

"FLORAÇÃO EM Phaseolus vulgaris L."



ANA MARIA MAGALHÃES ANDRADE LAGÔA

Este exemplar corresponde à redação final da
Tese defendida pela candidata Ana Maria Magalhães
Andrade Lagôa e aprovada pela Comissão Julgadora
mf. Fátima D. Pereira

"Floração em Phaseolus vulgaris L."

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

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

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria de Fátima Aleixo Pereira, orientadora deste trabalho, pela confiança e incentivo desde o início de minha formação científica.

Ao Dr. Ivany F. M. Válio, ao Dr. Ladaslav Sodek e à Dra. Ana Maria Bacellar Monteiro, pelas sugestões dadas no decorrer deste trabalho e, em especial, por ocasião da pré-banca.

Ao Dr. Alan Crozier pelas análises realizadas na Universidade de Glásgow e pelo auxílio na discussão dos resultados.

À Sra. Rita Helena Buso Jacon, do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio técnico no uso do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Fundação de Amparo à Pesquisa e à Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos, pelo apoio e incentivos dedicados.

ÍNDICE GERAL

	Página
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	10
II - 1.Material Biológico	10
II - 2.Germinação e Crescimento	10
II - 3.Análise dos ápices	10
II - 4.Remoção de órgãos	12
II - 5.Aplicação de substâncias de crescimento	13
II - 6.Extração e dosagem de proteínas solúveis	14
II - 7.Extração e dosagem de açúcares solúveis	15
II - 8.Extração, dosagem e identificação de substâncias fenólicas	16
II -8.1.Extração	16
II - 8.2.Quantificação de substâncias fenólicas	17
II - 8.3.Caracterização de substâncias fenólicas	17
II - 8.4.Atividade das substâncias fenólicas	18
II - 9.Extração e análise de AIA e seus metabolitos	18
II - 9.1.Aplicação de AIA radioativo	19
II - 9.2.Extração e fracionamento	19
II - 9.3.Cromatografia líquida de alta precisão	20
II - 10.Análise estatística dos resultados	20
III - RESULTADOS	22
III -1.Experimentos preliminares	22

III -1.1.Efeito de luz na iniciação floral .	22
III -1.2.Efeito de solução nutritiva	22
III - 2.Efeito da remoção de órgãos	22
III - 3.Efeito de substâncias de crescimento	33
III - 5.Conteúdo de substâncias fenólicas	44
III -6.Metabolismo de AIA	56
III - 7.Conteúdo de proteínas e carboidratos	63
III - 8.Análise morfológica de ápices	66
IV - DISCUSSÃO	70
IV - 1.Ontogênese dos ápices florais	83
V - RESUMO	85
VI - BIBLIOGRAFIA	88

I - INTRODUÇÃO

O estudo da floração é de grande importância por ser o primeiro passo para a reprodução sexuada nas plantas, tendo sido feitas várias investigações visando principalmente o conhecimento de como acontece a indução floral.

Desde o começo do século, importantes descobertas foram feitas, particularmente envolvendo o fotoperiodismo e a vernalização, sendo que a maior parte das pesquisas sobre floração, envolvem, até hoje, este tipo de plantas (EVANS, 1969; SCHWABE, 1971; VAN DE POL, 1972; ZEEVAART, 1976; SALISBURY, 1981).

Antes da II^o Guerra Mundial, levantou-se a hipótese da existência de um hormônio responsável pela floração, o "florigeno". Este conceito foi amplamente difundido e aceito como uma teoria para o controle da iniciação floral (CHAILAKHYAN, 1968). Outras hipóteses surgiram sobre a existência de substâncias indutoras da floração como por exemplo o sistema antesina-giberelina (CHAILAKHYAN, 1975). Porém não se conseguiu isolar ou identificar um hormônio específico para a floração, não se tendo ainda idéia da sua natureza química. Com a introdução de técnicas mais refinadas de investigação, tornou-se claro que o processo da floração é muito complexo, envolvendo vários passos interrelacionados, com influências de fatores tanto de origem externa como interna. Desta forma, fica difícil

acreditar que um só hormônio seria responsável pela iniciação floral (BERNIER *et al.*, 1981)

CHARLES-EDWARDS (1983), propôs um modelo para a floração baseado em substâncias que ocorrem normalmente em plantas, que não são específicas para este processo.

Quando o ápice recebe o estímulo floral, iniciam-se alterações morfológicas para a produção de órgãos florais. Para ocorrer a iniciação floral no meristema, este primeiramente se alarga, existindo trabalhos que mostram uma relação do tamanho do ápice e o início da formação de uma inflorescência (HORRIDGE & COCKSHULL, 1979). Ocorre uma profunda estimulação da taxa de divisão celular nas zonas periféricas e centrais do meristema apical (FRANCIS & LYNDON, 1979). Em muitos casos, ondas mitóticas se tornam sincronizadas, sendo detectadas por um aumento da taxa de síntese de DNA. Em Sinapis, duas ondas mitóticas foram detectadas durante a transição floral: uma associada com a sincronização e a outra com a iniciação floral (ZEEVAART, 1962; FRANCIS, 1981).

Em certos genes envolvidos com a floração ocorre uma de-repressão, levando à formação de novos RNAs mensageiros e, conseqüentemente de novas proteínas. Estes estudos foram feitos com a aplicação de antibióticos específicos na inibição de RNA e de proteínas e também, por observações histoquímicas no ápice (BERNIER, 1971). Foi demonstrado que mudanças na composição protéica do meristema são essenciais para a transição floral, porém não se sabe o controle destas mudanças. Outro fator é o aumento da atividade de várias enzimas hidrolíticas e possivelmente de certas seqüências de DNA, alterando as

propriedades da membrana (BONNER & ZEEVAART, 1962; MITRA & SEN, 1966; BERNIER et al., 1981).

Um fator importante para a iniciação floral é a modificação do nível de carboidratos ou do seu metabolismo nas regiões meristemáticas. Estas transformações podem fazer parte de um mecanismo de disparo para o desenvolvimento reprodutivo (HAVELANGE & BERNIER, 1983; BODSON, 1984). Em observações dos teores de carboidratos solúveis e amido nas folhas e gemas de plantas de Sinapis alba em transição da fase vegetativa para reprodutiva, BODSON (1977) sugeriu poder existir uma correlação entre estes compostos e a floração).

Em um grande número de espécies, a floração ocorre em um determinado fotoperíodo ou após um período de vernalização. No entanto, em muitas outras espécies, a floração parece ser determinada, primariamente, por alguns mecanismos internos. Esta transição parece ser mais um fenômeno geral na planta, desde que ocorrem mudanças progressivas durante o desenvolvimento, como diferenças morfológicas sucessivas nos órgãos. Como exemplo, as mudanças na forma e no tamanho das folhas. Estas mudanças podem ser afetadas por fatores ambientais, mas não dependem deste fatores (WAREING & PHILLIPS, 1982). Em plantas indiferentes ao fotoperíodo, sugere-se que a idade da planta controlaria primeiramente a iniciação floral (AKSENOVA et al., 1980). Porém pouco se sabe a respeito do tipo de indução que levaria à iniciação floral em uma determinada idade. LANG (1984), sugere que plantas não fotoperiódicas já possuem uma substância promotora para a floração,

independentemente do tratamento fotoperiódico. Esta substância pode ser translocada, através de enxertia, para plantas da mesma espécie, do mesmo gênero, da mesma família ou para plantas taxonomicamente distantes e ainda para plantas de diferente comportamento fotoperiódico, sendo que a única limitação é o enxerto ser bem sucedido.

Uma condição básica e essencial para que ocorram os processos normais de desenvolvimento de uma planta, é que todos os seus órgãos estejam em ativa interação (AKSENOVA et al., 1980). Segundo DÔSTAL (1967), o crescimento correlativo é o resultado das interações entre as várias partes da planta. Estas interações aumentam conforme a planta se desenvolve e os novos órgãos são formados. Assim, todos os órgãos interagindo governam o desenvolvimento de novos órgãos e estes, por sua vez, formam novos fatores que irão influenciar outra parte da planta.

A maior parte dos estudos realizados para o esclarecimento da influência de diferentes órgãos na iniciação floral, foram feitos com plantas fotoperiódicas. Nestas plantas, a fotoindução ocorre principalmente nas folhas, que com influência dos diferentes órgãos, transformam e transportam este estímulo para os meristemas caulinares onde ocorre a iniciação floral (VINCE-PRUE, 1975; BERNIER et al., 1981).

Entre os mecanismos internos que controlam a floração em plantas não fotoperiódicas e indiferentes à vernalização, estão as substâncias de crescimento. A ação dos hormônios de crescimento na floração, apesar de bastante estudada, não está totalmente elucidada. Esta ação varia de espécie para espécie,

sendo então difícil de se estabelecer padrões gerais para cada substância de crescimento.

As auxinas parecem implicadas na transição floral. Sugere-se que elas tenham ação em alguns eventos da evocação, como por exemplo: iniciação precoce das gemas axilares e alterações na filotaxia, podendo também estar envolvidas na proliferação celular. A ação da auxina é grandemente dependente de vários fatores que podem ter influência positiva ou inibitória na floração (BERNIER et al., 1981). Em plantas de dias curtos, as auxinas frequentemente têm efeito inibitório, como é o caso de Pharbitis e Xanthium. Sugere-se que este efeito seja por interferência na translocação de indutores de floração para o ápice (SALISBURY, 1955; OGAWA & ZEEVAART, 1967). Em plantas de dias longos, a aplicação de auxina pode aumentar a resposta para floração como ocorre em Lolium. O modo de ação neste casos ainda não foi elucidado (LIVERMAN & LANG, 1956; LANG, 1965). No entanto, a aplicação desta substância de crescimento dá uma grande variação de respostas, como é o caso de Cestrum nocturnum e Kalanchoe rotundifolia, duas espécies de dias longos-curtos. Em condições indutoras, as auxinas inibem a floração na primeira espécie e promovem a floração na segunda espécie (SILVA & RESENDE, 1956; SACHS, 1969). Em algumas espécies a ação de auxinas é dependente da concentração usada, sendo promotora em baixas concentrações ou inibitória em altas doses, como é o caso de soja e de Hyoscyamus. A inibição em altas concentrações, geralmente, não é devida a uma ação específica na floração, mas a uma inibição geral do crescimento (BERNIER,

et al., 1981). HOAD et al. (1987) discutem que auxinas em altas concentrações no ápice vegetativo de algumas espécies, inibem a floração e que necessitaria de uma diminuição destes níveis endógenos de auxina, ou por ação de peroxidases ou quebra da dominância apical, para que este ápice se diferencie em floral.

Muitas evidências mostram que as giberelinas estão envolvidas na transição floral em muitas espécies. Encontram-se na bibliografia exemplos tanto de promoção como de inibição da floração, pela ação deste grupo de substâncias. Elas podem promover a iniciação floral de plantas de dias longos como é o caso de Chrysanthemum morifolium (PHARIS, 1972), ou pode inibi-la, como é o caso de Lemna gibba (CLELAND & BRIGGS, 1969). As giberelinas também podem promover a iniciação floral em plantas de dias curtos, como é o caso de Crepis parviflora (MICHNIEWIEZ & LANG, 1962), ou inibi-la, como em Lemna paucicostata (GRUPTA & MAHESHWARI, 1970). Porém o efeito mais geral das giberelinas, é a promoção da floração, em condições não indutoras, em plantas de dias longos. Sugere-se que a ação deste grupo de substâncias, seja dependente de vários fatores da planta, como presença e ausência de certos genes e o estágio de desenvolvimento. Em muitas espécies, apesar da capacidade das giberelinas induzirem a floração, elas podem causar várias mudanças associadas com a transição floral: liberação precoce dos meristemas axilares da dominância apical, mudanças na filotaxia ou na forma das folhas, etc (SUGE, 1966; COHEN, 1976; GUARDIOLA, 1982; KAREGE, 1982).

Conhece-se desde o final do século passado o efeito do

etileno na indução floral de abacaxi (Ananas comosus) (ABELES, 1973). Mais tarde observou-se que auxinas e análogos de etileno, como propileno, tinham o mesmo efeito (DE FOSSARD, 1973). Um conhecido liberador de etileno, o ácido 2- cloroetilfosfônico (CEPA), ou mesmo o gás etileno, promoveu a iniciação floral em plantas não fotoperiódicas como por exemplo, em alguns membros das Bromeliaceae (BURG & BURG, 1966; COOKE & RANDALL, 1968).

As citocininas podem estar envolvidas no controle da iniciação floral. Podem ter um efeito promotor, como em Wolffia microscopica e Lemna paucicostata (VENKATARAMAN, et al., 1970; GUPTA & MAHESHWARI, 1970). Este hormônio também pode inibir a floração como em Chrysanthemum (PHARIS, 1972). A ação das citocininas depende da concentração usada, do local de aplicação, da presença de outros reguladores de crescimento e dos níveis de carboidratos presentes. Seu papel pode ser o de controlar mitoses, pode estar associada com a sincronização da divisão celular e iniciação precoce dos meristemas axilares (BESNARD & WIBAUT, 1981; LEONARD, 1982).

O ácido abscísico parece não determinar a iniciação floral, mas sugere-se que pode participar em algumas espécies e circunstâncias na transformação dos meristemas. Não existem evidências sobre seu papel na evocação. Em algumas espécies fotoperiódicas como Chenopodium rubrum, Pharbitis nil e Ribes nigrum, pode promover a floração (EL-ANTABLY & WAREING, 1966; KREKULE & KOHLI, 1981) ou inibir como em Sinapis alba e Kalanchoe blossfeldiana (SCHWABE, 1972; KINET et al., 1975).

Desde a década de 60, se têm evidências do envolvimento das substâncias fenólicas na floração. Um dos primeiros estudos com estas substâncias, foi realizado por PAULET (*in* BERNIER *et al.*, 1981) com Cichorium, quando se concluiu que o ácido p-cumárico e o ácido clorogênico têm ação promotora na floração, não se observando este efeito com o ácido caféico, ferúlico e chiquímico. Mais tarde, CLELAND & AJAMI (1974) observaram que a seiva contida em afídeos que visitam Xanthium em estágio floral ou vegetativo, contém substâncias ativas na floração de Lemna em condições não indutoras. Neste trabalho esta substância foi identificada como o ácido salicílico. KUMAR & NANDA (1981) observaram que a aplicação do ácido salicílico, tinha efeito promotor na floração de Impatiens balsamina. Os autores verificaram que a ação deste fenól é análoga à do ácido giberélico. Em Lemna paucicostata o efeito do ácido salicílico é dependente do fotoperíodo utilizado (CLELAND & TANAKA, 1981). Outros trabalhos com Lemnaceae demonstraram o efeito do ácido salicílico na floração (CLELAND *et al.*, 1982). O papel dos fenóis na evocação ainda não é claro. Acredita-se que por interferirem em processos metabólicos como por exemplo, na fosforilação oxidativa, seu efeito na floração seja de regulador energético (BERNIER *et al.*, 1981). Os fenóis também estão envolvidos no metabolismo de AIA, podendo desviar o curso deste processo bioquímico formando indóis decarboxilados (GRAMBOW & LANGENBECK-SCHWICH, 1983).

o objetivo deste trabalho é verificar as alterações ocorridas nos ápices de Phaseolus vulgaris L. cv Goiano Precoce.

quando da transição floral, bem como determinar quando ocorre esta transição. Pretende-se também determinar a época da indução floral, relacionando-a com possíveis alterações metabólicas nos ápices desta espécie. O cultivar em questão não é fotoperiódico nem responde a tratamentos de frio para floração, daí a importância deste estudo, uma vez que, pouco se sabe sobre a transição floral em espécies com estas características.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II - 1. Material Biológico

Foram utilizadas sementes de Phaseolus vulgaris L. cv. Goiano Precoce, fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

II - 2. Germinação e Crescimento

As sementes foram embebidas em papel de filtro enrolado e umedecido com água destilada. Estes rolos foram colocados em frascos com água destilada e deixados por 24 horas em câmaras de crescimento a 20°C. Após este período os tegumentos das sementes foram retirados e os tratamentos foram realizados.

Estas sementes foram transferidas para bandejas com vermiculite umedecida água destilada em câmaras de crescimento com luz contínua a 20°C.

II - 3. Análise dos ápices

Os ápices principais foram observados em microscópio estereoscópico com aumento de 40 vezes e determinados os estádios de desenvolvimento até a iniciação floral. Foi contado também, o número de primórdios de folhas trifolioladas formado até a transformação do ápice de vegetativo para floral.

