

EFEITO DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

NO ALONGAMENTO DO EIXO PRINCIPAL DE

Dalbergia miscolobium.



Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pelo candidato
Wilson Roberto Cavallari e aprovada
pela Comissão Examinadora.

Campinas, 05/12/91

Inf. Tatiana S. Pereira

WILSON ROBERTO CAVALLARI

CAMPINAS

Estado de São Paulo

1991



WILSON ROBERTO CAVALLARI $\overline{m}$

EFEITO DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL
NO ALONGAMENTO DO EIXO PRINCIPAL DE Dalbergia
miscolobium.

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

Orientadora: Prof. Dra. ANA MARIA MONTEIRO $\overline{m}$

CAMPINAS

1991

BC 9200988

Dedico este trabalho aos meus pais Hugo e Lourdes e
aos meus irmãos Sílvia e Emerson pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Ana Maria Monteiro, pela oportunidade, amizade e orientação durante o curso de Mestrado.

Aos Profs. Drs. Moacir Monteiro e Nelson Villa e ao técnico especializado Sr. Benigno do Departamento de Histologia do Instituto de Biociências da USP pelo oferecimento de um estágio.

Ao Prof. Dr. Angelo Cortelazzo e ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp pelo oferecimento de estágio e por possibilitar a execução das fotografias deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Apoio à Pesquisa pela Bolsa de Estudos concedida.

Aos professores e colegas de trabalho do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp pelo convívio e amizade, durante a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Angelo Cortelazzo, Maria de Fátima A. Pereira e Ana Maria Lagoa, pelo auxílio prestado no período de pré-banca.

INDICE GERAL

	página
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	21
1. Material vegetal	21
2. Condições gerais de crescimento	21
2.1. Tratamento de plântulas com reguladores de crescimento	22
2.1.1. Método da embebição	22
2.1.2. Método da micro gota	23
2.1.3. Tratamento das plântulas com KCl e GA ₃	24
3. Análise do crescimento inicial da plântula	25
3.1. Peso fresco	25
3.2. Peso seco	25
3.3. Alongamento das diferentes regiões da plântula	25
3.3.1. Epicótilo	25
3.3.2. Hipocótilo	26
3.3.3. Raiz	26
3.4. Análise do alongamento celular das diferentes regiões do eixo principal da plântula	27
3.4.1. Preparação das lâminas histológicas	27
3.4.2. Medidas de comprimento, largura e volume celulares	29

4. Análise do alongamento de secções do hipocótilo de plântulas	30
4.1. Preparação das secções	30
4.2. Tratamento com reguladores de crescimento	30
4.3. Análise do alongamento	32
5. Análise estatística	32
 III - RESULTADOS	 33
1. Análise do crescimento inicial de <u>D. miscolobium</u>	33
2. Efeito das aplicações exógenas de reguladores de crescimento no alongamento das regiões da plântula intacta	39
2.1. Auxinas	39
2.2. Giberelinas	48
2.3. Inibidores de biossíntese de giberelinas.	59
2.4. Ions potássio e interação com GA ₃	72
2.5. Ácido Abscísico	76
2.6. Etileno	80
3. Efeito de reguladores de crescimento no alongamento de secções de hipocótilo	80
 IV - DISCUSSÃO	 86
 V - RESUMO	 95
 VI- BIBLIOGRAFIA	 97

I-INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento vegetal é determinado por três eventos a nível celular. O primeiro é a divisão que é seguido pelo alongamento e finalmente a diferenciação celular no qual a célula se torna especializada.

O processo de alongamento celular é, sem dúvida, vital para a vida da planta. Este processo é altamente complexo e controlado, pelo menos em parte, por hormônios como auxinas e giberelinas e por alguns outros fatores internos como a condutividade de água, as diferenças entre potenciais osmóticos da célula e do meio aquoso que a rodeia, a pressão de turgescência do suco vacuolar e a extensibilidade da parede celular (HALL et al., 1981).

O ácido indol-3-acético (AIA) é um hormônio vegetal importante no controle do processo de alongamento celular. O seu efeito mais evidente neste processo é a nível de extensibilidade da parede, através de eventos que levam ao afrouxamento da mesma (HALL et al., 1981). Uma das mais marcantes respostas hormonais em plantas é a indução, pelo AIA, do rápido alongamento celular, verificado geralmente em caules isolados de plantas e secções de coleoptile. A resposta inicia-se em cerca de 10 minutos, resultando num aumento da taxa de crescimento de 5 a 10 vezes, persistindo por horas ou dias (PENNY & PENNY, 1978).

Os diferentes tecidos da planta respondem de maneiras diferentes ao AIA. Considerando a anatomia do caule de uma plântula de dicotiledônea, encontramos uma camada de células mais superficial que é a epiderme, sob a qual existem camadas subepidérmicas semelhantes às células de colênquima. Na parte mais interna, encontra-se a região do córtex composta por células parenquimáticas onde estão embutidos os característicos feixes vasculares. As células das camadas subepidérmicas são as que mais respondem ao AIA. As demais células simplesmente aumentam de volume acompanhando o crescimento das subepidérmicas, sendo que não são afetadas diretamente pela auxina (CLELAND, 1987).

Para medir-se a taxa de aumento do volume celular (dv/dt) de tecidos de plantas, os parâmetros do crescimento celular foram organizados na seguinte equação:

$$dv/dt = \frac{m \cdot L_p}{m + L_p} \cdot (\psi_a - \pi - Y)$$

onde,

m = extensibilidade da parede

L_p = condutividade hidráulica

ψ_a = potencial de água no apoplasto

π = potencial osmótico da célula

Y = limiar da pressão de turgescência que deve ser excedido para que a extensão da parede ocorra.

Na ausência do AIA, a taxa de alongamento celular é baixa por causa de um baixo m , baixo L_p ou alto Y .

3.
(ou uma combinação destes). Quando o AIA inicia o processo de rápido alongamento celular, pode aumentar m , L_p , γ_a ou P (pressão de turgescência = $\gamma_a - \pi$) ou pode diminuir π ou γ (CLELAND, 1987).

Para que o efeito do AIA no alongamento celular seja entendido, é essencial separar os efeitos da resposta inicial (30-90 min) dos efeitos da resposta prolongada de crescimento (após 3-6 horas) e dos processos que envolvem a manutenção do crescimento (CLELAND, 1987). Após a aplicação do AIA nas secções de coleóptiles de Avena, existe um intervalo de, pelo menos 8 minutos antes do início do aumento da taxa de crescimento. A duração deste intervalo pode ser aumentada até 10 minutos pelo abaixamento da temperatura ou através do uso de uma concentração subótima de AIA. No entanto, ele não pode ser diminuído pela elevação da temperatura, por concentração supra-ótima de AIA ou pela remoção da cutícula que envolve o tecido (EVANS, 1985).

CLELAND (1987) descreve os fatores que o AIA requer para o início do efeito no alongamento. São eles: síntese de ATP, ATPase ativa, síntese contínua de proteína e turgescência suficiente para exceder o limiar suportável pela parede. Os fatores não requeridos para a resposta inicial são açúcares exógenos (importantes para um alongamento contínuo) e íons K^+ ou Ca^{++} exógenos (CLELAND, 1977).

Por outro lado, a manutenção do alongamento celular em tecidos de coleóptile requer a presença de algum

soluto que possa ser absorvido. STEVENSON & CLELAND (1981) mostraram que KCl, NaCl, glicose ou sacarose são todos efetivos, quando em concentrações ótimas, mas para as secções de caule da maioria das dicotiledôneas, a adição de qualquer íon ou açúcar não provoca mudanças na taxa de crescimento.

Algumas teorias são sugeridas para explicar a ação do AIA no alongamento celular. Pela teoria do "fator de afrouxamento de parede (WLF)" o AIA entra na célula e interage com um receptor, WLF, que é então deslocado para a parede onde induz o afrouxamento da mesma. Na teoria do crescimento pela acidificação da parede, o WLF é o próton H^+ . Como resultado do abaixamento do pH do apoplasma, há ativação de hidrolases de polissacarídeos da parede que separam posições específicas nas ligações das fibrilas que constituem a parede, permitindo que a pressão de turgescência promova a expansão celular.

São propostos 3 possíveis mecanismos para a liberação de prótons induzida pelo AIA em células vegetais. Um deles é que o AIA ativa uma ATPase na membrana plasmática, a qual elimina H^+ e hiperpolariza o potencial de membrana, afetando a sua permeabilidade. Outro mecanismo sugerido é que o AIA ativa uma ATPase eletroneutra na membrana, a qual troca H^+ por K^+ (HAGER et al., 1971). Outra possibilidade é que o retículo endoplasmático contenha uma ATPase que seria ativa apenas na presença de AIA. Sítios de ligação do AIA têm sido detectados no retículo endoplasmático de

5.
alguns tecidos, como por exemplo, em coleoptile de milho (RAY, 1977). Este autor sugere, no mesmo trabalho, que a combinação do AIA com seus sítios receptores no retículo endoplasmático induziria o transporte de H^+ do citoplasma para as cisternas do retículo, sendo que o conteúdo ácido seria transportado juntamente com as proteínas sintetizadas no espaço do retículo para o exterior da célula (espaço da parede celular), provavelmente passando pelo Complexo de Golgi. Este modelo explicaria o período de latência observado durante a ação do AIA, no alongamento de células do coleoptile (BOWLES & NORTHCOTE, 1974; GARDINER & CHRISPHEELS, 1975 e PAULL & JONES, 1975).

Outro regulador de crescimento também envolvido na promoção do alongamento celular em muitas plantas é o ácido giberélico (GA_3). As giberelinas (GAs) foram descobertas pelo seu drástico efeito no alongamento do caule do arroz na investigação da doença "Bakanae", em Taiwan, no ano de 1926. Kurosawa, um fitopatologista japonês, mostrou que o rápido crescimento de plantas doentes de arroz era causado por uma secreção proveniente da infecção do fungo do gênero Gibberella. O fator ativo, promotor do alongamento celular e presente nessa secreção, foi identificado na década de 50 como ácido giberélico (JONES, 1983).

Acredita-se que a ação da giberelina no alongamento das células de tecidos vegetais, seja semelhante àquela do AIA. Contudo, a resposta ao AIA mostra um período de

latência bem definido, seguido por uma rápida aceleração do crescimento, que posteriormente diminui, mas se mantém numa taxa elevada. Por outro lado, a resposta ao GA_3 é caracterizada por uma gradual aceleração até atingir uma taxa de crescimento constante. O significado desta diferença não está ainda bem claro, mas a relação da indução-ácida do crescimento em resposta ao AIA não é observada em hipocótilo excisado de alfaca em resposta ao GA_3 , não havendo acidificação da parede celular neste caso. Isto poderia explicar a diferença observada nas cinéticas das respostas ao GA_3 e AIA, sugerindo que a resposta de hipocótilos excisados de alfaca ao GA_3 está baseada em algum outro mecanismo que não o da acidificação da parede celular (JONES & MOLL, 1983).

Numa revisão sobre o modo de ação das GAs no alongamento do eixo caulinar, MONTEIRO et al. (1985) sugerem que deve existir uma sequência de eventos desde a interação primária da giberelina com seu sítio receptor, até o processo real de alongamento celular. Embora não se tenham identificado os receptores de GAs, existem evidências que estes receptores possam ser proteínas. Um exemplo que reforça esta idéia foi encontrado em plântulas de ervilha, onde experimentos "in vitro" mostraram ligações de alta afinidade da $(^3H)GA_1$ com proteínas solúveis, apesar de ter sido observado baixo nível destas ligações (STODDART & VENIS in MONTEIRO et al., 1985). Sabe-se que o tratamento com GA_3 aumenta a plasticidade celular de hipocótilos de

alface crescidos sob luz contínua, e a rapidez da resposta inicial ao GA_3 sugere que a regulação não ocorre a nível de síntese de DNA ou RNA, mas talvez a nível de tradução (JONES & MOLL, 1983).

Durante o processo de alongamento celular induzido pela giberelina ocorrem mudanças na composição da parede celular. TANIMOTO (1988) mostrou que células de raízes de ervilha tratadas com ancimidol, um inibidor de síntese de giberelinas, apresentavam-se curtas e espessas, com paredes celulares ricas em galactose. Nas células tratadas com GA_3 ocorria o inverso, ou seja, as células eram longas e delgadas e com paredes celulares pobres em galactose.

Outra evidência importante no modo de ação da giberelina no alongamento celular é verificada por meio de experimentos que mostram que os íons Ca^{++} , importantes na ligação das cadeias de pectina das paredes celulares, inibem o crescimento do hipocótilo, inibição que pode ser em parte revertida pelo GA_3 . Foi verificado também, que o crescimento promovido pelo GA_3 pode ser inibido pelo vermelho de rutênio, um bloqueador específico do movimento de Ca^{++} através das membranas. Baseando-se nestas observações, foi proposto que a resposta ao GA_3 está relacionada com o movimento de íons Ca^{++} da parede celular para o citoplasma, aumentando assim a plasticidade da parede e facilitando o alongamento (JONES & MOLL, 1983). Estudos paralelos mostraram que uma ATPase eliminadora de Ca^{++} , inibida

8.
pela luz de comprimento de onda na faixa do vermelho extremo, estaria envolvida no processo. Embora já se tenha detectado esta ATPase em uma fração microssomal rica em membrana plasmática de Cucurbita pepo, não se conhece ainda a interação desta bomba iônica com as giberelinas (MARME in MONTEIRO et al., 1985).

Vários compostos químicos têm efeitos específicos no retardamento do alongamento do eixo aéreo de plantas superiores e têm sido descritos por muitos autores (WIRVILLE & MITCHELL, 1950; MARTH et al., 1953; TOLBERT, 1960). As respostas destes inibidores de crescimento tendem a ser opostas às desencadeadas pelas giberelinas (CATHEY, 1959 e WITTWER & TOLBERT, 1960). Interações aparentes entre giberelina e alguns destes inibidores do crescimento têm sido observadas durante o alongamento de internós de feijão (DOWNS & CATHEY, 1960), no crescimento de Ulothrix (CONRAD & SALTMAN, 1961) e na divisão celular em Chrysanthemum (SACHS et al., 1960).

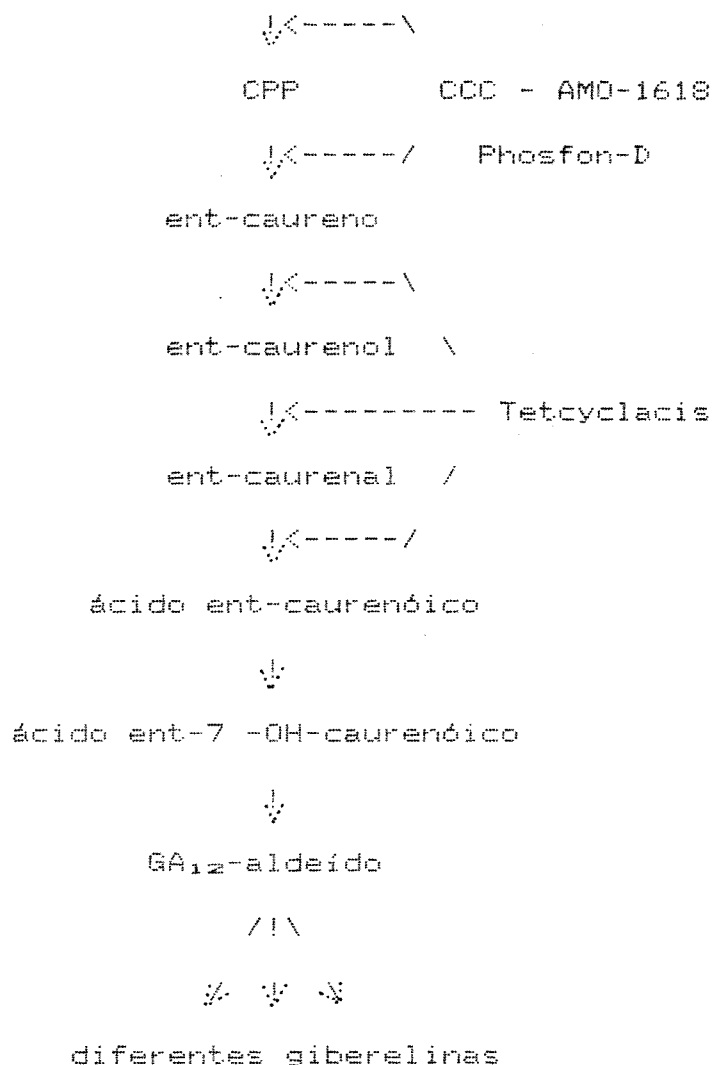
Há evidências indicando que anti-giberelinas como Fosfon-D (tributil - 2, 4 - diclorobenzilamônio clorídrico) e CCC (2 - cloroetil trimetil amônio clorídrico) exercem seus efeitos inibitórios preferivelmente em eixos aéreos do que em raízes (LOCKHART, 1962). Estes inibidores retardam o alongamento do caule, devido à interferência no sistema de reações enzimáticas que culminaria na produção da giberelina ativa responsável pelo crescimento. Devido ao bloqueio da síntese de giberelinas por estes inibidores

(esquema 1) ocorrer relativamente no início da via biossintética (SHECHTER & WEST, 1969), alguns resultados controversos aparecem na literatura. Assim, o tratamento de plântulas de ervilha com baixas concentrações de CCC (1 mg/l) resulta num aumento do nível de giberelina endógena em aproximadamente 150 vezes sem que haja, paralelamente, qualquer estimulação do crescimento. Na concentração de 1000 mg/l de CCC as plantas se tornam drasticamente anãs, porém os níveis de GA não diferem significativamente das plantas controle crescidas em água destilada (REID & CROZIER, 1970).

Plantas tratadas com inibidores sintéticos de crescimento, geralmente apresentam maior resistência às condições desfavoráveis do meio ambiente. O tratamento com Tetcyclacis (5-[4-clorofenil] - 3, 4, 5, 9, 10 - pentaaza-tetraciclo, 5, 4, 1, 02.6, 08.11 - dodeca - 3, 9 - dieno), outro inibidor da biossíntese de giberelina (esquema 1), resulta na redução do crescimento que é acompanhado por uma intensificação da cor verde das folhas, um efeito típico de muitos retardantes do crescimento (RADEMACHER et al., 1983).

O Tetcyclacis inibe a biossíntese de giberelina em sistemas livres de células pelo bloqueio das reações oxidativas dos passos compreendidos entre o ent-caureno e o ácido ent-caurenóico. Resultados preliminares de aplicações do Tetcyclacis em plântulas de arroz e milho indicaram uma diminuição no nível de giberelina após o tratamento. Estes dados sugerem que o retardamento do

MVA---->IPP---->GPP---->FPP---->GGPP



ESQUEMA 1 - Esquema inicial da biossíntese de giberelinas, indicando passos inibidos pelo CCC, AMD-1618, Phosfon-D e Tetcyclacis (RADEMACHER et al., 1983).

(MVA= ácido mevalônico; IPP= isopentenil pirofosfato; GPP= geranil PP; FPP= farnesil PP; GGPP= geranil geranil PP; CPP= copalil PP).

11.
crescimento promovido pelo Tetcyclacis seja devido à redução do nível de giberelina endógena nas plantas tratadas (RADEMACHER et al., 1983). Foi verificado também que o Tetcyclacis na concentração de $5 \times 10^{-5} M$, atua como poderoso supressor do crescimento do caule de plantas de Agrostemma sob condições de dias-longos, e aplicações de GA₁ reverterem completamente esta inibição (ZEEVAART, 1985).

Apesar das giberelinas geralmente promoverem o alongamento do eixo de plantas intactas, existem alguns trabalhos que relatam a promoção, pela aplicação de giberelinas, do alongamento de secções de eixos de dicotiledôneas. Este efeito é normalmente obtido pela aplicação de AIA. Uma das hipóteses que tenta explicar este fato é que a giberelina estimularia o alongamento interagindo com o AIA ou algum outro fator não identificado produzido pelo ápice do caule ou cotilédone (JONES, 1983). KAMISAKA (1973) e SHIBATA et al. (1974) isolaram e identificaram o álcool dihidroconiferol proveniente de cotilédones de plântulas de alface crescidas na luz e propuseram que este composto é essencial para a promoção do alongamento de plântulas promovido pela giberelina.

Outra hipótese, sugere que aplicações de giberelina podem induzir um aumento do nível endógeno de AIA. JINDAL & HEMBERG (1976), mostraram que a aplicação de ácido giberélico no ápice de plantas de feijão anão (cv. Alabaster) estimula o alongamento do epicótilo e

hipocótilo, o que não foi verificado no alongamento do cultivar normal. As plantas anãs tratadas com giberelina aumentaram cerca de duas vezes o nível endógeno de AIA. KURAISHI & MUIR (1962) também já haviam mostrado que plantas de ervilha anã, plantas de ervilha normal e plantas de girassol tratadas com giberelina produziram 3, 2 e 10 vezes mais AIA, respectivamente, do que plantas não tratadas. LAW & HAMILTON (1984) mostraram que a aplicação de GA_3 em plântulas de ervilha anã "Little Marvel", com 14 dias de idade, crescidas em luz, não somente induziu um aumento na taxa de alongamento do caule, como também aumentou cerca de 10 vezes a quantidade de AIA livre em folhas jovens e regiões de crescimento de caule.

Há vários trabalhos, como os citados anteriormente, que mostram que as giberelinas aplicadas exogenamente aumentam a atividade endógena das auxinas, seja esta medida por bioensaios (KURAISHI & MUIR, 1962; LATICAN & MUIR, 1969; VALDOVINDS & SASTRY, 1968) ou por determinação direta dos níveis de AIA (JINDAL & HEMBERG, 1976; LAW & HAMILTON, 1984). Esta interação entre o GA_3 e o AIA foi recentemente estudada com mais detalhes em um trabalho realizado com ervilha anã, mostrando que a biossíntese do AIA é promovida pelo GA_3 , que atuaria na atividade da triptofano-racemase, enzima que converte o L-triptofano (L-trp) em D-triptofano (D-trp), precursor do AIA (LAW, 1987).

O L-triptofano é um aminoácido presente em um grande

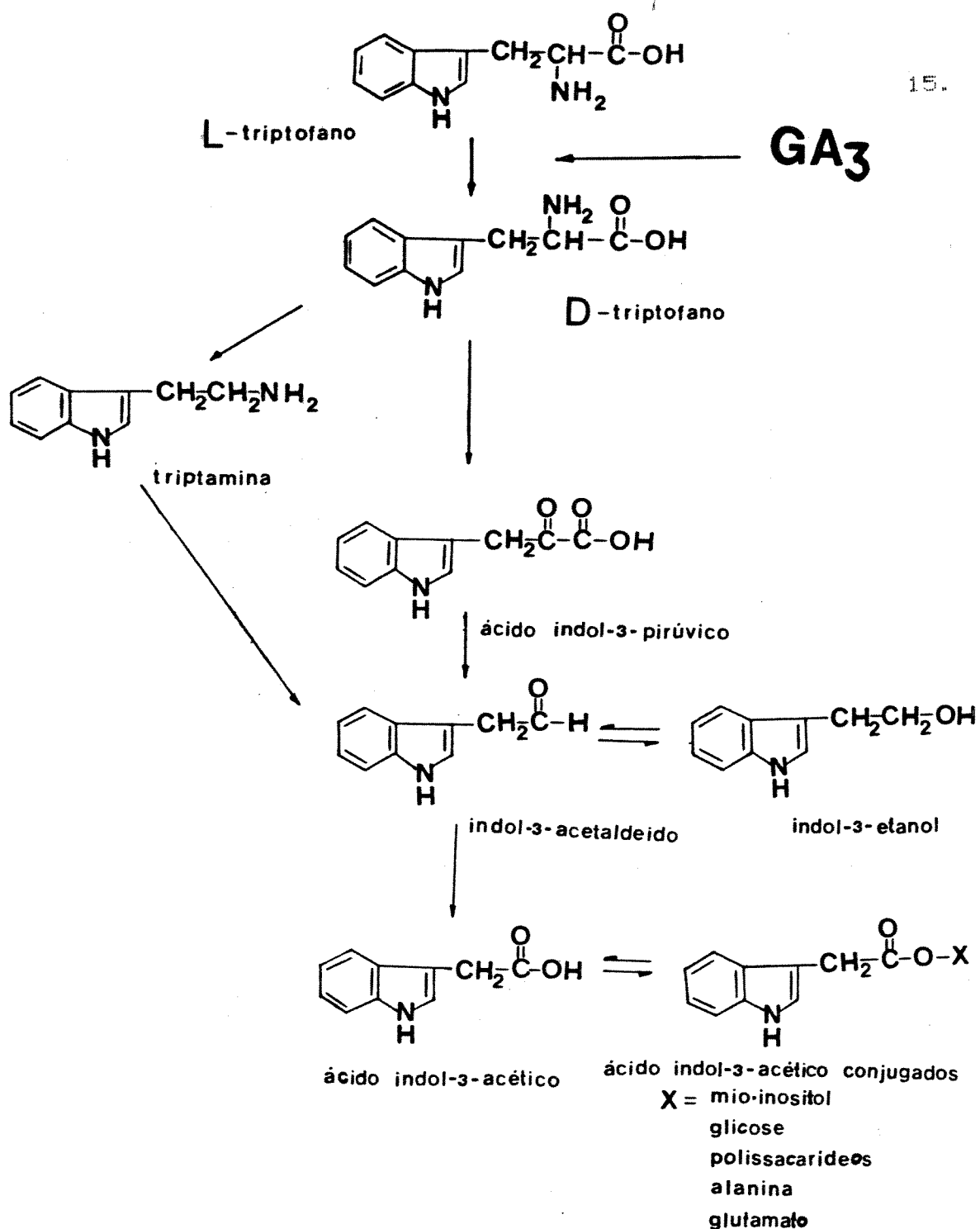
13.
número de plantas em níveis 500 a 1000 vezes maiores que os de AIA, correspondendo a 2-20µg/g de peso fresco (SCHNEIDER & WIGHTMAN, 1974). As plantas sintetizam L-trp e outros aminoácidos aromáticos, como fenilalanina e tirosina, via ácido chiquímico, sendo que esta via está na dependência do metabolismo de carboidratos que funcionam como fonte de substratos iniciais, como o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato.

Vários trabalhos evidenciando o papel do triptofano como um precursor do AIA em plantas, têm sido realizados em plantas intactas e preparações livres de células. Experimentos de biossíntese "in vivo" com triptofano marcado [^{14}C]Trp, resultam na produção de [^{14}C]AIA em plântulas de tomate e cevada (SCHNEIDER et al., 1972), Dalbergia (MONTEIRO et al., 1988a), hipocótilos de pepino (SHERWIN & PURVES, 1969), coleoptiles de milho, folhas de trigo, caules e raízes de feijão e frutos de limeira (SCHNEIDER & WIGHTMAN, 1974). Esta mesma conversão tem sido demonstrada em preparações livres de células provenientes de plântulas de feijão, tabaco e ervilha (SEMBER et al., 1980).

Experimentos de metabolismo, realizados por LAW (1987), em que foram usados L e D-trp em segmentos de caule de Pisum sativum L. (cv. Little Marvel) tratados ou não com GA₃, sugeriram que o L-trp pode ser primariamente convertido ao seu D-isômero menos abundante, que é então convertido a AIA. O alongamento das plântulas tratadas com L-trp só foi promovido na

presença de GA_3 . A atividade da triptofano racemase foi também detectada em extratos dializados provenientes de ápices de P. sativum. Segundo LAW (1987), essa atividade foi aumentada na presença de GA_3 e por isto, este autor propôs que o D-trp pode agir como um intermediário na síntese de AIA a partir de L-trp, e que o GA_3 aumenta a síntese de AIA por intermédio de uma regulação na conversão do L-trp para D-trp, que por sua vez é convertido a AIA, provavelmente, via ácido indol-3-pirúvico (esquema 2).

