


CLAUDIA TATIANA ARAUJO DA CRUZ SILVA



**CONTROLE DO ALONGAMENTO CAULINAR NO PORTA-ENXERTO DE  
MACIEIRA MARUBAKAIDO: EFEITO DO ISOESTEVIOL E DERIVADOS, E  
MECANISMO DE AÇÃO DA 5F-HOMOETILCASTASTERONA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas,  
Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Adauto Bellarmino de Pereira  
Netto

CURITIBA

2003

CLAUDIA TATIANA ARAUJO DA CRUZ SILVA

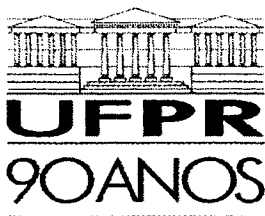
**CONTROLE DO ALONGAMENTO CAULINAR NO PORTA-ENXERTO DE  
MACIEIRA MARUBAKAIDO: EFEITO DO ISOESTEVIOL E DERIVADOS, E  
MECANISMO DE AÇÃO DA 5F-HOMOETILCASTASTERONA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas,  
Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira  
Netto

CURITIBA

2003



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Botânica  
**Curso de Pós-Graduação em Botânica**  
Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19031  
CEP: 81531-990 - CURITIBA - Paraná  
Tel. (41) 361-1625 - Fax (41) 266-2042  
E-mail: pgbotani@bio.ufpr.br - home page: <http://www.bio.ufpr.br>

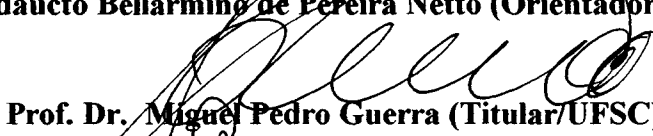
**“CONTROLE DO ALONGAMENTO CAULINAR NO PORTA-ENXERTO DE  
MACIEIRA MARUBAKAIDO: EFEITO DO ISOESTEVIOL E DERIVATIVOS E  
MECANISMO DE AÇÃO DA 5F-HOMOETILCASTASTERONA”**

por

***CLÁUDIA TATIANA ARAÚJO DA CRUZ SILVA***

**Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de mestre no Curso de  
Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos Professores**

  
**Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto (Orientador/UFPR)**

  
**Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Titular/UFSC)**

  
**Prof. Dr. Bras Heleno de Oliveira (Titular/UFPR)**

**Curitiba, 27 de fevereiro de 2003**

Dedico esta dissertação a meus pais por fazerem de mim o que sou, ao meu marido Marcos e ao meu filho João Pedro por todo apoio e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela força espiritual, principalmente nos momentos difíceis. Continue olhando por mim.

Ao Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto, pela orientação, pela oportunidade, pelas sugestões e ensinamentos. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, Assis e Elizete, (cujas palavras me faltam), pelo exemplo, amor. Tenho muito orgulho de vocês.

Ao meu marido, Marcos, por todo incentivo, e principalmente por acreditar em mim, me apoiando a seguir meu caminho. Mo cê, essa conquista também é sua.

Ao meu filho, João Pedro, que mesmo sofrendo com a distância nunca deixou de me dar amor e com isso forças para continuar. Você é o amor da minha vida.

Ao meu irmão, Luiz Fernando, pelas quebra-de-galhos, companheirismo e por ser você. Adoro esse seu jeitinho avoadado.

À Profª. Dra. Lydia Galagovsky, do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade de Buenos Aires, Argentina, pela molécula 5F-HCTS cedida para a realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelas moléculas de isoesteviol e seus derivados cedidas para a realização de parte deste trabalho e pelas informações prestadas.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Botânica, em especial à Profª. Dra. Thelma Alvim Veiga Ludwig, pelos auxílios prestados.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela autorização para o uso do cromatógrafo de gás e aos professores Dra. Gisele Klassen e Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo auxílio no uso do mesmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À minha avó Evani, por ser a vó que todos gostariam de ter e com isso ajudado a construir o que sou. Você é muito especial para mim.

Às minhas tias Beatriz e Belmair pelo exemplo, serenidade e coragem. Eu sei que vocês sempre torceram por mim.

À minha amiga e eterna professora Dra. Maristela Jorge Padoin, pelos conselhos e apoio em diferentes fases da minha vida. Obrigado por me mostrar que eu posso e abrir meus olhos em muitas situações.

À minha amiga Silvia pela amizade, pelas trocas de idéias, conversas e saídas, nunca esquecerei do bar "malária". Você está no lado esquerdo do peito.

Às minhas amigas Mariza, Simone Slusarski, Eliane e Fernanda por todos os momentos alegres e tristes em que estivemos juntas, contando umas com as outras, por nossas reuniões que sempre nos trouxeram paz aos nossos corações. Que a distância não apague nossa amizade.

Às minhas amigas de graduação, Justina, Francine, Simone Aparecida (Peixera) e Adrianinha, apesar da distância vocês estão em meu coração. Sinto saudades.

Aos colegas de mestrado, Juliana Marzinek, Sonia, Simone, Marília, Danielle, Juliana Stancik, Cláudia Chaves, João Carlos e Paulo, pelo companheirismo, conversas, descontração e risos. Sempre lembrarei de vocês.

À Andréia, pela acolhida na minha chegada e saída, com seu coração generoso; pela amizade, companheirismo nos passeios quando ficava no final de semana, vou sentir sua falta. Amiga você vai longe, basta acreditar.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica, e principalmente aos colegas, Guilherme, Karen, Ana Claudia, Ricardo, Adriano, pela disposição em compartilhar idéias e pequenos favores, e principalmente à Fernanda Simas pelas conversas, trocas de idéias, apoio sempre que precisei e incentivo. Obrigada.

Aos demais colegas de mestrado pelo convívio.

Ao Secretário do Departamento de Botânica, Narciso, pelos almoços sempre animados.

Ao colega Nilson, do Laboratório de Microtécnica, pelas poucas, mas valiosas conversas filosóficas.

Ao secretário da Pós-graduação em Botânica, José Carlos, apesar do pouco tempo de convívio, sempre com muita disposição em ajudar.

À Profa. Dra. Juliana Menestrina, do Departamento de Bioquímica, pelas dúvidas esclarecidas, pelas moléculas cedidas para testes, pelo estímulo nas horas difíceis.

Às Professoras, Dra. Kátia Christina Zuffellato-Ribas e Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas, pela disposição, conversas e auxílio.

Aos demais colegas do Laboratório de Micropropagação, Angelo, Cristiane, Joemir, Nayara, Nelson, pelos auxílios e pelo ambiente de trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram nesta etapa da minha vida, vocês serão lembrados com muito carinho.

“As coisas podem chegar até aqueles que esperam, mas são somente as sobras deixadas por aqueles que lutam”

**Abraham Lincoln**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	Ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1 GÊNERO <i>Malus</i> .....	2
2.1.1 <i>Malus prunifolia</i> cultivar Marubakaido.....	2
2.2 TERPENÓIDES.....	5
2.2.1 Biossíntese dos Terpenóides.....	6
2.3 BRASSINOESTEROIDES.....	9
2.3.1 Biossíntese dos Brassinoesteróides.....	13
2.3.2 Efeitos Fisiológicos de Brassinoesteróides.....	17
2.3.2.1 Alongamento de Partes Aéreas.....	18
2.3.2.2 Aplicações Práticas para Brassinoesteróides.....	19
2.3.2.2 Interações com Outros Reguladores do Crescimento Vegetal.....	19
2.4 ETILENO.....	20
2.4.1 Biossíntese do Etileno.....	21
2.4.2 Efeito do Etileno Sobre o Alongamento Caulinar.....	21
2.4.3 Efeito de Brassinoesteróides Sobre a Biossíntese de Etileno.....	24
2.5 ISOESTEVIOL E DERIVADOS.....	24
2.5.1 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni e Propriedades.....	24
2.5.2 Biossíntese dos Glicosídeos-Esteviol.....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	30
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	30
3.3 TESTE DO EFEITO DO BRASSINOESTERÓIDE 5F-HCTS SOBRE A TAXA DE LIBERAÇÃO DE ETILENO.....	31

3.3.1 Variáveis avaliadas.....	32
3.4 TESTE DO EFEITO DO ETILENO SOBRE A ARQUITETURA DE PARTES AÉREAS.....	34
3.4.1 Variáveis avaliadas.....	34
3.5 TESTE DO EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE A ARQUITETURA DE PARTES AÉREAS.....	37
3.5.1 Variáveis avaliadas.....	39
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 EFEITO DO BRASSINOESTERÓIDE 5F-HCTS SOBRE A TAXA DE LIBERAÇÃO DE ETILENO, CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE INTERESSE PARA MICROPROPAGAÇÃO E TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO.....	41
4.2 EFEITO DE ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM ETILENO SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE INTERESSE PARA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO...	45
4.3 EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE INTERESSE PARA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO...	53
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	
5.1 ESTIMULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ETILENO PELA 5F- HOMOETILCASTASTERONA.....	61
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO POTENCIAL DO ISOESTEVIOL E DE DOIS DERIVADOS SOBRE O PADRÃO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO PORTA-ENXERTO MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	64
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO .....	5
FIGURA 2.2 -	VIA METABÓLICA DOS TERPENÓIDES.....	7
FIGURA 2.3 -	VIA SUBCELULAR PARA A SÍNTESE DE TERPENÓIDES.....	8
FIGURA 2.4 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO BRASSINOLÍDEO (BL).....	10
FIGURA 2.5 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA CASTASTERONA (CS).....	11
FIGURA 2.6 -	BIOSSÍNTESE DO BRASSINOLÍDEO VIA OXIDAÇÃO PRECOCE E TARDIA DO CARBONO 6.....	16
FIGURA 2.7 -	VIA METABÓLICA DO ETILENO.....	23
FIGURA 2.8 -	COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE GLICOSÍDEOS EM <i>Stevia rebaudiana</i> . MVA: ÁCIDO MEVALÔNICO, IPP: ISOPENTENIL PIROFOSFATO, ER: RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, GA: GIBERELINA.....	26
FIGURA 2.9 -	ESTRUTURA QUÍMICA DOS GLICOSÍDEOS- ESTEVIOL .....	26
FIGURA 2.10 -	VIA METABÓLICA DO ESTEVIOL E ALGUNS DE SEUS GLICOSÍDEOS.....	29
FIGURA 3.1 -	VISTA GERAL DAS CULTURAS NA SALA DE AMBIENTE CONTROLADO.....	30
FIGURA 3.2 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO 5F-HCTS.....	32
FIGURA 3.3 -	FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A APLICAÇÃO DO BRASSINOESTERÓIDE 5F- HCTS.....	33
FIGURA 3.4 -	FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O CRESCIMENTO DOS EXPLANTES EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM ETILENO.....	35
FIGURA 3.5 -	FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O CRESCIMENTO DOS EXPLANTES EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM ETILENO.....	36

FIGURA 3.6 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL .....	37
FIGURA 3.7 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL OXIMA.....	38
FIGURA 3.8 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL AMINA.....	39
FIGURA 3.9 -	FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A APLICAÇÃO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS.....	40
FIGURA 4.1 -	ASPECTO GERAL DE PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO TRATADAS COM 5F-HCTS, TRINTA DIAS APÓS A APLICAÇÃO DO BRASSINOESTERÓIDE.....	42
FIGURA 4.2 -	EFEITO DO 5-F HCTS SOBRE A TAXA DE LIBERAÇÃO DE ETILENO DE PARTES AÉREAS DO PORTA ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	44
FIGURA 4.3 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	45
FIGURA 4.4 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O NÚMERO DE RAMOS PRINCIPAIS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	46
FIGURA 4.5 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	47
FIGURA 4.6 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA- ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO	

	<i>IN VITRO</i> .....	48
FIGURA 4.7 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS PRINCIPAIS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	49
FIGURA 4.8 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	50
FIGURA 4.9 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	50
FIGURA 4.10 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	51
FIGURA 4.11 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FORMAÇÃO DE TECIDO DE CALO NA BASE DOS EXPLANTES EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	52
FIGURA 4.12 -	EFEITO DO ETILENO SOBRE A MASSA FRESCA E A MASSA SECA DOS CALOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	52
FIGURA 4.13 -	EFEITO DO ISOESTEVIOL SOBRE O ALONGAMENTO CAULINAR DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	53
FIGURA 4.14 -	EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS	

	AMINA E OXIMA SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	54
FIGURA 4.15-	EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O NÚMERO DE RAMOS PRINCIPAIS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	55
FIGURA 4.16 -	EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	56
FIGURA 4.17 -	EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	57
FIGURA 4.18 -	EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O COMPRIMENTO DE RAMOS PRINCIPAIS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	58
FIGURA 4.19 -	EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O COMPRIMENTO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	59

FIGURA 4.20 - EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O COMPRIMENTO DE RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO <i>IN VITRO</i> .....	60
--	----

#### LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENÓIDES BASEADA NO NÚMERO DE CARBONOS QUE COMPÕEM A MOLÉCULA.....	6
TABELA 2.2 - DISTRIBUIÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES NO REINO VEGETAL.....	12
TABELA 4.1- EFEITO DA APLICAÇÃO DO 5F-HCTS SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	- ácido abscísico
ACC	- ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
Acetil-CoA	- acetil-coenzimaA
AOA	- ácido amino-oxiacético
AVG	- aminoetoxivinilglicina
BAP	- 6-benzilaminopurina
BE	- 24-epibrassinolídeo
BL	- brassinolídeo
BRs	- brassinoesteróides
CN	- campestanol
CPP	- <i>ent</i> -copalil pirofosfato
CR	- campesterol
CS	- castasterona
ER	- retículo endoplasmático
5F-HCTS	5-flúor-homoetil-casterona
GA	- giberelina
GPP	- geranyl difosfato
GGPP	-geranyl geranyl difosfato
ha	- hectares
HMG-CoA	- $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA
IAA	- ácido indol-acético
IPP	- isopentenil difosfato
MACC	- malonil-ACC
MS	- meio de cultura formulado por MURASHIGE e SKOOG (1962)
MVA	- ácido mevalônico
SAM	- S-adenosil metionina

## RESUMO

Neste trabalho foi investigado o possível envolvimento do etileno na estimulação do alongamento caulinar do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*) induzido pelo brassinoesteróide 5-Flúor homoetilcastasterona (5F-HCTS), e também o potencial efeito do isoesteviol e derivados, amina e oxima, sobre o alongamento caulinar do porta-enxerto crescendo *in vitro*. Partes aéreas originadas a partir de segmentos nodais cultivados por 15 dias receberam doses únicas de solução etanólica de 5F-HCTS, isoesteviol, isoesteviol-amina ou isoesteviol oxima, na forma de microgota (5  $\mu$ L), aplicada sobre a nervura central da folha mais próxima do ápice caulinar, medindo no mínimo 2 mm de largura. A taxa de liberação de etileno por partes aéreas tratadas com 5F-HCTS foi monitorada a partir de dosagens, realizadas através de cromatografia gasosa, da concentração do regulador de crescimento em frascos hermeticamente fechados. Etileno também foi injetado em frascos hermeticamente fechados contendo partes aéreas não tratadas com quaisquer dos diterpenóides utilizados neste estudo. Trinta dias após o tratamento com os diterpenóides ou etileno, as partes aéreas foram avaliadas para comprimento dos ramos principais, laterais primários e laterais secundários, e número de ramos principais e laterais com comprimento maior ou igual a 15mm. Além das variáveis associadas com a arquitetura caulinar, partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com etileno também foram avaliadas para massa fresca e seca de calos formados na base dos explantes. Partes aéreas tratadas e não tratadas com o brassinoesteróide 5F-HCTS (0,5  $\mu$ g.explante<sup>-1</sup>) apresentaram progressivo aumento da taxa de liberação de etileno, que atingiu um pico no oitavo e no quinto dia de cultivo, respectivamente, para partes aéreas tratadas e não tratadas com 5F-HCTS, respectivamente. Após atingir o pico, foi verificado decréscimo gradual na taxa de liberação de etileno. Aumento estatisticamente significativo ( $p=0,05$ ) na taxa de multiplicação, no número de ramos laterais primários e no comprimento de ramos laterais secundários foi observado para partes aéreas tratadas com 5F-HCTS. Inibição significativa ( $p=0,05$ ) para todas as variáveis analisadas foi verificada para partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com etileno, em todas as concentrações de etileno testadas. Nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) foi encontrada para quaisquer das variáveis avaliadas, quando partes aéreas do porta-enxerto marubakaido foram tratadas com isoesteviol ou seus dois derivados, amina e oxima. Estes resultados indicam que o etileno não é um mensageiro secundário na via de transdução de sinal do brassinoesteróide 5F-HCTS, no caso da estimulação do alongamento caulinar induzida pelo brassinoesteróide, e que, embora estruturalmente semelhantes às giberelinas, o isoesteviol e seus dois derivados, amina e oxima, não apresentam a capacidade de modificar a arquitetura de partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido crescendo *in vitro*.

Palavras-chave: brassinoesteróide, taxa de liberação de etileno, diterpenóides, isoesteviol, *Malus prunifolia*.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate: 1. A possible involvement of ethylene on the stimulation of branch elongation of the marubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* cv. Marubakaido), driven by the brassinosteroid 5-fluoro-homoethylcastasterone; 2. The potential effects of isosteviol and two derivatives, oxime and amine, on the branch elongation of the *in vitro*-grown rootstock. Shoots originated from nodal segments grown for 15 days *in vitro* were treated with single doses of ethanolic solutions of 5F-HCTS, isosteviol, isosteviol-amine or isosteviol-oxime, in the form of microdrops (5  $\mu$ L) applied on the main vein of the leaf closest to the shoot apex, measuring at least 2 mm wide. The ethylene release rate of 5F-HCTS-treated shoots was monitored through dosages, carried out by gas chromatography, of the growth regulator concentration in sealed vessels. Ethylene was also injected in sealed vessels containing shoots not treated with any of the diterpenoids used in this study. Thirty days after the treatment with diterpenoids or ethylene, the shoots were evaluated for: 1. Length of the main, primary lateral and secondary lateral branches; 2. Number of main, primary and secondary lateral branches measuring at least 15 mm in length. Besides the parameters related to branch architecture, shoots grown in ethylene-enriched atmosphere were also evaluated for fresh and dry weight of calli grown at the base of the explants. Shoots treated or not with the brassinosteroid 5F-HCTS (0,5  $\mu$ g.explant<sup>-1</sup>) showed progressive increase in the ethylene release rate which reached a peak on the eighth and fifth day of the culture cycle, respectively, for shoots treated and not treated with 5F-HCTS. After reaching the peak, gradual decline in the ethylene release rate was observed. Statistically significant increase ( $p=0,05$ ) in the multiplication rate, number of primary lateral branches and length of secondary lateral branches was observed for 5F-HCTS-treated shoots. Significant inhibition ( $p=0,05$ ) of all of the evaluated parameters was found for shoots grown in ethylene-enriched atmosphere, regardless ethylene concentration. No statistically significant ( $p=0,05$ ) change was found for any of the parameters evaluated when shoots of the marubakaido apple rootstock were treated with isosteviol or its two derivatives, amine or oxime. These results indicate that: 1. Ethylene is not a secondary messenger on the brassinosteroid 5F-HCTS signal transduction pathway, in the case of the brassinosteroid-induced stimulation of shoot elongation of the *in vitro*-grown marubakaido apple rootstock. 2. Although structurally similar to gibberellins, the isosteviol and its two derivatives, amine and oxime, are not able to change shoot architecture of the *in vitro*-grown marubakaido apple rootstock.

Key-words: brassinosteroid, ethylene release rate, diterpenoids, isosteviol, *Malus prunifolia*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os brassinoesteróides têm sido encontrados em ampla gama de estruturas vegetais, a exemplo de grãos-de-pólen, sementes e tecidos vegetativos jovens, tipicamente em baixas concentrações. Vários estudos demonstraram que brassinoesteróides desempenham papel essencial em diversos processos fisiológicos, dentre os quais a expansão celular, o alongamento de partes aéreas e a estimulação da produção de etileno.

Os glicosídeos-esteviol, diterpenóides de estrutura química semelhante as giberelinas, são encontrados em maior concentração nas folhas de *Stevia rebaudiana*, preferencialmente em tecidos adultos, sendo que seu papel fisiológico ainda não está esclarecido, embora tenha sido demonstrado que estes compostos podem apresentar atividade biológica, a exemplo de atividade inseticida.

O porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*) é uma espécie de origem japonesa que vem despertando grande interesse de produtores de maçãs, em função de apresentar boa afinidade com as cultivares-copa, bem como se adaptar a diferentes tipos de solo e apresentar resistência a patógenos.

Neste trabalho, investigou-se o possível envolvimento do etileno na proliferação de brotações laterais estimulada por brassinoesteróides no porta-enxerto de macieira marubakaido e também os efeitos de três diterpenóides derivados do esteviosídeo em estimularem o alongamento caulinar e/ou a proliferação de brotações laterais neste porta-enxerto de macieira.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Malus*

O gênero *Malus* pertence à família Rosaceae, a qual compreende aproximadamente 100 gêneros com ampla distribuição nas regiões temperadas do hemisfério Norte. A família Rosaceae é uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas, contendo aproximadamente 3.000 espécies, com hábitos bastante variados (ervas, subarbustos, arbustos, trepadeiras e árvores). Na flora brasileira, apenas 5 gêneros representam esta família, estando estes gêneros distribuídos principalmente na região Sul. A família Rosaceae apresenta grande importância econômica em função da grande variedade de espécies frutíferas que possui, onde se incluem espécies do gênero *Malus* (JOLY, 1983).

De acordo com CRONQUIST (1988), a posição taxonômica da espécie empregada neste estudo é a seguinte:

FILO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
ORDEM	Rosales
FAMÍLIA	Rosaceae
GÊNERO	<i>Malus</i> Mill.
ESPÉCIE	<i>Malus prunifolia</i> (Willd.) Borkh
CULTIVAR	<i>Malus prunifolia</i> cultivar Marubakaido

#### 2.1.1 *Malus prunifolia* cultivar Marubakaido

A cultura de macieira (*Malus domestica* Borkh) ocupa o segundo lugar na produção mundial de frutas (OLIVEIRA e FORTES, 1996). O Sul do Brasil é responsável por 99% da produção nacional desta cultura, atingindo uma área cultivada de 30.846 hectares (Associação Brasileira de Produtores de Maçã – ABPM, 2003).

O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçãs, com 55% da produção, seguido pelo Rio Grande do Sul, com 40% da produção e os estados do Paraná, São Paulo e

Minas Gerais são responsáveis por aproximadamente 4% da produção nacional (Associação Brasileira de Produtores de Maçã – ABPM, 2003).

A cultura da macieira no Brasil apresentou um grande desenvolvimento a partir da década de 70. A área plantada passou de 2.770 hectares em 1969 para 31.070 hectares em 2001, sendo a cultura frutífera que teve o maior aumento de produção, de 14.218 toneladas colhidas em 1977 para 968.063 toneladas em 2000 e 857.340 toneladas em 2002 (Associação Brasileira de Produtores de Maçã – ABPM, 2003). Todavia, este aumento de produção não é suficiente para atender a demanda interna, fazendo-se necessária à importação de maçã, principalmente da Argentina e Chile (CENTELLAS *et al.*, 1999). O crescente interesse apresentado nos últimos anos pela cultura da macieira aumentou a demanda por mudas de boa qualidade (SCHUCH e PETERS, 1993), bem como, por tecnologias mais eficientes para a produção de mudas de macieira (FLORES *et al.*, 1999).

Um dos porta-enxertos de macieira mais promissores introduzidos no Brasil é o Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh), de origem japonesa, também conhecido por Maruba, o qual já vem sendo amplamente utilizado na formação de pomares comerciais nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SCHUCH e PETERS, 1993).

Este porta-enxerto apresenta características que vem despertando grande interesse entre os produtores e pesquisadores (CAMARGO *et al.*, 1999) dentre as quais, precocidade, produtividade, vigor, facilidade de enraizamento (LOCATELLI *et al.*, 1998), boa afinidade com todas as cultivares-copa atualmente utilizadas (FLORES *et al.*, 1999), além de ser resistente a *Phytophthora cactorum* (LOCATELLI *et al.*, 1998; ZANOL *et al.*, 1998), à podridão-do-colo e a *Rosellinia* spp (SCHUCH e PETERS, 1993). Porém, o marubakaido é susceptível a viroses, a exemplo do “Stem Groovins” e “Stem Pitting”, que normalmente causam a morte do porta-enxerto (FLORES *et al.*, 1999).

O aprimoramento da técnica de micropropagação, com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação das partes aéreas e fornecer plantas adequadas ao enraizamento e a aclimação, é de fundamental importância para a viabilização econômica da produção de mudas de macieira através da micropropagação (ZANOL *et al.*, 1998). Todavia é necessário que a técnica de propagação seja adaptada conforme as necessidades de cada espécie e cultivar, pois estes diferem geneticamente entre si, o que as fazem responder diferentemente a micropropagação (PEREIRA *et al.*, 2001; SCHUCH e PETERS, 1993).

O cultivo *in vitro* se constitui em um conjunto de técnicas utilizadas com a finalidade de permitir o crescimento de células isoladas, de um grupo de células, tecidos ou órgãos sob condições controladas em ambiente artificial, asséptico. Atualmente, as técnicas de cultivo *in vitro* vêm sendo amplamente utilizadas como ferramentas para estudos de bioquímica, fisiologia e genética, além de aplicações biotecnológicas, a exemplo da micropropagação (SILVA, 2002).

