

NEIDE MARIA CORDEIRO LUCAS

EFEITO DO PULVINO BASAL NO ENRAIZAMENTO DE FOLHAS
PRIMÁRIAS DE *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título
de Doutor em Biologia Vegetal.

ORIENTADOR: Dr. IVANY FERRAZ MARQUES VÁLIO

CAMPINAS

1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À meus pais, pela devoção,
compreensão e carinho,

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

Ao Dr. Ivany Ferraz Marques Válio, pela sábia orientação, assim como a sua compreensão e amizade durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Gil Martins Felipe, pelo apoio, incentivo e sugestões.

Ao Engenheiro Agrônomo José Carlos Seraphin, pela colaboração na análise estatística dos resultados.

À Universidade Federal do Espírito Santo e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela concessão de afastamento e do suporte financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas e Desenvolvimento Científico, juntamente com o Conselho Britânico, que através do convênio ABRAÇOS, forneceram auxílio financeiro que permitiu a elaboração de parte desta pesquisa.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, bem como aos colegas do Departamento de Biologia da UFES, pelo apoio, estímulo e amizade. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

À professora Neyse Cordeiro Lucas, pelo cuidado na datilografia deste trabalho, realizada nos escritórios da CONSTENAV - Consultoria, Serviços Técnicos e Navais Ltda., a quem estendo meus agradecimentos.

I N D I C E

I - INTRODUÇÃO	1
II - DADOS BIBLIOGRÁFICOS	5
III - MATERIAL E MÉTODOS	
1. Material botânico	17
2. Cultivo das plantas	17
3. Análise de crescimento das folhas	17
4. Análise anatômica	18
5. Coleta de material	19
6. Testes de enraizamento	19
6.1. Verificação do enraizamento	21
6.2. Idade da folha	21
6.3. Tecido do pulvino	23
7. Translocação de fotossintatos	25
8. Difusado do pulvino	27
9. Transpiração	28
10. Lâmina foliar	28
10.1. Fotossintatos	28
10.1.1. Redução da área da lâmina foliar	28
10.1.2. Interrupção da nervura média	29
10.1.3. Inibição do processo de fotossíntese	29
10.1.4. Períodos crescentes de escuro	29
10.2. Reguladores de crescimento	30
10.2.1. Aplicação de reguladores de crescimento	
a- pasta de lanolina	30
b- pré-embebição	30
c- mecha de algodão	31

10.2.2. Bloqueio do fornecimento de etileno	31
10.2.3. Bloqueio do transporte auxínico	31
10.2.4. Translocação de ^{14}C	31
11. Testes bioquímicos no pulvino	
11.1. Fracionamento dos extratos de pulvino e pecíolo	32
11.2. Extração e purificação de estrógenos esteroidais	35
11.3. Extração e dosagem de ABA no pulvino e pecíolo	38
11.4. Atividade peroxidásica	40
12. Análise estatística	42

IV - RESULTADOS

1. Características morfológicas	43
2. Análise de crescimento das folhas	49
3. Enraizamento da folha primária	52
4. Influência do pulvino no enraizamento	
4.1. Quantidade de tecido do pulvino	56
4.2. Ação mecânica	56
4.3. Ação do tecido vivo	60
4.4. Difusado de pulvino	60
4.5. Transpiração	60
4.6. Translocação de fotossintatos	63
5. Efeito de substâncias fornecidas pela lâmina foliar	
5.1. Fotossintatos	
5.1.1. Redução da área foliar	63
5.1.2. Interrupção da nervura média	66

5.1.3.	Efeito de períodos crescentes de <u>es</u> <u>curo</u> no conteúdo de clorofila e <u>en</u> <u>raizamento</u>	66
5.1.4.	Inibição do processo fotossin tético	66
5.2.	Reguladores de crescimento	
5.2.1.	Auxinas	
a-	Bloqueio do transporte auxínico.	70
b-	Aplicação de auxinas em pasta de lanolina	70
c-	Aplicação de auxinas por pré-em- bebição	74
d-	Translocação do ^{14}C em folhas tra tadas com AIA-2- ^{14}C	76
5.2.2.	Ácido abscísico	
a-	Aplicação de ácido abscísico em pasta de lanolina	80
b-	Translocação do ^{14}C em folhas tra tadas com AIA-2- ^{14}C	80
c-	Dosagem de ABA no pulvino e pecí olo	83
5.2.3.	Etileno	
a-	Aplicação de CEPA em pasta de la nolina	83
b-	Aplicação de AVG e CEPA em me cha de algodão e pincelamento...	86
5.2.4.	Aplicação de reguladores por pré- embebição	86

6. Testes bioquímicos no pulvino	
6.1. Extratos	
6.1.1. Extrato bruto (bioteste)	90
6.1.2. Extrato fracionado (bioteste)	90
6.1.3. Extrato esteroideal (bioteste)	93
6.2. Análise cromatográfica dos extratos	93
6.3. Atividade peroxidásica	96
V - DISCUSSÃO	101
VI - RESUMO	126
VII - SUMMARY	130
VIII - ABREVIATURAS	133
IX - BIBLIOGRAFIA	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	-	Aspecto geral das folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca, mostrando os pulvinos apical (a) e basal (b)	20
Figura 2	-	Esquema da "câmara individual de crescimento"	22
Figura 3	-	Esquema do sistema de produção de corrente capilar de vapor de água	24
Figura 4	-	Esquema do sistema usado para alimentação de estacas de folha com $^{14}\text{CO}_2$	26
Figura 5	-	Esquema do fracionamento do extrato de pulvino em frações ácida, básica e neutra	34
Figura 6	-	Esquema da extração de estrógenos esteroidais	36
Figura 7	-	Pulvino basal. Aspecto geral da organização da região basal do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	45
Figura 8	-	Pulvino basal. Detalhe do cilindro central da região basal do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	45
Figura 9	-	Pulvino basal. Aspecto da organização do sistema vascular na região superior do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	47

Figura 10	- Pulvino basal. Corte longitudinal da região adaxial do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	47
Figura 11	- Pulvino basal. Corte longitudinal da região abaxial do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	47
Figura 12	- Pecíolo. Aspecto geral da região basal do pecíolo de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	48
Figura 13	- Pecíolo. Detalhe de um feixe vascular colateral da região basal do pecíolo de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca ...	48
Figura 14	- Pulvino apical. Aspecto do cilindro central da região mediana do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	50
Figura 15	- Início da formação da raiz adventícia a partir do feixe colateral adaxial do pecíolo de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	50
Figura 16	- Formação do primórdio radicular adventício a partir do feixe adaxial, no pecíolo do <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca.....	50
Figura 17	- Crescimento de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca. A) Cur	

- va de crescimento (mm); B) Curva de crescimento (ln); C) Taxa diária de crescimento. 51
- Figura 18 - Efeito da idade foliar no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal. A) Taxa de enraizamento: número médio de raízes por folha; B) Número de folhas enraizadas 55
- Figura 19 - Transpiração de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca..... 62
- Figura 20 - Translocação do ^{14}C em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca. A) Folhas com pulvino; B) Folhas sem pulvino 64
- Figura 21 - Efeito da área da lâmina foliar no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem pulvino basal 65
- Figura 22 - Efeito da interrupção da nervura mediana da lâmina foliar no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal 67
- Figura 23 - Efeito de aplicação de AIB em pasta de lanolina (0,5 mg AIB/mg de lanolina) no

- enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal 72
- Figura 24 - Efeito de aplicação de AIA em pasta de lanolina, no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal. A) 0,05 mg de AIA/mg de lanolina; B) 0,5 mg de AIA/mg de lanolina 73
- Figura 25 - Efeito de aplicação de várias auxinas, por pré-embrição de 17 horas, no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca. A) Folhas com pulvino; B) Folhas sem pulvino ... 75
- Figura 26 - Porcentagem de ^{14}C translocado em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, após 6 horas de tratamento com AIA-2- ^{14}C (1000cpm). A) Aplicação na lâmina; B) Aplicação no pulvino apical; C) Aplicação na região mediana do pecíolo; D) Aplicação no pulvino basal 79
- Figura 27 - Quantificação de ^{14}C em folhas primárias aneladas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, tratadas com AIA-2- ^{14}C (1000 cpm). A) Aplicação na região mediana do pecíolo; B) Aplicação na região superior do pecíolo 81

- Figura 28 - Efeito da aplicação de ABA em pasta de lanolina (0,5 mg ABA/mg de lanolina), no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal 82
- Figura 29 - Porcentagem de ^{14}C translocado em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, após 6 horas de tratamento com ABA $2\text{-}^{14}\text{C}$ (1000 cpm). A) Aplicação na lâmina; B) Aplicação no pulvino apical; C) Aplicação na região mediana do pecíolo; D) Aplicação no pulvino basal 84
- Figura 30 - Efeito da aplicação de ácido 2-cloroetil fosfônico em pasta de lanolina (0,5mg/mg de lanolina), no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, em folhas sem o pulvino basal .. 85
- Figura 31 - Efeito de CEPA e AVG no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, em folhas sem o pulvino basal 87
- Figura 32 - Efeito da aplicação de reguladores de crescimento, por pré-embebição de 17 horas, no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal 88

- Figura 33 - Relação entre a concentração do extrato bruto do pulvino e o enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca 91
- Figura 34 - Efeito do extrato fracionado de pulvino no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca 91
- Figura 35 - Efeito da fração básica do extrato de pulvino no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca. A) Porcentagem média de raízes por folhas; B) Porcentagem de folhas enraizadas 92
- Figura 36 - Efeito de estrógenos (estrona e estradiol), no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca sem o pulvino basal 94
- Figura 37 - Esquema do cromatograma com as frações ácida, básica e neutra do extrato do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca..... 95
- Figura 38 - Esquema do cromatograma de extratos esteroidais de pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, comparados com padrões de estrona e estradiol 95
- Figura 39 - Efeito de estrógenos aplicados em pasta de lanolina em folhas primárias de

	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	97
Figura 40 -	Efeito do volume do extrato usado no ensaio peroxidásico de pulvino basal de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	97
Figura 41 -	Proporcionalidade da relação, entre volume do extrato peroxidásico e atividade enzimática em pulvino de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca.	99
Figura 42 -	Estabilidade da atividade enzimática após extração do pulvino de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	99
Figura 43 -	Análise da atividade peroxidásica em folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca, com e sem pulvino	100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	- Tamanho dos pulvinos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	44
Tabela 2	- Efeito da idade da folha primária no enraizamento foliar de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	53
Tabela 3	- Tratamento fotoperiódico em plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca e seu efeito no enraizamento das folhas primárias ..	57
Tabela 4	- Efeito do pulvino apical no enraizamento de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	58
Tabela 5	- Efeito do pulvino basal no enraizamento de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	59
Tabela 6	- Efeito do pulvino basal no enraizamento de folhas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca: teste do efeito mecânico da epiderme, morte e isolamento do pulvino por anelamento	61
Tabela 7	- Efeito de difusão de pulvinos basais de folhas primárias no enraizamento foliar de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	61
Tabela 8	- Clorofila total e enraizamento de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca mantidas no escuro, presas às plantas do	

	adoras ou destacadas das mesmas e em condições de enraizamento	68
Tabela 9	- Efeito de DCMU a 10^{-2} M no enraizamento de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	69
Tabela 10	- Efeito de anel de mistura de TIBA com lanolina (TIBA mg de lanolina) sobre o pulvino apical no enraizamento de folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca	71
Tabela 11	- Médias do número de raízes formadas sob o efeito de aplicação de várias auxinas, por pré embebição de 17 horas, em folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca, com pulvino	77
Tabela 12	- Médias do número de raízes formadas sob o efeito de aplicação de várias auxinas em folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca, sem pulvino	78
Tabela 13	- Médias do número de folhas formadas sob o efeito da aplicação de reguladores, por pré embebição de 17 horas, em folhas primárias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. carioca sem o pulvino basal	89

I - INTRODUÇÃO

A recuperação de uma planta inteira a partir do cultivo de partes isoladas da mesma é de grande importância para a agricultura porque torna possível a produção em grande escala de plantas geneticamente uniformes, descendentes de um único indivíduo selecionado. Esta prática, conhecida como estaquia, é também ideal para certos estudos fisiológicos nos quais o uso de plantas inteiras é inconveniente e/ou impossível apresentando além da vantagem da uniformidade, a obtenção de grande número de repetições que podem facilmente ser submetidas às condições ambientais controladas.

No processo de estaquia, várias partes da planta são utilizadas: caule, hipocótilo, epicótilo, raiz, cotilédone, folha, etc. Tanto cotilédone como folhas se destacam como materiais ideais para muitos estudos fisiológicos por constituírem sistemas completos com uma fonte de produção de fotosintatos e uma fase final de utilização dos assimilatos.

O fenômeno de regeneração de novas partes de uma planta a partir de uma estaca está condicionado a sua capacidade de produzir raízes adventícias, razão pela qual a rizogênese vem sendo intensamente estudada. Para estudo dos fatores químicos, endógenos, bem como de fatores ambientais envolvidos na formação de raízes adventícias há necessidade de utilização de ensaios específicos pelos quais seja possível detectar as influências de agentes promotores e inibidores. Este estudo requer continuamente grande número de estacas uniformes.

O uso de estacas provenientes de plantas propagadas por sementes torna-se então muito favorável pela facilidade de obtenção de muitas plantas morfológicas e fisiologicamente uniformes em qualquer época do ano.

No estudo da rizogênese os pesquisadores têm utilizado plantas de diversos gêneros, como por exemplo: *Pisum* (WENT, 1929 ; VEIERSKOV et al., 1976), *Impatiens* (BOUILLENNE e WENT, 1933 in FERNQVIST, 1966), *Salix* (KAWASSE, 1964), *Sinapis* e *Raphanus* (LOVELL et al., 1971), *Abelmoschos* (BHATTACHARYA et al., 1978), *Phaseolus* (FERNQVIST, 1966), *Lycopersicon* (COLEMAN e GREYSON, 1976), *Panicum* (FELIPPE, 1979), etc. A utilização do gênero *Phaseolus* tem sido das mais frequentes e as pesquisas foram realizadas em estacas de diversas porções do corpo da plântula. HESS (1964) utilizou hipocótilo de plântulas de *P. vulgaris* e *P. aureus* crescidas no escuro, enquanto STUART (1938) trabalhou com hipocótilos de feijão anão crescidos na luz. HAMBERG (1951; 1953, 1954) em seus estudos de formação de raízes adventícias usou estacas de hipocótilo com folhas primárias e este método foi posteriormente introduzido como "teste de enraizamento do feijão". SHEUERMAN (1952 in FERNQVIST, 1966) estudou o efeito de vitaminas no crescimento meristemático e rizogênese em epicótilos esfoliados de *Phaseolus multiflorus*. Em *Phaseolus vulgaris*, as folhas primárias têm sido um sistema frequentemente usado para o estudo da formação da raízes adventícias (VARGA e HUMPHRIES, 1974; OPPERNORTH, 1978, 1979, 1980; HEWITT e HILLMAN, 1980 a).

As folhas primárias de *P. vulgaris* se movem para baixo e para cima com um ritmo circadiano, controlado por um "relógio" endógeno e que se mantém, mesmo à temperatura e/ou

sob condições de luz e escuro contínuos. Este movimento da folha resulta de alterações de turgescência em lados opostos do pulvino apical (BUNNING, 1973; SATTER, 1980). Os estudos de KIYOSAWA e TANAKA, (1976) revelaram que durante as alterações de volume das células pulvinares o ion K^+ foi encontrado em concentrações mais altas do que os outros e que, a deformação do pulvino ocorre por expansão e contração das células do seu lado superior e inferior, estando esta variação de turgescência em correlação positiva com as alterações na distribuição do potássio. Continuando estes estudos KIYOSAWA (1979) mostrou, através da análise das concentrações de ions e sacarídeos, nas partes superior e inferior do pulvino apical, que o "relógio" endógeno controla a distribuição desigual de K^+ , Cl^- , ácidos orgânicos (ou H^+) e NO_3^- no pulvino, podendo ser esta a força para o movimento circadiano.

KRIEGER (1978), observou que a aplicação de auxina no lado superior do pulvino apical da folha primária de *Phaseolus vulgaris*, faz com que esta se dobre em direção contrária ao ponto de aplicação. Este efeito foi apenas observado com aplicação de auxinas conhecidas como ativas, mas não por aplicação de análogos inativos das auxinas, sendo 2,4-D e L-2,4-D considerados como indutores de atividade intermediária. A promoção de dobramento foi reservável e presumivelmente causada por aumento de turgescência das células tratadas.

Os trabalhos realizados por THIMANN e POUTASSE (1941) e GREGORY e SAMANTARAI (1950) indicam que o pulvino basal afeta o enraizamento de folhas de *Phaseolus vulgaris*, sem

entretanto tecer considerações a respeito da validade e natureza desta inibição. Testes preliminares com algumas cultivares desta espécie comprovam o comportamento inibidor do pulvino no enraizamento de folhas primárias. Folhas com pulvino não enraizam e a eliminação desta estrutura restabelece a capacidade de enraizamento do pecíolo. HEWITT e HILLMAN (1981), analisando esta inibição observaram que ela poderia estar relacionada com a dessecação rápida e severa observada em folhas com pulvino, 24 horas após serem colocadas em condições de enraizamento. Argumentaram, entretanto, que a inibição causada pelo pulvino não poderia ser explicada somente em termos de relações hídricas, embora ela pudesse ser um efeito secundário desta dessecação.

A existência de material biológico propício (estaca de folha), contendo duas regiões próximas com efeito fisiológico tão diferente em relação à rizogenese (pecíolo e pulvino), parece um sistema adequado para pesquisar o processo de enraizamento e em particular estudar os fatos metabólicos que levam ao comportamento fisiológico diferencial em relação à formação de raízes adventícias.

II - DADOS BIBLIOGRÁFICOS

A formação de raízes adventícias é o mais importante dos processos que levam ao estabelecimento de uma planta, a partir de um órgão isolado, uma vez que são elas que absorvem água e nutrientes, tornando possível o intenso crescimento do caule. Os processos de iniciação e desenvolvimento das raízes adventícias são influenciados por muitos fatores, tanto endógenos como ambientais.

Muitas investigações foram realizadas no sentido de determinar as condições de formação de raízes e os resultados aparecem em várias revisões, principalmente as de DORE (1965), TORREY (1965), FERNQVIST (1966) e HESS (1969).

As pesquisas, neste setor, incluem o estudo da ação de fatores não químicos, considerados externos (água, aeração, temperatura, luz e pH) e internos (estado nutricional do tecido, polaridade etc.). Também tem sido analisada a ação de fatores químicos como vitaminas, gibberelinas e principalmente auxinas na formação deste órgão. Vários pesquisadores têm estudado em detalhe as relações fitohormonais neste fenômeno e sugerido alguns esquemas para compreensão dos passos metabólicos que levam à formação das raízes adventícias (SKOOG e MILLER, 1957; TORREY, 1956 in TORREY, 1965; LIBBERT, 1964 in GAUTHERET, 1969; BOUILLENNE, 1952, 1964, BOUILLENNE e BOUILLENNE-WALRAND, 1947 in GIROUARD, 1969).

A pesquisa a respeito de uma substância específica, formadora de raiz, começou em 1929 quando WENT notou que

difusados de folha de *Acaipha* podiam induzir a formação de raízes adventífcas em folhas de *Acalipha* e *Caríca* (WENT, 1929). A hipótese da rizocalina foi apresentada por BOUILLENNE e WENT em 1933 (in FERNQVIST, 1966); a rizocalina era considerada um hormônio específico formador de raízes, sem caráter nutricional, produzido nas folhas sob ação da luz, podendo ser armazenada nos cotilédones, de natureza termolábil e sendo translocada em direção basípeta. O desenvolvimento de testes específicos para formação de raízes facilitou o estudo da rizocalina, que passou a ser considerada por WENT e THIMANN (1937) como mais uma auxina. Para BOUILLENNE e seus colaboradores a rizocalina continuava sendo uma substância específica formadora de raízes (in CHAMPAGNAT, 1961) que para eles era "móvel-fixada". Segundo o novo postulado da hipótese, a auxina ativava uma "rizocalina móvel", que era sintetizada nas folhas, pela ação de uma enzima pertencente ao grupo das polifenolases. A auxina funcionava então como um co-fator na formação da "rizocalina-fixada", a qual se formava nos tecidos onde a polifenolase era encontrada. Na última modificação desta hipótese, BOUILLENNE (in GIROUARD, 1969) descreveu a rizocalina como um complexo de três fatores: um altamente específico, móvel, com grupos ortofenólicos que é sintetizado nas folhas expostas à luz; outro, uma auxina, um fator não específico móvel, presente em concentrações fisiológicas e o terceiro, uma enzima que requer oxigênio, localizada em células e tecidos específicos. Este conceito foi parcialmente modificado por LIBBERT em 1956 que não concordou, especificamente, com a exis-

tência de uma enzima presente somente em determinadas células e tecidos, que reagiria com a rizocalina livre, mas aceitando apenas, que uma parte deste fator se combinaria com a auxina e que este complexo formado induziria a formação de raízes adventícias (in GIROUARD, 1969). Em 1957, HESS (in HESS, 1969) introduziu o conceito do cofator de enraizamento. Estes cofatores denominados de 1 a 4, com base no seu comportamento cromatográfico, foram considerados substâncias endógenas capazes de atuar sinergisticamente com a auxina no enraizamento de estacas de plântulas de feijão mungo. Foi verificado que somente terpenóides promoviam a formação de raízes nas estacas de feijão mungo. Para atividade máxima neste bioensaio era requerida uma estrutura molecular com pelo menos dois grupos hidroxílicos na posição orto e uma posição para livre. Recentemente, os cofatores de muitas plantas foram analisados, entre eles de *Hedera helix* (GIROUARD, 1969), *Phaseolus aureus* (JAKSON e HARNEY, 1969) e *Rhododendron* (FOONG e BARNES, 1981).

É hoje de ampla aceitação o papel importante que as auxinas desempenham na formação de raízes adventícias. O efeito promotor deste hormônio é algumas vezes influenciado por fatores que são limitantes para formação de raízes. Alguns destes, têm efeito nutricional, como carboidratos e substâncias nitrogenadas. Outros, entretanto, podem ser considerados cofatores de crescimento e sinergistas do hormônio (VAN OVERBEEK et al., 1946; HESS, 1969). Observações sobre a atuação de ácido indolil-3-acético (AIA) na formação de raízes (NANDA et al.,

1971; ALTMAN e WAREING, 1975) sugerem que o aumento endógeno deste hormônio na base de uma estaca ou um tratamento com aplicação exógena poderia afetar imediatamente o acúmulo de outros fatores que são necessários à rizogênese. A importância das folhas (ALTMAN e WAREING, 1975) e das gemas (ERIKSEN, 1973) na promoção de iniciação de raízes em estacas foi verificada pelo efeito de eliminação destes órgãos no enraizamento. A expressão do efeito de AIA na indução de formação de raízes, é dependente da área foliar, sendo tanto maior o número de raízes, quanto maior o número de folhas mantidas na estaca. Após a excisão foliar, os açúcares passam a se acumular lentamente na base das estacas. A aplicação de AIA aumenta a velocidade deste transporte basípeto de assimilatos e conseqüentemente o seu acúmulo. Este acúmulo deve estar relacionado com a grande mobilização de assimilatos das partes superiores observado em estacas tratadas com AIA. Experimentos envolvendo pré-tratamento com AIA e transporte de assimilatos em estacas com primórdios em formação, sugerem um duplo efeito de AIA: um efeito direto sobre o transporte e um indireto no aumento do "sink" da raiz. A conclusão é que ambos podem estar influenciando a indução do acúmulo basípeto de assimilatos. Isto sugere que uma das propriedades do AIA na promoção do enraizamento de estacas é aumentar a utilização de açúcar no local de formação de raízes.

VON GUTTEMBERG e ZETSCHÉ (1956) mostraram que a síntese de carboidratos é necessária para o transporte de AIA no escuro. Estacas foliares de *Phaseolus vulgaris* provenientes

tes de plantas mantidas no escuro por 5 dias, quando tratadas com sacarose e AIA apresentaram um aumento do número de raízes formadas, bem como no comprimento da parte do pecíolo que enraizava, principalmente quando o AIA foi aplicado após a sacarose. Estes resultados indicam, também, que a sacarose deve ter promovido a entrada de AIA nas estacas (OPPENOORTH, 1980).

Estacas de caules estiolados de *Populus* formaram mais raízes após aplicação de sacarose (NANDA e JAIN, 1972). Entretanto, enraizamento de estacas caulinares verdes, desta espécie não se mostraram dependentes do nível de sacarose, mas sim, do conteúdo de citocininas (OKORO e GRACE, 1976, 1978). Portanto, o papel da sacarose exógena no enraizamento de estacas, parece estar restrito ao de fonte de energia metabólica em substituição à fotossíntese.

No entanto, o aumento da intensidade luminosa fornecida às plantas doadoras de estaca, diminui o número bem como o peso seco das raízes formadas nas estacas. Há indicações de que o tratamento tem mais efeito na diminuição da velocidade de crescimento do que propriamente na iniciação de raízes adventícias, (HANSEN e ERIKSEN, 1974; HANSEN, 1976; WELANDER, 1978; OPPENOORTH, 1980). LAMBERS e POSTHUMUS (1980, in OPPENOORTH, 1980) sugerem que a velocidade elevada de transpiração aumenta a velocidade de transporte de reguladores de crescimento sintetizados nas raízes em direção às folhas. Citocininas e ácido abscísico inibem o crescimento de raízes laterais (TORREY, 1976); assim uma alta concentração deste hormônio

na lâmina foliar, poderia causar uma diminuição da velocidade de formação de raízes adventícias em estacas foliares. Além disso mais ácido abscísico poderia ser sintetizado na folha devido à diminuição do potencial de água da lâmina, causada pela forte iluminação (WRIGHT e HIRON, 1972).

Há sugestões de que a produção de raízes, adventícias seja influenciada também pela qualidade da luz, a qual exerce seu efeito por meio de fatores regulatórios nutricionais (GUPTA et al., 1977). As estacas de *Phaseolus mungo* obtidas de plântulas crescidas em vermelho extremo, não enraizam em água, AIA ou ácido indolil butírico (AIB) sozinhos, porém, enraizam quando são cultivadas em sacarose ou em soluções destes reguladores combinadas com sacarose. Quando as plântulas crescem no escuro, sob luz branca ou vermelha as estacas enraizam. Neste caso, as estacas enraizam mais quando a planta mãe cresceu no escuro e a quantidade de raízes decresce nos tratamentos com luzes vermelha e branca.

O etileno é um regulador de crescimento natural com comprovada atividade na formação de raízes e transporte de auxinas (ZIMMERMAN e HITCHCOCK, 1933; PRATT e GOESCHL, 1969). Entretanto, não está clara a extensão do seu envolvimento em enraizamento, sendo que alguns investigadores mencionam-no como promotor (KAWASSE, 1971), outros como não tendo efeito (SHANKS, 1969) e ainda outros como inibidor (MULLINS, 1972) da formação de raízes adventícias.

BATTEN e MULLINS (1978) verificaram respos-

tas de enraizamento e produção de etileno em segmentos de hipocótilo de feijão mungo estiolados tratados com vários tipos de auxinas. Entretanto, não foi encontrada uma relação entre a capacidade da auxina induzir formação de raízes e sua capacidade de induzir a produção de etileno. Estudos com misturas de AIA (um fraco estimulador de enraizamento, mas efetivo na indução de produção de etileno) e AIB (um estimulante de enraizamento, mas fraco estimulador de produção de etileno), e exposição de estacas a dióxido de carbono (CO_2), em comparação com estacas tratadas com etileno ou a ácido 2-cloroetil fosfônico (etefon) indicaram que etileno não está diretamente envolvido na iniciação de raízes adventícias em feijão mungo. Conclui-se que concentrações não fisiológicas de etileno são necessárias para causar um efeito na formação de raízes adventícias e que o efeito das auxinas no enraizamento não é resultado de sua habilidade de produzir este gás. Para OPPENDORTH (1980) o etileno atua na iniciação radicular, na fase imediatamente após a primeira divisão celular quando são um pequeno grupo de células em contra-se ativado neste sentido.

A resposta do enraizamento pode ser também modificada por outros hormônios, como as giberelinas. Dados bibliográficos nesta área são até certo ponto conflitantes, havendo trabalhos que descrevem uma inibição (BRIAN *et al.*, 1960; COLEMAN e GREYSON, 1976), outros uma promoção (COLEMAN e GREYSON, 1977a; ANAND *et al.*, 1972; VARGA e HUMPHRIES, 1974; NANDA *et al.*, 1967, 1972), e outros ainda, descrevendo uma inibição e/ou promoção da formação de raízes por este hormônio (HANSEN, 1976; COLEMAN

e GREYSON, 1977b).

O efeito inibidor de giberelinas, como o ácido giberélico (GA_3), diminuído pela aplicação de auxina estaria relacionado com a inibição da síntese localizada de amido. Esta inibição provocaria a limitação da disponibilidade local de carboidratos na forma osmoticamente inativa, impedindo que fossem usados como fonte de energia metabólica ou para síntese rápida de parede celular por via dos açúcares fosforilados (COLEMAN e GREYSON, 1976, 1977a).

Por outro lado, o efeito promotor de GA_3 no enraizamento está ligado ao seu efeito no aumento da síntese de auxina. A atuação de GA_3 neste caso estaria relacionada com o aumento da disponibilidade dos precursores específicos da auxina como triptofano, triptamina e ácido 3 indol-lático (ANAND et al., 1972; COLEMAN e GREYSON, 1977a). A aplicação conjunta de GA_3 e triptofano, mostrou uma possível atuação da giberelina na biossíntese de auxina, pela promoção da utilização do triptofano. Em um sistema natural, GA_3 atuaria promovendo a utilização do triptofano liberado das proteínas. Esta observação corrobora os resultados de pré-tratamento com citocininas, hormônios que provocam a inibição da formação da raízes. Estes últimos hormônios retardando a decomposição de proteínas, diminuem a disponibilidade de triptofano para síntese de auxina, alterando a taxa auxina/citocinina, provocando formação de calo e impedindo a diferenciação de raízes (VARGA e HUMPHRIES, 1974).

A formação de raízes adventícias em estacas e folhas isoladas tem sido analisada anatômicamente, através do

acompanhamento das alterações histoquímicas observadas na gênese das divisões celulares que dão origem aos primórdios radiculares KAMINEK (1967) observou que em caules de ervilha estioladas os eventos iniciais da rizogênese compreendiam duas fases: a primeira, 64 horas após o início do experimento, caracterizada pela formação de células meristemáticas na região do periciclo e a segunda, após outras 64 horas como crescimento e diferenciação dos tecidos da raiz em formação. Observou ainda que cinetina inibia a instalação do meristema inicial e ativava o desenvolvimento de tecidos secundários. LOVELL et al. (1971) encontraram fases semelhantes no processo de enraizamento de cotilédones de *Sinapis alba* L. e *Raphanus sativum*, observando ainda, que fatores que afetam a formação de raízes exercem efeitos diferentes nestes estádios. Os efeitos de GA₃ e cinetina na inibição de raízes induzidas por AIA ocorrem somente quando estas substâncias são aplicadas durante as primeiras 27 a 72 horas após o início do cultivo de epicótilos de ervilha, isto é, antes de estar completo o primeiro meristema (KAMINEK, 1967). Aplicação de auxina e cinetina em vários períodos após o estaqueamento, mostrou que o AIA era mais efetivo quando aplicado algumas horas após estaqueamento, passando a ter efeito inibidor quando aplicado mais tardiamente, enquanto que a cinetina inibia enraizamento independentemente do período de aplicação (KAMINEK, 1967; ERIKSEN e MOHAMED, 1974; MOHAMED e ERIKSEN, 1974). A influência promotora de AIA, quando aplicado 16 horas após o estaqueamento, indica que a indução da desdiferenciação celular, que dá início à formação da inicial meristemática radicular, não ocor

re imediatamente após o estaqueamento. Devido à alta instabilidade do AIA, quando sua aplicação é feita na hora zero, no momento em que as células estão induzíveis, sua concentração já chegou a um nível muito baixo, razão pela qual o número de raízes formadas neste tratamento é bastante reduzido (OPPENORTH, 1980).

Muitos trabalhos foram realizados no sentido de mostrar a relação entre enzimas e enraizamento. Dentre elas, as peroxidases ocupam lugar de destaque e sua ação no crescimento e diferenciação celular foi estudada por vários autores (GALSTONE e DALBERG, 1954; SIEGEL e GALSTON, 1967). As peroxidases existentes nas plantas possuem formas moleculares múltiplas, as quais variam em conteúdo de acordo com a espécie, tecido, estágio de desenvolvimento, presença de infecções patogênicas e aplicação de substâncias de crescimento (SHANON, 1968). O efeito de substâncias de crescimento é de especial interesse, pois sabe-se que as peroxidases catalizam a oxidação do AIA, o que sugere um importante papel desta enzima na regulação do crescimento de uma planta (LEE, 1972). Foi também observado que os vários órgãos de ervilha possuem padrões de isoperoxidases eletroforicamente distintos e que a auxina pode induzir um aumento ou inibição na formação de uma isoenzima específica (OKORSE *et. al.*, 1966; SIEGEL e GALSTON, 1967; LAVEE e GALSTON, 1968). As alterações no padrão das peroxidases relacionadas com o enraizamento foram estudadas por CHANDRA e colaboradores (1971), enquanto que a constatação histoquímica do aparecimento de isoperoxidases nas células iniciais do primórdio radicular, bem como no próprio primórdio foi re

alizada por MOLNAR e LA CROIX(1972). Estudando a atuação de substâncias promotoras de crescimento(citocininas, auxinas e gibberelinas), no padrão de peroxidases, LEE(1972) mostrou que a atuação da peroxidase total não está necessariamente ligada à inibição do crescimento; assim um tecido crescendo rapidamente também pode ter um alto nível de peroxidase total. Este autor, sugere ainda, que o nível de isoenzimas está mais relacionado com o crescimento do que com o nível de peroxidase total. As polifenol-oxidases também desempenham papel importante no metabolismo dos fenóis. A bibliografia indica que o controle e regulação destas enzimas estão ligados às modificações fisiológicas das células vegetais. HABBAGUCHI (1977) encontrou um aumento da atividade da polifenol-oxidase antes ou simultaneamente com a formação de raízes em calo de cenoura. Neste sistema, a aplicação de substâncias ativadoras da rizogênese promoveu um aumento da atividade das polifenol-oxidases, enquanto que as inibidoras bloquearam a atividade desta enzima.

Foi mostrada recentemente, a existência de estrógenos esteroidais em plantas de *Phaseolus vulgaris* (YOUNG et al., 1977, 1978, 1979). Além disso, vários pesquisadores têm comprovado o efeito destes estrógenos em muitos processos de crescimento e diferenciação, inclusive na formação de raízes adventícias em estacas (GEUNS, 1978; HEWITT e HILLMAN, 1980 a,b). Segundo WENT e THIMANN (1937), a estrona aumenta a promoção de enraizamento induzida por auxina. O estradiol estimula o enraizamento em estacas brocoli, embora somente nas concentrações mais altas e mais

baixas que foram usadas (LESHEM, 1967). HEWITT e HILLMAN (1980 a) mencionam que sulfatos de estrona e estradiol inibem significativamente o enraizamento de hipocótilos de *Phaseolus vulgaris*, sendo a inibição quase total quando aplicados em epicótilos e folhas primárias. Entretanto, fosfatos destes estrógenos, bem como estrógenos puros causam modificação do padrão de enraizamento. Para estes pesquisadores, o efeito causado pelos esteróides sulfatados pode estar relacionado com o fato de serem eles mais livremente transportados no interior das células e tecidos do que quando sob a forma de fosfatos, que são rapidamente metabolizados pelo grande número de enzimas capazes de quebrar as ligações fosfato, ou puros, por serem insolúveis em água ficando mais retidos nos sistemas lipóides das membranas.

Como foi visto, até o presente, o problema da rizogênese não está elucidado. É possível que a multiplicação de teorias propostas para explicar a formação de raízes adventícias seja resultado do uso de materiais muito variados: estacas, segmentos de caule, folhas ou raízes isoladas. O fato é que existem pontos obscuros que devem ser cuidadosamente analisados para que se possa compreender melhor este fenômeno.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico experimental usado na presente pesquisa foi o par de folhas primárias de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, obtidas de sementes provenientes da Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP.

2 - CULTIVO DAS PLANTAS

Para obtenção das folhas primárias destinadas tanto para testes de enraizamento, como para fornecimento de pulvinos para extração de substâncias, as sementes foram plantadas em caixas plásticas mantidas em casa de vegetação ou diretamente em canteiros ao ar livre, com terra adubada. Em ambos os tipos de cultivo as plantas ficaram expostas aos foto e termoperíodos ambientais.

Em caso de testes especiais, como ação do fotoperíodo, as plantas cresceram em caixas plásticas submetidas a dias longos de 18 horas e dias curtos de 8 horas de fotoperíodo. Os dias longos foram conseguidos complementando a luz natural do dia com luz de lâmpadas incandescentes, suspensas a 80 cm de distância das plantas; os dias curtos, cobrindo as plantas com caixa de pano preto opaco, reduzindo assim o período de luz natural para um total de 8 horas.