O volume das células vegetais é influenciado pela absorção osmótica de água e foi demonstrado que auxinas e giberelinas influenciam fatores que controlam este fenômeno. Analisando as respostas de secções de hipocótilos de plântulas de pepino à auxina e giberelina, KAZAMA & KATSUMI (1973), mostraram que a sacarose (2%) inibiu o efeito da auxina no alongamento e aumentou o efeito promotor do GA_3 . Verificaram também que o alongamento por indução auxínica era inibido por manitol (1%) e que a indução do alongamento pelo GA_3 não era afetada pela ação hipertônica do manitol. Ainda em relação à absorção osmótica de água, conhece-se o papel de cátions monovalentes no alongamento celular. O alongamento de segmentos de hipocótilo estiolados de pepino (Cucumis sativus L.) foi estimulado pelo KCl, além de outros sais de potássio como KBr, KI, KNO_3 , K_2HPO_4 e K_2SO_4 , em uma concentração de 0,02N de K^+ . Foi observado também que, o efeito de KCl não foi



ESQUEMA 2 - Possíveis vias biossintéticas do AIA a partir do triptofano e a provável interação do GA₃ (COONEY, 1989).

evidente até 14 horas após o início do tratamento (PURVES, 1966). STUART & JONES (1978) baseando-se em experimentos detalhados usando secções de hipocótilo de alface, tratados ou não com GA₃ e KCl e mantidos na luz ou no escuro, concluíram que o alongamento das células é regulado por mudanças na extensibilidade da parede, que é modificada por tratamentos de luz ou GA. Quando a extensibilidade da parede é aumentada pelo tratamento de escuro ou GA, o alongamento celular pode ser modificado pela absorção de sais, mas a extensibilidade da parede não pode ser modificada apenas pelo tratamento com sais. Mudanças do potencial osmótico causadas pela absorção de sais não influenciam o alongamento de células de secções de hipocótilo mantidas na luz. A promoção do alongamento celular induzida pelo AIA também é resultado do controle do potencial osmótico através do aumento da extensibilidade da parede celular (JONES & MOLL, 1983).

A presença de inibidores endógenos de crescimento resulta na proteção da planta ou suas partes contra condições desfavoráveis do meio ambiente (como baixas temperaturas e deficit hídrico) e um dos mais conhecidos é o ácido abscísico (ABA). Existem estudos sobre mudanças sazonais do conteúdo de ácido abscísico (ABA) em plantas arbóreas, indicando uma correlação entre o nível endógeno de ABA e o grau de dormência de gemas. O papel do ABA na regulação do crescimento ainda é assunto de controvérsia (JOHANSEN et al., 1986). Um dos

principais efeitos do ABA é inibir a germinação das sementes durante a maturação destas na planta mãe. Foram determinados níveis maiores de ABA, nos primeiros dias após a embebição de sementes de Dalbergia, em comparação a estágios mais avançados, nos quais os níveis de ABA chegam a quase zero (MONTEIRO et al., 1986b). Em relação ao alongamento celular, o ABA inibe o crescimento do hipocótilo de plântulas de Amaranthus crescidas em luz (RAY et al., 1980; GURUPRASAD & LALORAYA, 1980a), de rabanete (GURUPRASAD & LALORAYA, 1980b), de alface (DURLEY et al., 1976), e de Trigonella crescidas no escuro (MEGHA & LALORAYA, 1977).

Outro regulador de crescimento que pode apresentar efeitos inibitórios no desenvolvimento de plantas é o etileno. Baixas concentrações (0,1 - 1 ppm) de etileno aplicado em plântulas de ervilha, são altamente efetivas no retardamento do desenvolvimento da gema apical (BURG & BURG, 1968). No mesmo trabalho, estes autores verificaram que a produção de etileno ao longo do eixo estiolado de ervilha era maior no ápice, no gancho plumular e nas regiões dos nós. Os internós que estavam se alongando apresentavam baixa produção de etileno.

Atualmente, estão sendo cada vez mais realizados estudos fisiológicos relacionados com o crescimento inicial de plantas do cerrado, devido à grande área do território nacional ocupada por esse tipo de vegetação (cerca de um quinto segundo EITEN, 1972).

A maioria das espécies de leguminosas do cerrado apresentam um desenvolvimento mais lento da parte aérea com relação à parte radicular, principalmente nas primeiras fases do estabelecimento da plântula. POGGIANI (1971) estudando o crescimento inicial de plantas arbóreas típicas do cerrado (fase de plântula), verificou que as raízes das 3 espécies estudadas (Stryphnodendron adstringens Mart. Coville, Dimorphandra mollis Benth e Sweetia pseudolegans Mohlenbr.) alcançavam ao redor de 30cm de comprimento em 6 semanas, enquanto que a parte aérea, com a mesma idade, apresentava cerca de 7cm de altura. Plantas com dois anos de idade de Ouratea sp apresentavam a parte aérea com 2 a 5cm enquanto que a raiz media de 30 a 40cm (RIZZINI & HERINGER, 1962). Anacardium pumilum, neste mesmo intervalo de tempo, apresentava raízes medindo 80cm enquanto a parte aérea media 15cm. As raízes de Hancornia speciosa, após dois anos, mediam 60cm e a parte aérea media 40cm; Sweetia lentiscifolia, Stryphnodendron barbatimao e Kilmeyera corymbosa, ao final de dois anos, mostravam o comprimento das raízes ao redor de 40cm, enquanto que a parte aérea media 14cm, 20cm e 12cm, respectivamente (RIZZINI & HERINGER, 1962). Um exemplo extremo foi encontrado em Kilmeyera coriacea em que, com 6 meses de idade, a raiz chega a ter 50 vezes o comprimento do caule (DIONELLO, 1978).

POGGIANI (1971) observou que a aplicação de ácido

indol-3-acético (AIA) em plântulas de Stryphnodendron^{19.}
adstringens e Dimorphandra mollis, mesmo em
concentrações baixas, estimulou o alongamento das
raízes. Este autor também verificou que a destruição da
auxina "in vitro", por ação enzimática (AIA-oxidase) dos
extratos vegetais, diminuiu gradualmente nas raízes com
o envelhecimento das plântulas. Foi sugerido que, em
plantas jovens, a degradação de AIA na raiz seria maior
que na parte aérea, e que os níveis de AIA da parte
aérea seriam inibitórios para um crescimento normal. Foi
também sugerido que a raiz poderia ser mais sensível a
auxina que a parte aérea.

Dalbergia miscolobium Benth., anteriormente
chamada de D. dolichopetala ou D. violacea é uma
leguminosa característica dos cerrados brasileiros,
conhecida popularmente como cabiúna-do-cerrado ou
jacarandá-do-cerrado. Aspectos da germinação desta
planta foram estudados por ARASAKI & FELIPPE (1987), que
mostraram que as sementes e frutos embebem muito
rapidamente nos primeiros 30 minutos, passando a embeber
mais lentamente após este período. Verificaram também,
que a germinação da semente é indiferente à luz na
temperatura de 25°C e que a germinação das sementes,
dentro de frutos intactos, é mais baixa que a das
sementes removidas de frutos.

MONTEIRO et al. (1987 e 1988a) observaram que as
sementes de Dalbergia dolichopetala possuíam menos
conjugados de AIA (geralmente, reservas inativas de AIA

livre) que outras espécies de leguminosas. Em outro trabalho, estes autores mostraram que as mudanças nos níveis endógenos de AIA livre durante o crescimento inicial desta espécie, até 6 dias após a embebição das sementes, são semelhantes às que ocorrem durante o crescimento inicial de outras espécies que não são características do cerrado, como Picea abies e Pinus silvestres (MONTEIRO et al., 1988b). Neste mesmo trabalho, os níveis endógenos de giberelina A₁ e ácido abscísico também foram medidos, durante o crescimento inicial de Dalbergia, período onde geralmente é observado intenso alongamento celular.

No presente trabalho estudou-se o controle do alongamento do eixo de D. miscolobium por alguns reguladores do crescimento, numa tentativa de relacionar o lento alongamento do eixo com estes reguladores.

II-MATERIAL E MÉTODOS

1-Material vegetal

As sementes de D. miscolobium utilizadas neste trabalho foram provenientes de árvores existentes no cerrado residual do Município de Itirapina no Estado de São Paulo, localizado na região rural do município na coordenada 22° de latitude sul. Esta área encontra-se dentro da Região Administrativa de Campinas.

As maiores coletas de frutos foram feitas nos anos de 1987 e 1989, quando a produção foi muito superior à de 1988. Os frutos foram acondicionados em vidros herméticos e mantidos em geladeira (4°C) para armazenamento.

2-Condições gerais de crescimento

Para a realização de cada experimento as sementes foram retiradas manualmente dos frutos e lavadas em água corrente durante 3 horas. Após a lavagem, foram esterelizadas em hipoclorito de sódio a 1%, durante 5 minutos e colocadas para germinar em placas de Petri de 15cm de diâmetro, forradas com papel de filtro umedecido com 9 ml de água destilada ou da substância a ser testada. Foram colocadas 14 sementes em cada placa de Petri. Usou-se sempre um número de sementes 3 vezes superior à quantidade de plântulas necessárias para a

realização do experimento, para minimizar o problema da variabilidade das sementes e do ataque por fungos.

As placas de Petri foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes para evitar a evaporação excessiva e mantidas em câmara de crescimento FANEM (modelo 347-F) sob luz contínua ($320 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) e em temperatura constante de 25°C até o momento da análise do crescimento das plântulas. No 29 dia de crescimento, o tegumento externo das sementes foi removido.

2.1-Tratamento de plântulas com reguladores de crescimento

2.1.1-Método da embebição

Logo após a lavagem e esterelização, as sementes foram colocadas para germinar (dia zero) em placas de Petri contendo a solução a ser testada ou água destilada (controle). As sementes permaneceram nestas condições até o dia da análise do crescimento.

Inicialmente foram feitos experimentos usando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento, próximas àquelas obtidas na literatura para outros materiais vegetais.

A auxina usada foi o ácido indol-3-acético (AIA) a $3 \times 10^{-7}\text{M}$, $3 \times 10^{-6}\text{M}$, $3 \times 10^{-5}\text{M}$, $3 \times 10^{-4}\text{M}$ e $3 \times 10^{-3}\text{M}$. Devido à facilidade de ser destruído pela luz, o AIA foi aplicado duas vezes durante o experimento

(dias 0 e 6).

As concentrações de ácido giberélico (GA_3) e ácido abscísico (ABA) testadas foram $3 \times 10^{-5}M$, $3 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-3}M$.

Os seguintes inibidores da biossíntese de giberelinas foram testados: ácido 2-cloroetil-trimetilamônio clorídrico (CCC) e ácido 2-isopropil-4'-trimetilamônio clorídrico-5'-metilfenil piperidina-1-carboxilato (AMD-1618) nas concentrações de $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ e $10^{-3}M$ e o Tetcyclacis (5-[4-clorofenil] - 3, 4, 5, 9, 10 - pentaaza-tetraciclo, 5, 4, 1, 0^{2.6}, 0^{2.11} - dodeca - 3, 9 - dieno) nas concentrações de $10^{-5}M$, $10^{-4}M$ e $10^{-3}M$.

As concentrações de ethrel utilizadas foram de 100mg/l, 500mg/l e 800mg/l.

Nos experimentos onde se usou Tetcyclacis, GA_3 ou AIA, a concentração mais efetiva destas substâncias na promoção ou inibição do alongamento do eixo principal da plântula, foi utilizada para análises mais detalhadas do alongamento do eixo.

2.1.2-Método da micro gota

Neste método, após a remoção do tegumento da semente no 2º dia, foi também removido um dos cotilédones. As sementes foram então colocadas novamente nas placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada, com o embrião voltado para cima. Foram aplicados 10 μl

da solução a ser testada com auxílio de uma microsiringa, sobre a face interna do cotilédone remanescente, próximo ao embrião. O tratamento controle consistiu na aplicação de 10µl de água destilada.

Para este método foram usados AIA, GA₃ e ABA nas concentrações de $3 \times 10^{-5}M$, $3 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-3}M$.

As concentrações mais efetivas foram utilizadas nos experimentos posteriores.

2.1.3-Tratamento das plântulas com KCl e GA₃

Foi utilizada uma combinação dos dois métodos descritos acima, quando o sal KCl foi fornecido às sementes, como fonte de ions monovalentes, para verificar a interação dos mesmos com o efeito causado pelo GA₃. As sementes foram colocadas para embeber no dia zero em soluções de KCl a $10^{-4}M$, $10^{-3}M$ e $10^{-2}M$. No 29 dia de crescimento foram aplicados 10µl de GA₃ a $3 \times 10^{-3}M$.

Neste experimento foi também testado o efeito do escuro no alongamento do eixo das plântulas. Assim, após o tratamento com KCl e GA₃, uma parte das placas de Petri contendo plântulas tratadas ou não, foram colocadas em sacos plásticos pretos e foram mantidas nas mesmas condições daquelas que receberam luz contínua, até o final do experimento.

3-Análise do crescimento inicial da plântula

O crescimento da plântula de D. miscolobium foi analisado nos 12 primeiros dias após a embebição das sementes. A análise foi feita comparando-se o crescimento inicial das diferentes regiões da plântula (epicótilo, cotilédones, hipocótilo e raiz) por meio de medidas de peso fresco, peso seco e alongamento. Foram usadas 10 plântulas para cada medida realizada.

3.1-Peso fresco

Após a coleta, foram feitas pesagens individuais de cotilédones e do eixo principal de cada plântula, utilizando-se balança analítica SARTORIUS, com sensibilidade de 0,1mg.

3.2-Peso seco

O peso seco do eixo principal da plântula e dos cotilédones foi obtido utilizando-se balança analítica SARTORIUS, com sensibilidade de 0,1mg, após secagem do material por 48 horas, em estufa a 80°C.

3.3-Alongamento das diferentes regiões da plântula

3.3.1-Epicótilo

Para a determinação do comprimento do epicótilo, foi

utilizado um microscópio estereoscópico com uma ocular graduada ou uma régua transparente graduada em milímetros quando o comprimento ultrapassava 7,2mm. As medidas foram feitas do ápice do eixo principal até o ponto de inserção dos cotilédones.

3.3.2-Hipocótilo

Foi utilizado um microscópio estereoscópico com ocular graduada nos primeiros dias de crescimento, quando não se distinguia o hipocótilo da região radicular, para medir o comprimento do eixo hipocótilo-radicular.

As medidas de comprimento do hipocótilo foram obtidas por meio de uma régua transparente graduada em milímetros, tomadas da região de inserção dos cotilédones, até o início da raiz (colo) que é uma região que se torna escura em contato com o ar.

3.3.3-Raiz

As medidas de comprimento da raiz foram feitas com régua transparente graduada em milímetros, do colo da raiz até a sua região apical.

3.4-Análise do alongamento celular das diferentes regiões do eixo principal da plântula

3.4.1-Preparação de lâminas histológicas

Regiões do epicótilo e do hipocótilo de plântulas tratadas ou não com substâncias reguladoras de crescimento, foram cortadas em secções de, no máximo, 8mm de comprimento. Secções do epicótilo foram feitas a aproximadamente 2mm do ápice.

Foram utilizados os seguintes fixadores durante 24 e 48 horas sob vácuo contínuo: "ALFAC" (80ml de álcool 80%; 15ml de formol e 0,5ml de ácido acético glacial); "BOUIN" (75ml de ácido pícrico - solução saturada; 25ml de formol e 5ml de ácido acético glacial); "CARNOY" (60ml de álcool absoluto, 30ml de clorofórmio e 10ml de ácido acético glacial); Paraformaldeído 4% em tampão fosfato a pH 7,4; FAA 50 (95ml de etanol 50%, 5ml de formol e 5ml de ácido acético).

Para o processo de desidratação do material, foram feitos vários testes a fim de se determinar o método mais adequado para o material utilizado.

A série etílica foi testada, nos seguintes tempos: 1, 6 e 12 horas em cada uma das etapas da bateria ascendente de álcoois (de 70 a 100%). Para a diafanização dos tecidos, os mesmos foram deixados de 30 minutos a 2 horas no xilol puro. Posteriormente, o xilol com o material foi saturado com parafina ralada e no dia

seguinte foram dados 3 banhos de parafina pura, de uma hora cada, em estufa a 60°C.

Um outro método de desidratação utilizado foi a série butílica. Os tempos testados foram de 6, 12 e 24 horas para cada álcool da bateria ascendente (de 70 a 100%). A transição do processo de desidratação para a inclusão em parafina foi obtida através da colocação de 1 volume de álcool butílico terciário (ABT) puro com o material em 3 volumes de parafina sólida, sendo que o frasco foi vedado com rolha de cortiça e levado a 60°C em estufa. Após a fusão da parafina, a rolha de cortiça foi removida e o material permaneceu na estufa sob vácuo, até que o álcool butílico evaporasse por completo. Foram utilizados três banhos de parafina pura, de 24 horas cada. Após o último banho, o material foi emblocado na posição do plano definido para a microtomia (transversal ou longitudinal). Para os cortes, foram usados micrótomos manuais, e os materiais foram cortados com 10 micrometros de espessura.

Para a caracterização geral do material, dois métodos de coloração foram usados. Os cortes permaneceram em solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0, durante 15 minutos, sendo a seguir lavados rapidamente em água, secados ao ar, diafanizados em xilol durante 10 minutos e montados em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1977).

O outro método de coloração usado foi o da safranina a 4% e verde rápido. O primeiro corante foi usado

durante 3 horas, seguido de uma desidratação rápida dos cortes, em álcool 100% (2 banhos de 1 minuto cada). Estes foram corados então com o verde rápido por 2 minutos, diafanizados em xilol durante 10 minutos e montados em bálsamo do Canadá (JOHANSEN, 1940).

3.4.2-Medidas de comprimento, largura e volume celulares

Para se estimar os valores de comprimento, largura e volume celulares, os cortes longitudinais e transversais, obtidos através dos métodos histológicos descritos no item anterior, foram analisados com auxílio de um microscópio Zeiss com uma ocular citométrica integradora acoplada.

Utilizaram-se para estas medidas, cortes da região mediana do epicótilo e do hipocótilo provenientes de 3 indivíduos de cada tratamento. Destes cortes 50 células foram medidas ao acaso. Foram medidas apenas as células do parênquima cortical.

Cortes que apresentavam os efeitos dos reguladores de crescimento mais expressivos foram fotografados.

O comprimento celular foi obtido através da medida do eixo maior longitudinal (D_1). A largura celular, foi obtida por meio da medida do eixo menor (D_2).

Para o cálculo do volume celular (V), utilizou-se a seguinte fórmula matemática, apropriada para células cilíndricas ou elipsóides (WEIBEL, 1963).

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D_1 \cdot D_2 \cdot \sqrt{D_1 \cdot D_2} \quad (\mu m^3)$$

4-Análise do alongamento de secções do hipocótilo de plântulas

4.1-Preparação das secções

Segmentos de hipocótilo de D. miscolobium com 10mm de comprimento, foram excisados de plântulas com 12 dias, crescidas na presença do inibidor de biossíntese de giberelina, o Tetcyclacis a $10^{-5}M$ (figura 1).

Após a excisão, as secções foram colocadas em placas de Petri de 10cm de diâmetro contendo 15ml da solução da substância a ser testada.

4.2-Tratamento com reguladores de crescimento

GA₃ foi fornecido aos segmentos, nas concentrações de $3 \times 10^{-3}M$ e $3 \times 10^{-4}M$. O AIA foi testado nas concentrações de $5 \times 10^{-5}M$ e $5 \times 10^{-4}M$. Os precursores da biossíntese de AIA testados nestes experimentos, foram os isômeros L e D-triptofano ambos na concentração de $5 \times 10^{-4}M$. O tratamento controle consistiu na imersão dos segmentos em 15ml de água destilada.

As placas de Petri foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e mantidas em câmaras de crescimento a 25°C, por um período de 3 dias durante os quais foram feitas medidas de alongamento.

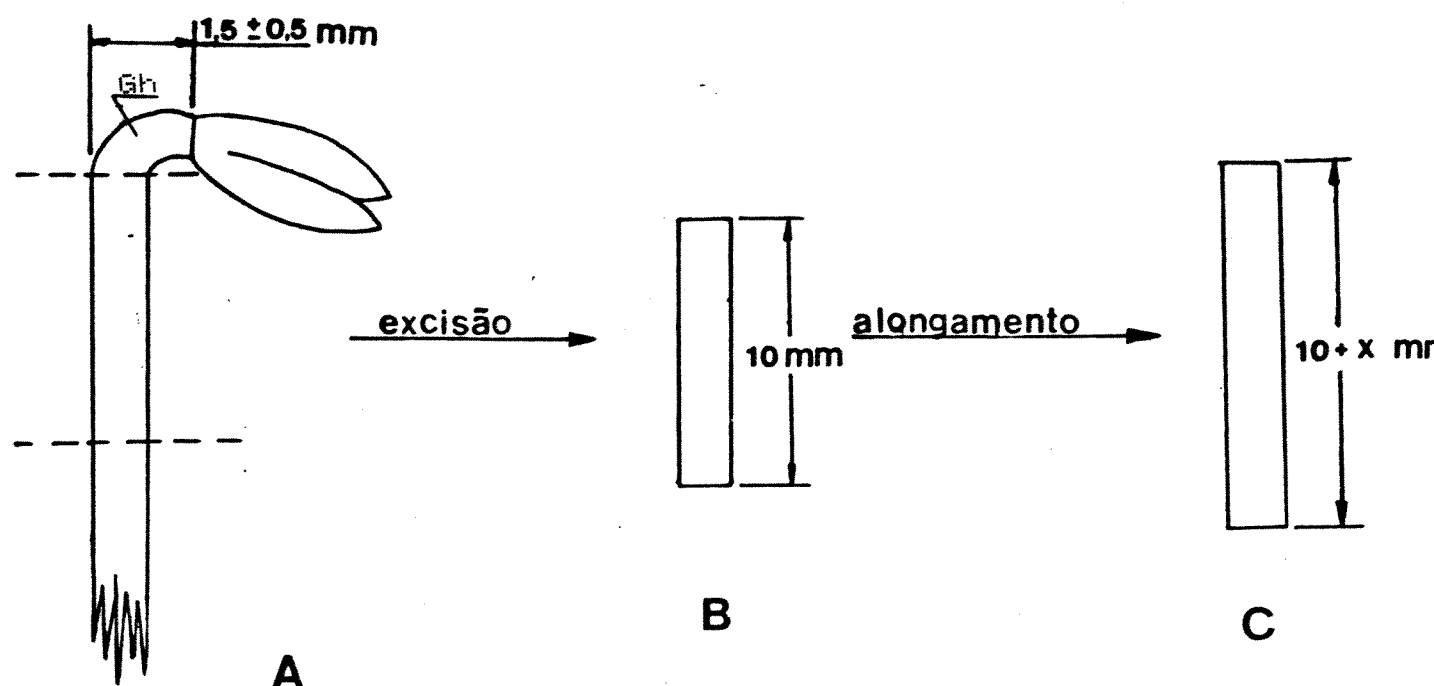


FIGURA 1 - Coleta e medição de segmentos de hipocótilo de *D. miscolobium* com 12 dias de idade. 1A, porção da plântula mostrando o gancho hipocotilar (Gh) e os cotilédones, assim como o local da excisão (linhas tracejadas). 1B, segmento recentemente coletado. 1C, segmento após o período de crescimento, tendo alongado x mm.

4.3-Análise do alongamento

As medidas de alongamento foram feitas no 19 e 39 dias subsequentes aos tratamentos, por meio de uma régua milimetrada. Para cada dia de análise e tratamento foram usadas 10 repetições.

5-Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos usou-se o teste t "student" para os experimentos com 2 tratamentos. Para aqueles com 3 ou mais tratamentos usou-se a análise de variância simples. Foi calculada a diferença mínima significativa (DMS) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey nos tratamentos onde houve promoção ou inibição de crescimento significativa.

Foram usadas letras diferentes para indicar as diferenças significativas entre os tratamentos, e barras verticais para indicar o limite de confiança para cada média aritmética de 10 repetições.

Os testes estatísticos usados foram feitos segundo SNEDECOR (1962).

III - RESULTADOS

1 - Análise do crescimento inicial de D. miscolobium

Para o estudo dos efeitos dos reguladores de crescimento no alongamento do eixo do jacarandá do cerrado, foi necessário caracterizar o padrão de crescimento das diferentes regiões da plântula durante o desenvolvimento inicial, período em que ocorre o estabelecimento da plântula. Para isto, foram medidos o peso fresco e seco do eixo principal e cotilédones e o comprimento das diferentes regiões do eixo principal.

O peso fresco e seco dos cotilédones (figura 2) praticamente não variaram nos 12 primeiros dias do crescimento após a embebição das sementes. Apenas no 12º dia notou-se aumento significativo no peso fresco e diminuição significativa no peso seco dos cotilédones quando comparados com os respectivos pesos no dia zero.

A figura 3 mostra que houve um aumento do peso fresco do eixo principal do 2º ao 12º dia após a embebição, enquanto que o peso seco só começou a aumentar significativamente após o 6º dia de crescimento.

Observa-se na figura 4 que o alongamento da região do epicótilo foi lento, permanecendo praticamente constante do dia 0 até aproximadamente o 8º dia. A partir desse dia, iniciou-se uma pequena aceleração do alongamento. O eixo hipocótilo-radicular, cujas regiões eram indiferenciáveis antes do 6º dia, alongou a partir do 2º

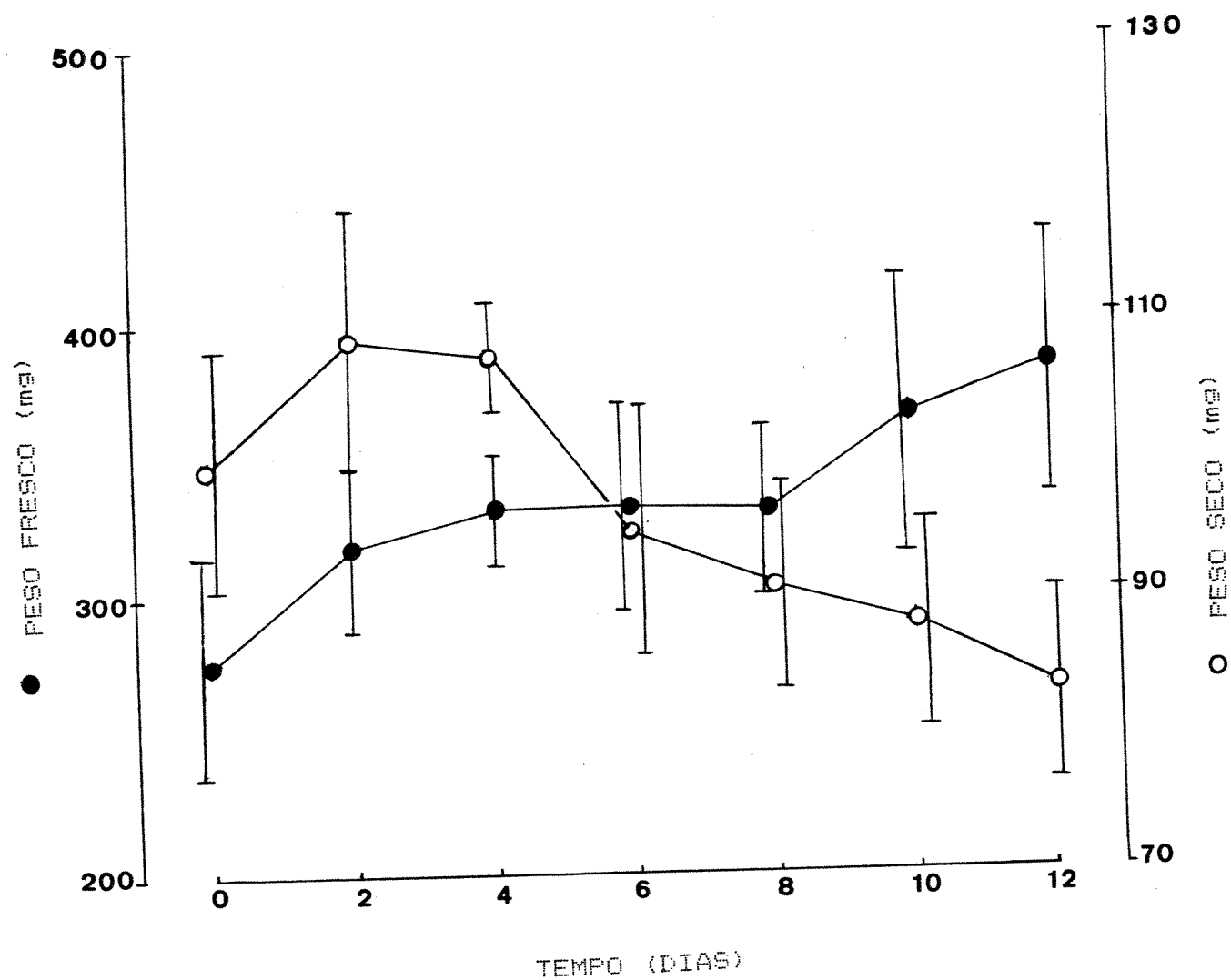


FIGURA 2 - Peso fresco (círculos cheios) e peso seco (círculos vazios) dos cotilédones de Dalbergia miscolobium, medidos durante 12 dias após a embebição.