A micropropagação é o método mais utilizado para a propagação da macieira, por se obter uma grande quantidade de mudas livres de doenças, em um espaço mais curto de tempo, quando comparado ao método tradicional, a enxertia, que é um processo mais demorado, além do propágulo ser susceptível a contaminação quando é empregada a técnica de enxertia (SCHUCH e PETERS, 1993). Além disto, proporciona uma elevada taxa de multiplicação e permite a produção de mudas durante todos os meses do ano (PEREIRA *et al.*, 2001).

A propagação da macieira por meio de micropropagação tem sido descrita por diversos autores (CENTELLAS *et al.*, 1999; FLORES *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2001).

O meio de cultura utilizado nas diversas fases da micropropagação deve fornecer à planta os nutrientes necessários ao metabolismo das células e os fatores de crescimento responsáveis pela diferenciação de brotos e raízes. A adição de reguladores do crescimento vegetal ao meio de cultura permite o desenvolvimento adequado de brotações durante o período de micropropagação da macieira. Na fase de multiplicação, é necessário que se tenha um meio de cultura rico em citocinina para haver produção de grande número de brotações através do desenvolvimento de meristemas laterais (SCHUCH e PETERS, 1993). FIORINO e LEVA (1983), trabalhando com diferentes cultivares de macieira, concluíram que a benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais ativa para a multiplicação de brotações.

NUNES *et al.* (1999) testaram o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), com o objetivo de desenvolver um protocolo de propagação massal *in vitro* para o porta-enxerto de macieira Marubakaido, a partir do cultivo de meristemas. A concentração de 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP mostrou-se mais eficiente que as outras concentrações testadas, resultando na formação de 4,73 brotos por explante.

## 2.2 TERPENÓIDES

As plantas produzem uma grande variedade de compostos, dentre os quais, os terpenóides. Estes compostos representam a segunda maior classe de constituintes ativos de plantas, perdendo apenas para os alcalóides, e estão subdivididos em várias subclasses (LIMA, 2000).

Os terpenóides são uma família de diversos compostos químicos que são encontradas na natureza e são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de muitos organismos. Estes compostos químicos desempenham papel essencial na manutenção da fluidez da membrana (esteróis), transporte elétrico (ubiquinona, menaquinona e plastoquinona), glicosilação de proteínas (dolicol) e na regulação do desenvolvimento celular, neste último caso, através de hormônios e proteínas regulatórias modificadas (McCASKILL e CROTEAU, 1998). Os terpenóides são também chamados de isoprenóides, e são os constituintes mais comuns dos óleos essenciais. É uma ampla família de produtos naturais, com mais de 22.000 compostos conhecidos. A estrutura destes compostos pode ser interpretada pelas unidades de isopreno (= terpenos - unidades de 5 carbonos que compõem os terpenos, FIGURA 2.1) unidas de diferentes formas (NORDIN, 1999).

FIGURA 2.1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOPRENO



Fonte: NORDIN, O. Stereoselective Synthesis of Semiochemicals Related to Pine Sawflies: Stereochemical and synthetic studies on 1,6-germacradien-5-ol and *Pseudomonas* lipase catalysed transesterification of primary 2-methylalcohols, 1999.; SMITH *et al.*, **Bioquímica: Aspectos Gerais**. 7. ed., Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 1983, 785p. capítulo 7 p.102-119.

Os terpenóides são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno presentes no esqueleto carbono da estrutura (TABELA 2.1). Estas classes são subdivididas em grupos baseados nas várias características das suas estruturas. Por exemplo, os monoterpenos podem ser divididos em compostos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (NORDIN, 1999).

TABELA 2.1 – CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENÓIDES BASEADA NO NÚMERO DE CARBONOS QUE COMPÕEM A MOLÉCULA.

Monoterpenos	C <sub>10</sub>
Sesquiterpenos	C <sub>15</sub>
Diterpenos	C <sub>20</sub>
Sesterterpenos	C <sub>25</sub>
Triterpenos	C <sub>30</sub> (esteróides)
Tetraterpenos	C <sub>40</sub> (carotenóides)
Politerpenos	(C <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> (n > 8)

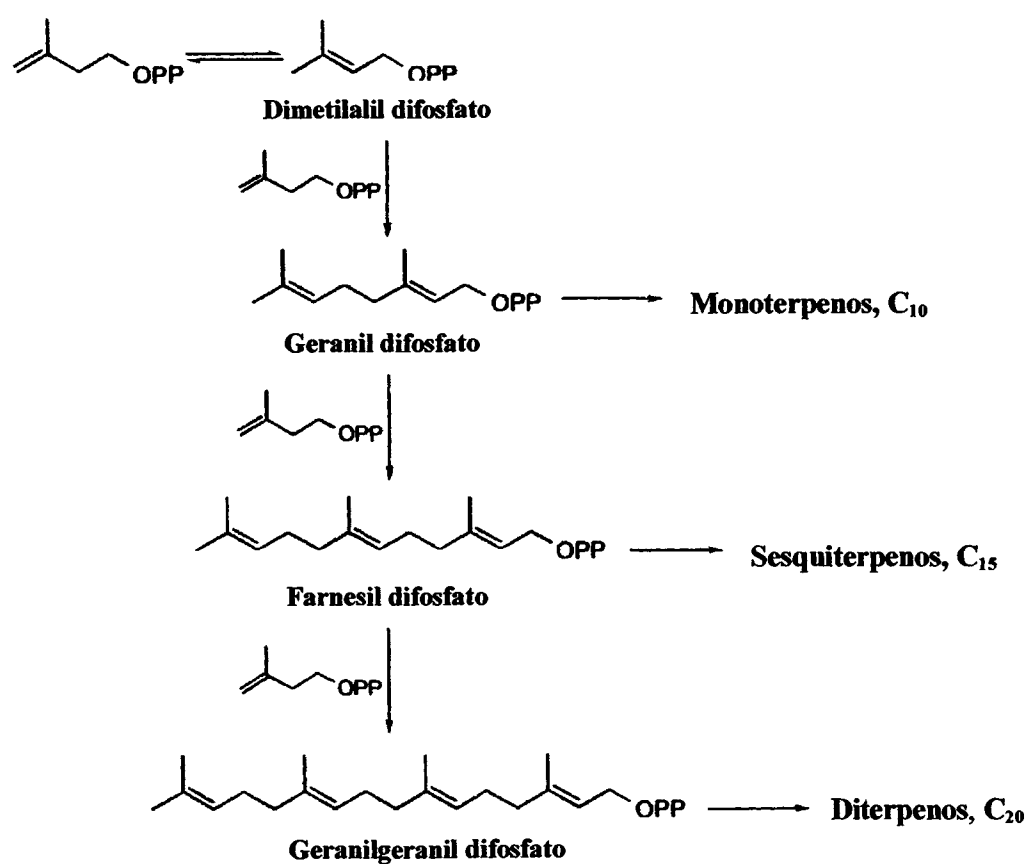
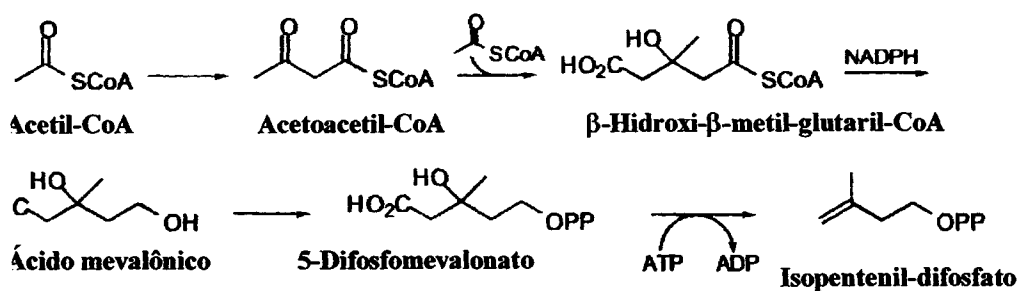
FONTE: NORDIN, O. Stereoselective Synthesis of Semiochemicals Related to Pine Sawflies: Stereochemical and synthetic studies on 1,6-germacradien-5-ol and *Pseudomonas* lipase catalysed transesterification of primary 2-methylalcohols, 1999.

### 2.2.1 Biossíntese dos Terpenóides

A compreensão do processo de formação dos terpenóides nas plantas, embora seja de grande interesse biotecnológico, ainda se constitui em um desafio devido a grande variedade de terpenóides produzidos a partir de um intermediário comum, o isopentenil difosfato (IPP), além da complexa organização e das características regulatórias das vias biossintéticas. O estudo das vias biossintéticas dos terpenóides é um campo de pesquisa tradicional, todavia, ainda muito ativo, submetido à reavaliação e revisões periodicamente (McCASKILL e CROTEAU, 1998).

A via biossintética para mono-, sesqui-, e diterpenóides está ilustrada na FIGURA 2.2. Duas moléculas de acetil-coenzimaA (acetil-CoA) são condensadas, formando acetoacetil-CoA, a qual é novamente condensada com outra molécula de acetil-CoA para formar β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). O HMG-CoA é reduzido na presença de NADPH

FIGURA 2.2 – VIA METABÓLICA DOS TERPENÓIDES

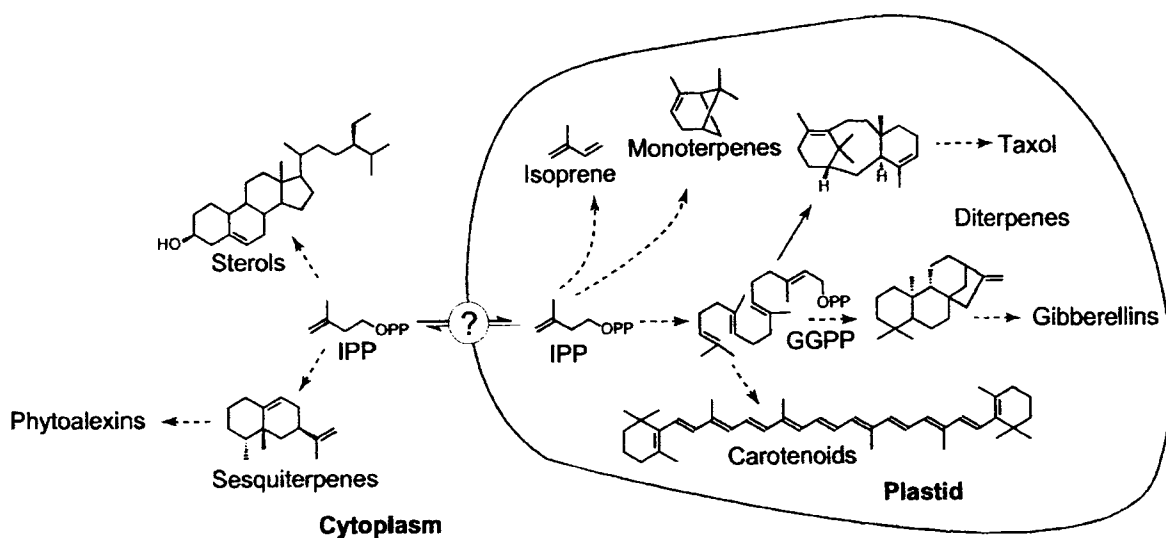


FONTE: modificado a partir de NORDIN, O. Stereoselective Synthesis of Semiochemicals Related to Pine Sawflies: Stereochemical and synthetic studies on 1,6-germacradien-5-ol and *Pseudomonas* lipase catalysed transesterification of primary 2-methylalcohols, 1999.

para ácido mevalônico (MVA), o qual é fosforilado em dois passos para formar 5-difosfomevalonato, o qual sofre uma descarboxilação e uma desidratação originando o IPP. Todos estes passos têm sido estudados em detalhe e suas enzimas isoladas a partir de diferentes fontes e caracterizadas. O IPP homoalílico é isomerizado para o seu correspondente isômero, o dimetilalil difosfato. Então, o dimetilalil difosfato é dimerizado com IPP para formar geranyl difosfato, o qual é o precursor de todos os monoterpênos. Posteriormente, o geranyl difosfato é dimerizado com uma outra unidade de IPP para formar o (E,E)-farnesil difosfato, o qual é o precursor dos sesquiterpênos. O precursor dos diterpenóides, o geranylgeranyl difosfato (GGPP) é formado no próximo passo, com a adição de mais uma molécula de IPP ao farnesil difosfato (NORDIN, 1999).

Os sesquiterpênos, fitoalexinas e esteróis (triterpênos) são produzidos no citoplasma. O isopreno, monoterpênos, diterpênos e carotenóides (tetraterpênos) são produzidos nos plastídeos. (FIGURA 2.3). Existe uma quantidade variável de troca de IPP entre os compartimentos subcelulares, quantidade esta que depende do tipo de tecido e estágio de desenvolvimento (McCASKILL e CROTEAU, 1998).

FIGURA 2.3 – VIA SUBCELULAR PARA A SÍNTESE DE TERPENÓIDES



FONTE: McCASKILL, D. e CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants, 1998.