3 - ANÁLISE DE CRESCIMENTO DAS FOLHAS

A análise de crescimento das folhas(fo

lhas primárias) foi realizada em plantas crescendo em casa de vegetação, através de medidas diárias do comprimento da nervura média do limbo foliar e do comprimento total do pecíolo. As medidas iniciais foram feitas em amostras de 20 primórdios foliares de sementes não embebidas. Nos 5 primeiros dias de crescimento, as folhas primárias ainda se encontravam cobertas pelos cotilédones e as plântulas eram eliminadas após as medidas. A partir de então, as medidas foram feitas nas mesmas plantas até o 16º dia após o plantio.

4 - ANÁLISE ANATÔMICA

A análise anatômica dos pulvinos e da parte basal do pecíolo foi realizada em folhas com e sem pulvino, com 0, 6, 12, 18 e 24 horas de condições de enraizamento. O material foi tratado com as técnicas histológicas usuais (JOHANSEN, 1940) de fixação (FAA - 50%), desidratação etanólica e infiltração parafínica com auxílio de xilol. Os blocos de parafina foram cortados transversal e longitudinalmente com micrótomo rotatório e as fitas de 8 μ m de espessura montadas em lâminas histológicas em resina sintética. Para facilitar a análise, foi usada a dupla coloração safranina e "fast-green", combinada com a técnica de FOSTER (1934) para evidenciação de paredes de células meristemáticas, pela precipitação do cloreto férrico. Pulvinos e pecíolos (5mm basais) de folhas recém colhidas, bem como de folhas com 5 dias de enraizamento foram também fixadas com glutaraldeído a 3% e embebidas em resina Epon/Araldite, sendo as secções de 3 μ m de espessura coradas com azul de toluidina.

5 - COLETA DE MATERIAL

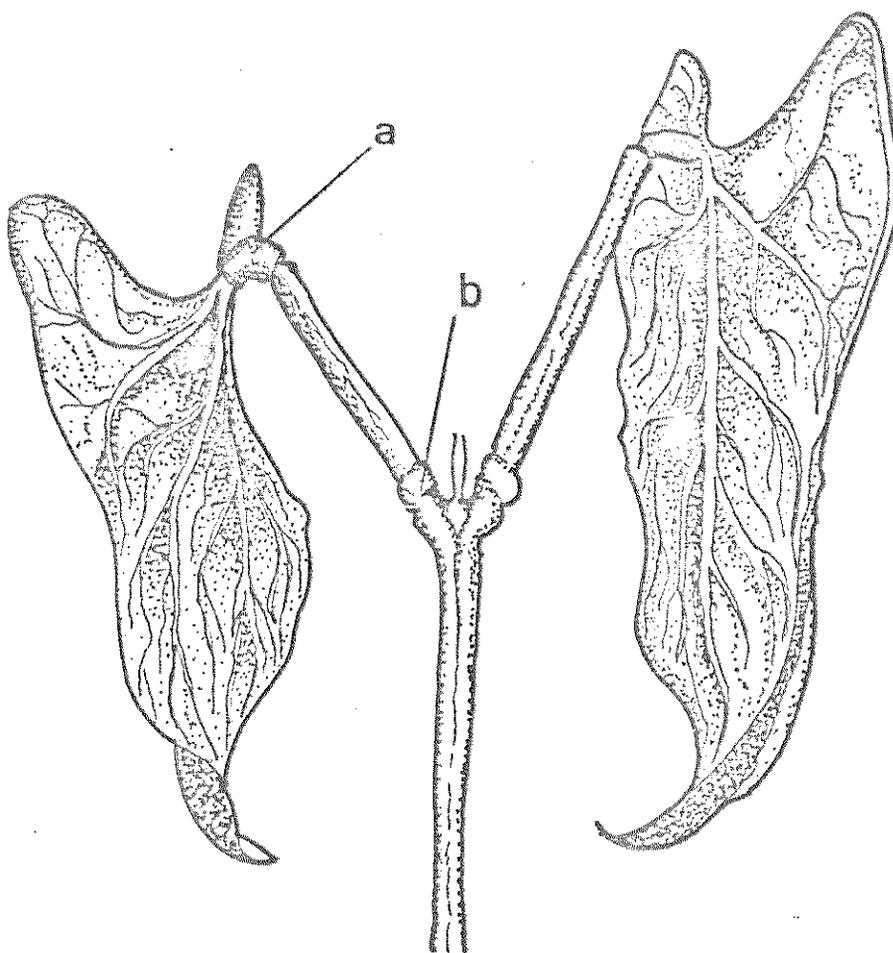
As estacas foliares usadas no presente trabalho constituíram-se sempre de uma única folha primária completa, destacada das plantas com auxílio de lâmina de barbear. As folhas eram cortadas na região basal (abaixo ou acima do pulvino basal) sob água para prevenir interrupção da continuidade da corrente de água no xilema. A figura 1 mostra um esquema das folhas primárias.

6 - TESTES DE ENRAIZAMENTO

Estes testes foram realizados em câmaras com fotoperíodo de 12 horas (lâmpadas fluorescentes e incandescentes) com intensidade luminosa média de 0,1 Ly/min e temperatura de 25 a 28 °C. As folhas em enraizamento, em número de 10 a 20 por tratamento, foram mantidas em cubas plásticas cobertas com plástico transparente, revestidas internamente com papel de filtro umedecido, formando uma câmara úmida. O sistema de manutenção das folhas em enraizamento variou de acordo com o tratamento aplicado. Em testes iniciais, as folhas ficaram suspensas em placas de isopor (0,5 cm de espessura) perfuradas, com os pecíolos imersos no meio de enraizamento e as lâminas sobre o isopor, isoladas do meio para evitar deterioração. Neste sistema, foram realizados testes de aeração contínua do meio de enraizamento com auxílio de tubos plásticos ligados a um compressor. Na maioria dos testes, entretanto, os pecíolos das folhas eram imersos no meio de enraizamento, colocados em pequenos vidros, com capacidade de 8 a 12 ml

FIGURA 1 - Aspecto geral das folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, mostrando os pulvinos apical (a) e basal (b).

FIGURA 1



mantidos na câmara úmida descrita acima ou em câmara com umidade controlada a 80%, fotoperíodo de 12 horas a 25 °C. Foi ainda utilizado o sistema de "câmaras individuais" formadas por frascos tipo Wheaton de boca larga com capacidade de 280 ml contendo na base, mecha de algodão bem embebida em água, onde se sustentava a base do pecíolo ou da lâmina foliar (figura 2). Neste sistema, o contacto da lâmina com as paredes do frasco permitia a sustentação da folha com melhor exposição à luz. Como meio de enraizamento, foram usados solução de HOAGLAND e ARNON (1938) diluída a 1/5 (pH 6,5), água de torneira, extratos ou soluções de reguladores de crescimento, de acordo com o estudo em curso.

6.1 - VERIFICAÇÃO DO ENRAIZAMENTO

A verificação do enraizamento foi realizada pela contagem das raízes que conseguiram romper a epiderme. Em alguns experimentos, os primórdios radiculares não chegavam a protrair totalmente, sendo visíveis como pequenas "verrugas". O número das verrugas não foi contado e o pecíolo foi denominado "enrrugado". A frequente formação de calo na extremidade cortada do pecíolo também não foi determinada como enraizamento a menos que apresentasse um primórdio radicular diferenciado. Exceto nos casos especificamente mencionados, a duração do experimento foi de 8 dias, sendo o enraizamento verificado no final deste período.

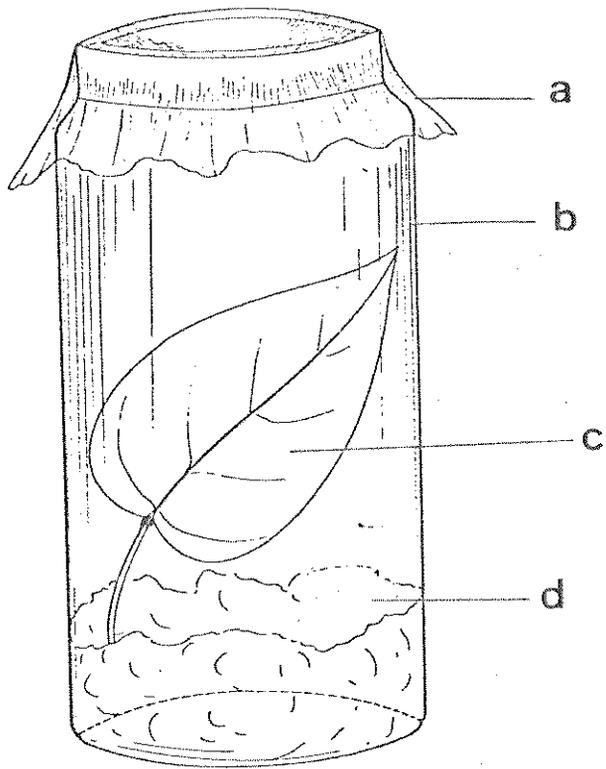
6.2 - IDADE DA FOLHA

Como em *Phaseolus vulgaris* as folhas primárias já ocorrem no embrião, a idade foi determinada convenci

FIGURA 2 - Esquema da "câmara individual de enraizamento".

- a. plástico fino
- b. vidro Wheaton
- c. estaca de folha
- d. algodão embebido em água.

FIGURA 2



onalmente pelo dia da semente. Assim, folhas com um dia de idade estão na plúmula da semente semeada há um dia.

Para se verificar o efeito da idade da folha no enraizamento foram realizados testes de enraizamento de folhas com e sem pulvino nas idades de 6,7,8,9 e 15 dias após a semente. Nestes experimentos o número de raízes por folha foi contado diariamente.

6.3 - TECIDO DO PULVINO

A extensão do tecido do pulvino capaz de atuar sobre o enraizamento foi verificada tanto no pulvino superior como no inferior, os quais se localizam respectivamente no ápice e na base do pecíolo (figura 1). Com relação ao pulvino superior, foram usadas folhas sem este pulvino, folhas com 100,50 e 25% do pulvino e ainda com 2 e 4mm do pecíolo abaixo do pulvino. Em relação ao pulvino inferior foi comparado o comportamento de folhas com 100, 75, 50, 25 e 0% deste pulvino, por eliminação parciais com cortes transversais, bem como 50% por eliminação parcial com corte longitudinal, deixando neste caso metade, da área de conexão do pecíolo com o pulvino, livre desta estrutura.

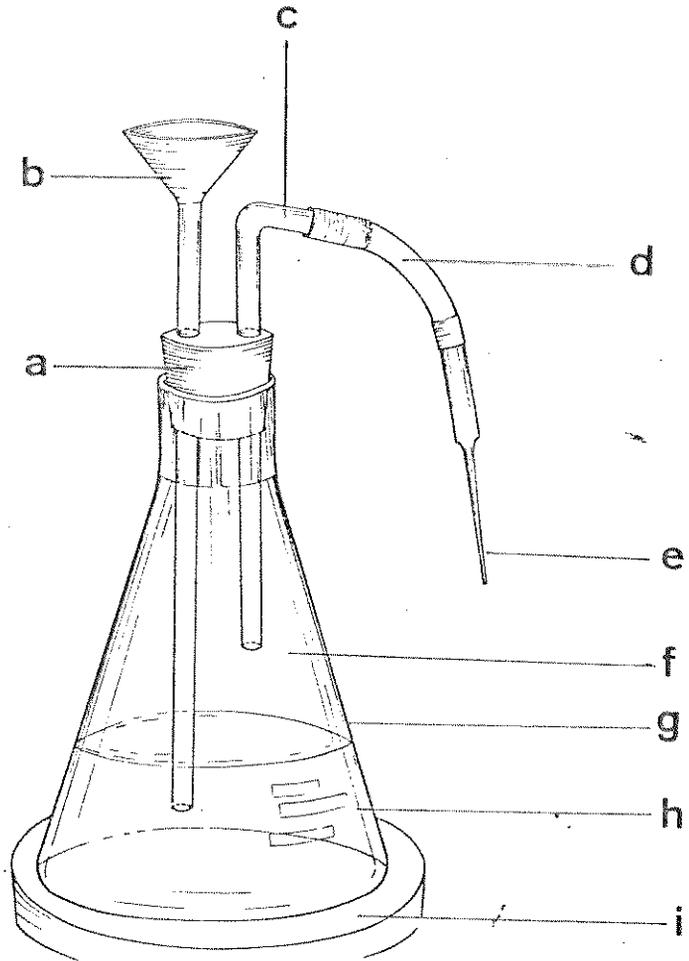
O efeito do fator mecânico no enraizamento, foi testado por eliminação da epiderme do pulvino basal.

A ação do tecido vivo do pulvino foi verificada matando as células desta estrutura com corrente capilar de vapor de água, mantendo-o preso ao pecíolo. O mesmo sistema esquematizado na (figura 3), foi usado para fazer o anelamento do pecíolo, logo acima da sua inserção com o pulvino, interrompendo a continuidade do tecido vivo entre as duas estruturas.

FIGURA 3 - Esquema do sistema de produção de corrente ca
pilar de vapor de água.

- a. rolha de borracha
- b. funil de segurança para manutenção do
nível de água.
- c. tubo de vidro
- d. tubo de borracha
- e. pipeta Pasteur
- f. vapor de água
- g. Erlenmeyer
- h. água
- i. placa aquecedora

FIGURA 3



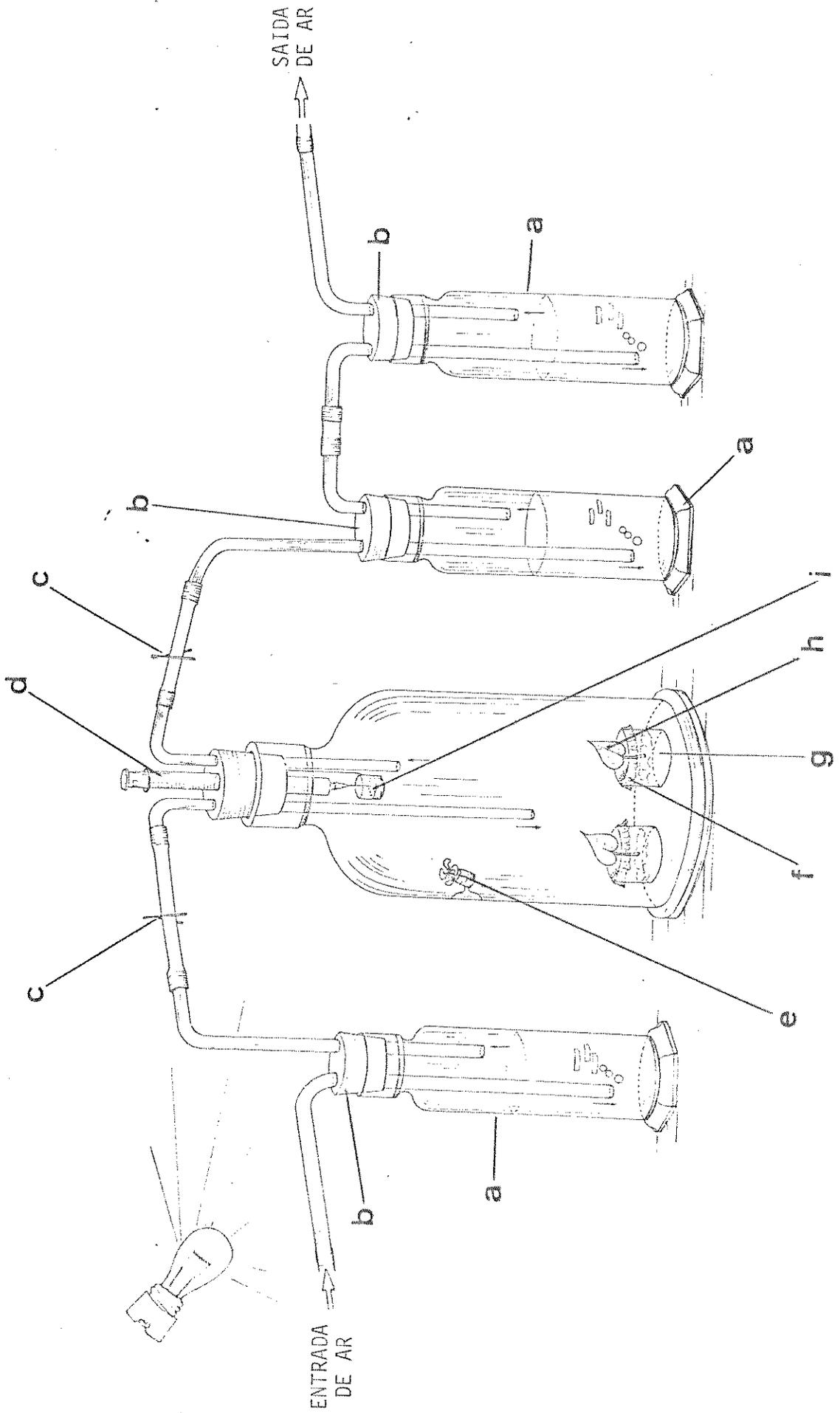
7 - TRANSLOCAÇÃO DE FOTOSSINTATOS

O efeito do pulvino na translocação de fotossintatos foi analisada em folhas com 0,1,2 e 4 dias de enraizamento, alimentadas com $^{14}\text{CO}_2$. As folhas, em número de 5, com e sem pulvino, tinham os pecíolos imersos em água num sistema de enraizamento no qual o meio era isolado da atmosfera circundante por parafilme, o qual era apenas perfurado para penetração dos pecíolos das folhas. Este sistema de enraizamento era mantido dentro de campânula de vidro transparente com base vaselinada em contacto com uma placa de vidro de superfície esmerilhada para permitir completa vedação (figura 4). A abertura superior da campânula era fechada por folha de borracha com tres perfurações onde se adaptavam dois tubos de vidro, um longo para entrada de ar e outro curto para saída do mesmo, e uma seringa plástica de 1 ml com agulha voltada para o interior de um pequeno frasco de boca larga preso por arame à rolha. Os tubos de vidro estavam conectados por tubos de borracha a tres frascos de segurança contendo líquido de cintilação para captura de $^{14}\text{CO}_2$, ligados a uma bomba de circulação de ar. Um deles estava localizado na entrada e dois na saída de ar da campânula. Presa à parede interna da campânula uma pequena ventoinha, mantida à pilha, ajudava a movimentação interna do ar, provocando mais rápida dispersão do $^{14}\text{CO}_2$. Presilhas nos tubos de entrada e saída de ar da campânula permitiam o fechamento do sistema no período de fixação do $^{14}\text{CO}_2$. O sistema era iluminado por duas lâmpadas incandescentes de 40 e 100 Watt, mantidas a 60 cm de distância das folhas. Para funcio-

FIGURA 4 - Esquema do sistema usado para alimentação d
estacas de folha com $^{14}\text{CO}_2$

- a. frasco de segurança
- b. rólha de borracha
- c. presilha de segurança
- d. seringa
- e. ventoinha
- f. parafilme
- g. água
- h. estaca de folha
- i. frasco com ácido láctico

FIGURA 4



namento, as presilhas eram fechadas e no sistema iluminado, eram aplicados cêrca de 30 μCi de $^{14}\text{C-Na}_2\text{CO}_3$, pela seringa, até o frasco contendo 1 ml de ácido lático, para liberação de $^{14}\text{CO}_2$. De corridos 30 minutos, as luzes eram apagadas, as presilhas abertas e a bomba circulação de ar ligada pelo período de duas horas. Após este período, as luzes eram novamente acesas e o sistema mantido em funcionamento por mais 30 minutos, permitindo assim a assimilação de gás carbônico natural. As folhas eram então retiradas e amostradas para oxidação e contagem de ^{14}C nas seguintes secções: pulvino inferior, as partes inferior, intermêdia inferior, mediana (1 cm) e superior ao pecíolo, pulvino superior e lâmina. A quantidade de radioatividade (^{14}C) das secções mencionadas foram determinadas por espectrometria de cintilação no "Packard Scintillation Spectrometer Model 3380", após oxidação das amostras no "Intertechnique 1N401 liquid Scintillation Sample Oxidiser".

8 - DIFUSADO DO PULVINO

A coleta do difusado de pulvino foi feita em fina camada de agar a 1% em placas de Petri, sobre a qual eram colocados pulvinos recém coletados, na posição vertical, com a base assentada no agar. O difusado era coletado por 4 horas e as placas mantidas a uma temperatura de 25 °C em luz difusa. Após a coleta, os pulvinos eram eliminados e o agar cortado em pequenos cubos perfurados na região mediana e encaixados na base do pecíolo de folhas sem pulvinos, mantidas sobre algodão umedecido em condições de enraizamento em "câmaras individuais".

9 - TRANSPIRAÇÃO

A transpiração foi verificada comparando a quantidade de água perdida em folhas com 0, 1, 2, 3 e 4 dias de enraizamento. A mesma amostra de 5 folhas (com e sem pulvino), era retirada nos períodos mencionados, das condições de enraizamento, e transferidos para pequenos tubos de ensaio de 3 cm de altura por 1 cm de diâmetro, com água. Os tubos eram mantidos eretos por introdução de suas bases em pequenos cubos de isopor. Este sistema, montado para cada folha, era pesado de 10 em 10 minutos durante 90 minutos em balança analítica. Paralelamente um sistema semelhante, sem a folha também era pesado, para medir a quantidade de água superficialmente evaporada no tubo. O experimento foi realizado, diariamente, em local iluminado com luz fluorescente, numa intensidade luminosa de $1000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ em câmara com temperatura média de $25,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) regulada automaticamente por termostato ligado a aparelho de refrigeração de ar. As áreas das folhas foram calculadas por pesagem comparativa de seus moldes em papel, com um quadrado do mesmo papel, de área conhecida (1 cm^2) e relacionados com a diminuição do peso pela perda de água.

10 - LÂMINA FOLIAR

Para análise dos fatores ligados à lâmina foliar, que poderiam estar envolvidos na formação de raízes adventícias, foram feitos vários testes de enraizamento.

10.1 - FOTOSSINTATOS

10.1.1 - Redução da área da lâmina foliar.

Foram realizados testes normais de enrai

zamento em folhas com 8 dias de idade, sem pulvino, com redução de 0, 25, 50, 75 e 100% da lâmina foliar. A redução era obtida por cortes transversais da lâmina da folha, sendo a última (100%) montado em pequenos tubos de ensaio. Foi ainda analisado o comportamento de folhas com lâminas inteiras (intactas), colocadas para enraizar na ausência de luz.

10.1.2 - Interrupção da nervura média.

Foram realizados experimentos com folhas nas mesmas condições do tratamento anterior nas quais a nervura média do limbo foliar nas regiões apical, medianda e basal, foi interrompida por um corte transversal com lâmina de barbear.

10.1.3 - Inibição do processo de fotossíntese.

Isto foi conseguido com a aplicação de inibidor da fotossíntese, o 3,4-diclorofenil dimetil uréia (DCMU), na concentração de 10^{-2} M. O DCMU foi aplicado tanto através da solução de cultivo, como por pulverização da lâmina foliar.

10.1.4 - Períodos crescentes de escuro.

Foi verificada a ação do escuro no conteúdo de clorofila e enraizamento de folhas destacadas ou presas à planta. Folhas sem pulvino, em condições de enraizamento, foram mantidas no escuro. Deste estoque, após 24, 28, 96 e 144 horas, 20 folhas eram transferidas para enraizamento na luz e 10 usadas para dosagem de clorofila total. Outro experimento com procedimento análogo foi realizado mantendo plantas intactas de feijão no escuro, a partir do 89 dia após o plantio. Neste caso, nos tempos mencionados eram coletadas as folhas primárias para teste de enraizamento (20) e para dosagem da clorofila total (10). A dosagem da clorofila total foi realizada segundo o método de ARNON (1949) modificado. Eram macerados 10 discos foliares de área conhecida, tomados

de diferentes folhas, em acetona aquosa (80%), centrifugação a 1000g, coleta de sobrenadante cujo volume era completado para 25 ml com o meio extrator e leitura da densidade óptica na faixa de 652 nm em espectrofotômetro Varian 634 UV/VIS. Nos testes de enraizamento foram contados tanto o número de folhas enraizadas como o número de raízes formadas em cada uma delas.

10.2 - REGULADORES DE CRESCIMENTO

10.2.1 - Aplicação de reguladores de crescimento.

Três métodos foram utilizados para a aplicação:

a - pasta de lanolina.

Ácido indolil-3-acético (AIA), ácido indolil-3-búti-
ríco (AIB), ácido abscísico (ABA) e ácido 2-cloroetil fosfônico (CEPA, EtreI), foram aplicados em pasta de lanolina na concentração de 0,5 mg/mg de lanolina. O AIA também foi aplicado na concentração de 0,05 mg/mg lanolina. Para preparação da pasta, os reguladores AIA, AIB e ABA em forma cristalizada foram inicialmente dissolvidos em gotas de etanol 95% e misturados vigorosamente à lanolina ainda derretida até que esta se tornasse novamente pastosa. O ácido 2-cloroetil fosfônico (CEPA), na sua formulação comercial, solução aquosa a 24%, EtreI, foi diretamente adicionado à lanolina derretida e misturado a ela pelo mesmo processo. A pasta assim preparada foi aplicada em folhas com e sem pulvino no limbo (região mediana, sobre a nervura média), pulvino superior, altura média do pecíolo e pulvino inferior.

b - pré-embebição.

Neste método, as folhas com e sem pulvino tinham

suas extremidades basais imersas por 17 horas em soluções aquosas nas concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1 mg do regulador/ml de água. Após o tratamento, os pecíolos eram lavados e transferidos para água de torneira.

c - mecha de algodão.

O CEPA foi também aplicado por intermédio de mechas de algodão, enroladas na região mediana do pecíolo, embebidas na solução do regulador nas concentrações de 0,005, 0,010 e 0,10 mg/ml de água. Estes testes de enraizamento foram realizados em "câmaras individuais" anteriormente descritas.

10.2.2 - Bloqueio do fornecimento de etileno.

O efeito do etileno no processo de enraizamento foi analisado interrompendo a sua biossíntese com aplicação de mecha de algodão embebida em solução aquosa de aminooxetivínil glicina (AVG) a 4 mM, envolvida na altura média do pecíolo de folhas com e sem pulvino. Neste experimento, as folhas foram mantidas em "câmaras individuais".

10.2.3 - Bloqueio do transporte auxínico

Ácido triiodobenzóico (TIBA) foi aplicado através de pasta de lanolina na concentração de 0,5 mg/mg lanolina, como um anel, sobre o pulvino superior em teste de enraizamento normal, na luz. Para preparação do TIBA em pasta de lanolina foi utilizado o mesmo critério usado para os reguladores de crescimento.

10.2.4 - Translocação de ^{14}C

Foi verificada a atuação do pulvino na translocação de ^{14}C proveniente de hormônios radioativamente marcados. A aplicação foi de doses de cerca de 1000 cpm de ácido

indolil-3-acético-2-¹⁴C (AIA-2-¹⁴C) e ácido abscísico-2-¹⁴C (ABA-2-¹⁴C) na forma de uma gotícula padrão de 1 µl, colocada sobre a superfície epidérmica previamente esfolada por papel carborundum. A aplicação foi feita em olhas com e sem pulvino, na lâmina foliar (região mediana na altura média da nervura principal), no pulvino superior, na altura média do pecíolo e no pulvino inferior. Após a aplicação, as folhas tratadas (5 por tratamento), foram mantidas em condições de enraizamento por 6 horas, em luz difusa para evitar a degradação do hormônio. Decorrido este tempo, cada folha foi dividida em 6 amostras padrões: lâmina, pulvino apical, regiões superior, mediana (1cm) e inferior do pecíolo e no pulvino basal quando presente. A contagem da radioatividade contida nas amostras referidas foi determinada por espectrometria de cintilação após oxidação das amostras.

II - TESTES BIOQUÍMICOS NO PULVINO

II.1 - Fracionamento dos extratos de pulvino e pecíolo.

A análise dos fatores endógenos do pulvino que poderiam atuar no enraizamento, foi feita inicialmente por extração, fracionamento e purificação do homogeneizado de pulvino.

EXTRAÇÃO. Amostras de peso fresco conhecido de pulvino de folhas primárias de plantas de feijão cultivadas em canteiro externo, foram macerados em homogeneizador Virtis com metanol a 80%. Os extratos foram colocados em refrigerador e após 24 horas filtrados a vácuo. O filtrado (filtrado I) foi colocado num novo frasco e o resíduo reextraído com metanol 80% por mais 24 horas. Após nova filtragem, o filtrado II foi juntado ao filtrado I. O resí-

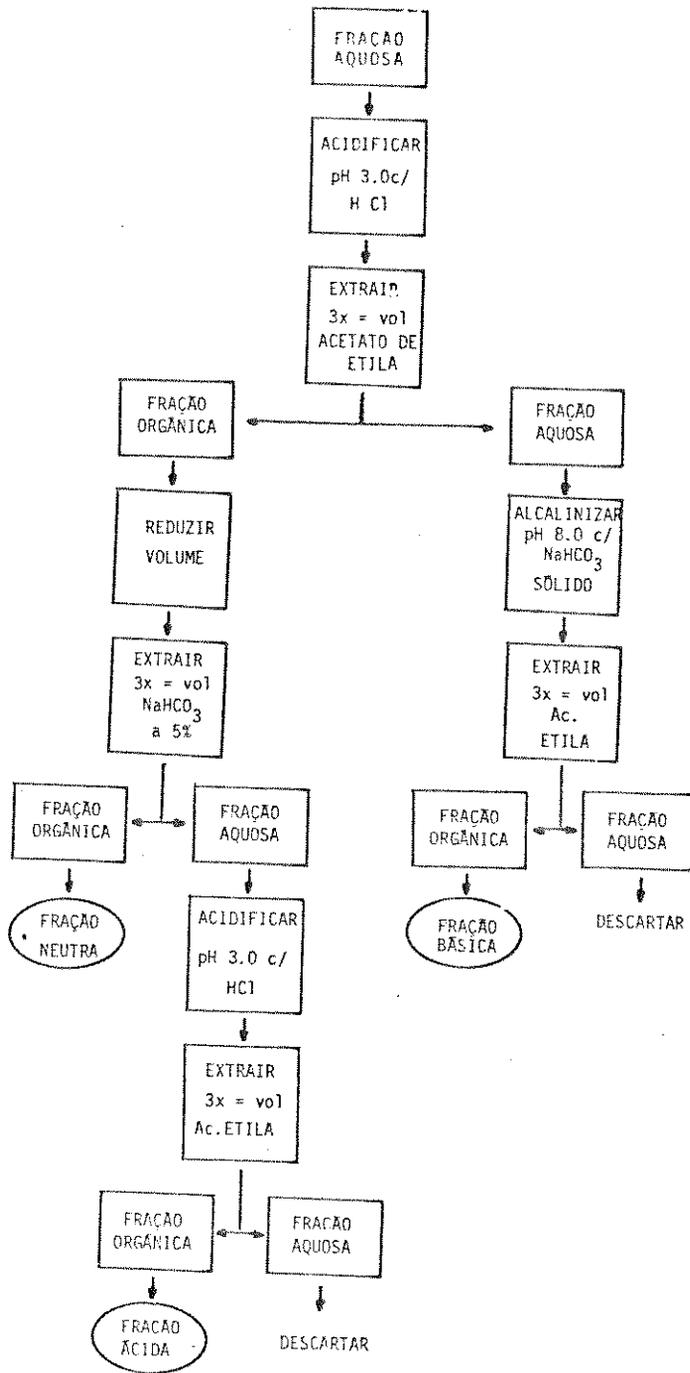
duo foi seco a 80 °C para obtenção do peso seco. O metanol foi removido do filtrado em evaporador rotatório a vácuo, sob pressão reduzida e temperatura entre 35 a 40 °C.

FRACIONAMENTO. O extrato aquoso obtido foi então fracionado de acordo com o esquema de VÁLIO modificado (VÁLIO, 1969) que é mostrado na figura 5. As frações ácida, básica e neutra obtidas foram evaporadas e retomadas em solução de HOGLAND e ARNON (1938) diluída (1/5) e biotestadas em enraizamento de folhas primárias de feijão sem pulvino.

PURIFICAÇÃO. Em alguns experimentos, as frações obtidas foram utilizadas para cromatografia de camada delgada. Foram usadas placas de sílica-gel de 0,5 - 1,0 mm de espessura e ativadas por 45 minutos a 100 °C. O extrato foi aplicado como uma faixa contínua no ponto de partida. O desenvolvimento ascendente, com percurso de 15 cm, foi realizado em cubas cromatográficas previamente saturadas com o sistema de solventes. O sistema de solventes acetato de etila: clorofórmio: ácido acético na proporção de 15:5:1 (v/v) foi usado para as frações básicas. Para serem biotestados, os cromatogramas secos ao ar, foram divididos em cinco faixas transversais correspondentes aos Rf's 0,1/0,2 a 0,8/1,0. Estas faixas foram raspadas separadamente e a sílica eluída em metanol 80% por 24 horas em geladeira. Os eluatos foram centrifugados a 8000g por 15 minutos a 4 °C, para eliminação da sílica e o pH ajustado para 6,0. Os biotestes foram montados em tubos de ensaio de 2 ml, presos a uma placa de isopor. Nestes testes foram utilizados 3 controles, todos sem extratos e tendo como meio, água destilada: um com sílica sem ter

FIGURA 5 - Esquema do fracionamento do extrato de pul_
vino em frações ácida, básica e neutra.

FIGURA 5



passado pelo sistema de solvente, mas eluída com metanol 80% e um último, sem sílica e sem metanol 80%, somente com água.

11.2 - Extração e purificação de estrógenos esteroidais.

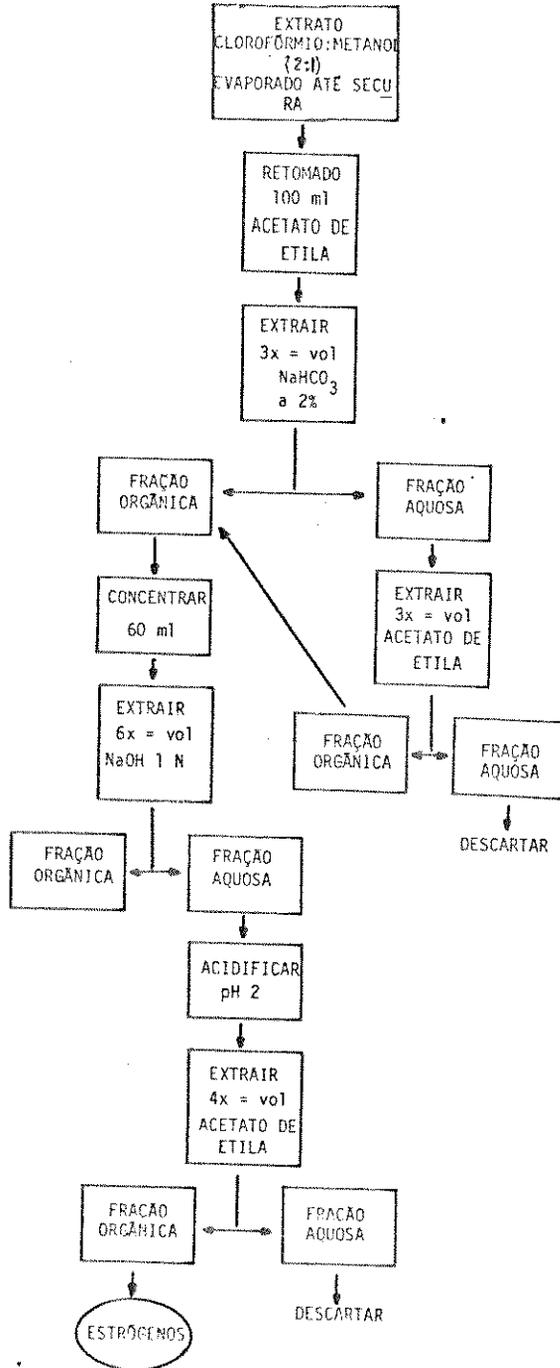
A metodologia modificada foi a de YOUNG et al. (1978).

EXTRAÇÃO. Pulvinos e secções do pecíolo imediatamente superiores a ele (6mm) foram obtidas em plantas com 45 dias de idade. O material foi macerado em homogeneizador Virtis, com clorofórmio: metanol (2:1 v/v), sendo posteriormente filtrado a vácuo em funil de Büchner. O resíduo foi extraído por reciclagem do solvente sob refluxo, usando cerca de 1000 ml de solvente em um aparelho de Soxhlet (300 ml) por 8 horas. O peso seco do resíduo foi obtido após 24 horas de secagem em estufa 80 °C. O extrato foi evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura de 36 a 40 °C até secagem. O resíduo foi retomado em 100 ml de acetato de etila. A fração orgânica foi então fracionada de acordo com os passos mostrados no esquema da figura 6.

PURIFICAÇÃO. O extrato orgânico obtido foi purificado com auxílio de cromatografia de camada delgada, usando os sistemas de solvente n-hexano: acetato de etila (17:3 v/v) e clorofórmio: metanol (95:5 v/v). O Extrato de pulvino foi inicialmente purificado em duas faixas: A (do Rf 0,33 a 0,55) e B (do Rf 0,55 a 0,76), separadas pelo sistema de solvente n-hexano: acetato de etila (17:3 v/v). As faixas dos cromatogramas fo

FIGURA 6 - Esquema da extração de estrógenos esteroidais.

FIGURA 6



ram raspadas e a sílica eluída em clorofórmio: metanol (2:1 v/v) com agitação por 30 minutos. Os eluatos foram centrifugados por 20 minutos a 879 g e os sobrenadantes reservados. A sílica foi reextraída pelo mesmo processo e o sobrenadante 2 foi juntado ao número 1, sendo o volume total reduzido por evaporação ao volume de 1 ml. Este volume foi novamente purificado em cromatografia de camada delgada.