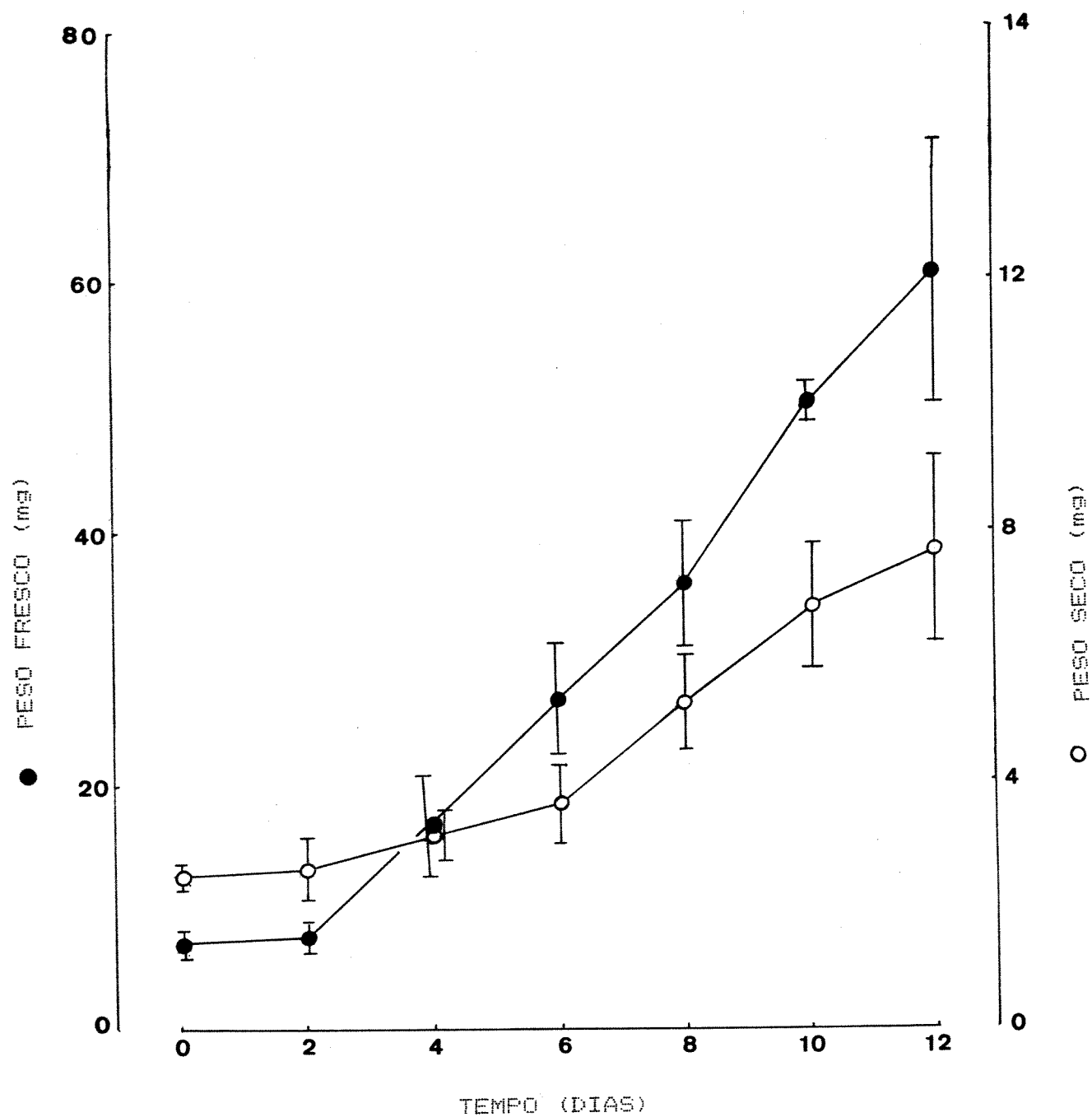


FIGURA 3 - Peso fresco (círculos cheios) e peso seco (círculos vazios) do eixo principal de Dalbergia miscolobium, medidos durante 12 dias após a embebição.

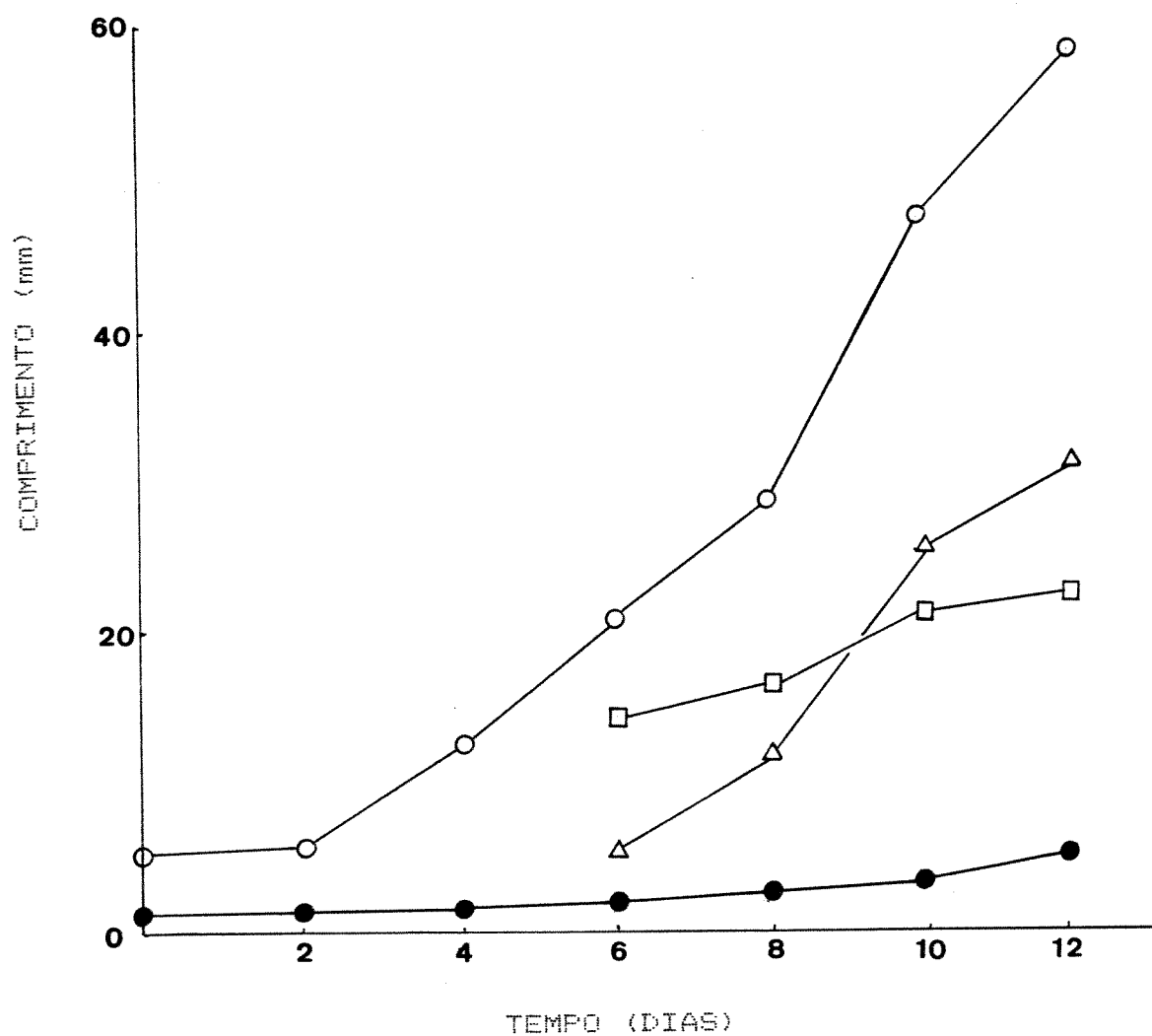


FIGURA 4 - Comprimento das diferentes regiões da plântula de *P. miscolobium*, medidas durante os 12 dias após a embebição.

- - epicótilo
- - eixo hipocótilo-raiz
- - hipocótilo
- △ - raiz

dia de crescimento (figura 4).

As curvas do alongamento das porções do hipocótilo e da raiz foram determinadas somente a partir do 69 dia de crescimento (figura 4). Quando se distinguiu o hipocótilo da raiz, ao redor do 69 dia de crescimento, o comprimento da raiz era muito menor que o do hipocótilo. No entanto, ao redor do 99 dia de crescimento, o comprimento da raiz tornou-se maior que o do hipocótilo, indicando que a mesma estava num processo de crescimento rápido e que o hipocótilo, pelo contrário, começou a apresentar uma estabilização no processo de alongamento.

A partir das medidas de comprimento das diferentes regiões, foram calculadas as razões do alongamento entre raiz/parte aérea, raiz/plântula e parte aérea/plântula que são mostradas na tabela 1. Devido a necessidade de se diferenciar a parte aérea da raiz, estes cálculos só foram feitos após o dia 6. No 69 dia de crescimento, a razão raiz/parte aérea (tabela 1-A), equivaleu a 0,4, indicando que a raiz era menor que a parte aérea. Porém, no 109 e 129 dias, esta razão sobiu para 1,1 e 1,2 respectivamente, mostrando que a raiz tornou-se maior que a parte aérea, ou seja, a raiz tornou-se maior que a metade do comprimento da plântula. Este resultado fica mais evidenciado pela razão raiz/plântula, (tabela 1-B) que equivaleu a 0,5 para o 109 dia e 0,6 para o 129 dia de crescimento, e pela razão parte aérea/plântula (tabela 1-C) que diminuiu progressivamente, variando de 0,7 no 69 dia a 0,4 no 129 dia de crescimento.

TABELA 1 - Razões entre os comprimentos da raiz, parte aérea e plântula durante o crescimento em D. miscolobium (método da embebição) - (mm/mm).

A= raiz/parte aérea

B= raiz/plântula

C= parte aérea/plântula

RAZÕES DIAS	A	B	C
06	0,4	0,3	0,7
08	0,7	0,4	0,6
10	1,1	0,5	0,5
12	1,2	0,6	0,4

2 - Efeito das aplicações exógenas de reguladores de crescimento no alongamento das regiões da plântula intacta.

2.1 - Auxinas

O efeito de várias concentrações de AIA no crescimento inicial de Dalbergia foi testado através do método de aplicação por embebição das sementes nas diferentes soluções. Concentrações mais baixas (de $3 \times 10^{-7}M$ a $3 \times 10^{-8}M$) não afetaram significativamente o peso seco do eixo principal da plântula (figura 5) nem o comprimento do epicótilo e do hipocótilo nos 10º e 12º dias, havendo uma pequena inibição do comprimento da raiz, apenas no 12º dia, na concentração de $3 \times 10^{-8}M$ (figura 6-A, B e C).

O mesmo método de aplicação hormonal por embebição das sementes, foi posteriormente utilizado para a verificação do efeito do AIA em concentrações mais altas, no alongamento de plântulas de D. miscolobium. A figura 7-A, B e C mostra a influência no alongamento das diferentes regiões da plântula de aplicações de concentrações mais altas de auxina ($3 \times 10^{-6}M$ a $3 \times 10^{-3}M$) pelo mesmo método de aplicação por embebição das sementes. A auxina na concentração de $3 \times 10^{-3}M$ mostrou ser inibidora do processo de alongamento no 10º dia nas regiões do hipocótilo e da raiz, e no 12º dia do experimento, nas três diferentes

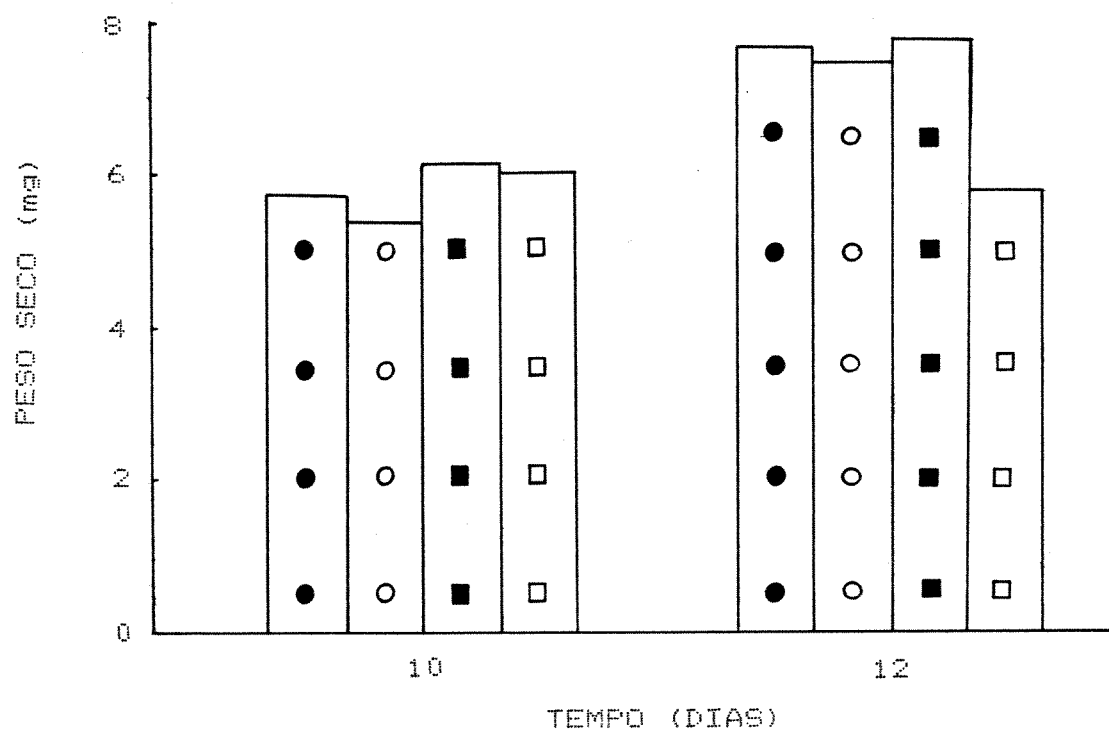


FIGURA 5 - Efeito do AIA em baixas concentrações, no peso seco da plântula, sem os cotilédones (eixo), de *D. miscolobium* (dias 10 e 12) - Método da embebição.

- - controle
- - AIA $3 \times 10^{-7}M$
- - AIA $3 \times 10^{-6}M$
- - AIA $3 \times 10^{-5}M$

FIGURA 6 - Efeito do AIA em baixas concentrações, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium (dias 10 e 12 após a embebição) - Método da embebição.

- - controle
- - AIA $3 \times 10^{-7}M$
- - AIA $3 \times 10^{-6}M$
- - AIA $3 \times 10^{-5}M$

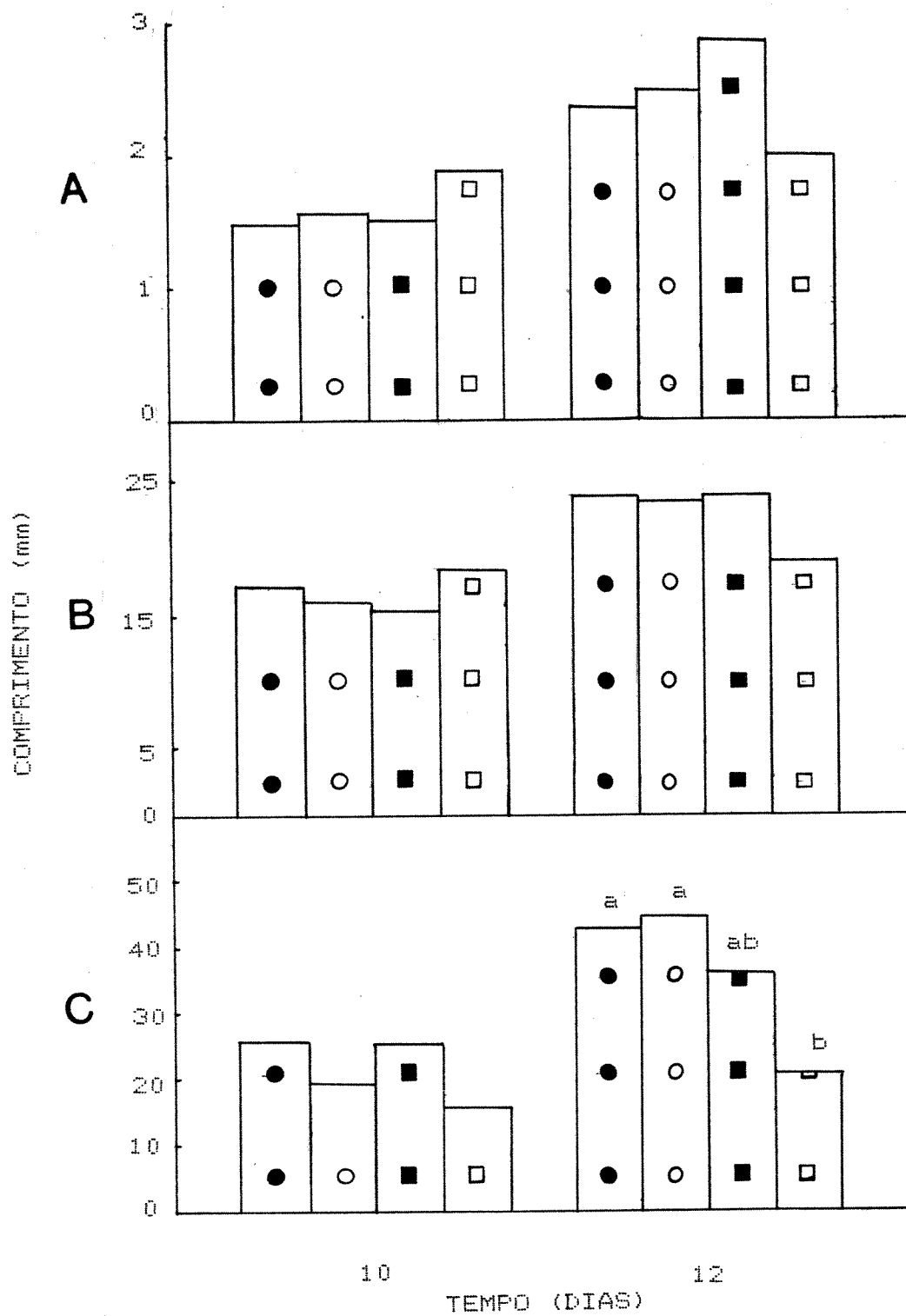


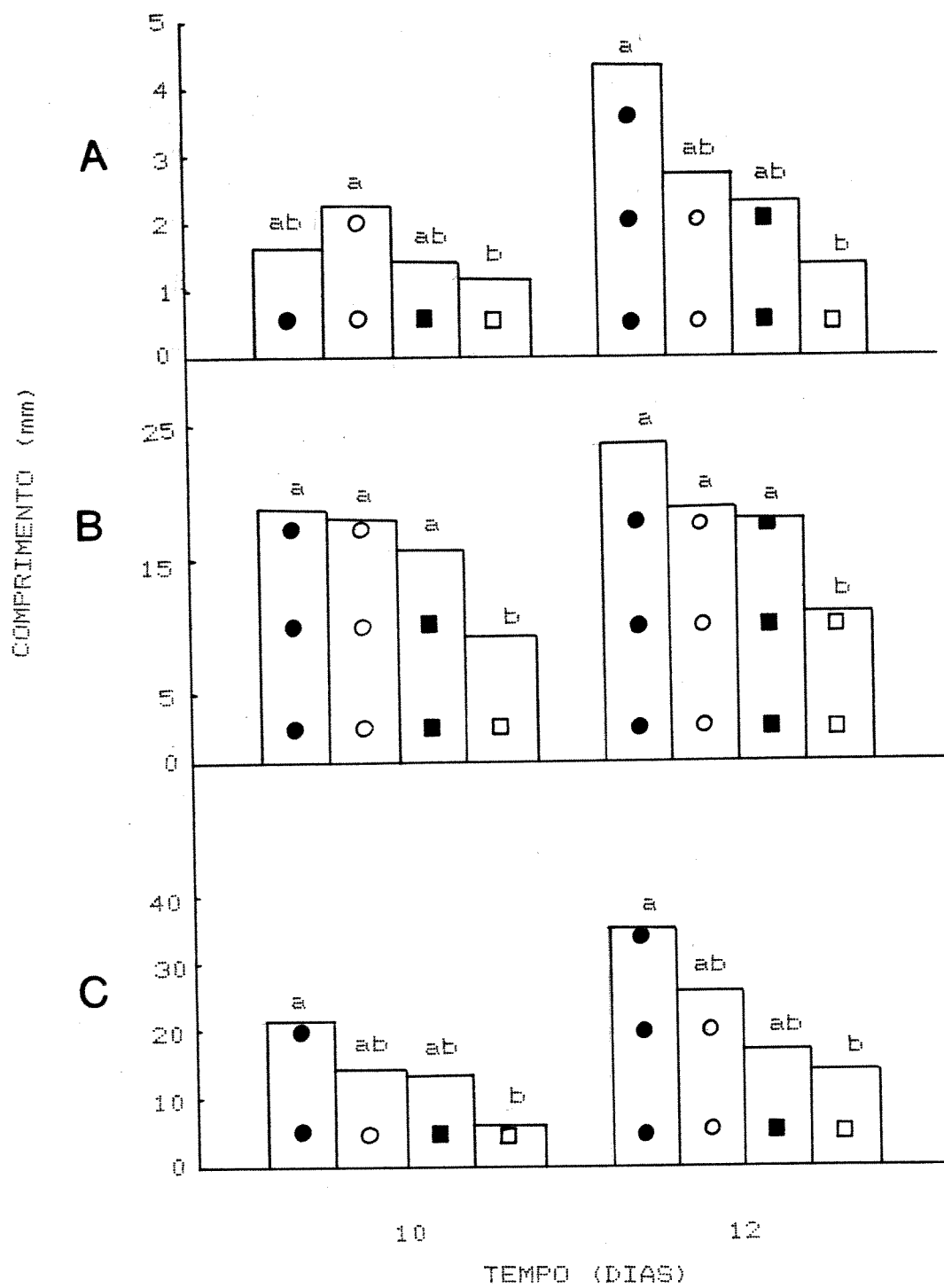
FIGURA 7 - Efeito do AIA em altas concentrações, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium (dias 10 e 12) - Método da embebição.

● - controle

○ - AIA $3 \times 10^{-5}M$

■ - AIA $3 \times 10^{-4}M$

□ - AIA $3 \times 10^{-3}M$



regiões do eixo principal da plântula (epicótilo, hipocótilo e raiz). As concentrações de $3 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-3}M$, não inibiram significativamente o alongamento do epicótilo, hipocótilo e raiz nos dois dias analisados (figura 7).

Notou-se inibição do peso seco somente no 12º dia, no tratamento com AIA a $3 \times 10^{-3}M$ (figura 8).

A figura 9-A,B e C mostra os resultados de outro experimento, onde foram usadas as mesmas concentrações de auxina, utilizando-se o método da aplicação da microgota. No 10º dia, houve inibição significativa do comprimento do epicótilo em todas as concentrações. O alongamento do hipocótilo e raiz não foi afetado.

O peso seco do eixo principal não foi afetado pelas concentrações mais altas de AIA aplicadas pelo método da microgota em relação ao controle (figura 10).

Para se analisar com mais detalhe o papel inibitório do AIA no alongamento do eixo, plântulas foram tratadas com AIA na concentração de $3 \times 10^{-3}M$ através do método da embebição. Medidas do comprimento do eixo foram feitas no início da embebição e de dois em dois dias. Verificou-se que o comprimento da região hipocótilo-radicular começou a ser inibido a partir do 6º dia de crescimento, culminando com inibições superiores a 50% em relação ao tratamento controle nos dias 08, 10 e 12 (figura 11). Além disto, neste lote de sementes, coletado no ano de 1987, a distinção entre a região do hipocótilo e a da raiz ocorreu próximo ao 8º

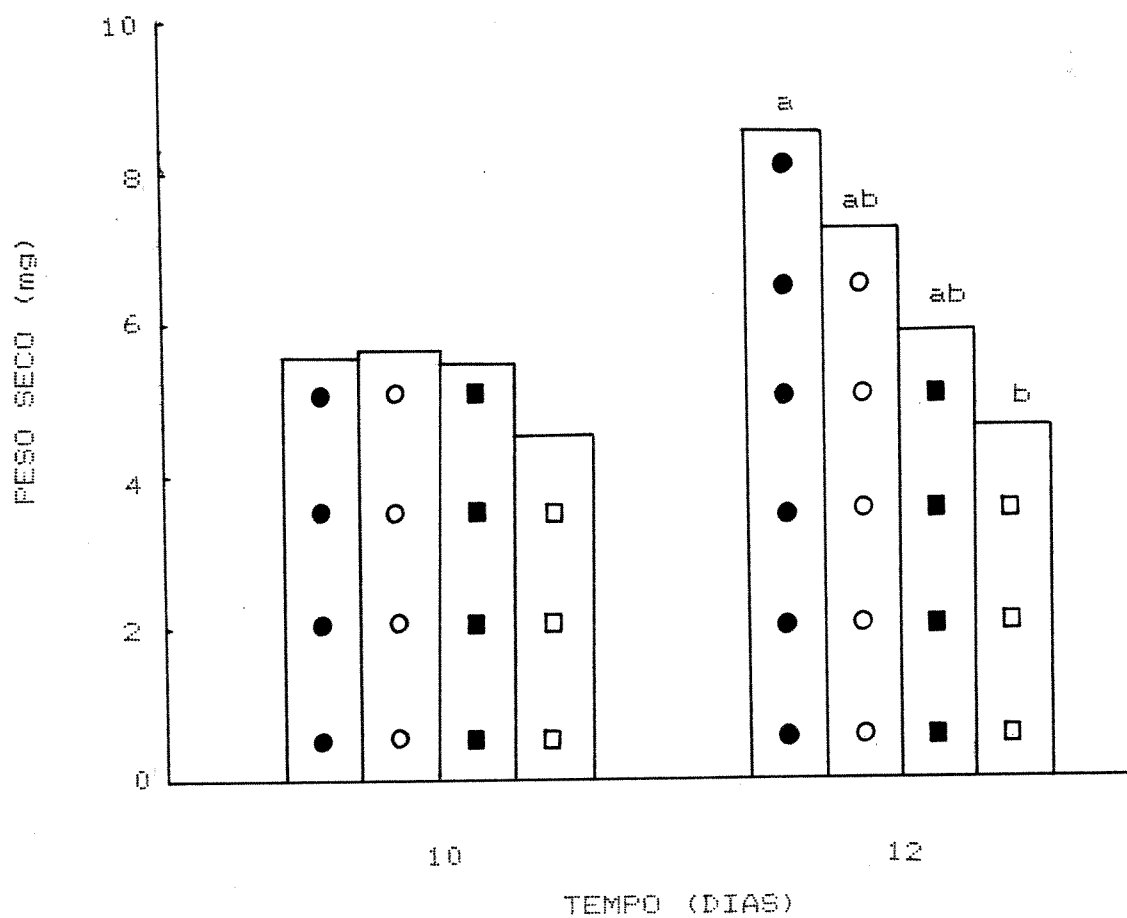
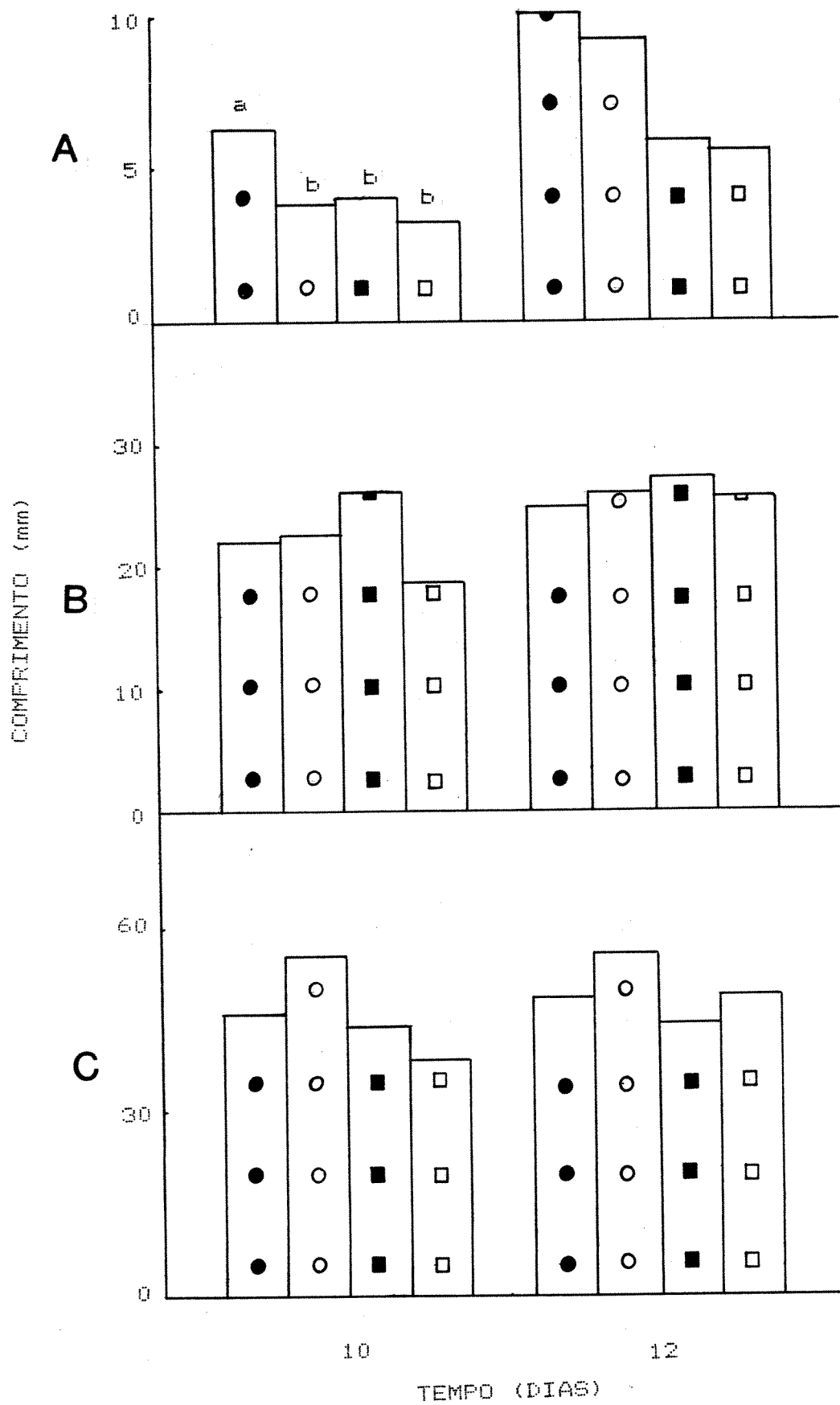


FIGURA 8 - Efeito do AIA em altas concentrações, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium (dias 10 e 12) - Método da embebição.