## 2.3 BRASSINOESTERÓIDES

Sabe-se há muitos anos que o pólen é uma rica fonte de compostos que regulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, sendo estes compostos estudados desde as décadas de 30 e 40. Mais de 60 espécies de plantas tiveram seus pólenes avaliados, e aproximadamente metade destas se mostraram capazes de estimular o alongamento em internós de feijão (MANDAVA, 1988).

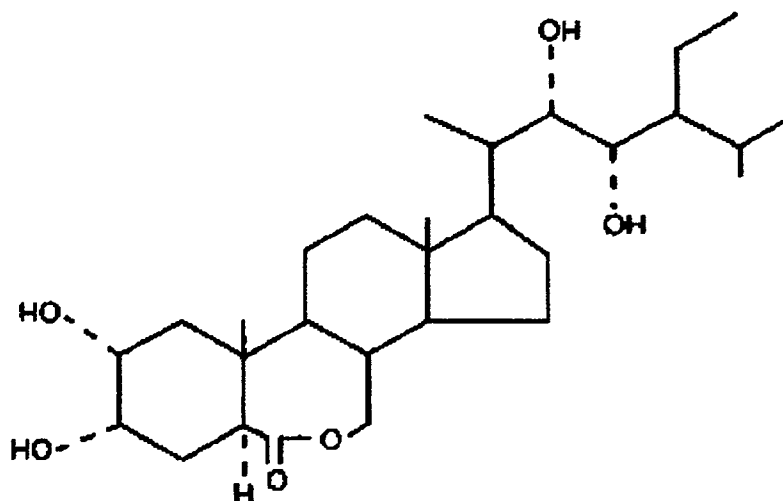
Entre os extratos de pólenes avaliados em inúmeras pesquisas, um maior aumento do crescimento caulinar no bioensaio do internó do feijão, foi obtido a partir de extratos dos pólenes do amieiro (*Alnus glutinosa* L.) e couve-nabo (*Brassica napus* L.), os quais produziram uma resposta incomum, que combinou alongamento (atividade biológica típica de giberelinas) com espessamento e curvatura (MITCHELL *et al.*, 1970).

A partir do isolamento e da purificação de diversos compostos do pólen de *Brassica napus* L. com atividade biológica, foi proposta uma nova classe de hormônios de natureza lipídica, os brassinos, termo este derivado do gênero *Brassica* (MANDAVA, 1988; ARTECA, 1995b).

A partir de 227 Kg do pólen da couve-nabo foram extraídas e purificadas 10 mg de um material cristalino e biologicamente ativo, então denominado brassinolídeo (BL) ( $2\alpha,3\alpha,22(R),23(R)$ -tetrahidroxi-24(S)-metil- $\beta$ -homo-7-oxa-5 $\alpha$ -colestano-6-ona (FIGURA 2.4). O BL está presente na proporção de duzentas partes por bilhão no pólen e aproximadamente 10 partes por milhão na fração lipídica purificada (MANDAVA, 1988).

O BL foi a primeira substância reguladora do crescimento vegetal identificada de natureza esteroideal. Desde a sua descoberta a atividade biológica do BL tem sido avaliada em numerosos sistemas-teste, tendo a molécula mostrado-se envolvida em respostas tais como: aumento da resistência a baixas temperaturas, doenças, herbicidas e estresse salino, alongamento celular e caulinar e estimulação de germinação de sementes; diminuição de queda e aborto de frutos; atividade anti-ecdisteróide; e inibição do crescimento e desenvolvimento de raízes (ARTECA, 1995a; MANDAVA, 1988).

FIGURA 2.4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO BRASSINOLÍDEO (BL)

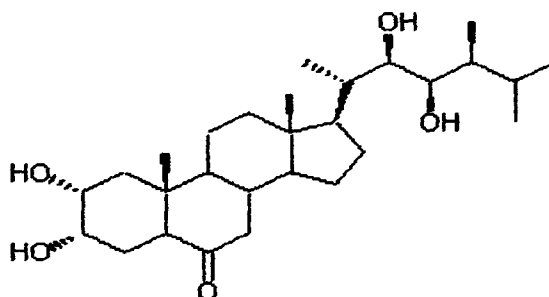


FONTE: KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. *Physiology of Woody Plants*. 2.ed., New York : Academic Press, 1996.

O BL, assim como muitos outros compostos quimicamente relacionados a ele, têm sido encontrados amplamente distribuídos no reino vegetal. Estes compostos apresentam muitos efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento vegetal, sendo coletivamente denominados de brassinoesteróides, BRs (MANDAVA, 1988). Entre os BRs de ocorrência natural, o brassinolídeo e a castasterona (CS) (FIGURA 2.5) são considerados os mais importantes, em função da sua ampla distribuição no reino vegetal, bem como de sua potente atividade biológica (ARTECA, 1995b).

Mais de sessenta BRs têm sido identificados, incluindo dois conjugados (SAKURAI e FUJIOKA, 1993), e mais de quarenta inteiramente caracterizados (IGLESIAS-ARTEAGA, 2002). Os BRs têm sido encontrados numa ampla variedade de plantas, incluindo dicotiledôneas, monocotiledôneas, gimnospermas e algas, e isolados a partir de vários órgãos tais como: folhas, flores, frutos, sementes, partes aéreas, galhas e caules (TABELA 2.2) (ARTECA, 1995a,b), nos quais as concentrações variam entre 0,5 picogramas (pg) a 30 nanogramas (ng) por grama de peso fresco. Todavia, no pólen, as concentrações atingem valores mais elevados, entre 5 e 190 ng por grama de peso fresco (CREELMAN e MULLET, 1997).

FIGURA 2.5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CASTASTERONA (CS)



FONTE: SCHAEFER, S.; MEDEIRO, S.A.; RAMIREZ, J.A.; GALAGOVSKY, L.R.; PEREIRA-NETTO, A.B. Brassinosteroid-driven enhancement of the *in vitro* multiplication rate for the marubakaido apple rootstock [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh]. *Plant Cell Rep.*, n. 20, p. 1093-1097, 2002.

BRs aplicados exogenamente em plantas estimulam o alongamento e a divisão celular em segmentos caulinares e plântulas, em concentrações que variam do micro ao picomolar. Além da sua atividade na promoção do crescimento em partes aéreas, BRs exógenos têm se mostrado capazes de inibir o crescimento radicular, aumentar o gravitropismo, retardar a abscisão foliar, aumentar a resistência ao estresse e promover a diferenciação do xilema (SAKURAI e FUJIOKA, 1993).

Tecidos jovens apresentam maior amplitude de resposta quando comparados a tecidos adultos (MANDAVA, 1988). Tecidos em crescimento, de maneira geral, apresentam níveis de BRs mais elevados quando comparados a tecidos maduros (CLOUSE, 1998).

BRs radio-marcados aplicados exogenamente são translocados das raízes para a parte aérea em espécies a exemplo de arroz, pepino e trigo, ocorrendo este transporte provavelmente via xilema. O transporte apresenta-se menos eficiente quando a aplicação ocorre nas folhas, sendo predominantemente acrópeto (SASSE, 1997; CLOUSE e SASSE, 1998). Para o transporte a longas distâncias, não é conhecido se o mesmo é importante para a modulação dos níveis endógenos de BRs e, conseqüentemente, para a modulação dos padrões de crescimento e

desenvolvimento normais da planta (CLOUSE e SASSE, 1998). Todavia, efeitos a curtas distâncias foram verificados em estudos com sementes e pólen (SASSE, 1997).

TABELA 2.2 - DISTRIBUIÇÃO DE BRASSINOESTERÓIDES NO REINO VEGETAL

Espécie	Parte da planta	Brassinoesteróide
<i>Brassica napus</i> L.	Pólen	BR <sub>1</sub> , BR <sub>2</sub>
<i>Brassica campestris</i>	Fruto	BR <sub>1</sub> , BR <sub>2</sub> , BR <sub>12</sub> , BR <sub>14</sub> , BR <sub>15</sub>
<i>Castanea crenata</i>	Galha, caule, folhas, flor	BR <sub>1</sub> , BR <sub>2</sub> , BR <sub>5</sub> , BR <sub>15</sub>
<i>Thea sinensis</i>	Folha	BR <sub>1</sub> , BR <sub>4</sub> , BR <sub>7</sub> , BR <sub>8</sub> , BR <sub>12</sub> , BR <sub>15</sub>
<i>Distylium racemosum</i>	Galha, folha	BR <sub>1</sub> , BR <sub>2</sub> , BR <sub>4</sub> , BR <sub>15</sub>
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Semente	BR <sub>1</sub> - BR <sub>6</sub> , BR <sub>13</sub> , BR <sub>16</sub>
<i>Pharbitis purpurea</i>	Fruto	BR <sub>2</sub> , BR <sub>15</sub>
<i>Typha latifolia</i>	Pólen	BR <sub>7</sub>
<i>Oryza sativa</i>	Parte aérea	BR <sub>2</sub> , BR <sub>4</sub>
<i>Zea mays</i>	Pólen	BR <sub>2</sub> , BR <sub>7</sub> , BR <sub>8</sub>
<i>Pinus thunbergil</i>	Pólen	BR <sub>2</sub> , BR <sub>7</sub>
<i>Picea sitchensis</i>	Parte aérea	BR <sub>2</sub> , BR <sub>7</sub>
<i>Hydrodyction reticulatum</i>	Colônia	BR <sub>9</sub> , BR <sub>12</sub>

FONTE: modificado a partir de MANDAVA, N. B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.39, p.23-52, 1988.

Os mutantes deficientes na biossíntese dos BRs são aqueles que, quando tratados exogenamente com o regulador de crescimento vegetal recuperam as características fenotípicas do tipo selvagem. A deficiência na biossíntese de BRs é geralmente causada por lesões em genes que codificam enzimas envolvidas na via biossintética dos BRs. Já os mutantes insensíveis aos BRs podem apresentar o mesmo fenótipo dos mutantes deficientes, todavia os mutantes insensíveis a BRs não são capazes de recuperar as características do tipo selvagem após suplementação exógena de BRs. Os mutantes insensíveis apresentam usualmente lesões em genes que codificam para receptores ou elementos da via de transdução do sinal de BRs (CLOUSE *et al.*, 1996).

Evidências de que BRs são essenciais para muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal tem sido obtidas a partir do isolamento de mutantes genéticos que apresentam insensibilidade a BRs, a exemplo do *bril* (CLOUSE *et al.*, 1996)/*cbb2* (KAUSCHAMANN *et al.*, 1996) e *ucu1* (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2002) ou deficiência na biossíntese de BRs, a exemplo de *dpy* (KOKA *et al.*, 2000), *dwarf 1/cbb1*; *cbb3/cpd*, *lkb* (CRELMAN e MULLET, 1997) e *det2* (LI e CHORY, 1999).

### 2.3.1 Biossíntese dos Brassinoesteróides

O entendimento detalhado de como os níveis endógenos de BRs são regulados via síntese, degradação e conjugação, é essencial para que um modelo da ação molecular dos BRs possa ser construído. A elucidação da(s) via(s) biossintética(s) dos BRs também é importante para o desenvolvimento de inibidores específicos de sua biossíntese (FUJIOKA e SAKURAI, 1997a).

Os sítios de síntese dos BRs na planta ainda não foram identificados. Todavia, tem sido sugerido que BRs podem ser produzidos em todos os tecidos, visto que a biossíntese e a transdução de sinal destes compostos ocorre em ampla variedade de órgãos, além de que efeitos de BRs a curta distância possivelmente também ocorram em grãos de pólen, sementes e em tecidos cultivados *in vitro* (CLOUSE e SASSE, 1998).

Todos os brassinoesteróides de ocorrência natural são esteróides com 27, 28 ou 29 átomos de carbono com estrutura baseada no  $5\alpha$ -colestano (THOMPSON, 1982; SAKURAI, 1999). Variações na estrutura de BRs, resultantes de diferentes substituições nos anéis A e/ou B e reações de oxidação ou redução nas cadeias laterais que ocorrem durante a biossíntese, alteram a atividade biológica destes compostos (CREELMAN e MULLET, 1997).

Tradicionalmente, as vias de biossíntese de BRs têm sido elucidadas através do suprimento de intermediários marcados com deutério para linhagens celulares de *Vinca minor* Madagascar (SAKURAI e FUJIOKA, 1996). Tem sido demonstrado que os BRs são sintetizados através de vias biossintéticas múltiplas, paralelas (FUJIOKA *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 1997). Sabe-se que os BRs mais abundantes são o BL e seus precursores biossinteticamente relacionados (YOKOTA, 1997). FUJIOKA e SAKURAI (1997a) demonstraram que existem pelo menos duas vias biossintéticas ramificadas dando origem ao BL (FUJIOKA e SAKURAI, 1997a; SAKURAI e FUJIOKA, 1997). Dependendo do estado de oxidação do carbono 6 (C-6), estas vias são

conhecidas como vias precoce ou tardia de oxidação C-6. Na via precoce, o C-6 é oxidado a uma cetona no campestanol (CN), enquanto que na via tardia o C-6 é oxidado na 6-deoxocasterona (6-deoxoCS) (CHOE *et al.*, 1998).

