas baixas" e em plantas mantidas em 18h provenientes de estacas vernalizadas, sendo 16h o fotoperíodo mais favorável para a indução floral. Logo, em plantas em "temperaturas altas" os DC apressam a indução e a antese floral, ocorrendo a floração em plantas menores. Em DL como os processos são mais

lentos o caule cresce e só muito mais tarde ocorre a formação de botões e a antese floral.

GARNER & ALLARD (1923) observaram em plantas de *Solidago juncea* Ait, mantidas sob DC (7,5h) no período de inverno, o desenvolvimento eventual de um caule floral curto e fraco, enquanto que, as demais plantas permaneceram em roseta até o final do experimento, período de aproximadamente 18 meses, porém, nas plantas que receberam extensão do fotoperíodo natural com iluminação até a meia noite, mesmo no inverno, o período de florescimento começou 120 dias após o plantio.

Em plantas de *Rudbeckia bicolor*, crescidas sob fotoperíodos acima de 12h, MURNEEK (1940) constatou alongamento caulinar simultâneo à indução floral. Em fotoperíodos menores que 12h, as plantas permaneceram em roseta, contudo, altas temperaturas (21 a 32°C), sob DC, induziram o florescimento sem alongamento caulinar marcante. Fato semelhante ocorreu no ensaio de verão-outono sob fotoperíodo de 8h, justificando a alta porcentagem de indução floral observada.

Helipterum roseum é uma PDL quantitativa que mostra inibição do florescimento sob condições de 25°C constantes, fotoperíodo de 12h e irradiância de 250W.m⁻², entretanto, sob as mesmas condições e temperatura constante de 20°C não há inibição do florescimento. O ápice vegetativo inibido pela temperatura alta teria perdido o sincronismo da divisão celular fundamental para a transição floral (SHARMAN et al., 1990)

O efeito da vernalização pode variar mesmo entre ecotipos da mesma espécie, pois, KARLSSON *et al.* (1993), estudando ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, uma PDL quantitativa que tem o florescimento acelerado pelos DL, verificaram que tanto sob DC (8h) quanto em DL (20h) dois ecotipos não floresceram após 110 dias e dois ecotipos exigem vernalização para o florescimento.

Quando há "bolting" no verão-outono nas plantas de *S. x luteus* mantidas em fotoperíodos de 8h e NI, há um acúmulo de massa seca na raiz semelhante ao da parte aérea. Em fotoperíodos onde foi observada uma menor intensidade da resposta indutiva (8h, 10h, 12h, 14h e NI) e "temperatura baixa" durante o outono-inverno, ocorreu direcionamento preferencial de assimilados para a raiz e a maioria das plantas permaneceu em roseta. Nas condições indutoras (16h, 18h e 20h), que independem da temperatura, verificou-se direcionamento de fotoassimilados para a parte aérea. Nas plantas sob LC, porém, houve direcionamento significativo de massa seca para a raiz, fazendo com que o efeito deste extremo fotoperiódico se identifique com o efeito do grupo dos fotoperíodos curtos (8h, 10h, 12h e 14h).

KIGELL & KOLLER (1970) observaram que o acúmulo de massa seca em *Oryzopsis miliacea* não foi afetado pelo fotoperíodo, mas a distribuição de fotossintetizados favoreceu a raiz no fotoperíodo de 8h e a parte aérea no fotoperíodo de 16h.

Em *Epilobium hirsutum* o padrão de distribuição de massa seca para as folhas, caule e raiz foi similar entre os

tratamentos de DC (9h) e NI, enquanto que, em *Lythrum salicaria* o tratamento de NI causou direcionamento de massa seca para o caule às expensas das folhas (SHAMSI, 1976).

MOZAFAR et al. (1993), trabalhando com fotoperíodos de 6h, 12h e 18h, constataram que plantas de *Zea mays* L., crescidas em 6h de luz e temperatura de 15°C na zona de raízes, tinham um sistema radicular mais desenvolvido que a parte aérea.

Em *Vigna subterranea* a partição de assimilados favoreceu a produção de folhas e caule sob 14h e 16h, enquanto que, em fotoperíodos iguais ou menores que 13h, os assimilados foram primeiramente usados para o crescimento da vagem e da semente (LINNEMANN, 1993).

Aumento na produção de massa seca é freqüentemente encontrado em plantas crescidas em DL, mesmo que o tratamento de luz suplementar forneça pouca energia fotossinteticamente ativa. Isso deve ocorrer em função do aumento em área foliar e do conseqüente aumento na produção fotossintética. O incremento em área foliar resulta do direcionamento da massa seca para a formação de folhas finas e mais expandidas, aumentando o potencial fotossintético total da planta (VINCE-PRUE, 1975). No presente trabalho também se registrou aumento na área foliar por planta nos fotoperíodos mais longos.

Com relação à antese floral, no experimento com 4 fotoperíodos ficou evidente que a planta responde às condições fotoperiódicas de DC (8h, 10h e 12h) acelerando e de DL (20h)

retardando a antese. No experimento com um número maior de fotoperíodos observou-se a mesma tendência, constatando-se ainda que os fotoperíodos entre 12h e 16h (14h) estariam numa situação de transição entre DC e DL, caracterizando assim, uma resposta quantitativa com o aumento do fotoperíodo.

Como em *Phaseolus vulgaris* P47 (ZEHNI et al., 1970), em *Xanthium* (VAN STADEN & WAREING, 1972; HENSON & WAREING, 1974) e em *Bougainvillea* "San Diego Red" (VAN STADEN & DIMALLA, 1980) a exposição de plantas de *S. x luteus* a ciclos de DC (8h, 10h e 12h) acelerou o desenvolvimento floral.

Como a indução floral ocorreu sob todos os fotoperíodos estudados, verificando-se, no entanto, diferenças quantitativas entre os diferentes fotoperíodos, o híbrido em estudo ficou caracterizado como uma planta de DL quantitativa com fotoperíodo mais favorável para indução floral em torno de 16h, pois, este foi o fotoperíodo em que o processo foi mais rápido e mais intenso. Contudo, a antese floral foi antecipada em fotoperíodos curtos (8h, 10h e 12h) refletindo também uma resposta quantitativa no desenvolvimento floral. Assim, *S. x luteus* requer condições fotoperiódicas semelhantes às das espécies envolvidas no híbrido, sem necessidade de vernalização para a indução floral sob DL e com antese floral mais rápida sob DC.

Aster também é uma planta de DL/DC para floração (SCHWABE, 1986a; KADMAN-ZAHAVI & YAHEL, 1986; WALLERSTEIN et al., 1992). Sob DL ocorre o alongamento das brotações e o aparecimento das ramificações e, sob DC, o florescimento. Para WALLERSTEIN et al.