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatofolhas alumínicas de sílica gel F₂₃₄ com espessura de 0,25 mm. Os estrógenos usados como padrões eram provenientes do Koch-Light Laboratories: 1,3,5(10)-Estratien-3,17 β diol (estradiol) e 1,3,5-Estratien-2-ol-17-one (estrona). Todos os cromatogramas foram analisados alternativamente com permanganato de potássio a 0,2% ou luz ultra-violeta (U.V.). Foram realizadas análises cromatográficas comparativas da fração orgânica da extração de estrógenos, com as frações ácida, básica e neutra obtidas pelo método de fracionamento de VÁLIO (1969) modificado, mostrado na figura 5.

EFEITO DE ESTRÓGENOS NO ENRAIZAMENTO. Os padrões de estrona e estradiol foram testados no enraizamento foliar em duas concentrações: 10^{-6} M e 10^{-8} M. Os estrógenos, por serem pouco solúveis em água, necessitam de um solvente orgânico e de um agente solubilizante para impedir a precipitação. Foi empregada uma solução de tween 80 a 0,01%:acetona (9:1 v/v) na preparação de soluções de estrona e estradiol a 10^{-4} M. As concentrações mais baixas, de 10^{-6} M e 10^{-8} M foram feitas por dilui

ção com água destilada (HEWITT e HILLMAN, 1980a). Os controles para cada tratamento foram semelhantemente preparados a partir de solução de tween 80 a 0,01%: acetona (9:1 v/v) com diluições de 1/100 e 1/10.000. O estrógeno também foi aplicado como pasta de lanolina. Paralela e semelhantemente foi testado o efeito dos extratos esteroidais de pulvino e pecíolo, na concentração de 1g de peso fresco/g de lanolina.

11.3 - Extração e dosagem de ABA do pulvino e pecíolo.

EXTRAÇÃO - Ácido abscísico foi extraído de pulvinos inferiores e pecíolos (6mm basais). Foram homogeneizadas 100g de peso fresco das referidas partes em Virtis com 1000 ml de metanol 100%. O homogeneizado foi mantido a 4 °C por 24 horas, após o que, foi filtrado em papel Whatman nº 1 usando funil de Büchner e o filtrado (filtrado I) reservado. Ao resíduo foram acrescentados mais 1000 ml de metanol 100% e a operação de extração foi repetida mais duas vezes, sendo recolhidos os filtrados II e III os quais foram reunidos ao filtrado I.

PURIFICAÇÃO. O metanol dos extratos foi eliminado totalmente por evaporação rotatória à pressão reduzida, numa temperatura de 35 °C. O resíduo foi retomado em um total de 50 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0), e filtrado em funil de Büchner com papel Watman nº 1. O Filtrado resultante foi misturado e deixado por 10 minutos, em 50g de polivinil pirrolidona previamente hidratado com mesmo tampão em que o extrato foi reto

mado. A mistura foi passada por funil Büchner e papel Whatman Nº 1 e o filtrado acidificado a pH 3,0 com HCl 3 M. Nova purificação dos extratos foi feita em colunas de sílica tipo SEP-PAK C₁₈ as quais foram pré-hidratadas com 5 ml de metanol seguido de duas aplicações de 5 ml de água destilada. Então a coluna recebia 1/12 da amostra (cada uma). O ABA foi eluído das colunas usando 3 aplicações de 5 ml de metanol 100%. À amostra (15 ml) foram acrescentadas 20 ml do tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) e o metanol evaporado à pressão reduzida, a 35 °C. O pH do resíduo, dissolvido no tampão foi ajustado para 3,0 com HCl 3 M e o extrato particionado 3 vezes com igual volume de éter dietílico. O extrato e tereó foi completamente evaporado a vácuo 30 °C. O resíduo foi retomado em 6 ml de diclorometano e passado em colunas de sílica SEP-PAK de acordo com o método de HUBRICK e REID (1980). Antes de receberem 1/6 da amostra, cada coluna foi lavada com 5 ml de diclorometano. Para a eluição do ABA, cada coluna recebeu uma sequência de 5 ml dos solventes: 6 alíquotas de diclorometano, 1 alíquota de cada uma das combinações de solventes em diclorometano: 5% de éter dietílico, 5% de acetato de etila, 5% de acetona e 4, 10, 20 e 60% de metanol e metanol 100%. Na utilização das colunas de sílica SEP-PAK observou-se sempre a manutenção da taxa de fluxo no limite de 30 segundos por 5 ml. Aos 4 últimos filtrados (20 ml) foram adicionados 10 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) e o metanol foi evaporado a vácuo na temperatura de 35 °C. O extrato ficou então dissolvido no tampão, o qual foi acidificado a pH 2,5 com HCl 3 M e particionado 3 vezes com igual volume de a

acetato de etila.

QUANTIFICAÇÃO. A fração de acetato de etila foi totalmente seca à pressão reduzida e temperatura de 35 °C. O resíduo foi retomado em 2 ml de metanol redestilado e colocado em 2 pequenos tubos e metilado com 20 µl de diazometano. O metanol foi removido sob N₂(gás), e os extratos foram retomados em diazometano etéreo. Aliquotas do extrato foram analisadas em cromatografia gasosa com detector de captura de elétron (ECD-D1). A quantidade total de ABA (cis-trans e trans-trans) dos extratos foi calculada a partir da curva padrão das áreas dos picos de ABA metilado (cis-trans e trans-trans) contendo 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg de ABA/µl de diazometano etéreo.

11.4 - ATIVIDADE PEROXIDÁSICA

A análise da atividade da enzima peroxidase (EC 1.11.1.7) foi realizada nos pulvinos e nos 4 mm do pecíolo imediatamente acima do pulvino. Isto foi feito tanto em folhas recém colhidas (dia 0), como em folhas colocadas para enraizar (com e sem pulvino) por 5 dias. As amostras eram colhidas diariamente.

EXTRAÇÃO de peroxidase foi feita segundo método descrito por LEE (1971). Meio grama de peso fresco de tecido do pulvino ou do pecíolo foi extraído por maceração em um almofariz com 8 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0). Este tampão continha 800 mM de cloreto de potássio (para extração de enzimas ligadas ionicamente e algumas insolúveis) e ascorbato de

sódio 50 mM (como substância anti-oxidante). O homogeneizado foi centrifugado a 8.000g durante 15 minutos a 40 °C. Aliquotas de 3 ml do sobrenadante foram purificadas em coluna Sephadex G-25 Medium, de dimensão de 1 x 10 cm, equilibrada com tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0). Eram coletadas frações de 6 ml. Após cada aplicação do extrato, a coluna foi lavada com 20 ml do mesmo tampão de equilíbrio, antes de ser re-utilizada.

A determinação da atividade peroxidásica foi feita utilizando-se guaiacol como doador de H⁺, por não apresentar interferência com a atividade de polifenol-oxidase (LANCE, 1955). O ensaio da atividade enzimática foi baseado no método descrito por LEE (1972). A mistura de reação contendo guaiacol 13 mM, peróxido de hidrogênio 5 mM, tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) e extrato enzimático em um volume final de 4 ml foi incubado a 37 °C em banho-maria. A atividade peroxidásica foi medida pela leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 470 nm, de minuto em minuto durante os 10 primeiros minutos e de 3 em 3 minutos durante 21 minutos.

As proteínas dos extratos foram dosadas segundo o método de LOWRY et al. (1951). Aliquotas de 3 ml do extrato purificado foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 50% e mantidos a 4 °C por 10 dias para precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15 minutos a 978 g o precipitado obtido foi ressuspenso em volume conhecido de NaOH 0,1 N. Paralelamente, foi feito um padrão de proteínas, utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) da Sigma Chemical Co., 96-99% de albumina, em concentrações de 0,0 a 200,0 mg. As amostras padrões

de BSA, todas de 1 ml de solução de NaOH 0,1 M, foram adicionados 5ml de solução alcalina de cobre e tartarato, contendo 3 g de $\text{NaCO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ em 95,5 ml de NaOH 0,1 M, 1 ml de sulfato de cobre a 10% em água destilada e 2 ml de tartarato de potássio e sódio a 10% em NaOH 0,1 M. Após 15 minutos, foi adicionado o reagente de Folin a 50% em água destilada (Reativo de Folin-Ciocalteu Queel Indústrias Químicas S/A), sendo os tubos agitados imediatamente. Após estabilização da cor azul, foi lida a absorbância das soluções a 630 nm. Através de uma curva padrão de BSA, calculou-se a quantidade de proteína encontrada nos extratos.

12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando-se coeficiente de variação, análise de regressão e análise de variância com cálculo da DMS a 5%, Duncan, Tuckey e teste t. Para melhor visualização dos resultados, as respostas estatísticas foram expressas nas tabelas onde, as médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si (SNEDECOR, 1962).

IV - RESULTADOS

1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Nas folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, os pulvinos, em número de dois estão localizados na base da folha onde o pecíolo se liga ao caule (pulvino inferior, basal ou proximal) e na região apical do pecíolo onde este se liga à lâmina foliar (pulvino superior, apical ou distal). Em folhas com 10 dias de idade, foi determinado o tamanho dos pulvinos determinando-se o peso fresco, comprimento e diâmetro (tabela 1). Como pode ser comprovado, o pulvino basal é mais pesado e mais grosso que o pulvino apical.

A análise anatômica dos pulvinos, bem como da região basal do pecíolo mostra que a organização interna destas regiões segue o padrão característico da espécie.

O pulvino basal, na sua região inferior apresenta o sistema vascular reunido em um cilindro estreito sendo difícil a delimitação dos feixes (figura 7). Este sistema está envolvido por uma fina faixa de esclerênquima e rodeado por uma região cortical bem desenvolvida, que se mantém ao longo de todo o pulvino, sendo limitada por uma epiderme de células caracteristicamente organizadas, onde podem ser vistos aparelhos estomáticos. Um detalhe da organização da região limite entre cilindro central e região cortical (figura 8) mostra o xilema e floema ligados por uma tênue faixa de câmbio vascular e protegidos externamente pela camada esclerenquimatosa que limita a conexão do sistema vascular com o parênquima cortical. À medida que se distancia da base, o

TABELA 1. Tamanho dos pulvinos de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca
São apresentadas as médias acompanhadas do desvio padrão.

PULVINO	PESO FRESCO (mg)	COMPRIMENTO (mm)	DIÂMETRO (mm)
basal	18,69 [±] 4,70	3,48 [±] 0,47	3,08 [±] 0,22
apical	10,24 [±] 2,15	3,21 [±] 0,41	2,34 [±] 0,14

FIGURA 7 - Pulvino basal. Aspecto da organização da região basal do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Corte transversal evidenciando uma larga região cortical (RC). (2,5 x 1,6 x 10).

FIGURA 8 - Pulvino basal. Detalhe do cilindro vascular da região basal do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Corte transversal mostrando o xilema (X) separado do floema (F) por uma estreita faixa cambial (FC). Feixes esclerenquimáticos (FE) separam o floema da região cortical (RC). (20 x 10).

FIGURA 7

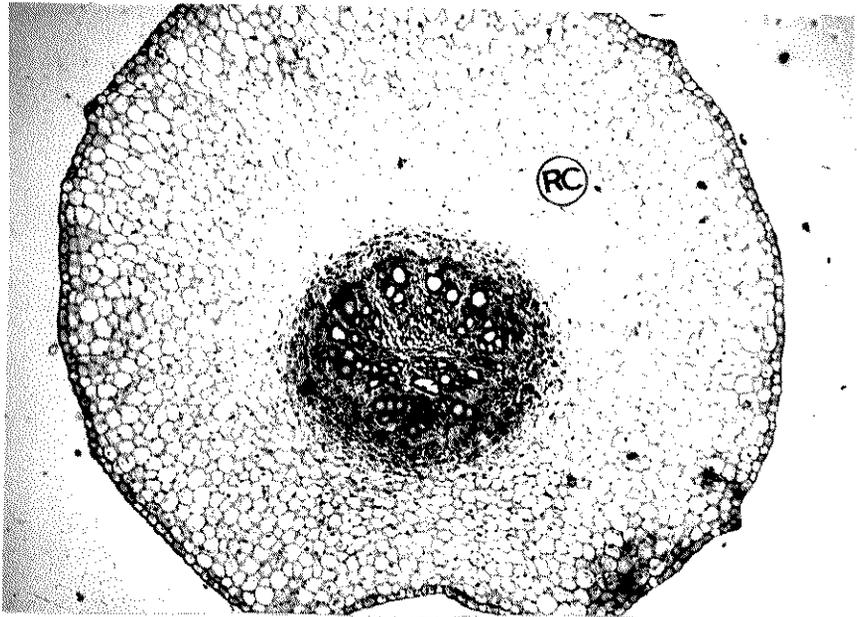
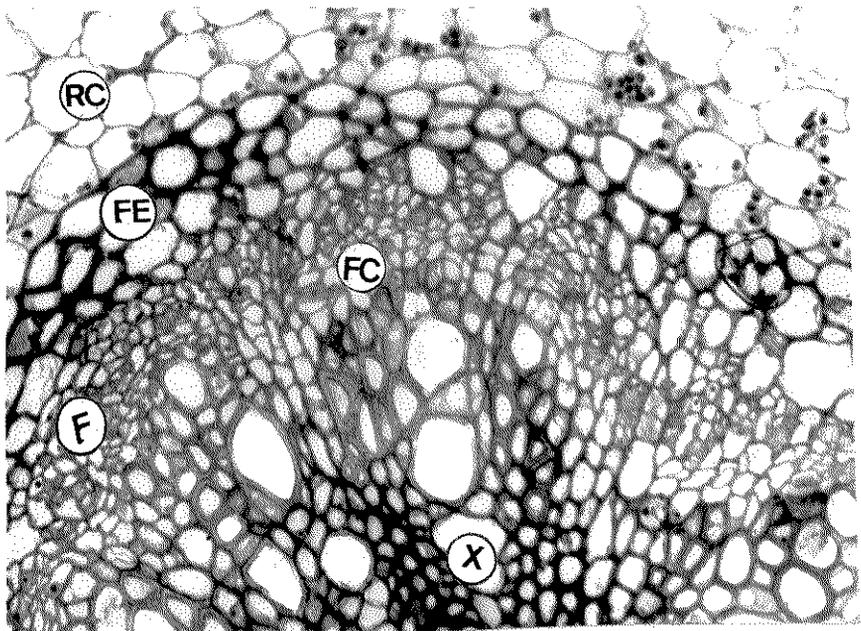


FIGURA 8



sistema vascular começa a se separar em 5 feixes colaterais e logo, os dois feixes adaxiais se dividem em dois, dando origem a dois feixes adaxiais menores que começam a se separar do cilindro central. Na metade superior do pulvino, a individualização e divergência dos feixes vasculares vai ampliando o lumen da estele e diminuindo gradativamente a espessura da região cortical. No ápice do pulvino, já podem ser vistos 5 feixes vasculares formando um círculo principal, ligeiramente deformado em relação à face adaxial onde correm os feixes vasculares menores (figura 9).

A organização epidérmica característica desta estrutura pode ser melhor evidenciada em corte longitudinal, onde podem ser vistas as células epidérmicas, bem como as corticais periféricas que por alteração da turgescência permitem a movimentação nictinásticas das folhas. A figura 10 mostra a região extensora, com as células mencionadas, encolhidas, provocando um "dobramento" na epiderme, e a região fletora, na figura 11, com as células túrgidas, permitindo uma distensão da epiderme, mantendo assim a folha em posição "fechada".

No pecíolo, os 5 feixes principais estão bem separados formando uma eustele e os feixes adaxiais colaterais continuam a seguir separados do cilindro central, correndo paralelamente ao longo do eixo principal, imersos na região cortical. (figura 12). Uma visão detalhada de um feixe vascular (figura 13) mostra o xilema separado do floema por uma faixa cambial bem evidente, limitada ao feixe vascular. No floema podem ser vistas células companheiras e parenquimáticas bem desenvolvidas, encimadas por esparsos feixes esclerenquimáticos e uma estreita região

FIGURA 9 - Pulvino basal. Aspecto da organização do sistema vascular na região superior do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Corte transversal. (6,5 x 1,25 x 10).

FIGURA 10 - Pulvino basal. Corte longitudinal da região adaxial do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

A fotografia mostra as células epidérmicas caracteristicamente contraídas, provocando o enrugamento da periferia da estrutura permitindo o "fechamento" da folha. (6,3 x 1,25 x 10).

FIGURA 11 - Pulvino basal. Corte longitudinal da região abaxial do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

A fotografia mostra as células periféricas túrgidas, mantendo a superfície da estrutura distendida. (6,3 x 1,25 x 10).

FIGURA 9

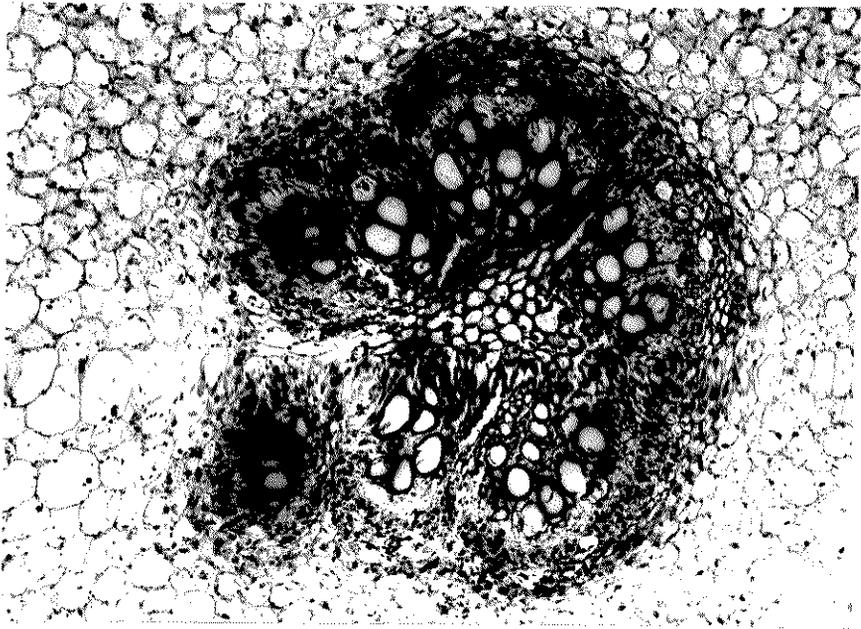


FIGURA 10

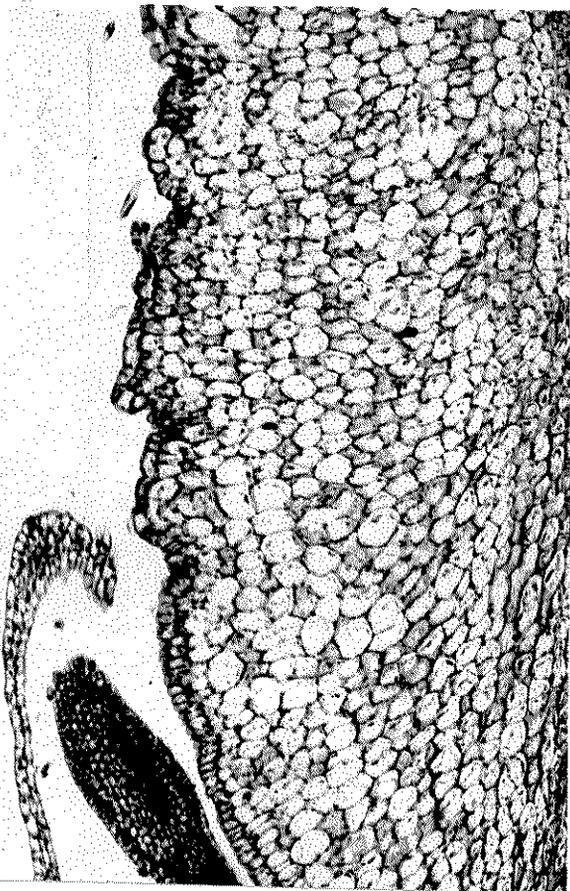


FIGURA 11

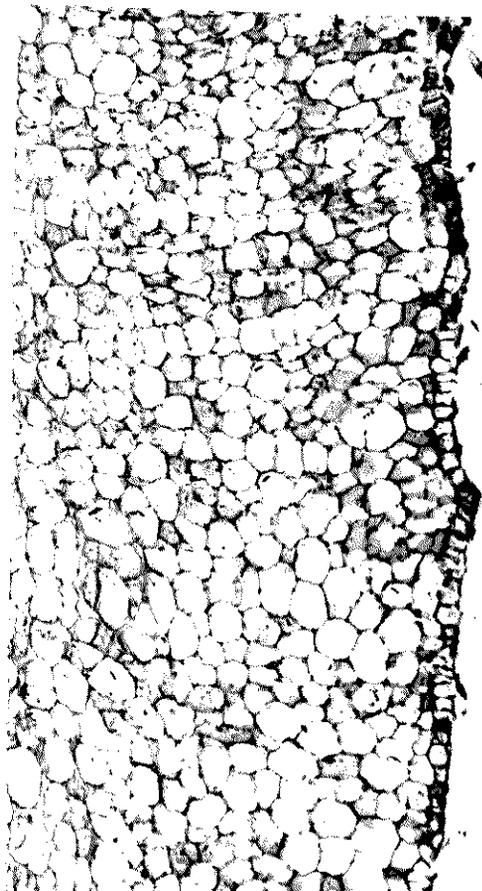


FIGURA 12 - Pecíolo. Aspecto geral da região basal do pecíolo de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.
Corte transversal, evidenciando uma medula (M) desenvolvida e uma estreita região corticular (RC). (2,5 x 1,6 x 10).

FIGURA 13 - Pecíolo. Detalhe de um feixe vascular colateral do corte transversal da região basal do pecíolo de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.
Corte transversal: uma faixa cambial (FC) para o xilema (X) do floema (F) com muitas células companheiras. (20 x 10).

FIGURA 12

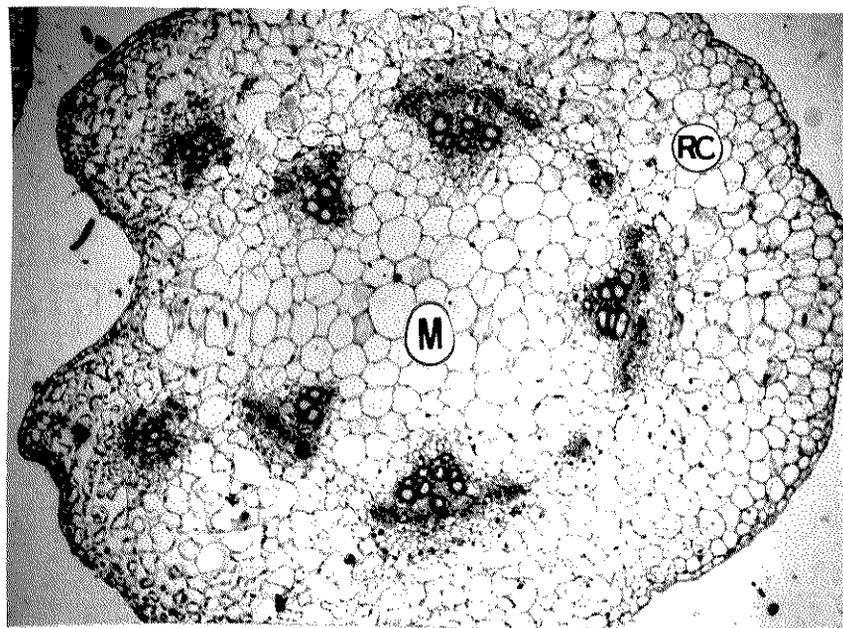
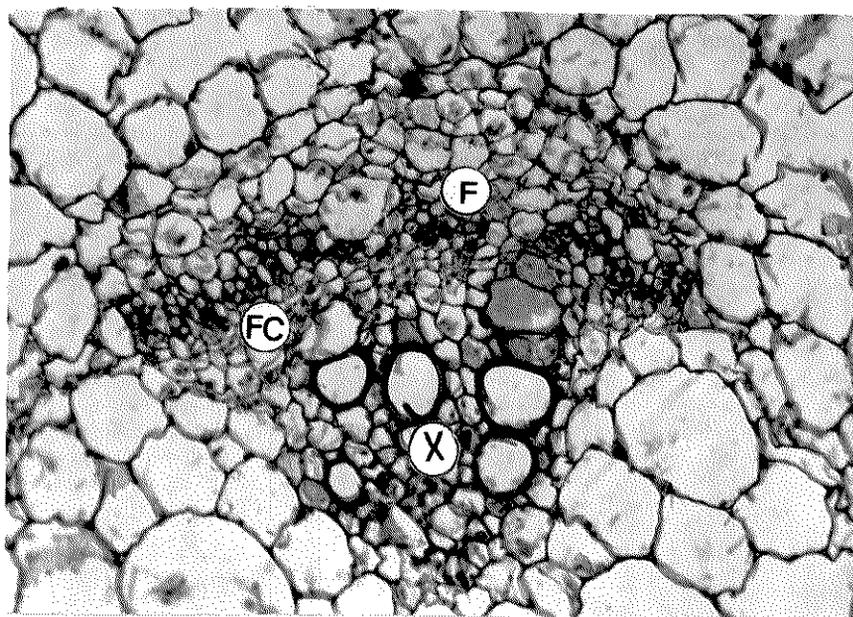


FIGURA 13



cortical. Também na epiderme do pecíolo, podem ser observados es
parsos aparelhos estomáticos.

A estrutura do pulvino superior é caracterizada pe
la aproximação dos 5 feixes vasculares que se encontravam bem de
limitados e afastados na região superior do pecíolo. À medida que
se aproximam, os dois feixes laterais se unem ficando a estru-
ta vascular constituída por 3 cordões separados por uma larga re
gião cortical (figura 14). No limite superior do pulvino, o fei
xe vascular dorsal se continua com a nervura média da lâmina en
quanto os laterais vão originar as nervuras laterais principais.

Não foram detectadas alterações na estrutura ana-
tômica da região basal do pecíolo ou do pulvino das folhas (com
e sem pulvino) durante as primeiras 24 horas em condições de en
raizamento.

Nas folhas sem pulvino mantidas por mais tempo em
condições de enraizamento, a rizogênese se estabelece preferenci-
almente na parte basal do pecíolo. Nestas folhas, como pode ser
visto na figura 15, as raízes adventícias se formam a partir das
células parenquimáticas da região do floema dos feixes vasculares.
O primórdio radicular cresce em direção à periferia, através da
região cortical, até protrair na epiderme (figura 16).

2 - ANÁLISE DE CRESCIMENTO DAS FOLHAS

A determinação do padrão de crescimento das
folhas primárias de plantas de *Phseolus vulgaris* L. cv. carioca,
feita a partir de medidas lineares dos comprimentos da lâmina
(nervura mediana) e do pecíolo, mostra que em ambos os casos, as
curvas apresentam forma sigmóide (figura 17.A). Entretanto, a

FIGURA 14 - Pulvino apical. Aspecto do cilindro central na região mediana do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Corte transversal, evidenciando a medula (M) reduzida e o sistema vascular formado por dois arcos distintos. (10 x 10).

FIGURA 15 - Início de formação de raiz adventícia a partir de um feixe adaxial do pecíolo de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Corte transversal de folha com 5 dias de condições de enraizamento. (10 x 10).

FIGURA 16 - Formação do primórdio radicular adventício a partir do feixe adaxial, no pecíolo de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Corte transversal com 3µm de espessura de folhas com 5 dias de condições de enraizamento (10 x 10).

FIGURA 14

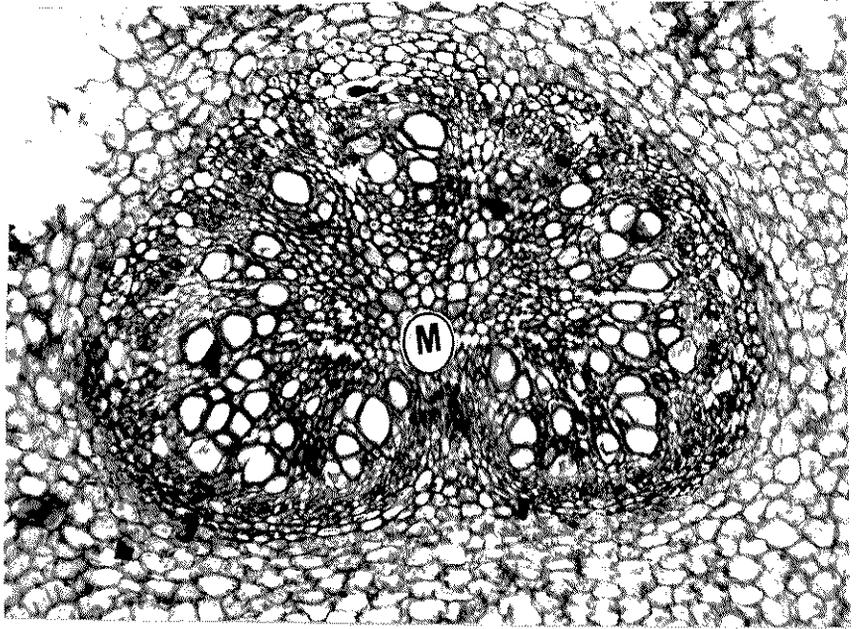


FIGURA 15

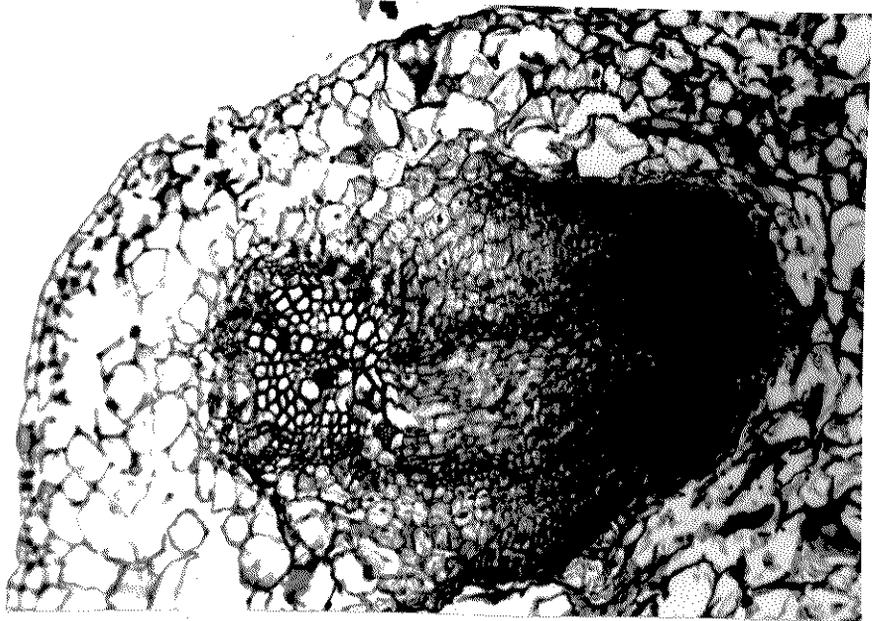


FIGURA 16

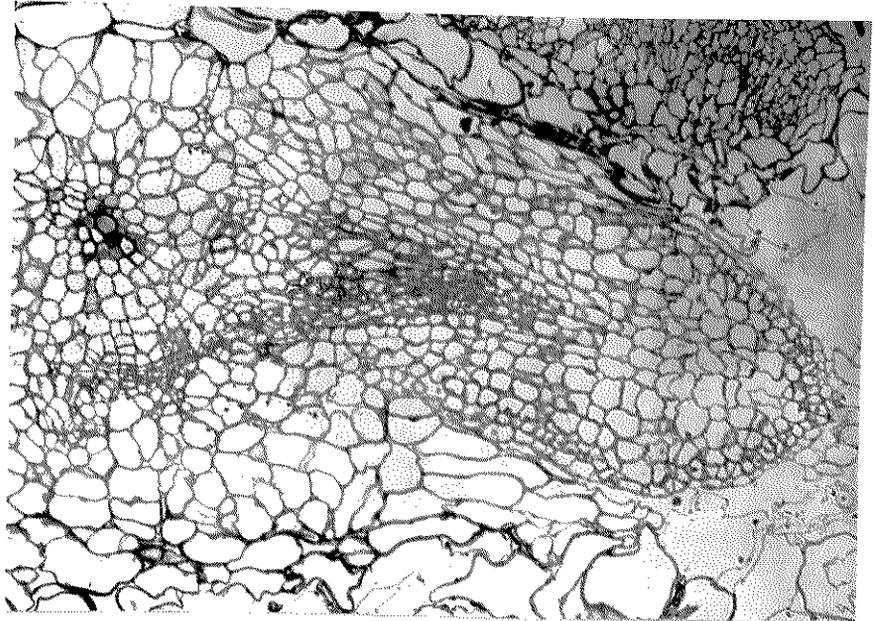


FIGURA 17 - Crescimento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Valores diários, média de 20 repetições. O valor inicial foi obtido de sementes não embebidas.

● - comprimento da nervura média

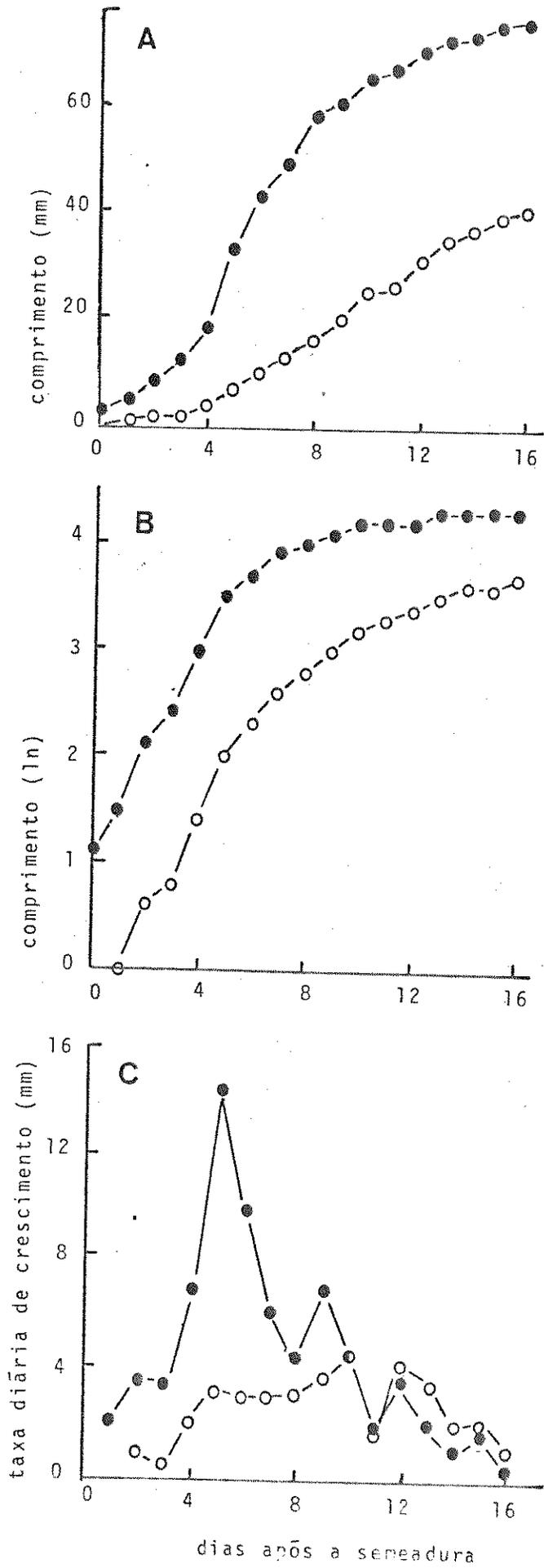
○ - comprimento do pecíolo

A - Curva de crescimento (mm)
Comprimento x dias

B - Curva de crescimento (ln)
Valores de comprimento transformados em
garitmo neperiano (ln)

C - Taxa diária de crescimento.
Comprimento final menos comprimento inicial
x dias.

FIGURA 17



curva logarítmica, (figura 17.B) especialmente no caso da lâmina foliar, não evidencia o período de latência, já se iniciando com a fase exponencial, denunciando assim o crescimento ininterrupto e acelerado da plúmula já existente na semente. O crescimento exponencial em ambas as partes analisadas ocorre até o 5º dia após a semeadura.

A taxa diária de crescimento mostra um ponto máximo bem definido para a lâmina, no 5º dia, enquanto as variações no pecíolo são menores, com um crescimento máximo ocorrendo por volta do 10º dia (figura 17.C).

3 - ENRAIZAMENTO DA FOLHA PRIMÁRIA

A idade da folha foi determinada convencionalmente pelo dia de semeadura.

O enraizamento foi testado em dois estádios de desenvolvimento: folhas com 6, 7, 8 e 9 dias de semeadura, após a fase exponencial de crescimento, mas ainda em expansão laminar e peciolar e folhas com 15 dias de idade, portanto após o final da fase de expansão. Os resultados (tabela 2) indicam que as folhas com pulvino, independentemente da idade, não enraizam. A eliminação do pulvino permite a formação de raízes na base do pecíolo, onde os primórdios se originam diretamente do tecido peciolar (tabela 2).

Pode, também, ser observado que em folhas sem pulvino a idade parece não afetar o número médio de raízes formadas por folha, o qual não varia muito nem mesmo quando a porcentagem de enraizamento cai para 60%, como no caso de folhas

TABELA 2. Efeito da idade da folha primária no enraizamento foliar de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.
Média e porcentagem de 20 repetições.

IDADE DA FOLHA (DIAS)	FOLHAS COM PULVINO		FOLHAS SEM PULVINO	
	fls.enraiz. (%)	raiz p/fl. (\bar{x})	fls.enraiz. (%)	raiz p/fl. (\bar{x})
6	0	0	90	6,1
7	0	0	90	5,6
8	0	0	100	8,3
9	0	0	100	7,0
15	0	0	60	8,6

com 15 dias de idade.