Partindo de um precursor inicial, campesterol (CR), os intermediários de BRs sofrem uma série de hidroxilações, reduções, uma epimerização, e uma levando a forma mais oxidada, BL (FUJIOKA e SAKURAI, 1997a; FIGURA 2.4). A oxidação da CS, o último passo na biossíntese de BRs, não ocorre em algumas espécies (YOKOTA *et al.*, 1991; CHOE *et al.*, 1998). Nestes casos, CS age como o principal BR, ao invés do BL (YOKOTA *et al.*, 1991).

A redução do CR a CN e a oxidação do CN a 6-oxoCN tem sido demonstrada através de experimentos envolvendo suplementação exógena de BRs. A hidroxilação do 6-oxoCN originando a CS é pressuposta, mas demonstração experimental direta deste passo não tem sido possível porque a quantidade endógena de CS é 500 vezes menor que a de 6-oxoCN. A grande diferença entre as quantidades endógenas da CS e do 6-oxoCN sugere que esta conversão pode ser o passo limitante na biossíntese do BL (CLOUSE e SASSE, 1998).

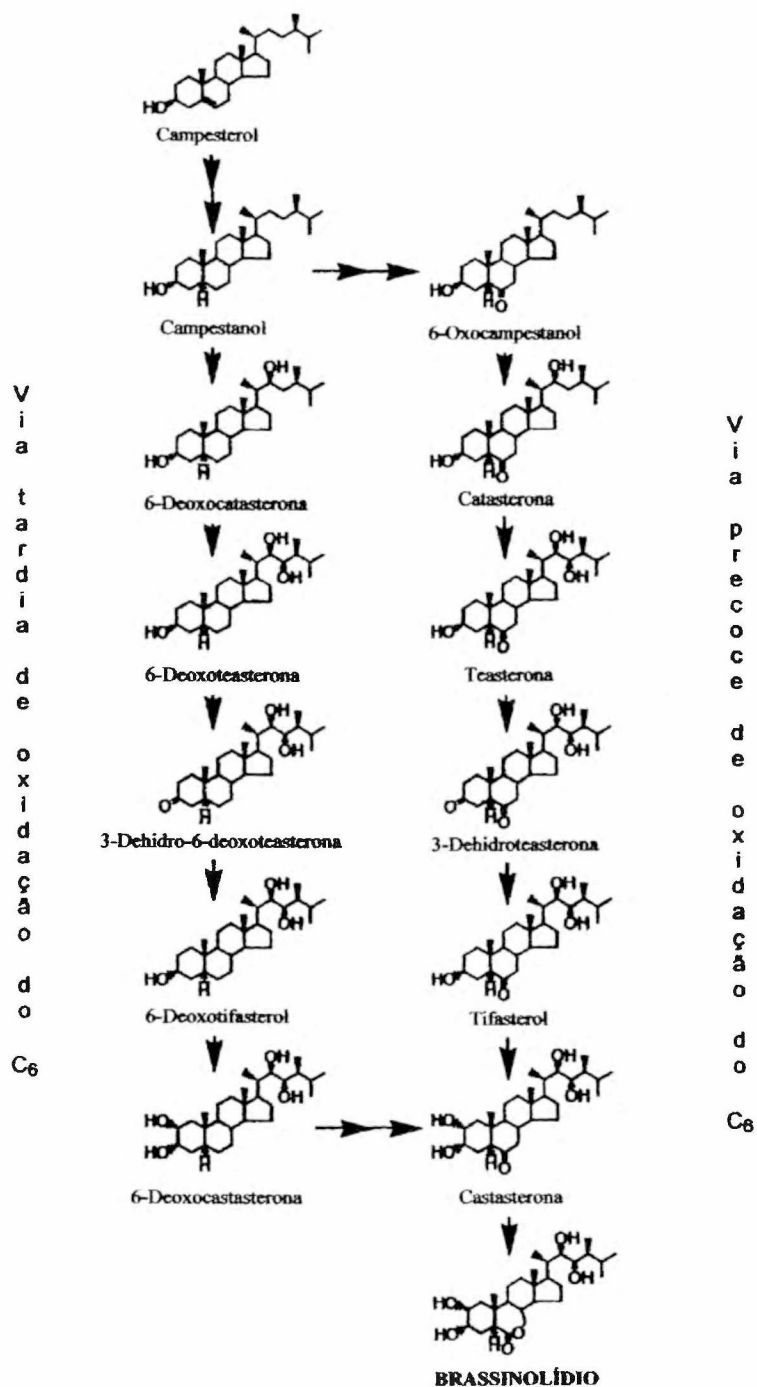
No passo final da conversão de CS a BL, algumas diferenças têm sido encontradas entre plântulas. Em plântulas de *Catharanthus roseus*, a seqüência biossintética teasterona→tifasterol→CS→BL foi demonstrada, tendo sido a seqüência teasterona→tifasterol→CS também encontrada em tabaco e arroz, em experimentos onde substratos marcados com deutério foram empregados (FUJIOKA e SAKURAI, 1997a). Todavia, em arroz e tabaco, a conversão CS→BL não pôde ser demonstrada (CLOUSE e SASSE, 1998). Entretanto, desde que a CS e o BL co-ocorrem como BRs endógenos em plântulas de arroz, provavelmente a via biossintética opera de maneira completa também nesta planta. Uma possível explicação para a impossibilidade de se demonstrar conversão de CS em BL em plantas de arroz é que a CS marcada fornecida exogenamente nos experimentos pode não ter alcançado o sítio de biossíntese do BL nesta planta (CLOUSE e SASSE, 1998).

Uma reavaliação dos BRs endógenos em cultura de células de *C. roseus*, resultou na identificação de 6-deoxo-CS, 6-deoxo-tifasterol e 6-deoxo-teasterona, tendo os níveis endógenos de 6-deoxoCS sido os mais elevados dentre todos os BRs encontrados (CHOI *et al.*, 1996; 1997; FUJIOKA e SAKURAI, 1997a). Experimentos com deutério marcado demonstraram a conversão de 6-deoxo-teasterona em 6-deoxo-tifasterol, através da formação de 3-dehidro-6-deoxoteasterona (CHOI *et al.*, 1997), e também da 6-deoxo-CS em CS e, em seguida, de CS em

BL (CHOI et al., 1996). Portanto, estes experimentos demonstraram a existência de uma via biossintética alternativa para BL, através da oxidação tardia do carbono 6 (Fujioka & Sakurai, 1997a). Em plântulas de arroz e tabaco, a exemplo do que ocorre em cultura de células de *C. roseus*, as vias biossintéticas com oxidação em C<sub>6</sub> precoce ou tardia (FIGURA 2.6) co-existem, e, em plantas como *Arabidopsis*, representantes de ambas as vias biossintéticas co-ocorrem, o que sugere que ambas as vias podem estar amplamente distribuídas no reino vegetal (CLOUSE e SASSE, 1998).

Entre os brassinoesteróides naturais, pouca atenção era dirigida aos 6-deoxo-BRs, a exemplo da 6-deoxo-CS, uma vez que estas formas mostravam-se menos ativas em relação aos 6-oxo-BRs em vários bioensaios. Os 6-deoxo-BRs eram considerados como produtos finais abortados, sem a capacidade de serem convertidos em BRs ativos. Porém, recentes estudos mostrando a ocorrência natural destas formas 6-deoxo em um amplo número de espécies vegetais, têm levado a uma reavaliação quanto ao seu envolvimento na via biossintética dos BRs (FUJIOKA e SAKURAI, 1997a).

FIGURA 2.6 - BIOSÍNTESE DO BRASSINOLÍDIO VIA OXIDAÇÃO PRECOCE E TARDIA DO CARBONO 6



FONTE: Modificado a partir de FUJIOKA, S.; SAKURAI, A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol. Plant.*, n. 100, p. 710-715, 1997a.

Recentes estudos em plântulas de *Arabidopsis* demonstraram que ambas as vias biossintéticas descritas para BRs (oxidação precoce ou tardia do carbono 6) ocorrem nesta espécie. Do ponto de vista quantitativo, parece que a via biossintética de oxidação tardia do carbono 6 predomina em plântulas crescendo na luz, dando origem à maior parte do BL produzido por estas plantas, enquanto que a via precoce de oxidação do carbono 6 parece ser a via predominante em plântulas crescendo no escuro. Nestas plântulas, em presença de luz, os intermediários 6-deoxo-BRs mostraram uma atividade biológica mais alta, resultando em um crescimento mais acentuado, em relação aos seus intermediários correspondentes na forma 6-oxo-BRs. Em contrapartida, no escuro, as formas 6-deoxo-BRs mostraram-se menos ativas do que as formas 6-oxidadas correspondentes (NOGUCHI *et al.*, 2000).

Até pouco tempo eram conhecidos dois pontos possíveis de oxidação do carbono 6 durante a biossíntese dos BRs: a conversão do CN em 6-oxo-CN (via de oxidação precoce) e a conversão da 6-deoxo-CS em CS (via de oxidação tardia). Porém, em estudos realizados por NOGUCHI *et al.* (2000), o intermediário tifasterol foi encontrado como um dos metabólitos originados a partir do fornecimento exógeno de 6-deoxo-tifasterol. A partir deste resultado, pode-se sugerir que a oxidação no carbono 6 pode acontecer também em outros passos, indicando que as vias precoce e tardia de oxidação do carbono 6 podem ocorrer simultaneamente, com interconversões entre seus intermediários, e não como duas vias completamente isoladas (CHOE *et al.*, 1998).

### 2.3.2 Efeitos Fisiológicos de Brassinoesteróides

Desde a descoberta do BL, sua atividade biológica, bem como a de compostos intermediários da sua via biossintética, e de BRs sintéticos e seus análogos, têm sido testadas em vários bioensaios, bem como suas interações com inibidores e promotores do crescimento vegetal (CLOUSE e SASSE, 1998; MANDAVA, 1988).

Os efeitos fisiológicos de BRs incluem respostas como o alongamento e a divisão celular, que resultam no alongamento caulinar. Efeitos estimulatórios de BRs sobre o alongamento caulinar ocorrem na luz, mas não no escuro. A ação dos BRs na regulação do crescimento parece ser mediada pelo fitocromo. BRs também atuam no desenvolvimento reprodutivo e vascular, polarização da membrana e bombeamento de prótons, modulação do estresse, crescimento do

tubo polínico, enrolamento e curvatura de folhas, inibição do crescimento de raízes, além da estimulação da síntese do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (ARTECA, 1995a,b; CLOUSE e SASSE, 1998; MANDAVA 1988, YOKOTA, 1997), da diferenciação do xilema (ARTECA, 1995a), e da germinação de sementes (STEBER e McCOURT, 2001).

### 2.3.2.1 Alongamento de Partes Aéreas

Aplicação de BRs em níveis que variam do nano ao micromolar, causam acentuado alongamento de hipocótilos, epicótilos e pedúnculos em dicotiledôneas, bem como de coleóptiles e mesocótilos em monocotiledôneas. Este efeito estimulatório tem sido mostrado sob condições de luz branca, verde e vermelha de baixa intensidade. Entretanto, pouco ou nenhum efeito foi encontrado no escuro, sugerindo que a ação de BRs pode resultar da superação do efeito inibitório que a luz apresenta sobre o alongamento celular (ARTECA, 1995a).

BRs induzem o alongamento de epicótilos de plantas de ervilha normais e anãs, de segmentos apicais de soja anã, do epicótilo de feijão munguba, feijão Azuki e girassol, assim como do hipocótilo de pepino (MANDAVA, 1988).

WANG *et al.* (1993) demonstraram que BRs podem estimular o alongamento de hipocótilos em *Brassica chinensis* cv Lei-Choi (Pakchoi) pelo aumento do relaxamento da parede celular sem uma concomitante mudança nas propriedades químicas da parede.

Os possíveis efeitos do brassinolídeo (BL) sobre o crescimento de partes aéreas de vários cultivares de plântulas de arroz foram testados por CHON *et al.* (2000), tendo resultados significantes observados nas concentrações de  $10^{-7}$  e  $10^{-5}$  M. O efeito do BL foi verificado em todos os cultivares testados, demonstrando uma clara atividade fisiológica deste BR sobre o crescimento de partes aéreas de arroz. O brassinolídeo estimulou o alongamento do mesocótilo, coleóptile e bainha foliar em todos os cultivares. Além de seu efeito sobre o alongamento, o BL aumentou o número de folhas nas plântulas de arroz quando usado na concentração de  $10^{-5}$  M. Estes resultados indicam que o BL exerce efeito sobre o alongamento celular, divisão celular e diferenciação de novas folhas em plântulas de arroz.