Para melhor definição dos estádios de desenvolvimento foram

determinados também em microscópio de varredura, operado a 3 Kv. Secções de 2 mm de ápices de plantas com diferentes idades foram observadas em ME a fresco, isto é, sem nenhuma cobertura metálica, obtendo-se assim fotografias dos diferentes estádios de desenvolvimento (figura 1 e 2). Na figura 1-A (plantas com 3 dias), pode-se observar o domo apical e a presença de estípulas laterais que se diferenciam dos primórdios de folha trifoliolada por serem menos espessas. Na figura 1-B (plantas com 2 dias) nota-se, ao lado do domo, a formação do primórdios de folha trifoliolada (ift), com uma protuberância central (foliolo mediano) e uma protuberância lateral (um dos folíolos laterais). No lado oposto deste foliolo, pode-se observar o foliolo mediano (m) do 2º primórdio de folha trifoliolada, sendo que um dos folíolos laterais desta folha, está recoberto por uma estípula. Na figura 1-C, está representado o domo apical e em primeiro plano, a ponta do foliolo mediano de folha trifoliolada. Ápices com estas características, foram considerados em estágio vegetativo.

Na figura 2 estão representados os estádios considerados florais. Na figura 2-A, observa-se o domo central e na sua base, duas saliências opostas que são iniciações florais. Elas se diferenciam do primórdio de folha trifoliolada por serem arredondadas (plantas com 7 dias). Na figura 2-B, observa-se a sequência de desenvolvimento das iniciações florais, não se podendo mais distinguir o domo apical, pois estas iniciações atingem a forma e a dimensão do domo observado na figura 2-A (plantas com 9 dias). Nesta figura pode-se observar o

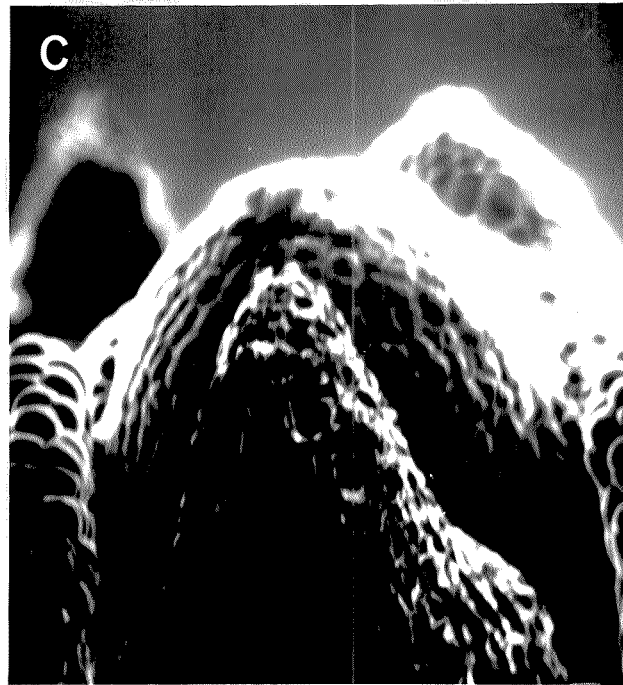
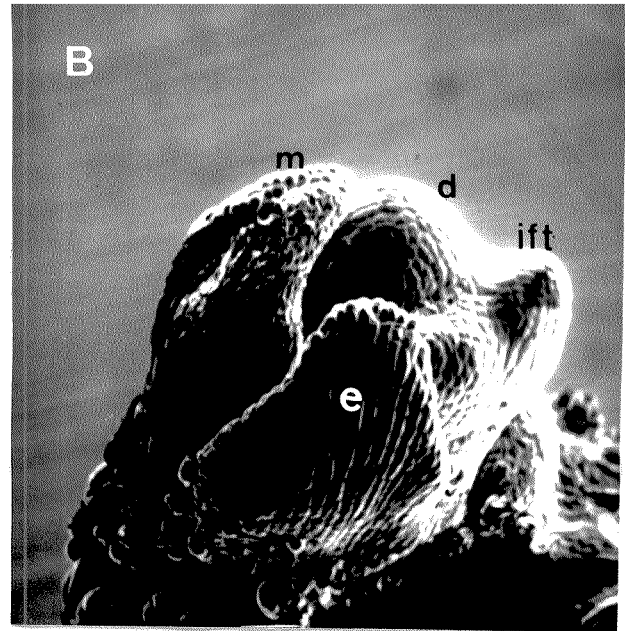
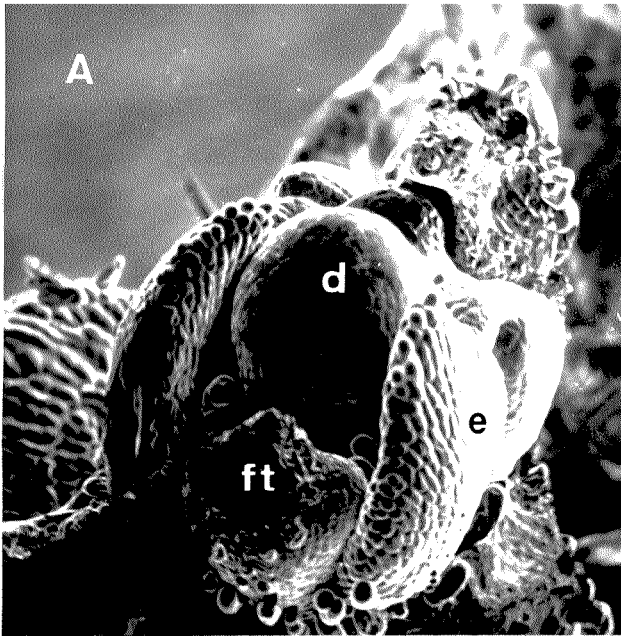


FIGURA 1- Fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura operado a 3kv, de ápices em estadio vegetativo.

A- aumento de 235 vezes (plantas com 3 dias);

B- aumento de 215 vezes (plantas com 2 dias);

C- aumento de 540 vezes (plantas com 2 dias)

d- domo apical

e- estípula

ft- primórdio de folha trifoliolada

m- foliolo mediano

ift- iniciação do primórdio de folha trifoliolada

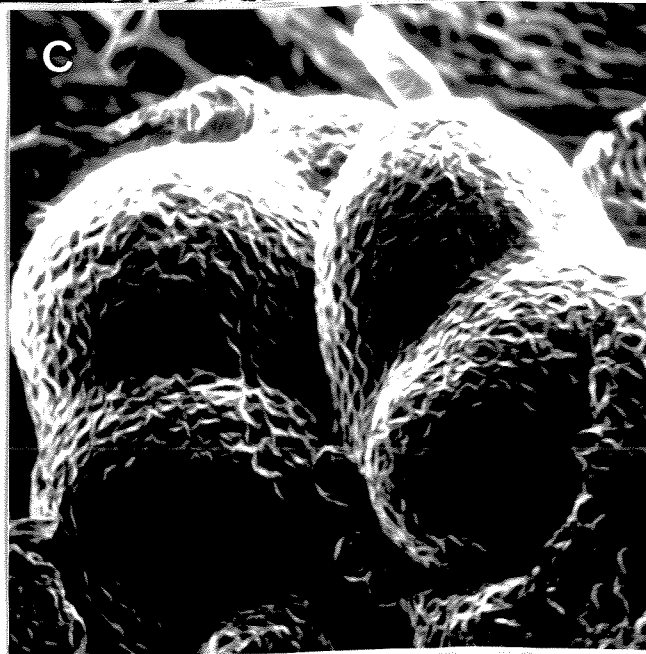
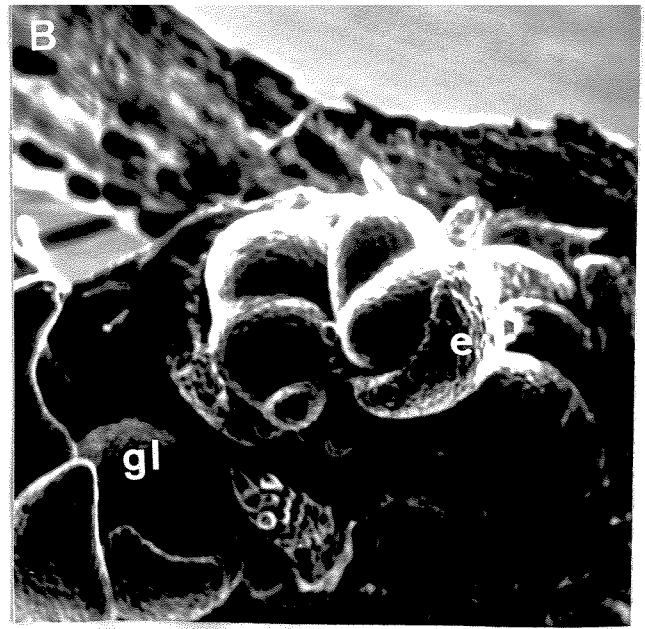
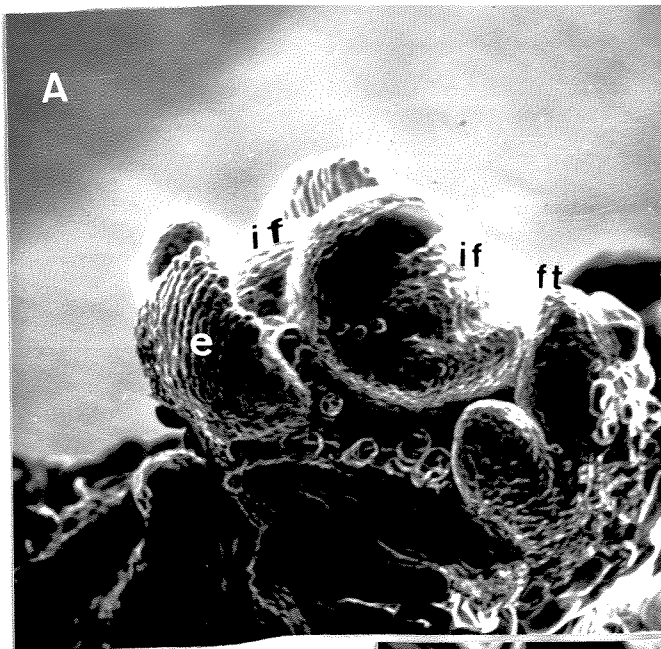


FIGURA 2- Fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, operado a 3kv, de ápices em estadio floral.

A- aumento de 240 vezes (plantas com 7 dias);

B- aumento de 210 vezes,es (plantas com 9 dias);

C- aumento de de 520 (plantas com 9 dias).

e- estípula

ft- primórdio de folha trifoliolada

if- iniciação floral

gl- gema lateral

desenvolvimento de uma gema lateral (gl) ainda em estágio vegetativo. Na figura 2-C, esta representado um aumento maior da figura 2-B.

Foram medidos por meio de transferidor, os ângulos formados entre o centro do domo apical e o centro do primórdio de folha ou flores, nas fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura.

A ântese foi verificada em plantas crescidas em luz contínua, a 20°C, sendo que um lote foi regado com água destilada e o outro com solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1938), a partir do 9° dia após a embebição. Nestas plantas foi contado o número de folhas trifolioladas expandidas por ocasião da primeira ântese.

II - 4. Remoção de órgãos

Nos experimentos onde foram retirados os cotilédones ou folhas primárias, a remoção foi realizada após 24 horas de embebição das sementes.

Testou-se também a remoção de primórdios de folhas trifolioladas que foram retiradas com auxílio de bisturi sob microscópio estereoscópico. Paralelamente em um lote de plântulas, provocou-se uma injúria na região apical, com o auxílio de bisturi e sob microscópio estereoscópico, com o cuidado de não se atingir o domo. Esta injúria foi realizada na região onde, no outro lote, foi removido o primórdio de folha trifoliolada.

Quando se testou o efeito da raiz principal na iniciação floral, plântulas após 4 dias da embebição das sementes, foram colocadas em vidros com capacidade de 50 ml com solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1938). A raiz principal foi cortada na região do colo, sendo que as novas raízes formadas, foram retiradas diariamente. Para a verificação do efeito das raízes adventícias após 24 horas de embebição, as sementes, foram colocadas em vermiculite, em câmaras de crescimento, e as raízes adventícias foram retiradas a partir do 4° dia da embebição.

II - 5. Aplicação de substâncias de crescimento

AS substâncias de crescimento foram aplicadas em plântulas com 3 dias após a embebição, com ou sem o primórdio da primeira folha trifoliolada, sendo também retirado um dos cotilédones e as duas folhas primárias. AS aplicações foram feitas na região apical, por meio de micropipeta de 10µl. Para garantir a permanência da gota aplicada no ápice, estes foram envolvidos por um pequeno chumaço de algodão. Estas plantas foram transferidas para bandejas com vermiculite umedecidas com água destilada e mantidas em câmaras de crescimento com luz contínua a 20°C.

AS substâncias de crescimento aplicadas foram: ácido indol 3 acético (AIA) em solução de 10^{-2} e 10^{-3} M; ácido salicílico em solução de 10^{-3} M; ácido caféico em solução de 10^{-3} M; ácido cumárico em solução de 10^{-3} M; ácido 2,3,5 triiodo benzóico (TIBA) em solução de 10^{-4} M; ácido giberélico (GA_3) em solução de

10^{-3} M; cinetina em solução de 10^{-3} M; ácido abscísico (ABA) em solução de 10^{-3} M e etrel em solução de 10^{-5} a 10^{-2} M.

II - 6. Extração e dosagem de proteínas solúveis

Foram realizadas extrações de proteínas de ápices de plantas com 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a embebição das sementes. Para isto, utilizaram-se os 2 mm apicais, sendo removidas as folhas primárias. O método de extração usado seguiu o descrito por BRADFORD (1976). Cerca de 50 mg de tecido em 5 ml de metanol, clorofórmio e água na proporção de 12:5:3 v/v (MCW), foram macerados em aparelho tipo Polytron acoplado a um ultrassonicador Kinemática. Em seguida este extrato foi centrifugado em temperatura ambiente por 5 minutos a 1400 g. O precipitado foi extraído 3 vezes com 1 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. A esta solução adicionaram-se 3 ml de ácido tricloroacético a 10%. Após a centrifugação por 5 minutos a 1400 g, separou-se o precipitado que foi ressuscendido com 1 ml de hidróxido de sódio a 0,1 N. Uma alíquota de 0,1 ml deste extrato foi adicionado a 5 ml de reagente.

O reagente foi preparado utilizando-se 100 mg de "Coomassie Brilliant Blue" G250 (Sigma) em 50 ml de etanol a 95% e 100 ml de ácido ortofosfórico a 85%. A esta solução adicionou-se água destilada até completar 1 litro.

Utilizou-se como padrão soroalbumina bovina-BSA (Sigma) nas concentrações de 1; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 mg/ml. Destas soluções retirou-se uma alíquota de 0,1 ml e adicionou-se a

5 ml de reagente.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm, cerca de 20 minutos depois de se ter colocado os padrões ou os extratos no reagente.

Tanto nos extratos como nos padrões, foram feitas 3 repetições para cada dia ou concentração.

II - 7. Extração e dosagem de açúcares solúveis totais

A extração de carboidratos e açúcares solúveis foi feita segundo adaptações dos métodos de SHANNON (1968), BIELESKI & TURNER (1966) e Mc CREADY *et al.* (1950). Cerca de 50 mg de ápices principais (2 mm apicais) de plantas de 3, 4 ou 7 dias após a embebição das sementes, foram macerados e homogeneizados em 4 ml de MCW, por meio de aparelho tipo Polytron acoplado a um ultrassonicador Kinemática. Esta solução foi centrifugada por 5 minutos, considerando-se o sobrenadante como extrato de açúcares solúveis em água. O extrato de carboidratos totais foi conseguido quando a solução foi homogeneizada e não centrifugada.

Nestes extratos foram adicionados 1 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água para a separação dos lipídeos e pigmentos, em funil de separação. Da fase aquosa superior, foi retirada uma alíquota de 0,1 ml que foi diluída em 0,9 ml de água destilada. A esta solução adicionou-se 2 ml de reagente de Antrona, segundo o método de YEMM & WILLIS (1954). Como padrão, para a leitura dos açúcares solúveis em água, utilizou-se solução de glicose

nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/ml. Para as leituras dos carboidratos totais, utilizou-se como padrão, solução de glicose nas concentrações de 80, 100, 120, 140, 160 e 200 µg/ml.

Para a preparação de reagente, utilizou-se 20 mg de Antrona (Sigma) adicionados a 0,5 ml de água destilada e 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 95%.