- - controle
- - AIA $3 \times 10^{-5}M$
- - AIA $3 \times 10^{-4}M$
- - AIA $3 \times 10^{-3}M$

FIGURA 9 - Efeito do AIA em altas concentrações, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da microgota.

- - controle
- - AIA $3 \times 10^{-5} M$
- - AIA $3 \times 10^{-4} M$
- - AIA $3 \times 10^{-3} M$



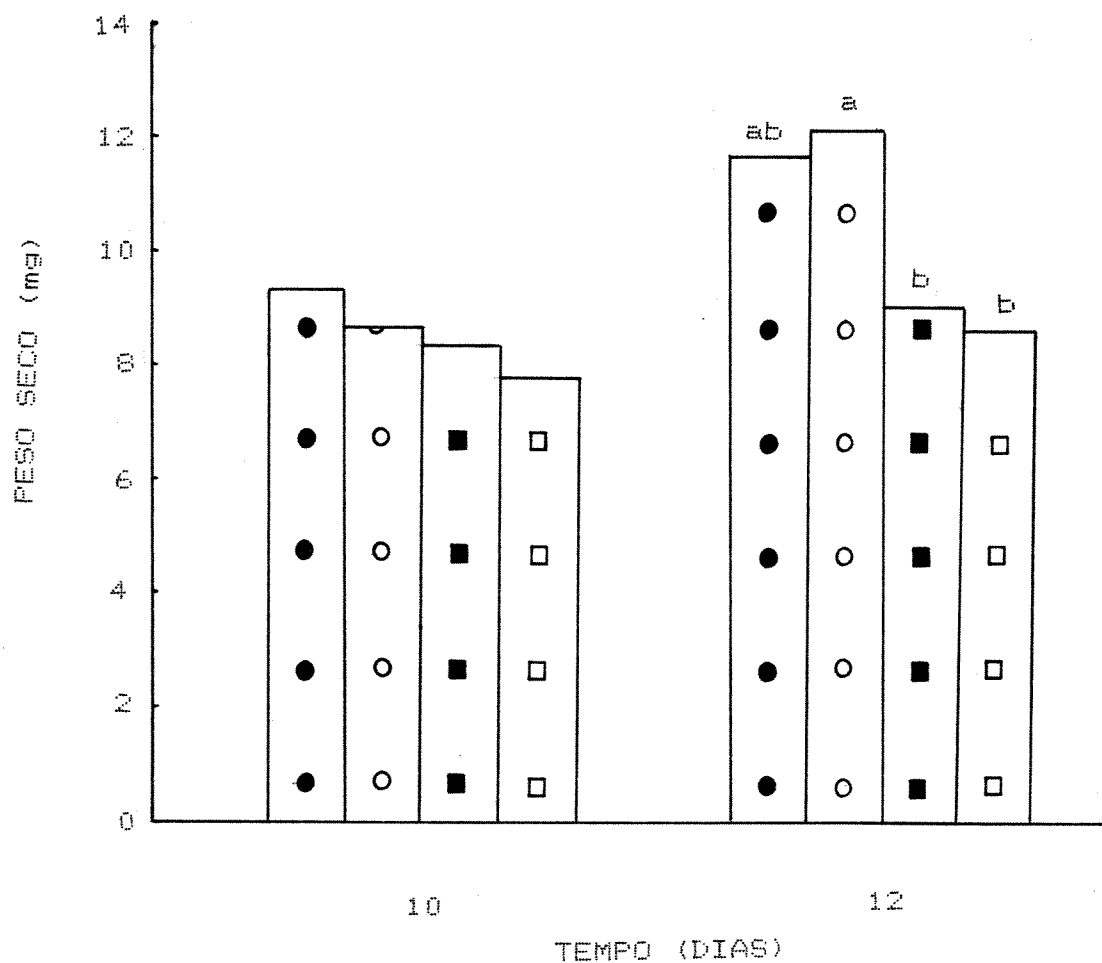


FIGURA 10 - Efeito do AIA em altas concentrações, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da microgota.

- - controle
- - AIA $3 \times 10^{-5}M$
- - AIA $3 \times 10^{-4}M$
- - AIA $3 \times 10^{-3}M$

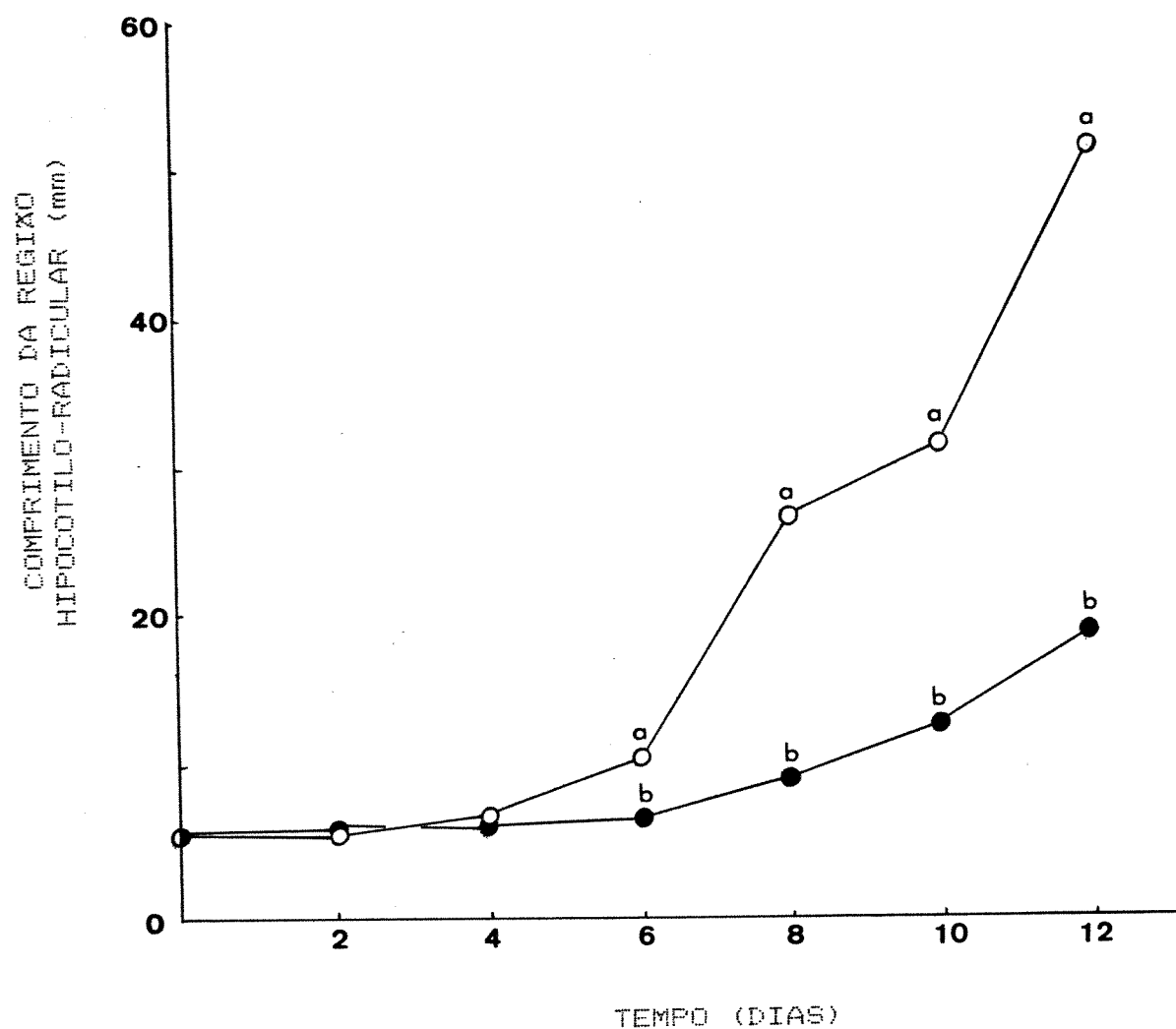


FIGURA 11 - Efeito do AIA a $3 \times 10^{-3}M$ no alongamento do região hipocótilo - radicular de *D. miscolobium*. O AIA foi aplicado nos dias 0 e 6, pelo método da embebição.

Símbolos vazios = água destilada

Símbolos cheios = AIA $3 \times 10^{-3}M$

dia de crescimento, enquanto que nas sementes tratadas com o AIA a $3 \times 10^{-3} M$, a diferenciação das duas regiões ocorreu somente dois dias mais tarde, no 100 dia de crescimento.

2.2 - Giberelinas

Inicialmente, através do método da embebição, verificou-se o efeito de diferentes concentrações do ácido giberélico (GA_3) no alongamento das diferentes regiões do eixo de plântulas intactas provenientes de sementes coletadas em 1987.

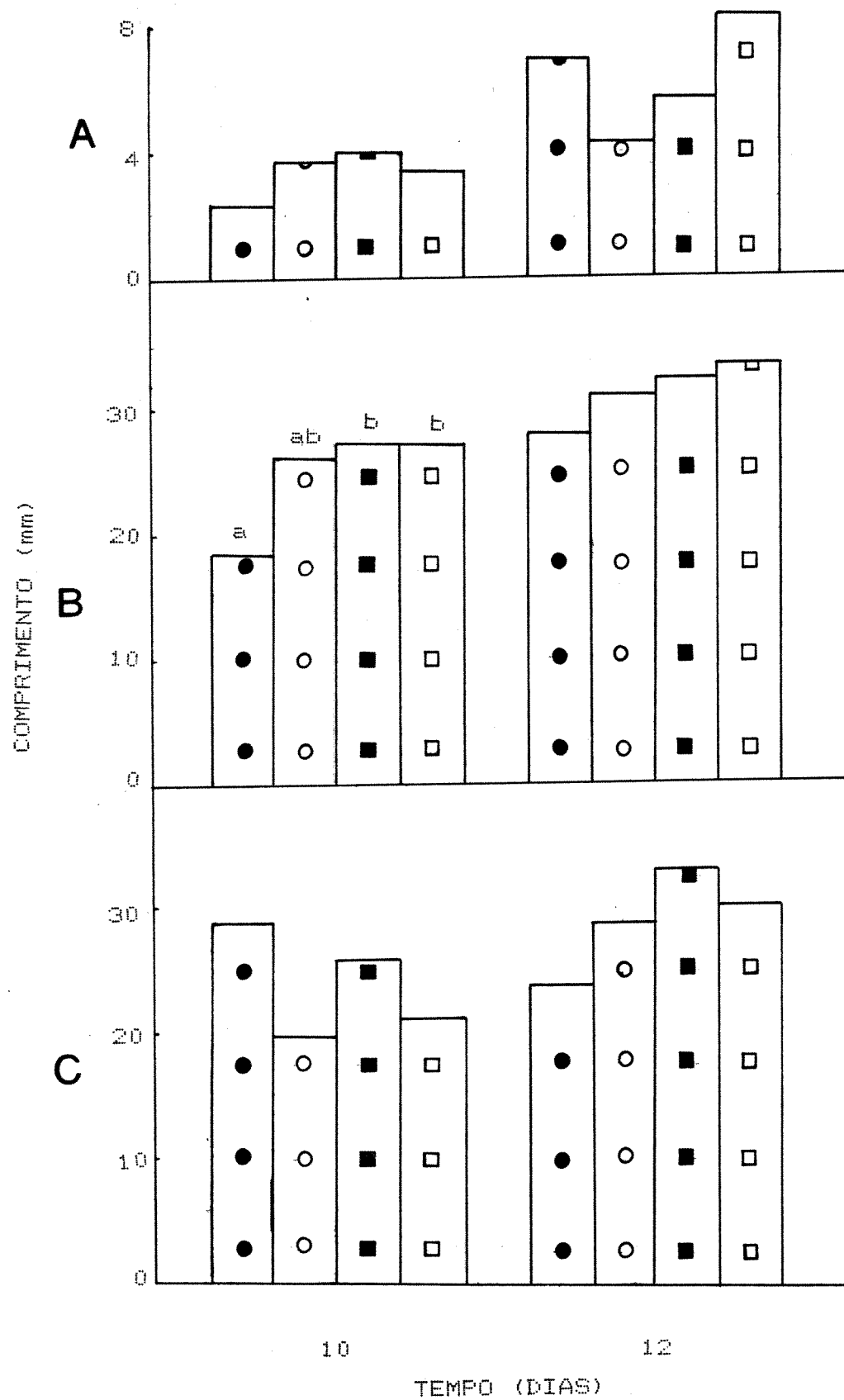
Pela figura 12, nota-se uma promoção do alongamento apenas do hipocótilo (B) pelo GA_3 a $3 \times 10^{-3} M$ e $3 \times 10^{-4} M$ no dia 10. O alongamento do epicótilo e raiz não foi afetado pelo GA_3 (figura 12-A e C).

Ainda neste experimento inicial, a figura 13 mostra que o peso seco do eixo principal da plântula não foi afetado por nenhuma das concentrações de GA_3 utilizadas.

Após estes resultados, foi escolhida a concentração de $3 \times 10^{-3} M$ de GA_3 , para uma análise mais detalhada do efeito do GA_3 pois esta foi uma das concentrações que promoveu o alongamento da região hipocotilar em plântulas tratadas pelo método da embebição. Para este experimento usaram-se sementes coletadas em 1989. Os resultados apresentados na figura 14 indicam que o comprimento do epicótilo teve um aumento maior quando se

FIGURA 12 - Efeito do GA₃ em 3 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - GA₃ 3×10⁻⁵M
- - GA₃ 3×10⁻⁴M
- - GA₃ 3×10⁻³M



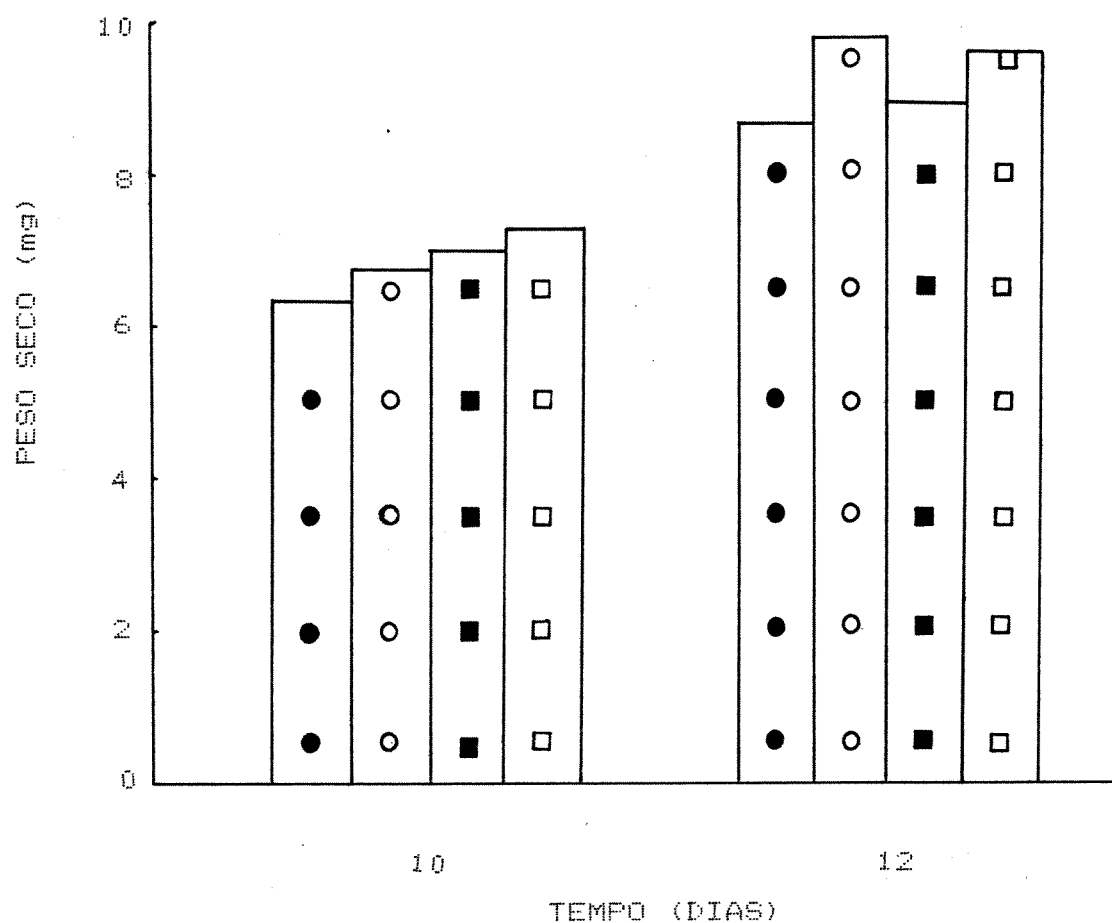


FIGURA 13 - Efeito do GA_3 em 3 concentrações diferentes, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - GA_3 $3 \times 10^{-5}M$
- - GA_3 $3 \times 10^{-4}M$
- - GA_3 $3 \times 10^{-3}M$

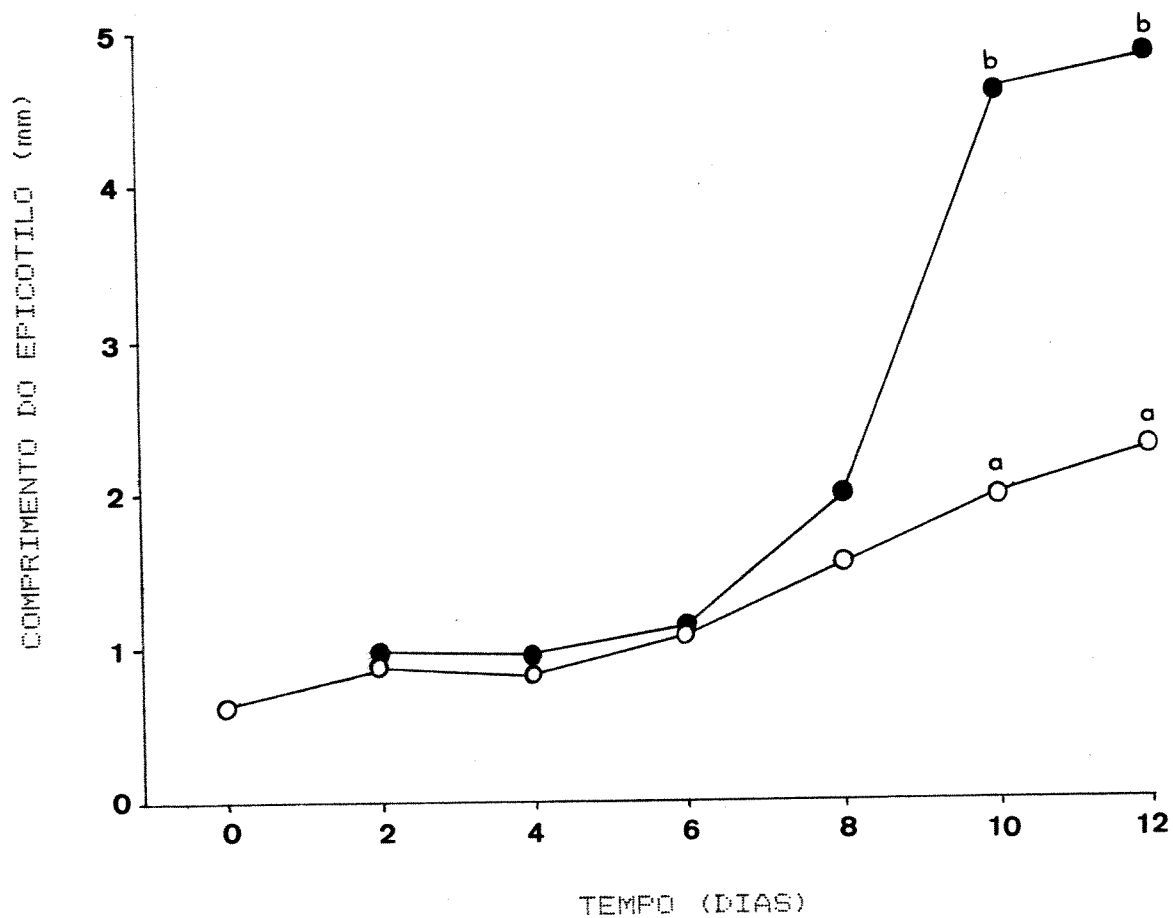


FIGURA 14 - Efeito do GA_3 a $3 \times 10^{-3}M$ no alongamento do epicótilo de D. miscolobium - Método da embebição.

Símbolos vazios = água destilada

Símbolos cheios = GA_3 $3 \times 10^{-3}M$

aplicou GA_3 a $3 \times 10^{-3} M$ pelo método da embebição. Os resultados foram significativos a partir do 10º dia de crescimento.

O comprimento da região hipocótilo-radicular pode ser visto na figura 15. Analisando-se conjuntamente o hipocótilo e raiz durante 12 dias de crescimento, nota-se que o alongamento não foi afetado pelo GA_3 (figura 15).

Neste novo lote de sementes (1989), a distinção entre hipocótilo e raiz ocorreu no 6º dia de crescimento (figura 16). Analisando-se separadamente o alongamento do hipocótilo e da raiz (figura 16), observa-se nas plantas controle uma estabilização do crescimento do hipocótilo a partir do 10º dia, enquanto a raiz cresce exponencialmente durante todo o período da análise. O hipocótilo é uma região da planta cujo crescimento promove a exposição dos cotilédones à luz sendo que em poucos dias ele deixa de crescer, período no qual o epicótilo assume o crescimento da plântula. As plântulas tratadas com GA_3 , não apresentam esta estabilização no crescimento do hipocótilo que cresce exponencialmente a partir do 8º dia. A promoção do crescimento do hipocótilo pelo GA_3 é estatisticamente significativa no 10º e 12º dias de crescimento (figura 16). O GA_3 não afeta significativamente o alongamento da raiz (figura 16).

Quando se compara o crescimento do hipocótilo com o da raiz, em plântulas controle, a raiz começa a crescer

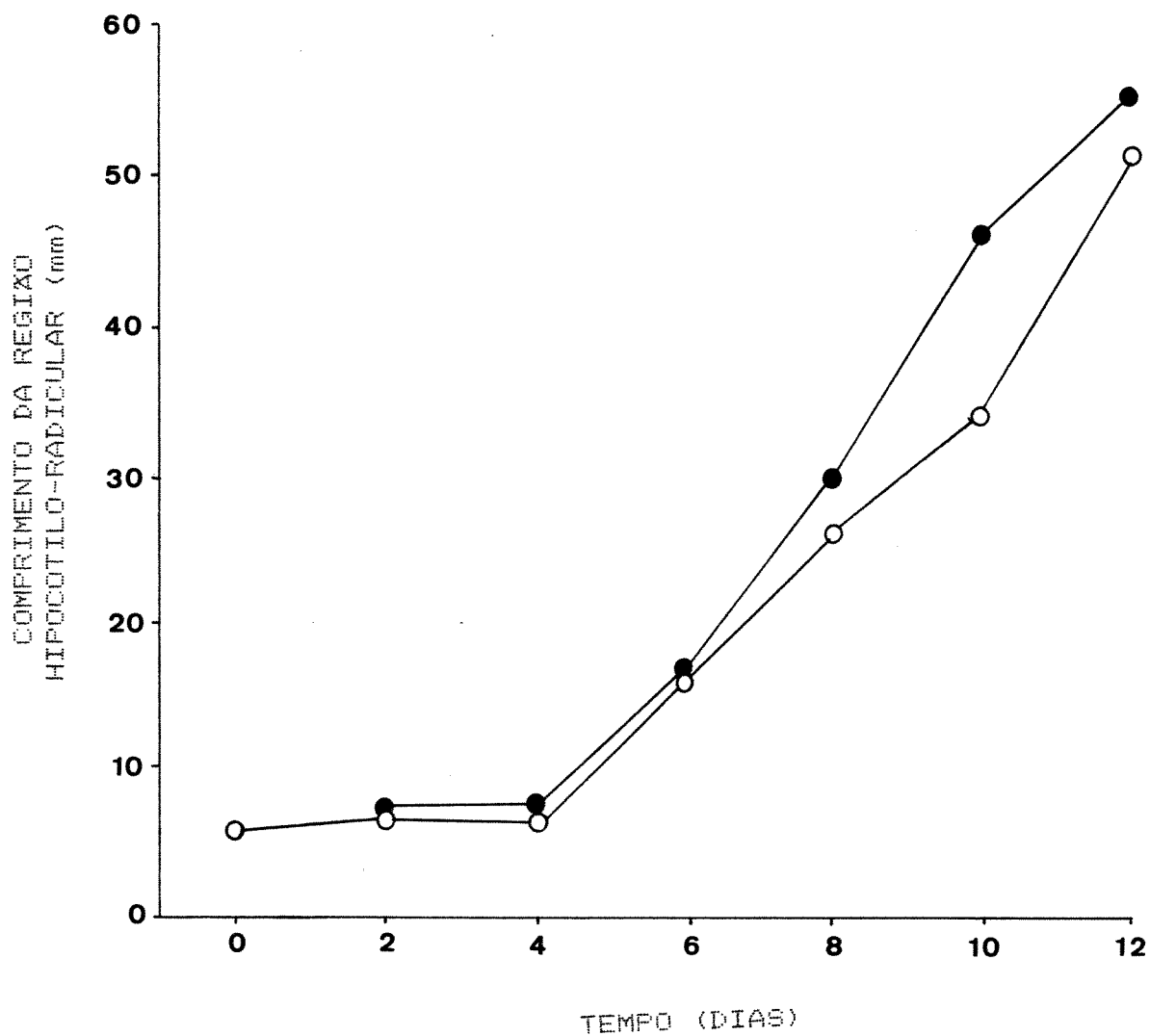


FIGURA 15 - Efeito do GA₃ a $3 \times 10^{-3}M$ no alongamento das regiões hipocótilo e raiz de plântulas de D. miscolobium - Método da embebição.