(1992), pelo menos uma primeira ordem de ramificação é pré-requisito para que haja iniciação floral.

Embora a indução floral em *S. x luteus* seja afetada pela interação fotoperíodo-temperatura é bem provável que substâncias reguladoras de crescimento também estejam envolvidas, no entanto, foi de maior interesse o estudo do envolvimento destas substâncias no desenvolvimento floral.

Tratamentos com giberelinas promovem o florescimento em muitas plantas que precisam de frio e em plantas de DL em roseta VINCE-PRUE (1975). O exame das giberelinas endógenas em *Agrostemma githago* e em espinafre, plantas em roseta de DL, mostraram que o tratamento com DL leva a um aumento no conteúdo de giberelinas em *A. githago* (JONES & ZEEVAART, 1980) e a um aumento em GA₂₀ e o correspondente decréscimo em GA₁₉ em espinafre (METZGER & ZEEVAART, 1980a), entretanto, se as giberelinas influenciam somente o alongamento caulinar ou também o florescimento ainda não foi determinado.

Para MENHENETT (1979), as giberelinas endógenas teriam um papel dominante na taxa de desenvolvimento do botão floral de crisântemo, podendo ser necessárias para o desenvolvimento normal e rápido dos botões florais, atuando provavelmente no direcionamento de assimilados, pois, JEFFCOAT & COCKSHULL (1972) associaram a concentração endógena de giberelinas com a taxa de crescimento relativo do botão floral de crisântemo, mostrando que a atividade destas substâncias atinge o máximo

nos estádios iniciais de desenvolvimento da flor, quando seriam drenos mais eficientes de assimilados.

A teoria do direcionamento de assimilados em função de giberelinas ou auxinas tem respaldo nos trabalhos de JEFFCOAT & HARRIS (1972) em cravos. Foram observados níveis maiores de ^{14}C nos tecidos florais do que em outras partes da planta e como o GA_3 e o AIA, aplicados no lugar da flor, foram eficientes aumentando a proporção dos assimilados marcados que se movimentaram em sentido ascendente partindo da folha fonte, ficou consistente a hipótese de que em plantas intactas o direcionamento de assimilados é regulado por substâncias endógenas reguladoras do crescimento presentes na flor. Porém, o AIA se mostrou mais eficiente do que o GA_3 e como o efeito do GA_3 não foi aditivo ao do AIA, tornou-se evidente que as duas substâncias atuariam pelo mesmo sistema.

Em *S. x luteus*, quando o tratamento de GA_3 10^{-3}M teve efeito acelerando a velocidade média de antese floral também provocou uma maior porcentagem de dano floral; na concentração de 10^{-4}M não se observou efeito promotor da velocidade de antese nem dano floral, questionando seu papel fisiológico. Também não se observou efeito aditivo de GA_3 10^{-4}M quanto à velocidade média de antese floral nos tratamentos de GA_3 10^{-4}M mais 6-BA $4 \times 10^{-4}\text{M}$ e de GA_3 10^{-4}M mais KI $4 \times 10^{-4}\text{M}$.

A aplicação de giberelinas em botões florais de *Aquilegia*, onde houve quebra de dormência pela aplicação de citocininas, promoveu um crescimento ocasional. Presumivelmente

estes botões teriam um nível subótimo de giberelinas (KHAN, 1975).

Não foi detectada atividade giberelínica na fração ácida dos extratos de folhas e botões florais de plantas de *S. x luteus* em nenhum dos tratamentos estudados.

No bioensaio para detectar atividade giberelínica foi encontrada atividade inibidora do crescimento do hipocótilo de alface nos extratos de folhas de plantas sob DL e nos de botões florais de plantas sob DL e DC. Este inibidor não deve ser de natureza fenólica, visto que no processo de extração é usado PVP para complexar e eliminar os compostos fenólicos (ANDERSEN & SOWERS, 1968). Por outro lado, a presença de fenóis não foi revelada em UV nos Rfs em torno de 0,7 a 1,0, região de inibição. Os reveladores NaOH 2% e vapor de amônia, não sendo específicos para compostos fenólicos podem ter revelado qualquer substância de natureza ácida.

Os resultados do bioensaio de germinação de sementes de alface sugerem que o inibidor presente na fração ácida seja ABA. Houve inibição significativa na faixa entre os Rfs 0,8 e 0,9 no extrato de folhas de plantas em DL, próximo ao valor médio de Rf de 0,75 para o ABA padrão (RUDNICKI & ANTOSZEWSKI, 1968 *apud* KEFELI, 1978), quando também cromatografado em papel e com isopropanol:amônia:água (10:1:1 v/v/v). Quando os padrões AIA e ABA foram cromatografados com benzeno:n-butanol:ácido acético (14:5:1 v/v/v), o mesmo sistema de solventes usado nos cromatogramas dos extratos no bioensaio de alongamento do

hipocótilo de alface, apresentaram Rf de 0,8, indicando que o inibidor presente na fração ácida poderia ser ABA, AIA ou ambos.

O florescimento e o desenvolvimento de flores de crisântemo cv. pink Champagne sob DL não indutivos foi eficientemente promovido pela aplicação de BA mais GA₅, entretanto, as aplicações simultâneas de AIA reduziram o desenvolvimento das inflorescências, porém sob DC, o AIA não teve efeito significativo sobre o índice de florescimento, a porcentagem de plantas floridas ou o número de flores produzidas (PHARIS, 1972).

De forma geral tem sido encontrado que as auxinas inibem o florescimento em PDC (JACOBS, 1985), não tendo efeito, ou ainda, promovendo o florescimento em PDL. Os dados refletem um ajustamento geral do nível de auxina ao comprimento do dia em lugar de mudanças devidas à indução floral (KREKULE et al., 1985). O estudo dos níveis endógenos de AIA usando GC-MS não foram correlacionados com o gradiente floral *in vitro* presente nos tecidos de caule de fumo (NOMA et al., 1984), entretanto, em fumo cv. Maryland Mammoth (PDC) e em *Nicotiana silvestris* (PDL) a diminuição nos níveis de AIA após 10 dias indutivos, está de acordo com a hipótese aceita de que um nível baixo de AIA é pré-requisito para a indução floral em PDC. Após 20 dias indutivos, as plantas estão parcialmente induzidas e níveis mais altos de auxina seriam essenciais para estimular o crescimento dos botões florais. O desenvolvimento subsequente de botões florais e

órgãos, provavelmente requer reduções nos níveis de AIA (LOZHNIKOVA et al., 1990).