A solução final, isto é, reagente com padrão ou extrato, foi agitada e aquecida por 3 minutos a 100°C, em banho-maria. Foram feitas 3 repetições para cada extrato ou padrão.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm.

II - 8. Extração, dosagem e identificação de substâncias fenólicas

II - 8.1. Extração

As extrações de substâncias fenólicas realizadas, seguiram o método de SWAIN & HILLIS (1959) e HARBORNE (1974) com algumas modificações.

Cerca de 90 mg de ápices (2 mm apicais) de plantas com 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias após a embebição das sementes, foram colocados em 10 ml de etanol a 95%. Cada uma destas soluções foi colocada em uma balão de vidro acoplado a um condensador. O balão foi colocado em uma manta aquecedora, mantida a 70°C, durante 2 horas, conseguindo-se assim o extrato bruto, que continha as substâncias fenólicas. Após este período, deixou-

se o extrato esfriar, e o volume final foi reduzido para 2 ou 5 ml, por meio de evaporação a pressão reduzida, a 38°C, para a realização dos ensaios quantitativos.

II - 8.2. Quantificação de substâncias fenólicas

Nos ensaios para a quantificação de substâncias fenólicas, a um volume de 0,25 ml de extrato fenólico ou solução padrão, foram adicionados 3,25 ml de água destilada e 0,25 ml de reagente para fenóis "Folin Ciocalteu" (BDH Chemical). A solução foi agitada e depois de 3 minutos foram adicionado 0,5 ml de solução saturada de carbonato de sódio (A.O.A.C., 1955). Depois de uma hora, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 725 nm.

Foram feitas 3 repetições para cada idade e para cada concentração da solução padrão. Como padrão utilizaram-se soluções etanólicas de ácido salicílico nas concentrações de 1,62; 16,2; 162 e 1620 µg/ml.

II - 8.3. Caracterização de substâncias fenólicas

A caracterização de substâncias fenólicas foi feita por cromatografia de camada delgada em placas de vidro de 20 por 20 cm com celulose, com 0,3 mm de espessura.

Em alguns casos, o volume final de extrato foi reduzido para 1 ml, por meio de evaporador sob pressão reduzida, a 38°C. Uma alíquota de 250 µl deste extrato, foi aplicada na placa de celulose, que foi corrida bidimensionalmente, utilizando-

se 2 sistemas de solventes: butanol, ácido acético e água (6:1:2 v/v) na primeira direção e ácido acético 2% na segunda direção (SEIKEL, 1962; EGGER, 1969, MAZZAFERA, 1987). Foram usadas 2 placas para cada extrato. Após a secagem, as placas foram colocadas sob luz ultra violeta, quando as manchas observadas foram delimitadas. Estas manchas foram eluidas para a determinação do espectro de absorção. A celulose da placa na região das manchas em questão foi raspada e colocada em tubos de ensaio com 1ml de etanol 75%. A solução foi agitada e centrifugada a 352 g em temperatura ambiente, durante 5 minutos e o sobrenadante utilizado. Este processo foi repetido por 2 vezes. O sobrenadante foi colocado em evaporador rotatório a 38°C até secar e ressuspendido em 0,5 ml ou 0,25 ml de água destilada. O espectro de absorção dos eluatos foi realizado por meio de espectrofotômetro na faixa do ultra violeta.

II - 8.4. Atividade das substâncias fenólicas

Quando foi testada a atividade de eluatos fenólico na iniciação floral, aplicaram-se os mesmos em plântulas com 3 dias após a embebição das sementes, seguindo-se o método descrito para substâncias reguladoras de crescimento. As aplicações foram realizadas no início e no final do 3° dia. As observações da iniciação floral foram feitas no 8° dia após a embebição das sementes.

II - 9. Extração e análise de AIA e seus metabolitos

II - 9.1. Aplicação de AIA radioativo

50 plântulas com 2 ou 3 dias após a embebição das sementes, onde foi removido um dos cotilédones, foram postas para crescer em placas de Petri com 2 folhas de papel de filtro umedecido com água destilada. Em suas regiões apicais, foram aplicados com micropipeta, 5µl de solução em metanol e água 1:1 de ácido 3 indol acético marcado com Carbono 14 no Carbono 2' da cadeia lateral da molécula. A atividade específica do AIA radioativo era de 7×10^2 dpm.ng⁻¹. Depois de 6 horas da aplicação, foram feitos extratos destas plântulas.

II - 9.2. Extração e fracionamento

Após as 6 horas de incubação com o [2'-¹⁴C]AIA, as plântulas foram colocadas em 30 ml de metanol e 5 mM do antioxidante, ácido dietil-ditiocarbâmico (ERNSTSEN et al., 1987), seguindo-se o método de extração de auxinas descrito por SANDBERG et al. (in RIVIER & CROZIER, 1987). Os extratos metanólicos foram filtrados em flocc, o volume reduzido até secar em evaporador sob pressão reduzida a 37°C. O extrato foi ressuscendido em tampão fosfato pH 7,5 e esta solução foi fracionada 3 vezes com 100 ml de acetato de etila. A fração em acetato de etila foi reduzida até secar em evaporador sob pressão reduzida (37°C) (fração neutra). À fração aquosa foi adicionado polivinilpirrolidona (PVP) e após a adição procedeu-se à filtração. O pH do filtrado foi ajustado para 3 com ácido

sulfúrico 50%. Esta solução foi fracionada 3×30 ml com acetato de etila. A fração em acetato de etila foi reduzida até secar em evaporador sob baixa pressão a 37°C (fração ácida).

II - 9.3. Cromatografia líquida de alta precisão (HPLC)

O AIA e seus metabolitos presentes nas frações neutras e ácidas obtidas como descrito acima, foram analisados por (HPLC), tendo como detector um monitor de radioatividade. A coluna utilizada (Shandon) foi de ODS Hypersil 5 μm , com 250 mm de comprimento por 5 mm de diâmetro. Como solvente, utilizou-se um gradiente de metanol e água, variando de 20 a 60% de metanol em 25 minutos, sendo bombeado através da coluna a 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (bombas Altex 332). As amostras foram injetadas na coluna por uma válvula injetora Altex 210. O eluido da coluna era misturado com cintilador e analisado em monitor de radioatividade LKB 1208 Betacord (MONTEIRO et al., 1988). Estas análises foram realizadas pelo Dr. A. Crozier, na Universidade de Glasgow.

II - 10. Análise estatística dos resultados

Os valores de absorbância obtidos nos ensaios de proteínas, carboidratos e fenóis, foram relacionados com os dos padrões pelo cálculo de correlação e regressão. Nestes resultados foram considerados o peso inicial do tecido ou o número de ápices utilizados, bem como as diluições realizadas ao longo dos

processos de extração, sendo os dados expressos em relação a mg de tecido ou por ápice.

Todos os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste F, sendo calculada a diferença mínima significativa (DMS) a 5% pela teste Tukey, quando o F foi significativo (PIMENTEL-GOMES, 1984).

Nas tabelas, os valores seguidos pela mesma letra, não diferem entre si significativamente.

III - RESULTADOS

III - 1. Experimentos preliminares

III - 1.1. Efeito de luz na iniciação floral

Para verificar se a iniciação floral é afetada pela luz, testou-se o desenvolvimento de plantas tanto na luz como no escuro. Pelos resultados apresentados na tabela 1, verifica-se que não houve diferenças significativas tanto nos estádios de desenvolvimento como no número de primórdios de folhas trifolioladas, entre as plantas crescidas em escuro contínuo e plantas crescidas na luz. No 7° e 8° dias após a embebição, todas as plantas estavam em estágio floral.

III - 1.2. Efeito de solução nutritiva

Quando se verificou o efeito da aplicação de solução nutritiva na primeira ântese da inflorescência apical (tab.2), observou-se que o número de folhas trifolioladas expandidas foi maior nas plantas que receberam solução nutritiva do que nas plantas mantidas em água destilada. Porém, o dia em que ocorreu esta ântese foi o mesmo para os dois tratamentos.

III - 2. Efeito da remoção de órgãos

A partir dos resultados apresentados na tabela 3, observa-

TABELA 1 - Efeito do escuro e luz contínuos na iniciação floral de plantas de Phaseolus vulgaris L.. f-ápices em estágio floral.

dias	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdio de folhas trifolioladas	
	LUZ	ESCURO	LUZ	ESCURO
7°	f	f	3,4	3,2
8°	f	f	4,0	4,0

TABELA 2 - Efeito de solução nutritiva no número de folhas trifolioladas expandidas, por ocasião da primeira ântese da inflorescência apical em plantas de Phaseolus vulgaris L.

Plantas	1	2	3	4	5
Tratamento					
solução nutritiva	3	4	4	4	4
Água	1	1	1	1	1

se que a retirada de um dos cotilédones após 24 horas de embebição das sementes, não alterou a iniciação floral. Verifica-se também que não houve diferenças significativas no número de primórdios de folhas trifolioladas entre as plantas tratadas e as controle.

Na mesma ocasião verificou-se o efeito da remoção dos dois cotilédones na iniciação floral. Como resultado obteve-se uma deficiência geral no desenvolvimento das plantas em relação ao controle. Desta forma, a verificação de qualquer efeito na iniciação floral ficou comprometida.

Nos experimentos realizados para a verificação do efeito da remoção das folhas primárias na transição floral, não foram encontradas diferenças significativas entre as plantas tratadas e as controle, tanto nos estádios de desenvolvimento como no número de primórdios de folhas trifolioladas (tab.4).

Quando foram retiradas as folhas primárias em plantas com um cotilédone, verifica-se que não houve diferenças significativas entre as plantas controle (sem cotilédone), e as plantas tratadas (tab.5). Comparando-se estes dados com o controle apresentado na tabela 4 (plantas intactas), não se observam diferenças estatisticamente significativas.

A partir dos dados apresentados na tabela 6, verifica-se que a retirada das folhas primárias e do primórdio da primeira folha trifoliolada no 3º dia após a embebição, provocou um atraso de um dia na iniciação floral. Nota-se também um aumento estatisticamente significativo no número de folhas trifolioladas nas plantas tratadas, no último dia de observação.

TABELA 3 -Efeito da remoção de um cotilédone na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L..v-ápices em estágio vegetativo; f-ápices em estágio floral.

dias	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
7°	v	v	3,6	3,0
8°	f	f	4,0	4,0

TABELA 4 -Efeito da retirada das duas folhas primárias na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L. v-ápices em estágio vegetativo; f-ápices em estágio floral.

dias	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
5°	v	v	3,2	3,0

TABELA 5 - Efeito da remoção das duas folhas primárias na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L. com um cotilédone. v-ápices em estágio vegetativo; f-ápices em estágio floral.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
dias				
6°	v	v	3,0	3,0
7°	f	f	3,9	4,2

TABELA 6 - Efeito da remoção das folhas primárias e do primórdio da primeira folha trifoliolada, retirada no 3° dia após a embebição, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. v-ápices vegetativos; f- ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
dias				
6°	v	v	3,8a	3,4a
7°	f	v	3,8a	4,6a
8°	f	f	4,0a	5,0b

Nesta ocasião, em um lote de plantas sem folhas primárias, foi provocada uma injúria na região apical, próxima da primeira folha trifoliolada, simulando a injúria que teria sido causada pela remoção da folha trifoliolada, não se obtendo diferenças no desenvolvimento destes ápices em relação às plantas intactas (dados não apresentados).

Analisando-se os dados apresentados na tabela 7, verifica-se que a remoção das folhas primárias, de um dos cotilédones e da primeira folha trifoliolada, provocou um atraso de dois dias na iniciação floral. Observa-se também, que no 9° dia de análise, as plantas tratadas apresentaram um número de primórdios de folhas trifolioladas significativamente maior do que as controle.

Com base nos resultados apresentados na tabela 8, verifica-se que a remoção de um cotilédone e da primeira folha trifoliolada no 6° dia após a embebição, não afetou a transição floral, nem o número de primórdios de folhas trifolioladas em relação ao controle (plantas intactas).

Na tabela 9, observa-se que a remoção das folhas primárias e da primeira folha trifoliolada no 4°, 5° e 6° dias após a embebição, não afetou a iniciação floral, não alterando também o número de primórdios de folhas trifolioladas, quando se compara com as plantas controle (intactas). Nos dias anteriores ao 7° dia, em todos os tratamentos, os ápices estavam vegetativos e com igual número de primórdios de folha trifoliolada (dados não apresentados).

De acôrdo com os resultados apresentados na tabela 10,

TABELA 7 - Efeito da remoção das folhas primárias, um cotilédone e primeira folha trifoliolada, no 3° dia após a embebição, na iniciação floral de plantas de Phaseolus vulgaris. v-ápices vegetativos; f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
7°	f	v	3,8a	4,0a
8°	f	v	3,6a	4,2a
9°	f	f	4,0a	4,8b

TABELA 8 - Efeito da remoção no 6° dia após a embebição, de um cotilédone e da primeira folha trifoliolada na transição floral em plantas de Phaseolus vulgaris L. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
dias				
7°	f	f	4,0	4,0
10°	f	f	4,0	4,0

TABELA 9 - Efeito da remoção das folhas primárias e da primeira folha trifoliolada na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com 4 (Trat.1), 5 (Trat.2) e 6 (Trat.3) após a embebição das sementes. f-ápices florais.

dias	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	7°	10°	7°	10°
CONT.	f	f	4,0	4,0
TRAT.1	f	f	4,0	4,0
TRAT.2	f	f	4,0	4,0
TRAT.3	f	f	4,0	4,0

TABELA 10 - Efeito da remoção das folhas primárias e do primórdio da 1° folha trifoliolada no 3° dia (Trat.1) e do primórdio da 1° folha trifoliolada (3° dia) e da 2° folha trifoliolada (4° dia) (Trat.2). v-ápices vegetativos; f-ápices florais.

dias	Estádios de desenvolvimento			Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas		
	7°	8°	9°	7°	8°	9°
CONT.	f	f	f	3,6a	4,0a	4,0a
TRAT.1	v	f	f	4,0a	5,0b	5,0b
TRAT.2	v	v	f	4,0a	4,6a	6,0b

a retirada da primeira folha trifoliolada e das folhas primárias no 3° dia, provocou um atraso de um dia na transição floral, e o estágio floral foi atingido com maior número de primórdios de folhas trifolioladas em relação ao controle. Quando foram retiradas as folhas primárias e a primeira e segunda folhas trifolioladas, houve um atraso de dois dias na iniciação floral, sendo que o estágio floral foi atingido com um maior número de folhas trifolioladas. Neste experimento também foi retirado o primórdio da terceira folha trifoliolada e as folhas primárias, o que resultou num decréscimo no desenvolvimento geral da planta (dados não apresentados).

Como mostram os dados apresentados na tabela 11, a remoção das raízes adventícias não afetou a iniciação floral, não alterando também o número de primórdios de folhas trifolioladas em relação ao controle.

Analisando-se o efeito da remoção da raiz principal na iniciação floral (tab.12), verificou-se que não houve diferenças significativas entre as plantas tratadas e as controle, nos estádios de desenvolvimento e no número de primórdios de folhas trifolioladas.

III -3. Efeito de substâncias de crescimento

A aplicação do ácido indol 3 acético (AIA) na concentração de 10^{-2} M, provocou alterações morfológicas nos ápices, ficando impossível, pelas técnicas utilizadas, determinar os estádios de desenvolvimento (tab.13). Quando o AIA foi aplicado na

TABELA 11 - Efeito da remoção das raízes adventícias na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L. v-ápices vegetativos; f-ápices florais.

dias	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
5°	v	v	3,0	3,0
6°	f	f	4,0	4,0

TABELA 12 - Efeito da remoção da raiz principal na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. v-ápices vegetativos; f-ápices florais.

dias	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	CONTROLE	TRATADO	CONTROLE	TRATADO
6°	v	v	3,0	2,5
7°	f	f	4,0	3,6

TABELA 13 - Efeito do ácido indol 3 acético em solução a 10^{-2} M e a 10^{-3} M, na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
AIA(10^{-2} M)	*	*	*	*
AIA(10^{-3} M)	f	f	5,0b	5,2b

* - ápices com alterações morfológicas.

concentração de $10^{-3}M$ não houve alterações nos estádios de desenvolvimento em relação ao controle. Nas plantas intactas (p) tratadas com AIA a $10^{-3}M$, houve a formação de um maior número de primórdios de folhas trifolioladas do que nas plantas intactas sem o tratamento de AIA (controle). Esta diferença não ocorreu nas plantas em que se removeu o primórdio da primeira folha trifoliolada (tab.13).