### 2.3.2.2 Aplicações Práticas para Brassinoesteróides

Muitos estudos buscando aplicações práticas para BRs na agricultura têm sido realizados, principalmente no Japão, em função do grande interesse científico que esta classe de compostos desperta naquele país, e também devido à síntese em maior escala de compostos caracterizados como BRs que é realizada no país. Diversas companhias da área de pesticidas tem realizado experimentos práticos utilizando o BL, o 24-epibrassinolídeo e o (22S,23S)-28-homobrassinolídeo (ARTECA, 1995a).

Dentre as aplicações práticas que têm sido estudadas, uma das que se tem destacado é o tratamento de sementes com BRs. Em sementes tratadas com BRs, tem-se observado aumento no percentual de germinação, estimulação do enraizamento e estimulação do alongamento dos ramos vegetativos. Outras aplicações para BRs na agricultura incluem a estimulação do florescimento de plantas de dias longos, efeito não observado em plantas de dias curtos, além do aumento da resistência contra doenças (KAMURO e TAKTSUTO, 1999; MANDAVA, 1988). Em meados dos anos 80 demonstrou-se que BRs poderiam aumentar a produção de radite, alface, feijão, pimenta e batata. Entretanto, resultados subseqüentes sob condições de produção foram desapontadores por causa da inconsistência dos resultados obtidos. Mais recentemente, testes de campo em larga escala, realizados na China e Japão a mais de seis anos, mostraram que o 24-epibrassinolídeo, aumentou a produção agrônômica de culturas como o trigo, milho, tabaco, melancia e pepino. Entretanto, uma vez mais, dependendo das condições da cultura, métodos de aplicação e outros fatores, os resultados eram impressionantes ou marginais (ARTECA, 1995b).

### 2.3.3 Interações com Outros Reguladores do Crescimento Vegetal

BRs apresentam forte interação com outros reguladores do crescimento vegetal e através destas interações, regulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal (KOZLOWSKI e PALLARDY, 1996; SAKURAI e FUJIOKA, 1993). BRs interagem fortemente com auxinas, provavelmente de maneira sinérgica. Quando BRs são aplicados em plantas, isolados ou juntamente com auxinas, a síntese de etileno é estimulada. O ácido abscísico (ABA) também interage fortemente com BRs e previne os efeitos induzidos pelos mesmos. Aplicação exógena de

BRs e giberelinas induz respostas que parecem ter mecanismos de ação independentes, porém com efeitos semelhantes e aditivos (KOZLOWSKI e PALLARDY, 1996; KOSLOWSKI, 1997; MANDAVA, 1988).

## 2.4 ETILENO

O etileno é o único regulador do crescimento vegetal gasoso. Quimicamente, o etileno é um hidrocarboneto insaturado muito simples, cuja fórmula é  $C_2H_4$ . Também é encontrado na atmosfera, pois é liberado pelo aquecimento ou oxidação de compostos orgânicos (BIASI, 2002).

O etileno, um potente modulador do crescimento e desenvolvimento vegetal (ECKER, 1995), é produzido por todas as células vegetais, além de alguns fungos e bactérias (SALISBURY e ROSS, 1992).

A produção de etileno varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do órgão vegetal. A sua concentração sofre um aumento nas folhas e flores durante a senescência, nos frutos próximos da maturação e nas gemas quando entram em dormência. A produção de etileno também aumenta quando os tecidos vegetais são atacados por pragas e doenças ou sofrem danos de origem mecânica ou química (BIASI, 2002).

O etileno está envolvido em muitos aspectos do ciclo de vida da planta, incluindo germinação de sementes, desenvolvimento de pelos e nódulos nas raízes, senescência das flores, abscisão e maturação de frutos (WANG *et al.*, 2002).

A produção de etileno é altamente regulada por sinais e em resposta a estímulos ambientais, de natureza biótica (ataque patógenos) e abiótica (ferimento, hipoxia, ozônio, resfriamento) (GUZMAN e ECKER, 1990).

### 2.4.1 Biossíntese do Etileno

O precursor do etileno é a metionina. Inicialmente, a metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM) por meio da enzima S-adenosilmetionina sintase. Parte da SAM formada é reciclada através do Ciclo de Yang, através das reações: metiltioadenosina → metiltioribose-1-fosfato → 2-ceto-4-metilbutirato → metionina → SAM (FIGURA 2.7) (ARTECA, 1995a; McKEON e YANG, 1995; BIASI, 2002).

A SAM pode sofrer a ação da ACC sintase e formar o ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), que pode ser convertido em etileno pela enzima ACC-oxidase (também conhecida como enzima formadora de etileno – EFE) ou em um composto conjugado do ACC, o malonil-ACC (MACC), um produto inativo, pela enzima ACC N-maloniltransferase (FIGURA 2.7) (ARTECA, 1995a). Em 1995, foi identificado um segundo composto conjugado do ACC, o ácido (1- $\gamma$ -L-glutamina) ciclopropano-1-carboxílico (GACC), o qual também pode ser formado pela via metabólica do etileno (MARTIN *et al.*, 1995).

O metabolismo de etileno pode ser controlado através da regulação da produção de ACC, via ACC sintase, pela conjugação do ACC a MACC ou a GACC, e pela conversão do ACC a etileno através da atividade da ACC oxidase (OSBORNE, 1989).

O etileno é produzido em taxas que variam de 0,05 à 100nL.(peso fresco)<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (OSBORNE, 1989). O etileno pode estimular a sua própria produção de etileno (síntese autocatalítica) ou inibição (autoinibição) (MATTHYS *et al.*, 1995).

Por se tratar de um composto orgânico simples, o etileno pode ser obtido de forma sintética, o que facilita muito a sua aplicação na agricultura. Na agricultura, o etileno é obtido pela utilização do ácido 2-cloroetilfosfônico, também conhecido como etefon (SALISBURY e ROSS, 1992).

### 2.4.2 Efeito do Etileno Sobre o Alongamento Caulinar

A morfogênese da planta é governada pela coordenação da divisão e expansão celular. Muitas evidências sugerem que os reguladores do crescimento vegetal estão envolvidos na regulação destes eventos, mas pouco se sabe como eles interagem ocasionando o crescimento regulado no tempo e espaço (COLLETT *et al.*, 2000).

A dominância apical pode ser definida como o controle inibitório exercido pelo meristema apical de partes aéreas sobre o crescimento e desenvolvimento das gemas laterais (CLINE, 1997). A dominância apical controla o crescimento de ramos nos estádios de desenvolvimento vegetativo de muitas espécies herbáceas e arbóreas no estágio juvenil (CLINE, 2000), sendo este processo quem determina o grau de ramificação e, conseqüentemente, a arquitetura de partes aéreas da planta (CLINE, 1994).

Em hipocótilos de *Arabidopsis*, as auxinas parecem promover o crescimento em algumas circunstâncias, e inibir em outras, tendo sido sugerido que as auxinas podem inibir o alongamento através do etileno (SMALLE *et al.*, 1997), visto que as auxinas são conhecidas por serem capazes de promover a síntese de etileno, e o etileno, por sua vez, ser conhecido por inibir o alongamento de hipocótilos (McKEON e YANG, 1995).

COLLETT *et al.*, (2000), avaliando a interação entre auxinas e o etileno, relataram que a auxina e o etileno atuam independentemente no controle do alongamento de hipocótilos. Aqueles autores verificaram que quando as respostas ao etileno foram bloqueadas, usando um mutante resistente ao etileno ou utilizando a aminoetoxivinilglicina (AVG), para inibir a biossíntese de etileno, o efeito da auxina no alongamento do hipocótilo permaneceu inalterado.

O etileno promove o crescimento radial e inibe o crescimento longitudinal do caule de dicotiledôneas. O fornecimento de etileno em altas concentrações pode provocar a paralisação do crescimento em altura e o intumescimento do caule de plântulas. Nestas condições também ocorre o fenômeno do diageiotropismo, ou seja, o caule que estava crescendo com geotropismo negativo passa a ter crescimento horizontal (BIASI, 2002).



### 2.4.3 Efeito de Brassinoesteróides Sobre a Biossíntese de Etileno

Em segmentos de hipocótilo estiolado de feijão, BRs aumentam a biossíntese de etileno pela estimulação da atividade da enzima ácido 1-aminociclopropano carboxílico (ACC) sintase (vide item 2.4.1). A biossíntese de etileno induzida por BRs pode ser inibida pelo ácido aminooxiacético (AOA), que bloqueia a formação do ACC através da inibição da enzima ACC sintase, por íons cobalto, que inibem a ação da enzima ACC oxidase, assim como pelos inibidores do transporte de auxinas ácido 2,3,5-triidobenzóico e ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropiónico (ARTECA, 1995a).

Na produção de etileno, BRs atuam sinergisticamente com auxinas ativas e cálcio (ARTECA, 1995a).

A presença de luz inibe a produção de etileno induzida por BRs, embora tenha pouco efeito sobre a produção de etileno induzida por ácido indol-acético (IAA) (ARTECA, 1995a).

Aumento nas concentrações de ACC e de etileno têm sido observadas em raízes de tomate tratadas com BRs, crescidas em solução hidropônica. Como o etileno tem um efeito inibitório no crescimento de raízes e BRs estimulam a síntese de etileno, é possível que a inibição do crescimento observada em raízes tratadas com BRs seja causada pela produção de etileno induzida por BRs (ARTECA, 1995a,b).

## 2.5 ISOESTEVIOL E DERIVADOS

### 2.5.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni e Propriedades

*Stevia rebaudiana* Bertoni é uma das 154 espécies de *Stevia*. O gênero *Stevia* pertence à família Asteraceae, anteriormente conhecida como família Compositae (SOEJARTO *et al*, 1982). A *Stevia* apresenta arranjo de folhas alternadas e hábito de crescimento herbáceo com flores arrançadas em inflorescências do tipo cima. As flores são pequenas e brancas; o pólen pode ser altamente alérgico. A *Stevia* é auto-incompatível e provavelmente polinizada por insetos; as sementes pequenas e com pouco endosperma, são dispersas pelo vento (BERTONI, 1899).

Os compostos edulcorantes encontrados nas folhas da *Stevia* são glicosídeos, sintetizados através de uma via muito semelhante à via biossintética do ácido giberélico, um importante regulador do crescimento vegetal. As vias de biossíntese do esteviol e das giberelinas divergem a partir do caureno. Na *Stevia*, o caureno é convertido para esteviol, seguido de uma glicosilação ou ramnosilação para formar os principais compostos adocicados. Os compostos precursores isopentenil pirofosfato e caureno são sintetizados nos cloroplastos e então transportados para o retículo endoplasmático, onde são formados o esteviol e atractilitrol, que através de uma reação de glicosilação dão origem ao esteviosídeo no complexo de Golgi, o qual pode posteriormente ser armazenado no vacúolo (FIGURA 2.8) (BRANDLE *et al.*, 2002).

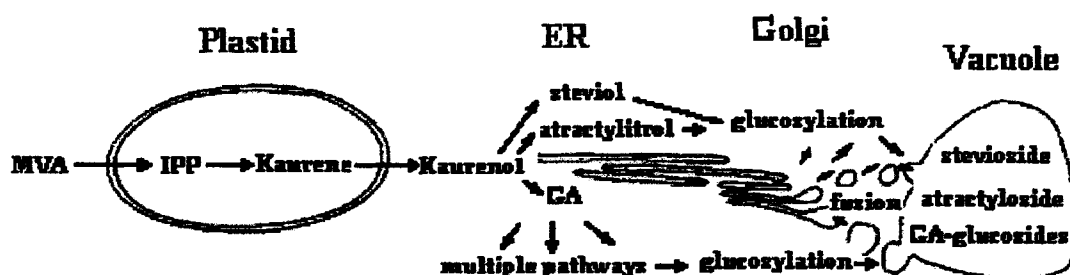
A função fisiológica dos glicosídeos edulcorantes na planta ainda não está esclarecida, mas sua alta concentração nas folhas e a manutenção da via dentro da espécie podem indicar que, em algum ponto da evolução, sua presença conferiu significativa vantagem para os indivíduos que os possuíam. Alguns pesquisadores acreditam que estes compostos são capazes de repelir certos insetos, todavia, outros especulam que a síntese de glicosídeos-esteviol é uma maneira elaborada de controlar os níveis de ácido giberélico na planta (BRANDLE *et al.*, 2002).