Embora existam discrepâncias na literatura com respeito ao sitio primário da ação da auxina podendo ser nos cotilédones e folhas de plantas de *Chenopodium rubrum* (PDC) e de *C. murale* (PDL) (KREKULE et al., 1985) ou no meristema apical em *C. rubrum* (KREKULE & PRIVRATSKY, 1974; SEIDLOVÁ & KHATOON, 1976), há evidências de que o AIA teria sua função não somente na indução floral nos cotilédones mas também nos eventos posteriores de evocação floral e diferenciação no ápice em *Pharbitis nil* (KULIKOWSKA-GULEWSKA et al., 1995).

WARDELL & SKOOG (1969) relataram que pelo menos 1mM de AIA é necessário para o desenvolvimento de flores normais e sementes maduras em cultura *in vitro* de tecidos de caule destacados de plantas floridas de fumo.

Em rosas "Baccara" o conteúdo de auxina alcançou um pico tanto no ramo floral quanto no ramo não floral até 0,16m de comprimento. Em ramos de comprimento maior do que 0,16m, o conteúdo de auxina permaneceu constante no ramo floral, porém, caiu consideravelmente nos ramos não florais (ZIESLIN & HALEVY, 1976).

De acordo com SEIDLOVÁ & KHATOON (1976) em *Chenopodium rubrum* o AIA teria uma ação dupla, inibindo ou estimulando o florescimento em diferentes estádios do ápice, independentemente da indução fotoperiódica. A auxina aplicada antes da ramificação

do meristema inibe o início da diferenciação floral, porém, aplicada em estádios mais tardios, inibe os primórdios dos botões axilares já formados permitindo uma rápida e completa diferenciação da flor terminal.

Uma maior concentração de AIA em folhas e botões florais de plantas de *S. x luteus* em DL poderia estar relacionada com uma menor velocidade de antese floral em DL, ao passo que, a diminuição de AIA nas folhas e sua ausência nos botões florais em plantas sob DC poderia estar relacionada à maior velocidade de antese floral em DC. As maiores concentrações de ABA em relação ao início dos tratamentos fotoperiódicos foram em folhas e botões florais em plantas na condição de DC, assim, no balanço de AIA e ABA, estes estariam em concentrações opostas, principalmente no botão floral em DC, onde se observou a maior quantidade de ABA e a ausência de AIA.

Bioensaios de extratos foliares de várias espécies lenhosas indicaram que as folhas continham maiores níveis do "inibidor β " sob DC do que sob DL. As explicações possíveis para as discrepâncias nas observações discutidas por WAREING & SAUNDERS (1971) foram: os DC poderiam reduzir o nível de promotores de crescimento (por exemplo giberelinas) que antagonizariam ABA no bioensaio, porque em cromatografia em papel com isopropanol:amônia:água como fase móvel não se obtém uma boa separação entre o ABA e várias giberelinas; os DC aumentariam o transporte de ABA das folhas para o ápice; a

falta de controle de estresse de água nas plantas experimentais levaria a variações significativamente grandes nos níveis de ABA, que mascarariam a influência das condições fotoperiódicas sobre os níveis do hormônio.

ZEHNI & MORGAN (1976) sustentam a hipótese de que em fotoperíodos longos são formadas mais substâncias inibidoras do crescimento nas folhas, incluindo ABA, que se acumulariam nos botões florais das plantas de *Phaseolus* P47, da mesma forma que se acumulam substâncias promotoras, incluindo giberelinas, que promovem o alongamento do caule e do pecíolo. BENTLEY *et al.* (1975) encontraram na mesma variedade, as maiores concentrações de ABA em botões florais inibidos sob DL (18h), que também tinham quantidades consideráveis de ABA conjugado em relação aos botões florais das plantas sob DC (8h), onde o desenvolvimento floral foi normal. Em folhas maduras de *Ricinus communis* o ABA é sintetizado e metabolizado, e o próprio ABA e seus metabólitos são transportados via floema para os ápices da parte aérea (drenos), onde o ABA, não sendo acumulado em grande quantidade é metabolizado rapidamente via ácido faséico para ácido dihidrofaséico, o qual, se acumula nos drenos metabólicos como produto final da via metabólica (ZEEVAART, 1977). As folhas maduras ou senescentes de *Lupinus luteus* também acumulam altos níveis de ABA conjugado (WEILER, 1980).

Para PILATE *et al.* (1990) em *Pseudotsuga menziesii* os níveis de ABA foram duas vezes maiores nos ramos axilares tratados com GA_{4/7} mais AIA (tratamento que aumentou a iniciação

floral) do que nos ramos controle. As variações nos níveis de ABA-glicosil-ester (ABAGE) sugerem que este metabólito poderia regular os níveis de ABA livre. Segundo BRENNER (1987), em soja o ABA se move das folhas para os legumes em enchimento. O ABA também seria transportado das folhas para as raízes via floema e reciclado via fluxo xilemático para outros drenos metabólicos

MALDINEY *et al.* (1986) dosaram no mesmo extrato AIA, ABA e ZR por ELISA após separação por HPLC, partindo de apenas 100mg de massa fresca de amostras de tomate e também observaram uma situação oposta entre AIA e ABA. Foi verificado que na base do hipocótilo havia 175ng.g^{-1} de massa fresca de AIA e 4ng.g^{-1} de massa fresca de ABA, ao passo que no ápice foram 67 e 443ng.g^{-1} de massa fresca de AIA e de ABA, respectivamente.

Durante o período de diferenciação do botão floral em laranja "navel" os conteúdos endógenos de Z e de ABA nas folhas das árvores enxertadas em "trifoliata", que florescem precocemente, foram significativamente maiores do que os das enxertadas em "hongju". O conteúdo endógeno de GA_3 foi significativamente menor, indicando que Z e ABA promovem e GA_3 inibe a diferenciação do botão floral (ZHU & ZHANG, 1991)

Em *Boronia megastigma* a diferenciação do botão floral foi associada com incrementos de GA_1 e GA_3 , ABA, Z e DHZ (ROBERTS *et al.*, 1991).

Os níveis de ABA, AIA e giberelinas (GA_1 , GA_{19} e GA_{20}) nos exsudatos floemáticos coletados de cotilédones de *Pharbitis nil* foram maiores nas plantas sob condições indutivas, sugerindo

que estas substâncias estariam envolvidas na regulação do florescimento desta espécie e que haveria um transporte floemático significativo de substâncias reguladoras de crescimento (WIJAYANTI et al., 1995).