Analisando-se os dados apresentados na tabela 14, quando se testou o efeito de ácido salicílico na iniciação floral, verifica-se que não houve diferenças entre os estádios de desenvolvimento nas plantas tratadas e controle. Também não houve diferenças em relação ao número de primórdios de folhas trifolioladas entre plantas tratadas e controle, quando intactas (p). Nas plantas tratadas e sem o primórdio da primeira folha trifoliolada (s), o número de primórdios foi menor que nas plantas "s" controle (sem o primórdio da primeira folha trifoliolada). No entanto, foi observado que o número de primórdios das plantas "s" tratadas, foi igual ao das plantas com o primórdio da primeira folha trifoliolada.

Os dados apresentados na tabela 15, mostraram que no 8° dia após a embebição, apenas as plantas tratadas com AIA e sem o primórdio da primeira folha trifoliolada estavam em estágio vegetativo. Estas plantas apresentavam um menor número de primórdios que as plantas intactas e também tratadas com AIA. No tratamento com ácido salicílico, as plantas "s", apresentaram um menor número de primórdios que as plantas "s" do controle. Quando se aplicou ácido salicílico juntamente com AIA,

TABELA 14 - Efeito do ácido salicílico na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	f	f	4,0a	3,6a
DMS (Tukey)	0,5			
cv (coeficiente de variação)	3,0%			

TABELA 15 - Efeito do ácido salicílico a 10^{-3} M e do ácido indol 3 acético na iniciação floral em plantas de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio folhas trifoliolada. Observações feitas no 8° dia. v-ápices vegetativos; f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
A.SAL.	f	f	4,0a	3,6a
AIA	f	v	5,0b	4,0a
AIA+A.SAL.	f	f	3,2c	2,2d
DMS (Tukey 5%)			0,47	
cv (coeficiente de variação)			5,24%	

verificou-se que as plantas "s" atingiram o estágio floral com o menor número de primórdios quando comparadas com os outros tratamentos. As plantas "p" deste tratamento atingiram o estágio floral com um número de primórdios menor do que as plantas "p" e "s" do controle e das tratadas com ácido salicílico ou com AIA isoladamente (tab.15).

Quando se testou a ação do ácido 2,3,5 triiodo benzóico na iniciação floral de Phaseolus vulgaris, verificou-se que, no 8º dia após a embebição das sementes, as plantas tratadas não atingiram o estágio floral e apresentaram um igual número de primórdios em relação às plantas "p" do controle (tab.16).

Analisando-se os resultados apresentados na tabela 17, verifica-se que a aplicação do ácido caféico a 10^{-3} M, não afetou os estádios de desenvolvimento, nem o número de primórdios de folhas trifolioladas, quando comparados com o controle. Este experimento foi repetido utilizando-se concentrações mais altas de ácido caféico, tendo sido obtido o mesmo resultado (dados não apresentados).

Na tabela 18, observa-se que a aplicação de cumarina a 10^{-3} M, não alterou os estádios de desenvolvimento em relação ao controle, verificando-se um maior número de primórdios nas plantas "p" tratadas em relação às plantas "p" controle.

A aplicação de ácido caféico juntamente com ácido salicílico, não afetou a iniciação floral nem o número de primórdios, quando comparados com o controle (tab.19).

Quando se testou o efeito do ácido giberélico (GA_3) a 10^{-3} M na iniciação floral, verificou-se que as plantas tratadas

TABELA 16 - Efeito do ácido 2,3,5 triido benzóico (TIBA) a 10^{-4} M na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. v-ápices vegetativos; f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	v	v	4,0a	4,0a

TABELA 17 - Efeito do ácido caféico a 10^{-3} M, na iniciação floral Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	f	f	4,2a	5,4b
DMS (Tukey 5%)			0,57	
cv (coeficiente de variação)			6,87%	

TABELA 18 - Efeito de cumarina a 10^{-3} M, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	f	f	5,4b	5,0b
DMS (Tukey 5%)			0,94	
cv (coeficiente de variação)			10,76%	

TABELA 19 - Efeito do ácido salicílico e do ácido caféico na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio de folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
A. SAL.	f	f	4,0a	3,6a
A. CAF.	f	f	4,2a	5,4b
A.SAL.+ A.CAF.	f	f	4,0a	5,0b
DMS (Tukey 5%)		0,47		
cv (coeficiente de variação)		5,24%		

não diferiram das plantas controle tanto no estádios de desenvolvimento quanto no número de primórdios iniciados (tab.20). Concentrações mais altas de GA_3 foram testadas e provocaram um alongamento dos internós, tornando-se impossível a dissecação dos ápices para posteriores observações.

Quando se aplicou cinetina nos ápices, verificou-se que não houve diferenças nos estádios de desenvolvimento em relação às plantas controle. No entanto, o número de primórdios de folhas foi menor nas plantas tratadas, quando comparadas com as plantas controle, sendo este número menor ainda nas plantas controle sem primórdio (tab.21).

Pelos dados apresentados na tabela 22, observa-se que não houve diferenças entre as plantas tratadas com ácido abscísico e as plantas controle, tanto nos estádios de desenvolvimento, quanto no número de primórdios de folhas trifolioladas formadas por ocasião da iniciação floral.

III - 5. Conteúdo de substâncias fenólicas

O teor de substâncias fenólicas totais foi analisado em ápices de plantas com diferentes idades. Nesta análise verificou-se que, em plantas com 2 dias, a quantidade destas substâncias foi estatisticamente menor que nas outras idades analisadas. A partir do 3° dia esta concentração vai crescendo até o 5° dia, quando se analisou os dados de μg de substâncias fenólicas/ápices. No 6° dia houve uma diminuição destas

TABELA 20 - Efeito do ácido giberélico (GA_3) a $10^{-3}M$, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio de folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	f	f	4,0a	4,6b
DMS (Tukey 5%)			0,4	
cv (coeficiente de variação)			5,28%	

TABELA 21 - Efeito de cinetina a 10^{-4} M na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	f	f	3,0c	3,6d
DMS (Tukey 5%)			0,5	—
cv (coeficiente de variação)			7,0%	

TABELA 22 - Efeito do ácido abscísico a 10^{-3} M na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L., com (p) ou sem (s) o primórdio da primeira folha trifoliolada. f-ápices florais.

	Estádios de desenvolvimento		Número de primórdios de folhas trifolioladas iniciadas	
	p	s	p	s
CONTROLE	f	f	4,0a	5,0b
TRATADAS	f	f	4,0a	5,0b

substâncias e no 7º dia verificou-se o maior valor encontrado (tab.23). Estes resultados foram obtidos pela comparação com curva padrão obtida com concentrações conhecidas de ácido salicílico, com coeficiente de regressão de 0,98.

A análise qualitativa das substâncias fenólicas presentes em ápices de plantas com diferentes idades, está representada na forma de diagramas onde estão esquematizadas as manchas observadas nas cromatoplasmas obtidas depois do uso de 2 sistemas de solventes, delimitadas em luz ultra-violeta. Verifica-se que as manchas de coloração azul escuro (A), azul claro (D) e azul esverdeado (C) estão presentes em Rfs semelhantes em todos os extratos analisados (fig.3, 4, 5, 6, 7, 8). Com a cor preta (não fluorescente e apresentando absorbância) aparece apenas uma mancha (B), nos extratos de ápices de plantas com 2, 3 e 4 dias de idade (fig.3, 4 e 5). Nos extratos de plantas com 5 e 6 dias de idade, foram observadas 2 manchas sendo que o Rf de uma das manchas (B), coincide com os Rfs das idades anteriores (fig.6 e 7). Nos extratos de plantas com 8 dias de idade, observam-se 3 manchas pretas (B, B1 e B2) (fig.8). Duas destas manchas (B e B1) coincidem com os Rfs das manchas pretas observadas na cromatoplasma de extrato de plantas com 6 dias.

Nos experimentos para a análise da atividade dos eluatos das manchas observadas em cromatoplasmas de extratos de plantas com diferentes idades, verificou-se que nos extratos de plantas com 2 dias, nenhuma das manchas provocou mudanças na iniciação floral em P. vulgaris, analisando-se os estádios de desenvolvimento e o número de primórdios de folhas trifolioladas

TABELA 23- Conteúdo de substâncias fenólicas em ápices de diferentes idades de plantas de Phaseolus vulgaris L. cv. Goiano Precoce.

idade (dias)	µg de subst.fen./mg de tecido	µg de subst.fen./ápice
2	0,43a	0,031a
3	40,20b	0,49b
4	69,90e, d	1,30c
5	73,76e	2,53e
6	53,85c	1,68d
7	65,72d	2,83f
DMS (Tukey 5%)	9,1	0,21
cv(coeficiente de variação)	6,37%	5,22%

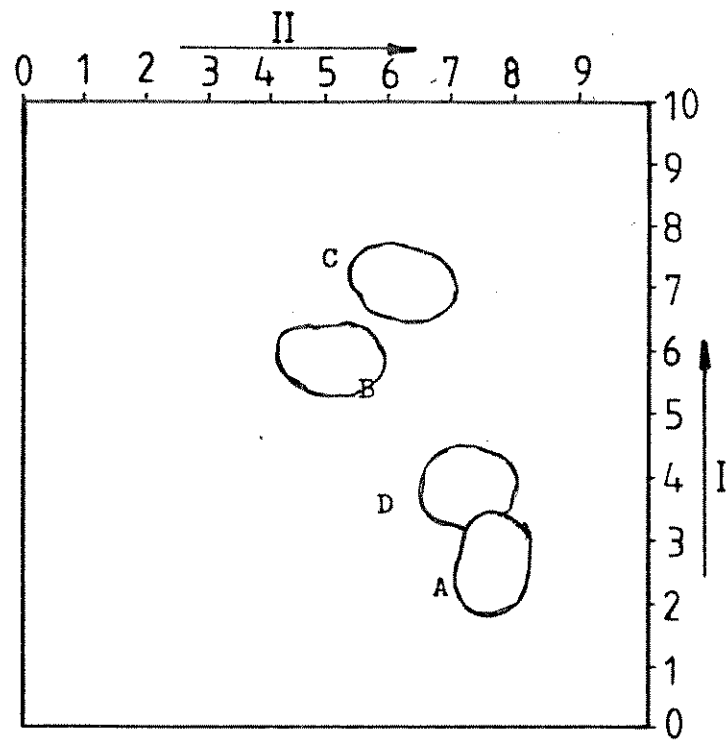


FIGURA 3 - Diagrama de cromatoplaça onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 2 dias após a embebição das sementes, com 2 sistemas de solventes corridos bidimensionalmente (I e II).

- A - mancha azul escura
- B - mancha preta
- C - mancha azul esverdeada
- D - mancha azul claro

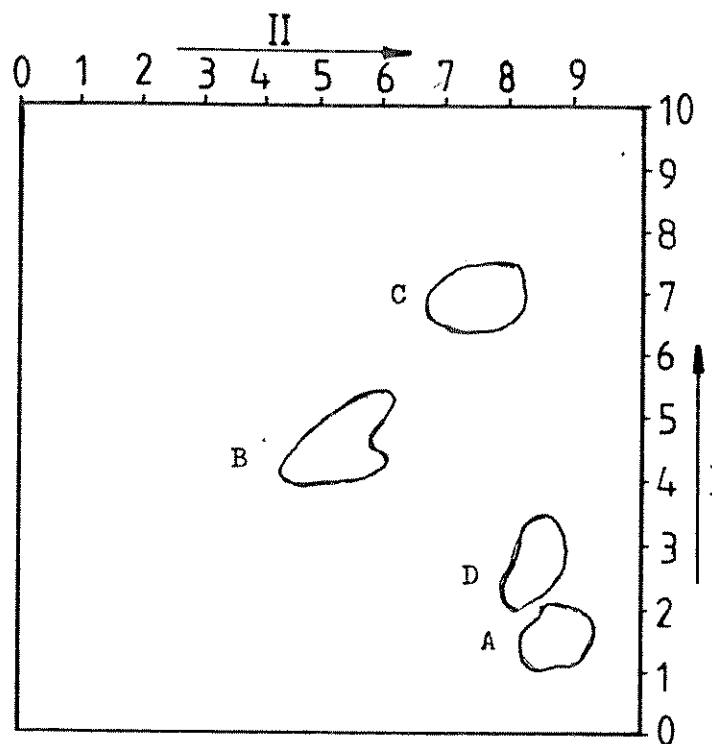


FIGURA 4 - Diagrama de cromatoplaça onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 3 dias de idade, com 2 sistemas de solventes corridos bidimensionalmente (I e II).

- A - mancha azul escuro
- B - mancha preta
- C - mancha azul esverdeado
- D - mancha azul claro

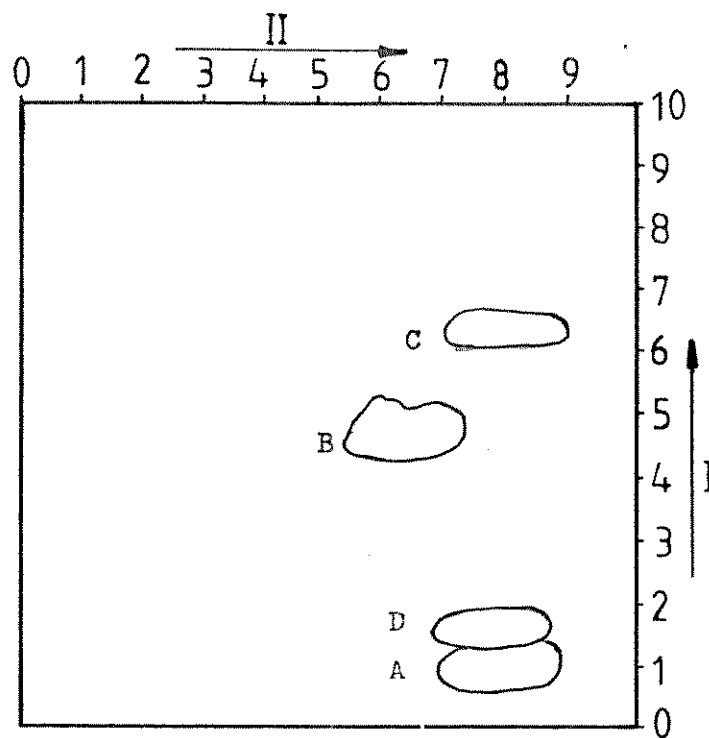


FIGURA 5 - Diagrama de cromatoplaça onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 4 dias de idade, com 2 sistemas de solventes corridos bidimensionalmente (I e II).

- A - mancha azul escuro
- B - mancha preta
- C - mancha azul esverdeado
- D - mancha azul claro

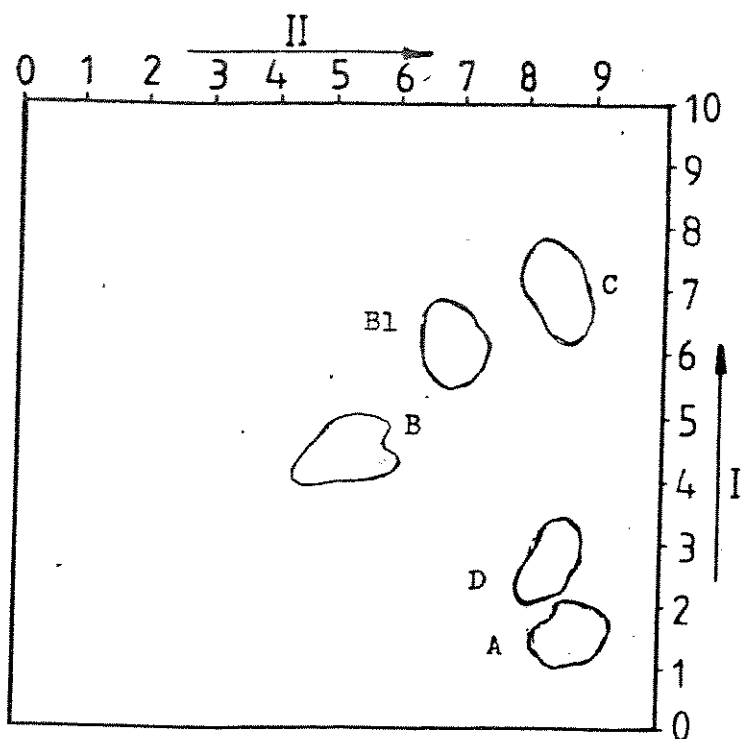


FIGURA 6 - Diagrama de cromatoplaça onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 5 dias de idade, com 2 sistemas de solventes corridos bidimensionalmente (I e II).