Símbolos vazios = água destilada

Símbolos cheios = GA₃ $3 \times 10^{-3}M$

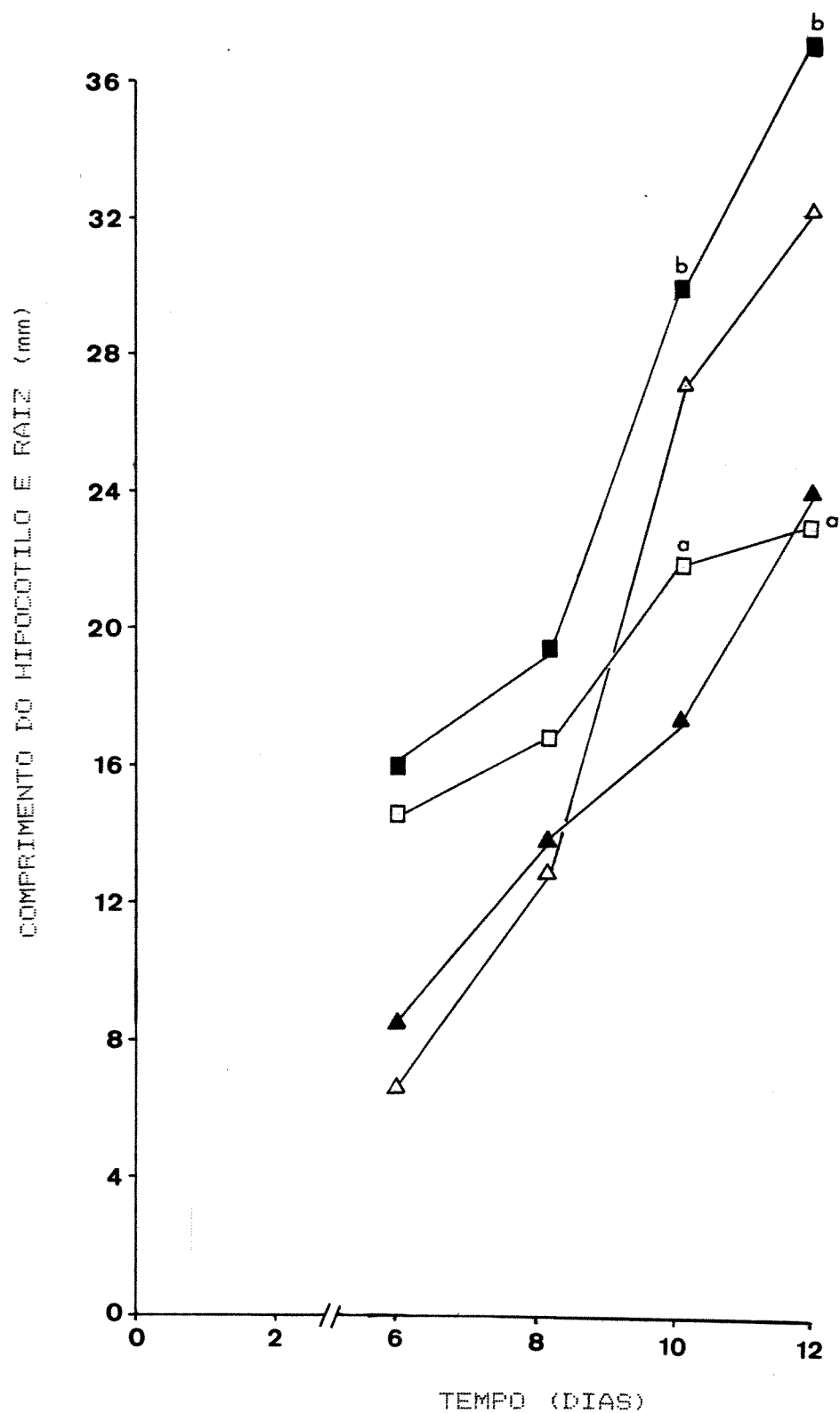


FIGURA 16 - Efeito do GA₃ a $3 \times 10^{-3}M$ no alongamento do hipocótilo (quadrados) e da raiz (triângulos) de D. miscolobium. Símbolos vazios = controle (água destilada). Símbolos cheios = GA₃ - Método da embebição.

rapidamente, superando o crescimento do hipocótilo a partir do 99 dia, aproximadamente. Mas quando o GA₃ é aplicado, o hipocótilo assume um alongamento tão pronunciado nessa fase que supera o comprimento da raiz (figura 16). Observou-se neste experimento que a aplicação de GA₃ alterou as razões de crescimento entre raiz e parte aérea, fazendo com que o alongamento da parte aérea supere o alongamento da raiz no 109 e 129 dias após a embebição (tabela 2).

A aplicação de GA₃ a $3 \times 10^{-3}M$ não afetou, em nenhum dia, o peso seco do eixo principal (figura 17), embora tivesse influenciado nos alongamentos do epicótilo e do hipocótilo, promovendo-os no 109 e 129 dias (figuras 14 e 16).

O efeito do GA₃ no alongamento do eixo de Dalbergia foi ainda analisado em outro experimento usando diferentes concentrações de GA₃ aplicadas pelo método da microgota. Na figura 18-A, observa-se que na concentração de $3 \times 10^{-3}M$ de GA₃ ocorre pequena promoção do alongamento do epicótilo no 109 dia. Uma inibição do alongamento do epicótilo no 129 dia é observada na concentração de $3 \times 10^{-3}M$ (figura 18-A). O alongamento do hipocótilo é promovido nos dois dias de análise quando se aplicou GA₃ a $3 \times 10^{-3}M$ (figura 18-B). A raiz não foi nada afetada por este método de aplicação (figura 18-C).

Houve inibição do peso seco do eixo principal no 129

TABELA 2 - Razões entre comprimento da raiz, parte aérea e plântula durante o crescimento inicial de *D. miscolobium*, tratadas ou não com GA₃ $3 \times 10^{-3} M$ (método da embebição) - (mm/mm).

A= raiz/parte aérea

B= raiz/plântula

C= parte aérea/plântula

RAZÕES DIAS	CONTROLE			GA ₃		
	A	B	C	A	B	C
06	0,4	0,3	0,7	0,5	0,4	0,6
08	0,7	0,4	0,6	0,6	0,3	0,7
10	1,1	0,5	0,5	0,5	0,4	0,6
12	1,3	0,6	0,4	0,5	0,3	0,7

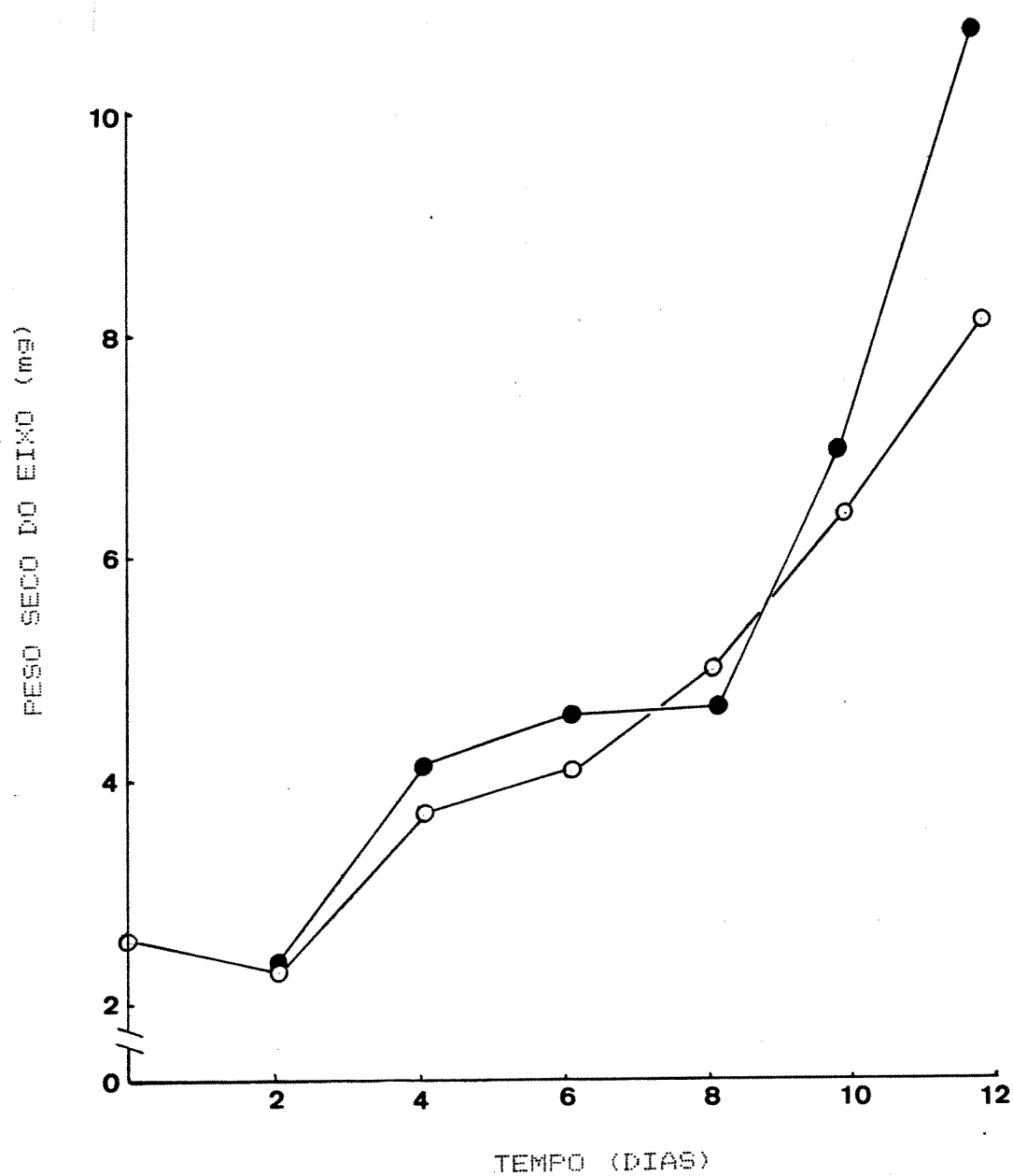


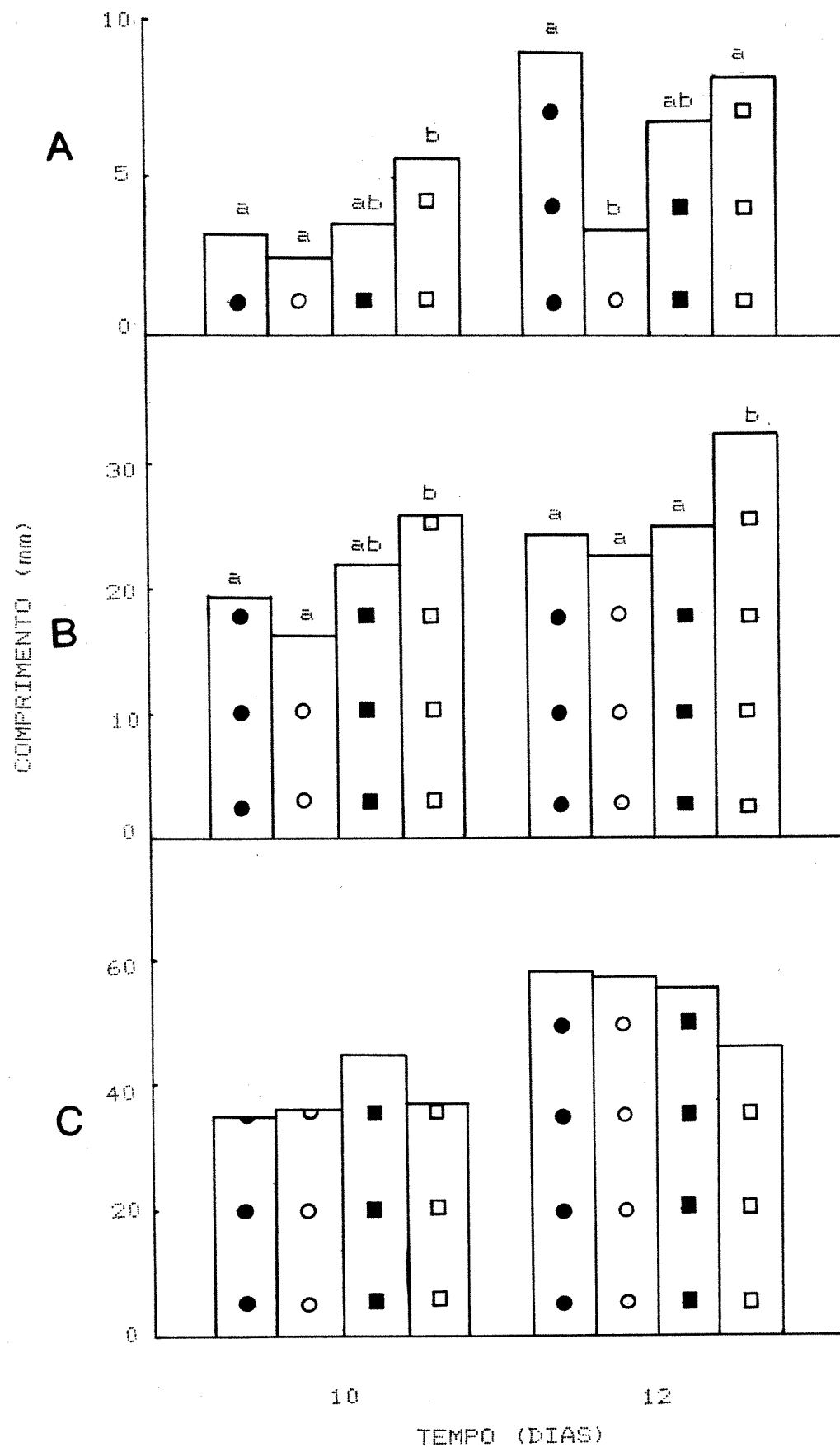
FIGURA 17 - Efeito do GA_3 a $3 \times 10^{-3}M$ no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

Símbolos vazios = água destilada

Símbolos cheios = GA_3 $3 \times 10^{-3}M$

FIGURA 18 - Efeito do GA_3 em 3 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da microgota.

- - controle
- - GA_3 $3 \times 10^{-5}M$
- - GA_3 $3 \times 10^{-4}M$
- - GA_3 $3 \times 10^{-3}M$



dia nas concentrações de $3 \times 10^{-2} M$ e $3 \times 10^{-4} M$ (figura 19).

Em ambas as metodologias de aplicação do GA_3 utilizadas neste trabalho, apenas concentrações relativamente altas ($10^{-2} M$) de GA_3 promoveram o alongamento da parte aérea de Dalbergia alterando a taxa de crescimento parte aérea/raiz.

2.3 - Inibidores da biossíntese de giberelinas

O papel do CCC no alongamento do eixo de Dalbergia, foi testado em 3 concentrações diferentes, pelo método da embebição (figura 20). Não foi observada nenhuma alteração no alongamento do epicótilo (figura 20-A). Apenas na concentração de $10^{-2} M$ e no 12º dia do experimento foi observada uma inibição de 38% do comprimento do hipocótilo (figura 20-B) sendo que na raiz uma inibição de cerca de 65% ocorreu no 8º dia (figura 20-C).

O peso seco das plântulas tratadas com CCC foi inibido apenas no 12º dia e na concentração de $10^{-2} M$ (figura 21).

Além do CCC, testou-se o efeito de outro inibidor da biossíntese de GAs, o AMD-1618. Na figura 22 observa-se que na concentração de $10^{-2} M$ o AMD-1618 inibe o alongamento das três regiões do eixo analisadas (epicótilo, hipocótilo e raiz).

A inibição do epicótilo (figura 22-A) e do hipocótilo

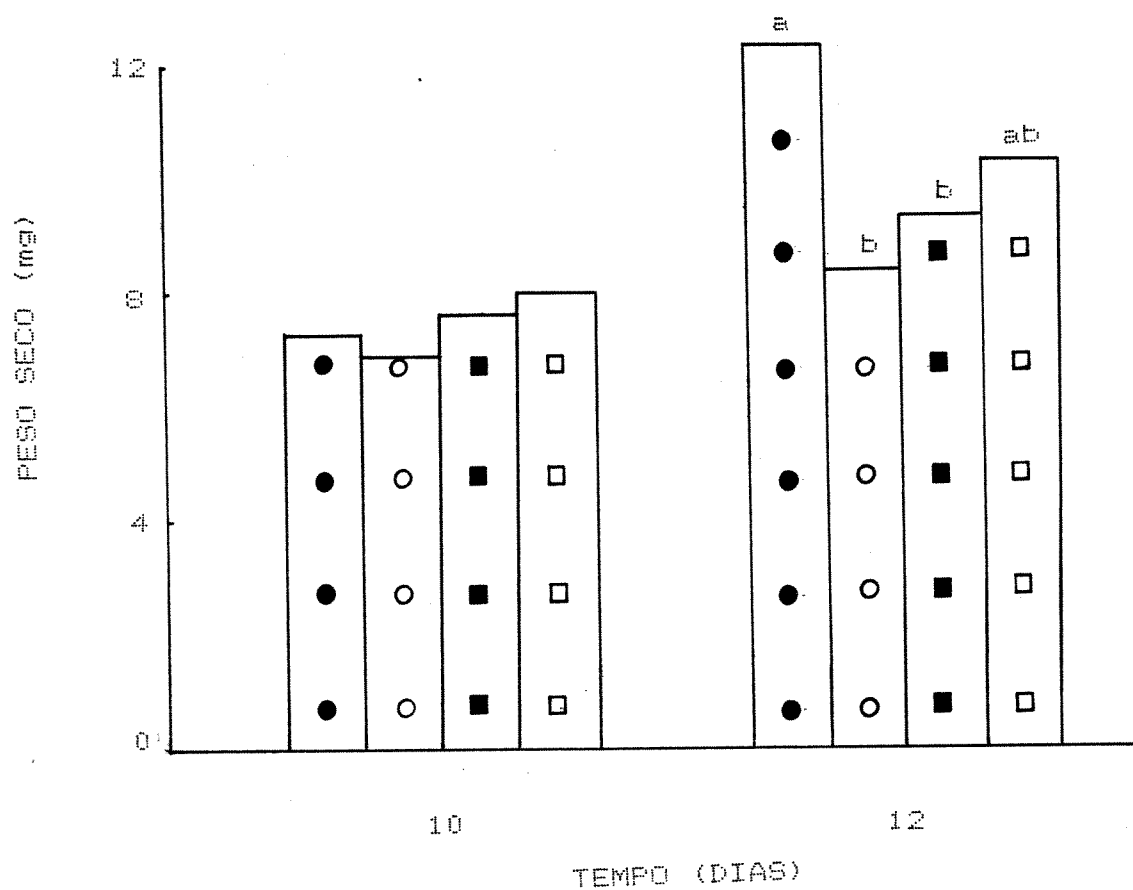


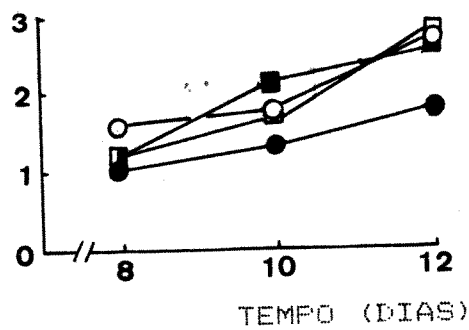
FIGURA 19 - Efeito do GA_3 em 3 concentrações diferentes, no peso seco do eixo da plântula de P. miscolobium - Método da microgota.

- - controle
- - $GA_3 \ 3 \times 10^{-5} M$
- - $GA_3 \ 3 \times 10^{-4} M$
- - $GA_3 \ 3 \times 10^{-3} M$

FIGURA 20 - Efeito do CCC em 3 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da embebição.

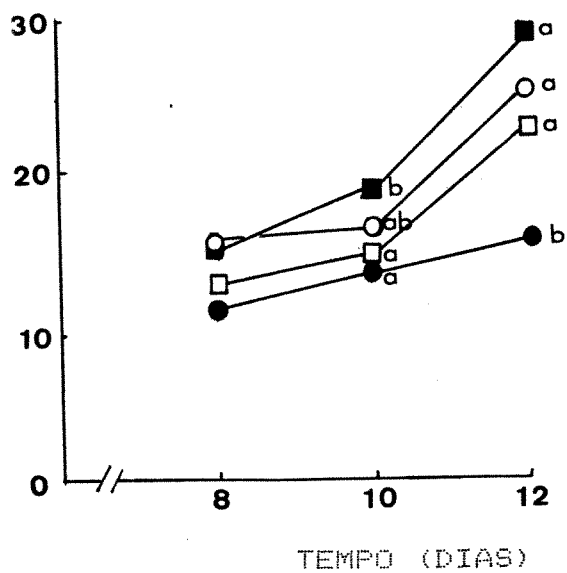
- - controle
- - CCC $10^{-4}M$
- - CCC $10^{-3}M$
- - CCC $10^{-2}M$

A

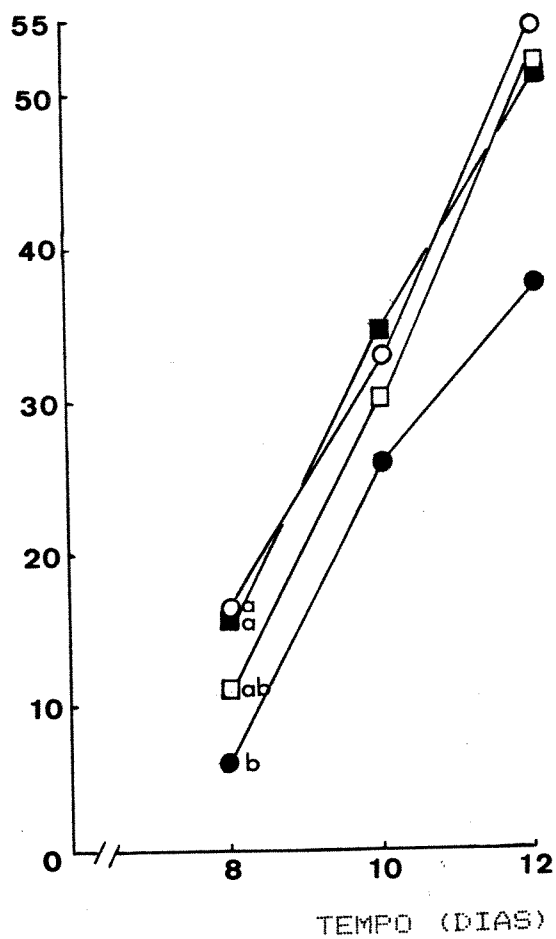


B

COMPRIMENTO (mm)



C



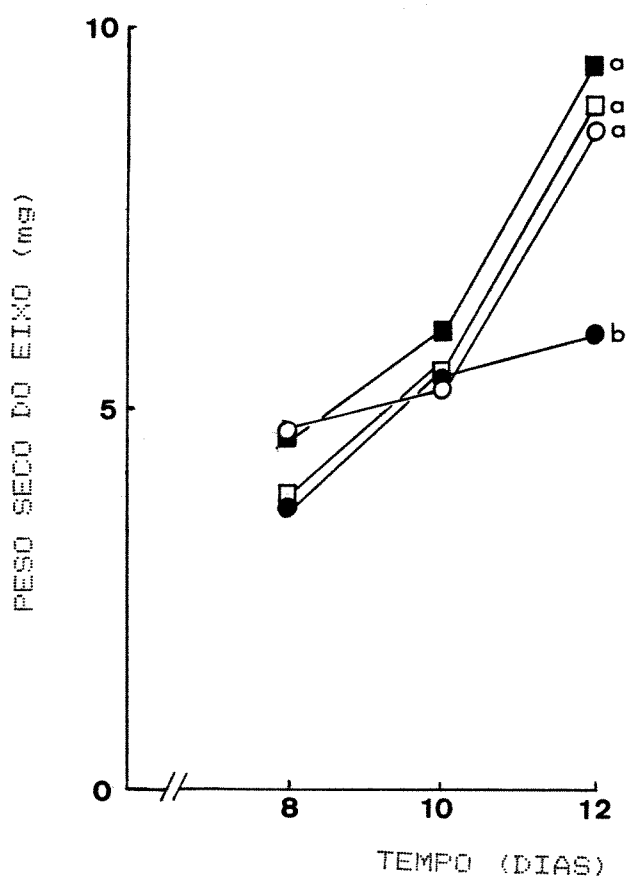
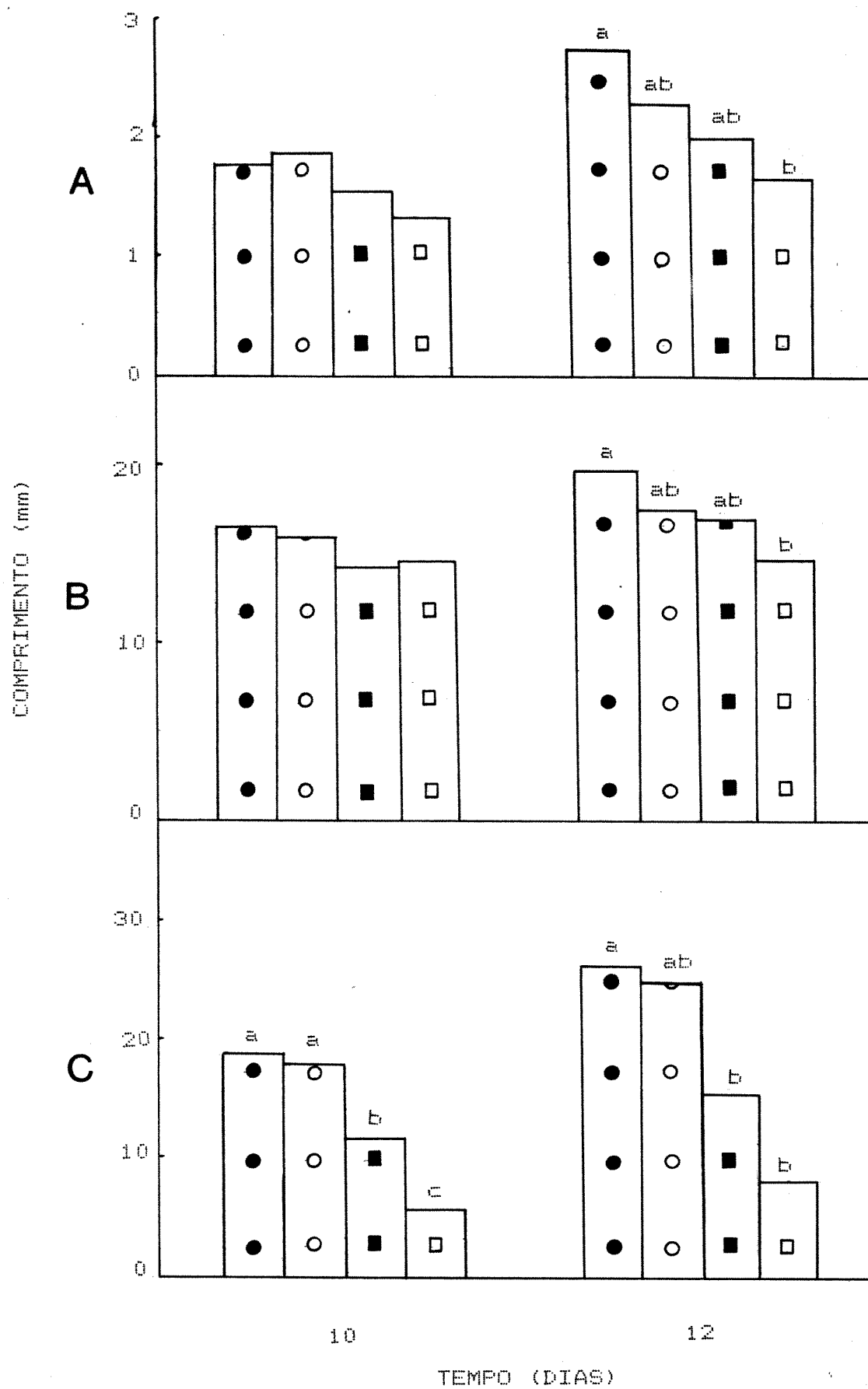


FIGURA 21 - Efeito do CCC em 3 concentrações diferentes, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - CCC 10⁻⁴M
- - CCC 10⁻³M
- - CCC 10⁻²M

FIGURA 22 - Efeito do AMD-1618 em 3 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - AMD-1618 $10^{-5}M$
- - AMD-1618 $10^{-4}M$
- - AMD-1618 $10^{-3}M$



(figura 22-B), pela concentração de $10^{-3}M$, somente foi obtida no 12º dia de crescimento, sendo que o epicótilo foi mais afetado que o hipocótilo. O alongamento do epicótilo foi inibido em cerca de 41% enquanto que o hipocótilo foi inibido em 36% em relação ao controle. As outras concentrações ($10^{-4}M$ e $10^{-5}M$) não inibiram significativamente o alongamento destas regiões (figura 22-A e B).