Os níveis de ABA aumentaram drasticamente na seiva xilemática em árvores de *Litchi chinensis* Sonn cv. Heh yeh trinta dias antes da formação do botão floral; simultaneamente, o conteúdo total de citocininas também aumentou alcançando seu máximo durante a formação do botão floral e antese total. O conteúdo xilemático de giberelinas se manteve sempre baixo nos estádios estudados (CHEN, 1990).

Numa tentativa de definição do padrão hormonal em botões terminais e flores em *Brassica napus* variedade oleífera, o florescimento foi correlacionado a aumentos temporários e sucessivos de ABA nos botões terminais e de citocininas (Z e ZR) durante o florescimento (BOUILLE et al., 1989).

A respeito da aplicação de citocininas em *S. x luteus* tanto 6-BA $4 \times 10^{-4}M$ quanto KI $4 \times 10^{-4}M$ diferiram das plantas controle sob DL com relação à velocidade média de antese floral, porém, no tratamento com 6-BA observou-se uma maior porcentagem de dano floral do que no tratamento com KI. Quando se aumentou a frequência de aplicação de KI $4 \times 10^{-4}M$ para 4 dias não houve diferença na velocidade média de antese floral entre este tratamento e o controle de plantas em DC, nem malformação floral, indicando que provavelmente as citocininas naturais

poderiam estar envolvidas no processo de aumento da velocidade de antese floral nas plantas sob DC.

Na formação de botões florais em explantes de pedicelos de fumo *in vitro* provavelmente a Z endógena está menos envolvida, pois, na concentração ótima no meio, induziu apenas um botão floral por explante, enquanto que, 6-BA e DHZ na concentração ótima de 1mmol.m^{-3} , formaram aproximadamente 12 botões florais por explante (VAN DER KRIEKEN *et al.*, 1991)

BENTLEY *et al.* (1975) verificaram que aplicações de KI ou 6-BA em plantas de feijão cultivadas em DL estimularam o desenvolvimento dos botões florais, os quais, teriam sido severamente inibidos pela ação do ABA endógeno.

Em *Sinapis alba* uma das mudança essenciais durante a evocação floral é uma onda mitótica no meristema apical. Foi mostrado que uma única aplicação de 6-BA ou Z na concentração de 5 e $20\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, estimulariam a atividade mitótica de forma semelhante à observada no meristema das plantas induzidas, desta forma as citocininas fariam parte do estímulo floral nesta espécie (BERNIER *et al.*, 1977)

Os maiores drenos para citocininas são as partes meristemáticas ou com crescimento potencial, que também são centros primários de produção de citocininas, estas também causam mobilização de metabólitos para a área tratada, criando novas relações fonte e dreno e mantendo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas (MOORE, 1979).

GERHÄUSER & BOPP (1990a) estudaram a degradação metabólica de [^{14}C]KI e [^{14}C]6-BA no musgo *Funaria hygrometrica* e encontraram que o principal produto do catabolismo da KI foi a adenina e do catabolismo do 6-BA foi a adenosina, além de que, o 6-BA, embora em níveis inferiores, permaneceu constante por mais tempo do que a KI, indicando que a via metabólica de ambos os hormônios é diferente. Isto, em função de que a cinetina oxidase quebra a cadeia lateral da KI, surgindo a adenina como produto primário, enquanto que, o 6-BA não é substrato desta enzima, tendo efeito residual mais prolongado GERHÄUSER & BOPP (1990b). A adenina e seus derivados são freqüentemente reportados como o maior grupo de metabólitos de Z, ZR, iP e iPA em plantas superiores e seu metabolismo pode ser atribuído à citocinina oxidase (LETHAM & PALNI, 1983). Desta forma, em *S. x luteus* provavelmente o metabolismo de 6-BA seja diferente do de KI, de maneira similar a *Funaria*. O 6-BA permanecendo por mais tempo no tecido, além de eventualmente acelerar a antese floral pode ter também ocasionado o aborto das estruturas florais, ao passo que, a KI sendo mais rapidamente metabolizada, acelera a antese floral, respondendo ao aumento na freqüência de aplicação, sem dano floral.

A atividade citocinínica detectada nos extratos provenientes tanto de folhas de plantas sob DC como de botões florais de plantas no início dos tratamentos, sob DL e DC e a resposta das plantas acelerando a antese floral com a aplicação de KI foram as evidências de que citocininas endógenas estariam

envolvidas no processo. Entre as quatro citocininas analisadas (Z, ZR, iP e iPA) somente o iP e iPA foram detectadas, podendo outras bases livres, ribosídeos ou ribotídeos estarem envolvidas, pois, os O-glicosídeos e N-glicosídeos são provavelmente formas inativas ou de armazenamento, enquanto que as bases livres, ribosídeos e nucleotídeos são formas prontamente interconvertíveis e estão provavelmente intimamente associadas com a ação citocinínica (LETHAM & PALNI, 1983). Segundo MOORE (1979) as reações metabólicas descritas para as citocininas envolvem glicosilação, tiometilação, clivagem da cadeia lateral e quebra do anel purínico, contudo o iPA é uma das citocininas mais ativas.

Não se pode correlacionar a atividade citocinínica dos bioensaios com cada uma ou o conjunto das citocininas analisadas, visto que, não necessariamente as citocininas ativas no bioensaio corresponderiam às dosadas por HPLC e ELISA. Pois, segundo LETHAM & PALNI (1983) foram identificadas em plantas 28 citocininas naturais na forma livre, que variam desde as quase inativas a às altamente ativas. As citocininas dosadas foram as de fácil acesso comercial.

Para a dosagem analítica das bases citocinínicas (Z, iP) e seus ribosídeos (ZR, iPA) por HPLC, se faz necessária uma adequada separação prévia dos padrões. Esta separação também é fundamental no ensaio imunoenzimático, em função da diferente porcentagem de reação cruzada entre os ribosídeos e as bases livres correspondentes.

Uma adequada separação de citocininas do tipo Z (Z e ZR) e do tipo iP (iP e iPA) por HPLC foi obtida por ANDERSEN & KEMP (1979) usando-se como fase móvel MeOH:água, uma coluna μ bondapack C18 e fluxo de $0,3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Nestas condições a ZR foi eluída antes da Z, de forma inversa ao obtido no presente trabalho, entretanto, iPA eluiu antes do que iP, da mesma forma que em nossa pesquisa.

O fato das citocininas do tipo Z eluírem juntas (tempo de retenção (TR) entre 32,5 e 35,0min) e posteriormente as citocininas do tipo iP, relativamente apolares, também eluírem juntas (TR entre 48,5 e 50,5min) facilita a coleta manual destas frações para posterior análise.