- A - mancha azul escuro
- B e B1 - mancha preta
- C - mancha azul esverdeado
- D - mancha azul claro

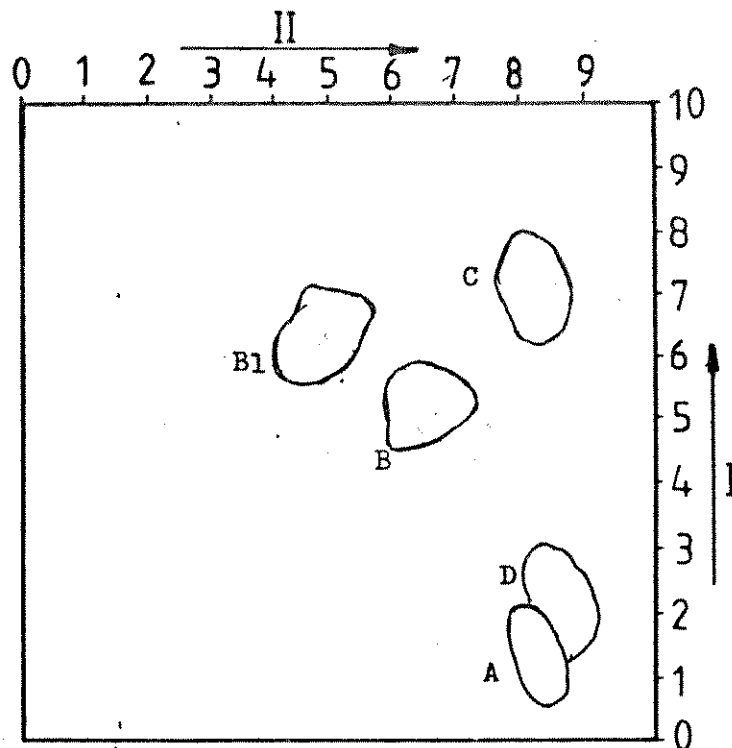


FIGURA 7 - Diagrama de cromatoplaca onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 6 dias de idade, com 2 sistemas de solventes corridos bidimensionalmente (I e II).

- A - mancha azul escuro
- B e B1 - mancha prete
- C - mancha azul esverdeado
- D - mancha azul claro

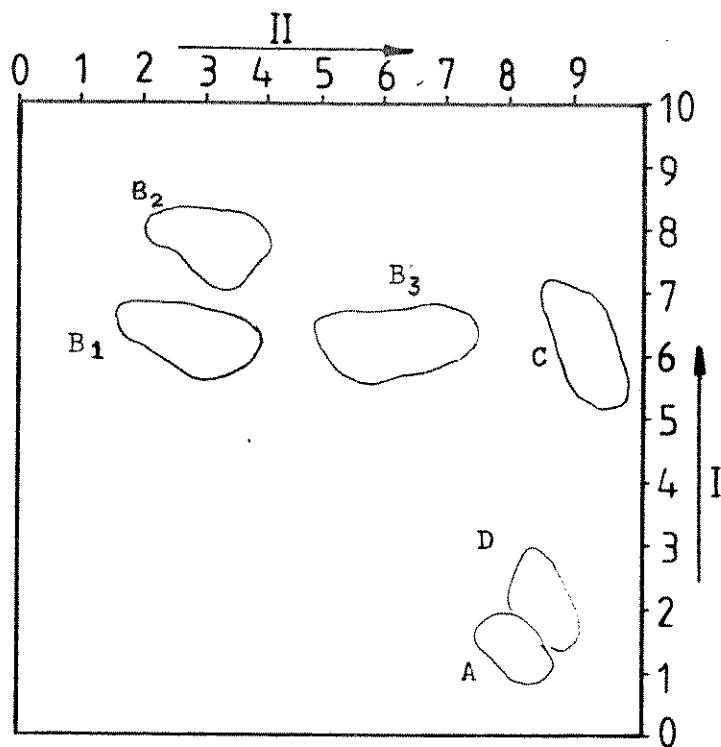


FIGURA 8 - Diagrama de cromatoplaça onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 8 dias de idade, com 2 sistemas de solventes, bidimensionalmente (I e II).

- A - mancha azul escuro
- B (1,2 e 3) - mancha preta
- C - mancha azul esverdeado
- D - mancha azul claro

formado, por ocasião da iniciação floral (tab.24).

Quando se verificou o efeito dos eluatos dos cromatogramas de extratos de plantas com 3 dias, em P. vulgaris, verificou-se que nas plantas onde foi aplicado eluato da mancha preta (B), a iniciação floral ocorreu quando ápices apresentavam 3 primórdios de folhas trifolioladas (tab.25).

Nos ápices onde foram aplicados eluatos de manchas dos cromatogramas de extratos de plantas com 4 dias, não se observou efeito tanto nos estádios de desenvolvimento quanto no número de primórdios de folhas trifolioladas (tab.26).

Na análise da atividade dos eluatos das manchas de cromatogramas de extratos de plantas com 8 dias, verificou-se que os ápices onde foram aplicados eluatos da mancha preta B, tiveram sua iniciação floral depois de formados 3 primórdios de folhas trifolioladas (tab.27).

Na verificação do grupo das substâncias fenólicas a que pertenceriam estas manchas pretas, foi determinado o espectro de absorção de eluatos de plantas de 5 dias, e verificou-se que estes eluatos apresentam um pico por volta de 210 nm (fig.9).

III -6. Metabolismo de AIA

Na análise do possível envolvimento dos fenóis no metabolismo de auxina, em ápices de P. vulgaris com diferentes idades, verificou-se que os compostos formados depois da aplicação de auxina marcada, tanto nos extratos com pH 3,0 (fig.10A e 10B), como nos extratos com pH 7,0 (fig.10C e 10D)

TABELA 24- Efeito de eluatos das manchas da cromatoplaça de extrato de ápices de plantas com 2 dias após a embebição das sementes, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. cv. Goiano Precoces. As observações foram realizadas em plantas com 7 dias de idade. f-estádio floral.

	Estádios de desenvolvimento	Número de primórdios de folhas trifolioladas
CONTROLE	f	4,0a
MANCHA A	f	4,0a
MANCHA D	f	4,0a
MANCHA C	f	4,0a
MANCHA B	f	3,8a
cv (coeficiente de variação)		4,1%

TABELA 25- Efeito de eluatos das manchas da cromatoplaça de extrato de ápices de plantas com 3 dias de idade, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. cv Goiano Precoce. As observações foram realizadas em plantas com 7 dias de idade. f-estádio floral.

	Estádios de desenvolvimento	Número de primórdios de folhas trifolioladas
CONTROLE	f	4,0a
MANCHA A	f	3,6a
MANCHA B	f	3,0b
MANCHA C	f	4,0a
MANCHA D	f	3,8a
DMS (Tukey 5%)	0,5	
cv (coeficiente de variação)	3,2%	

TABELA 26- Efeito de eluatos das manchas da cromatoplaca de extrato de ápices de plantas com 4 dias de idade, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. cv Goiano Precoce. As observações foram realizadas em plantas com 7 dias

	Estádios de desenvolvimento	Número de primórdios de folhas trifolioladas
CONTROLE	f	4,0a
MANCHA A	f	4,0a
MANCHA B	f	3,8a
MANCHA C	f	4,0a
MANCHA D	f	3,8a
cv (coeficiente de variação)		4,5%

TABELA 27- Efeito de eluatos de manchas de cromatoplasmas de extrato de ápices de plantas com 8 dias de idade, na iniciação floral de Phaseolus vulgaris L. cv Goiano Precoce. As observações foram realizadas em plantas com 7 dias f-estádio floral.

	Estádios de desenvolvimento	Número de primórdios de folhas trifolioladas
CONTROLE	f	4,0a
MANCHA A	f	4,0a
MANCHA B1	f	3,0b
MANCHA B2	f	3,8a
MANCHA B3	f	3,8a
MANCHA C	f	4,0a
MANCHA D	f	3,8a
DMS (Tukey 5%)		0,6
cv (coeficiente de variação)		3,4%

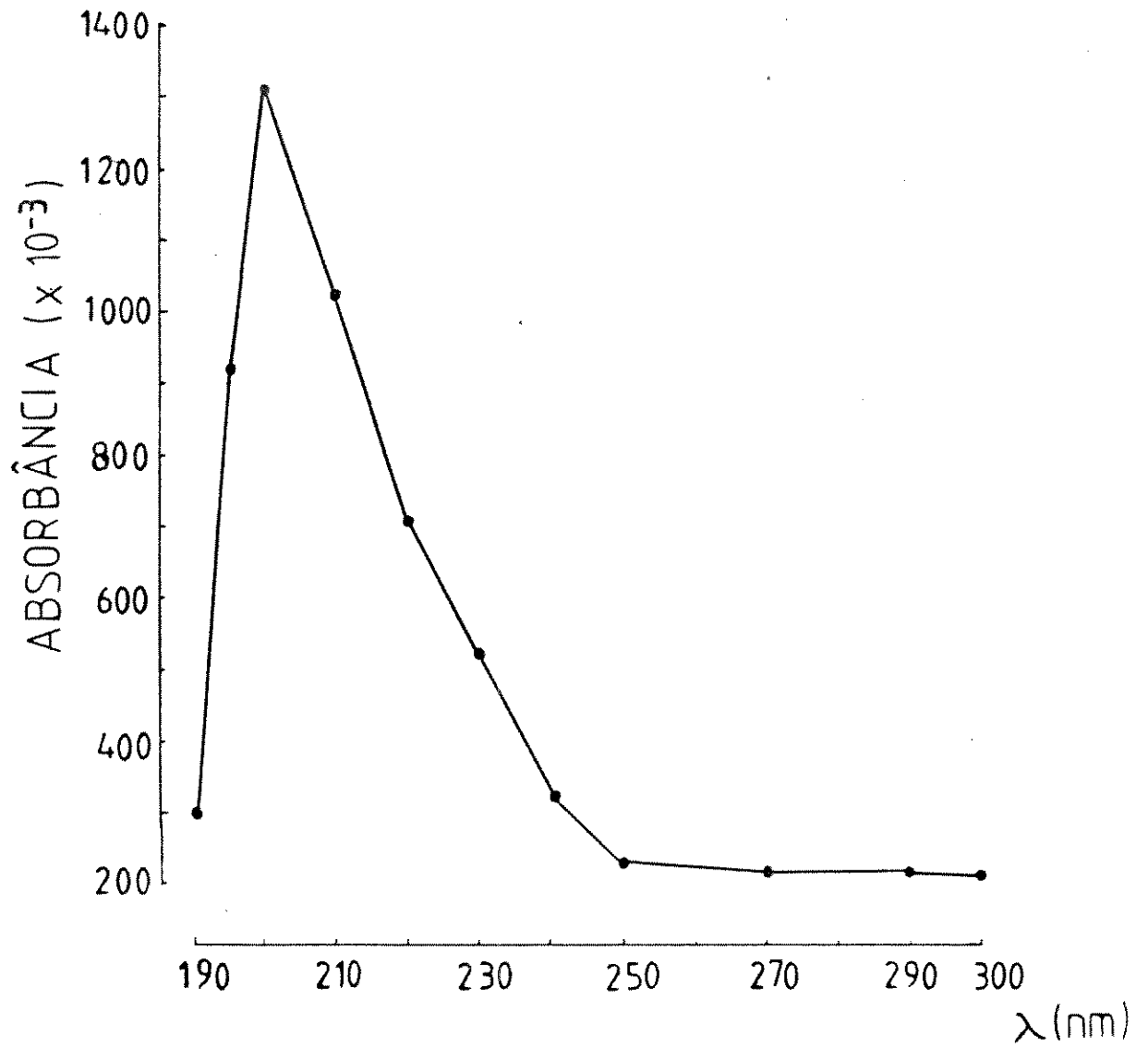


FIGURA 9 - Espéctro de absorção das manchas pretas de cromatoplasmas onde foi corrido extrato fenólico de ápices de plantas com 5 dias, crescidas na luz.

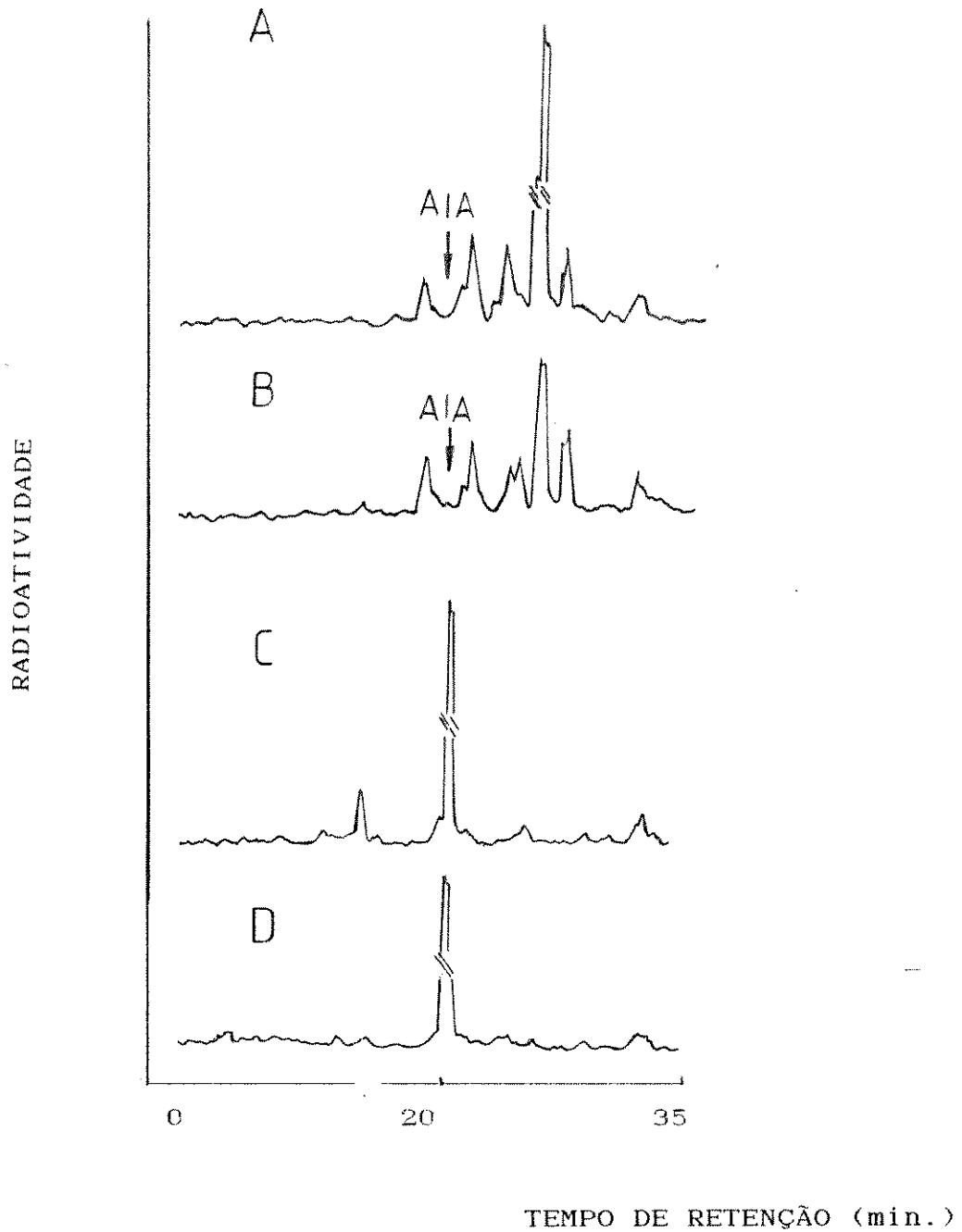


FIGURA 10 - Análise em HPLC de fase reversa, do metabolismo de $(2'-^{14}\text{C})\text{AIA}$ em plântulas de Phaseolus vulgaris L. cv. Goiano Precoce, com 2 dias (A e C) e 3 dias (B e D) de idade. A e B - fração ácida; C e D - fração neutra.

apresentaram o mesmo tempo de retenção em HPLC, para as duas idades analisadas. Nas figuras 10A e 10B, estão representados os cromatogramas obtidos em HPLC, onde está indicado o tempo de retenção do AIA padrão. Nestes casos, na fração ácida dos extratos, o AIA não foi detectado. Nesta fração foram encontrados 4 compostos menos polares que o AIA e um composto mais polar.

Na fração neutra, nas duas idades analisadas, verificou-se a presença de apenas um composto que, por estar nesta fração, é mais polar que o AIA.