O acompanhamento diário da resposta de enraizamento em folhas sem pulvino, nas várias fases mencionadas, mostra que a idade da folha afeta a velocidade de enraizamento (figura 18 A). Folhas mais novas, com 6 e 7 dias enraizam mais lentamente que folhas com 8, 9 e 15 dias, mais próximas da expansão total, as mais novas apresentando também um menor número médio de raízes por folha (tabela 2).

Analisando-se o número de folhas enraizadas (figura 18 B), verifica-se que independentemente do dia do início do aparecimento das primeiras raízes ou do resultado final, a porcentagem máxima é alcançada no 6º dia em condições de enraizamento. Das várias idades testadas, apenas folhas com 15 dias de idade apresentam redução no enraizamento. Além disso, um número menor de folhas com 15 dias de idade enraizam (tabela 2). Em vista dos resultados das figuras 18 A e 18 B, nos demais experimentos de enraizamento, foram utilizadas folhas com 8 dias de idade, pois não diferem na média de raízes das de 9 e 15 dias (figura 18 A), mas parecem alcançar o máximo de enraizamento mais rapidamente (figura 18 B).

Para verificar um possível efeito das condições fotoperiódicas ambientais onde se desenvolvem as plantas doadoras, no enraizamento foliar, foi alterado artificialmente o regime de luz no desenvolvimento das plantas para 8 e 18 horas, dias curtos e longos respectivamente. Os resultados não mostram qualquer modificação da resposta de enraizamento das fo

FIGURA 18 - Efeito da idade foliar no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. carioca, sem o pulvino basal.

Valores médios de 20 replicatas. Folhas com 6(●), 7(▲), 8(○), 9(△) e 15(■) dias após a sementeira.

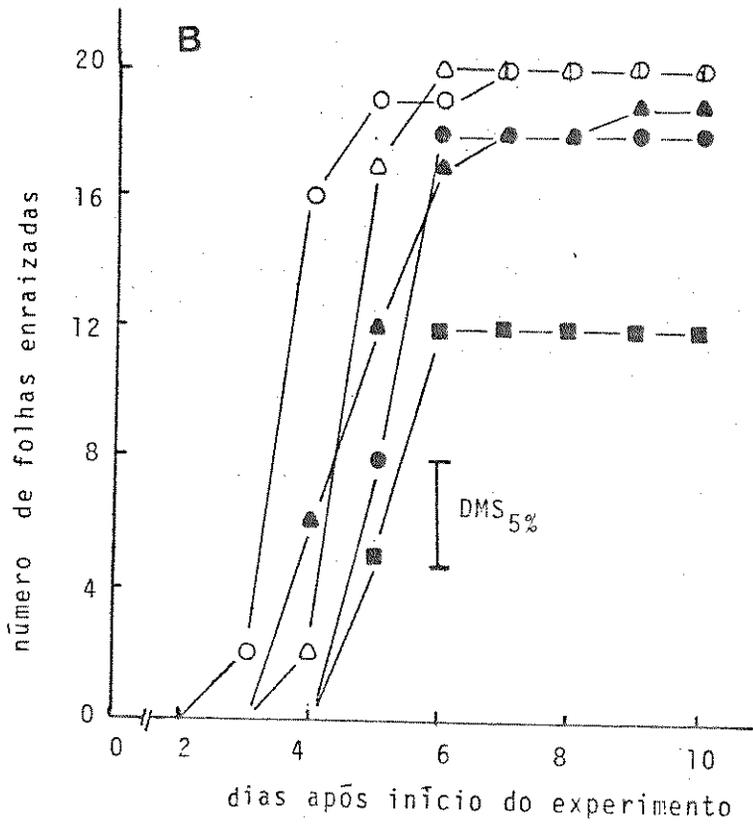
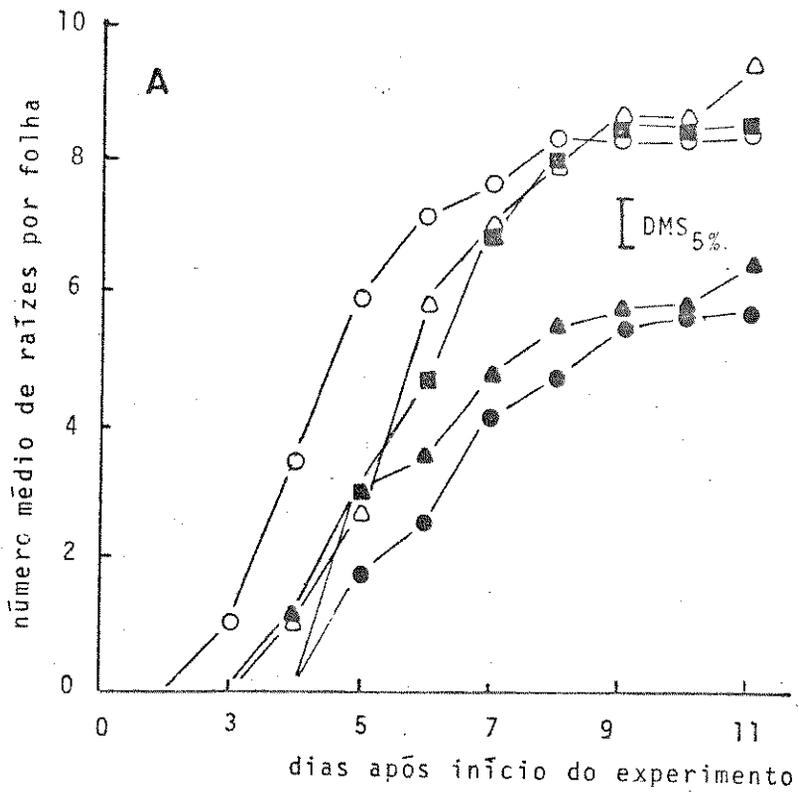
A - Taxa de enraizamento: número médio de raízes por folha.

O teste t mostrou que folhas de 6 e 7 dias são estatisticamente diferentes das outras 3 idades: $DMS_{5\%}$ calculada para o 99 dia é mostrada na figura.

B - Número de folhas enraizadas.

$DMS_{5\%}$ calculada para o dia 6 após o início do experimento é mostrada na figura.

FIGURA 18



lhas em relação ao fotoperíodo em que cresceram as plantas doadas (tabela 3).

O efeito da aeração da solução de enraizamento também foi testado, porém não foram observadas diferenças significativas nas respostas.

4 - INFLUÊNCIA DO PULVINO NO ENRAIZAMENTO

4.1 - Quantidade de tecido do pulvino.

Os resultados constantes das tabelas 4 e 5, mostram que tanto o pulvino apical como o basal inibem o enraizamento. Evidencia-se ainda, destes dados, que o efeito inibidor permanece mesmo quando uma pequena porção desta estrutura é mantida na região basal da estaca. No entanto, a continuidade com o tecido do pecíolo, mesmo na ordem de 2 ou 4 mm é suficiente para o restabelecimento da capacidade de enraizamento. Em casos esporádicos de enraizamento de folhas com pulvino, as raízes se diferenciam a partir de um calo formado na região cortada do pulvino.

Face à constatação da existência do efeito inibidor do enraizamento em ambos os pulvinos (tabelas 4 e 5), os experimentos subsequentes foram sempre realizados em relação ao pulvino basal.

4.2 - Ação mecânica.

A epiderme diferenciada de um órgão pode perder suas características plástica e elástica, tornando-se resistente à ampliação do seu volume. Por outro lado, em alguns casos, tem sido notado que integridade da epiderme exerce correlativamente um efeito inibidor do processo de diferenciação. Entretanto, a

TABELA 3. Tratamento fotoperiódico em plantas de *Phaseolus vulgaris* L.cv. carioca e seu efeito no enraizamento das folhas primárias.

Média e porcentagem de 20 repetições

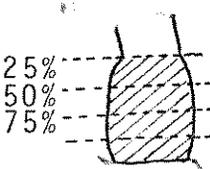
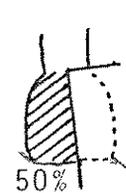
FOTOPERÍODO	FOLHAS COM PULVINO		FOLHAS SEM PULVINO	
	% enraizto	raízes p/fl. (\bar{x})	% enraizto	raízes p/fl. (\bar{x})
Dias curtos	0	0	85	4
Dias longos	0	0	85	5

TABELA 4. Efeito do pulvino apical no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L.cv. carioca. Média e porcentagem de 20 repetições.

TRATAMENTO	ENRAIZAMENTO (%)	RAÍZES p/fl. (\bar{x})
sem pulvino	50	4,8
com 100% pulvino	0	0
com 50% pulvino	0	0
com 25% pulvino	0	0
com 100% pulvino + 2 mm pecíolo	80	7
com 100% pulvino + 4 mm pecíolo	100	20,2

TABELA 5. Efeito do pulvino basal no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Média e porcentagem de 20 repetições. Os esquemas laterais indicam a orientação das secções no pulvino basal.

	TRATAMENTO	ENRAIZAMENTO (%)	RAÍZES p/fl. (\bar{x})
	sem pulvino	100	14.6
	com 100% pulvino	0	0
	com 75% pulvino	0	0
	com 50% pulvino	0	0
	com 25% pulvino	0	0
	com 50% pulvino Lateral		
	no pecíolo	80	3,5
	no pulvino	50*	1,6*

* enraizamento a partir de calo.

extirpação da epiderme do pulvino, bem como execução de cortes longitudinais (sulcos) nesta estrutura não suprimiu a inibição ao enraizamento (tabela 6).

4.3 - Ação do tecido vivo.

O efeito inibidor do pulvino é eliminado com a morte de suas células, ainda que, nestas condições, permaneça ligado ao pecíolo. Este efeito é também afastado com a interrupção da continuidade do tecido vivo (anelamento) entre o pulvino e o restante do pecíolo (tabela 6). Em ambos os casos, o enraizamento passa a ocorrer no pecíolo, na região imediatamente superior ao tratamento.

4.4 - Difusado de pulvino.

O exudado de pulvino coletado em agar, quando aplicado a pecíolos de folhas sem pulvino não afetou o enraizamento destas (tabela 7).

4.5 - Transpiração.

A análise da transpiração de folhas com 0, 1, 2, 3 e 4 dias em condições de enraizamento, mostrou que tanto folhas com pulvino como sem ele apresentam um aumento substancial da transpiração quando mantidas por um dia em condições de enraizamento, em relação a todos os outros pecíolos nestas condições. Entretanto, com 4 dias de tratamento, as folhas com pulvino apresentaram uma sensível diminuição da transpiração e embora não diferindo das folhas sem pulvino deste mesmo tratamento é menor que a taxa observada nas folhas sem pulvino dos outros tratamentos: dias 1, 2 e 3 (figura 19).

TABELA 6. Efeito do pulvino basal no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca. Teste de efeito mecânico da epiderme, morte e isolamento do pulvino por anelamento.

Média e porcentagem de 20 repetições.

PARÂMETROS	SEM PULVINO	COM PULVINO (intacto, s/epiderme ou c/sulcos)	PULVINO MORTO	ANELAMENTO
enraizamento (%)	93	0	80*	93*
raízes p/fl. (\bar{x})	12,3	0	28,6*	9,1*

* - enraizamento acima do tratamento

TABELA 7. Efeito de difusado de pulvinos basais de folhas primárias no enraizamento foliar de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Média e porcentagem de 15 repetições.

PARÂMETROS	FOLHAS SEM PULVINO	
	agar puro	agar + difusado
% enraizamento	83	83
\bar{x} raízes p/fl.	8,4	9,0

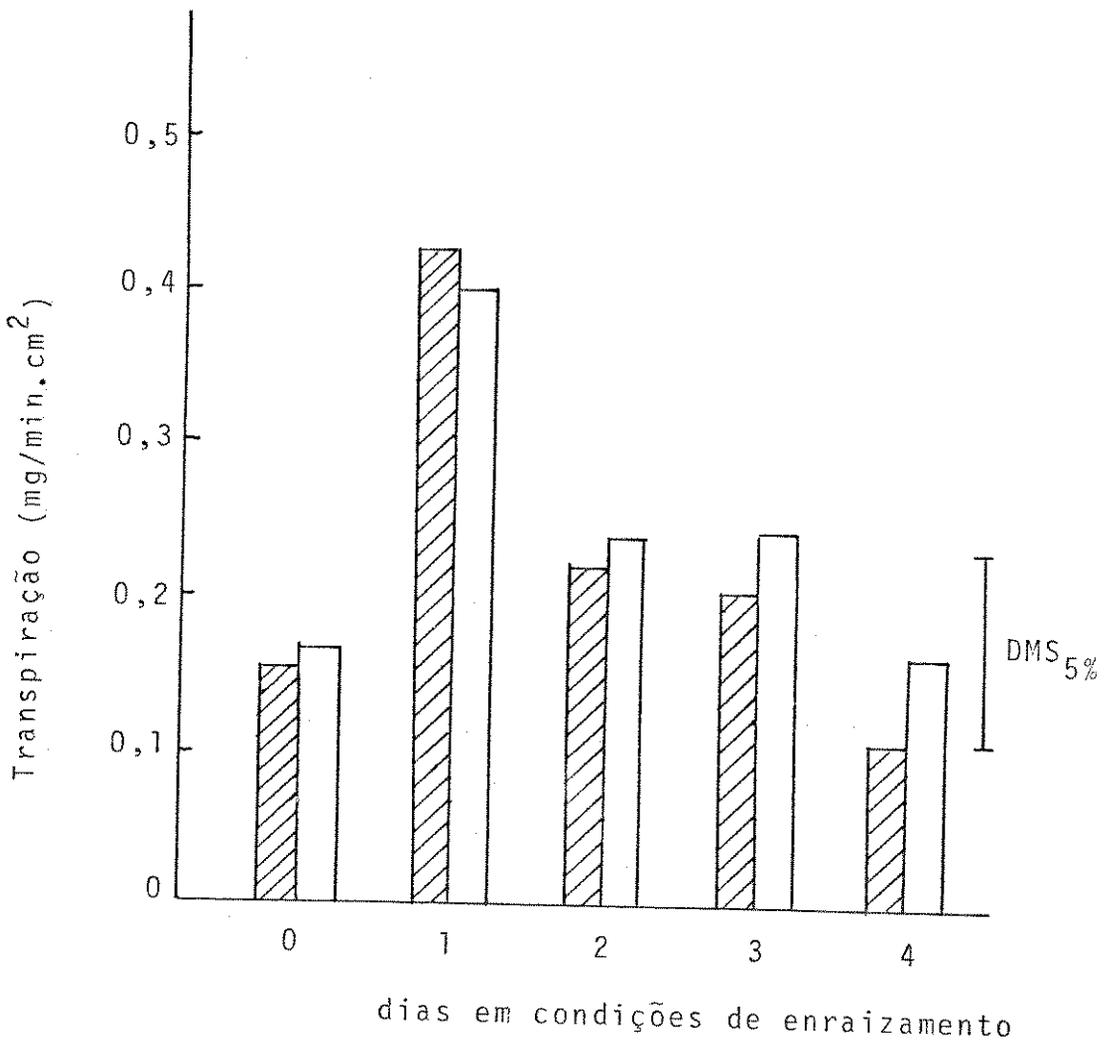
FIGURA 19 - Transpiração de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Folhas em condições de enraizamento por 0, 1, 2, 3 e 4 dias. Valores médios de 5 repetições.

 - folhas com pulvino

 - folhas sem pulvino

FIGURA 19



4.6 - Translocação de fotossintatos.

Os resultados do estudo de translocação de fotossintatos em folhas com e sem pulvino, alimentadas com $^{14}\text{CO}_2$ são mostrados nas figuras 20.A e 20 B. Os dados indicam que o pulvino não inibe a translocação de fotossintatos. Folhas com pulvino apresentam uma diminuição gradativa da translocação, do dia 0 para o dia 4 em condições de enraizamento, enquanto que nas folhas sem pulvino ocorre uma variação não padronizada.

5 - EFEITO DE SUBSTÂNCIAS FORNECIDAS PELA LÂMINA FOLIAR:

5.1 - Fotossintatos.

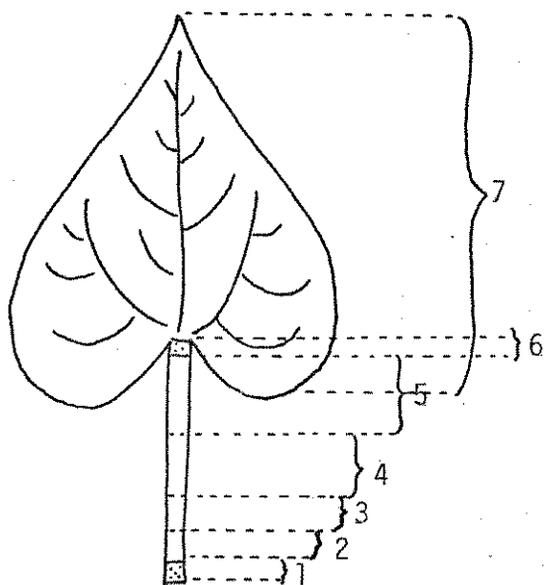
5.1.1 - Redução da área foliar.

Os resultados da eliminação de diferentes quantidades da lâmina foliar, até 50% (inclusive) (figura 21), evidenciam uma proporcionalidade entre a área da lâmina que permanecia e a média do número de raízes formadas. Não há diferença no número médio de raízes formadas em folhas com 50 ou 25% da área. Folhas sem lâmina não enraizam. Pode-se observar ainda que folhas com 100% da lâmina, quando mantidas no escuro, apresentam um número médio de raízes semelhante ao de folhas com 25% da lâmina, mantidas no fotoperíodo normal de 12 horas. Entretanto, folhas com 100 e 75% da lâmina mantidas em fotoperíodo de 12 horas apresentaram maior enraizamento do que folhas intactas no escuro. As raízes formadas em folhas mantidas no escuro, são finas e curtas.

FIGURA 20 - Translocação de ^{14}C em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Folhas alimentadas por 30 minutos com $^{14}\text{CO}_2$ após serem mantidas por 0 (●), 1 (■), 2 (▲) e 4 (▼) dias em condições de enraizamento. Médias de 5 repetições.

Regiões das folhas seccionadas para análise:



1. pulvino basal
2. base do pecíolo
3. intermédio inferior do pecíolo
4. meio do pecíolo (1 cm)
5. ápice do pecíolo
6. pulvino apical
7. lâmina

A - Folhas com pulvino

B - Folhas sem pulvino

FIGURA 20

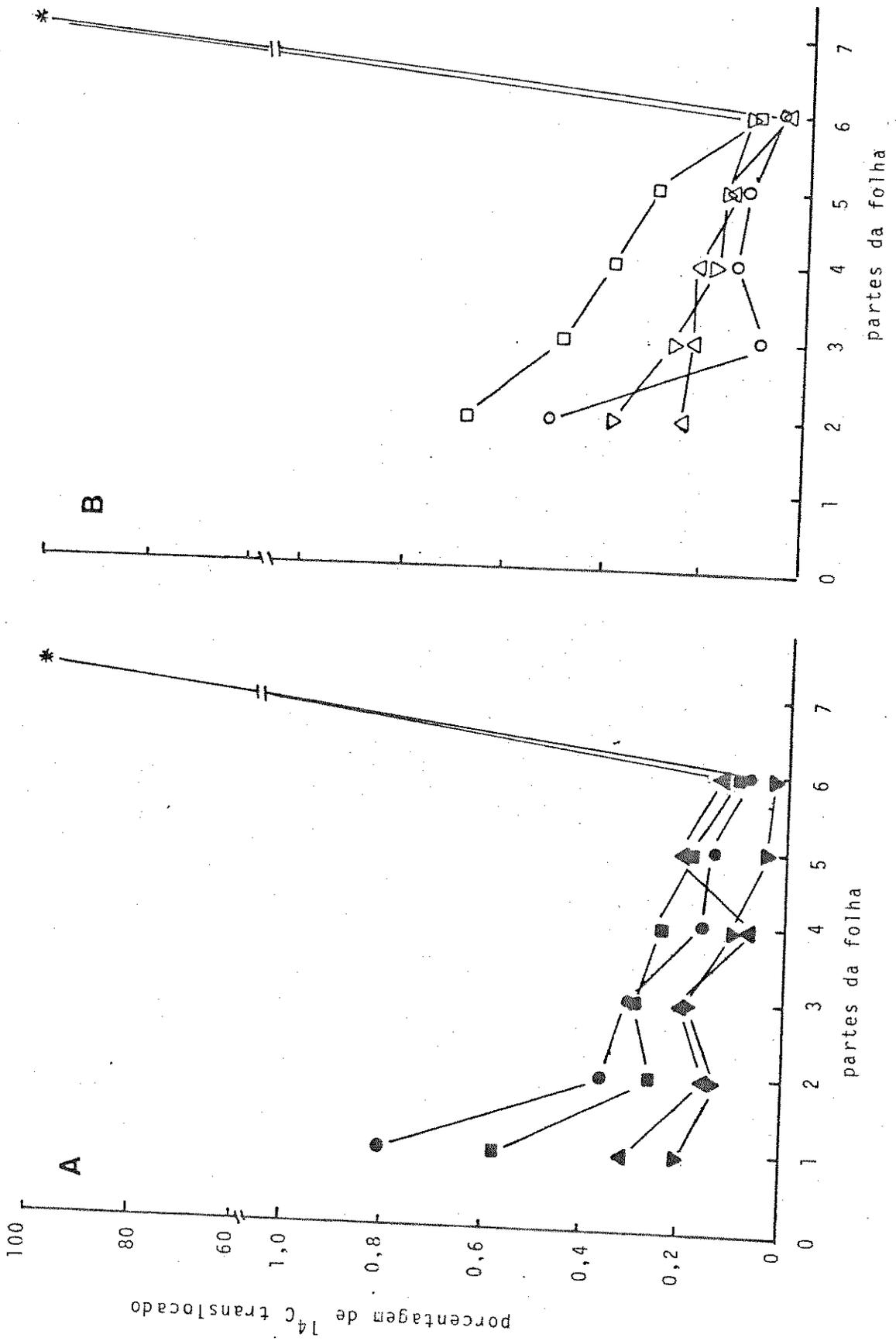
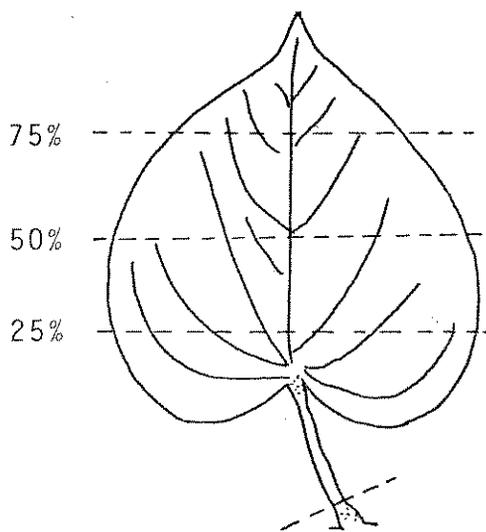
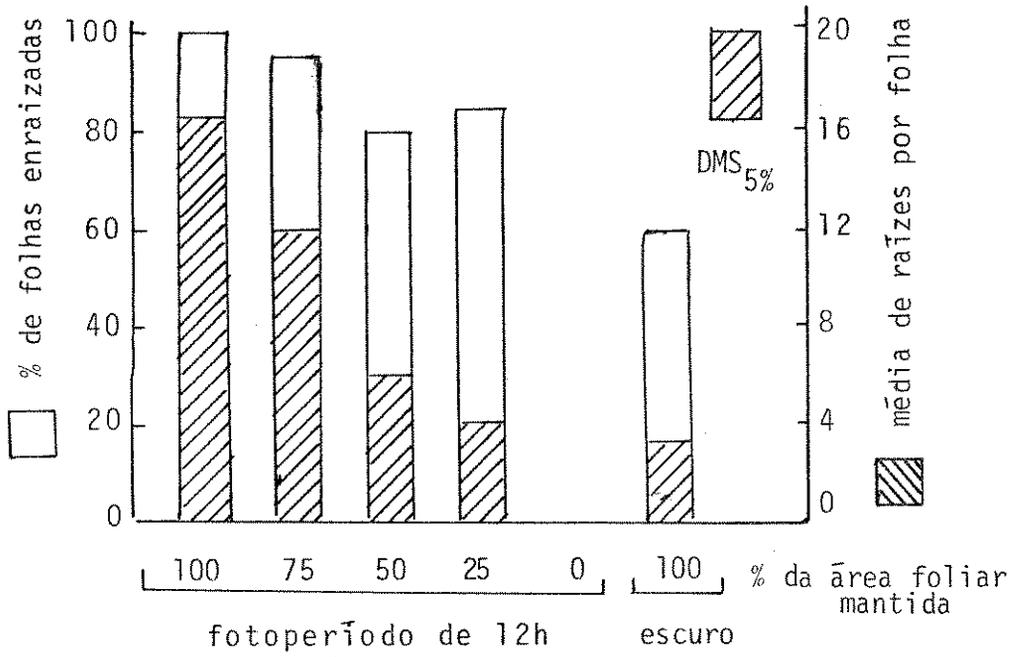


FIGURA 21 - Efeito da área da lâmina foliar no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L.cv. carioca.

Folhas com 100, 75, 50, 25 e 0% da lâmina, ^{re}presentado no esquema abaixo, em fotoperíodo de 12 horas e com 100% da lâmina no escuro.

Média e porcentagem de 20 repetições e DMS_{5%} para o número média de raízes por folha.

FIGURA 21



5.1.2 - Interrupção da nervura média.

O seccionamento da nervura média provoca o enraizamento acima da região seccionada, somente quando a interrupção se localiza nas regiões basal e mediana da lâmina. Quando o seccionamento é apical, ou não foi feito, o enraizamento ocorre somente na base do pecíolo (figura 22). O enraizamento na base do pecíolo continua a ocorrer semelhante e independentemente da posição do tratamento. O número médio de raízes por folha é maior (estatisticamente) nas folhas intactas do que nas seccionadas (figura 22).

5.1.3 - Efeito de períodos crescentes de escuro no conteúdo de clorofila e enraizamento.

O efeito de períodos de escuro de 0 a 144 horas foi verificado no conteúdo de clorofila e no enraizamento de folhas ligadas à planta e em condição de enraizamento, de acordo com a metodologia já descrita em material e métodos. A tabela 8 mostra que não houve uma relação entre o aumento do período de escuro e o conteúdo total de clorofila. Entretanto, um período de escuro de 96 horas já inibe totalmente o processo de enraizamento.

5.1.4 - Inibição do processo fotossintético.

O tratamento de folhas com o inibidor de fotossíntese DCMU quando foi adicionado ao substrato de enraizamento reduziu a rizogênese e inibiu-a totalmente quando aplicado sobre a lâmina foliar (tabela 9).

FIGURA 22 - Efeito da interrupção da nervura mediana da lâmina foliar no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal.

Interrupções nas regiões apical, mediana e basal, conforme esquema abaixo do gráfico. Média e porcentagem de 20 repetições e DMS_{5%} para o número médio de raízes por folha.

□ - na base do pecíolo

▣ - acima da interrupção

FIGURA 22

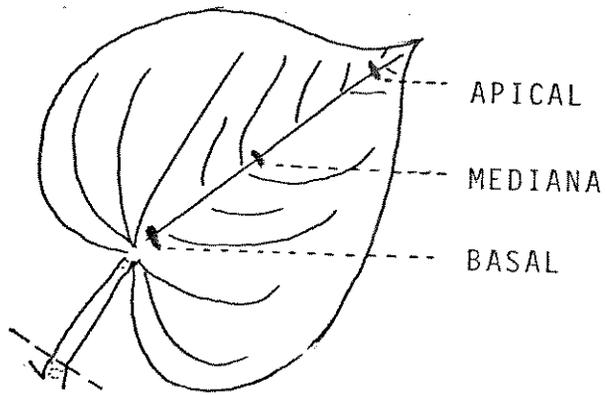
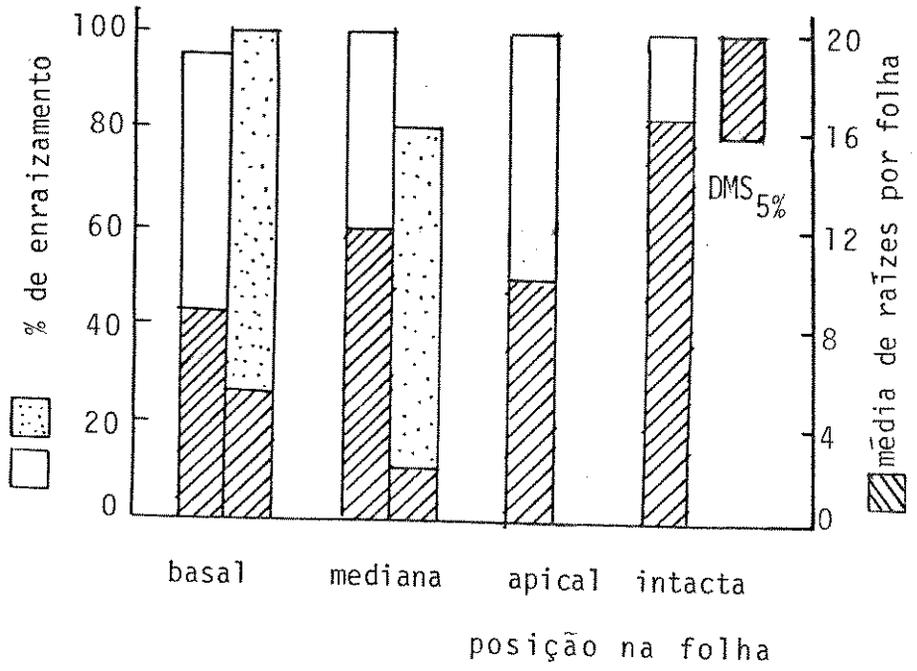


TABELA 8 - Clorofila total e enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* mantidas no escuro, presas às plantas doadoras ou destacadas das mesmas em condições de enraizamento.

Valores médios de 20 repetições para enraizamento e 6 medidas para clorofila total. O teste F não mostrou significância.

HORAS DE ESCURO	FOLHAS NA PLANTA			FOLHAS DESTACADAS		
	CLOROFILA TOTAL	ENRAIZAMENTO		CLOROFILA TOTAL	ENRAIZAMENTO	
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% enrzt \varnothing	\bar{x} raízes	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	% enrzt \varnothing	\bar{x} raízes
0	18	95	5	18	95	5
24	14	90	8,1	15	100	2,4
48	14	100	6,3	11	70	3,2
96	15	0	0	11	0	0
144	14	0	0	13	0	0

TABELA 9. Efeito de DCMU a 10^{-2} M no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Valores percentuais de 20 repetições.

TRATAMENTOS	FOLHAS ENRAIZADAS (%)
Controle	100
DCMU na lâmina	0
DCMU no meio de enraizamento	60

5.2 - Reguladores de Crescimento

5.2.1 - Auxinas

a - Bloqueio do transporte auxínico:

A Aplicação do bloqueador do transporte de auxina, ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) em pasta de lanolina como um anel sobre o pulvino apical, inibiu totalmente a formação de raízes na base do pecíolo de folhas sem o pulvino basal (tabela 10).

b - Aplicação de auxinas em pasta de lanolina.

O efeito de auxinas exógenas foi testado pela aplicação de pasta de lanolina em diversos pontos da folha. Os resultados referentes ao efeito do ácido indolil-3-butírico (AIB) em folhas sem pulvino, são apresentados na figura 23. Os valores encontrados não são significativamente diferentes dos respectivos controles. Entretanto, quando se compara os vários tratamentos, observa-se uma diminuição do enraizamento quando o regulador foi aplicado no meio do pecíolo, em relação à aplicação no pulvino apical. Este tratamento não promoveu o enraizamento quando aplicado a folhas com pulvino (dados não representados na figura 23). A aplicação do regulador no pulvino apical ou no meio do pecíolo provocou um entumescimento esbranquiçado na região logo acima do pulvino.

O AIA foi testado em duas concentrações (figura 24). Na concentração de 0,05 mg AIA/mg de lanolina, as folhas sem pulvino apresentaram uma grande promoção do n^um^ero médio de raízes por folha quando o regulador foi aplicado no pulvino apical (figura 24 A). Neste tratamento, as raízes se

TABELA 10 - Efeito de anel de mistura de TIBA com lanolina (0,5 mg TIBA/mg de lanolina) sobre o pulvino apical, no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L.cv. carioca.

Valores percentuais de 15 repetições.

TRATAMENTO	FOLHAS ENRAIZADAS (%)
Controle	100
TIBA	0

FIGURA 23 - Efeito de aplicação de AIB em pasta de lanolina (0,5 mg AIB/mg de lanolina) no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal.

Valores médios e percentuais de 15 repetições.
Porcentagem de folhas enraizadas:

- controle - tratado.

FIGURA 23

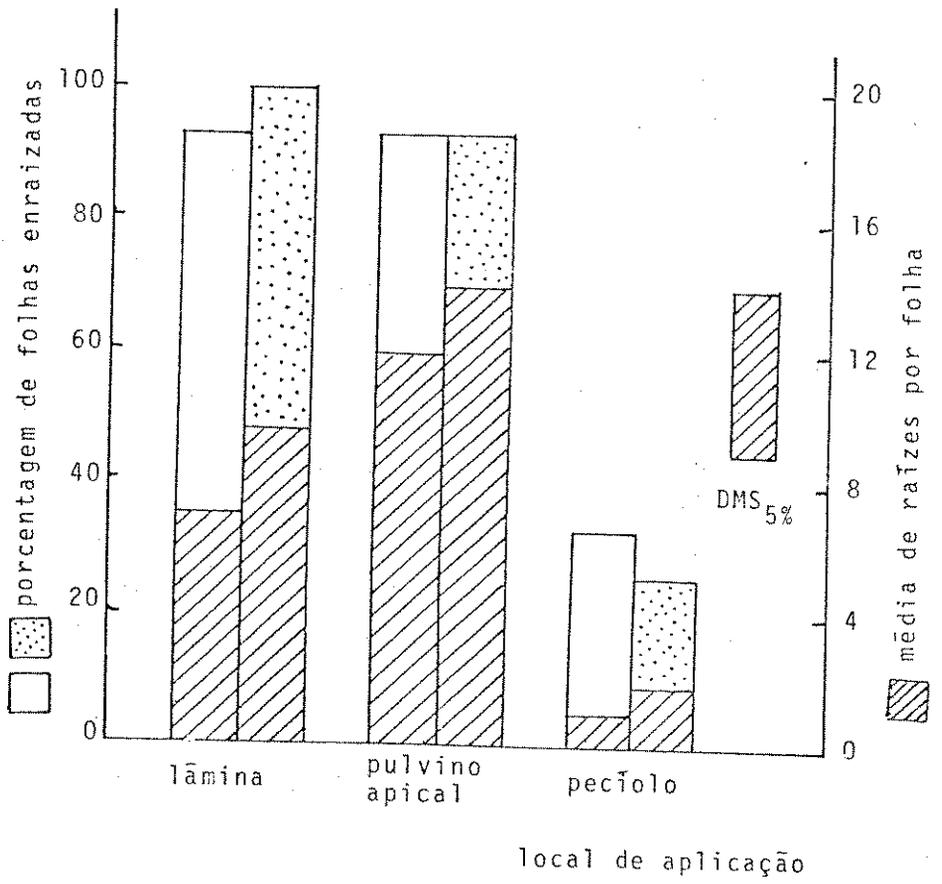


FIGURA 24 - Efeito de aplicação de AIA em pasta de lanolina, no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal.

Valores médios e percentuais de 15 repetições.