A ordem de eluição das citocininas na coluna Sephasil C18 sugere que estas não estariam sendo eluídas exclusivamente pelo mecanismo de fase reversa, pois, mesmo com a mistura binária MeOH:água a Z elui primeiro que a forma ribosídica (ZR), em princípio mais polar; porém, nas citocininas do tipo iP que eluíram no final do gradiente, com maior porcentagem de MeOH na fase móvel, o iPA eluiu primeiro do que a base correspondente (iP). HOLLAND *et al.* (1978), trabalhando com extratos de folhas de feijão, obtiveram boa separação de citocininas, conseguindo eluir primeiro a forma ribosídica tanto de Z como de iP, usando como fase móvel MeOH:água a pH próximo de 5, coluna hichrosorb RP-8 (10mm) e fluxo de $1,3-1,4\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Quando os padrões foram eluídos com MeOH:água ácida (0,5% de ácido acético) obteve-se uma separação eficiente tanto das citocininas do tipo Z quanto das do tipo iP, ao contrário do preconizado por HORGAN & KRAMERS (1979), tornando evidente o efeito do pH em ionizar as bases e seus correspondentes ribosídeos.

Pelas análises por HPLC constatou-se que as quantidades de iP foram semelhantes entre os extratos de folhas e entre os extratos de botões florais, embora maiores em folhas do que em botões florais nos três tratamentos fotoperiódicos. Nas dosagens por ELISA, verificou-se uma diminuição significativa de iP nas folhas das plantas sob DC em relação às plantas no início dos tratamentos, enquanto que nos extratos de botões florais as quantidades de iP se equivaleram nos três tratamentos.

Embora não se tenha constatado diferença significativa entre os extratos de folhas de plantas nas dosagens feitas por ELISA para iPA, observou-se uma tendência decrescente entre o extrato de folhas de plantas no início dos tratamentos, o extrato de folhas de plantas sob DL e o de plantas em DC. Esta tendência foi verificada nas análises por HPLC. Nos extratos de botões florais, constatou-se uma diminuição significativa de iPA no extrato de botões florais de plantas em DL em relação ao extrato de botões florais de plantas no início dos tratamentos e ao de plantas sob DC, também de forma semelhante ao observado nas dosagens por HPLC.

SOTTA *et al.* (1987) dosaram citocininas do tipo Z e do tipo iP por ELISA em extratos metanólicos de folhas de fumo e constataram que a reprodutibilidade do método, assim como, as variações inter e intra ensaio não passaram de 5%, contudo, a purificação dos extratos por HPLC e o uso de vidraria silanizada foram pré-requisitos para uma determinação acurada dos níveis destes hormônios. Somente iP e iPA foram significativamente detectados nos extratos de folhas de fumo.

Apesar de não ter resultados das citocininas do tipo Z por ELISA, foi observado pelas análises por HPLC que as citocininas do tipo iP foram mais abundantes do que as citocininas do tipo Z, tanto em folhas como em botões florais. Em extratos de plantas floridas geralmente Z e ZR são as citocininas predominantes (KOSHIMIZU & IWAMURA, 1986). Interconversões entre as citocininas, como transhidrolização das citocininas do tipo iP a citocininas do tipo Z, que são comuns em plantas superiores (MACGAW *et al.*, 1984), poderiam ocorrer durante o desenvolvimento do botão floral em *S. x luteus*.

As interconversões entre as bases livres e os ribosídeos exigiriam que as análises fossem simultâneas ou que os extratos fossem tratados enzimaticamente para manter as proporções de cada uma das citocininas entre uma análise e outra. Como as análises não foram simultâneas, os extratos podem ter sofrido metabolização, justificando-se assim, as diferenças nas análises por HPLC e ELISA.

VAN STADEN & WAREING (1972) verificaram uma diminuição acentuada nos níveis de citocininas na fração butanólica de extratos de folhas de *Xanthium strumarium* quando as plantas foram transferidas para DL ou submetidas ao tratamento de NI, sugerindo que o decréscimo em citocininas seja um efeito fotoperiódico verdadeiro. Também observaram que as citocininas presentes nas partes de crescimento ativo estão na forma de bases e/ou ribosídeos e nas folhas maduras havia altas concentrações de ribotídeos.

Em *Bougainvillea* "San Diego Red" VAN STADEN & DIMALLA (1980) verificaram uma diminuição nos níveis de citocininas ocasionada pelos ciclos fotoindutivos, sendo que, o pico de atividade que co-eluiu com Z, teve a sua atividade marcadamente diminuída sob DC.

Comparando as inflorescências de plantas de tomate cv. King Plus cultivadas sob condições favoráveis (DL (20h) e 20W.m⁻²) e adversas (DC (8h) e 12W.m⁻²), o nível de citocininas diminuiu drasticamente nas inflorescências das plantas sob condições adversas, sugerindo que as citocininas desempenham um papel importante no desenvolvimento de estádios reprodutivos iniciais desta espécie (LEONARD & KINET, 1982).

Em análises de Z, ZR, iP e iPA feitas por ELISA em *Chenopodium rubrum* (PDC) e em *C. murale* (PDL) MACHÁCKOVÁ & KREKULE (1991) verificaram que o nível de citocininas é

controlado pelo fotoperíodo, diminuindo no período de escuro e aumentando no período de luz. O padrão de flutuação estaria acoplado com o regime que induz o florescimento na PDC e com o regime que mantém as plantas vegetativas na PDL, o que tornaria difícil estabelecer correlações entre as flutuações nos níveis de citocininas e a indução fotoperiódica do florescimento.

LUKASZEWSKA *et al.* (1994) dosaram citocininas do tipo Z e do tipo iP por ELISA em pétalas de rosa e contrariamente ao resultado do bioensaio, os dados de ELISA mostraram que as citocininas do tipo iP foram mais abundantes do que as do tipo Z.

Durante o processo de diferenciação floral em *Pseudotsuga menziesii* as mudanças em iP parecem ser independentes do florescimento, enquanto que, a quantidade de iP foi sistematicamente relacionada com a iniciação de flores femininas. A aplicação de iP também foi associada com o florescimento de flores femininas (IMBAULT *et al.*, 1988).

Também em *Pseudotsuga menziesii* as citocininas do tipo Z estavam em níveis baixos, tendo sido detectados níveis altos de iP nos ramos das árvores floridas. A suspensão na atividade radicular, que interrompe a hidroxilação do iP a citocininas do tipo Z, resultou no acúmulo de iP no botão terminal (PILATE *et al.*, 1990).