O AMD-1618 tem um efeito muito mais evidente na inibição do alongamento da raiz do que nas outras porções da plântula de D. miscolobium. A inibição do alongamento da raiz causada pela aplicação do inibidor a $10^{-3}M$ foi de 67% no 10º dia e 71% no 12º dia de crescimento. A raiz também foi inibida em 26% do seu crescimento pela concentração de $10^{-4}M$ no 10º dia e em 35% no 12º dia (figura 22-C).

O peso seco do eixo principal da plântula foi inibido em apenas 27% do peso da plântula não tratada, somente no 12º dia de crescimento, pela concentração de $10^{-3}M$ (figura 23).

Devido à falta de clareza nos resultados obtidos com os tratamentos de CCC e AMD-1618, resolveu-se testar um inibidor da biossíntese de GAs mais específico. O Tetcyclacis inibe a via biossintética em passos mais próximos da síntese do GA_{12} -aldeído (primeira giberelina da via, esquema 1 - Introdução). Analisando-se a figura 24, nota-se que a inibição do alongamento das diferentes partes da plântula pelo

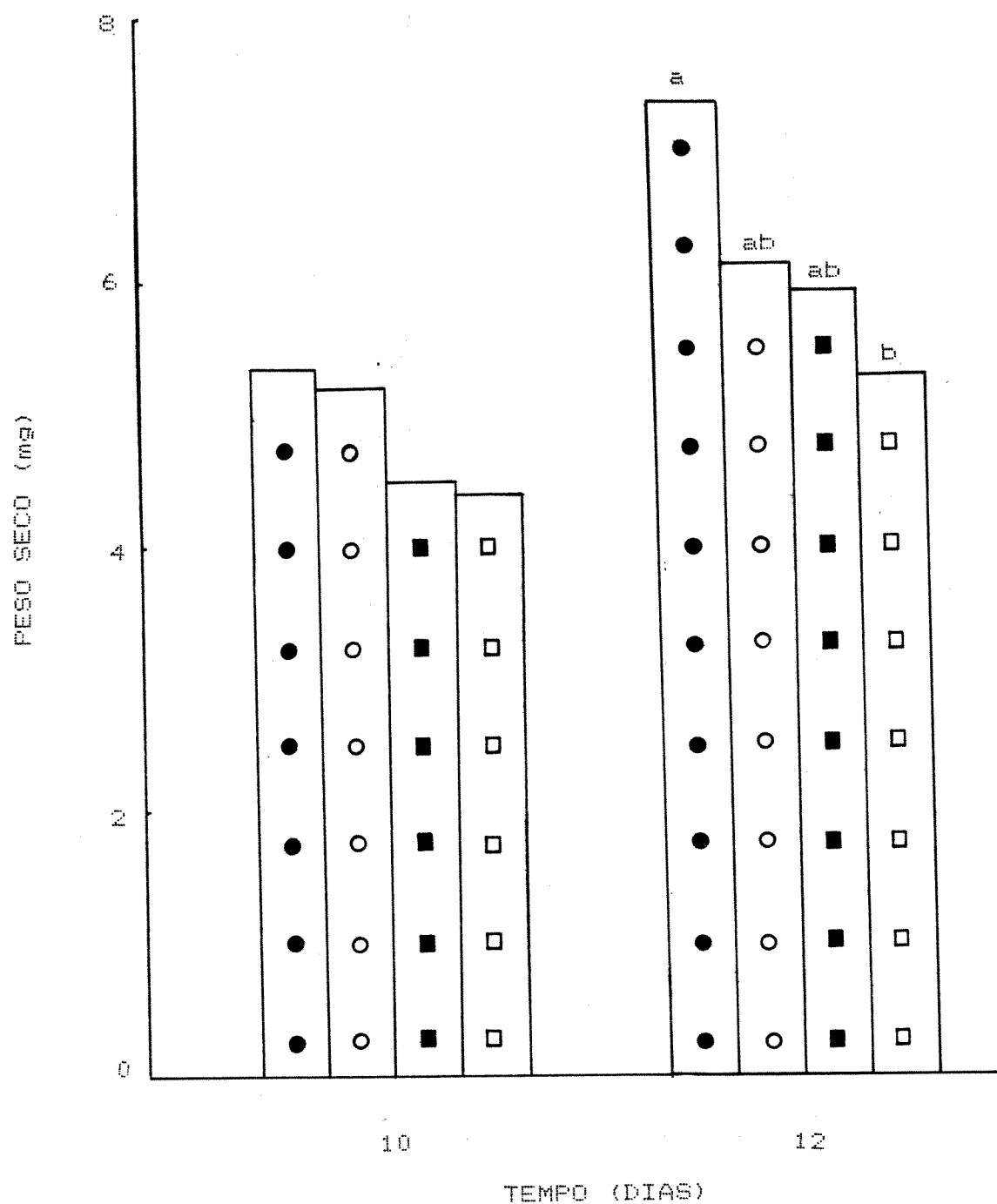


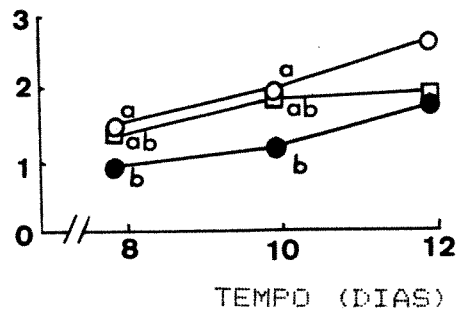
FIGURA 23 - Efeito do AMD-1618 em 3 concentrações diferentes, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - AMD-1618 $10^{-5}M$
- - AMD-1618 $10^{-4}M$
- - AMD-1618 $10^{-3}M$

FIGURA 24 - Efeito do Tetcyclacis em 2 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da embebição.

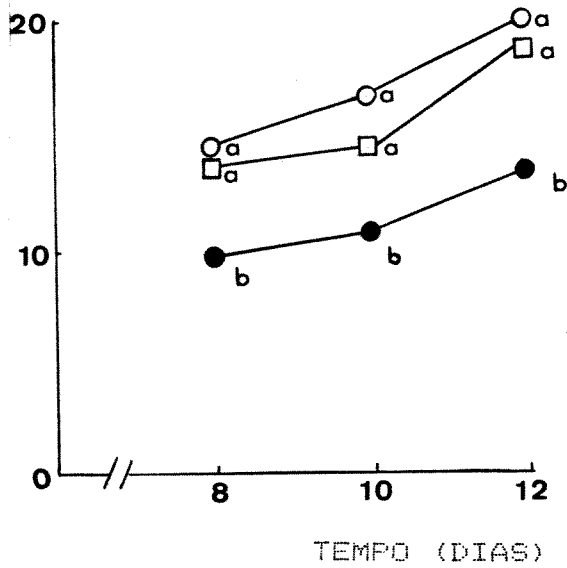
- - controle
- - Tetcyclacis $10^{-6}M$
- - Tetcyclacis $10^{-5}M$

A

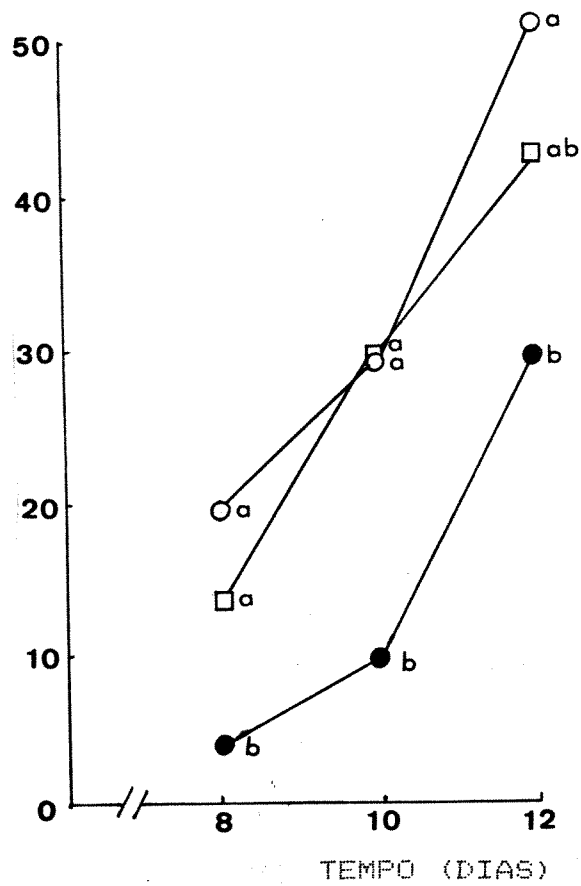


B

COMPRIMENTO (mm)



C



Tetacyclacis iniciou-se antes do 89 dia de crescimento. Neste experimento, as medidas foram feitas a partir do 89 dia pois no 69 dia as regiões do hipocótilo e da raiz estavam começando a se distinguir e a região do epicótilo ainda não havia se desenvolvido a ponto de se observar em diferenças entre os tratamentos. A inibição do alongamento do epicótilo foi observada no 89 e 109 dias, apenas na concentração de Tetacyclacis de 10^{-8} M. A redução do crescimento foi de 36% e 38% nos dois dias mencionados, respectivamente (figura 24-A). O crescimento do hipocótilo foi inibido também pelo Tetacyclacis a 10^{-8} M no 89 dia (29%), no 109 dia (37%) e no 129 dia (35%) (figura 24-B).

O crescimento da raiz também foi inibido por esta concentração, em 79%, 66% e 43%, após 8, 10 e 12 dias de crescimento, respectivamente (figura 24-C).

Em relação ao peso seco do eixo principal das plântulas, observa-se uma inibição de 28% em relação ao controle, no 89 e 109 dias do experimento causada pelo Tetacyclacis na concentração de 10^{-8} M (figura 25). Não ocorreu inibição do peso seco em nenhuma das concentrações no 129 dia de crescimento, quando o alongamento tanto do epicótilo como do hipocótilo estava sendo bastante inibido.

Para verificar se o Tetacyclacis estava inibindo o alongamento, devido à inibição da biossíntese de GAs, tentou-se reverter o efeito do Tetacyclacis pela aplicação subsequente de GA_3 . Neste método o inibidor

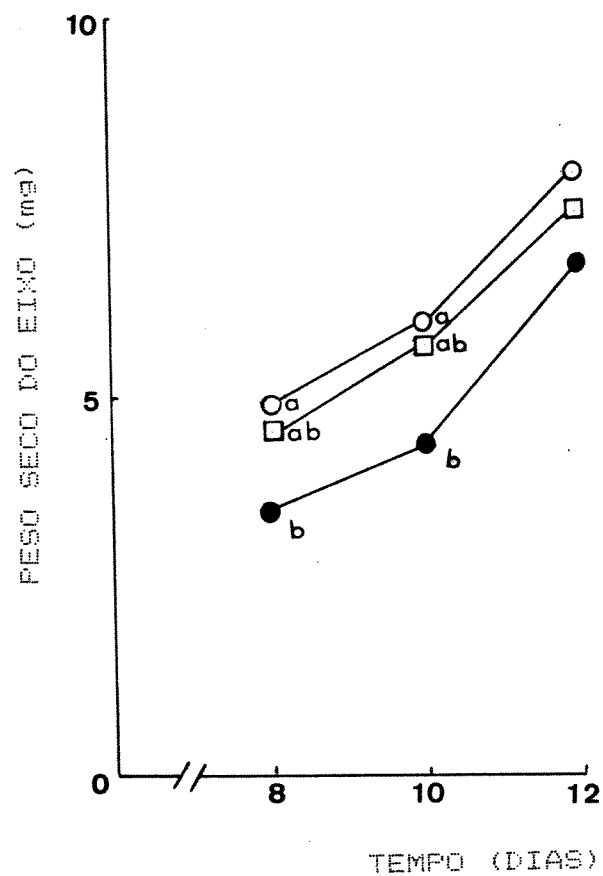


FIGURA 25 - Efeito do Tetcyclacis em 2 concentrações diferentes, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - Tetcyclacis 10⁻⁶M
- - Tetcyclacis 10⁻⁸M

permaneceu na placa de Petri até o 29 dia de crescimento sendo substituído neste dia pelo GA₃ (método da embebição). O GA₃ continuou mostrando eficiência na promoção do alongamento do epicótilo e do hipocótilo neste método (figura 26-A e B). Novamente, não observou-se efeito significativo no alongamento da raiz, pela aplicação de GA₃ por embebição (figura 26-C). O Tetcyclacis, aplicado por este método, foi eficiente apenas na inibição do alongamento do hipocótilo, não afetando significativamente o alongamento do epicótilo e raiz (figura 26-A,B e C). O GA₃ foi efetivo na reversão desta inibição induzida pelo Tetcyclacis (figura 26-B).

O peso seco do eixo principal (figura 27) foi inibido pelo Tetcyclacis apenas no 109 dia do experimento, enquanto que o GA₃ continuou não afetando o peso seco das plântulas até o 109 dia mas, no 129 dia houve aumento do peso seco quando se aplicou GA₃ após o uso do Tetcyclacis.

O efeito do Tetcyclacis e do GA₃ foi também observado a nível celular após a preparação de lâminas permanentes com cortes longitudinais e transversais do epicótilo e do hipocótilo das plântulas tratadas. Não foram obtidos bons resultados para o material desidratado em bateria de etanol. No material desidratado pelo butanol, o tempo mais eficiente foi o de 24 horas para cada álcool. Assim, os resultados obtidos para os cortes histológicos referem-se ao

FIGURA 26 - Papel do GA₃ no processo da reversão da inibição do alongamento celular, provocada pelo Tetcyclacis, em D. miscolobium. - epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) - Método da embebição.

- - controle
- - Tetcyclacis 10^{-5} M (aplicado do dia 0 ao dia 2)
- - GA₃ 3×10^{-5} M (aplicado no dia 2)
- - Tetcyclacis + GA₃

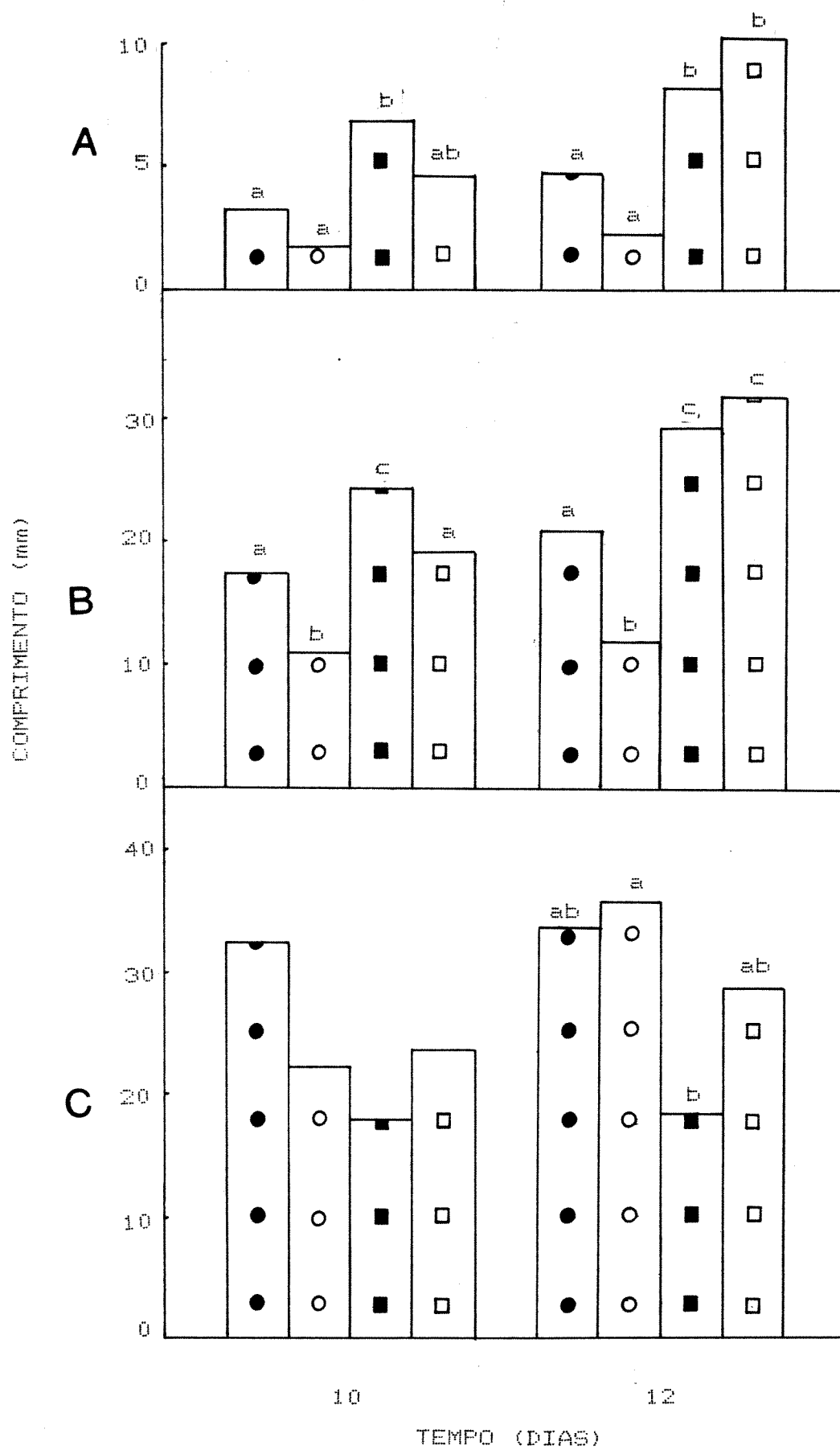
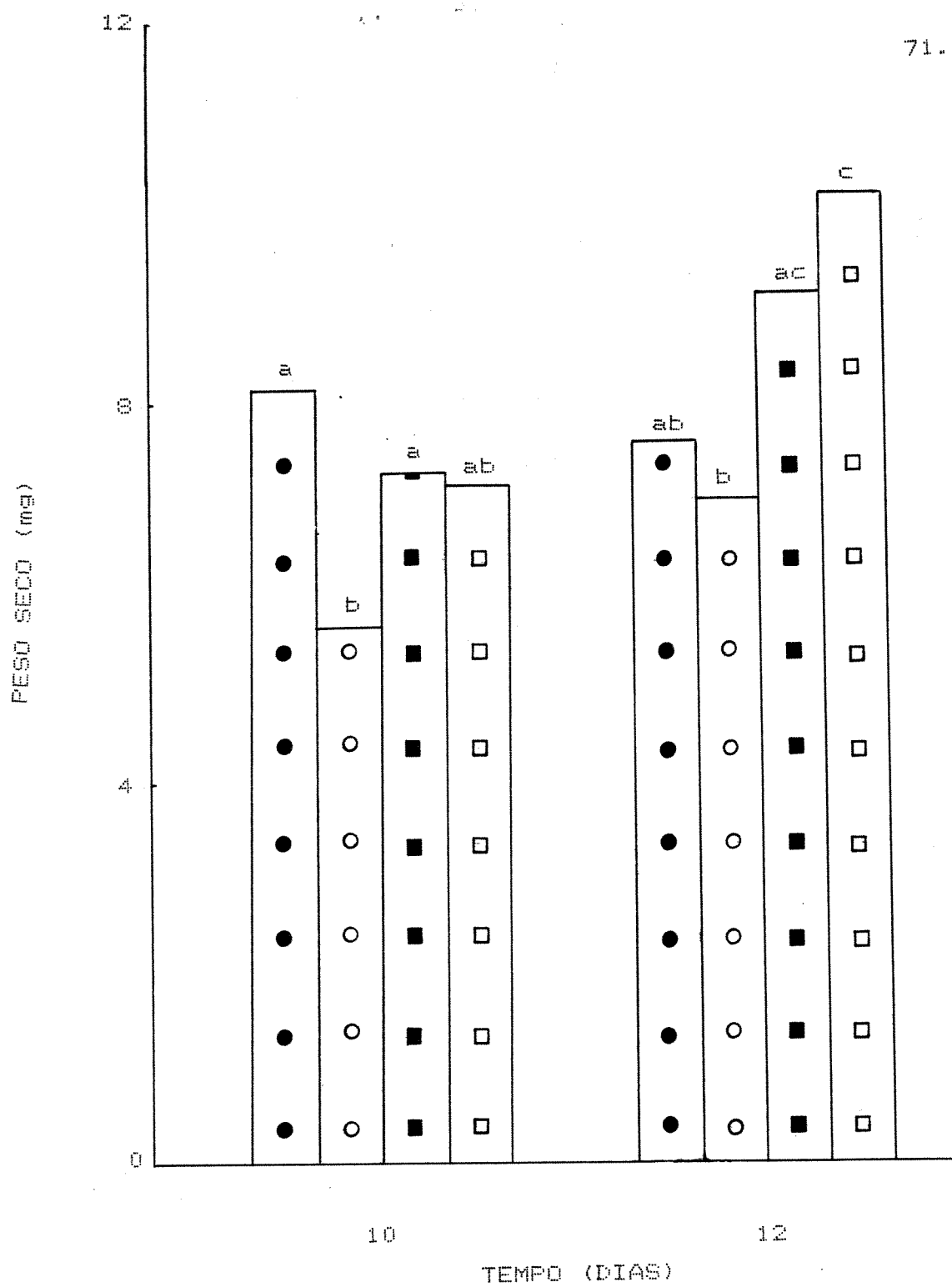


FIGURA 27 - Papel do GA₃ na reversão da inibição do peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium provocada pelo Tetcyclacis - Método da embebição.

- - controle
- - Tetcyclacis 10^{-8} M (aplicado do dia 0 ao dia 2)
- - GA₃ 3×10^{-8} M (aplicado no dia 2)
- - Tetcyclacis + GA₃



material fixado em FAA 50% durante 48 horas, desidratado em butanol com concentrações crescentes, incluídos em parafina e posteriormente corados pela safranina e verde rápido ou pelo azul de Toluidina. Os resultados obtidos para os cortes longitudinais do tecido parenquimático cortical do hipocótilo de plântulas com 12 dias de idade (tabela 3 e prancha 1), comprovaram o efeito inibitório do Tetcyclacis $10^{-5}M$ em relação ao controle (1.1 - 1.2), a promoção do alongamento provocada pela utilização do GA_3 $3 \times 10^{-5}M$ (1.3) e a reversão obtida quando da utilização do GA_3 no 2º dia do experimento, após o tratamento com Tetcyclacis nos dois primeiros dias (1.4). As células do epicótilo não foram afetadas significativamente pelo Tetcyclacis e tiveram seu volume aumentado por aplicações de GA_3 (tabela 3).

2.4 - Ions potássio e interação com GA_3

O efeito do íon potássio (K^+) no alongamento do hipocótilo de plântulas de D. miscolobium crescidas na luz e no escuro, pode ser observado na figura 28-A e B. O tratamento com KCl nas concentrações de $10^{-4}M$ e $10^{-3}M$, tanto na luz como no escuro, não afetaram significativamente o alongamento do hipocótilo. Somente na concentração de KCl de $10^{-2}M$, houve uma promoção do alongamento do hipocótilo, sendo esta promoção mais evidente nas plântulas mantidas no escuro (figura 28-B). A aplicação de GA_3 sozinho promoveu um alongamento

FRANCHA 1:

Cortes do tecido parenquimático cortical do hipocótilo de plântulas de Dalbergia miscolobium, com 12 dias de idade. Aumento: 400 x.

1.1: controle; 1.2: Tetcyclacis 10^{-5} M; 1.3: GA₃ 3×10^{-5} M; 1.4: Tetcyclacis + GA₃.