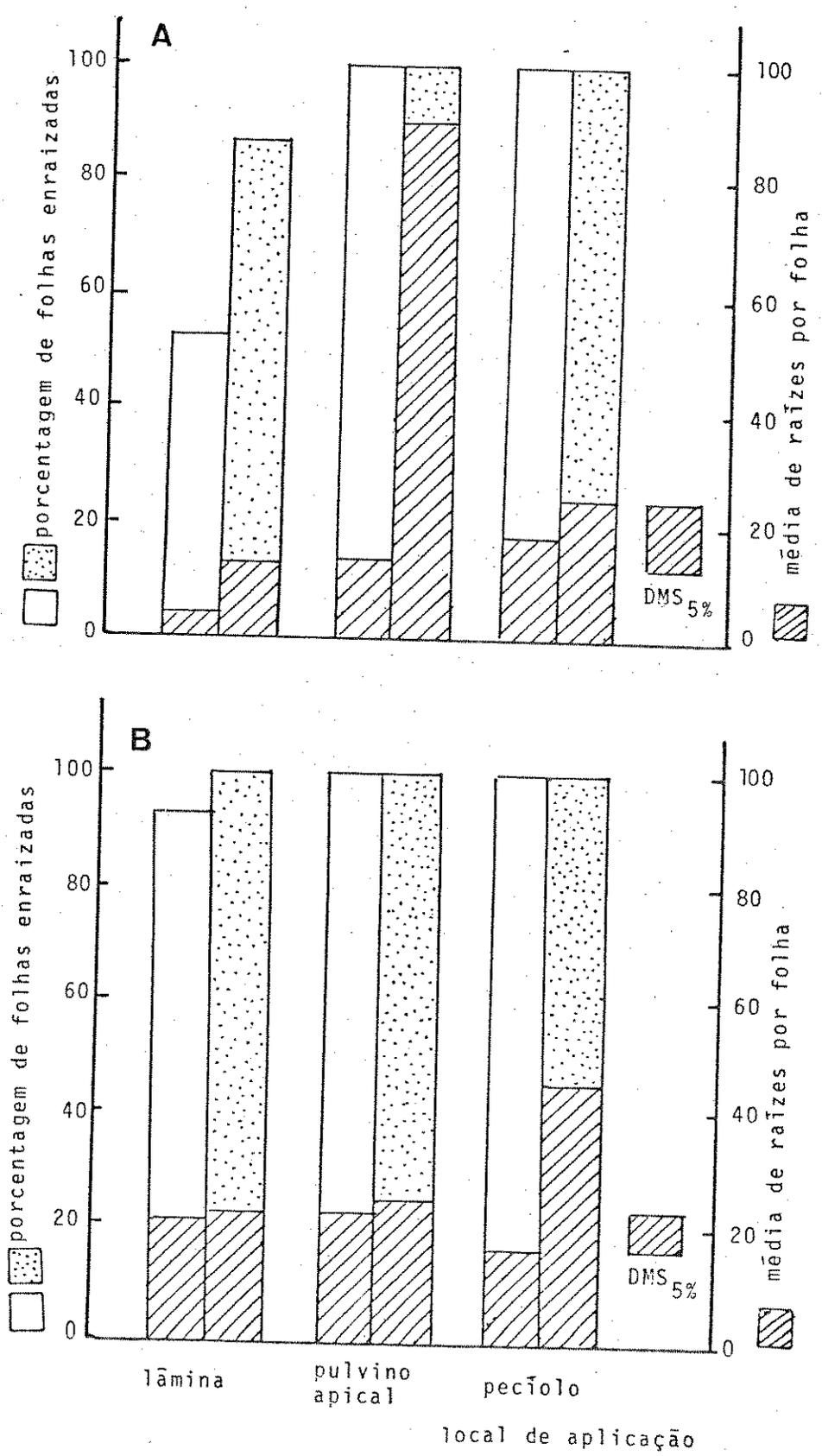
Porcentagem de folhas enraizadas:

□ - controle,  - tratado.

A - 0,05 mg de AIA/mg de lanolina

B - 0,5 mg de AIA/mg de lanolina.

FIGURA 24



formaram ao longo do pecíolo. Nos demais tratamentos não houve diferença entre as estacas tratadas e o seu controle em relação ao número médio de raízes por folha. Folhas com pulvino basal não enraizaram.

Aumentando a concentração para 0,5 mg AIA/mg de lanolina, as folhas sem pulvino apresentaram uma promoção de enraizamento (número médio de raízes por folha) quando a aplicação foi realizada no meio do pecíolo; as raízes se desenvolveram também na região de aplicação (figura 24 B). Tal ocorrência foi também verificada no mesmo tratamento em folhas com pulvino, em 80% das estacas, porém com média de raízes mais baixa: 0,27 (dados não representados no histograma).

c - Aplicação de auxinas por pré-embebição.

O fornecimento de várias auxinas em tratamento de pré-embebição por 17 horas a estacas de folhas primárias de feijão, mostrou que nas concentrações usadas (0,01 e 0,1 mg de auxina/ml de água), elas promovem o enraizamento, sendo o número total de raízes formadas semelhante em folhas com ou sem pulvino (figura 25).

Em folhas com pulvino AIA e ANA não promoveram significativamente enraizamento na dose mais fraca, sendo o efeito de AIA, o menos expressivo em relação às demais auxinas. AIB foi a auxina mais eficaz a 0,01 mg/ml de água, e tão eficaz quanto ANA a 0,1 mg/ml de água (figura 25A).

Em folhas sem pulvino, as auxinas promoveram o enraizamento, nas duas doses usadas, com excessão de AIA na dose mais fraca (figura 25 B). Neste caso, AIB foi mais eficiente

FIGURA 25 - Efeito de aplicação de várias auxinas, por pré embebição de 17 horas, no enraizamento de fo_lhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L.cv. carioca.

Valores médios de 10 repetições.

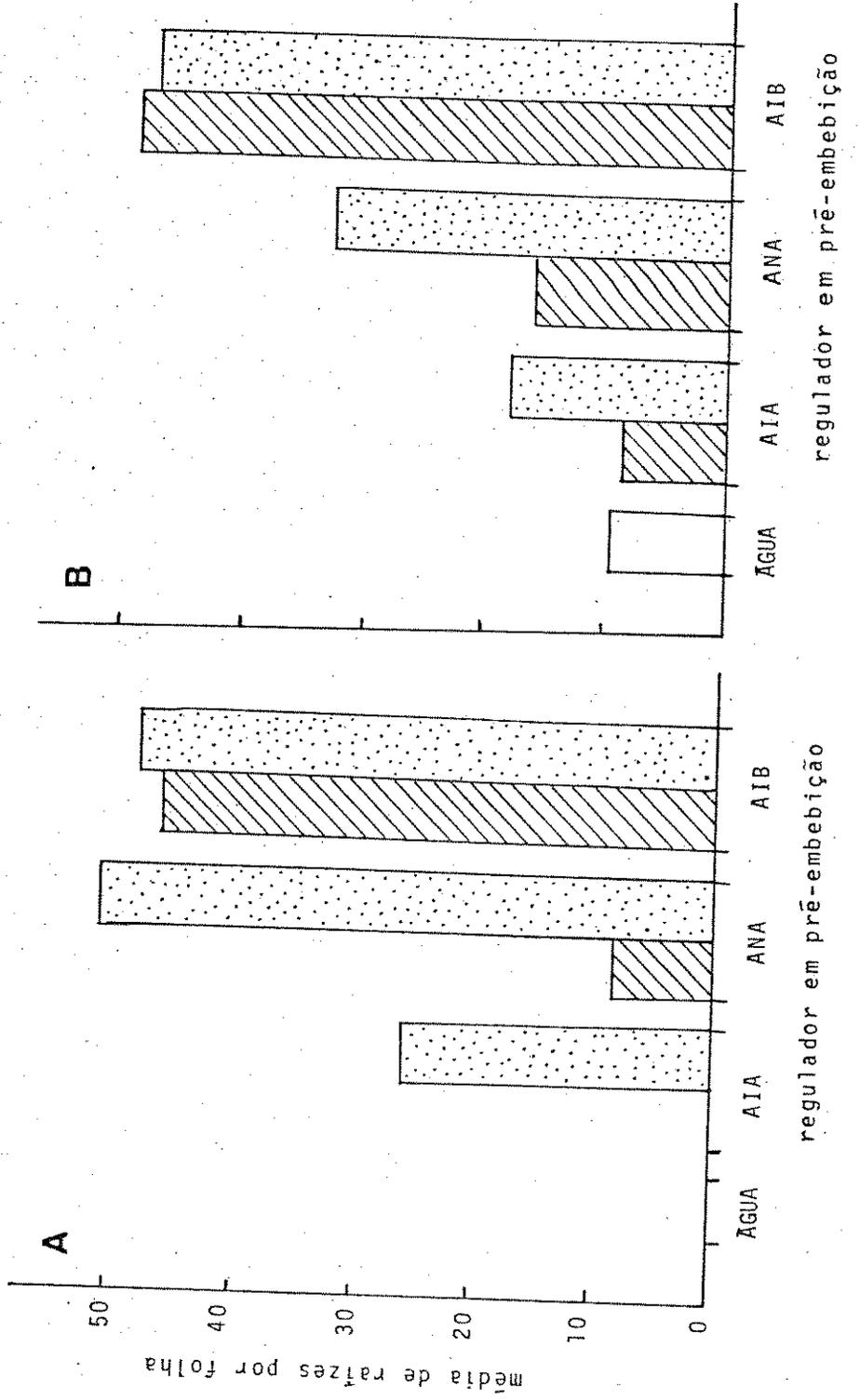
 - 0,01 mg auxina/ml de água

 - 0,1 mg auxina/ml de água

A - Folhas com pulvino

B - Folhas sem pulvino

FIGURA 25



regulador em pré-embrição

em promover a rizogênese em ambas as doses, o efeito de AIA e ANA semelhante na dose mais baixa e ANA mais efetivo na dose mais alta. Portanto, as folhas com e sem pulvino tratadas com AIA sempre produziram menor número de raízes, enquanto que AIB demonstrou ser mais eficiente neste processo (tabela 11 e 12).

De maneira geral, o enraizamento de folhas com pulvino ocorreu acima desta estrutura, e nos dois tipos de estacas de folha (com e sem pulvino) a formação de raízes se deu ao longo do pecíolo. Em ambos os tipos de estaca, nos tratamentos com AIB e ANA, observou-se além das raízes formadas, a presença de inúmeras "verrugas" na superfície do pecíolo, ocasionadas por pressão de primórdios radiculares ainda não protruídos, ou em fase de rompimento da epiderme. Nas estacas sem pulvino tratadas com a dose mais alta de ANA, foi observada intensa fasciação das raízes formadas.

d - Translocação de ^{14}C em folhas tratadas com AIA-2- ^{14}C .

A movimentação do ^{14}C a partir da região de aplicação de auxina marcada em folhas, com e sem pulvino, pode ser vista nas figuras 26A, 26B, 26C e 26D. Observa-se que apenas quando a aplicação foi feita no pulvino apical e na região mediana do pulvino (figura 26B e 26C) houve uma pequena diferença na porcentagem de ^{14}C translocado para a região basal da estaca. O radioisótopo foi encontrado em maior porcentagem na base de folhas sem pulvino. De maneira geral, a porcentagem de translocação é baixa. Quando o tratamento foi aplicado no pul

TABELA 11. Médias do número de raízes formadas sob o efeito da aplicação de várias auxinas, por pré-embebição de 17 horas, em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L.cv.carioca, com pulvino.

DOSES mg/ml de água	NÚMERO DE RAÍZES			
	AIA	ANA	AIB	média das doses
0,01	0,00 c*B**	8,60bB	46,20aA	18,26B
0,10	26,00 bA	51,25aA	48,00aA	40,59A
MÉDIA DE REGULADORES	11,55 a	20,78 a	47,10b	

* - As letras minúsculas comparam os reguladores dentro de cada dose (horizontal).

** - As letras maiúsculas comparam as doses dentro de cada regulador (vertical)

DMS (Turkey 5%)

TABELA 12. Médias do número de raízes formadas sob o efeito da aplicação de várias auxinas, por pré-embebição de 17 horas, em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L.cv.carioca, sem pulvino.

DOSES mg/ml de água	NÚMERO DE RAÍZES			
	AIA	ANA	AIB	média das doses
0,01	8,40 b*A**	15,70bB	49,00aA	23,36B
0,10	18,00 cA	33,12bA	47,6aA	32,89A
MÉDIAS DE REGULADORES	13,20c	23,44b	48,30a	

* - As letras minúsculas comparam os reguladores dentro de cada dose (horizontal)

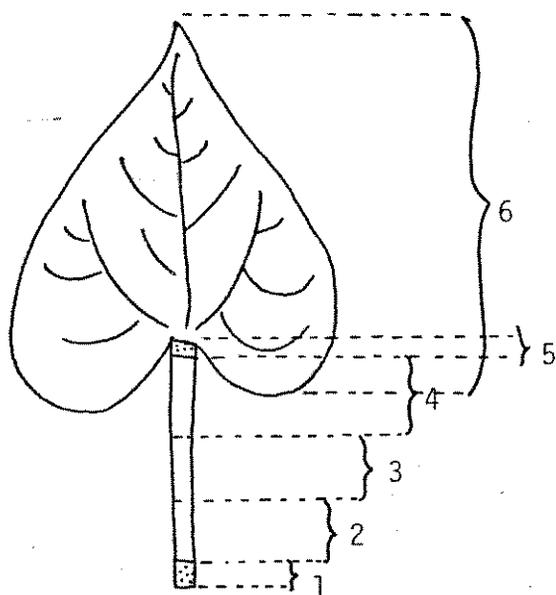
** - As letras maiúsculas comparam as doses dentro de cada regulador.
(vertical)

DMS (Tuckey 5%)

FIGURA 26 - Porcentagem de ^{14}C translocado em folha de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, após 6 horas de tratamento com AIA-2- ^{14}C (1000 cpm).

Valores médios de 5 repetições. Folhas (●) com pulvino e (○) sem pulvino.

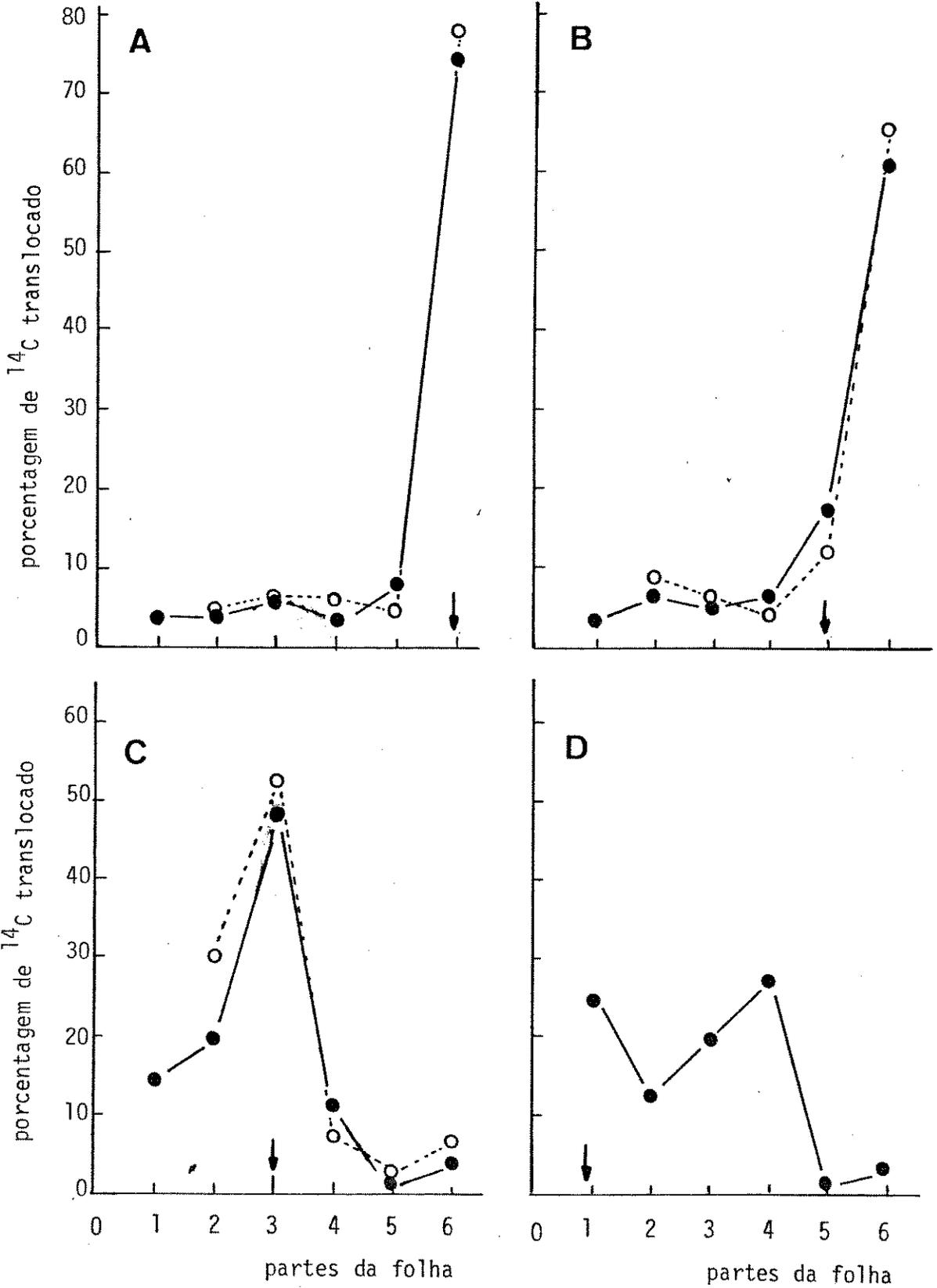
Partes da folha:



1. pulvino basal
 2. região inferior do pecíolo
 3. região mediana do pecíolo (1cm)
 4. região superior do pecíolo
 5. pulvino apical
 6. lâmina
- (↓) ponto de aplicação

- A. Aplicação na lâmina
- B. Aplicação no pulvino apical
- C. Aplicação na região mediana do pecíolo
- D. Aplicação no pulvino basal.

FIGURA 26



vino apical a movimentação ascendente foi mais substancial e no tratamento do pulvino basal, o acúmulo maior se deu na região superior do pecíolo. Aplicação no meio do pecíolo, mostra uma translocação preferencialmente basípeta com maior acúmulo na região inferior do pecíolo livre do pulvino.

Aplicação de AIA-2- ^{14}C em folhas com anelamento no pecíolo na região imediatamente superior ao pulvino, mostra que não há translocação do ^{14}C através de anelamento, havendo então, um acúmulo do radioisótopo na região acima do anelamento, independentemente do ponto de aplicação do hormônio (figura 27A e 27B).

5.2.2 - Ácido abscísico

a - Aplicação ácido abscísico em pasta de lanolina.

A aplicação de ABA em pasta de lanolina na lâmina, reduziu o enraizamento de folhas sem pulvino (figura 28). Nos demais tratamentos, não provocou nenhuma alteração no processo de rizogênese tanto em folhas com pulvino (figura 28), como sem pulvino (dados não representados).

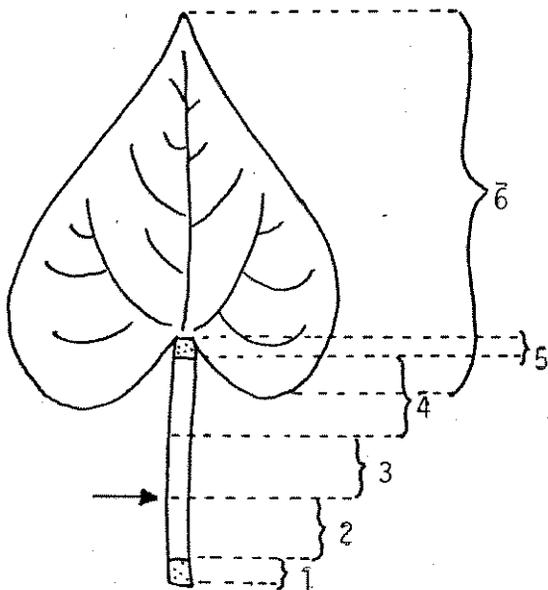
b - Translocação de ^{14}C em folhas tratadas com ABA-2- ^{14}C .

O acompanhamento do fluxo do ^{14}C proveniente do ABA-2- ^{14}C , após 6 horas da aplicação em vários pontos da folha pode ser observado nas figuras 29A, 29B, 29C e 29D. Os valores obtidos neste intervalo de tempo indicam que a movimentação do radioisótopo é pequena. Na aplicação do regulador marcado no pulvino apical houve um transporte substancial do radioi

FIGURA 27 - Quantificação de ^{14}C em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca tratadas com AIA-2- ^{14}C (1000 cpm).

Valores médios de 5 repetições.

Partes da folha:



1. pulvino basal
 2. região inferior do pecíolo
 3. região mediana do pecíolo(1cm)
 4. região superior do pecíolo
 5. pulvino apical
 6. lâmina
- (↓) - região do anelamento
(*) - ponto de aplicação

A. Aplicação na região mediana do pecíolo

B. Aplicação na região superior do pecíolo

FIGURA 27

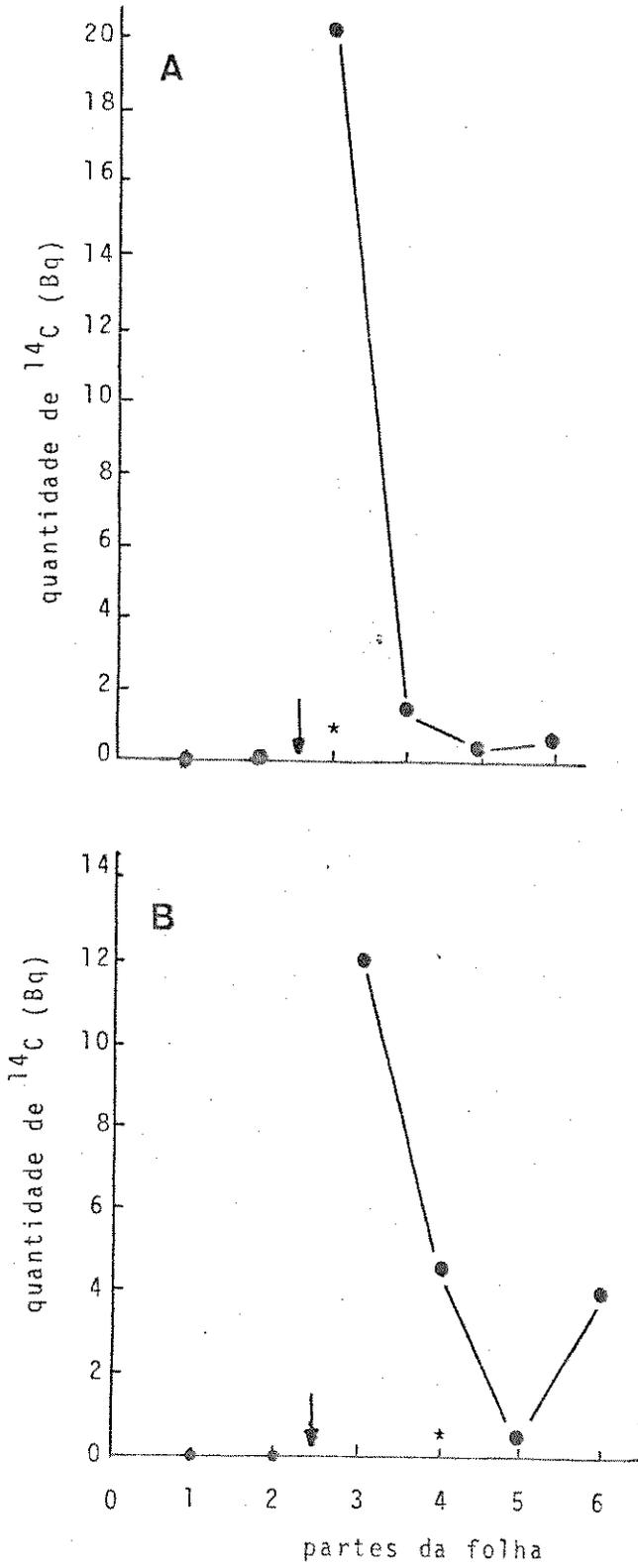


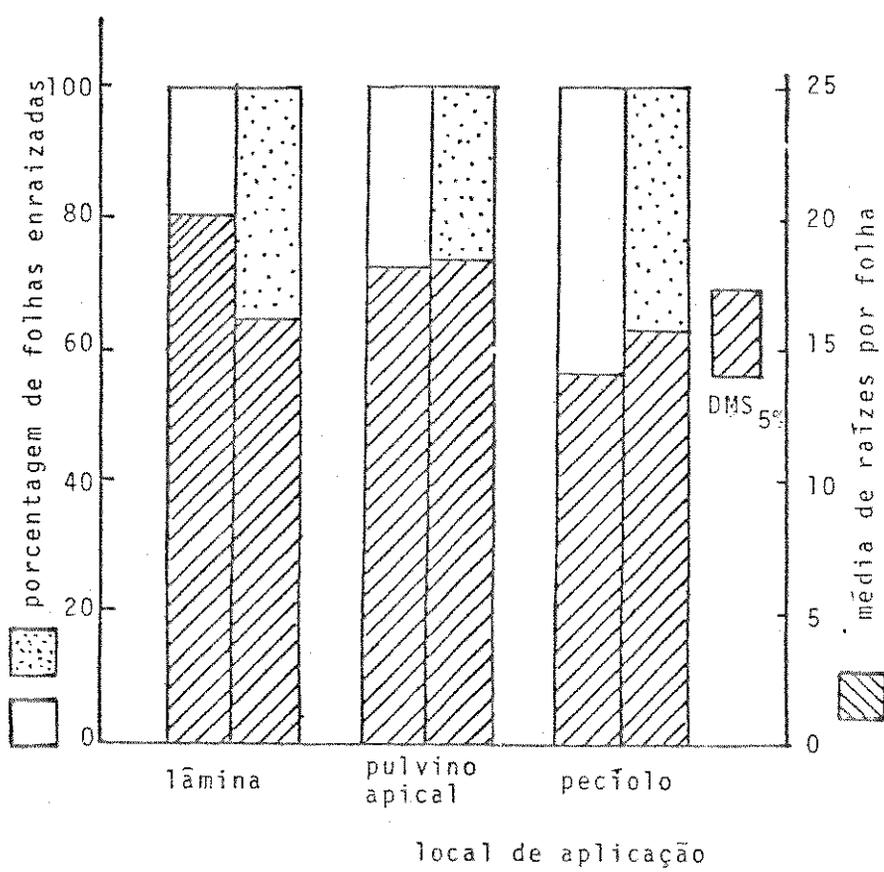
FIGURA 28 - Efeito da aplicação de ABA em pasta de lanolina (0,5 mg de ABA/mg de lanolina) no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal.

Valores médios e percentuais de 15 repetições.

Porcentagem de folhas enraizadas:

□ - controle,  - tratado.

FIGURA 28



sótopo em direção à lâmina (basífugo), embora também seja observada uma pequena movimentação basípeta (figura 29B). A aplicação no pulvino basal além de mostrar pequena movimentação do ^{14}C , não apresentou valores elevados, comumente detectados nos locais de aplicação (figura 29D).

c - Dosagem de ABA no pulvino e no pecíolo.

Análise do possível relacionamento entre a concentração endógena de ABA e o processo inibidor do pulvino foi realizada através de extração e dosagem deste regulador na região basal do pecíolo e do pulvino basal de folhas recém colhidas. Os resultados indicam ser a concentração no pecíolo mais elevada do que a do pulvino: 756,53 e 16,58 ng de ABA por grama de peso fresco, respectivamente.

5.2.3 - ETILENO

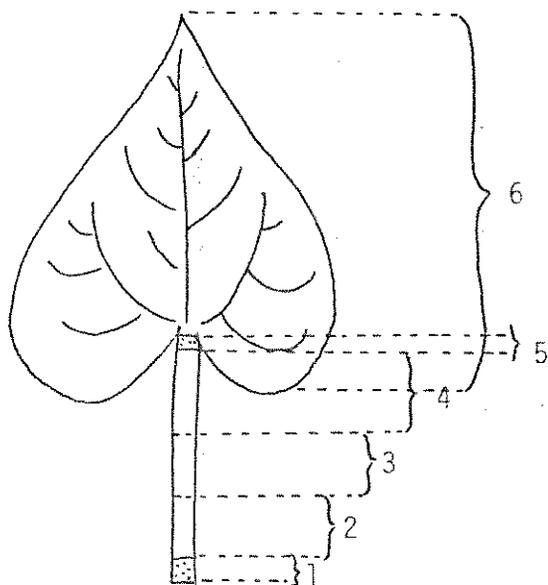
a - Aplicação de CEPA em pasta de lanolina.

Os resultados da aplicação de CEPA em pasta de lanolina (0,5 mg/mg de lanolina), sem pulvino provocou uma redução tanto na porcentagem de enraizamento como no número de raízes formadas por estaca, quando o tratamento foi aplicado no pulvino apical e no meio do pecíolo (figura 30). A aplicação de CEPA no pulvino apical de folhas sem pulvino basal, provocou ainda a formação de raízes, até a região mediana do pecíolo, cuja superfície algumas vezes apresentava um aspecto enrugado pela pressão de primórdios radiculares que não chegaram a romper a epiderme. Em estacas com pulvino, o CEPA só promoveu a rizogênese quando aplicado no pulvino basal, onde ocorreu o enraizamento de 66,6% de estacas com média de 2,13 raízes por folha. As

FIGURA 29 - Porcentagem de ^{14}C translocado em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, após 6 horas do tratamento com ABA-2- ^{14}C (1000 cpm).

Folhas (●) com pulvino e (○) sem pulvino

Partes da folha:



1. pulvino basal
 2. região inferior do pecíolo
 3. região mediana do pecíolo (1cm)
 4. região superior do pecíolo
 5. pulvino apical
 6. lâmina
- (↓) ponto de aplicação

A. Aplicação na lâmina

B. Aplicação no pulvino apical

C. Aplicação na região mediana do pecíolo

D. Aplicação no pulvino basal.

FIGURA 29

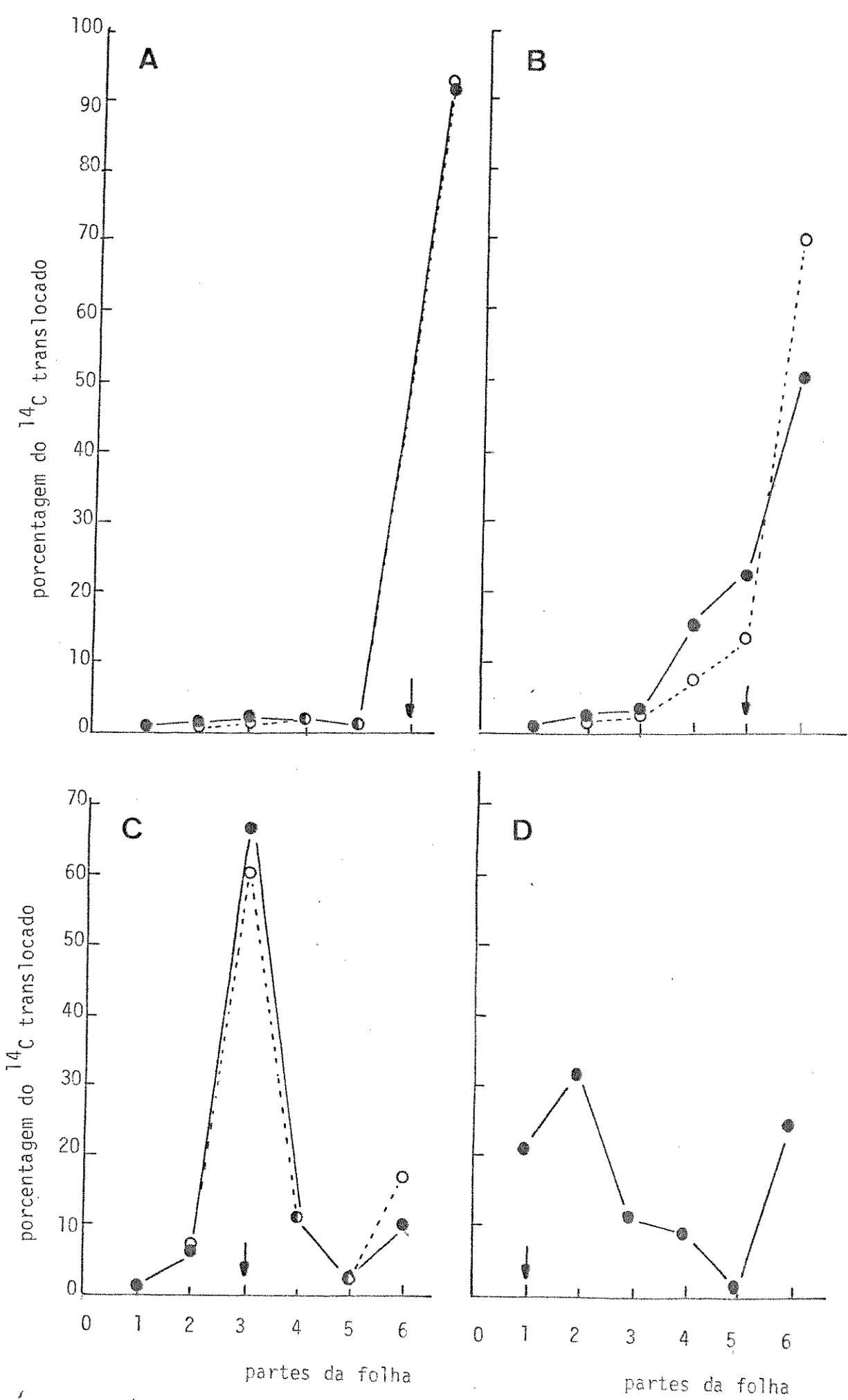


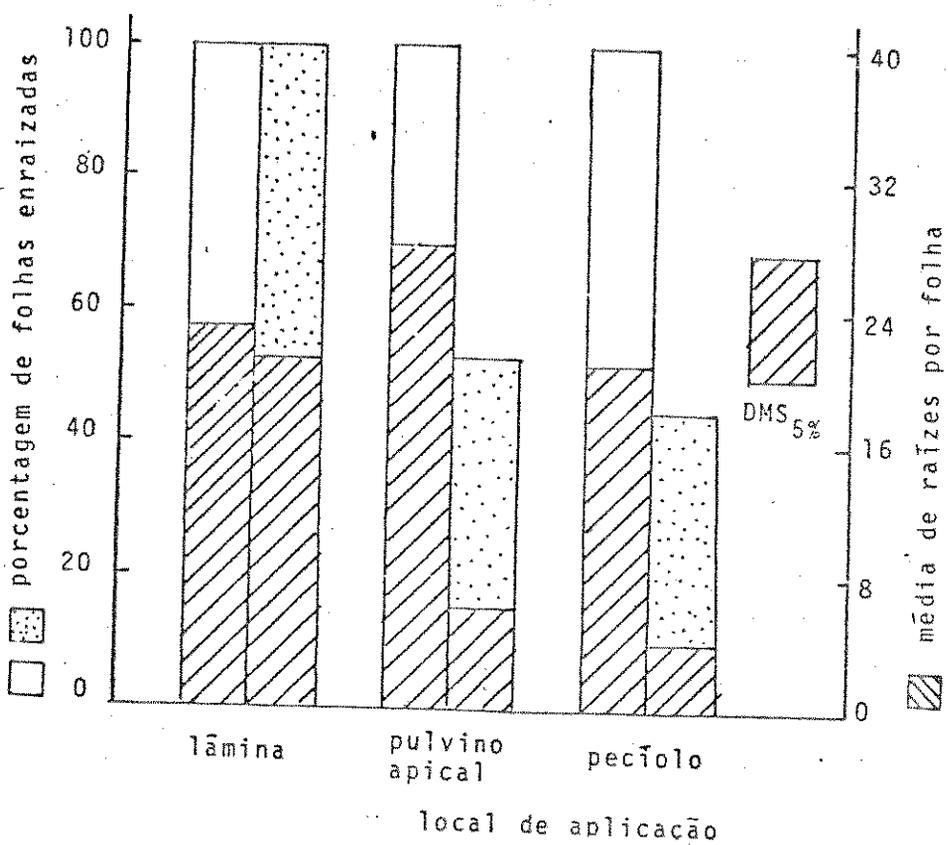
FIGURA 30 - Efeito da aplicação de ácido 2 cloroetil fosfônico em pasta de lanolina (0,5mg/mg de lanolina), no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca em folhas sem o pulvino basal.

Valores médios e percentuais de 15 repetições.

Porcentagem de folhas enraizadas:

- controle - tratado.

FIGURA 30



raízes se originavam de um pequeno calo central, formado na região do corte (dados não representados na figura 30).

b - Aplicação de AVG e CEPA em mecha de algodão e pincelamento.

Alteração da concentração, bem como variação do tipo de aplicação do ácido 2-cloroetil fosfônico (CEPA) não modificou sua atuação em relação à inibição do pulvino. Em folhas sem pulvino, observa-se que tanto na aplicação em mecha de algodão como por pincelamento, as concentrações mais elevadas tendem a induzir uma redução do enraizamento (figura 31). Verifica-se ainda que a mesma concentração de CEPA (0,05 mg/ml), mostra efeitos diferentes dependendo do tipo de aplicação. Entretanto, tentativa de diminuir a concentração de etileno endógeno pelo bloqueio de sua biossíntese com aplicação de AVG, não afetou o enraizamento (figura 31).

5.2.4 - Aplicação de reguladores por pré-embebição

Comparando o efeito dos reguladores AIA, AIB, ABA e CEPA fornecidos através da solução de enraizamento, por pré-embebição de 17 horas (figura 32), observa-se que em folhas sem pulvino, o AIB promove o enraizamento, sendo seu efeito muito mais evidente na dose de 0,01 mg/ml como pode ser visto na tabela 13. No caso de folhas com pulvino (dados não representados), o AIB foi o único dos reguladores usados capaz de promover o enraizamento. Neste caso, a formação de raízes ocorreu na região do pecíolo acima do pulvino, em 60% das estacas, com uma média de 114 raízes por estaca.

FIGURA 31 - Efeito de CEPA e AVG no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca em folhas sem o pulvino basal.