VAN STADEN *et al.* (1990) verificaram que o [³H]iP foi rapidamente transportado para todas as partes da flor em cravos de corte e que se transformou, entre outros compostos, em Z e

DHZ, indicando o grau de hidroxilação, o que contribuiria para a eficiência do iP.

Uma diminuição significativa de iP em folhas de plantas de *S. x luteus* sob DC pode estar sendo estimulada por uma taxa de transporte mais ativa na forma de iPA para o botão floral, o que por sua vez estimularia uma maior velocidade de antese floral sob DC.

Pelos dados apresentados e discutidos no presente trabalho fica muito bem caracterizado o comportamento fotoperiódico de *S. x luteus* tanto para a indução quanto para o desenvolvimento floral. Também é evidente a participação de substâncias reguladoras do crescimento no desenvolvimento do botão floral do híbrido, principalmente de citocininas; pois foi obtida resposta na aplicação do hormônio e a sua participação no processo foi detectada por bioensaios e análises por HPLC e ELISA. O inibidor do desenvolvimento floral presente na fração ácida, que poderia ser AIA, ABA ou ambos, indica que a velocidade de antese floral sob condições fotoperiódicas opostas estaria controlada pela interação citocininas-inibidor. Contudo, os dados referentes às determinações dos níveis endógenos de hormônios não são conclusivos, podendo servir de base para estudos futuros.

5. LITERATURA CITADA

- ANDERSEN, R. A., SOWERS, J. A., 1968. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry*, 7:293-301.
- ANDERSEN, R. A., KEMP, T. R., 1979. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of several plant cell division factors (cytokinins) and their *cis* and *trans* isomers. *J. Chromatogr.*, 172:509-12.
- BENTLEY, B., MORGAN, C. B., MORGAN, D. G., SAAD, F. A., 1975. Plant growth substances and effects of photoperiod on flower bud development in *Phaseolus vulgaris*. *Nature*, 256:121-22.
- BERNIER, G., 1988. The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39: 175-219.
- BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA, C., PETITJEAN, A., LEJEUNE, P., 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*, 5:1147-55.
- BERNIER, G., KINET, J. M., JACQARD, A., HAVELANGE, A., BODSON, M., 1977. Cytokinin as a possible component of the floral stimulus in *Sinapis alba*. *Plant Physiol.*, 60:282-85.
- BOUILLE, P. de, SOTTA, B., MIGINIAC, E., MERRIEN, A., 1989. Hormones and inflorescence development in oilseed rape. *Plant Physiol. Biochem.*, 27:443-50.
- BRENNER, M. L., 1987. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. IN: *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development* (P. J. Davies, ed.), Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, pp. 474-514.
- BROUILLET, L., SEMPLE, J. C., 1981. A propos du status taxonomique de *Solidago ptarmicoides*. *Can. J. Bot.*, 59:17-21.
- CALDAS, L. S., BRAVO, C., PICCOLO, H., FARIA, C. R. S. M., 1992. Measurement of leaf area with a hand-scanner linked to a microcomputer. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 4:17-20.

- CHAILAKHYAN, M. KH., 1985. Hormonal regulation of reproductive development in higher plants. *Biol. Plant.*, 27:292-302.
- CHEN, W. S., 1990. Endogenous growth substances in xylem and shoot tip diffusate of lychee in relation to flowering. *Hortscience*, 25:314-15.
- CLARK, B., ENGVALL, E., 1985. Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspects. IN: *Enzyme - Immunoassay* (E. T. Maggio ed.), CRC Press, pp. 167-79.
- DATHE, W., SEMBDNER, G., 1980. Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. II. gibberellins and plant growth inhibitors in floral organs during their development. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 175:599-610.
- DAVIES, P. J., 1987. Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 681p.
- DURLEY, R. C., KANNANGARA, T., SIMPSON, G. M., 1978. Analysis of abscisins and 3-indolylacetic acid in leaves of *Sorghum bicolor* by high performance liquid chromatography. *Can. J. Bot.*, 56:157-61.
- FELIPPE, G. M., VÁLIO, I. F. M., PEREIRA, M. F. A., SHARIF, R. R., VIEIRA, S. R., 1985. Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal. 2a. ed., Editora da Unicamp, Campinas, 66p.
- FRANKLAND, B., WAREING, P. F., 1960. Effect of gibberellic acid on hipocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature*, 185:255-56.
- GARNER, W. W., ALLARD, H. A., 1920. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.*, 18:553-606.
- GARNER, W. W., ALLARD, H. A., 1923. Further studies in photoperiodism, the response of plants to relative length of day and night. *J. Agric. Res.*, 23:871-920.
- GELEIN, C., 1990. *Cut flowers*. Verenigde Bloemenveilingen Aalsmer, Amsterdam, pp. 32-35, 188-189.

- GERHÄUSER , D., BOPP, M., 1990a. Cytokinin oxidases in mosses. 1. metabolism of kinetin and benzyladenine *in vivo*. *J. Plant Physiol.*, 135:680-85.
- GERHÄUSER , D., BOPP, M., 1990b. Cytokinin oxidases in mosses. 2. metabolism of kinetin and benzyladenine *in vitro*. *J. Plant Physiol.*, 135:714-18.
- GONZÁLES BENAVENTE-GARCIA, A., 1992. *Solidaster*, uma planta com evidente interés ornamental. *Flor cultivo e comercio*, Almeria, 5:31-4.
- GRAU, J., 1977. *Astereae* - systematic review. IN: *The Biology and Chemistry of the Compositae* (V. H. Heywood, J. B. Harborne and B. L. Turner, eds.), Academic Press, London, pp. 539-65.
- HARBORNE, J. B., 1984. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall, London, 288p.
- HENSON, I. E., WAREING, P. F., 1974. Cytokinins in *Xanthium strumarium*: a rapid response to short day treatment *Physiol. Plant.*, 32:185-7.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I., 1938. The water-culture method for growing plants withuot soil. *University of California Agricultural Experimental Station Circular*, Berkeley, 39p. (Circular 347).
- HOLLAND, J. A., MCKERRELL, E. H., FUELL, K. J., BURROWS, W. J., 1978. Separation of cytokinins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 166:545-53.
- HORGAN, R., KRAMERS, M. S., 1979. High-performance liquid chromatography of cytokinins. *J. Chromatogr.*, 173:263-70.
- IMBAULT, N., TARDIEU, I., JOSEPH, C., ZAERR, J. B., BONNET-MASIMBERT, M., 1988. Possible role of isopentenyladenine and isopentenyladenosine in flowering of *Pseudotsuga menziesii*: Endogenous variations and exogenous applications. *Plant Physiol. Biochem.*, 26:289-96.