III - 7. Conteúdo de proteínas e carboidratos

Na verificação do conteúdo de proteínas totais em ápices de plantas de P. vulgaris com diferentes idades, detectou-se um aumento significativo comparado com as outras idades analisadas, em plantas com 4 dias após a embebição das sementes. Este aumento foi significativo tanto quando se analisou o teor protéico por ápice como quando este foi analisado em relação ao peso do tecido (tab.28). Estes valores foram calculados a partir de comparações com curva padrão obtida com concentrações conhecidas de soro albumina bovina cujo coeficiente de regressão era de 0,99.

Quando foi analisado o teor de açúcares solúveis em ápices de plantas com diferentes idades, verificou-se que, em plantas com 4 dias, houve um aumento significativo em relação às outras idades analisadas (tab.29).

Quanto às extrações realizadas para verificação do conteúdo

TABELA 28- Conteúdo de proteínas totais em ápices de diferentes idades de plantas de Phaseolus vulgaris L.cv Goiano Precoce.

idade (dias)	µg de proteína/mg de tecido	µg de proteína/ápice
2	23,67a	2,1a
3	24,62a	2,6a
4	32,92b	3,4b
7	24,57a	2,2a
DMS (Tukey 5%)	5,93	0,59
cv (coeficiente de variação)	8,7%	8,8%

TABELA 29- Conteúdo de açúcares solúveis, em ápices de diferentes idades de plantas de Phaseolus vulgaris L. cv Goiano Precoce.

idade (dias)	µg de polissac./mg de tecido	µg de polissac./ápice
3	300,76a	4,19a
4	521,66b	15,81b
7	381,64c	10,31c
DMS (Tukey 5%)	73,41	0,8
cv (coeficiente de variação)	7,3%	6,4%

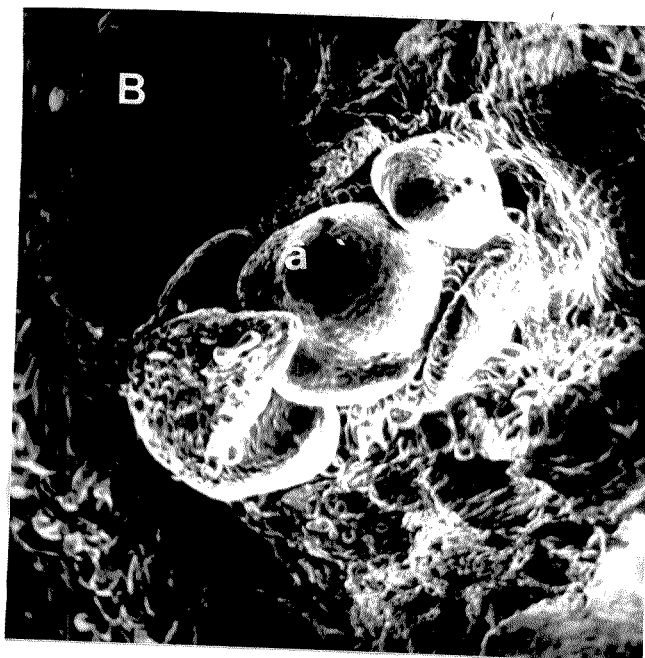
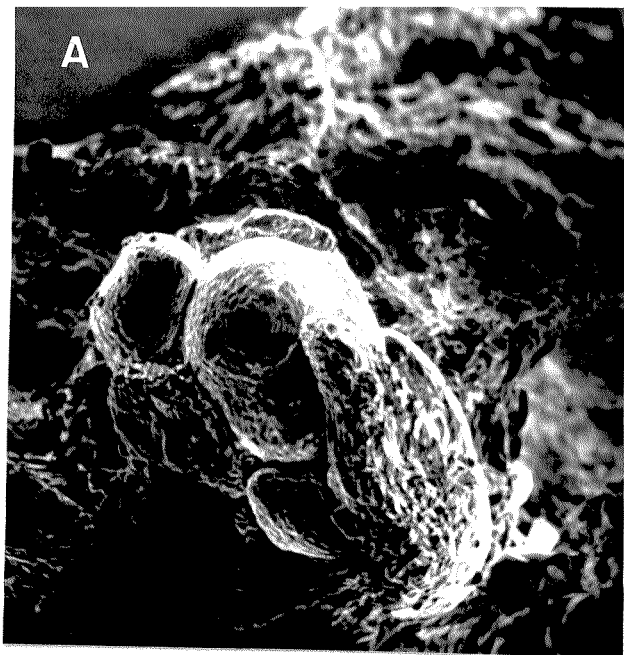
de carboidratos totais em ápices de diferentes idades, observou-se um aumento significativo no 3° e 4° dias, quando comparados com as outras idades, nas análises feitas em relação ao número de ápices. No teor de carboidratos totais em relação ao peso de tecido, verificou-se uma diminuição significativa a partir do 3° dia de idade, sendo que estes teores foram iguais no 6° e 7° dias de idade (tab.30). Estes resultados foram calculados com base na curva padrão de concentrações conhecidas de glicose, cujo coeficiente de regressão foi de 0.99.

III - 8. Análise morfológica de ápices

Nas figuras 11 e 12 estão representados, por meio de fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, ápices em estádios vegetativos e florais. Pela análise destas figuras, verifica-se que o ângulo divergente não foi alterado pela transformação do ápice vegetativo em floral, sendo de $170^\circ(\hat{a})$ entre o centro do domo apical e o centro dos primórdios de folhas ou de flores.

TABELA 30- Conteúdo de carboidratos totais em ápices de diferentes idades de plantas de Phaseolus vulgaris L.cv Goiano Precoce.

idade (dias)	µg de carboid./mg de tecido	µg de carboid./ápice
2	299,15c	8,5a
3	320,50c	15,1b
4	237,80b	15,0b
6	131,90a	6,1a
7	140,90a	7,4a
DMS (Tukey 5%)	55,41	2,6
cv (coeficiente de variação)	7,6%	8,3%



68.

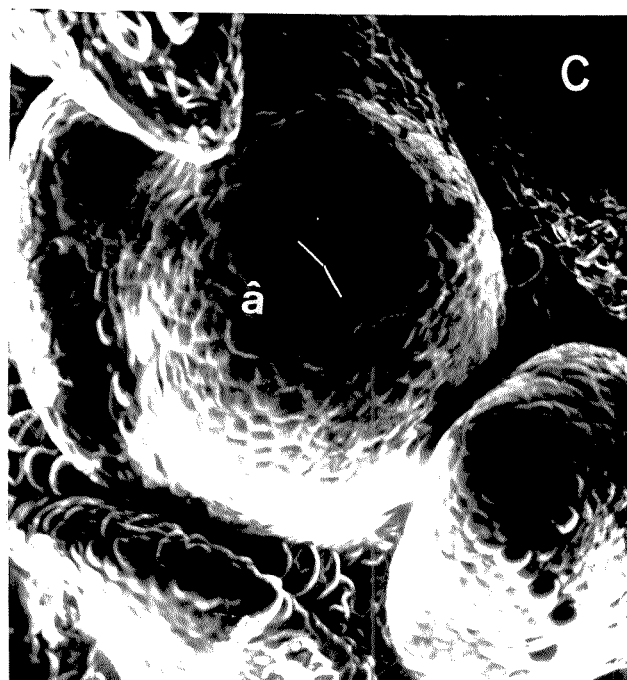
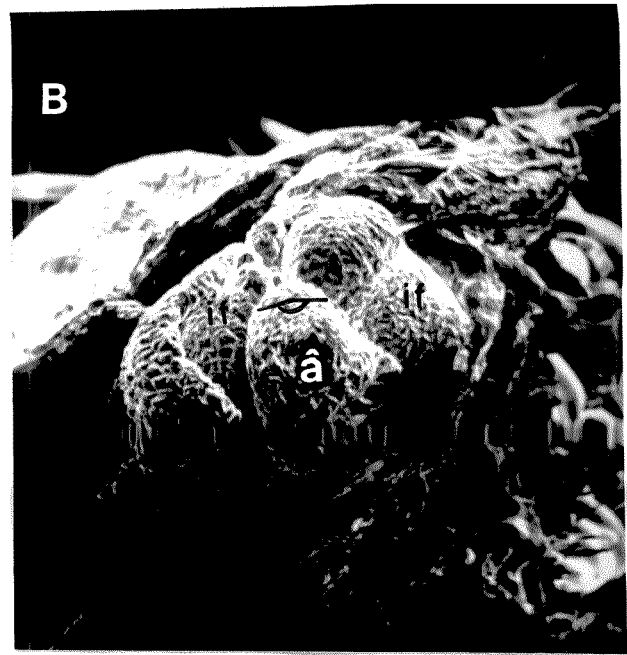


FIGURA 11 - Fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura operado a 3 Kv. de ápices de plantas em estágio vegetativo.

A e B - aumento de 210 vezes; C - aumento de 600 vezes.

pft - primórdio de folha trifoliolada

d - domo apical



69.



FIGURA 12 - Fotografia obtida em microscópio eletrônico de varredura operado a 3 Kv, de ápices em estágio floral. A e B - aumento de 210 vezes; C - aumento de 240 vezes.

pft - primórdio de folha trifolilada

d - domo apical

if - primórdio floral

â - ângulo divergente

IV - DISCUSSÃO

Em algumas variedades de Phaseolus vulgaris, a iniciação floral se dá em estádios de desenvolvimento bastante precoces. Na variedade "Mont D'Or Golden Butter", plantas com 4 ou 5 primórdios de folhas trifolioladas já apresentam o ápice transformado em floral (PEREIRA, 1978). Na variedade "Canadian Wonder" este fenômeno ocorre por volta do 6° dia após o plantio (MURRAY, 1968).

No caso do cultivar Goiano Precoce a iniciação floral ocorreu por volta do 7° dia após a embebição das sementes. Este cultivar não é fotoperiódico. A iniciação floral ocorreu igualmente em plantas crescidas na luz e no escuro contínuos. Este fato deixa claro que a iniciação floral, nesta espécie, independe também da fotossíntese, haja visto que, plantas totalmente aclorofiladas, crescidas desde a germinação das sementes em escuro contínuo, tiveram a iniciação floral no 7° dia e com 4 primórdios de folhas trifolioladas.

O estudo do efeito da nutrição mineral na floração, tem mostrado que um balanço de nutrientes minerais é necessário para que ela ocorra (SIMMONDS, 1982). Segundo BERNIER et al. (1981), a nutrição mineral tem uma importância secundária na floração, tendo um efeito modulador neste fenômeno. Em P. vulgaris, notou-se que o uso de solução nutritiva, não afetou o desenvolvimento da inflorescência e a ântese. No entanto, as plantas tratadas com solução nutritiva, na ocasião de

iniciação floral, apresentaram um maior número de folhas trifolioladas expandidas quando ocorreu a primeira ântese. Sabendo-se que a iniciação floral ocorre depois que o meristema formou 4 primórdios de folhas trifolioladas, acredita-se que a nutrição mineral acelera o desenvolvimentos destas folhas, quando comparada com as plantas regadas com água destilada.

Os cotilédones são considerados como a principal fonte de metabólitos para uma planta em crescimento. No entanto, verificou-se que eles devem armazenar outro tipo de substâncias necessárias para o crescimento, uma vez que, embriões de Phaseolus vulgaris sem cotilédones tiveram seu crescimento limitado, mesmo em cultura com meio nutricional completo (MONNIER, 1978). Sabendo-se que a iniciação floral em P. vulgaris cv Goiano Precoce é independente de estímulo luminoso, da fotossíntese e ocorre tão cedo, levantou-se a hipótese de que os cotilédones poderiam estar envolvidos na indução floral desta espécie. Nos experimentos onde os 2 cotilédones foram retirados, o desenvolvimento geral da planta foi grandemente afetado, sendo que, o uso de solução nutritiva não substituiu a ausência dos cotilédones, concordando com MONNIER (1978). Este fato impossibilitou a análise, nestas condições, uma vez que, não se poderia justificar um efeito específico na iniciação floral, já que todo o desenvolvimento da planta foi afetada.

A remoção de um dos cotilédones não afetou a transição floral.

Vários trabalhos, realizados com plantas fotoperiódicas, indicam que as folhas têm um importante papel na percepção do estímulo luminoso e na transmissão da indução floral para os

meristemas (VINCE-PRUE, 1975; BERNIER et al., 1981). Entretanto em plantas não fotoperiódicas o papel das folhas na iniciação floral, ainda não está esclarecido.

O crescimento correlativo é o resultado das interações entre as várias partes da planta (DÔSTAL, 1967). Assim, HADDAD & VÁLIO (1984), verificaram que a remoção das folhas primárias em plantas de P. vulgaris cv Goiano Precoce, provoca uma redução do alongamento caulinar. Este efeito parece ser devido a fatores hormonais (VÁLIO & SCHWABE, 1978). Buscou-se então, um possível envolvimento das folhas primárias desta espécie na indução floral. No entanto, a retirada destes órgãos em plântulas, não afetou a iniciação floral, concluindo-se que as folhas primárias provavelmente não participam diretamente da indução floral.

A remoção das folhas primárias e de um dos cotilédones atrasou a antese e reduziu o número de flores em plantas de P. vulgaris cv "Mont D'Or Golden Butter" (PEREIRA, 1981). A autora sugere que este atraso pode ocorrer também na transformação do ápice de vegetativo para floral. Entretanto, este não é o caso no cv Goiano Precoce pois não se verificou efeito na iniciação floral, com a remoção destes órgãos.

Em algumas plantas fotoperiódicas a remoção de primórdios de folhas tem efeito inibitório na iniciação floral (LAM & LEOPOLD, 1960; BERNIER et al., 1981). No presente trabalho, verificou-se que a retirada da primeira folha trifoliolada além das folhas primárias e de um dos cotilédones, no 3° dia de embebição, provocou um atraso na iniciação floral, atraso este confirmado pela formação de um número maior de folhas

trifolioladas. Estes fatos poderiam ser justificados como um efeito promotor do primórdio na iniciação floral, ou um efeito conjunto de cotilédones, folhas primárias e primórdios de folhas trifolioladas. Uma outra explicação poderia ser dada com base na injúria provocada na região apical. Sabe-se que a injúria provocada em tecidos de plantas, provoca um aumento na produção de etileno no órgão afetado (ABELES, 1973). No entanto, quando se provocaram lesões na região apical de *P. vulgaris*, sem a remoção de primórdios de folhas trifolioladas, não houve atraso nem aceleração da iniciação floral. Isto é confirmado pelo fato de a aplicação de etrel não provocar efeito algum na iniciação floral desta espécie (dados não apresentados).

Na tentativa de se verificar um efeito conjunto de cotilédones, folhas primárias e primórdios de folhas trifolioladas, experimentou-se a remoção destes órgãos, mantendo as folhas primárias. No entanto, este tipo de remoção, só poderia ser feito em plantas com mais de 6 dias, uma vez que, em idades anteriores, as folhas primárias recobriam a região apical. Isto impossibilitava a remoção do primórdio de folha trifoliolada, sem a retirada das primárias. Como não houve efeito na iniciação floral, testou-se a remoção do primórdio de folha trifoliolada e das folhas primárias, mantendo-se os cotilédones, tratamentos este que não foram efetivos na iniciação floral. No entanto, todos estes tratamentos foram realizados em plantas com mais de 3 dias de idade. Quando estas remoções foram realizadas em plantas com 3 dias de idade, retirando-se sucessivamente os primórdios de folhas trifolioladas formados, verificou-se que,

para que a iniciação ocorresse, sempre teria que ser formado mais um primórdio de folha trifoliolada, substituindo aquele(s) removido(s). Estes fatos reforçam a hipótese de que a presença de um número mínimo de primórdios (4) de folhas trifolioladas é necessário estar presente para que a iniciação floral ocorra nesta espécie. Conclui-se também, que a indução floral ocorre até o 3° dia após a embebição das sementes, já que depois desta idade, não se consegue mais reverter o processo de iniciação floral.

As raízes, tanto a primária quanto as adventícias, não devem estar envolvidas na iniciação floral desta espécie, uma vez que a remoção delas não provocou efeito neste processo.

Segundo SHARDE & MURASHIGE (1977), os primórdios de folhas representam grande fonte de produção de auxina. Suspeitou-se então do envolvimento deste hormônio na iniciação floral da espécie estudada. A aplicação de AIA a 10^{-2} M foi alta, provocando alterações nos primórdios de folhas trifolioladas, impedindo o desenvolvimento deste ápices. Este tipo de anomalia em folhas de Phaseolus, já foi descrito por PEREIRA (1979), pela aplicação de 2,4-D em ápices. A concentração de 10^{-3} M, provocou um atraso na iniciação floral em plantas intactas, não tendo efeito em plantas sem o primórdio da primeira folha trifoliolada. Acredita-se então, que as auxinas podem estar envolvidas na iniciação floral desta espécie, mas que talvez este efeito seja dependente de outras substâncias produzidas nos primórdios.