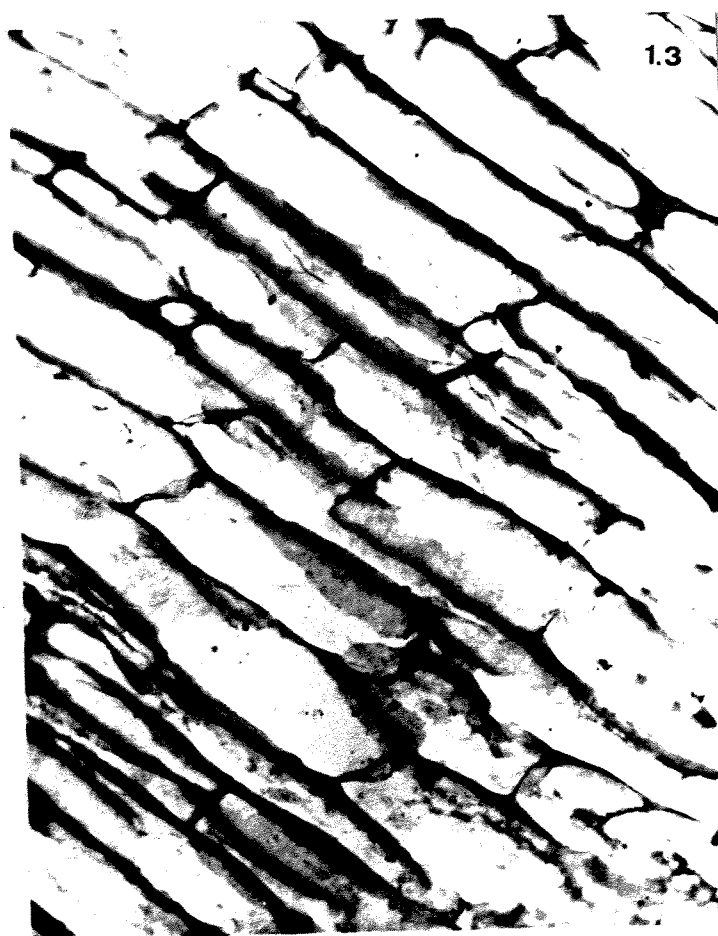
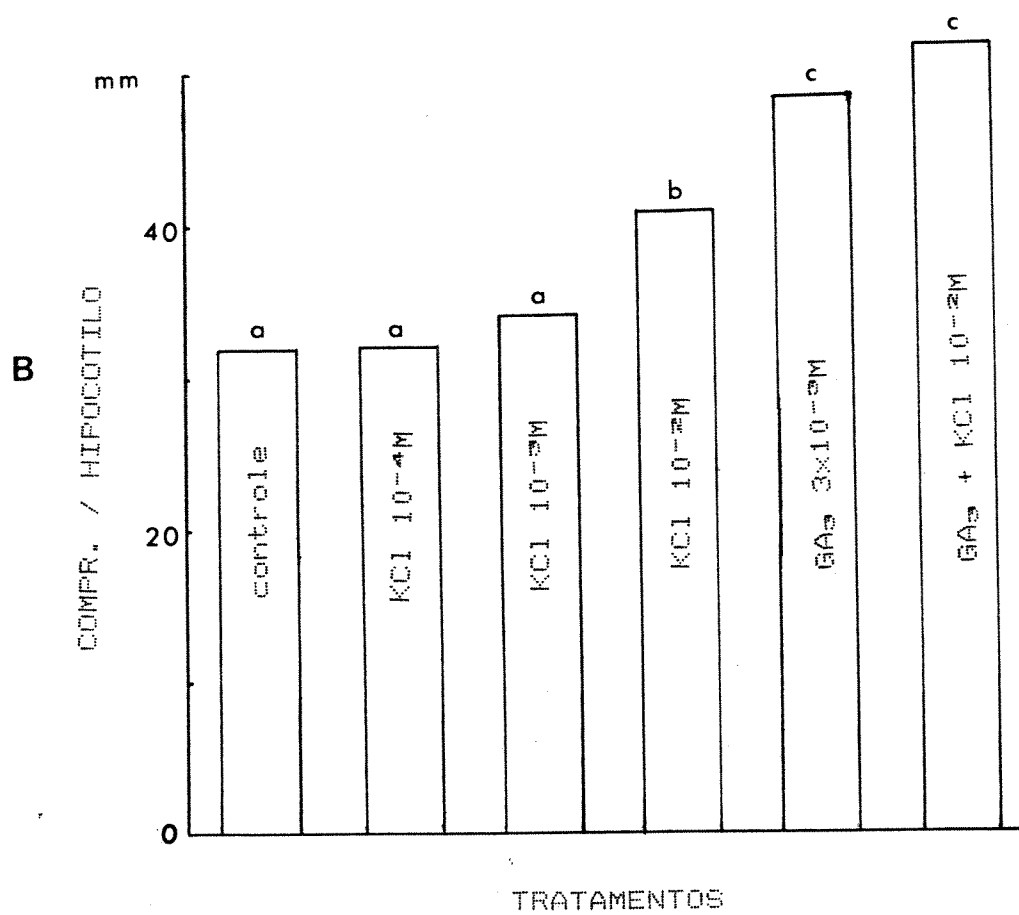
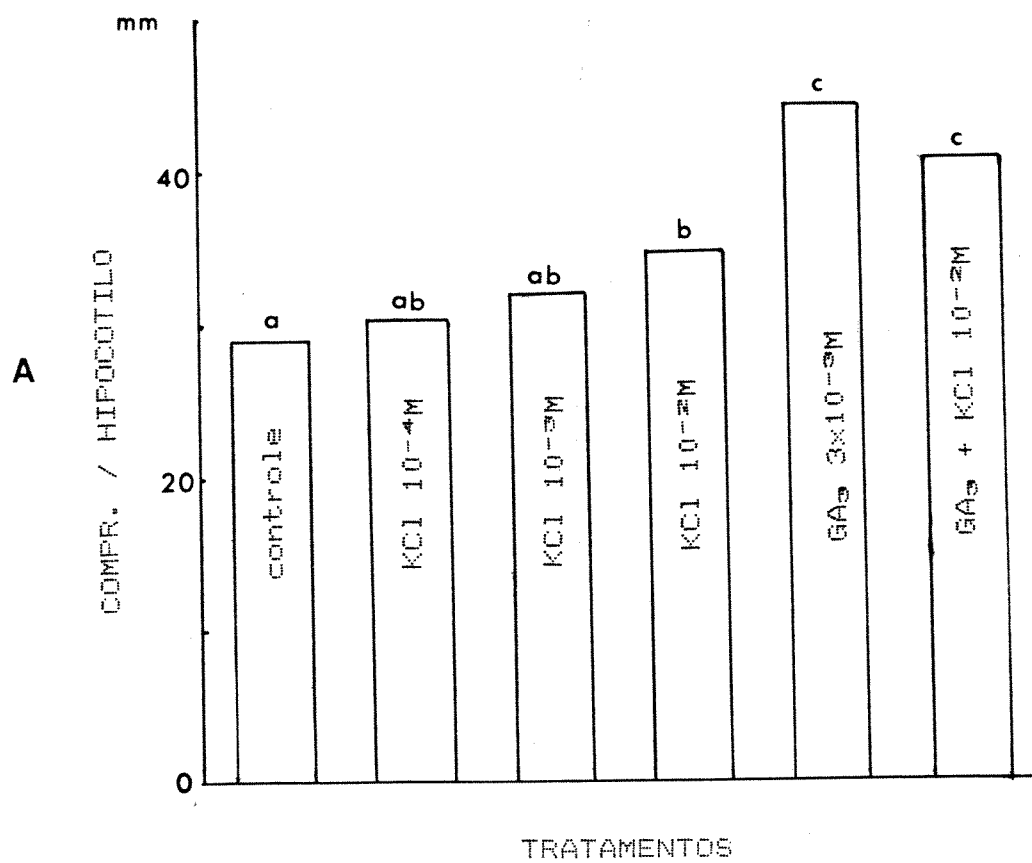


TABELA 3 - Volumes das células parenquimáticas corticais (μm^3) tratadas pelo método da embebição com GA_3 $3 \times 10^{-3}\text{M}$ e Tetracyclacis 10^{-3}M . Segmentos coletados para fixação no dia 12 de crescimento.

TRATAM. / REGIÃO	CONTROLE	TETC.	GA	TETC. + GA
EPICOTILO	82,25 ^{ab}	29,40 ^b	226,18 ^c	142,79 ^a
HIPOCOTILO	135,88 ^A	64,74 ^B	310,03 ^C	290,78 ^C

FIGURA 28 - Efeito do KCl e GA_3 no alongamento do
hipocótilo de plântula intacta de D. miscolobium, na
luz (A) e no escuro (B) - Método misto de aplicação.



ainda maior que o promovido pelo KCl, mas não houve ação sinérgica entre o KCl e o GA_3 , quando as duas substâncias foram aplicadas conjuntamente (figura 28).

Para eliminar possíveis efeitos de GA_s endógenas realizou-se outro experimento usando-se Tetracyclina durante a embebição das sementes, até o 29 dia com o posterior tratamento com KCl (método de embebição) ou GA_3 (método da microgota). Também neste caso, não houve ação sinérgica entre o KCl e o GA_3 (tabela 4).

2.5 - Ácido Abscísico

O comprimento do epicótilo foi inibido em todas as concentrações de ABA usadas, no 10º e 12º dias (figura 29-A), sendo que as maiores inibições foram obtidas nas concentrações de $3 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-3}M$. Neste experimento, a inibição do alongamento do eixo hipocótilo-raiz foi intensa (figura 29-B), fazendo com que estas regiões não se desenvolvessem distintamente. No tratamento com ABA a $3 \times 10^{-3}M$, houve uma inibição total da germinação nos 12 dias analisados. Neste caso, a medida do eixo foi obtida após a remoção do tegumento e de um dos cotilédones da semente.

Pela figura 30, verifica-se também uma grande inibição do peso seco do eixo principal na concentração de $3 \times 10^{-3}M$ e $3 \times 10^{-4}M$ de ABA no 10º e 12º dias de crescimento, sendo que neste último dia observou-se

TABELA 4 - Efeito do KCl $10^{-2}M$ e GA₃ $3 \times 10^{-3}M$ e suas interações, no alongamento do hipocótilo de plântulas de P. miscolobium (mm) com 12 dias de idade tratadas inicialmente com Tetrcyclacis a $10^{-2}M$.

TRATAMENTOS			
TETCYCL.	TETC.+KCl	TETC.+GA ₃	TETC.+KCl+GA ₃
21,26 ^a	24,33 ^a	43,0 ^b	45,26 ^b

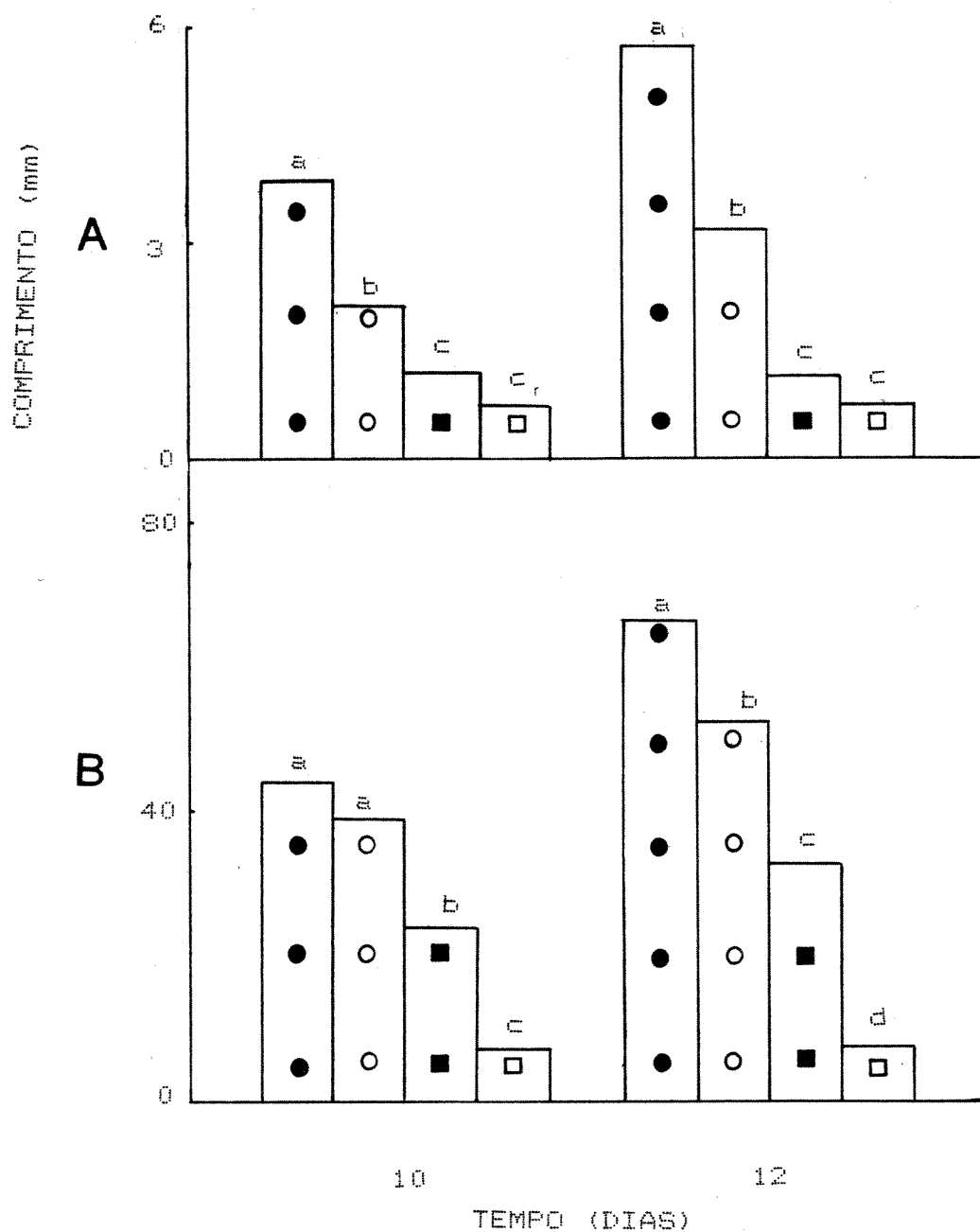
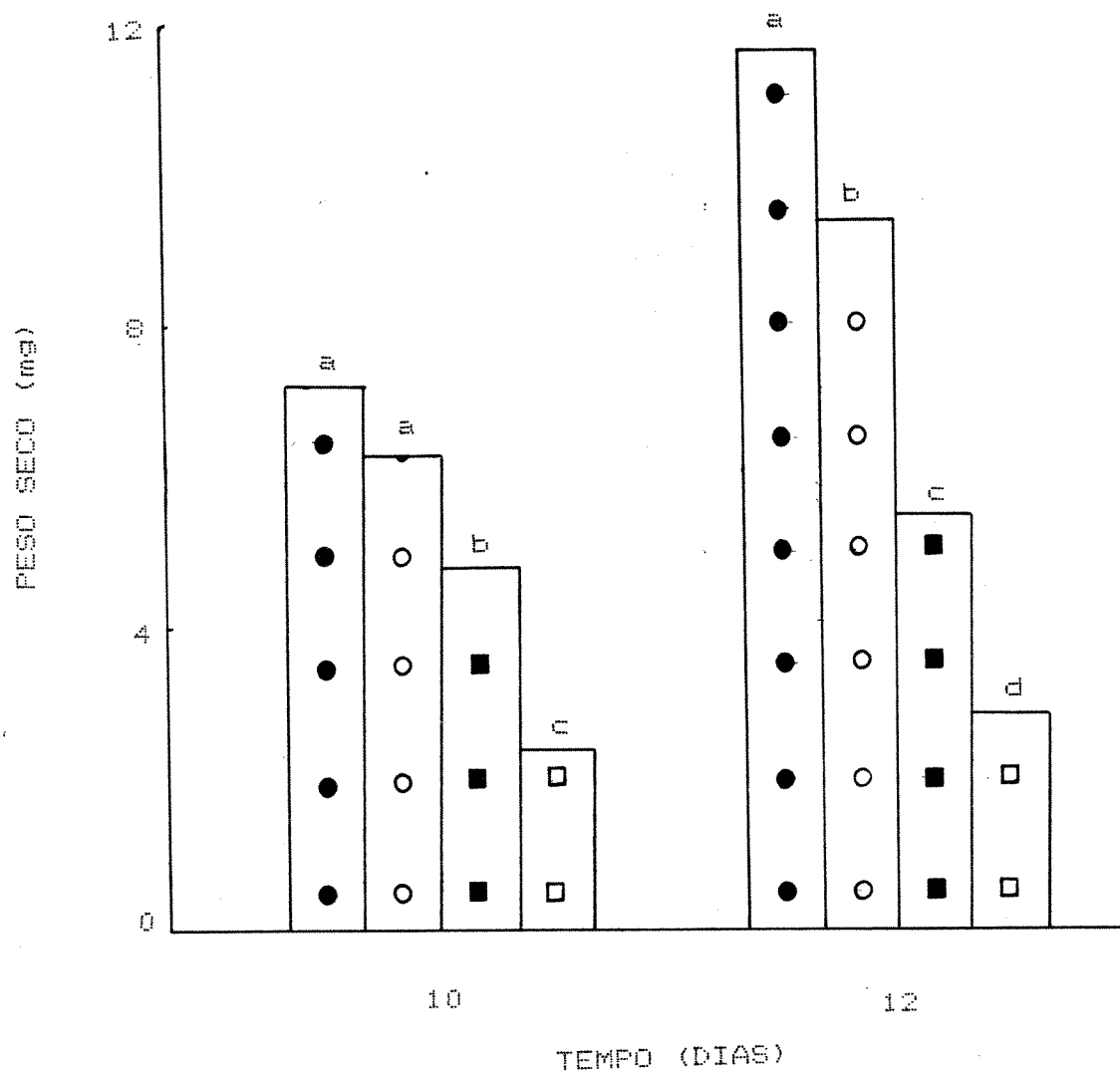


FIGURA 29 - Efeito do ABA em 3 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A) e do eixo hipocótilo-raiz (B) de *D. miscolobium* - Método da embebição.

- - controle
- - ABA $3 \times 10^{-5}M$
- - ABA $3 \times 10^{-4}M$
- - ABA $3 \times 10^{-3}M$

FIGURA 30 - Efeito do ABA em 3 concentrações diferentes no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - ABA $3 \times 10^{-5} M$
- - ABA $3 \times 10^{-4} M$
- - ABA $3 \times 10^{-3} M$



inibição também pela concentração de $3 \times 10^{-5} M$.

2.6 - Etileno

Através do método da embebição, foi testado o efeito do ethrel, como indutor da liberação de etileno, no alongamento do eixo de Dalbergia.

Analisando-se a figura 31-A, nota-se inibição do alongamento do epicótilo no 12º dia nas concentrações de 100 e 500 mg/l de ethrel. Com relação ao hipocótilo, houve uma pequena inibição no 12º dia apenas na concentração de 100 mg/l de ethrel (figura 31-B). A raiz foi a região mais inibida pela aplicação de ethrel principalmente no último dia de análise (figura 31-C). As 3 concentrações testadas, inibiram o alongamento da raiz, havendo entretanto um efeito maior nas concentrações mais altas como 500 e 800 mg/l (figura 31-D).

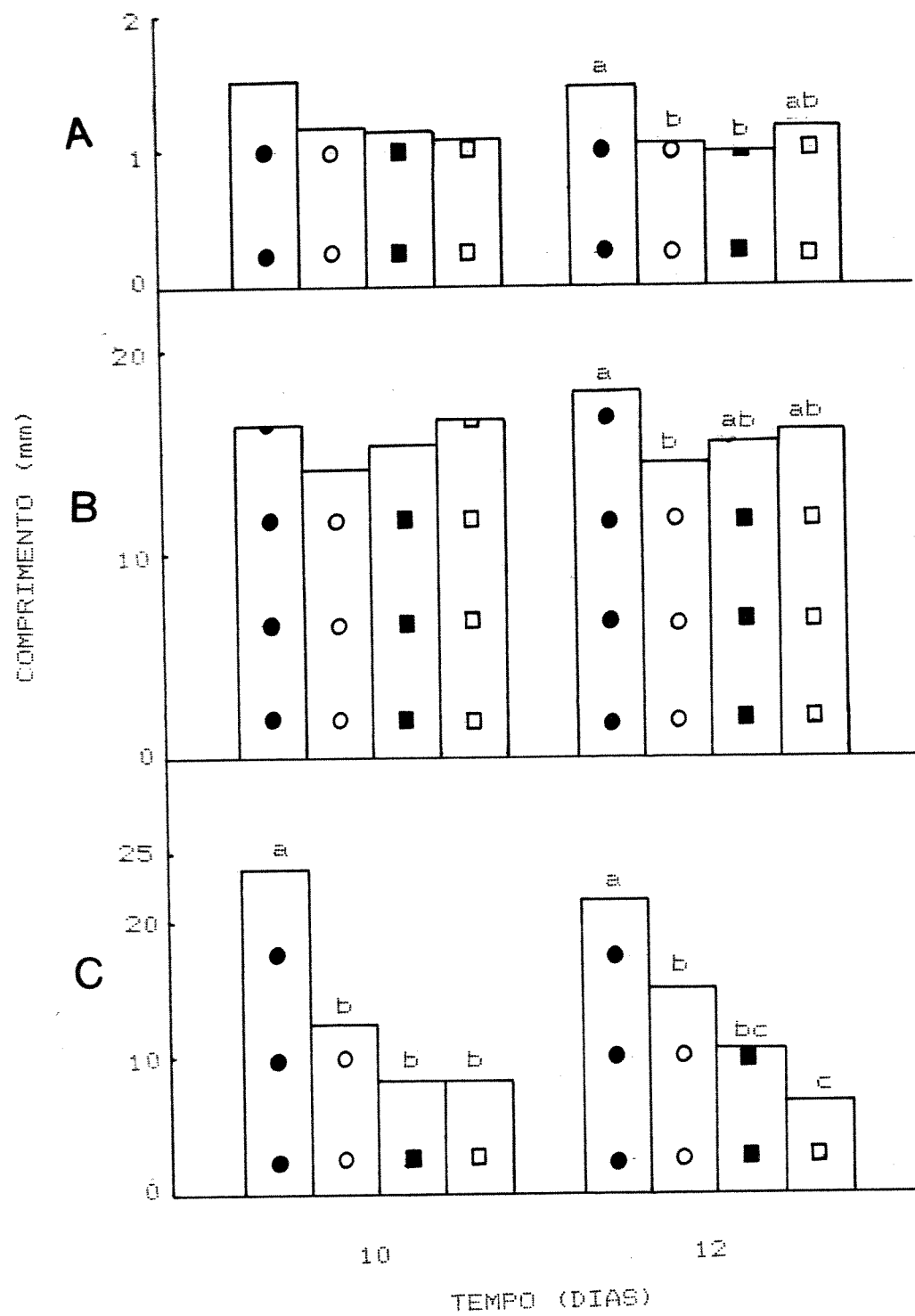
O peso seco do eixo principal da plântula não foi alterado com a aplicação exógena de ethrel (figura 32).

3 - Efeito de reguladores de crescimento no alongamento de secções de hipocótilo

O efeito do GA_3 na regulação da biossíntese de AIA foi testado em dois experimentos usando concentrações diferentes de GA_3 e AIA e precursores do AIA. L e

FIGURA 31 - Efeito do ethrel, em 3 concentrações diferentes, no alongamento do epicótilo (A), hipocótilo (B) e raiz (C) de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - ethrel 100 mg/l
- - ethrel 500 mg/l
- - ethrel 800 mg/l



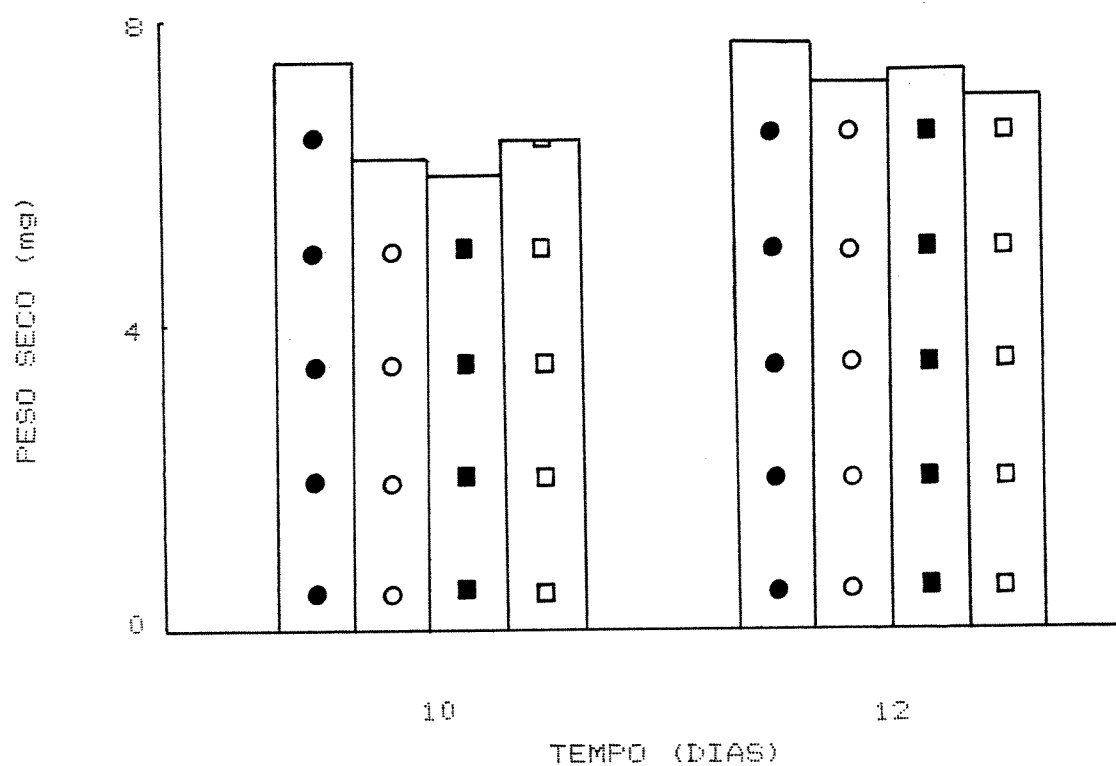


FIGURA 32 - Efeito do ethrel em 3 concentrações diferentes, no peso seco do eixo da plântula de D. miscolobium - Método da embebição.

- - controle
- - ethrel 100 mg/l
- - ethrel 500 mg/l
- - ethrel 800 mg/l

D-triptofano (tabela 5 e figura 33).

No primeiro experimento (tabela 5) onde foram usados segmentos de hipocótilo de plântulas com 12 dias tratados com GA_3 a $3 \times 10^{-9}M$ e AIA a $5 \times 10^{-9}M$, foi observado que após 24 horas houve um alongamento, mas não significativo estatisticamente, nos segmentos tratados com D-triptofano (C), AIA (D) e L-triptofano+ GA_3 (E). Neste mesmo período, notou-se uma promoção maior nos tratamentos com D-triptofano+ GA_3 (F) e GA_3 (G). No 39 dia após os tratamentos, os resultados foram semelhantes aos encontrados no 19 dia.

A figura 33, mostra os resultados obtidos no 29 experimento onde se usaram $5 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-4}M$ de AIA e GA_3 respectivamente. Notou-se um efeito bastante significativo na promoção do alongamento de secções de hipocótilo pelo AIA, atingindo 13,35 mm, ou seja, 3,35 mm de alongamento durante o período do experimento. Os tratamentos controle, L-triptofano e GA_3 não apresentaram um alongamento superior a 1 mm. Também observou-se um aumento significativo no alongamento, nos segmentos tratados com D-triptofano, L-triptofano+ GA_3 , D-triptofano+ GA_3 (figura 33).

Comparando-se os dois últimos experimentos realizados, nota-se que o GA_3 foi efetivo no alongamento de segmentos apenas em concentrações mais altas.

TABELA 5 - Efeito do AIA, GA₃ e dos precursores do AIA (L e D triptofano) sozinhos ou em conjunto com GA₃, no alongamento de segmentos (10 mm) de hipocótilo de 12 dias de D. miscolobium (mm).

A=controle

B=L-triptofano ($5 \times 10^{-4}M$)

C=D-triptofano ($5 \times 10^{-4}M$)

D=AIA ($5 \times 10^{-8}M$)

E=L-triptofano + GA₃

F=D-triptofano + GA₃

G=GA₃ ($3 \times 10^{-8}M$)

TRATAM. / TEMPO	A	B	C	D	E	F	G
24 horas após tratamentos	a 10,3	a 10,45	ab 10,6	ab 10,95	ab 11,0	b 11,35	b 11,1
39 dia após tratamentos	A 10,25	A 10,6	AB 10,85	AB 11,05	B 11,65	B 11,55	AB 11,25

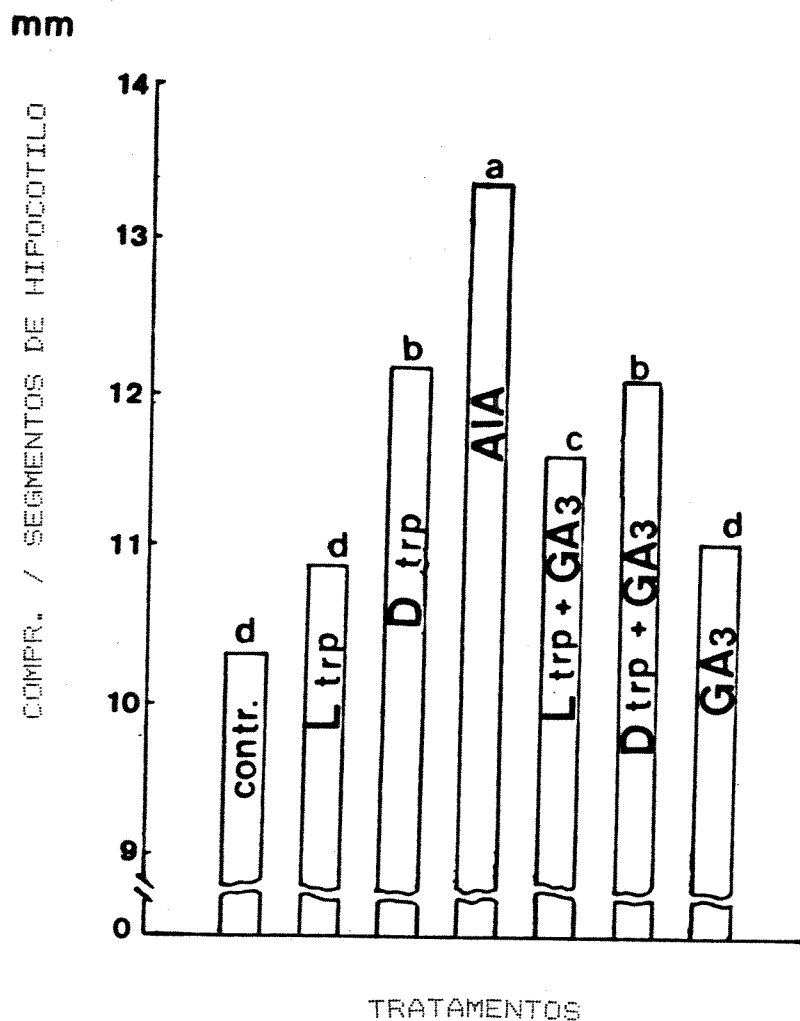


FIGURA 33 - Diagrama mostrando alterações no alongamento de seções de hipocótilo de D. miscolobium, 3 dias após os tratamentos: controle (água destilada), L-triptofano ($5 \times 10^{-4}M$) D-triptofano ($5 \times 10^{-4}M$), AIA, ($5 \times 10^{-4}M$), L-trp + GA ($5 \times 10^{-4}M$) D-trp + GA₃ e GA₃ ($3 \times 10^{-4}M$). Letras diferentes sobre as colunas, indicam diferença significativa entre os tratamentos.