- JACOBS, W. P., 1985. The role of auxin in inductive phenomena. *Biol. Plant.*, 27:303-09.
- JEFFCOAT, B., COCKSHULL, K. E., 1972. Changes in the levels of endogenous growth regulators during development of the flowers of *Chrysanthemum morifolium*. *J. Exp. Bot.*, 23:722-32.
- JEFFCOAT, B., HARRIS, G. P., 1972. Hormonal regulation of the distribution of ¹⁴C-labelled assimilates in the flowering shoot of carnation. *Ann. Bot.*, 36:353-61.
- JONES, M. G., ZEEVAART, J. A. D., 1980. Gibberellins and photoperiodic control of stem elongation in the log-day plant *Agrostemma githago* L. *Planta*, 149:269-73.
- KADMAN-ZAHAVI, A., YAHEL, H., 1986. *Aster pilosus*. IN: *Handbook of Flowering* (A. H. Halevy, ed.), Vol. 5, CRC Press, Boca Raton, pp. 42-46.
- KARLSSON, B. H., SILLS, G. R., NIENHUIS, J., 1993. Effects of photoperiod and vernalization on the number of leaves at flowering in 32 *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes. *Amer. J. Bot.*, 80:646-48.
- KEFELI, V. I., 1978. *Natural Plant Growth Inhibitors and Phytohormones*. Dr W. Junk b.v. Publishers, The Hague, 277p.
- KHAN, A. A., 1975. Primary, preventive and permissive roles of hormones in plant systems. *Bot. Rev.*, 41:391-420.
- KIGEL, J., KOLLER, D., 1970. Analysis of the control of development in *Oryzopsis miliacea* by the light environment. *J. Exp. Bot.*, 21:1003-16.
- KINET, J. M., SACHS, R. M., 1984. Light and flower development. IN: *Light and the Flowering Process* (D. Vince-Prue, B. Thomas and K. E. Cockshull, eds.), Academic Press, London, pp. 211-225.
- KINET, J. M., SACHS, R. M., BERNIER, G., 1985. *The Physiology of Flowering. The Development of Flowers*. Vol. 3, CRC Press, Boca Raton, 274 p.

- KOSHIMIZU, K., IWAMURA, H., 1986. Cytokinins. IN: Chemistry of Plant Hormones (N. Takahashi, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 153-99.
- KREKULE, J., PRÍVRATSKÝ, J., 1974. The shoot apex as the site of an inhibitory effect of applied auxin on photoperiodic induction of flowering in the short-day plant *Chenopodium rubrum* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 71:345-48.
- KREKULE, J., PAVLOVÁ, L., SOUCKOVÁ, D., MACHÁCKOVÁ, I., 1985. Auxin in flowering of short-day and long-day *Chenopodium* species. *Biol. Plant.*, 27:310-17.
- KULIKOWSKA-GULEWSKA, H., CYMERSKI, M., CZAPLEWSKA, J., KOPCEWICZ, J., 1995. IAA in the control of photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil* Chois. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 64:45-50.
- LABOURIAU, L. G., 1983. A germinação das Sementes. Secretaria-geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, 172p.
- LEONARD, M., KINET, J. M., 1982. Endogenous cytokinin and gibberellin levels in relation to inflorescence development in tomato. *Ann. Bot.*, 50:127-30.
- LETHAM, D. S., 1971. Regulators of cell division in plant tissues XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. *Physiol. Plant.*, 25:391-96.
- LETHAM, D. S., PALNI, L. M. S., 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34:163-97.
- LINNEMANN, A. R., 1993. Phenological development in Bombara ground-nut (*Vigna subterranea*) at constant exposure to photoperiods of 10 to 16h. *Ann. Bot.*, 71:445-52.
- LOZHNIKOVA, V. N., MACHÁCKOVÁ, I., EDER, J., DUDKO, N., KREKULE, J., CHAĪLAKHYAN, M. KH., 1990. Changes in free IAA level in the leaves of short-and long-day tobacco during flowering and the effect of applied IAA on the transition to flowering. *Biol. Plant.*, 32:339-45.

- LUKASZEWSKA, A. J., BIANCO, J., BARTHE, P., LE PAGE-DEGIVRY, M. T., 1994. Endogenous cytokinins in rose petals and the effect of exogenously applied cytokinins on flower senescence. *Plant Growth Regul.*, 14:119-26.
- MACHÁCKOVÁ, I., KREKULE, J., 1991. Cytokinins in photoperiodic flower induction in *Chenopodium* species. *Flowering Newslett.*, 12:15-17.
- MALDINEY, R., LEROUX, B., SABBAGH, I., SOTTA, B., SOSSOUNTZOV, L., MIGINIAC, E., 1986. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *J. Immunol. methods*, 90:151-58.
- MCGAW, B. A., SCOTT, I. M., HORGAN, R., 1984. Cytokinin biosynthesis and metabolism. IN: *The Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones* (A. Crozier and J. R. Hillman, eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 105-33.
- MENHENETT, R., 1979. Effects of growth retardants, gibberellic acid and indol-3-ylacetic acid on stem extension and flower development in the pot *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), *Ann. Bot.*, 43:305-18.
- MERCK, 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E. Merck, Darmstadt, 118p.
- METZGER, J. D., 1987. Hormones and reproductive development. IN: *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development* (P. J. Davies, ed.), Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, pp. 431-71.
- METZGER, J. D., ZEEVAART, J. A. D., 1980a. Comparison of the levels of six endogenous gibberellins in roots and shoots of spinach in relation to photoperiod. *Plant Physiol.*, 66:679-83.
- METZGER, J. D., ZEEVAART, J. A. D., 1980b. Effect of photoperiod on the levels of endogenous gibberellins in spinach as measured by combined gas chromatography-selected ion current monitoring. *Plant Physiol.*, 66:844-46.