Para maior elucidação, testou-se o efeito do TIBA,

conhecida substância antagonista de auxina, por inibir a translocação deste hormônio na planta. Sabe-se também que o TIBA diminui os níveis endógenos de auxina, por aumentar a atividade de AIA-oxidase (KUMAR & NANDA, 1981b). A aplicação de TIBA a 10^{-3} M, provocou um atraso na diferenciação floral, pois até o 8º dia após a embebição das sementes, os ápices não estavam em estágio floral. Desta forma foi reforçado o envolvimento de auxinas na iniciação floral, tendo-se em vista que este hormônio é produzido em regiões apicais, e que o TIBA inibe a translocação desta substância de crescimento. Concentrações maiores que 10^{-3} M de TIBA, provocaram uma intensa modificação nos ápices, efeito este já descrito por GORTER (1951) em ápices de tomateiro.

Em algumas plantas, sabe-se que a oxidação de AIA favorece a floração. Esta oxidação é feita pela enzima AIA-oxidase e algumas substâncias de crescimento podem levar a um aumento da atividade ou da quantidade desta enzima, induzindo assim, indiretamente a floração (KUMAR & NANDA, 1981). Os fenóis parecem estar envolvidos no aumento da oxidação enzimática de auxinas. Desde de que as auxinas estejam envolvidas no processo da floração, é interessante examinar o efeito de fenóis neste processo (BERNIER et al., 1981).

Segundo KONISHI & GALSTON (1964), a indução floral em Pharbits nil, segue-se a uma queda de inibidor fenólico e um aumento de AIA-oxidase (in KUMAR & NANDA, 1981). Em Impatiens balsamina o ácido salicílico induz a iniciação floral em condições não indutoras (NANDA et al., 1976). No presente

trabalho, observou-se que o ácido salicílico acelerou a floração significativamente, apenas em plantas sem o primórdio da primeira folha trifoliolada. Logo, a aplicação de ácido salicílico parece ter substituído a ausência do primórdio, uma vez que não houve diferença entre o número de primórdios de folhas destas plantas e o das plantas com primórdio do controle. Neste caso, quando o primórdio foi mantido, o fato de não se ter observado efeito na iniciação floral, sugere que a ação do ácido salicílico deve depender da ação de alguma(s) substância(s) endógena(s) presente(s) neste ou no conjunto de 4 primórdios de folhas trifolioladas, em concentrações capazes de anular o efeito deste fenól.

Segundo KUMAR & NANDA (1981a), os monofenóis como ácido salicílico, são ativos como cofatores ou ativadores de AIAoxidase. Quando o ácido salicílico foi aplicado junto com AIA, observou-se uma intensificação do efeito do ácido salicílico, uma vez que houve promoção da iniciação floral tanto nas plantas com, quanto nas plantas sem o primórdio da primeira folha trifoliolada. Nesta últimas, o efeito foi mais intenso, pois plantas com apenas dois primórdios, já apresentavam ápices em estágio floral. Estes fatos sugerem que deve realmente existir ação conjunta destas substâncias de crescimento, e que esta ação deve depender de concentrações endógenas destas substâncias, que quando aplicadas exogenamente, se adicionam às concentrações endógenas, provocando o efeito observado.

Os difenóis e os polifenóis são ativos inibidores de AIA-oxidase, promovendo-se assim a diferenciação floral em

algumas espécies (NANDA & KUMAR, 1981b). No entanto, o ácido caféico não foi ativo na iniciação floral em P. vulgaris. A cumarina provocou um atraso na iniciação floral, mas acredita-se que este efeito se deva a uma atraso geral no desenvolvimento da planta, já que as plantas tratadas eram bem menores que as plantas controle.

Sabendo-se que o ácido salicílico pode aumentar a atividade de AIAoxidase e que o ácido caféico pode inibir esta enzima, tentou-se verificar se ocorreria reversão de efeito. Quando se aplicou estes fenóis juntos, verificou-se que a ação do ácido salicílico foi revertida pelo ácido caféico. Este efeito fornece mais indícios de que provavelmente a ação do ácido salicílico na iniciação floral de P. vulgaris, se dá via AIAoxidase.

Uma vez estabelecido o possível envolvimento de substâncias fenólicas na iniciação floral desta espécie, partiu-se para a investigação do teor destas substâncias em ápices de plantas com diferentes idades. Nos ensaios quantitativos específicos para estas substâncias, verificou-se uma diferença de resultados quando se analisaram os teores destas substâncias em relação a mg de tecido e ao número de ápices. Sugere-se que a variação observada, deve-se a diferença no número de ápices necessários, nas diferentes idades, para atingir uma determinada quantidade de tecido. Sabe-se que quanto maior a idade, menores são os ápices, e conseqüentemente, utilizou-se um maior número de ápices na extração. Logo, os resultados expressos em relação ao número de ápices, parecem refletir melhor o conteúdo de substâncias fenólicas, uma vez que a iniciação floral ocorre

no ápice. Sendo assim, conclui-se que ocorre um aumento significativo no conteúdo de substâncias fenólicas, no dia da indução floral (3° dia). Estes fatos sugerem um envolvimento destas substâncias na indução floral, porém existe ainda, a possibilidade deste aumento ser uma consequência das alterações metabólicas que ocorrem normalmente em ápices induzidos para a floração.

Em vista deste possível envolvimento, procedeu-se a uma série de extrações e cromatografias, com extratos fenólicos de ápices de plantas com diferentes idades, para a caracterização das substâncias fenólicas presentes. Nestas análises deduziu-se que, a partir do dia da indução floral, as manchas pretas (absorbância) (B), se decompunham em 2 e até 3 manchas em Rfs próximos. Sugeriu-se que estas substâncias poderiam ser as responsáveis pelo efeito dos fenóis na indução floral, uma vez que as outras manchas estavam presentes em todas as idades analisadas, sem sofrerem modificações. Para a maior elucidação, testou-se a atividade dos eluatos de manchas de extratos de ápices com diferentes idades. Estes testes foram realizados em plantas com 3 dias de idade. Conclui-se que as substâncias que tiveram ação na iniciação floral, no caso, acelerando este processo, foram as que apresentaram manchas pretas nas cromatoplacas, excluindo-se as dos extratos de ápices de plantas com 2 dias que não foram ativas.

Apenas uma das manchas pretas dos extratos de plantas com 8 dias foi ativa (B). Provavelmente as outras manchas pretas observadas nesta idade sejam produtos do metabolismo da

substância inicial B. Sugere-se então, que estas substâncias têm efeito endógeno, acelerando a iniciação floral nesta espécie, relacionado com a aplicação exógena de ácido salicílico.

Pelo espectro de absorção destas substâncias ativas na iniciação floral, sugere-se que elas pertençam ao grupo dos fenilpropanóides, que são compostos que ocorrem naturalmente em plantas, que apresentam picos de absorção na faixa do ultra violeta, próximos a 210 nm (HARBORNE, 1973).

Segundo GRAMBOW & LANGENBECK-SCHWICH (1983), o metabolismo de auxinas endógenas na presença de substâncias fenólicas, produziria indóis decarboxilados, enquanto que na ausência de fenóis, oxindóis decarboxilados se acumulariam. Segundo estes autores, o peróxido de hidrogênio é produzido pela ação de oxidases, antes da degradação do AIA pela AIA-oxidase. Quando esta reação ocorre sem a presença de fenóis, o excedente de peróxido de hidrogênio formado se liga à indolnina que é um produto intermediário do catabolismo de AIA, produzindo oxindóis. Se a reação ocorrer na presença de fenóis, estes reduzem o peróxido de hidrogênio e o intermediário indolinina, é convertido em indóis. Este modelo foi demonstrado *in vivo* com Triticum compactum (LANGENBECK-SCHWICH & GRAMBOW, 1984). Para se confirmar o envolvimento de fenóis relacionado à AIA-oxidase no metabolismo de AIA em ápices de P. vulgaris, procedeu-se a extrações específicas utilizando-se plântulas com idades anteriores e durante a indução floral, nas quais foram aplicadas concentrações conhecidas de AIA radioativo. Pela verificação dos compostos radioativos formados pelo metabolismo da auxina

marcada aplicada, poder-se-ia verificar se na época da indução floral, os fenóis presentes nestes ápices, poderiam estar atuando no do metabolismo do AIA via AIA-oxidase, quando comparado com ápices de plantas antes da indução floral.

HPLC é uma cromatografia de partição líquido/líquido baseada na solubilidade das moléculas nas 2 fases líquidas, uma estacionária e outra móvel. Na HPLC de fase reversa, a fase estacionária é hidrofóbica, sendo que os solutos são eluídos em ordem decrescente de polaridade. Conforme se diminui a polaridade da fase móvel, maior o poder de eluição deste solvente. No presente trabalho, verificou-se que todo o AIA aplicado foi metabolizado, uma vez que, na fração ácida, não se detectou AIA, cujo tempo de retenção do padrão, cromatografado da mesma maneira, foi de 20min. e 15 seg. Verificou-se também, que a maioria dos metabólitos presentes na fração ácida e neutra, são menos polares que o AIA pois o seu tempo de retenção é maior.

Não se conseguiu identificar nenhum dos metabólitos formados devido à pequena quantidade do extrato. Entretanto, por comparações com algumas substâncias indólicas padrão disponíveis, sabe-se que não houve a formação do conjugado mais polar que o AIA, ácido indol-3-acetil aspártico (tempo de retenção 14 min.) ou do ácido oxindol-3-acético (tempo de retenção 13 min.). Sabe-se também, que os metabólitos decarboxilados, ácido indol-3-carboxílico (tempo de retenção semelhante ao do AIA) e indol-3-metanol (tempo de retenção maior que do AIA) não estavam presentes nas frações ácidas e neutras, respectivamente (SUNDBERG *et al.*, 1985).

Os metabolitos produzidos nas duas idades analisadas, tanto na fração ácida como neutra, foram muito parecidos (tab. 10), indicando que não houve diferença marcante no metabolismo de auxinas nestas plantas, ou seja, com maior ou menor quantidade de substância fenólica. Dessa forma, pode-se dizer, que o conteúdo diferente de substâncias fenólicas em plantas com 2 e 3 dias de idade, não está relacionado com o metabolismo de auxinas, apesar das auxinas e das substâncias fenólicas serem ativas, separadamente, no processo de iniciação floral em Phaseolus.

Em Impatiens balsamina o ácido giberélico pode estimular a floração, e quando aplicado juntamente com ácido salicílico, este efeito indutor é aumentado (NANDA et al., 1976). A aplicação de GA₃ em ápices de P. vulgaris nas concentrações usadas não provocou efeito algum na iniciação floral desta espécie. Concentrações maiores provocaram um alongamento dos internós, sendo impossível a dissecação e posterior análise dos ápices. Logo, não se pode concluir sobre o efeito desta substância de crescimento na iniciação floral desta espécie.

A ação do ácido abscísico (ABA) na iniciação floral já foi alvo das atenções de muitos pesquisadores, que acreditavam que a iniciação se daria por um balanço dos níveis deste inibidor com promotores de crescimento. Atualmente, acredita-se que o ABA não tenha um efeito específico na iniciação floral e sim, em alguns eventos da evocação (BERNIER et al., 1981). Em P. vulgaris, verificou-se que a aplicação deste inibidor não afetou a iniciação floral, acreditando-se portanto, que ele,

provavelmente, não esteja diretamente envolvido na transição floral nesta espécie.

TSE et al. (1974), trabalhando com Bougainvillea "San Diego Red", verificaram que a remoção de folhas jovens acelerava a floração, o mesmo ocorrendo com a aplicação de citocinina. Verificou-se o mesmo efeito da citocinina em ápices de Phaseolus, em plantas com ou sem o primórdio de folha trifoliolada. No entanto, a remoção do primórdio nas plantas tratadas, provocou atraso na iniciação floral quando comparadas com as plantas tratadas e sem primórdio, mostrando que o efeito observado não se deve só à presença de citocinina no ápice, mas também a substâncias presentes nos primórdios. Em Bougainvillea os autores sugerem que a remoção de primórdios e a aplicação de citocinina provocariam um afluxo de nutrientes para o ápice, estimulando assim a floração. Possivelmente a ação da cinetina em Phaseolus, pode ser a de atração de nutrientes para o ápice. Esta hipótese da ação das citocininas baseia-se no fato de que, quando se realizaram extrações de carboidratos e açúcares solúveis, verificou-se que houve, por volta do 3º dia após a embebição das sementes, um aumento nos níveis destas substâncias. Sabendo-se que nesta idade provavelmente ocorre a indução floral nesta espécie, acredita-se que o aumento de carboidratos e açúcares solúveis observado, esteja relacionado com a indução floral.

Vários trabalhos demonstram que existe uma estreita relação entre a indução floral e o aumento de síntese de proteínas, sugerindo que este aumento, em muitos casos, é necessário para que a indução ocorra (BERNIER, 1966; MITRA &

SEN, 1966 e SAWHENEY et al., 1976). Nas investigações do conteúdo de proteínas totais em ápices de Phaseolus, verificou-se que plantas com 4 dias, apresentaram uma maior quantidade de proteínas, sugerindo que este aumento esteja relacionado com as alterações metabólicas que ocorrem durante a indução floral nesta espécie.

IV - 1. Ontogênese dos ápices florais

Segundo KING & EVANS (in BERNIER et al., 1981) em Pharbitis o meristema axilar que forma a folha, após a indução floral, se transforma em primórdio de flor, mantendo assim, cada botão floral, a mesma filotaxia em espiral existente no estágio vegetativo. Segundo Dr. W.W.SCHWABE (comunicação pessoal), as protuberâncias que aparecem ao redor do meristema apical de algumas dicotiledôneas, por ocasião da iniciação floral, podem corresponder a gemas axilares de folhas atrofiadas. Estas gemas começam a se diferenciar em flores, mantendo o mesmo ângulo divergente entre o centro do meristema apical e o centro dos primórdios de folhas ou flores em ápices em estágio vegetativo e floral, respectivamente.

Em análises feitas em fotografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura, pode-se concluir que os ângulos entre os primórdios de folhas ou flores são iguais, mantendo, no entanto o mesmo número (4) de primórdios de folhas observado em microscópio estereoscópico até a iniciação floral. Verifica-se também, a existência de gemas laterais em estágio vegetativo,

mesmo em plantas com seu ápice principal transformado em floral (fig. 2-B). Estes fatos reforçam a hipótese de que os primórdios de flores não são gemas axilares de folhas atrofiadas.

V - RESUMO

A maior parte dos estudos sobre floração, enfoca plantas fotoperiódicas ou vernalizáveis, sendo que pouco se sabe sobre como ocorre este processo em plantas que não respondem a estes fatores ambientais.

Phaseolus vulgaris L. cv. Goiano Precoce, tem crescimento determinado, independentemente de fotoperíodo e de vernalização, para que ocorra a floração, já que a iniciação floral ocorre igualmente em plantas crescidas na luz e escuro contínuos.

O objetivo deste trabalho, foi verificar as alterações que ocorrem em ápices de plantas desta espécie, durante a transição floral.

Verificou-se, por observações em microscópio estereoscópico, que a iniciação floral em Phaseolus ocorre muito precocemente (7 dias após a embebição das sementes), sendo que a indução floral ocorre no 3° dia.

Para a verificação do efeito correlativo de órgãos na indução floral, realizou-se experimentos removendo-se diferentes partes da planta, concluindo-se que os primórdios de folhas trifolioladas parecem estar envolvidos neste processo. A remoção de um ou mais primórdios, provocou um atraso na iniciação floral. Constatou-se que são necessários 4 primórdios para que a iniciação floral ocorra normalmente. Estes fatos sugerem que os primórdios de folhas trifolioladas exercem algum controle sobre a iniciação floral, que pode ser via produção de um ou

mais fatores que levam à indução ou à iniciação floral nesta espécie.

O efeito de substâncias reguladoras de crescimento foi verificado pela aplicação destas substâncias, em diferentes concentrações, em ápices de plantas com 3 dias. O ácido indol 3 acético provocou um atraso na iniciação floral, enquanto que o ácido salicílico adiantou este processo.