Valores médios e percentuais de 15 repetições
AVG = 4 mM

CEPA:  - 0,005 mg/ml água
 - 0,05 mg/ml água
 - 0,10 mg/ml água

FIGURA 31

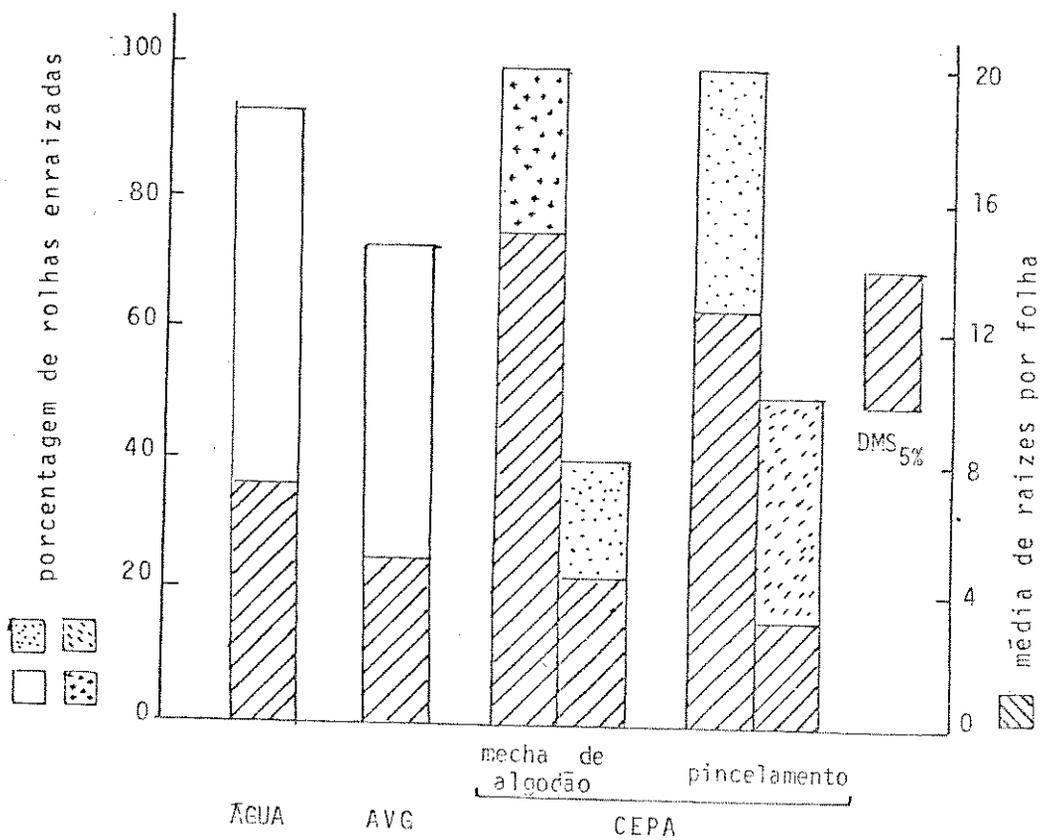


FIGURA 32 - Efeito de aplicação de reguladores de crescimento, por prē-embebição de 17 horas, no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal.

Valores médios de 10 repetições.

Concentração do regulador:

 - 0,01 mg/ml de água

 - 0,10 mg/ml de água

FIGURA 32

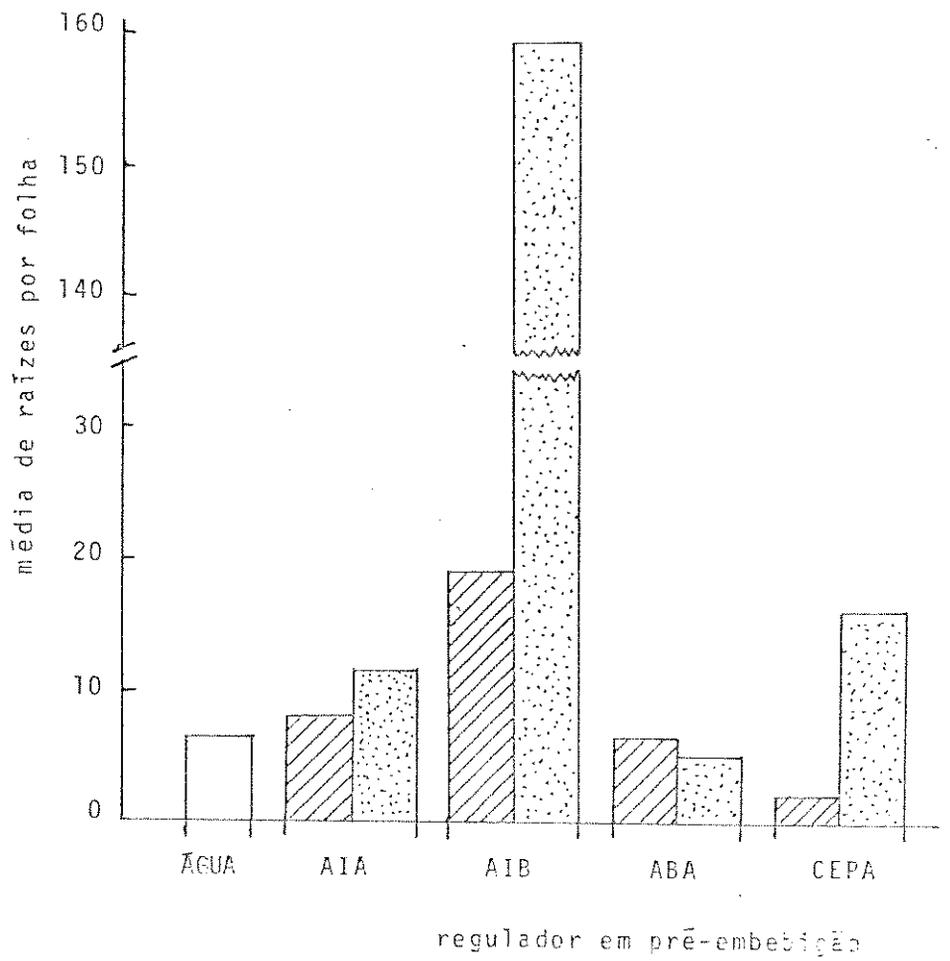


TABELA 13 - Médias do número de raízes formadas sob o Efeito de aplicação de reguladores, por pré-embebição de 17 horas, em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca sem o pulvino basal.

DOSES mg/ml de água	NÚMERO DE RAÍZES				média das doses
	AIA	AIB	ABA	CEPA	
0,001	8,20a*A**	19,14aB	6,40aA	2,00aA	8,75B
0,010	11,37bA	159,57aA	5,00bA	16,00bA	56,17A
MÉDIA DE REGULADORES	9,61b	89,35a	5,70b	6,36b	

* - As letras minúsculas comparam os reguladores dentro de cada dose (horizontal)

** - As letras maiúsculas comparam as doses dentro de cada regulador (vertical)

DMS (Tuckey 5%)

6 - TESTES BIOQUÍMICOS NO PULVINO

6.1 - Extratos

6.1.1 - Extrato bruto (bioteste)

Análise do efeito do extrato bruto de pulvino no enraizamento de folhas primárias mostrou a existência de uma proporcionalidade entre a concentração do extrato e a inibição do enraizamento (figura 33).

6.1.2 - Extrato fracionado (bioteste)

Foi então feito fracionamento do extrato bruto dos pulvinos, sendo cada fração biotestada em enraizamento de folhas primárias de feijão. Os resultados, mostrados na figura 34, evidenciam significamente uma inibição pela fração básica e uma promoção pela fração neutra do extrato.

A análise mais detalhada do efeito da fração básica (que era inibitória) no enraizamento foi executada com o mesmo bioteste, mas utilizando faixas entre os Rfs do cromatograma desta fração desenvolvido com o sistema de solventes benzeno: acetona (9:1 v/v). Ao cromatograma foram aplicados 5 ml da fração básica contendo 98,66 mg de peso seco/ml. Os resultados em relação ao número médio de raízes formadas por folha (figura 35 A), mostram uma região de inibição entre o ponto de aplicação e o Rf 0,4 e outra entre os Rfs 0,6 e 0,8. A inibição é semelhantemente observada com relação ao número de folhas enraizadas (figura 35 B), sendo coincidente principalmente na região entre o ponto de aplicação e o Rf 0,4 (compare figuras 35 A e B).

FIGURA 33 - Relação entre a concentração do extrato bruto do pulvino e o enraizamento da folha primária de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Valores médios de 20 repetições.

FIGURA 34 - Efeito de extrato fracionado de pulvino no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Concentração: 12,5 mg de peso seco/ml. Valores médios de 20 repetições. A zona hachurada é estatisticamente diferente do controle ao nível de 5%.

FIGURA 33

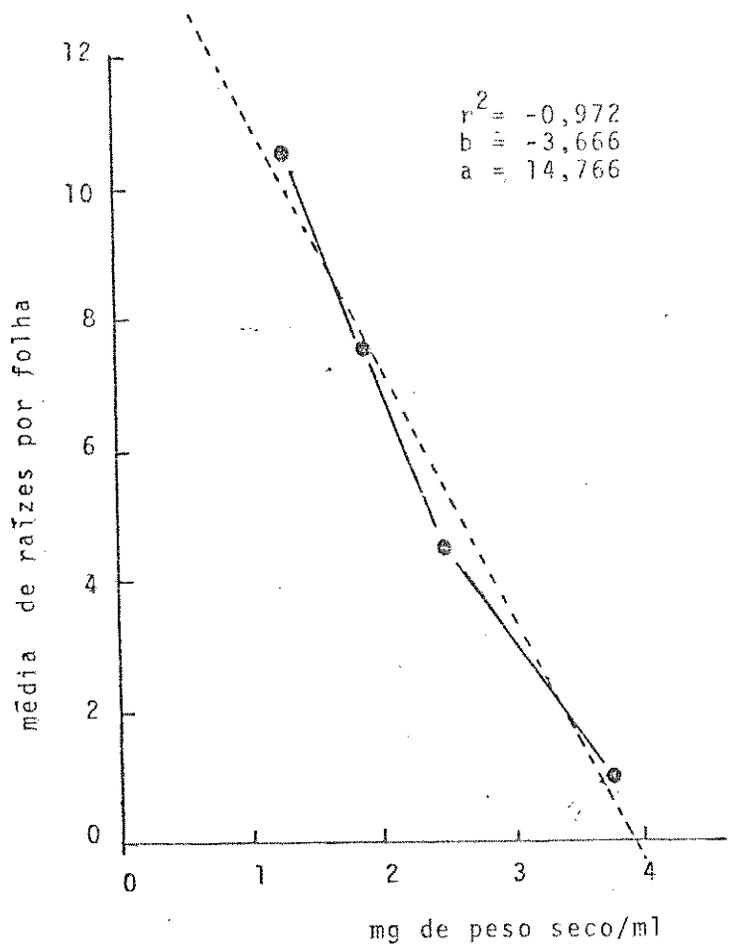


FIGURA 34

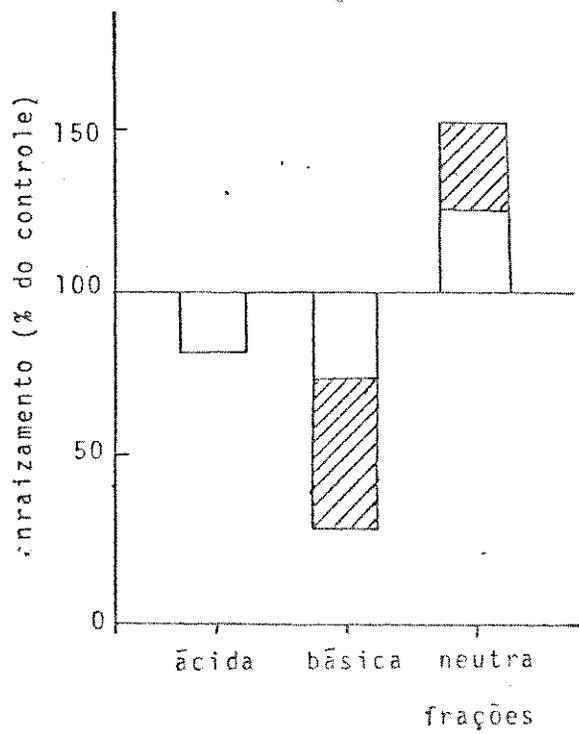
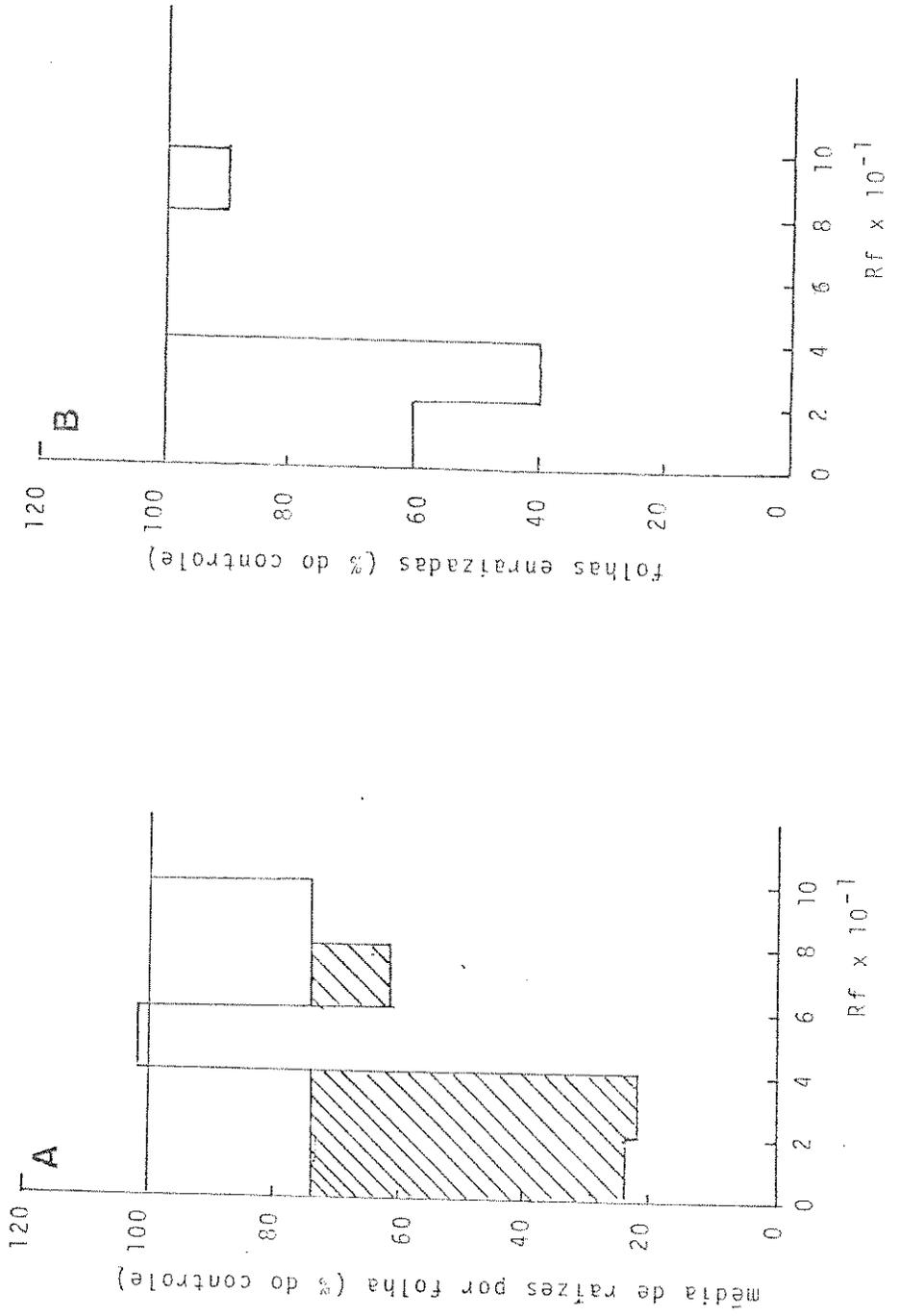


FIGURA 35 - Efeito da fração básica do extrato de pulvino no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Cromatografia de sílica-gel com 5 ml da fração básica do extrato com 98,66 mg peso seco/ml, desenvolvido com sistema de solventes benzeno: acetona (9:1 v/v). Valores médios de 10 repetições. A zona hachurada é estatisticamente diferente do controle pela análise de variância.

- A. Porcentagem média de raízes por folha.
- B. Porcentagem de folhas enraizadas.

FIGURA 35



6.1.3 - Extrato esteroidal (bioteste)

O teste do efeito dos estrógenos padrões (estrona e estradiol) no enraizamento de folhas com e sem pulvino mostrou que os estrógenos padrões não afetam o enraizamento foliar. A figura 36 mostra o resultado de folhas sem pulvino. Embora a porcentagem de enraizamento seja reduzida de 30% com estrona, em relação a água, o número médio de raízes por folha mantem-se mais elevado que no controle com água. O enraizamento por folha, muito baixo do controle neste experimento evidencia a variabilidade da resposta de enraizamento em folhas de *Phaseolus vulgaris*.

6.2 - Análise cromatográfica dos extratos

Comparação do comportamento cromatográfico dos padrões de estrona e estradiol com as frações ácida, básica e neutra do extrato de pulvino, mostra na fração básica uma mancha característica coincidente com o padrão de estrona quando revelado com luz U.V.. A mesma mancha, mais pálida, aparece também na fração neutra (figura 37).

O extrato esteroidal do pulvino, realizado conforme o método anteriormente descrito foi inicialmente purificado cromatograficamente usando o sistema de solventes clorofórmio: metanol (95:5 v/v). A detecção dos estrógenos da placa foi obtida por correspondência de Rf através de cromatografia paralela dos padrões de estrona e estradiol revelados com luz U.V.. Tal comparação das faixas eluídas em clorofórmio: metanol (2:1 v/v) evidenciou a presença de uma substância com comportamento semelhante à estrona (Rf 0,61) no eluato dos Rfs 0,33 a 0,55 (figura 38). A mancha mais frontal persistente em todos os

FIGURA 36 - Efeito de estrógenos (estrona e estradiol) no enraizamento de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem o pulvino basal.

O teste F não mostrou significância.

FIGURA 36

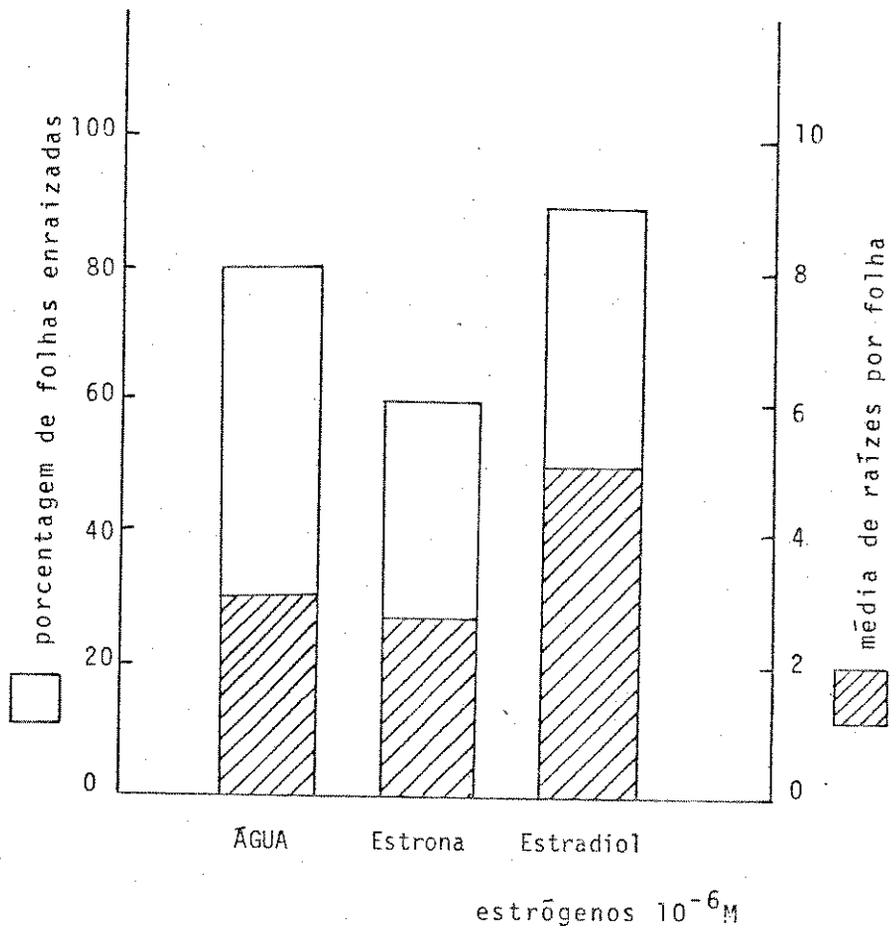


FIGURA 37 - Esquema do cromatograma com as frações ácida, básica e neutra do extrato de pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

O cromatograma ascendente foi realizado em cromatofolhas alumínicas de sílica-gel F₂₅₄, revelado com luz U.V. (ondas médias e curtas), de frações, ácida e neutra de extrato de pulvino, comparadas com padrões de estrógenos. (1) estradiol, (2) estrona, (3) fração ácida, (4) fração básica e (5) fração neutra.

Sistema de solventes:

Clorofórmio: Metanol (95:5 v/v). As manchas hachuradas correspondem aos padrões e a mancha mais de frente, possivelmente a um isômero.

FIGURA 38 - Esquema do cromatograma dos extratos esteroidais do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

O cromatograma ascendente foi realizado em cromatofolhas alumínicas de sílica-gel F₂₅₄, revelado com luz U.V. (ondas médias e curtas), de eluatos dos Rfs 0,55-0,76-(1) e 0,33-0,55 (2) de extratos esteroidais de pulvino comparados com padrões de estrona (3) e estradiol (4). O cromatograma foi desenvolvido em sistema de solventes Clorofórmio: Metanol (95:5 v/v). As manchas, hachuradas, correspondem aos padrões e as manchas de frente, possivelmente a um isômero.

FIGURA 37

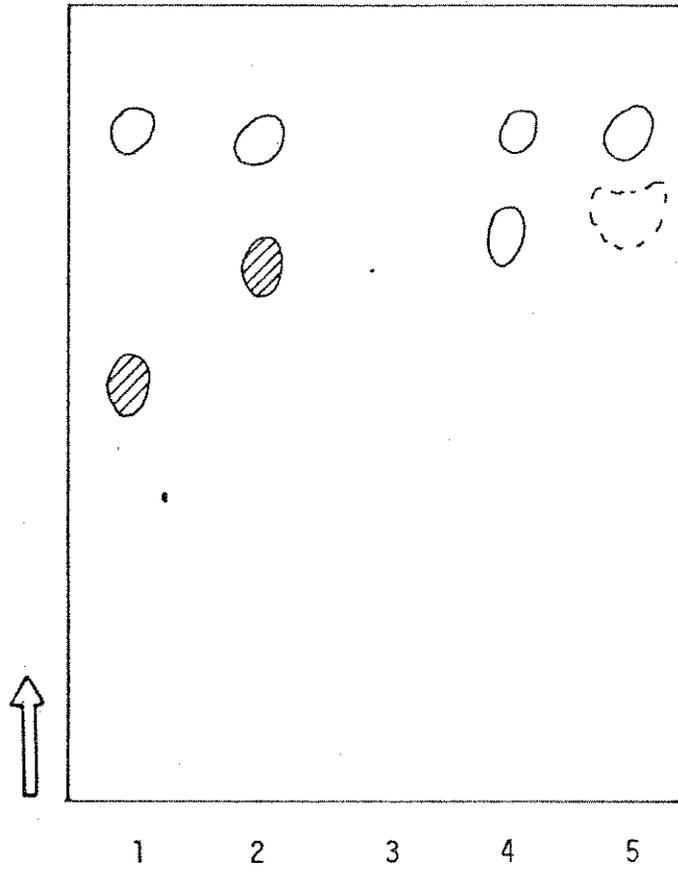
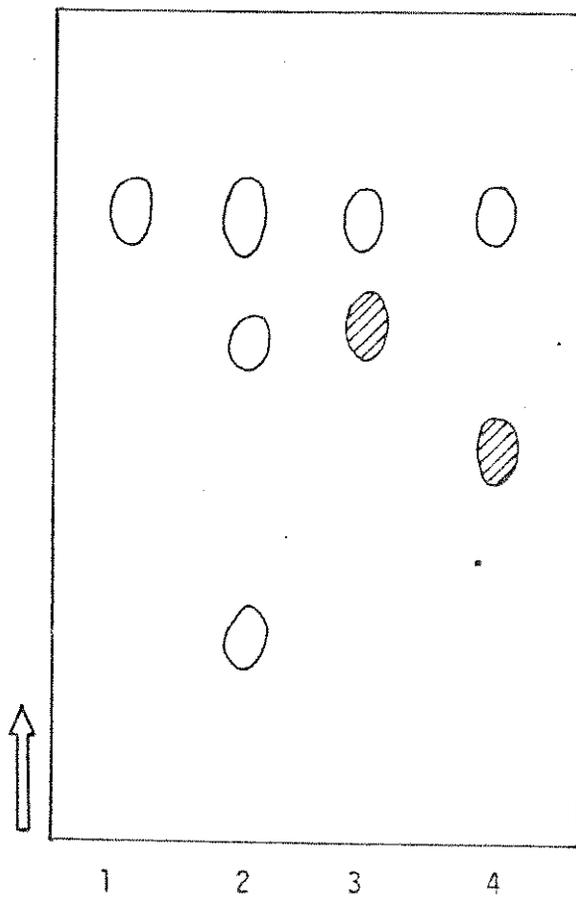


FIGURA 38



testes realizados é de procedência não identificada, sendo provavelmente a de um isômero.

Os mesmos padrões de estrógenos desenvolvidos em sistema de solventes benzeno: acetona (9:1 v/v) e igualmente revelados com luz U.V. apresentaram além da mancha coincidente não caracterizada no Rf 0,75, as manchas correspondentes à estrona no Rf 0,40 e estradiol no Rf 0,23. Os estrógenos padrões, bem como os extratos esteroidais de pulvino e pecíolos misturados à lanolina, foram aplicados em folhas de feijão sem pulvino. Este teste mostrou que embora os estrógenos padrões não tenham afetado significativamente o enraizamento de folhas sem pulvino, os extratos esteroidais de pecíolo e de pulvino inibiram este processo (figura 39).

6.3 - Atividade peroxidásica

Estando a peroxidase ligada ao sistema AIA oxidase, o qual regula o nível de auxinas, hormônios diretamente relacionados com o processo de formação de raízes, passamos a analisar comparativamente a atividade total desta enzima no pecíolo e no pulvino, investigando seu possível envolvimento no processo inibidor existente no pulvino.

Verificando o efeito do volume do extrato usado no ensaio, acompanhando a reação de minuto em minuto durante 10 minutos, observou-se que nos três primeiros minutos de reação, o aumento da atividade peroxidásica é praticamente linear (figura 40), com todos os volumes de extrato usados.

Analisando a resposta da reação com quanti

FIGURA 39 - Efeito de estrógenos aplicados em pasta de lanolina em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, sem pulvino.

1. controle
2. estrona a 0,5 mg/g de lanolina.
3. estradiol a 0,5 mg/g de lanolina.
4. extrato esteroidal de pulvino
(1 g peso fresco/g de lanolina).
5. extrato esteroidal de pecíolo.
(1 g peso fresco/g de lanolina).

FIGURA 40 - Efeito do volume do extrato usado no ensaio peroxidásico de pulvino basal de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

(●) 0,1 ml; (○) 0,075 ml; (▲) 0,05 ml; e
(△) 0,025 ml do extrato.

FIGURA 39

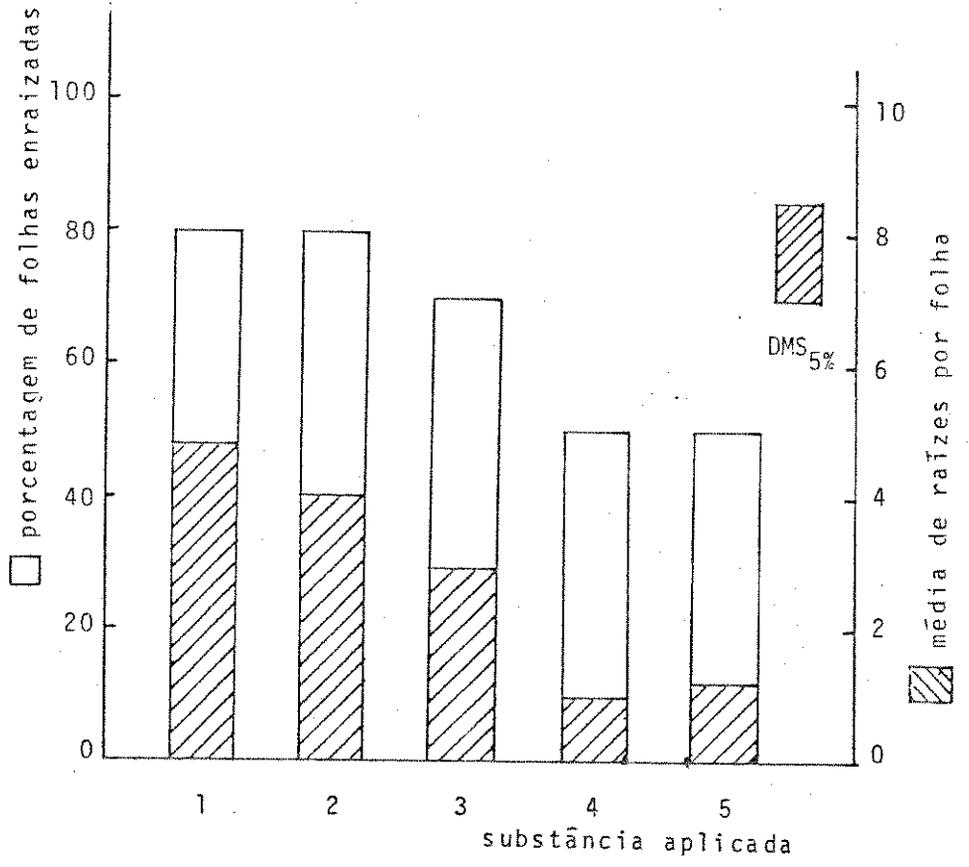
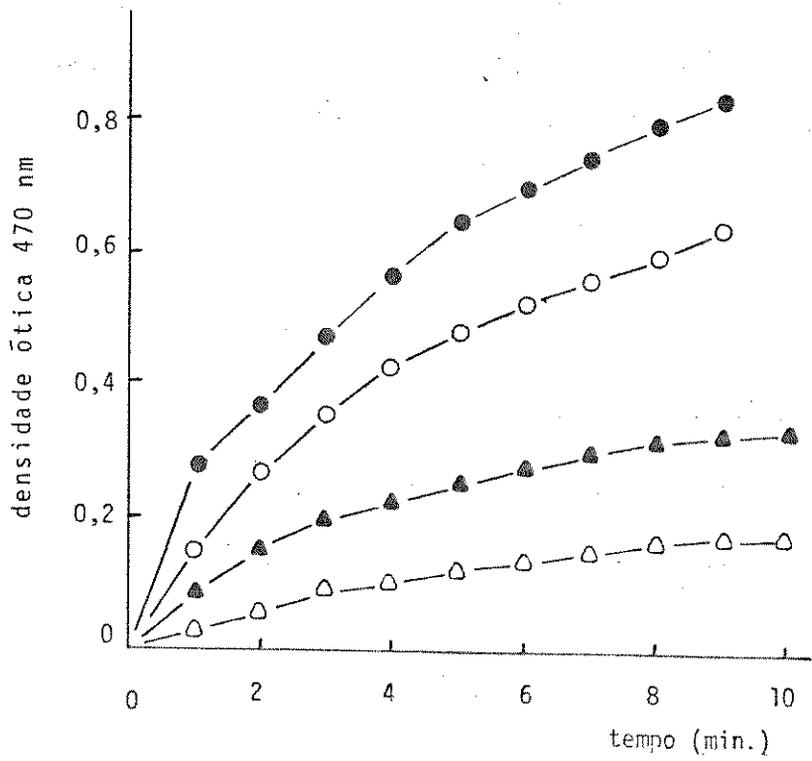


FIGURA 40



dades variadas do extrato enzimático purificado, verificou-se a existência de uma proporcionalidade entre o volume do extrato e a atividade (figura 41). Esta constatação permitiu o uso de alíquotas diferentes do extrato na determinação da atividade enzimática nos vários tratamentos.

Ensaio realizados em diferentes tempos após a purificação enzimática mostraram que a atividade peroxidásica sofre mudanças no período de 4:30 horas após extração, sugerindo que os ensaios devam ser realizados em intervalo de tempo menor para que não sejam computadas perdas apreciáveis da atividade (figura 42).

Em folhas com pulvino a atividade peroxidásica no pulvino parece diminuir gradativamente. Entretanto, a região do pecíolo imediatamente superior ao pulvino não parece mostrar nenhum padrão definido, embora haja indicação de aumento no período entre 20 e 40 dia de enraizamento.

Comparando o comportamento dos ápices peciolares com e sem pulvino em condições de enraizamento, verifica-se que inicialmente (dia 1), a atividade do pecíolo é maior que a do pulvino. Posteriormente, há um declínio, havendo uma alteração desta relação, e já no final do período o pecíolo continua com mais atividade que no pulvino. Observando as variações ocorridas nas folhas em enraizamento sem pulvino, nota-se que a atividade cai consideravelmente do 1º para o 2º dia e depois tende a aumentar até o fim das observações (figura 43).

FIGURA 41 - Proporcionalidade da reação entre volume do extrato peroxidásico e atividade enzimática em pulvino de folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

FIGURA 42 - Estabilidade da atividade enzimática após a extração do pulvino de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca.

Ensaio peroxidásico realizado (○) 1:30 h e (●) 4:30 h após a extração enzimática.

FIGURA 41

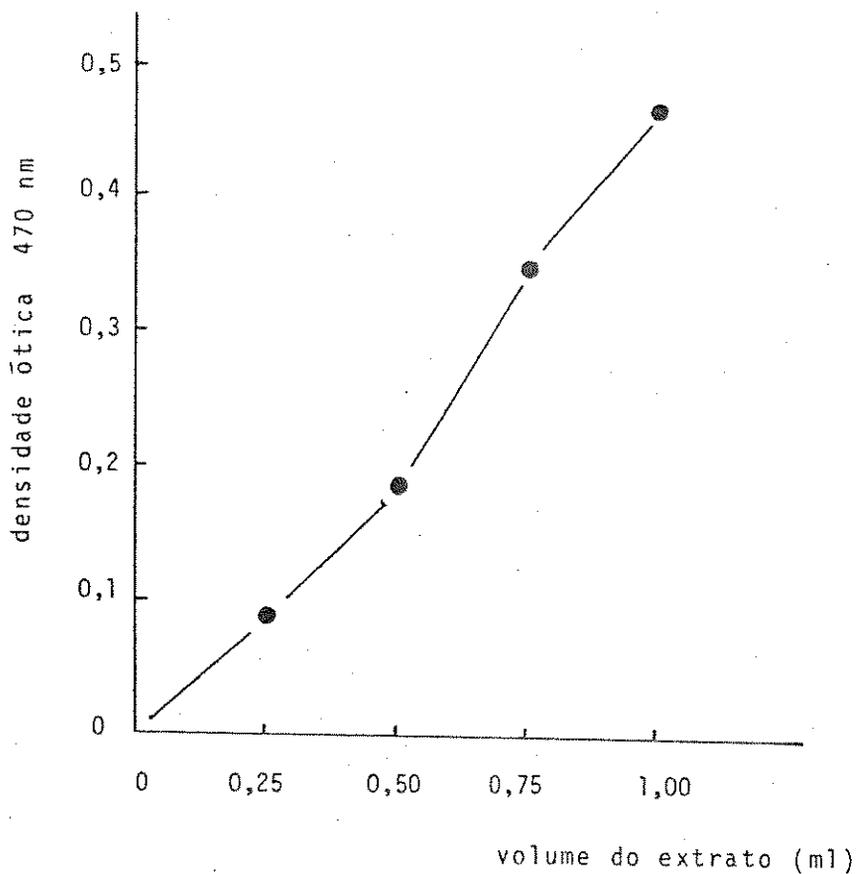


FIGURA 42

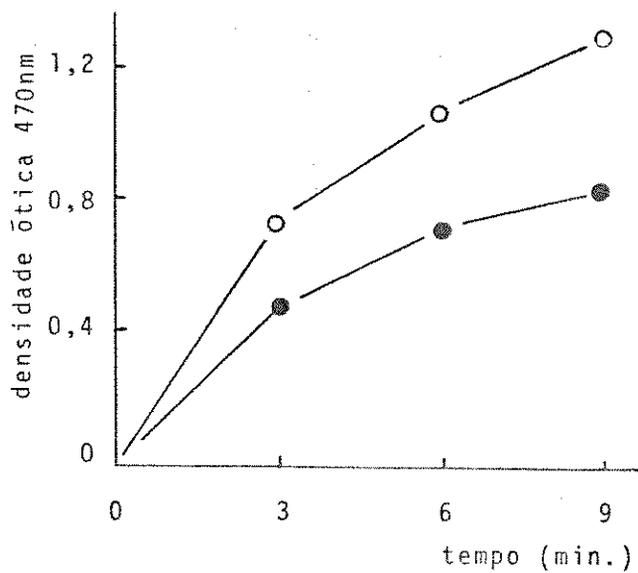


FIGURA 43 - Análise da atividade peroxidásica em folhas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca e sem pulvino.

As folhas eram mantidas em condições de enraizamento por 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias.