- MILBORROW, B. V., 1974. The chemistry and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:259-307.
- MOORE, T. C., 1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag, New York, 274p.
- MOZAFAR, A., SCHREIBER, P., OERTLI, J. J., 1993. Photoperiod and root-zone temperature: interacting effects on growth and mineral nutrients of maize. *Plant Soil*, 153:71-78.
- MURNEEK, A. E., 1940. Length of the day and temperature effects in *Rudbeckia*. *Bot. Gaz.*, 102:269-79
- NOMA, M., KOIKE, N., SANO, M., KAWASHIMA, N., 1984. endogenous indole-3-acetic acid in the stem of tobacco in relation to flower neofomation as measured by mass spectroscopic assay. *Plant Physiol.*, 75:257-60.
- PHARIS, R. P., 1972. Flowering of *Chrysanthemum* under non-inductive long days by gibberellins and N⁶-benzyladenine. *Planta*, 105:205-12.
- PILATE, G., SOTTA, B., MALDINEY, R., BONNET-MASIMBERT, M., MIGINIAC, E., 1990. Endogenous hormones in Douglas fir trees induced to flower by gibberellin A-4/7 treatment. *Plant Physiol. Biochem.*, 28:359-366.
- ROBERTS, E. H., SUMMERFIELD, R. J., 1987. Measurement and prediction of flowering in annual crops. IN: *Manipulation of Flowering* (J. G. Atherton, ed.), Butterworths, 434p.
- ROBERTS, N. J., MENARY, R. C., HOFMAN, P. J., 1991. Plant growth substances in *Boronia megastigma* Nees. during flowering. *J. Hort. Sci.*, 66:327-34.
- SCHWABE, W. W., 1986a. *Aster novi-belgii*. IN: *Handbook of Flowering* (A. H. Halevy, ed.), Vol. 5, CRC Press, Boca Raton, pp. 29-41.
- SCHWABE, W. W., 1986b. *Solidago*. IN: *Handbook of Flowering* (A. H. Halevy, ed.), Vol. 5, CRC Press, Boca Raton, pp. 338-40.

- SEIDLOVÁ, F., KHATOON, S., 1976. Effects of indol-3yl-acetic-acid on floral induction and apical differentiation in *Chenopodium rubrum* L. *Ann. Bot.*, 40:37-42.
- SHAMSI, S. R. A., 1976. Effect of a light-break on the growth and development of *Epilobium hirsutum* and *Lythrum salicaria* in short photoperiods. *Ann. Bot.*, 40:153-62.
- SHARMAN, K. V., SEDGLEY, M., ASPINALL, D., 1990. Disruption by temperature of floral evocation and cell-cycling in the shoot apical meristem of *Helipterum roseum* (Asteracea). *Aust. J. Plant Physiol.*, 17:629-40.
- SKOOG, F., MILLER, C. O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. IN: Biological Action of Growth Substances. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Cambridge University Press, 11:118-31.
- SOTTA, B., PILATE, G., PELESE, F., SABBAGH, I., BONNET, M., MALDINEY, R., 1987. An avidin-biotin solid phase ELISA for femtomole isopentenyladenine and isopentenyladenosine measurements in HPLC purified plant extracts. *Plant. Physiol.*, 84:571-73.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood city, 565p.
- THOMAS, B., 1993. The role of phytochrome and other photoreceptors in the control of flowering in long-day plants. *Flowering Newslett.*, 16:6-10.
- VAN DER KRIEKEN, W. M., VAN ELDIK, G., NIJTMANS, L., CROES, A. F., WULLENS, G. J., 1991. Endogenous cytokinins in flower bud forming explants of tobacco. *J. Exp. Bot.*, 42:77-80.
- VAN STADEN, J., DIMALLA, G. G., 1980. Endogenous cytokinins in *Bougainvillea* 'San Diego Red'. III Effect of photoperiod and gibberellic acid on flowering and cytokinin levels. *Bot. Gaz.*, 141:248-51.
- VAN STADEN, J., UPFOLD, S. J., BAYLEY, A. D., DREWES, F. E. 1990., Cytokinins in cut carnation flowers. IX. Transport and metabolism of isopentenyladenine and the effects of its

- derivatives on flower longevity. *Plant Growth Regul.*, 9:255-61.
- VAN STADEN, J., WAREING, P. F., 1972. The effect of photoperiod on level of endogenous cytokinins in *Xanthium strumarium*. *Physiol. Plant.*, 27:331-37.
- VINCE-PRUE, D., 1975. *Photoperiodism in Plants*. McGraw Hill, London, 444p.
- VONK, C. R., 1978. Formation of cytokinin nucleotides in a detached inflorescence stalk and the occurrence of nucleotides in phloem exudate from attached *Yucca* plants. *Physiol. Plant.*, 44:161-66.
- WALLERSTEIN, I., KADMAN-ZAHAVI, A., YAHEL, H., NISSIM, A., STAV, R., MICHAL, S., 1992. Control of growth and flowering in two *Aster* cultivars as influenced by cutting type, temperature and day length. *Sci. hortic.*, 50:209-18.
- WARDELL, W. L. SKOOG, F., 1969. Flower formation in excised tobacco stem; I. Methodology and effects of plant hormones. *Plant Physiol.*, 44:1402-06.
- WAREING, P. F., SAUNDERS, P. F., 1971. Hormones and dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22:261-288.
- WEBB, D. P., WAREING, P. F., 1972. Seed dormancy in *Acer*: endogenous germinating inhibitors and dormancy in *Acer pseudoplatanus* L. *Planta*. 104:115-25.
- WEILER, E. W., 1980. Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta*, 148:262-72.
- WEILER, E., W., JOURDAN, P, S., CONRAD, W., 1981. Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta*, 153:561-71.
- WERNER, P. A., BRADBURY, I. K., GROSS, R. S., 1980. The biology of canadian weeds. 45. *Solidago canadensis* L. *Can. J. Plant. Sci.*, 60:1393-1409.

- WIJAYANTI, L., KOBAYASHI, M., FUJIOKA, S., YOSHIZAWA, K., SAKURAI, A., 1995. Identification and quantification of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellins in phloem exudates of *Pharbitis nil*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59:1533-35.
- WOOD, T., 1955. A reagent for detection of chloride and certain purines and pyrimidines on paper chromatograms. *Nature*, 176:175-76.
- ZEEVAART, J. A. D., 1977. Sites of abscisic acid synthesis and metabolism in *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.*, 59:788-91.
- ZEHNI, M. S., MORGAN, D. G., 1976. A comparative study of the effects of photoperiod on flower bud development and stem elongation in three varieties of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.*, 40:17-22.
- ZEHNI, M. S., SAAD, F. S., MORGAN, D. G., 1970. Photoperiod and flower bud development in *Phaseolus vulgaris*. *Nature*, 227:628-29.
- ZHU, L., ZHANG, W., 1991. Physiological and biochemical studies on the rootstock effects on early bearing of grafted citrus cultivars. *Acta Horti. Sin.*, 18: 296-302.
- ZIESLIN, N., HALEVY, A. H., 1976. Flower bud atrophy in Baccara roses. IV. The activity of various growth substances in leaves of flowering and non-flowering shoots. *Physiol. Plant.*, 37:317-25.