Para a confirmação do envolvimento das substâncias fenólicas na iniciação floral desta espécie, realizou-se ensaios quantitativos específicos e ensaios qualitativos, por meio de cromatografia de camada delgada e detecção em luz ultra violeta. Nestes ensaios verificou-se um aumento significativo do teor de substâncias fenólicas a partir do dia da indução floral. Após a indução floral, nos cromatogramas, foi verificado o desdobramento de uma das manchas detectadas em U.V. Esta mancha, nos testes de atividade, quando os eluatos correspondentes foram aplicados em ápices de plantas de Phaseolus, mostrou-se, em alguns casos, ativa, adiantando este processo. Este fatores reforçam o envolvimento das substâncias fenólicas na iniciação floral nesta espécie. Para a caracterização desta substância ativa na iniciação floral, procedeu-se às leituras de seu espectro de absorção, por meio de espectrofotômetro, concluindo-se que possivelmente elas fazem parte do grupo dos fenilpropanóides.

Para a verificação da possível relação entre a ação das substâncias fenólicas e as auxinas, foram realizadas extrações de indóis provenientes do metabolismo de auxina radioativa

aplicada em ápices de plantas com diferentes idades, e por meio de HPLC e de detector de radioatividade, verificou-se os compostos resultantes do metabolismo da auxina aplicada. Sabe-se que as substâncias fenólicas podem mudar o curso metabólico das auxinas, formando compostos diferentes daqueles formados na ausência de fenóis. Pelos resultados obtidos, verificou-se não existir uma relação metabólica entre auxinas e fenóis, neste caso.

Em análises feitas em ápices, visando o teor de proteínas e carboidratos, verificou-se um aumento significativo destes compostos na época da indução floral. Estes aumentos podem estar relacionados com as alterações metabólicas que devem ocorrer intensamente nos ápices, durante a transição floral.

VI - BIBLIOGRAFIA

- O.A.A.C. Ass. Off. Agric. Chem., 1975. Official and Tentatives Methods of Analysis. 8th. Ed. pp.144.
- ABELES, F. B., 1973. Growth and developmental effect of ethylene In Ethylene in Plant Biology. Acad. Press.N.Y.pp. 135-143.
- AKSENOVA, N.P.; BAVRINA, T.V. & KONSTANTINOVA, T.N., 1980. Interaction of organs in regulation of the flowering of Soviet. Plant Physiol. 27 (5): 702-711.
- AMORIM, H.V.; ALVARES, M.L.M.; LOPES, C.R.; CARVALHO, A. & MONACO, L.C., 1978. Análise de compostos fenólicos em folhas de cafeeiro resistentes e susceptíveis a Hemileia vastratrix.Turrialba 28 (1): 57-60.
- BERNIER, G., 1966. The morfogenetic role of the apical meristem in higher plants.In Les Phytohormone et l'Organogenèses. Les Congress et Colloques de l'Université de Liège. 38: 151-211.
- BERNIER, G., 1971. Structural and metabolic changes in the shoot apex in transition to flowering. Can.J.Bot. 49: 803-819.

- BERNIER, G.; KINET, J.M. & SACHS, R.M., 1981. The Physiology of Flowering. II. CRC Press. Florida. 188pp.
- BESNARD-WIBAUT, C., 1981. Effectiveness of gibberellins and 6-BA on flowering of Arabidopsis thaliana. Physiol. Plant. 53: 205-230.
- BIELSKI, R.L. & TURNER, N.A., 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. Anal. Biochem. 17: 278-293.
- BODSON, M., 1977. Changes in the carbohydrate content of the leaf and the apical bud of Sinapis during transition to flowering. Planta (Berl.) 135: 19-23.
- BODSON, M., 1984. Assimilates and Evocation. In D. Vince-Prue, B. Thomas, K.E. Cockshull (eds.). Light and the Flowering Process. Acad. Press. London. pp. 157-169.
- BONNER, J. & ZEEVAART, J.A.D., 1962. Ribonucleic acid synthesis in the bud: an essential component of floral initiation in Xanthium. Planta (Berl.) 37: 43-49.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72:

BURG, S.P. & BURG, E.A., 1966. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 55: 262-269.

CHAILAKHYAN, M.Kh., 1968. Flowering hormones of plants. In F. Wightman e G. Setterfield (eds) Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. Runge Press. Ottawa. pp.1317-1340.

CHAILAKHYAN, M.Kh., 1975. Forty years of resarch on the hormonal basis of plant development - some personal reflections. Bot Rev. 41: 1-29.

CHARLES-EDWARDS, D.A., 1983. An hypothesis about the control of flowering. Ann. Bot. (Lond.) 52: 105-107.

CLELAND, C.F. & ZEEVAART, J.A.D., 1970. Gibberellins in relation to flowering and stem elongation in the long-day plant Silene armeria. Plant Physiol. 46: 131-144.

CLELAND, C.F. & AJAMI, A., 1974. Identification of the flowering inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicilic acid. Plant Physiol. 54: 904-906.

CLELAND, C.F. & TANAKA, O., 1981. Effect of day-light on the ability of salicilic acid induced flowering in the long-day plant Lemna gibba G3 and short day-plant Lemna paucicostata 6746. Plant Physiol. 64: 121-127.

- CLELAND, C.F.; TANAKA, O. & FEEDMAN, L.J., 1982. Influence of plant growth substances and salicylic acid on flowering and growth in the Lemnaceae (duckweeds). Aquatic Bot. 13 (1): 3-20.
- COHEN, Y. & DAVRAT, A., 1976. Gibberellins and inhibitors in relation to flowering of white clover (Trifolium repens L.). J.Exp.Bot. 27: 817-826.
- COOKE, A.R. & RANDALL, D.I., 1968. 2-haloethane phosphonic acid as ethylene releasing agents for the induction of flowering in pineapples. Nature(Lond.). 218: 974-975.
- DE FOSSARD, R.A., 1973. The effects of CCC, ethrel, ABA on the developmental and flowering of Chenopodium rubrum L. Bot. Gaz. 134: 103-117.
- DÓSTAL, R., 1967. On Integration in Plant. Harvard Un.Press. Massachusetts. 218 p.
- EGGER, K., 1969. Plant Phenol Derivatives. In Thin Layer Chromatography. E.S. Stahl (ed.). Springer-Verlag. Berlin. pp. 687-706.
- EL-ANTABLY, H.M.M.; WAREING, P.F. & HILLMAM, J., 1967. Some physiological responses to D.L. abscisic acid (dormin). Planta. (Berl.) 73: 74-90.

ERNSTSEN, A.; SANDBERG, G. & LUNDSTRÖN, K., 1987.

Identification of oxindole-3 acetic acid and metabolic conversion of indole-3-acetic acid to oxindole-3-acetic acid in Pinus sylvestris seeds. Planta(Berl.). 172: 47-52.

EVANS, L.T., 1969. A Short History of the Physiology of Flowering In L.T. Evans (ed) The Induction of Flowering. MacMillan Company of Australia. Melbourne. pp. 1-13.

EVANS, L.T., 1971. Flower induction and the florigen concept. Annu. Rev. Plant Physiol. 22: 365-394.

FRANCIS, D., 1981. A rapid accumulation of cell in G2 in the shoot apex of Silene colli-rosa during the first day of Planta(Berl.)floral induction. Ann.Bot. 48: 391-394.

FRANCIS, D. & LYNDON, R.F., 1979. Synchronization of cell division in the shoot apex of Silene in relation to flower initiation Planta(Berl.) 145: 151-157.

GORDON, M.H. & MACRAF, R., 1987. Instrumental Analysis in the Biological Sciences. Blackie & Son ltda . Glasgow. 243pp.

GORTER, CHR. J., 1951. The influence of 2,3,5 triiodobenzoic acid on the growing points of tomatoes II. The initiation of ringfasciation. Proc. Acad. Sci. Anist. 54c: 181-187.

- GUARDIOLA, J.L.; MONERRI, C. & AUGUSTI, M., 1982. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. Physiol. Plant. 55: 136-142.
- GRUPTA, S. & MAHESHWARI, S.C., 1970. Growth and flowering of Lemna paucicostata. II. Role of growth regulators. Plant Cell Physiol. 11: 97-106.
- GRAMBOW, H.J. & LANGENBECK-SCHWICH, B., 1983. The relationship between oxidase activity, hydrogen peroxide and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro. Planta. (Berl.) 157: 131-137.
- HADDAD, C.R.B. & VÁLIO, I.F.M., 1984. Crescimento correlativo em plantas de Phaseolus vulgaris L. I. Efeito das folhas e reguladores de crescimento no desenvolvimento do caule. An. IV Congr. SBSP. pp. 25-35.
- HARBORNE, J.B., 1973. Phytochemical Methods: Phenolic Compounds. Ed. Chapman and Hall. N.Y.. pp. 33-80.
- HAVELANGE, A. & BERNIER, G., 1983. Partial floral evocation by high irradiance in the long-day plant Sinapis alba. Physiol. Plant. 59: 545-550.
- HOAD, G.V.; LENTON, J.R.; JACKSON, M.B. & ATKIN, R.K., 1987. Hormones Action in Plant Development-A Critical Appraisal. Butterworth & Co (publishers) ltda. London. 315pp.

- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I., 1938. The water-culture method growing plants waterstress soil. Univ. Calif. Agric. Exp. Stn. Cir :347.
- HORRIDGE, J.S. & COCKSHULL, K.E., 1979. Size of Chrysanthemum shoot apex in relation to inflorescence initiation and development. Ann. Bot. 44(5): 547-549.
- KAREGE, F.; PENEL, C. & GREPPIN, H., 1982. Floral induction in spinach leaves by light, temperature and gibberellic acid: use of the photocontrol of basis peroxidase activity in biochemical marker. Z. Pflanzenphysiol. 107: 357-366.
- KINET, J.M. ; BODSON, M.; JACKMARD, A.& BERNIER, G., 1975. The inhibition of flowering by abscisic acid in Sinapis alba L.. Z. Pflanzenphysiol. 77: 70-74.
- KONISHI, M. & GALSTON, A.W., 1964. Light-induced changes in phenolic inhibitor of indolacetic acid oxidase in cotyledons of Pharbitis nil. Phytochemistry 3: 559-568.
- KREKULE, J. & KOHLI, R.K., 1981. The condition of the apical meristem of seedling responsive to a promotive effect of abscisic acid on flowering in short-day plant Chenopodium rubrum. Z. Pflanzenphysiol. 103: 45-51.
- KUMAR, S. & NANDA, K.K., 1981a. Gibberellic acid and salicylic acid caused formation of new proteins associates with

- KUMAR, S. & NANDA, K.K., 1981b. Effect of gibberellic acid and salicylic acid on the activity and electrophoretic pattern of IAA-oxidase during floral induction in Impatiens balsamina Biol.Plant. 23(5): 328-327.
- LAM, S.L. and LEOPOLD, A.C., 1960. Reversion from flowering to the vegetative state in Xanthium. Am.J.Bot. 47: 256-259.
- LANG, A., 1984. Die Photoperiodische Regulation von Förderung und Hemmung der Blütenbildung. Ber.Dtsch.Bot.Ges. 97: 293-314.
- LANGENBECK-SCHWICH, B. & GRAMBOW, H.J., 1984. Metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-methanol in wheat leaf segments. Physiol.Plant. 61: 125-129.
- LEONARD, M. & KINET, J.M., 1982. Endogenous cytokinin and gibberellic levels in relation to inflorescence development in tomato. Ann.Bot. 50(1): 127-130.
- LIVERMAN, J.L. & LANG, A., 1956. Induction of flowering in long-day plants by applied indoleacetic acid. Plant Physiol. 31: 147-150.
- MAZZAFERA, P., 1987. Estudos sobre a resistência induzida no complexo Coffea arabica L.-Hemileia vastatrix Berk. et Br.

- MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SIVEIRA, V. & OWENS, H.S., 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Anal. Chem. 22: 1156-1158.
- MICHNIEWICZ, M. & LANG, A., 1962. Effect of nine different gibberellins on stem elongation and flower formation in cold requiring and photoperiodic plants grown under non-inductive conditions. Planta(Berl.). 58: 549-563.
- MONTEIRO, A.M.; CROZIER, A. & SANDBERG, G., 1988. The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seed and seedlings of Dalbergia dolichopetala. Planta(Berl.) 425:1-8.
- MITRA, R. & SEN, S.P., 1966. The dependence of flowering on nucleic acid and protein synthesis. Plant Cell Physiol. 7: 167-170.
- MONNIER, M., 1978. Culture des embryos adultes de Phaseolus vulgaris; rôle des réserves. C.R.Acad.Sci. Ser.D.286: 461-464.
- MURRAY, D., 1968. Light and leaf growth in Phaseolus vulgaris Ph.D. Thesis University of Edinburgh.
- NANDA, K.K.; SURINDER, K. & SOOD, V., 1976. Effects of gibberellic acid and some phenols on flowering of Impatiens balsamina a quantitative short-day plant. Physiol.Plant. 38: 53-56

- OGAWA, Y. & ZEEVAART, J.A.D., 1967. The relation of growth regulators to flowering. In Physiology of Flowering in Pharbitis nil. S.Imamura (ed.) Japanese Society of Plant Physiologist. pp.107-119.
- PEREIRA, M.F.A., 1978. Primordial development in Phaseolus Ph.D. Thesis University of Edimburgh.
- PEREIRA, M.F.A., 1981. Regulation of seedling development in Phaseolus vulgaris L. by the cotyledons and primary leaves. Revt. Brasil. Bot. 4: 39-42.
- PHARIS, R.P., 1972. Flowering of Chrysanthemum under non-inductive long-days by gibberellins and by N⁶-benzyladenine. Planta. 105: 205-212.
- PIMENTEL GOMES, F., 1984. A Estatística Moderna na Pesquisa Agropecuária. Potafos. Piracicaba, S.P. pp. 161.
- RIVIER, L. & CROZIER, A., 1987. The Principles and Practice of Plant Hormone Analysis. II. Academic. Press .London. 401pp.
- SACHS, R.M., 1969. Cestrum nocturnum L. In The induction of Flowering. L.T. Evans (ed.), MacMillan of Australia: 424-434.
- SALISBURY, F.B., 1955. The dual role of auxin in flowering.

- SHARDE, M. & MURASHIGE, T., 1977. Hormonal requirements of exised Dianthus caryophyllus L. shoot apical meristem in vitro. Amer.J.Bot. 64(4): 443-448.
- SILVA, M.H.T. & RESENDE, F., 1956. Kalanchoe rotundifolia (PDLC) florescendo em permanente DC pela accao de auxina (AIA). Rev. Biol.(Lisbon).1: 63-67.
- SIMMONDS, J., 1982. In vitro flowering on leaf explants of Streptocarpus nobilis. The influence of culture medium components on vegetative and reproductive development. Can.J. Bot. 60: 1461-1467.
- SUGE, H. & OSAKA, A., 1966. Inhibitory effect of growth retardant on the induction of flowering in winter wheat. Plant Cell Physiol. 7: 617-630.
- SUNDBERG, B.; SANDBERG, G. & JENSEN, E., 1985. Identification and quantification of indole-3-methanol in Scots pine (Pinus sylvestris L.) Plant Physiol. 77; 952-955.
- TSE, A.T.Y.; RAMINA, A.; HACKETT, W.P. & SACHS, R.M., 1974. Enhanced inflorescence development in Bougainvillea "San Diego Red" by removal of young leaves and cytokinin treatment. Plant Physiol. 54: 404-407.
- VÁLIO, I.F.M. & SCHWABE, W.W., 1978. Correlative growth in

- VAN DE POL, P.A., 1972. Floral induction, floral hormones and flowering. Meded.Landbouechogesch Wageningen 72-9.89pp.
- VENKATARAMAN, R.; SETH, P.N. & MAHESHWARI, S.C., 1970. Studies on the growth and flowering of a short-day plant, Wolffia microscopica. I. General aspects and induction of flowering by cytokinins. Z.Pflanzenphysiol. 62: 316-327.
- VINCE-PRUE, D., 1975. Photoperiodism in Plant. McGraw Hill Book Co. London. 444pp.
- WAREING, P.F. & PHILLIPS, I.D.J., 1982. Growth and Differentiation in Plant. 3rd Edition. Pergamon Press.
- YEMN, E.W. & WILLIS, A.J., 1954. Estimation of carbohydrates in extracts by anthrone. Biochem. J. 57: 508-514.
- ZEEVAART, J.A.D., 1976. Physiology of flower formation. Annu. Rev Plant Physiol. 27: 321-348.
- ZEEVART, J.A.D., 1980. Perception nature and complexity of transmitted signal. Colloque Internationaux du C.N.R.S. (285). 89pp.