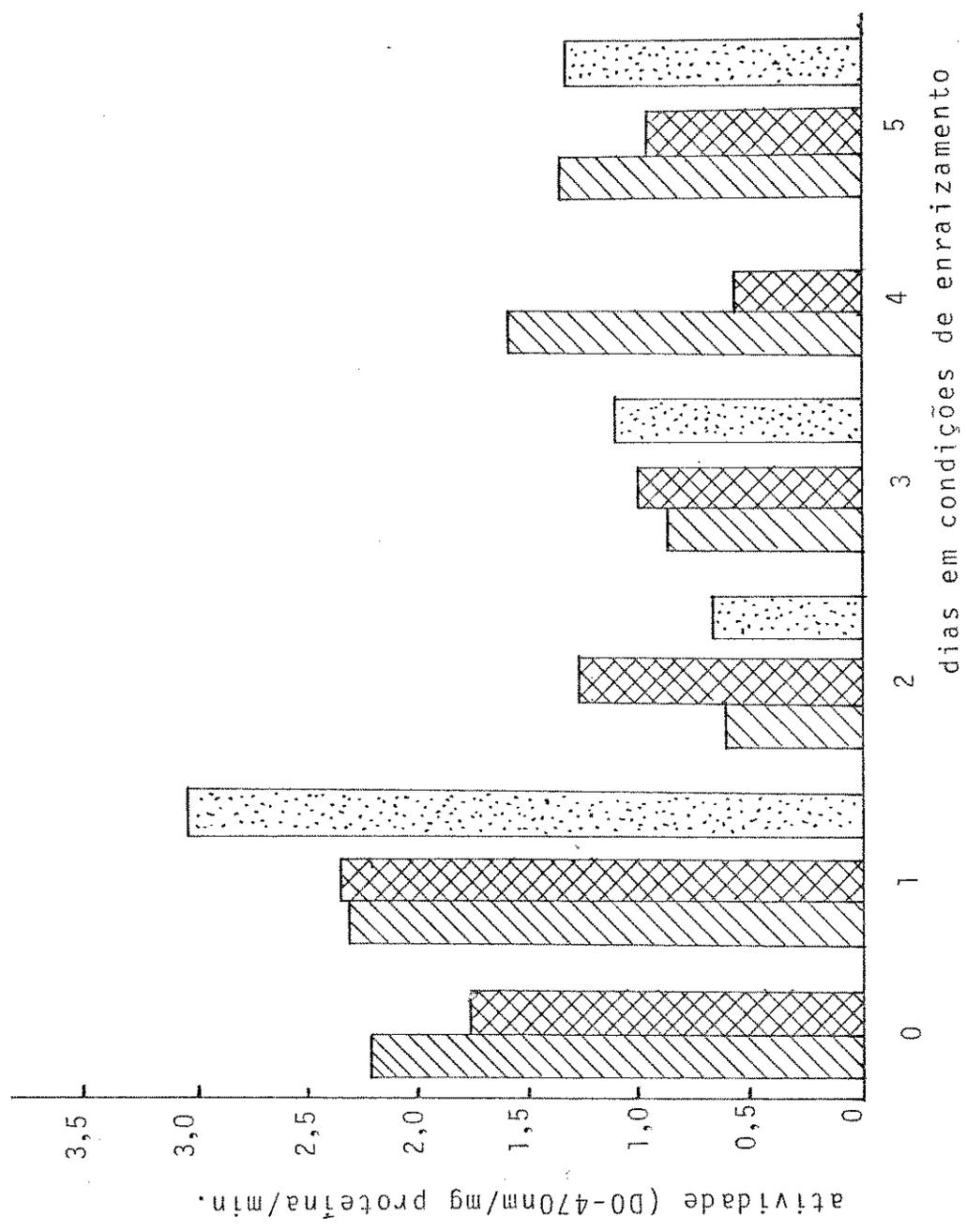
 - pecíolo de folha com pulvino

 - pulvino

 - pecíolo de folha sem pulvino

IB/5096

FIGURA 43



V - DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que folhas mais jovens (6 e 7 dias) além de enraizarem mais lentamente, apresentaram um menor número de raízes do que folha com 8, 9 e 15 dias (figura 18). Entretanto, o maior número de folhas não enraizadas foi encontrado no grupo de folhas mais velhas (isto é, com 15 dias de idade). Resumindo, folhas mais jovens apresentam um número pequeno de raízes, mas sempre enraizam. Nem todas as folhas mais velhas enraizam, mas as que o fazem desenvolvem um grande número de raízes.

Uma resposta semelhante, foi em parte, observada por GREGORY e SAMANTARAI (1950) com folhas trifolioladas de uma variedade anã de *Phaseolus vulgaris* L. em que folhas mais jovens enraizavam mais lentamente. Porém, no caso destes autores, a folha do segundo nó, mais próxima do ápice, apresentava um número maior de raízes, isto é, a folha mais jovem é que produzia maior número de raízes.

Utilizando o índice de plastocrônio foliar, COLEMAN e GREYSON (1976), evidenciaram em platinhas de *Lycopersicon esculentum* Mill., a influência da idade do ápice e da posição da folha na sua capacidade de enraizamento. Além de produzirem maior número de raízes, quando em plantas mais jovens, as folhas, à medida que se afastam do ápice apresentam inicialmente um aumento e depois uma diminuição da capacidade de enraizamento.

Levando em consideração todos estes dados, parece que o número de raízes formado é influenciado pela posição que originalmente a folha ocupava na planta. No trabalho atual, eli-

minou-se esta variável, que é a posição da folha na planta. Como padrão de homogeneidade, foi sempre usada folha de uma mesma posição (folha primária) e de uma mesma idade (8 dias), pretendendo desta maneira, eliminar a influência de outros fatores endógenos da planta.

O efeito da idade, no enraizamento de folhas primárias de feijão, pode estar ligado não só ao grau de amadurecimento fisiológico da folha, mas também, a área disponível para produção de fotossintatos e substâncias hormonais. Os resultados de experimentos realizados com eliminações parciais da lâmina foliar, revelam que o enraizamento está na dependência da área foliar e que pecíolos sem lâmina não enraizam, em concordância com os dados de VAN RAALTE *et al.*, (1975), que também trabalharam com folhas primárias de outra cultivar de feijão. COLEMAN e GREYSON (1976) também mostraram que havia uma correlação significativa entre o crescimento da lâmina e do pecíolo com o enraizamento. A afirmação de que a diminuição do enraizamento é proporcional à redução da área foliar deixa de ser válida para a metade basal da lâmina, cujo enraizamento é comparável entre folhas com 50% e 25% basais da lâmina. A importância da região apical da lâmina no enraizamento pode ser observada pela redução significativa do enraizamento, causada pelas eliminações sucessivas até a metade da nervura média do limbo (figura 21). Evidentemente essa diferença não poderia ser explicada por diminuição de fotossintatos porque a área removida foi pequena. Poderia entretanto, ser considerado que as folhas usadas neste experimento, com 8 dias de idade ainda não estão completamente expandidas (figura 17 A, 17B e 17C). -

A diferenciação foliar é basífuga nas nervuras principais e somente nas mais tênues, basípeta (ESAU, 1965). Quando comparadas com outras espécies, as folhas primárias de feijão não apresentam grande porcentagem de células formadas durante a expansão laminar (DALE, 1982). Assim, a parte superior da folha, ainda em expansão, poderia estar contribuindo com maior contingente hormonal produzido nas regiões meristemáticas apical e marginal ainda com alguma atividade. VAN RAALTE et al. (1975) mostraram que o número de raízes formado é dependente da superfície da lâmina.

Por outro lado, os resultados de interrupção da nervura média, mostrando enraizamento normal e semelhante na base do pecíolo, em todos os tratamentos (figura 22), podem indicar que o encaminhamento dos fatores de enraizamento para as regiões de seccionamento na lâmina não foi muito expressivo. A maior parte dos produtos foi encaminhada para o pecíolo, uma vez que o tratamento em nenhuma das posições chegou a interromper totalmente a continuidade da lâmina foliar com esta região. Devido à vascularização reticulada bem desenvolvida na lâmina, a quantidade de substância acumulada na interrupção, suficiente para promover a formação de raízes nestes locais, não representou uma drenagem significativa dos recursos fornecidos pelo limbo ao pecíolo, para que fossem detectadas diferenças no seu enraizamento.

Como já foi dito anteriormente, nas folhas usadas nos experimentos, a região apical provavelmente está ainda produ

zindo substâncias hormonais importantes para o processo de formação de raízes adventícias. Entretanto, não ocorreu enraizamento na região de interrupção da nervura média nesta posição. Tal fato pode ser explicado em razão da interrupção estar em continuidade com uma pequena porção final da nervura média, cuja ramificação é muito restrita, recebendo, portanto, a contribuição de uma pequena área produtora de assimilatos, cuja disponibilidade é insuficiente para fornecer substrato energético necessário para atender as exigências metabólicas requeridas no local (complementação da diferenciação do limbo, bem como para o processo de enraizamento) .

LOVELL e MOORE (1969) mencionam que estacas de cotilédones mantidas no escuro não enraizam. No presente trabalho, observou-se enraizamento de folhas mantidas por 8 dias no escuro (figura 21). No entanto, a aplicação de vários períodos de escuro tanto em folhas ligadas à planta como destacadas e em condições de enraizamento, mostrou que quando as folhas eram levadas para condições padrões de enraizamento (luz), a rizogênese só ocorria quando o período de pré-tratamento de escuro não excedia a 48 horas (tabela 8).

Muitos pesquisadores têm estudado a senescência em folhas destacadas, tanto no claro, como no escuro. TETLEY e THIMANN (1974) mostraram que folhas de aveia destacadas ao completarem a fase de expansão, senescem rápida e uniformemente, apresentando um aumento da respiração com o estabelecimento do processo de senescência. Quando segmentos apicais da primeira folha, com 7 dias de idade, eram incubados a 26 °C, foi observado que depois do pri

meio dia a taxa respirat6ria começava aumentar até atingir um pico, após o terceiro dia, alcançando um valor 2,5 vezes maior que o original. Em folhas verdes, a perda de clorofila se iniciava dentro de um dia e a perda atingia o máximo quando a respiração estava aumentando. Em tres dias, toda a clorofila tinha sido degradada. Um aumento semelhante na respiração ocorria em folhas estioladas. A magnitude do aumento da respiração era semelhante se os segmentos de folhas eram incubados na luz ou no escuro (THIMANN et al., 1977). Estes autores sugerem que até 25% do aumento respiratório no escuro pode ser atribuído a um aumento na disponibilidade de aminoácidos livres e açúcares, resultantes da hidrólise de proteínas e carboidratos de reserva. Os 75% do aumento seriam devidos ao desacoplamento da fosforilação da respiração. Sugerem ainda que estaria sendo criado um desacoplador natural durante a senescência. Aumento de respiração pode ocorrer durante a senescência de folhas presas à planta, da mesma maneira que com folhas destacadas (HARDWICK et al., 1968)

A senescência de folhas é considerada como um processo que embora essencialmente catabólico, envolvendo atividade de enzimas hidrolíticas, parece estar envolvido com alguns processos essencialmente anabólicos (BEEVERS, 1976; MARTIN e THIMANN, 1972). Em folhas de aveia, a senescência é inibida por cicloeximida, um inibidor da síntese de proteína, e por anaerobiose (MARTIN e THIMANN, 1972). TETLEY e THIMANN (1974) propuseram a hipótese de que a senescência da folha é dependente da síntese de novo de uma ou mais enzimas proteolíticas. A quebra de ácidos nucleicos e proteínas em vez dos carboidratos acumulados na folha, parece ser a

mudança fundamental que ocorre no início da senescência. Há consideráveis dúvidas se a perda observada de ácidos nucleicos e proteínas é devida a uma desorganização nos processos envolvidos na sua formação, ou devida a um aumento de atividade hidrolítica envolvida na sua degradação (RHODES, 1980).

Por outro lado, a senescência de folhas está também relacionada com uma queda no conteúdo de clorofila. Em folhas destacadas de aveia (TETLEY e THIMANN, 1974), a proteólise pode já ser detectada 6 horas após excisão, enquanto que a primeira evidência da perda de clorofila está associada com a perda da atividade fotossintética e a transformação de cloroplasto em cromoplasto. BUTLER e SIMON (1971 in RHODES, 1980) mostraram que as mudanças ultra estruturais associadas com a senescência ocorrem em uma sequência muito bem definida, independentemente da maneira como a senescência foi induzida. As primeiras mudanças a ocorrer são declínio na população de ribosomas e início da desorganização do cloroplasto. O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi desaparecem. As mitocôndrias e o núcleo permanecem intactos estruturalmente até os últimos estádios da senescência.

Pode-se admitir que em folhas mantidas permanentemente no escuro, o aparecimento sequencial dos efeitos da senescência, por vezes não tão rápidos, permitem a utilização dos produtos das hidrólises (carboidratos) e proteólises (aminoácidos) no estabelecimento da rizogênese. Entretanto, os processos de senescência no escuro poderiam ser acelerados em folhas transferidas para a luz, pelo efeito competitivo das exigências metabólicas dos

processos que passam a ocorrer em sua presença, como: produção de clorofila, fotossíntese, fotorespiração, movimento estomático, produção hormonal etc. A competição por material energético em declínio, pela ação da senescência, poderia ser então, um fator na interrupção do processo de enraizamento em folhas transferidas para a luz, após 48 horas de escuro.

Neste trabalho não foi possível relacionar nem senescência, nem o efeito dos assimilatos fotossintéticos com os níveis de clorofila total em folhas tratadas com vários períodos de escuro, embora a inibição do enraizamento observada no tratamento com DCMU tenha mostrado a necessidade da integridade do processo fotossintético na formação de raízes adventícias. Tal efeito foi também observado por LOVELL et al., (1972) em cotilédones de *Sinapsis* e *Raphanus* em cultura contínua no escuro, ou na luz com tratamento de DCMU. Neste caso, foi também observado que a adição de sacarose restabelece o enraizamento em cotilédones tratados com DCMU na luz e em cotilédones mantidos no escuro. Porém, quando sacarose foi acrescentada em presença de luz (sem DCMU), o enraizamento foi inibido e a inibição foi parcialmente revertida por aplicação do inibidor. Parece portanto, que o nível de carboidratos muito alto devido a aplicação de sacarose com os produtos da fotossíntese, também é inibidora do enraizamento. Há uma concentração ótima de carboidratos, acima ou abaixo da qual o enraizamento é reduzido.

Aplicação de TIBA, em pasta de lanolina, na região do pulvino superior inibiu totalmente o enraizamento de folhas mantidas na luz. Esta inibição poderia ser explicada em termos do blo

queio do transporte auxínico. Entretanto, o papel de TIBA embora bastante estudado parece não estar bem definido. Os resultados mostram que quando aplicado a estacas com a base mantida imersa em solução com auxina, TIBA pode promover a formação de raízes (FERNQVIST, 1966). Vários autores discutem o efeito de TIBA em relação ao transporte auxínico. DA CRUZ e AUDUS (1978) mostram que TIBA é um potente inibidor da ação da auxina na degradação do amido em frações etanólicas solúvel e insolúvel. Mais recentemente, BATTEN e GOODWIN (1981) trabalhando com estacas imersas em cultura líquida em agitação contendo AIA e TIBA, observaram inibição do enraizamento. Tendo sido eliminado o problema da polaridade pelo tipo de cultura, o efeito do TIBA, segundo os autores, poderia estar associado ao de um inibidor de algum processo metabólico necessário à formação de raízes adventícias.

Além dos fatores endógenos, os fatores do meio ambiente também afetam o enraizamento. HEWITT e HILLMAN (1980a) encontraram atuação da variação estacional dos fatores ambientais na característica de enraizamento de folhas de feijão. No verão houve um aumento da média de raízes formadas, bem como da velocidade do enraizamento, em relação ao inverno. Tal variação pode ser atribuída a uma delimitação mais evidente das estações nas regiões temperadas onde foram realizados os experimentos.

No trabalho atual, embora as condições de enraizamento tenham sido controladas, a variabilidade da resposta de formação da raízes, mesmo nos controles, levou a pesquisa de um possível reflexo das variações das condições fotoperiódicas, nas

quais se desenvolveram as plantas estoque, no enraizamento de suas folhas. Entretanto, nas condições de dias curtos e dias longos testadas, não foi observada nenhuma alteração no processo de formação de raízes pelas estacas foliares.

A variabilidade sazonal das condições climáticas na região tropical não é tão marcada. Entretanto, é preciso considerar a influência de outros fatores, os quais, ainda que atuando uniformemente sobre cada experimento, pelo controle das condições de enraizamento, podem afetar estacionalmente a resposta de enraizamento, face às variações ambientais a que estão expostas as plantas doadoras. Intensidade e tipo de radiação luminosa fornecida às plantas estoques podem alterar a resposta do enraizamento (HANSEN, 1976) e este efeito, pode ser devido à ação mediadora de luz no metabolismo de carboidratos e auxinas (KHAN et al. 1977).

Como pode ser visto na tabela 2 o pulvino, independentemente da idade da folha, inibe o enraizamento. Este efeito é observado tanto para o pulvino apical (tabela 4), como para o pulvino basal (tabela 5). Em ambos os casos, a inibição independe da quantidade de pulvino mantida na base do pecíolo. No caso do pulvino apical pode ser observado que o efeito inibitório se restringe ao tecido do pulvino, sendo imediatamente eliminado quando uma mínima parte do pecíolo é deixada na base da estaca, havendo indicação de que quanto maior o comprimento do pecíolo, maior o enraizamento.

Foi observado que em *Kalanchoe Blossfeldiana* a

eliminação das células epidérmicas do limbo, desreprime as células do mesófilo que sofrem uma desdiferenciação e passam a se dividir formando uma camada cambial formadora de um tecido de cicatrização (SCHWABE, 1968). Analisando o efeito da epiderme em segmentos de caule de *Pisum*, BRUMMEL e HALL (1979) observaram que embora segmentos sem epiderme apresentassem menor crescimento em contacto com soluções de auxina, segmentos com sulcos verticais superficiais apresentavam uma resposta positiva significativa em relação aos segmentos intactos, indicando que a remoção da epiderme não atuou como dano ao tecido. Entretanto, no trabalho atual, tratamentos de eliminação da epiderme, bem como de cortes verticais superficiais na região do pulvino não tiveram efeito na diferenciação celular e os pulvinos continuaram agindo como inibidores do enraizamento.

O efeito inibidor do pulvino só é exercido quando suas células, vivas, estão em continuidade com o restante do pecíolo. A necessidade desta continuidade do tecido vivo, foi verificada pelo anelamento realizado na região imediatamente superior a esta estrutura. Neste caso, o isolamento do pulvino permitiu a formação de raízes logo acima do tratamento.

Tem sido verificado que o anelamento de estacas caulinares normalmente estimula a formação de raízes, estando seu efeito relacionado com acúmulo de carboidratos, aminoácidos e uma substância formadora de raízes não identificada, na região superior do anelamento (STOLTE e HESS, 1966; WALLERSTEIN et al., 1974).

Analisando o efeito de estiolamento conjuntamente com anelamento, DELARGY e WRIGHT (1978) observaram que anelamento proximal à região estiolada aumentava o efeito promotor de estiolamento, mas quando o anelamento era distal ao segmento estiolado era tão inefetivo como simples excisão do tecido estiolado, anulando também o efeito benéfico do anelamento proximal. Seus resultados corroboram com a interpretação de que o anelamento interrompe o transporte de uma substância ativa formadora de raiz, através da região cortical.

No caso atual o enraizamento acima da região de anelamento pode indicar que o tratamento está impedindo a ação do pulvino no transporte de substâncias provenientes da lâmina, ou no encaminhamento de uma substância inibidora para a região superior do pecíolo, ou mesmo na destruição de algum princípio ativo, proveniente do pecíolo, no seu próprio tecido pulvinar.

O efeito do pulvino na hidratação das folhas primárias de *P. vulgaris* em condições de enraizamento foi abordado por HEWITT e HILLMAN (1981), que inferiram ao pulvino basal um efeito coordenador na restrição do transporte de água ligado a uma atuação na abertura estomática. Segundo seus dados, em presença do pulvino basal, o pulvino apical após 20 horas de condições de enraizamento, ao mesmo tempo que se curvaria colocando a folha em posição vertical, permitiria maior abertura estomática na lâmina e restringiria o transporte hídrico, provocando em consequência um rápido dessecação da lâmina foliar. Esta desidratação rápida prejudicaria a distribuição de carboidratos e substân

cias hormonais, bem como restringiria a área laminar disponível para produção de assimilatos.

Folhas mantidas em condições de enraizamento com umidade relativa alta, mantiveram-se túrgidas, independentemente da presença do pulvino basal. Ainda nesta situação foi observada a influência inibidora do pulvino no enraizamento. Mesmo bloqueando a entrada de água pela região cortada do pecíolo com lanolina pura, não houve inibição do enraizamento, desde que as estacas de folhas fossem mantidas em ambiente com umidade relativa alta. Analisando a transpiração de folhas nestas condições (umidade relativa alta) de enraizamento durante os 4 primeiros dias não foram observadas diferenças significativas entre o comportamento de folhas com e sem pulvino (figura 19). A semelhança dos resultados de HEWITT e HILLMAN (1981), foi detectado um aumento da taxa de transpiração nas primeiras 24 horas, porém semelhante em ambos os tratamentos. Esta taxa diminuiu progressivamente nos dois tratamentos nos subsequentes 20, 30 e 40 dias, sem apresentarem diferenças significativas entre si. No 40 dia, a transpiração de folhas com pulvino foi mais reduzida do que a de folhas sem pulvino nos 20 e 30 dias. Entretanto, o processo de formação radicular normalmente já ocorreu neste período em folhas de 7 a 9 dias de idade (figuras 18 A e B), sendo pouco provável que este efeito seja responsável pela inibição observada em folhas com pulvino.

Os resultados dos experimentos do presente trabalho, demonstram que em folhas primárias de *Phaseolus vulgaris* L. os assimilatos podem facilmente se tornar um fator limitan-

te para formação de raízes, a semelhança do que tem sido mencionado para outras espécies por HOWARD e SYKES (1966) e MOORE e LOVELL (1969), ZAIDAN e VÁLIO (1977), ELIASSON (1978) etc.

ALTMAN e WAREING (1975) utilizando estacas hipocotiledonares de outra variedade de feijão, mencionam que as relações quantitativas entre área foliar e aplicação de AIA no enraizamento desta variedade, que facilmente enraiza, indicam que os carboidratos transportados pelas folhas são o principal fator limitante no enraizamento, sendo mesmo mais importante que o "fator de enraizamento" de natureza hormonal.

Em feijão, o pulvino poderia provocar uma alteração na translocação de assimilatos da lâmina para a região basal cortada, onde se estabelece o "sink", afetando desta forma o processo de formação de raízes neste local. Os dados de translocação de fotossintatos marcados em folhas alimentadas com $^{14}\text{CO}_2$, não são muito elucidativos. O acúmulo de radioatividade encontrado na base das estacas com e sem pulvino indicam que esta estrutura não impede a translocação de fotossintatos. Entretanto, o padrão de acúmulo em folhas em condições de enraizamento é diferente nos dois tipos de estacas (figura 17 A e 17B).

O decréscimo da translocação de assimilatos pode ocorrer por um efeito de saturação do floema (GIAQUINTA, 1980). A variação no padrão de acúmulo observado ao longo do pecíolo em que as estacas estiveram em condições de enraizamento poderia ser explicado pela utilização das reservas acumuladas. A disponibili-

dade deste material no pulvino poderia ser limitada pela alta concentração do ion potássio encontrado nesta estrutura e relacionado com os movimentos nictinásticos (KIYOSAWA e TANAKA, 1976; Kiyosawa, 1979). Embora as pesquisas sobre o efeito de ions monovalentes na disponibilidade de carboidratos não sejam conclusivos existem evidências de que altas concentrações de K^+ possam afetar este processo por aumentarem a síntese de amido por ativação da ADP-glicose amido sintase (HAWKER et al., 1974), ou da sacarosintase em direção à síntese de sacarose (PRASOLOVA et al., 1976), e inibindo a hidrólise da sacarose (COHEN et al., 1976 in GIAQUINTA, 1980).

Em estacas sem pulvino, a variação do acúmulo pode estar relacionada com a utilização das reservas nos processos metabólicos provavelmente ligados à regeneração, os quais parecem diminuídos do 1º para o 2º dia e intensificados do 3º para o 4º dia em condições de enraizamento.

O efeito de potássio, foi de certa maneira testado no enraizamento de folhas primárias de outra cultivar de *P. vulgaris* por OPPENOORTH. (1979). Nas concentrações usadas, o pré-tratamento com KOH reduziu o número e conseqüentemente a densidade de raízes ao longo do pecíolo. Entretanto, tal efeito, proporcional à concentração das soluções, foi relacionado com a intensidade da lesão provocada nos tecidos peciolares.

Nos tratamentos de estacas de folhas primárias de feijão com aplicação de alguns reguladores de crescimento fornecidos de diversas maneiras, apenas aqueles pertencentes ao grupo das auxinas mostraram algum efeito em relação à inibição do pul-

vino. Ainda assim, nestes casos o efeito do regulador se manifestou liberando a região superior do pulvino em sua presença, para o enraizamento. Este fato poderia ser indicativo de um possível efeito do pulvino no movimento de auxinas endógenas.

O transporte de auxinas tem sido analisado por muitos anos e os resultados indicam que a direção do fluxo deste regulador é independente da orientação física do órgão, podendo a substância se mover para fora do tecido de transporte, em direção a um receptor de agar, mesmo contra um gradiente de concentração. Isto foi verificado por VAN DER WEIJ (1932, 1934 in KALDEWERY, 1968) e confirmado por GOLDSMITH e THIMANN (1962) em coleoptile de aveia e por McCREADY (1963) usando auxina marcada, em pecíolo de *Phaseolus vulgaris*.

Em pecíolos de folhas primárias de feijão a polaridade do movimento da auxina diminui com a idade, como causa do seu desenvolvimento acrópeto. Esta alteração na direção do fluxo foi observada tanto com AIA como com 2,4-D e se mostrou correlacionada com um declínio no alongamento dos segmentos de pecíolo durante o experimento (McCREADY e JACOBS, 1963). Esta diminuição do movimento basípeto com a idade foi também observada em hipocótilos de feijão (McCREADY e JACOBS, 1967).

Talvez por esta razão, tenha sido detectado um movimento expressivo do ^{14}C proveniente do AIA-2- ^{14}C aplicado em vários locais da folha. As folhas usadas já se encontravam na fase final de expansão, onde o pecíolo está na sua fase final de maturação, geralmente finalizada na região apical. Realmente, quando o regulador foi aplicado no pulvino superior ou no meio do pecíolo

lo (figura 26 B e 26 C respectivamente) é que pode ser evidenciada alguma movimentação do radioisótopo. Foi também no tratamento nestes dois pontos (pulvino apical e meio do pecíolo) que se observou uma ligeira modificação na porcentagem de translocação para a região basal cortada com e sem pulvino. O nível de acúmulo do radioisótopo na base da folha sem pulvino tende a ser maior do que no pulvino ou mesmo na região correspondente, à medida que a aplicação se aproxima da base. Nos tratamentos de estacas com AIA em lanolina nestes mesmos pontos ocorre a promoção do enraizamento que se expressa inclusive com "enrugamento" de epiderme peciolar.

Aplicação de auxina marcada no pulvino basal, mostrou um certo acúmulo de ^{14}C no pulvino superior, indicando uma movimentação acrópeta, semelhante à observada no tratamento do pulvino apical (movimentação em direção à lâmina).

Embora a movimentação do ^{14}C tenha sido baixa, ela deve se realizar através do tecido vivo, uma vez que em folhas aneladas, a radioatividade não ultrapassa a região do anelamento (figura 27A e 27B).

Os resultados de experimentos de transporte de radioatividade proveniente de aplicação de AIA-2- ^{14}C , devem ser olhados com cuidado, uma vez que uma parte, embora pequena da radioatividade passa para outros compostos através de rápida metabolização, da substância aplicada. Estas evidências estão sendo verificadas através da análise metabólica da translocação da radioatividade do AIA-2- ^{14}C em hipocotilo de *Phaseolus vulgaris* com auxílio de cromatografia gasosa de alta pressão (HILLMAN, comunicação pessoal).

Dos métodos de aplicação de reguladores de crescimento usados no presente trabalho, o mais eficiente foi o de pré embebição. Observa-se que nas aplicações por lanolina, pincelamento ou mecha de algodão há necessidade do uso de concentrações mais elevadas para que o efeito da penetração de uma concentração menor seja detectável. Estes métodos de aplicação dificultam a compreensão do relacionamento dose-efeito. Analisando os resultados de aplicação de ácido 2-cloroetil fosfônico pela resposta de enraizamento, observa-se uma provável variação da penetração do ácido nos 4 tipos de tratamento (figura 30, 31 e 32).

A formação de raízes adventícias em estacas de folhas primárias de feijão carioca, sem pulvino pode ser inibida ou promovida por tratamento com ácido 2-cloroetil fosfônico. Assim, independentemente do método de aplicação, entre as concentrações mais altas aplicadas verifica-se que as mais altas inibem enquanto que as mais baixas promovem o enraizamento. A inibição foi observada no tratamento do pecíolo com lanolina e pincelamento, nas concentrações de 0,5 mg/g lanolina e 0,1mg/ml de água, enquanto que a promoção ocorreu com aplicação por meio de mecha de algodão e pincelamento nas doses de 0,005 e 0,05 mg/ml de água, respectivamente. Nos tratamentos de pré-embebição, por 17 horas as concentrações de 0,001 e 0,01 mg/ml de água não foram efetivas no enraizamento.

O ácido 2-cloroetil fosfônico quando em contacto com as células vegetais, libera etileno (YANG, 1969). A atividade

de do etileno como regulador de crescimento (PRATT e GOESHL, 1969); tem sido demonstrada em vários processos fisiológicos, inclusive na formação de raízes (ZIMMERMAN e WILCOXON, 1935). Embora sua função neste processo não seja bem compreendida, sua atividade tem sido bastante relacionada com as auxinas. As pesquisas nesta área indicam que o etileno é produzido pelas auxinas (CHADWICK e BURG, 1967) e que sua produção promove a destruição da própria auxina (MICHNER, 1938), podendo atuar no seu transporte (MORGAN e GAUSMAN, 1966) inibindo sua translocação (BEYER e MORGAN, 1969). Existem ainda indicações de que etileno promove a síntese de novo de RNA (HOLM et al, 1970), bem como de que o enraizamento de hipocotílos e pecíolos de *Phaseolus vulgaris* requer a presença conjunta de etileno e auxina (LINKINS et al, 1973).

As auxinas foram os únicos reguladores de crescimento, entre os testados neste trabalho, capazes de superar o efeito inibidor do pulvino, promovendo enraizamento ao longo do pecíolo, geralmente na região superior do pulvino. Este efeito promotor foi especialmente observado no tratamento de pré-embebição. Neste tratamento, AIB foi a auxina mais efetiva na promoção do enraizamento, embora ANA e AIA tenham também promovido o processo. AIA foi o menos eficiente, uma vez que além de promover a produção de menor número de raízes em ambos os tipos de estacas de folha (com e sem pulvino), em concentração mais baixa-0,01mg/ml da água - não conseguiu superar o efeito inibidor do pulvino.

O efeito promotor das auxinas na formação de raízes adventícias já foi mencionado por muitos pesquisadores,

trabalhando com várias espécies, como mencionado anteriormente no presente trabalho. A promoção do enraizamento ligada ao desenvolvimento de raízes ao longo do pecíolo, também foi mencionada e medida por OPPENDOORTH (1980), que inclusive relacionou o efeito do AIA quantitativamente ao da densidade de raízes formadas ao longo do pecíolo de folhas primárias de outra cultivar de feijão. A atuação dos vários tipos de auxina no enraizamento tem sido tentativamente explicada pela capacidade deste regulador de produzir etileno. BATTEN e MULLINS (1978) observaram que ANA, uma auxina sintética era não só efetiva na promoção do enraizamento como também em estimular a produção de etileno. Entretanto, aplicação de etileno ou de etefon tiveram pouco efeito no enraizamento. Desta maneira, o etileno não estaria diretamente envolvido na formação de raízes adventícias.

No esquema hipotético do inter-relacionamento hormonal atuante no mecanismo de formação de raiz, idealizado por OPPENDOORTH (1980), a auxina seria o ponto de partida para a formação radicular, atuante na primeira fase, período da desdiferenciação e o etileno atuaria no passo seguinte de organização das primeiras células divididas, em primórdio de raiz, no qual o crescimento ainda se dá por indução de desdiferenciação. Neste período (cerca de 40 horas após estaqueamento), o etileno produzido pela auxina atuaria na desdiferenciação e também na degradação da auxina. A auxina induziria então a sua própria degradação por estimular a síntese de peroxidases e etileno, os quais destroem a auxina (BEYER e MORGAN, 1969; PALMIERI et al., 1978). Levando-se em consideração esta

hipótese, o efeito de ANA poderia persistir se sua estrutura não fosse igualmente destruída pelo etileno e peroxidases. Por outro lado, altas concentrações de etileno, agiriam destruindo a auxina ao passo que concentrações mais baixas apenas aumentariam o efeito promotor do etileno na segunda fase - organização do primórdio. A ineficiência do etileno no tratamento por pré-embebição poderia estar relacionado com o período de aplicação uma vez que somente após aproximadamente 40 horas se estabelece a fase de primeira divisão e organização de um grupo de células em primórdio. Por ser um gás, o etileno se difundiria do tecido antes do período de atuação.

O efeito inibidor do pulvino poderia estar relacionado com aumento do conteúdo de ácido abscísico, uma vez que este inibidor pode ser sintetizado nas folhas em decorrência de "stress" de água (WRIGHT e HIRON, 1972). Esta é uma condição frequente em estacas de folhas com pulvino devido ao efeito desta estrutura no movimento estomático e restrição do transporte hídrico (HEWITT e HILLMAN, 1981). Entretanto, no trabalho atual, aplicação de ABA tanto em pasta de lanolina como por pré-embebição não afetou o enraizamento (figura 28). Corroborando com este resultado, ABA foi também encontrado em maior concentração na região basal do pecíolo que no pulvino. Embora o efeito deste regulador no enraizamento não seja bem compreendido, a sua ineficiência neste processo foi também encontrada para outra cultivar de feijão por KRELLE e LIBBERT (1969 *in* HARTUNG *et al.*, 1980).

Acompanhamento da movimentação do ^{14}C proveniente da aplicação de ABA-2- ^{14}C em vários pontos da estaca de fo

lha com e sem pulvino, também não ofereceu nenhum esclarecimento sobre o envolvimento deste regulador no processo de inibição (figuras 29A, 29B, 29C e 29D). A movimentação do radioisótopo é muito pequena e não apresenta polaridade definida. A característica não polar do transporte de ácido abscísico foi também observada em pecíolo de *Coleus* com o uso de ABA radioativo (VEEN, 1975). HOCKING et al. (1972) mencionam que extratos de várias partes da plântula de *Phaseolus vulgaris* cujas folhas receberam aplicação de ABA-2-¹⁴C, realizados após um dia de tratamento, apresentam o ¹⁴C ainda ligado ao ABA, embora a radioatividade aparecesse também em outras regiões do cromatograma. Assim, no caso presente, além da pequena translocação observada, deve ser considerado que uma parte da radioatividade pode estar ligada a outros compostos embora grande parte ainda continue ligada ao ABA.

Além da possibilidade do processo inibidor do pulvino estar relacionado com a translocação de água e substâncias essenciais ao estabelecimento da regeneração, foi também sugerida a hipótese do seu envolvimento em processos degradativos atuantes em fatores específicos impedindo suas ações morfogenéticas. No trabalho atual, foi verificado serem as auxinas os principais fatores com atividade comprovadamente efetiva no enraizamento. Assim, entre os mecanismos degradativos ligados ao fenômeno da rizogênese, estaria o da destruição da auxina pelo sistema AIA-oxidase, do qual as peroxidases são os principais componentes (VARDAR, 1968).

Os níveis de peroxidase total nas regiões onde o

enraizamento ocorre (base do pecíolo) e é inibido (pulvino), a presentaram uma variação ao longo do período em que as estacas se mantiveram em condições de enraizamento (figura 43). Em folhas recém colhidas, o conteúdo total de peroxidase é mais elevado no pecíolo que no pulvino, situação que se mantém aumentada após 24 horas de estaqueamento, após o que, os níveis começam a cair em ambas as estruturas, e mais rapidamente no pecíolo, de maneira que o conteúdo se mostra mais baixo no pecíolo no segundo dia. A partir daí, embora o nível no pulvino continue caindo vagarosamente, no pecíolo ele passa a aumentar.

O aumento inicial dos níveis de peroxidase tanto no pulvino como no pecíolo pode estar relacionado com a injúria do estaqueamento, uma vez que o tecido do pecíolo superior ao pulvino, que não foi ferido, não apresentou este aumento. O processo de injúria pode liberar compostos fenólicos normalmente compartimentalizados em componentes celulares (HARBORNE, 1964). O efeito auxínico pode ser afetado pela atuação dos ácidos fe nolcarboxílicos, sob cuja influência as raízes adventícias se formam mais próximo da base (TURETSKAYA et al., 1976). Segundo estes autores, o efeito dos diversos ácidos fenolcarboxílicos na rizogênese pode ser realizado a diferentes níveis: durante a biosíntese da auxina, no seu funcionamento e na sua decomposição. A atuação sinérgica ocorre quando estes ácidos intensificam a síntese de triptofano e retardam a destruição da auxina pela peroxidase. Portanto, dependendo da sua conformação, os ácidos fe nolcarboxílicos podem regular o balanço de síntese ou degradação auxínica.

As pesquisas histoquímicas com envolvimento de peroxidases no enraizamento, indicam que há um aumento de peroxidase nos tecidos do floema e xilema relacionadas com a formação de raízes, antes mesmo que qualquer alteração anatômica seja perceptível (MOLNAR e LA CROIX, 1972).

Segundo OPPENOORTH (1980), em pecíolos de *Phaseolus vulgaris* L. os primeiros sinais anatômicos do estabelecimento, da inicial de raiz aparecem cerca de 40 horas após estaqueamento, quando ocorre a primeira divisão celular. No trabalho atual, além da coincidência das características anatômicas estruturais dos pulvinos e pecíolos e a da origem das raízes adventícias com as da espécie (DOUTT, 1932; VAN RAALTE et. al., 1975), dentro de 24 horas após estaqueamento, nenhuma alteração anatômica relacionada com enraizamento foi observada, podendo, portanto, o tempo médio de formação das iniciais ser semelhante ao da cultivar analisada por OPPENOORTH. Os níveis peroxidásicos observados no período de 40 a 48 horas após estaqueamento indicam uma atividade mais baixa desta enzima no pecíolo que no pulvino, o que poderia propiciar o estabelecimento da rizogênese.