Os quatro principais glicosídeos-esteviol (FIGURA 2.9) são:

1. Esteviosídeo;
2. Rebaudiosídeo A;
3. Rebaudiosídeo C e
4. Dulcosídeo A

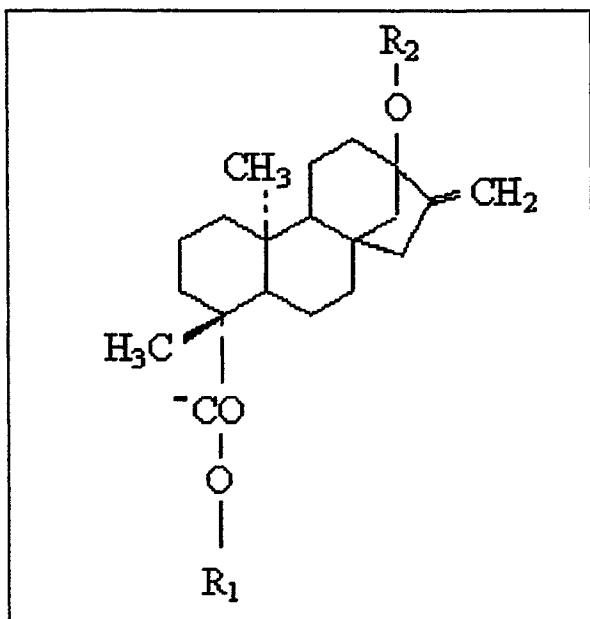
Dois outros glicosídeos que podem estar presentes nos tecidos das plantas são o rebaudiosídeo D e o E. O rebaudiosídeo B também tem sido detectado, todavia, esta detecção é provavelmente um artefato originado durante o processo de isolamento. As proporções encontradas para os quatro principais glicosídeos são: esteviosídeo, 5-10%, rebaudiosídeo A, 2-4%, rebaudiosídeo C, 1-2% e dulcosídeo A, 0,5-1%. Estes compostos apresentam poder edulcorante de 40 a 250 vezes maior do que a sacarose (BRANDLE *et al.*, 2002).

FIGURA 2.8 - COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE GLICOSÍDEOS EM *Stevia rebaudiana*. MVA: ÁCIDO MEVALÔNICO, IPP: ISOPENTENIL PIROFOSFATO, ER: RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, GA: GIBERELINA



FONTE: BRANDLE *et al.*, *Stevia rebaudiana* Its Biological, Chemical and Agricultural Proprieties, 2000.

FIGURA 2.9 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS GLICOSÍDEOS-ESTEVIOL



Stevioside:	$R_1$ : Glu
	$R_2$ : Glu — Glu
Rebaud A:	$R_1$ : Glu
	$R_2$ : Glu — Glu
	Glu
Rebaud C:	$R_1$ : Glu
	$R_2$ : Glu — Rha
	Glu
Dulco A:	$R_1$ : Glu
	$R_2$ : Glu — Rha

FONTE: BRANDLE *et al.*, *Stevia rebaudiana* Its Biological, Chemical and Agricultural Proprieties, 2000.

### 2.5.2 Biossíntese dos Glicosídeos-Esteviol

Os glicosídeos-esteviol tendem a se acumular nos tecidos de acordo com a sua idade, de modo que folhas mais velhas e inferiores apresentam maior teor de esteviol-glicosídeos quando comparadas a folhas mais jovens e superiores. Visto que os cloroplastos são importantes para a síntese dos precursores dos glicosídeos-esteviol, os tecidos desprovidos de clorofila, como raiz e caules mais baixos não contém ou somente apresentam vestígios de glicosídeos. Uma vez que a floração é iniciada, as concentrações de glicosídeos nas folhas começam a cair (BRANDLE *et al.*, 2000).

A biossíntese dos glicosídeos-esteviol tem sido investigada por mais de 30 anos. Estes são sintetizados a partir do ácido mevalônico (MVA) através da via comum a todos os compostos terpenóides (FIGURA 2.10). Os passos para a formação do ácido *ent*-caurenóico são idênticos àqueles que ocorrem para a biossíntese das giberelinas. A conversão do geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) a *ent*-copalil pirofosfato (CPP) é catalizada pela CPP sintase (também chamada de *ent*-caureno sintase A), sendo o CPP posteriormente convertido a *ent*-caureno pela *ent*-caureno sintase (também chamada de *ent*-caureno sintase B). Subseqüente oxidação no carbono 19 do *ent*-caureno forma o ácido *ent*-caurenóico (BRANDLE *et al.*, 2002). Neste ponto, a via metabólica do glicosídeo-esteviol e das giberelinas divergem. O esteviol é produzido pela hidroxilação do carbono 13 do ácido *ent*-caurenóico. A ácido *ent*-caurenóico 13-hidroxilase, enzima responsável pela conversão do ácido *ent*-caurenóico em esteviol, tem sido purificada a partir de extratos de folhas de *Stevia* e parcialmente caracterizada (KIM *et al.*, 1996).

Seguindo a formação do esteviol, dois grupos funcionais presentes neste composto, o grupo carboxílico no carbono 19 e o grupo álcool no carbono 13, fornecem pontos de ligação para cadeias lineares de açúcares que permitem a formação de diversos glicosídeos. Cadeias lineares de glicanas são compostas predominantemente por resíduos de glicose, mas podem conter ramnose; estes resíduos se ligam diferentemente nos carbono 13 e carbono 19 para formar os quatro principais glicosídeos-esteviol (FIGURA 2.9 e 2.10). As seqüências biossintéticas da glicosilação e ramnosilação, que antecedem a formação dos glicosídeos-esteviol, estão em estágios iniciais de elucidação (SHIBATA *et al.*, 1995).

Muitos diterpenóides tetracíclicos, especialmente cauranos, apresentam atividade biológica (OLIVEIRA *et al.*, 1999), dentre os quais o bioensaio do endosperma de cevada

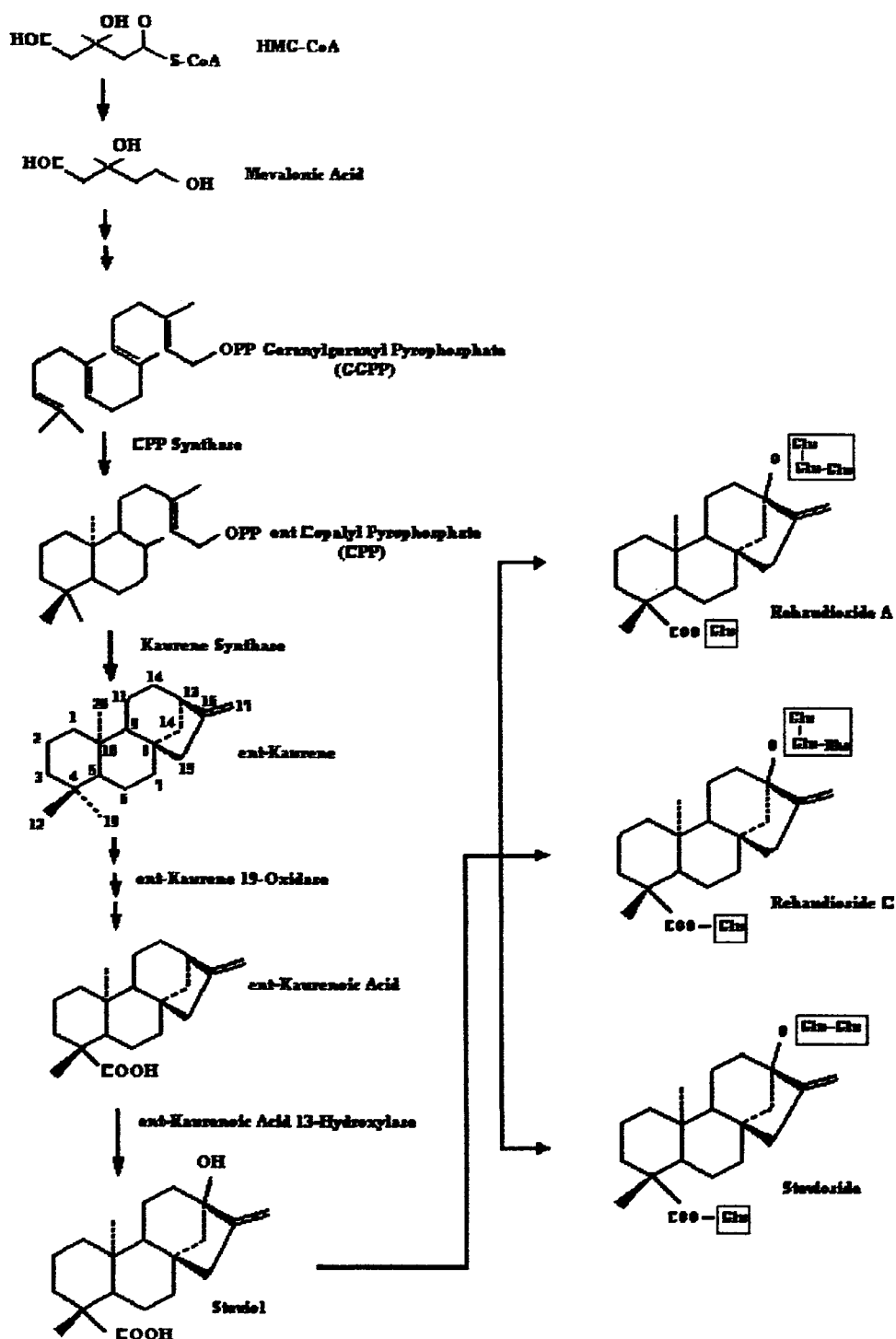
(TORRENEGRA *et al.*, 2001). Atividades semelhantes as giberelinas foram previamente observadas em outros derivados cauranos (VILLALOBOS *et al.*, 1994).

O esteviosídeo é comercialmente extraído a partir de folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, e usado como um adoçante não calórico em muitos países, sendo que a alta demanda por dietas de baixas calorias e alimentos naturais contribuíram para o aumento da popularidade desse glicosídeo (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

O esteviosídeo esteviol apresenta atividade semelhante a giberelina, sendo capaz de ativar um gene de um mutante anão de milho anteriormente conhecido por responder somente a giberelina. Este esteviosídeo, usado na concentração de 500 ppm, aumentou em 187% o crescimento de caules de arroz depois de duas semanas de cultivo. Aumento no crescimento de raízes de *Galium aparine* L. também foi observado quando árvores foram cultivadas na presença de 100 ppm do esteviosídeo (HERSHENHOM *et al.*, 1997).

A biotransformação do esteviol e sua atividade fisiológica têm despertado interesse devido à similaridade estrutural destes compostos com compostos intermediários da biossíntese de giberelinas. Há relatos da hidrólise enzimática do esteviosídeo pelo suco gástrico de caracol (*Helix pomatia*), pectinases (AVENT *et al.*, 1990) ou hesperidinases (MIZUKAMI *et al.*, 1982), produzindo o esteviol. Um método químico para se obter esteviol a partir do esteviosídeo envolve a oxidação do açúcar com periodato e hidrólise alcalina (AVENT *et al.*, 1990).

FIGURA 2.10 - VIA METABÓLICA DO ESTEVIOL E ALGUNS DE SEUS GLICOSÍDEOS



FONTE: BRANDLE *et al*, *Stevia rebaudiana* Its Biological, Chemical and Agricultural Properties, 2000.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Segmentos nodais medindo entre 15 e 20 mm de comprimento, obtidos a partir de um clone do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*), já estabelecido *in vitro*, foram inoculados em 40 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 2,2  $\mu\text{M}$  de benzilaminopurina (BAP), 3% (m/v) sacarose e 0,7% (m/v) de ágar A-7002 (Sigma Chem. Co, Mo, E.U.A.). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem.

#### 3.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os explantes foram mantidos em sala de ambiente controlado, com fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A temperatura e a umidade relativa do ar foram mantidas em  $27 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  e  $70 \pm 5\%$ , respectivamente.

FIGURA 3.1 – VISTA GERAL DAS CULTURAS NA SALA DE AMBIENTE CONTROLADO



### 3.3. TESTE DO EFEITO DO BRASSINOESTERÓIDE 5F-HCTS SOBRE A TAXA DE LIBERAÇÃO DE ETILENO

Neste experimento, partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro* foram tratadas com o brassinoesteróide 5F-HCTS e em seguida a taxa de liberação de etileno foi estimada de acordo com o procedimento descrito a seguir.

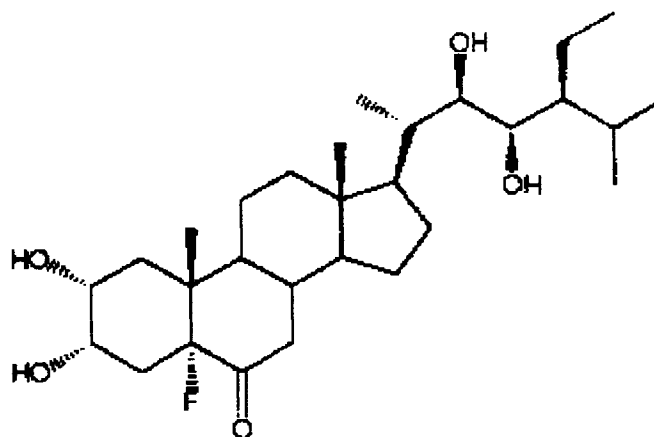
A 28-Homoetil-castasterona foi sintetizada a partir do estigmasterol e o derivativo fluoretado apresentando substituição com o íon flúor no carbono 5 da 28-Homoetil-castasterona (FIGURA 3.2) foi sintetizado de acordo com Ramírez e Galagovsky (2000a) e Ramírez e Galagovsky (2000b). A 28-Homoetil-castasterona na sua forma fluoretada foi fornecida pela Dra. Lydia R. Galagovsky (Departamento de Química Orgânica, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade de Buenos Aires, Argentina).