IV - DISCUSSÃO

O crescimento lento da parte aérea em relação à raiz, encontrado em plântulas de Dalbergia miscolobium está de acordo com o observado para a maioria das plantas de cerrado que, para sobreviver, necessita atingir o lençol de água subterrâneo logo nos primeiros estágios do estabelecimento da plântula (RIZZINI & HERINGER, 1962; ARASAKI, 1988). Sabe-se que no campo, plantas de D. miscolobium com um ano de idade apresentam as seguintes dimensões médias: parte aérea - 17 cm; parte subterrânea - 34 cm (RIZZINI, 1977). O mecanismo de controle deste crescimento lento da parte aérea em relação à raiz ainda não foi elucidado. Também, não está claro qual o papel dos fitormônios no controle deste processo de alongamento lento. Sabe-se que giberelinas e auxinas regulam o alongamento de células do eixo de diversas plantas (DAVIES, 1987). Em Dalbergia, os níveis endógenos de giberelina A₁ e do ácido indol-3-acético aumentam logo no início da embebição das sementes, antes do alongamento do eixo das plântulas se tornar mensurável. Os níveis endógenos do ácido abscísico, geralmente considerado inibidor do crescimento, permanecem baixos durante os primeiros dias após a embebição das sementes (MONTEIRO et al. 1988b). No presente trabalho, numa tentativa de esclarecer o papel destes fitormônios no crescimento inicial do eixo de plântulas de Dalbergia, aplicaram-se diversos

reguladores do crescimento vegetal às plântulas e acompanhou-se o desenvolvimento inicial das mesmas.

Pela análise do crescimento inicial foi demonstrado que o alongamento da parte aérea de Dalbergia já é lento desde os primeiros dias após a germinação. Baseando-se nas informações da literatura e nestes resultados, resolveu-se aplicar os diferentes reguladores do crescimento logo no início da embebição das sementes. Os efeitos destas substâncias foram analisados principalmente no 10º e 12º dias de crescimento após a embebição, quando nas plântulas controle o alongamento da parte aérea era bem mais lento que o da raiz.

A auxina testada neste trabalho foi o ácido indol-3-acético que é uma auxina de ocorrência geral em plantas superiores e que atua como promotor de crescimento em várias espécies. Trabalhando com plantas de cerrado, POGGIANI (1971) sugeriu que o crescimento lento da parte aérea pode ser atribuído à inibição causada pela presença de AIA em concentrações mais altas do que na raiz. Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que em concentrações altas ($10^{-3}M$) o AIA inibe o alongamento do eixo. Concentrações mais baixas de AIA ($10^{-6}M$ e $10^{-7}M$) e mais próximas dos níveis endógenos normalmente encontrados em tecidos vegetais não afetaram em nada o processo do alongamento. Sugere-se que esta variação na sensibilidade ao AIA nestas concentrações em Dalbergia seja devida à grande

88.
variabilidade genética presente nas sementes desta
planta não cultivada.

BURG & BURG (1968) verificaram que altas concentrações de AIA estimulam a produção de etileno na região nodal de caules de ervilha, e o etileno inibe o crescimento da gema. Resolveu-se então, no decorrer deste trabalho, verificar o papel do etileno no alongamento do eixo de Dalbergia. Os resultados obtidos indicaram que o crescimento da parte aérea não é afetado por este regulador de crescimento.

Aplicações do ácido giberélico a plântulas de Dalbergia promoveram o alongamento do eixo, principalmente o do hipocótilo. Os resultados obtidos estão de acordo com o fato do hipocótilo ser, nesta fase de crescimento da plântulas, uma das regiões mais sensíveis a ação das giberelinas (JONES & MOLL, 1983). Promoção do alongamento do epicótilo pelo GA_3 foi obtida nos experimentos em que se usaram sementes coletadas em 1989. Portanto o epicótilo também é uma região sensível a aplicação de giberelinas. As plântulas do experimento cujas sementes usadas foram coletadas em 1987 não mostraram sensibilidade do epicótilo ao GA_3 .

Apesar do alongamento da parte aérea das plântulas de Dalbergia ter sido promovido pela GA_3 , o peso seco não foi afetado. Este fato, juntamente com as observações citológicas, mostraram que o efeito do GA_3 no crescimento do eixo é devido, principalmente, ao processo do alongamento celular. Isto está de acordo com

dados da literatura, que afirmam que o efeito deste regulador está associado mais com a promoção do alongamento celular, que permite a entrada de água nas células, do que com a promoção da divisão celular que aumentaria a matéria seca do embrião (JONES & MOLL, 1983).

Somente concentrações relativamente altas ($10^{-3}M$ e $10^{-4}M$) de GA_3 promoveram o alongamento da parte aérea. Estes resultados, comparados com dados de literatura indicam que plântulas de Dalbergia são pouco sensíveis a aplicações deste regulador de crescimento, que geralmente promove o alongamento do eixo de plantas em concentrações variando de $10^{-8}M$ a $10^{-7}M$ de GA_3 (CROZIER et al., 1970). A baixa sensibilidade da parte aérea de plântulas de Dalbergia ao GA_3 poderia ser explicada pela presença de giberelina endógena em níveis suficientes para a promoção máxima do alongamento. Resolveu-se, então, testar o efeito de inibidores da biossíntese de giberelinas no alongamento do eixo, numa tentativa de alterar os níveis endógenos do fitormônio.

O CCC inibiu o alongamento do hipocótilo e da raiz apenas na concentração mais alta ($10^{-3}M$) utilizada, inibindo também o aumento do peso seco do eixo. Aplicações de AMO-1618 inibiram o alongamento do eixo apenas na concentração de $10^{-3}M$, sendo a inibição do crescimento da raiz bem pronunciada. Sugere-se então, que a inibição causada por estas substâncias não está

relacionada à ação do GA_3 . Como estes inibidores bloqueiam passos iniciais da via biossintética dos terpenóides (DAVIES, 1987), vários compostos necessários para o desenvolvimento normal da plântula podem não ter sido produzidos, acarretando a inibição do crescimento. Testou-se, então, um inibidor mais específico da biossíntese de giberelinas, o Tetcyclacis. Este composto inibe a via biossintética em passos mais próximos da síntese da primeira giberelina da via (GA_{12} -aldeído). ZEEVAART (1985) observou que plantas de Agrostemma githago sob condições de dias longos, tratadas com Tetcyclacis apresentavam um nível de GA muito mais baixo do que plantas não tratadas, além de uma acentuada inibição do comprimento do caule. A aplicação do Tetcyclacis a $10^{-5}M$ inibiu o alongamento do eixo de Dalbergia, principalmente do hipocótilo. Apesar desta inibição ter sido observada no 12º dia do experimento, não foi notada inibição do peso seco, indicando que o efeito deste inibidor é predominante no alongamento e não no acúmulo de matéria seca.

ZEEVAART (1985) aplicou Tetcyclacis a $5 \times 10^{-5}M$ a plantas de Agrostemma e obteve inibição do crescimento do caule, que foi completamente revertida pelo tratamento com GA_1 . A reversão da inibição do alongamento do hipocótilo de Dalbergia, provocada pelo Tetcyclacis, pode ser obtida pela aplicação subsequente do GA_3 , indicando um provável envolvimento da giberelina endógena no controle do alongamento do eixo

de Dalbergia.

Devido à possível interação de íons K^+ com o GA_3 na promoção do alongamento celular sugerida por STUART & JONES (1978), resolveu-se estudar o papel deste íon no alongamento do eixo de Dalbergia. Aplicações de KCl a $10^{-2}M$ promoveram o alongamento do hipocótilo de plântulas de Dalbergia mantidas na luz e no escuro e aplicações de GA_3 junto com KCl não tiveram ação sinérgica. Para eliminar possíveis efeitos de giberelinas endógenas na ação do KCl, realizou-se um pré-tratamento das plântulas com Tetracyclacis. Neste caso o KCl aplicado sozinho não foi efetivo na promoção do alongamento e também não se observou ação sinérgica entre aplicações de KCl e GA_3 . Estas observações não estão de acordo com o observado por GURUPRASAD & GURUPRASAD (1988) em Amarantus caudatus. Neste trabalho as plântulas de A. caudatus, previamente incubadas com CCC, foram tratadas com GA_3 a $2,9 \times 10^{-5}M$, juntamente com várias concentrações de KCl. Foi observado um aumento na promoção do alongamento do hipocótilo causada pelo GA_3 , pelas aplicações do KCl em plântulas mantidas na luz ou no escuro. Entretanto, STUART & JONES (1978) observaram que o alongamento de células de secções do hipocótilo de alface não é afetado pela absorção de sais, após o tratamento com GA_3 , quando as secções são mantidas na luz. O mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho, onde as plântulas tratadas com KCl e GA_3 foram mantidas sob luz, quando

eliminou-se o efeito da giberelina endógena pelo tratamento com o Tetcyclacis. O efeito promotor do KCl observado em plântulas mantidas na luz e no escuro e não tratadas pelo Tetcyclacis pode ser atribuído à presença de giberelinas endógenas que, de acordo com STUART & JONES (1978), aumentariam a extensibilidade da parede, facilitando a absorção de sais e consequentemente, o alongamento celular.

O efeito no alongamento do eixo, do tratamento de plântulas de Dalbergia com ABA, foi também analisado no presente trabalho, visto que pequenas quantidades de ABA endógeno haviam sido detectadas em Dalbergia logo no início da embebição das sementes (MONTEIRO et al., 1988b). No tratamento com a concentração mais alta de ABA ($3 \times 10^{-2}M$) houve uma inibição total da germinação das sementes durante os doze dias da análise. Nos outros tratamentos (ABA a $3 \times 10^{-4}M$ e $3 \times 10^{-5}M$) houve germinação mas o crescimento geral das plântulas foi inibido. O ABA exerce um papel importante na inibição da germinação de sementes que ainda não estão no estágio ideal para começarem seu crescimento inicial. ONCKELEN et al. (1980) mostraram que sementes de feijão, na fase de maturação, ainda presas à planta mãe, apresentavam o catabolismo do ABA inibido. Mostraram também, que ocorria um decréscimo gradual do ABA "livre" endógeno nas sementes durante a maturação. Quando as sementes foram removidas da planta mãe, ou embebidas em água destilada observaram um drástico aumento no catabolismo

do ABA resultando em um rápido desaparecimento do ABA "livre". Com os resultados obtidos, estes autores sugeriram que quando o nível de ABA cai abaixo de um valor crítico, as sementes são capazes de germinar. Pode-se então supor, que o ABA endógeno encontrado em Dalbergia no início da embebição, está apenas controlando o processo de germinação, já que foi demonstrado por MONTEIRO et al. (1988b) que o nível do ABA endógeno diminui, chegando a quase zero, após as primeiras 24 horas de embebição das sementes.

Apesar de não se ter observado efeito do AIA promovendo o alongamento do hipocótilo de plântulas intactas de Dalbergia, testou-se o papel deste regulador em secções de hipocótilo e a possível interação do GA₃ na biossíntese do AIA. Os resultados mostraram que os segmentos de hipocótilo, diferentemente de hipocótilos intactos, são sensíveis à aplicação exógena de AIA, que promove o alongamento celular. A maior sensibilidade das secções ao AIA sugere que a ausência de meristema, fonte endógena deste hormônio, pode ser um fator importante quando se aplica exogenamente este regulador. Os resultados mostraram também, que existe uma possível interação entre o GA₃ e o AIA.

Recentemente, McQUEEN-MASON & HAMILTON (1989) estudando a biossíntese do AIA a partir do D-triptofano, a nível das organelas (plastídeos) onde ocorrem as reações dessa via metabólica, verificaram que o

D-triptofano é um substrato muito mais importante do que o L-triptofano para a biossíntese do AIA. TSURUSAKI et al. (1990) verificaram que a aplicação exógena de D-triptofano é mais efetiva que a de L-triptofano na indução do alongamento de segmentos de coleoptile de duas linhagens de cevada, sendo uma normal (Hordeum vulgare L. cv. Akashinriki) e uma semi-anã com baixo nível endógeno de AIA. Os resultados obtidos no presente trabalho com segmentos de hipocótilo, estão de acordo com estas informações da literatura e foram muito semelhantes aqueles obtidos por LAW (1987) com segmentos de caule de Pisum sativum. Este autor observou promoção do alongamento celular na presença de AIA e de seus precursores, exceto pelo L-triptofano, o qual necessita de adição de GA₃ para induzir o crescimento. Esse autor mostrou também que a atividade da triptofano racemase, enzima que converte L em D-triptofano aumentou após aplicações de GA₃. Sugeriu então que, giberelinas aumentam a biossíntese do AIA através do controle da conversão do L em D-triptofano que é então convertido em AIA. Para que a proposta de LAW (1987) possa ser sugerida para segmentos de hipocótilo de Dalbergia miscolobium estudos complementares serão necessários. Nestes estudos as taxas endógenas de L e D-triptofano deverão ser determinadas, e uma quantificação, que determine a contribuição relativa desses isômeros e do GA₃ para o "pool" de AIA, deverá ser realizada.

V - RESUMO

O lento alongamento da parte aérea de Dalbergia, característico de plântula de cerrado, em relação ao da raiz é mensurável desde o 10º dia após a embebição. Com o objetivo de se avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento neste processo do alongamento do eixo de Dalbergia miscolobium, este trabalho foi desenvolvido numa sequência de etapas em que se estudou o alongamento das diferentes regiões da plântula intacta e de segmentos de hipocótilo submetidos a diferentes reguladores de crescimento. O AIA inibe o alongamento e o peso seco do eixo das plântulas somente em altas concentrações. Parece que este efeito não está relacionado com a liberação de etileno pois este fitormônio afeta, principalmente o alongamento da raiz, inibindo-o. O GA₃ em altas concentrações promove o alongamento da parte aérea, principalmente do hipocótilo e altera a taxa de crescimento parte aérea / raiz. CCC e AMO - 1618 não são específicos na inibição do alongamento do eixo enquanto que o Tetcyclacis promove sua inibição. Aplicações de GA₃ são capazes de reverter este efeito no alongamento do hipocótilo, tanto ao nível macroscópico como ao nível celular. Apesar de aplicações de íons potássio promoverem o alongamento do hipocótilo, este efeito não é sinérgico com o causado pelo GA₃. O ABA inibe o alongamento do eixo em baixas concentrações, inibindo inclusive o processo de

germinação, quando concentrações mais altas são aplicadas às plantas. Assim, parece que este regulador está envolvido mais efetivamente no controle da germinação do que no do alongamento do eixo. O alongamento de células de segmentos do hipocótilo de Dalbergia é promovido por AIA, D-triptofano, L-triptofano+GA₃ e D-triptofano+GA₃. Talvez o GA₃ atue no controle da biossíntese do AIA em segmentos do hipocótilo de Dalbergia por meio da promoção da conversão de L-triptofano para D-triptofano.

VI - BIBLIOGRAFIA

ARASAKI, F.R. 1988. Relação entre parte aérea e sistema radicular de Kilmeyera coriacea. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

ARASAKI, F.R. e FELIPPE, G.M. 1987. Germinação de Dalbergia violacea, uma espécie dos cerrados. Rev. Brasil. Biol., 47 (4): 457-63

BOWLES, D.J. e NORTHGOTE, D.H. 1974. The amounts and rates of export of polysaccharides found within the membrane system of maize root cells. Biochem J. 142: 139-44

BURG, S.P. e BURG, E.A. 1968. Ethylene formation in pea seedlings: its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. Plant Physiol 43: 1069-74

CATHEY, H.M. 1959. Effects of gibberellin & AMO-1618 on growth & flowering of Chrysanthemum morifolium on short photoperiods. Pp. 365-71. In: Photoperiodism & related phenomena in plants & animals, R.B. Withrow, ed. AAAS, Washington, D.C.

CLELAND, R.E. 1977. The control of cell enlargement. In: Integration of activity in the higher plant, pp. 101-15, Jennings, D.H., ed. Cambridge Press, Cambridge.

CLELAND, R.E. 1987. Auxin and Cell Elongation. In: "Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development". (P.J. Davies, ed.), Martins Nyhoff Publishers, U.K. - pp. 132-48.

CONRAD, H.M. e SALTMAN, P. 1961. Interaction of gibberellic acids & allyl trimethylammonium bromide upon growth of *Ulothrix*. Plant Physiol 36: 685-7.

COONEY, T.P. 1989. Studies on the biosynthesis of indole-3-acetic in tomato shoots. Ph. D. thesis, Auckland University, Auckland, Australian, 116 pp.

CROZIER, A., KUO, C.C., DURLEY, R.C. e PHARIS, R.P. 1970. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant assays. Can. J. Bot. 48: 867-77.

DAVIES, P.J. 1987. Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Martins Nyhoff Publishers, U.K.

DIONELLO, S.B. 1978. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de Kielmeyera coriacea Mart.. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

99.
DOWNS, R.J. e CATHEY, H.M. 1960. Effects of light, gibberellin & a quaternary ammonium compound on the growth of dark-grow red kidney beans. Botan. Gaz. 121: 233-37.

DURLEY, R.C., BEWLEY, J.D., RAILTON, I.D. e PHARIS, R.P. 1976. Effects of light abscisic acid, and 6N-benzyladenine on the metabolism of [³H]-gibberelin A₄ in seeds and seedling of lettuce. cv. Grand Rapids. Plant Physiol. 57: 699-703.

EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. Bot. Rev. 38 (2): 201-341.

EVANS, M.L. 1985. The action of auxin on plant cell elongation. Critical Rev. Plant Sci. 2:317-65.

GARDINER, M. e CHRISPEELS, M.J. 1975. Involvement of the Golgi apparatus in the synthesis and secretion of hydroxyproline - rich cell wall glyco-proteins. Plant Physiol. 55: 536-41.

GURUPRASAD, A. e GURUPRASAD, K.N. 1988. Interaction of potassium ions and gibberellin in the control of hypocotyl growth in Amaranthus caudatus. Physiol. Plant 74: 154-8.

100.

GURUPRASAD, K.N. e LALORAYA, M.M. 1980a.
Dissimilarity in the inhibition of betacyanin synthesis
caused by gibberellic acid and abscisic acid. Biochem.
Physiol. Pflanz. : 269-77.

GURUPRASAD, K.N. e LALORAYA, M.M. 1980b. Effect of
pigment precursors on the inhibition of anthocyanin
biosynthesis by GA and ABA. Plant Sci. Lett. 19:
73-9.

HAGER, A., MENZEL, H. e KRAUSS, A. 1971. Versuche und
hypothese zur primarwirkung des auxins beim
Streckungswachstum. Planta 100: 47-75.

HALL, J.L., FLOWERS, T.J. e ROBERTS, R.M. 1981 .
Plant Cell Structure and Metabolism Cap. 10: Cell Wall
Longman Group Limited, New York, pp. 430-72.

JINDAL, K.K. e HEMBERG, T. 1976. Influence of
gibberellic acid on growth and endogenous auxin level in
epicotyl and hypocotyl tissues of normal and dwarf bean
plants. Physiol. Plant. 38: 78-82.

JOHANSEN, D.A. 1940. Plant microtechnique. New
York, Mc Graw, 523 pp.

JOHANSEN, L.G., ODEN, P.C e JUNTILLA, O. 1986.
Abscisic acid and cessation of apical growth in Salix
petandra. Physiol. Plant. 66: 409-12.

JONES, R.L. 1983. The role of gibberellins in plants
CRC. Critical Rev. Plant Sci.: 23-47.

JONES, R.L. e MOLL, C. 1983. Gibberelin-induced
growth in excised lettuce hypocotyls. In: The
Biochemistry and Physiology of Gibberelins Vo. 2, (A.
CROZIER, ed.), Praeger, USA, pp. 95-128.

KAMISAKA, S. 1973. Requiriments of cotyledons for
gibberellic acid-induced hypocotyl elongation in lettuce
seedlings. Isolation of the cotyledon factor active in
enhancing the effect of gibberellic acid. Plant Cell
Physiol., 14, 747.

KAZAMA, H. e KATSUMI, M. 1973. Auxin gibberellin
relationships in their effects on hypocotyl elongation
of light-grown cucumber seedlings. Responses of sections
to auxin, gibberellin and sucrose. Plant And Cell
Physiol. 14: 449-58.

KURAIISHI, S. e MUIR, R.M. 1962. Increase in
diffusible auxin after treatment with gibberellin -
Science 137: 760-1.

LATICAN, B.P. e MUIR, R.M. 1969. Auxin physiology of
dwarfism in pea. Physiol. Plantarum 22: 412-23.

LAW, D. 1987. Gibberellin-enhanced indole-3-acetic acid biosynthesis: D-trip. as the precursor of indole-3-acetic acid. Physiol. Plantarum 70: 626-32.

LAW, D.M. e HAMILTON, R.H. 1984. Effects of Gibberellic Acid on Endogenous Indole-3-Acetic Acid and Indoleacetyl Apartic Acid Levels in a Dwarf Pea. Plant Physiol. 75: 255-6.

LOCKHART, J.A. 1962. Kinetic studies of certain anti-gibberellins. Plant Physiol. , 759-64.

MARTH, P.C., PRESTON Jr, W.J. e MITCHELL J.W. 1953. Growth controlling effects of some quaternary ammonium compounds on various species of plants. Botan. Gaz. . 115: 200-4.

McQUEEN-MASON, S.J. e HAMILTON, R.H. 1989. The biosynthesis of indole-3-acetic from D-tryptophan in Alaska pea plastids. Plant Cell Physiol. 30 (7): 999-1005.

MEGHA, B.M. e LALORAYA, M.M. 1977. Effects of abscisic acid on growth, IAA oxidase, peroxidase and ascorbate oxidizing systems in Trigonella foenum graecum L. Biochem. Physiol. Pflanz. : 269-77.

MONTEIRO, A.M., CROZIER, A. e SANDBERG, G. 1988a.
The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid
in germinating seedes and seedlings of Dalbergia
dolichopetala. Planta 174: 561-8.

MONTEIRO, A.M., SANDBERG, G. e CROZIER, A. 1987.
Detection of abscisic acid, indole-3-acetic and
indole-3-ethanol in seeds of Dalbergia
dolichopetala. Phytochemistry 26: 327-8.

MONTEIRO, A.M., SANDBERG, G. e CROZIER, A. 1988b.
Endogenous hormones, germination and early seedling
growth of Dalbergia dolichopetala. J. Plant
Physiol. 132: 762-5.

MONTEIRO, A.M., TURBULL, C. e CROZIER, A. 1985. As
giberelinas e sua função no alongamento do eixo
caulinar. Revta. brasil. Bot. 8: 241-64.

ONCKELEN, H.V., CAUSBERGS, R., HOREMANS, S. e GREFF,
J.A 1980. Metabolism of abscisic acid in developing
seeds of Phaseolus vulgaris L. and its correlation
to germination and α -amilase activity. J. Exp.
Bot. 31: 913-20.

PAULL, R.E. e JONES, R.L. 1975. Studies on the
secretion of maize root-cap slime. III. Histochemical
and autoeadiografic localization of incorporated fucose.
Planta 127: 97-110.

PENNY, P. e PENNY, D. 1978. Rapid responses to phytohormones. In: Phytohormones and related compounds, Vol. II, pp. 537-97, Letham, D.S., Goodwin, P.B., Higgins, T.J.V., eds. Elsevier, Amsterdam.

POGGIANI, F. 1971. Estudo do crescimento e da atividade da AIA-oxidase em algumas espécies do cerrado. In: III Simpósio sobre o cerrado. Editora Edgard Blucher e Editora da Universidade de São Paulo. 201-11 pp.

PURVES, W.K. 1966. Monovalent cations and growth regulation. I. Growth responses in cucumber hypocotyl segments. Plant Physiol. 41: 230-3.

RADEMACHER, W., JUNG, J., HILDEBRANDT, E. e GRAEBE, J.E. 1983. Influence of the bioregulator tetcyclacis (BAS 106...W) on gibberellin biosynthesis and the hormonal status of plants. I.- Proceedings of the Tenth Annual Meeting of the Plant Growth Regulator Society of America (1983).

RAY, P.M. 1977. Auxin-binding sites of amize coleoptile are localized on membranes of the endoplasmic reticulum. Plant Physiol. 59: 594-9.

RAY, S.D., GURUPRASAD, K.N. e LALORAYA, M.M. 1980. Antagonistic action of phenolic compounds on abscisic acid-induced inhibition of hypocotyl growth. J. Exp. Bot. 31: 1651-6.

REID, D.M. e CROZIER, A. 1970. CCC-induced increase of gibberellin levels in pea seedlings. Planta (Berl.) 94: 95-106.

RIZZINI, C.T. 1977. Tratado de Fitogeografia do Brasil. Vol. 2. Aspectos sociológicos e florísticos. Editora da Universidade de São Paulo.

RIZZINI, C.T. e HERINGER, E.P. 1962. Studies on the underground organs of trees and shrubs from some southern Brazilian savannas. Anais Acad. Brasil. Ciênc., 34: 235-47.

SACHS, R.M., LANG, A., BRETZ, C.F. e ROACH, J. 1960. Shoot histogenesis: Subapical meristematic activity in a caulescent plant & the action of gibberellic acid & AMO-1618. Am. J. Botany 47: 260-6.

SCHNEIDER, E.A., GIBSON, R.A. e WIGHTMAN, F. 1972. Biosynthesis of auxins. Pathways of auxin biosynthesis in shoots of higher plants. In: Plant Growth Substances 1970. Ed. D. J. Carr, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York, 1972, pp. 82-90.

SCHNEIDER, E.A. e WIGHTMAN, F. 1974. Metabolism of auxin in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 487-513.

SEMBER, G., GROSS, D., LIEBISCH, H.W. e SCHNEIDER, G.
1980. Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones (J. MacMillan, Ed.). In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Volume 9, pp. 281-390.

SHECHTER, I. e WEST, C.A. 1969. Biosynthesis of gibberellins. IV . Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranyl-geranyl pyrophosphate. J. Biol. Chem. 3200-9.

SHERWIN, J.E. e PURVES, W.K. 1969. Tryptophan as an auxin precursor in cucumber seedlings. Plant Physiol. 44: 1303-9.

SHIBATA, K., KUBOTA, T. e KAMISAKA, S. 1974. Isolation and chemical identification of a lettuce cotyledon factor, a synergist of the gibberellin action in inducing lettuce hypocotyl elongation. Plant Cell Physiol. 15: 191.

SNEDECOR, G.W. 1962. Statistical Methods. Iowa State University Press, Iowa.

STEVENSON, T.T., CLELAND, R.E. 1981. Osmoregulation in the Avena coleoptile in relation to growth. Plant Physiol. 67: 749-53.

STUART, D.A. e JONES, R.L. 1978. The role of cation and anion uptake in salt-stimulated elongation of lettuce hypocotyl sections. Plant Physiol. 61: 180-3.

TANIMOTO, E. 1988. Gibberellin Regulation of Root Growth with Change in Galactose Content of Cell Walls in Pisum sativum. Plant Cell Physiol. 29(2): 269-80.

TOLBERT, N.E. 1960. (2-chloroethyl) trimethyl ammonium chloride & related compounds as plant growth substances. I . Chemical structure & bioassay. J. Biol. Chem. 235: 475-79.

TSURUSAKI, K., WATANABE, S., SAKURAI, N. e KURAISHI, S., 1990. Conversion of D-tryptophan to indole-3-acetic acid in coleoptiles of a normal and a semi-dwarf barley (Hordeum vulgare) strain. Physiol. Plant 79: 221-5.

VALDOVINOS, J.G. e SASTRY, K.S. 1968. The effect of gibberellin on tryptophan conversion and elongation of the Avena coleoptile. Physiol. Plantarum 21: 1280-6.

VIDAL, B.C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. Cell Mol. Biol., 22: 45-64.

WEIBEL, E.R. 1963. Principles and methods for morfometric studies of the lung and other organs. Lab. Invest. 12: 131-55.

WIRVILLE, J.W. e MITCHELL, J.W. 1950. - New plant growth inhibiting compounds. Botan. Gaz. 111: 491-4.

WITTWER, S.H. e TOLBERT, N.E. 1960. 2-Chloroethyl trimethyl ammonium chloride & related compounds as plant growth substances. V . Growth, flowering & fruiting responses as related to those induces by auxin & gibberellin. Plant. Physiol. 35: 871-7.

ZEEVAART, J.A.D. 1985. Inhibition of stem growth and gibberellin production in Agrostemma githago L. by the growth retardant tetcyclacis. Planta 166: 276-9.