LEE (1972) mostrou que a atuação da peroxidase total não está necessariamente ligada à inibição do enraizamento. Este aumento de nível, segundo ele, pode também ser encontrado em um tecido em crescimento rápido. As folhas de feijão usadas no presente trabalho, já apresentavam a região basal diferenciada, podendo a variação dos níveis de peroxidase total ser atribuída a uma intensificação do processo oxidativo realizado pela peroxidase, embora seja difícil indicar o seu grau de envolvimento no processo de rizogênese. Entretanto, segundo LEE (1972) os processos de diferenciação radicular podem ser melhor identificados pelos níveis de izoenzimas. QUORIN et al. (1974), analisando o padrão de isoperoxidasas du

rante a formação radicular encontraram um aumento da intensidade das isoperoxidasas anódicas em concomitância com um decréscimo da intensidade das isoperoxidasas catódicas, relacionadas com o enraizamento, sem no entanto encontrarem variação no nível da peroxidase total.

Na busca de um fator intrínseco do pulvino atuante no processo inibitório por ele desenvolvido, observou-se que seu extrato bruto inibe proporcionalmente o enraizamento de folhas de feijão sem pulvino. Bioteste do extrato fracionado mostrou uma inibição na fração básica e uma promoção na fração neutra (figura 34).

A existência comprovada de estrógenos esteroidais em plantas de outra cultivar de *P. vulgaris* L. (YOUNG, 1977) e a mencionada atuação inibidora destes hormônios ao enraizamento (HEWITT e HILLMAN, 1980b), levou à comparação cromatográfica das frações do extrato do pulvino com padrões de estrona e estradiol. Foram encontradas manchas correspondentes ao padrão de estrona mais intensamente na fração básica e bem menos intensamente na fração neutra (figura 38). Além disso, o bioteste da fração básica evidenciou inibição na região dos R_fs correspondentes tanto a estrona e estradiol, como com a mancha frontal não caracterizada, julgada um isômero dos estrógenos.

Extratos esteroidais purificados de pulvino, quando comparados com padrões de estrona e estradiol mostraram a presença de substâncias cromatograficamente semelhantes à estrona, bem como ao isômero não identificado (figura 37).

O aparecimento de tênue mancha cromatográfica na fração neutra, correspondente ao Rf do padrão de estrona pode significar que tal substância possa ter efeito diferente dependendo de sua concentração, fato este comprovado por LESHEM(1967) com aplicações de estradiol em estacas de brocolí.

Embora os padrões de estrona e estradiol não tenham mostrado efeito no enraizamento, independentemente do tipo de aplicação, extratos esteroidais de pulvino e pecíolo quando aplicados através de pasta de lanolina na região mediana do pecíolo de folhas primárias de feijão, inibiram o enraizamento (figura 39).

A ineficiência dos padrões de estrona e estradiol no enraizamento foi também mostrada por HEWITT e HILLMAN(1980b) que só puderam observar um efeito inibidor dos estrógenos sulfatados. Tal diferença de comportamento foi explicada pelo fato dos estrógenos serem pouco solúveis em água, ficando retidos no meio lipofílico celular, enquanto que os sulfatados, facilmente solúveis em água penetram e são translocados mais facilmente. Em vista desta argumentação, poder-se-ia considerar que os estrógenos contidos nos extratos encontram-se em formas conjugadas mais facilmente penetráveis e translocáveis no meio celular, sendo possível evidenciar o seu efeito. Entretanto, como os extratos esteroidais de pulvino e pecíolo não são totalmente purificados, não se pode excluir a possibilidade da presença de outra substância não esteroideal nestes extratos, a qual seria responsável pelo efeito inibidor observado no teste de enraizamento (figura 39).

VI - RESUMO

Em *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca, a formação de raízes adventícias no pecíolo de folhas primárias ocorre a partir de células do parênquima floemático. Não foi observada formação de raízes a partir de células do pulvino. Nesta cultivar o pulvino inibe o enraizamento de estacas de folhas, independentemente da idade foliar. Na rizogênese de folha sem pulvino, as mais jovens apresentam pequeno número de raízes, mas sempre enraizam. Nem todas as folhas mais velhas enraizam, mas as que o fazem desenvolvem um grande número de raízes.

A redução da área da lâmina foliar reduz o enraizamento de folhas sem pulvino, sendo a redução mais significativa pela eliminação da metade superior da lâmina, sugerindo o efeito de substâncias hormonais, além dos fotossintatos produzidos nesta região.

Interrupção da nervura média da lâmina provoca enraizamento na região seccionada, exceto quando apical, sendo o enraizamento proporcional à área da lâmina relacionada com a secção. Tal enraizamento não afeta a rizogênese na base do pecíolo livre do pulvino. Bloqueio da fotossíntese com DCMU inibe totalmente o enraizamento evidenciando a necessidade de carboidratos para o estabelecimento da rizogênese.

Indução de senescência com aplicação de vários períodos de escuro em folhas ligadas à planta ou destacadas e em condições de enraizamento mostrou que quando as folhas eram levadas para as condições de enraizamento na luz, a rizogênese só o

correu quando o período de pré-tratamento com escuro não excedeu a 48 horas. Embora neste período não tenham sido detectadas diferenças nos níveis de clorofila total, é possível que a transferência das folhas do escuro para o claro acelere o processo de senescência o que, dependendo do grau de adiantamento alcançado no escuro, pode ser fatal para o estabelecimento da rizogênese.

O pulvino não afeta a translocação de carboidratos, entretanto, a variação do padrão de acúmulo nos dois tipos de folha (com e sem pulvino) pode indicar um controle de "feed back", ou que a disponibilidade destas substâncias no pulvino seja limitada pelas altas concentrações de potássio encontradas nas suas células.

Transpiração de folhas com e sem pulvino em condições de enraizamento é semelhante em ambas as espécies havendo apenas uma redução nas folhas com pulvino no 49 dia em relação às folhas sem pulvino nos 29 e 39 dias. Neste período, entretanto, o enraizamento já ocorreu, não havendo portanto relacionamento direto deste fenômeno com a inibição do enraizamento.

Auxinas promovem o enraizamento tanto de folhas com pulvino como sem esta estrutura. AIB foi a auxina mais efetiva em ambas as doses aplicadas, enquanto que AIA foi a menos efetiva, especialmente em folhas com pulvino. Este efeito pode estar ligado à capacidade das auxinas de induzirem a síntese de etileno, uma vez que tanto AIB como ANA não são degradados pelo sistema de AIA-oxidase. O pulvino não afeta a translocação de ^{14}C do AIA-2- ^{14}C aplicado na lâmina foliar, sendo o acúmulo do

radioisótopo na base da folha sem pulvino, maior que no pulvino ou na região imediatamente superior a ele. Aplicação no pulvino basal provoca acúmulo no pulvino superior (transporte acrópeto). Aplicação de TIBA no pulvino superior inibe totalmente o enraizamento, sugerindo que o efeito desta substância não se limita ao bloqueio do transporte das auxinas.

Etileno afeta o enraizamento de folhas sem pulvino promovendo-o em doses mais baixas e inibindo-o nas mais elevadas.

ABA não afetou o enraizamento nas doses aplicadas, exceto uma pequena inibição em folhas sem pulvino quando aplicado em pasta de lanolina na lâmina foliar. ABA endógeno é mais concentrado na base do pecíolo que no pulvino. Esta estrutura não afeta a translocação de ^{14}C do ABA-2- ^{14}C , não havendo indício de polaridade na movimentação do radioisótopo.

Em condições de enraizamento, o nível de peroxidase (EC 1.11.1.7) total varia na base de estacas com e sem pulvino. Esta variação pode estar relacionada com a disponibilidade de auxinas para o enraizamento, embora seja aconselhável uma análise dos padrões isoenzimáticos.

O extrato bruto de pulvino inibe proporcionalmente o enraizamento de folhas sem pulvino. Fração básica do extrato purificado inibe o enraizamento, enquanto que a fração neutra o promove. A presença de substâncias com comportamento cromatográfico semelhante a estrógenos nestes extratos foi comprovada com o uso de padrões de estrona e estradiol. A julgar pela intensidade da reação cromatográfica, a fração básica provavelmente possui maior quantidade de estrógenos que a fração neutra, podendo as res

postas (inibição e promoção) estarem respectivamente ligadas a este fato. O bioteste da fração básica apresenta inibição nas regiões correspondentes às manchas cromatográficas dos estrógenos, bem como do suposto isômero presente em todos os cromatogramas.

Aplicação de estrógenos padrões não afeta o enraizamento, porém, aplicação de extrato esteroidal de pulvino e pecíolo inibem-no. Como a ineficiência dos estrógenos purificados tem sido relacionada com a sua baixa solubilidade em meio aquoso, a inibição causada por estes extratos pode indicar que nele os estrógenos estejam sob formas conjugadas facilmente solúveis no meio aquoso celular, sendo facilmente absorvidos e translocados. Há entretanto a possibilidade de que os extratos esteroidais não purificados contenham outro tipo de substância que seja responsável pelo efeito inibidor observado no teste de enraizamento.

SUMMARY

Adventitious root initiation in the petioles of primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioca propagate from parenchymatic cells of the phloem. The presence of the pulvinus inhibits rooting regardless of the age of the leaf. Young leaves without the pulvinus always produce roots, although in small numbers, while rooting of old leaves is less frequent but in larger numbers.

Reduction of the leaf blade reduces rooting. In this respect upper half is more effective thus suggesting a hormonal effect besides the necessity of photosynthates produced in this area.

Interruption of the main vein of the leaf induces rooting near the cut area except when apical. Such rooting does not affect rooting of the petiole.

A carbohydrate requirement for rooting is suggested by the inhibitory effect of DCMU upon root formation.

Dark pre-treatment of intact plants or isolated leaves for longer than 48h inhibits rooting. Although changes in chlorophyll levels were not detectable after this dark period it is possible that the transfer from dark to light stimulated senescence and consequently restrained rooting.

The pulvinus does not affect carbohydrate translocation although differences in the pattern of accumulation in leaves with and without pulvinus would suggest either a feed back control or a limited availability of these substances by the high levels of K^+ in the cells.

Transpiration of leaves with or without pulvi

nus was similar and no correlation between transpiration and root inhibition was detected.

Rooting of leaves with or without the pulvinus was enhanced by auxins. IBA was the most effective in both concentrations used. IAA was less effective specially in leaves with the pulvinus. The pulvinus does not affect translocation of ^{14}C from IAA-2- ^{14}C fed through the leaf blade. After feeding at the basal pulvinus, radioactivity was accumulated in the apical pulvinus (acropetal transport). Ethylene affects rooting of leaves without the pulvinus, promoting at low concentrations and inhibiting at high concentrations. Exogenous ABA does not affect rooting. The pulvinus does not interfere with the translocation of ^{14}C from ABA-2- ^{14}C , polarity not being observed.

During the rooting period, peroxidase (EC 1.11.1.7) activity changes in the lower part of the petiole both with or without the pulvinus.

A crude extract of the pulvinus inhibits rooting of leaves without the pulvinus. Inhibition was also found in the basic fraction from partially purified extracts while promotion was recorded in the neutral fraction.

Thin-layer chromatography of the basic fraction with estrogen standards (estrone and estradiol) showed similar spots with the same Rfs.

Inhibition of rooting was detected in bioassays of the basic fraction at the Rf corresponding to the standard estrogens.

Although extracts of pulvinus and petiole inhibited rooting, standard estrogens were ineffective. This could be explained by differences in translocation of free estrogens (standards) and possibly conjugated estrogens (extracts): perhaps conjugated forms being more easily absorbed and translocated through the tissues.

Another possibility could be the presence of contaminants in the extracts responsible for the root inhibition.

VII - ABREVIATURAS

ABA	-	ácido abscísico
AIA	-	ácido indolil-3-acético
AIB	-	ácido indolil-3-butírico
ANA	-	ácido naftaleno acético
AVG	-	aminoetoxivinil glicina
BSA	-	albumina de soro bovino
Bq	-	Bequerel(desagregações por segundo)
CEPA	-	ácido 2-cloroetil fosfônico (etrel,etefon)
μCi	-	micro Currie
2,4-D	-	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
L-2,4-D	-	ácido L-2,4-diclorofenoxi isopropiônico
DCMU	-	3,4 diclorofenil dimetil uréia
enraiz.	-	enraizado
enraiztº	-	enraizamento
FAA	-	formol, ácido acético e álcool
fls	-	folhas
GA ₃	-	ácido giberélico
IAA	-	indolil-3-acetic acid
IBA	-	indolil-2-butiric acid
Ly/min	-	Lyman/min= cal/cm ² . min
p/fl	-	por folha
RNA	-	ácido ribonucleico
s/	-	sem
TCA	-	ácido tricloroacético
UV	-	ultra violeta
TIBA	-	ácido 2,3,5-triodobenzóico

IX - BIBLIOGRAFIA

- ALTMAN, A.e WAREING, P.F. 1975. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ^{14}C -labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. Plant Physiol. 33:32-8.
- ANAND, V.K., CHIBBAR, R.N.e NANDA, K.K. 1972..Effect of GA_3 and IBA on rooting and the sprouting of buds on stem cuttings of *Ipomoea fistulosa*. Plant Cell Physiol. 13:917-21.
- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant. Physiol. 24:1-15.
- BATTEN, D.J. e GOODWIN, P.D. 1981. Auxin transport inhibitors and the rooting of hypocotyl cuttings from etiolated mung-bean *Vigna radiata* (L.) Wilczek seedings. Ann.Bot.(Lond.)47:497-503
- BATTEN, D.J. e MULLINS, M.G. 1978. Ethylene and adventitious root formation in hypocotyl segments of etiolated mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) seedlings. Planta (Berl.) 138:193-7.
- BEEVERS, L.1976. Senescence.In: J.E. Varmer e J.D. Bonner (eds.) Plant Biochemistry. Academic Press, New York. pp.771-94.
- BEYER, E.M. e MORGAN, P.W. 1969. Time sequence of the effect of ethylene on transport, uptake and decarboxylation of auxin. Plant Cell Physiol. 10:787-99,

- BHATTACHARYA, S., BHATTACHARYA, N.C. e MALIK, C.P. 1978. Synergistic effect of gibberellic acid and indole 3-acetic acid on rooting in stem cuttings of *Ablemoschus esculentus* Moench. Planta(Berl.) 138:111-2.
- BRIAN, P.W., HEMMING, H.G. e LAVEE, D. 1960. Inhibition of rooting of cuttings by gibberellic acid. Ann.Bot.(Lond.) 24:407-19.
- BRUMMEL, D.A. e HALL, J.L. 1979. The role of the epidermis in auxin induced and fusicoccin-induced stem elongation growth. The tenth International Conference on Plant Growth Substances. Madison, Wisconsin. July 22-26. Abstract no065. pp.39.
- BUNNING, E. 1973. The physiological clock (3rd ed), Spring-Verlag, Berlin.
- CHADWICK, A.V. e BURG, S.P. 1967. An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic acid. Plant Physiol. 42:415-20.
- CAMPAGNAT, P. 1961. Differenciation et formation des racines et des bourgeons. In: W. Ruhland (ed.) Encyclopedia of Plant Physiology. vol XV. Spring-Verlag, Berlin. pp.839-71.
- CHANDRA, G.R. e GREGORY, L.E. e WORLEY, J.E. 1971. Studies on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyle. Plant Cell Physiol 12:317-324.
- COLEMAN, W.R. e GREYSON, R.I. 1976. Root regeneration from leaf cuttings of *Lycopersicum esculentum* Mill, application of the leaf plastochron index and responses of exogenous gibberellic acid. - J. Exp. Bot. 27:1339-51
- COLEMAN, W.K. e GREYSON, R.I. 1977a. Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*L.esculentum*) cultured "in vitro". New Phytol. 78:47-54.

- COLEMAN, W.K. e GRAYSON, R.I. 1977b. Analysis of root formation in leaf discs of *L. esculentum* Mill. cultivated in vitro. Ann. Bot. (Lond.) 41:307-20.
- DA CRUZ, G.S. e AUDUS, L.J., 1978. Studies of hormone-directed transport in decapitated stolons of *Saxifraga sarmentosa*. Ann. Bot. (Lond.) 42:1009-27.
- DELARGY, J.A. e WRIGHT, C.E. 1978. Root formation in cuttings of apple (cv. Bramley's seedling) in relation to ringbarking and to estiolation. New Phytol. 81:117-27
- DALE, J.E. 1982. The growth of leaves. The Institute of Biology's. Studies in Biology N°137. Edward Arnold. London.
- DORE, J. 1965. Physiology of regeneration in cormophytes. In: Encyclopedia of Plant Physiology. vol. 15 (W. Ruhland ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-91.
- DOUTT, M.T. 1932. Anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. var. Black Valentine. Michigan Technical Bulletin 128:2-31.
- ELIASSON, L. 1978. Effects of nutrients and light on growth and root formation in *Pisum sativum* cuttings Physiol. Plant. 43:13-18.
- ERIKSEN, E.N. 1973. Root formation in pea cuttings. I: Effects of decapitation and disbudding at different developmental stages. Physiol. Plant. 28:503-61.
- ERIKSEN, E.N. e MOHAMED, S. 1974. Root formation in pea cuttings. II. The influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. Physiol. Plant. 30:158-62.

ESAU, K. 1965. Plant anatomy. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. London.

FELIPPE, G.M. 1979. Promotion of rooting in stem cuttings of *Panicum maximum* Jacq. by gibberellic acid and other growth regulator. Rev. Bras. Bot. 2:73-6

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

FOONG, T.W. e BARNES, M.F. 1981. Rooting "cofactors" in *Rhododendron*: the fractionation and activity of components from an easy-to-root and a difficult-to-root variety. Biochem. Physiol. Plant. 176:507-23.

FOSTER, A.S. 1934. The use of tannic acid and iron chloride for staining cell walls in meristematic tissue. Stain Technol. 9:91-2.

GALSTON, A.W. e DALBERG, L.Y. 1954. The adaptative formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. Am. J. Bot. 41: 373-380.

GAUTHERET, R.J. 1969. Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured in vitro. Am. J. Bot. 56: 702-77.

GEUNS, J.M.C. 1978. Steroid hormones and plant growth and development. Phytochemistry 17: 1-14

GIAQUINTA, R.T. 1980. Translocation of sucrose and oligosaccharides. Cap. 8. In J. Preiss (ed.) Biochemistry of plants. Carbohydrates: Structure and function. Vol. 3. Academic Press. New York. pp. 271-320.

- GIROUARD, W.K. 1969. Physiological and biochemical studies of adventitious root formation. Extractible rooting cofactors from *Hedera Helix*. Can. J. Bot. 47: 687-99.
- GOLDSMITH, M.H.M. e THIMANN, K.V. 1962. Some characteristics of movement of indoleacetic acid in coleoptiles of *Avena*. I. Uptake, immobilization, and distribution of IAA during basipetal translocation. Plant. Physiol. 37: 492-505.
- GREGORY, F.G. e SAMANTARAI, B. 1950. Factors concerned in rooting responses of isolated leaves. J. Exp. Bot. 1:159-93
- GUPTA, S., KOCHLAR, V.K. e NANDA, K.K. 1977. Effect of some metabolic inhibitors on rooting cuttings of *Phaseolus mungo* under varying light conditions and its relationship with auxin and nutrition. Ann. Bot.(Lond.) 41: 507-15
- HABBAGUCHI, K. 1977. Alteration in polyphenol oxidase activity during organ redifferentiation in carrot calluses cultivated in vitro. Plant. Cell Physiol. 18: 181-9.
- HAMBERG, T. 1951. Rooting experiments with hypocotyles of *Phaseolus vulgaris* L. Physiol. Plant. 4: 358-59.
- HAMBERG, T. 1953. The effect of vitamins K and H on the root formation in cuttings of *Phaseolus vulgaris* L. Physiol. Plant. 6: 17-20.

- HAMBERG, T. 1954. The relation between the occurrence of auxin and rooting of hypocotyls in *Phaseolus vulgaris* L. Physiol. Plant. 7:323-31.
- HANSEN, J. 1976. Adventitious root formation induced by gibberellic acid and regulated by the irradiance to the stock plants. Physiol. Plant. 36: 77-81.
- HANSEN, J. e ERIKSEN, E.N. 1974. Root formation of pea cuttings in relation to the irradiance of the stock plants. Physiol. Plant. 43: 13-18.
- HARBORNE, J. 1964. Biochemistry of phenolic compounds. Academic Press, London.
- HARDWICK, K., WOOD, M. e WOOLHOUSE, H.W. 1968. Photosynthesis and respiration in relation to leaf age in *Perilla frutescens* (L.) Britt. New Phytol. 67: 79-86.
- HARTUNG, W., OHL, B. e KUMMER, V. 1980. Abscisic acid and the rooting of runner bean cuttings. Z. Pflanzenphysiol. 98:95-103.
- HAWKER, J.S., MARSCHENER, H. e DOWTON, W.S.J. 1974. Effects of sodium and potassium on starch synthesis in leaves. Austr. J. Plant. Physiol. 1:491-501
- HESS, C.E. 1964. A physiological analysis of root initiation in easy and difficult-to-root cutting. Proc. 16th Intern. Hort. Congr. 1962. 4: 375-81.
- HESS, C.E. 1969. Internal and external factors regulating root initiation. In: Root Growth. Plenum Press, New York pp.42-53

- HEWITT, S. e HILLMAN, J.R. 1980a. Steroidal oestrogens and adventitious root formation in *Phaseolus* cuttings. Ann.Bot.(Lond.) 46: 153-64.
- HEWITT, S. e HILLMAN, J.R. 1980b. Steroidal oestrogens and plant growth and development. New Phytol. 85: 329-50.
- HEWITT, S. e HILLMAN, J.R. 1981. Inhibition of adventitious root formation in *Phaseolus vulgaris* L. primary leaf cuttings by the presence of the proximal pulvinus. Ann. Bot.(Lond.)48:569-72.
- HOAGLAND, D.R. e ARNON, D.I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agric. Expt. Stn - Circ. 347.
- HOCKING, T.J., HILLMAN, J.R. e WILKINS, M.B. 1972. Movement of abscisic acid in *Phaseolus vulgaris*. Nat. New Biol. 235: 124-5.
- HOLM, R.E. O'BRIEN, T.J., KEY, J.L. e CHERRY, J.H. 1970. The influence of auxin and ethylene on chromatin-directed ribonucleic acid synthesis in soybean hipocotyl. Plant.Physiol.45: 41-5.
- HOWARD, B.H. 1968. Effects of bud removal and wounding on rooting in hardwood cuttings. Nature (Lond.) 220:263.

- HOWARD, B.H. e SYKES, J. Y. 1966. Regeneration of the hop plant (*Humulus lupulus* L.) from so wood cuttings. II. Modification of the carbohydrate resources within the cutting. J.Hort. Sci. 41:155-63.
- HUBRICK, K.T. e REID, D.M. 1980. A rapid method for the extraction and analysis of abscisic acid from plant tissue. Plant. Physiol. 65: 523-5.
- JACKSON, M.B. e HARNEY, P.M. 1969. Rooting cofactors, indoleacetic acid, and adventitious root initiation in mung bean cuttings (*Phaseolus aureus*). Can. J. Bot. 48: 943-6.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc-Graw-Hill. New York.
- KALDEWEY, H. 1968. Auxin transport: general remarks concerning the terminology and the methods. In Y. Vardar (ed.) North Holland Publishing Company, Amsterdam. pp.1-23.
- KAWASSE, M. 1964. Centrifugation, rhizocaline and rooting in *Salix alba* L. Physiol. Plant. 17:855-65.
- KAWASSE, M. 1971. Causes of centrifugal root promotion. Physiol Plant. 25:64-70.
- KAMINEK, M. 1967. Root formation in pea stem sections and its inhibition by kinetin, ethionine and chloramphenicol. Biol Plant. 9: 86-91

- KHAN, A.R., ANDERSEN, A.S. e HANSEN, J. 1977. Morphactin and adventitious root formation in pea cuttings. Physiol. Plant. 39:97-100.
- KIYOSAWA, K. 1979. Unequal distribution of potassium anions within the *Phaseolus* pulvinus during circadian leaf movement. Plant Cell Physiol. 20:1621-34
- KIYOSAWA, K. e TANAKA, T. 1976. Change in potassium distribution in *Phaseolus* pulvinus during circadian movement of the leaf. Plant Cell Physiol. 17:289-98.
- KRIEGER, K.G. 1978. Early time course and specificity of auxin effects on turgor movement of the bean pulvinus. Planta (Berl.) 140:107-9
- LANCE, C. 1955. Sur la détermination de l'activité peroxidase des extraits bruts de tissu végétaux. Rev. Gen. Bot. 62:609-21
- LAVEE, S. E GALSTON, A.W. 1968. Hormonal control of peroxidase activity in cultured *Pelargonium* pith. Am. J. Bot. 55:890-893.
- LEE, T.T. 1971. Cytokinin controlled indoleacetic oxidase isoenzyme in tobacco callus culture. Plant. Physiol. 47:181-85.
- LEE, T.T. 1972. Interaction of cytokinin, auxin and gibberellin on peroxidases isoenzymes in tobacco tissues cultivated in vitro. Can. J. Bot. 50:2471-7.

- LESHEM, Y. 1967. Physiological effects of animal steroid and gonadotropic hormones on curd cuttings of *Brassica oleracea*. Phyton. (B. Aires) 24: 25-9.
- LINKINS, A.L., LEWIS, L.N. e PLAMER, R.L. 1973. Hormonally induced changes in the stem and petiole anatomy and cellulase enzyme patterns in *Phaseolus vulgaris*. Plant.Physiol. 52:554-60
- LOVELL, P.H. e MOORE, K.G. 1969. The effects of light and cotyledon age on growth and root formation in excised cotyledons of *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) 85: 351-8
- LOVELL, P.H., COBB, A. e MOORE, K.G. 1971. The control of root initiation and development in detached cotyledon of *Sinapis alba* L. and *Raphanus sativus* L. Ann. Bot. (Lond.) 35:501-9.
- LOVELL, P.H., ILLSLEY, A. e MOORE, K.G. 1972. The effects of light and sucrose on root formation, photosynthetic ability, and senescence in detached cotyledons of *Sinapis alba* L. and *Raphanus sativus* L. Ann. Bot (Lond.). 36:123-34.
- LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem. 193: 265-75.
- MARTIN, C. e THIMANN, K.V. 1972. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. Plant.Physiol. 49:64-71.

- McCREADY, C.C. 1963. Movement of growth regulators in plants. I. Polar transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in segments from the petioles of *Phaseolus vulgaris*. New Phytol. 62:3-18.
- McCREADY, C.C. e JACOBS, W.P. 1963. Movement of growth regulators in plants. IV. Relationship between age, growth and polar transport in petioles of *Phaseolus vulgaris*. New Phytol. 62: 360-6.
- McCREADY, C.C. e JACOBS, W.P. 1967. Movement of growth regulators in plants. V. A further note on the relationship between polar transport and growth. New Phytol. 66:485-8.
- MICHENER, H.D. 1938. The action of ethylene on plant growth. Am. J. Bot. 25: 711-20.
- MOHAMED, S. e ERIKSEN, E.R. 1974. Root formation in pea cuttings. IV. Further studies on the influence of indole-3-acetic acid at different developmental stages. Physiol. Plant. 32:94-6
- MOLNAR, J.M. e LA CROIX, L.J. 1972. Studies of the rooting cuttings of *Hydrangea macrophylla* enzyme changes. Can. J. Bot. 50:315-22
- MOORE, K.G. e LOVELL, P.H. 1969. Root formation by detached white mustard (*Sinapis alba*) cotyledon. Physiol. Plant. 22:937-44.
- MOORE, K.G. e LOVELL, P.H. 1970. Control of rooting and the pattern of senescence in detached white mustard cotyledon. Physiol. Plant. 23:985-92

- MORGAN, P.W. and H.W. GAUSMAN. 1966. Effects of ethylene on auxin transport. Plant Physiol. 41:45-52.
- MULLINS, M.C. 1972. Auxin and ethylene in adventitious root formation in *Phaseolus aureus* (Roxb). In: J.Carr (ed.) Plant Growth Substances 1870. Springer-Verlag, Berlin. pp.526-33.
- NANDA, K.K. e JAIN, M.K. 1972. Utilization of sugars and starch as carbon sources in the rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. New Phytol. 71: 825-8.
- NANDA, K.K., PUROHIT, A.N. e BALA, A. 1967. Effect of photoperiod, auxin and gibberellic acid on rooting of stem cuttings of *Bryophyllum tubiflorum*. Physiol.Plant.20:1096-102.
- NANDA, K.K., JAIN, M.K. e MALHOTRA, S. 1971. Effect of glucose and auxinas on rooting etiolated stem segments of *Populus nigra*. Physiol. Plant. 24:387-91.
- NANDA, K.K., ANAND. V.K. e CHIBBAR, R.N. 1972. The promotive effect of gibberellic acid on the production of adventitious roots on stem cuttings of *Ipomoea fistulosa*. Planta (Berl.) 105:360-63.
- OKORO, O.O. e GRACE, J. 1976. The physiology of rooting of *Populus*

cuttings. I. Carbohydrates and photosynthesis. Physiol. Plant.
36:133-8

OKORO, O.O. e GRACE, J. 1978. The physiology of rooting of *Populus* cuttings. II. Cytokinin activity in leafless hardwood cuttings. Physiol. Plant. 44:167-70.

OKORSE, R. SIEGEL, B.Z. e GALSTON, A.W. 1966. Hormone induce repression on a peroxidase isozyme in plant tissue. Science 151:452-3

OPPENORTH, J.M. 1978. The influence of colchicine on initiation and early development of adventitious roots. Physiol. Plant. 42:375-8

OPPENORTH, J.M. 1979. Influence of cycloheximide and actinomycin D on initiation and early development of adventitious roots. Physiol. Plant. 47:134-8

OPPENORTH, J.M. 1980. Formation of adventitious roots on green leaf cuttings of *Phaseolus vulgaris* L. Ph. D. Thesis. Rijksuniversiteit.

PALMIERI, S., ODOARDO, M., SORESSI, G.P. e SALAMINI, F. 1978. Indoleacetic acid oxidase activity in two high-peroxidase tomato mutants. Physiol. Plant. 42:85-90.

PRATT, H.K. e GOESCHL, J.D. 1969. Physiological roles of ethylene in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. 20:541-54.

- PROSOLOVA, M.F., MANBETKULOV, SH., PAVLINOVA, O.A. e PECHENOV, V..A.
1976. Action of inorganic ions of sucrose synthase of sugar
beet roots. Soviet Plant Physiol. 23:249-55.
- QUORIM, M., BOXUS, B. e GASPAR, TH. 1974. Root initiation and iso
peroxidases of stem tip cutting from mature *Prunus* plants.
Physiol. Veg. 12:165-74.
- RHODES, M.J.C. 1980. Respiration and senescence of plant organs.
Cap. 10. In, D.D. Davies (ed.). The biochemistry of plants.
Metabolism and respiration. Vol. 2. Academic Press. New York,
pp. 419-62.
- SATTER, R.L. 1980. Nyctinastic leaf movements: hands of the biolo
gical clock. What's new in Plant Physiology 11:13-6.
- SCHWABE, W.W. 1968. Studies on the role of the leaf epiderm in
photoperiodic perception in *Kalanchoe Blossfeldiana*. J. Exp. Bot.
58:108-13
- SHANKS, J.B. 1969. Some effects and potencial uses of ethrel on or
namental crops. Hort. Sci. 4:56-9.
- SHANON, L.M. 1968. Plant isoenzymes. Annu. Rev. Plant Physiol. 19:187
210.
- SIEGEL, B.Z. e GALSTON, A.W. 1967. The isoperoxidases of *Pisum sati
vum*. Plant. Physiol. 42:221-6.

- SKOOG, F. e MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Biol. 11:118-131.
- SNEDECOR, G.W. 1962. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. 5th ed. The Iowa University Press, Iowa, USA,
- STOLTZ, L.P. e HESS, C.E. 1966. The effect of girdling upon root initiation carbohydrates and aminoacids. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 89: 734-43.
- STUART, N.W. 1938. Nitrogen and carbohydrates metabolism of kidney bean cuttings as affected by treatment with indoleacetic acid. Bot. Gaz. 100:298-311.
- TETLEY, R.M. e THIMANN, K.V. 1974. The metabolism of oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism, and the action of cytokinins. Plant Physiol. 54:294-303.
- THIMANN, K.V. e POUTASSE, E.F. 1941. Factors affecting root formation of *Phaseolus vulgaris*. Plant. Physiol. 16:585-98.
- THIMANN, K.V., TETLEY, R.M. e KRIVAK, B.M. 1977. Metabolism of oat leaves during senescence. V. Senescence in light. Plant. Physiol. 59:448-54.

- TORREY, J.G. 1965. Physiological basis on organization in the root. In: W.Ruhland (ed.) Encyclopedia of Plant Physiology. vol.XV/1. Springer-Verlag, Berlin. pp.1296-327.
- TORREY, J.C. 1976. Root hormones and plant growth. Annu,Rev.Plant. Physiol. 27:435-59.
- TURETSKAYA, R.KH., GUS'KOV, A.V., BLEIS, W., KOF, E.M., KEFELI, V.I. e KUTAČEK, M. 1976. Possible role of phenolic compounds in growth and rhizogenesis of cuttings. Soviet Plant Physiol.23: 640-3.
- VĀLIO, I.F.M. 1969. Promotion and inhibition of growth in *Lunularia cruciata* (L.) DUM. Ph.D. Thesis. University of London.
- VAN OVERBEEK, J., GORDON, S.A. e GREGORY, L.E. 1946. Analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings. Am.J.Bot.33:100-7.
- VAN RAALTE, M.H., DE KOK, L.J. e OPPENOORTH, J.M. 1975. Experiments on root formation. The site of initiation of adventitious roots in petioles of *Phaseolus vulgaris* L. Proc. K.Ned.Akad. Wet.Ser. C78:217-25.
- VARDAR, Y. 1968. Agent modifying the longitudinal transport of auxin. In Y. VARDAR (ed.) The transport of plant hormones. North Holland Publishing Company - Amsterdam pp.156-91

- VARGA, M. e HUMPHRIES, E.D. 1974. Root formation on petioles of detached primary leaves of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) pretreated with gibberellic acid, triiodobenzoic acid and cytokinins. Ann. Bot. (Lond). 38: 803-7
- VEEN, H. 1975. Non-polar translocation of abscisic acid in petiole segments of *Coleus*. Acta Bot. Neerl. 24:54-62.
- VEIERSKOV, V., HANSEN, J. e ANDERSEN, A.S. 1976. Influence of cotyledon excision and sucrose on root formation in pea cuttings. Physiol. Plant. 36:105-9.
- VON GUTTENBERG, H. e ZETSCHKE, K. 1956. Der Einfluss des Lichtes auf die Auxinkildung und den Auxintransport. Planta (Berl.) 48:99-134
- WELANDER, T. 1978. Influence of nitrogen and sucrose in the medium and of irradiance of the stock plants on root formation in *Pelargonium* petioles grown in vitro. Physiol. Plant. 43:136-41.
- WALLERSTEIN, I., GOREN, R. e MONSELISE, S.P. 1974. The effect of girdling on starch accumulation in sour orange seedlings. Can. J. Bot. 52:935-937.
- WENT, F.W. 1929. On a substance causing root formation. Proc. K. Ned. Akad. Wetenschap. 32: 35-39.
- WENT, F.W. e THIMANN, K.V. 1937. Phytohormones. Macmillan, New York.

- WRIGHT, S T.C. e HIRON, R.W.P. 1972. The accumulation of abscisic acid in plants during wilting and under other stress conditions. In: D.J. Carr (ed.) Plant growth substances 1970. Springer Verlag, Berlin, pp.291-8
- YANG, S.F. 1969. Ethylene evolution from 2-chlorethylphosphonic acid. Plant. Physiol. 44:1203-24.
- YOUNG, I.J. 1977. Steroidal oestrogens in *Phaseolus vulgaris*. Ph.D. Thesis, University of Glasglow.
- YOUNG, I.J., KNIGHTS, B.A. e HILLMAN, J.R. 1977. Ostradiol and its biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. Nature(Lond.)267:429.
- YOUNG, I.J., HILLMAN, J.R. e KNIGHTS, B.A. 1978. Endogenous estradiol 17 β in *Phaseolus vulgaris* Z.Pflanzenphysiol.90:45-50
- YOUNG, I.J., KNIGHTS, B.A. e HILLMANN, J.R. 1979. Metabolism of estrogens by *Phaseolus vulgaris* in vitro and in vivo. Z.Pflanzenphysiol. 94:307-16.
- ZAIDEN, L.D.P. e VÁLIO; I.F.M. 1977. Rooting of detached leaves of *Pereskia grandifolia* Hars. (Cactaceae). Z. Pflanzenphysiol. 83:25-33.
- ZIMMERMAN, P.W. e HITCHCOCK, A.E. 1933. Initiation and stimulation of adventitious roots caused by unsaturated hydrocarbon gases. Contr. Boyce Thompson Inst. 5: 351-369.

ZIMMERMAN, P.W. e WILCOXON, F. 1935. Several growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. Contrib. Boyce Thompson Inst. 7: 209-22.