Quinze dias após o subcultivo, partes aéreas formadas a partir de segmentos nodais (item 3.1), foram transferidas para frascos com volume de 600 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, mantidos na posição horizontal. Em cada frasco foram cultivados 10 explantes, os quais receberam doses únicas  $0,5 \mu\text{g.explante}^{-1}$  do brassinoesteróide 5F-HCTS (5F-28-Homoetil-castasterona; 5F-(22R,23R)- $2\alpha,3\alpha,22,23$ -tetrahidroxi- $5\alpha$ -estigmasteran-6-ona) (FIGURA 3.3) na forma de microgotas ( $5 \mu\text{L}$ ), em soluções etanólicas (etanol P.A., Merck, Darmstadt, Alemanha), as quais foram aplicadas na folha mais próxima do ápice caulinar, medindo no mínimo 2 mm de largura, formadas durante o período de cultivo. A cada 5 dias foram dosadas as concentrações de etileno na atmosfera interna dos frascos, que permaneceram hermeticamente fechados, por 48 horas antes da dosagem de etileno. Para tanto, amostras de  $500 \mu\text{L}$  da atmosfera interna dos frascos foram removidas e imediatamente injetadas em cromatógrafo de gás, modelo Varian 3400, coluna Porapak N e detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, a um fluxo de  $20 \text{ mL}/\text{min.}$ , sendo a temperatura da coluna  $120^{\circ}\text{C}$ , do injetor  $110^{\circ}\text{C}$ , do auxiliar  $150^{\circ}\text{C}$  e do detector  $200^{\circ}\text{C}$ . O padrão é etileno gasoso (contém  $2,16 \text{ nmoles}$  em  $0,5 \text{ mL}$ ).

O peso fresco dos explantes (g) foi obtido após dosagem da concentração de etileno. Posteriormente os frascos foram ventilados com ar em fluxo de  $252 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  por 3 minutos e fechados com tampa de alumínio de maneira não hermética.

As plântulas controle receberam  $5 \mu\text{L}$  de solução etanólica e foram submetidas aos mesmos procedimentos das plântulas tratadas com o brassinoesteróide 5F-HCTS.

FIGURA 3.2 – ESTRUTURA QUIMICA DO 5F-HCTS



FONTE: RAMIREZ, J. A.; GROS, E. G. & GALAGOVSKY, L. R. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs. *Tetrahedron*, n. 56, p. 6171-6180, 2000 b.

### 3.3.1. Variáveis avaliadas

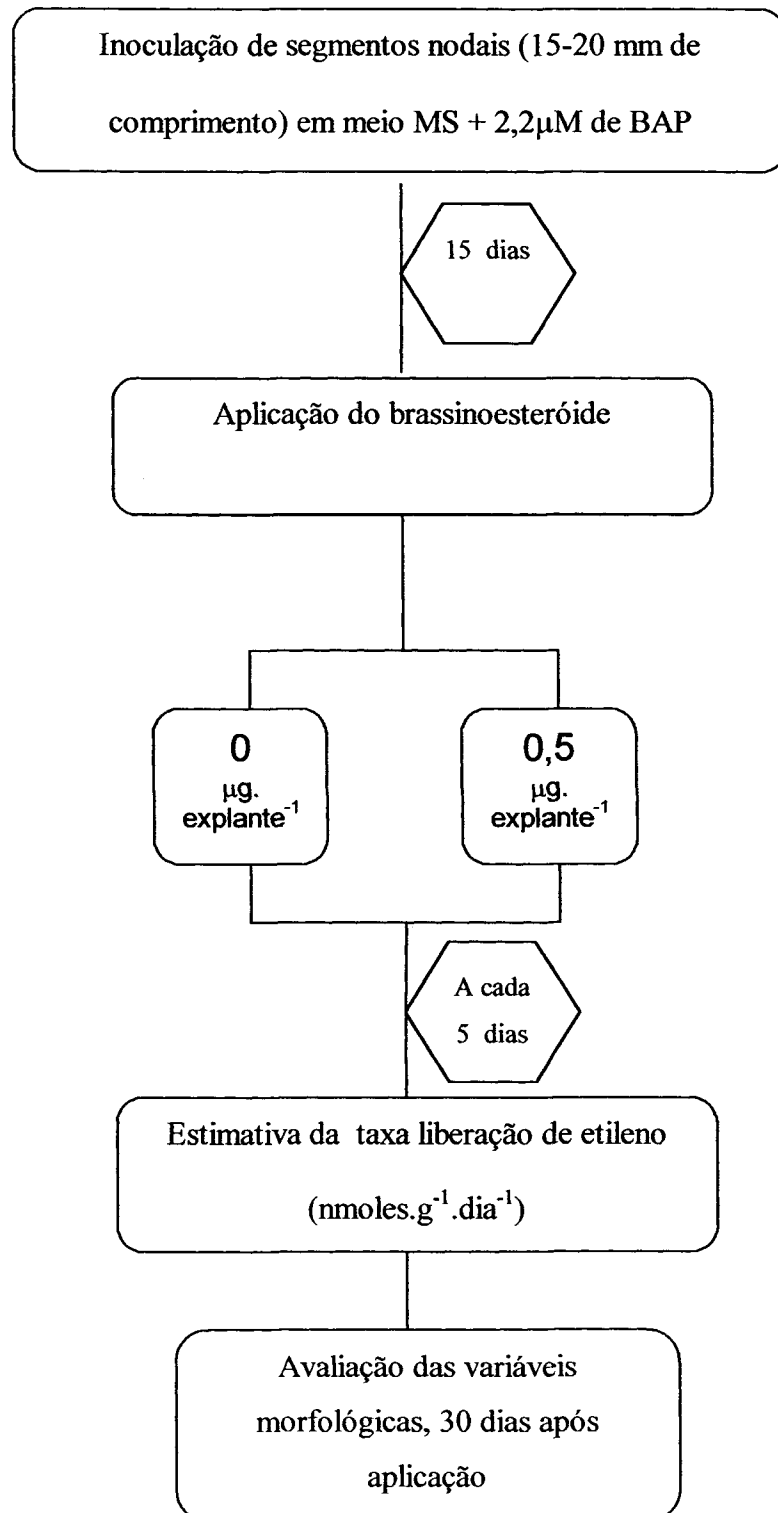
No primeiro dia e depois a cada cinco dias após o tratamento com o brassinoesteróide as partes aéreas formadas foram avaliadas para as variáveis:

1. taxa de liberação de etileno ( $\text{nmoles.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ );
2. massa fresca dos explantes (g).

Trinta dias após o tratamento com o brassinoesteróide as partes aéreas foram avaliadas para as seguintes variáveis:

1. taxa de multiplicação (número total de ramos  $\geq 15$  mm em comprimento);
2. número de ramos principais (Ramo desenvolvido diretamente a partir do explante original inoculado  $\geq 15$  mm);
3. número de ramos laterais primários (Ramo desenvolvido diretamente a partir de um ramo principal  $\geq 15$  mm);
4. número de ramos laterais secundários (Ramo desenvolvido diretamente a partir de um ramo lateral primário  $\geq 15$  mm) (quando estes ocorreram);
5. comprimento dos ramos principais e laterais dos explantes (em mm);

FIGURA 3.3 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A APLICAÇÃO DO BRASSINOESTERÓIDE 5F-HCTS



### 3.4. TESTE DO EFEITO DO ETILENO SOBRE A ARQUITETURA DE PARTES AÉREAS

Neste experimento, partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro* foram tratadas com etileno de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Quinze dias após o subcultivo, partes aéreas formadas a partir de segmentos nodais (item 3.1), foram transferidas para frascos com volume de 600 mL, contendo 80 mL de meio de cultura, mantidos na posição vertical. Em cada frasco foram cultivados 6 explantes, nos quais foram injetadas as concentrações de 0, 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (FIGURA 3.4) ou 0, 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno (White Martins) (FIGURA 3.5). A cada 5 dias, os frascos foram ventilados, como descrito no item 3.3, e novamente hermeticamente fechados e reinjetadas as concentrações de etileno.

#### 3.4.1. Variáveis avaliadas

Trinta dias após o tratamento com o etileno, as partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com etileno foram avaliadas para as variáveis:

1. taxa de multiplicação;
2. número de ramos principais  $\geq 15$  mm;
3. número de ramos laterais primários  $\geq 15$  mm;
4. número de ramos laterais secundários  $\geq 15$  mm (quando estes ocorrerem);
5. comprimento dos ramos principais e laterais dos explantes (em mm);
6. massa fresca dos explantes (g);
7. massa seca dos explantes (g);
8. massa fresca dos calos (g);
9. massa seca dos calos (g).

FIGURA 3.4 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O CRESCIMENTO DOS EXPLANTES EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM ETILENO

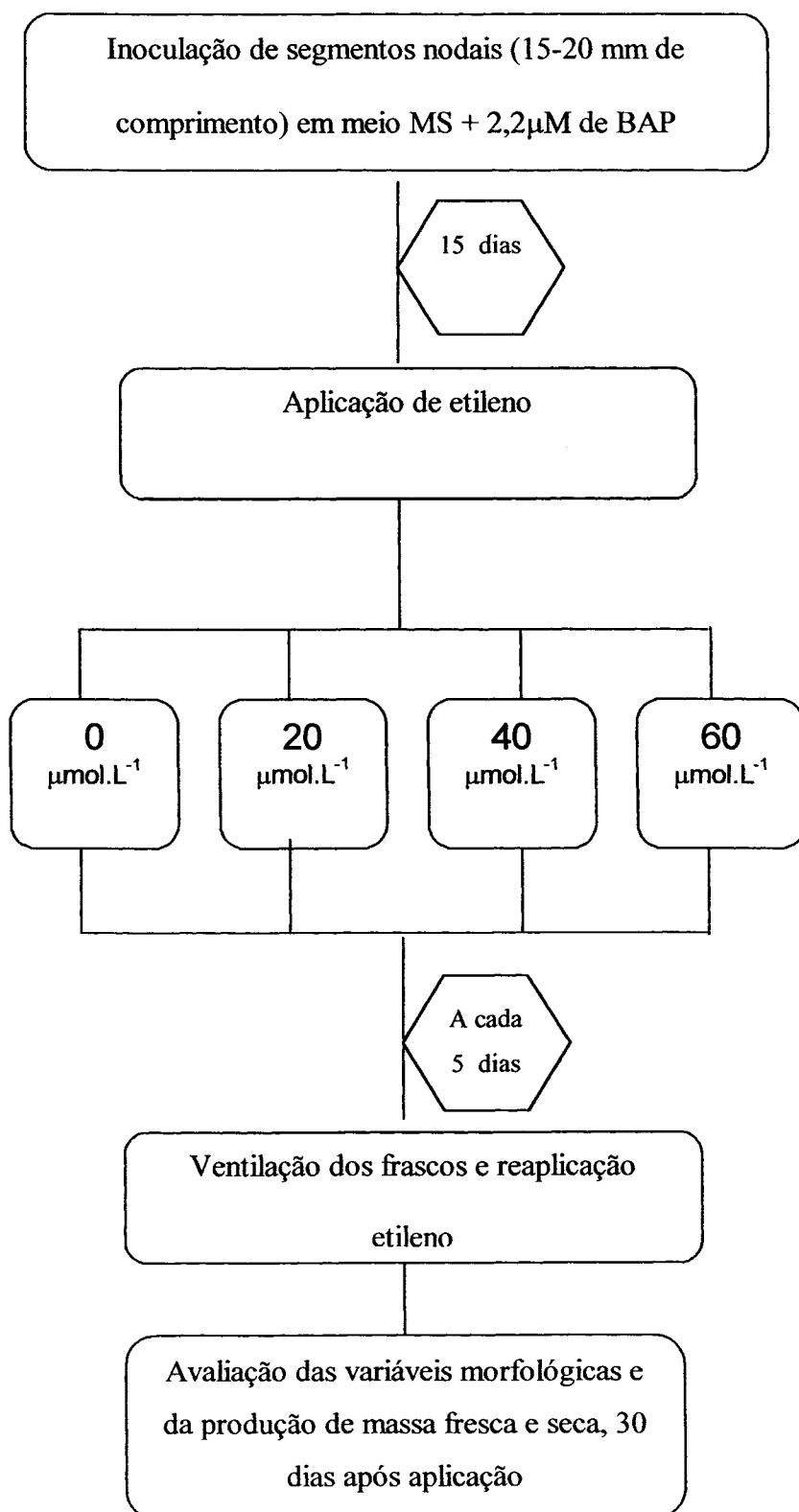
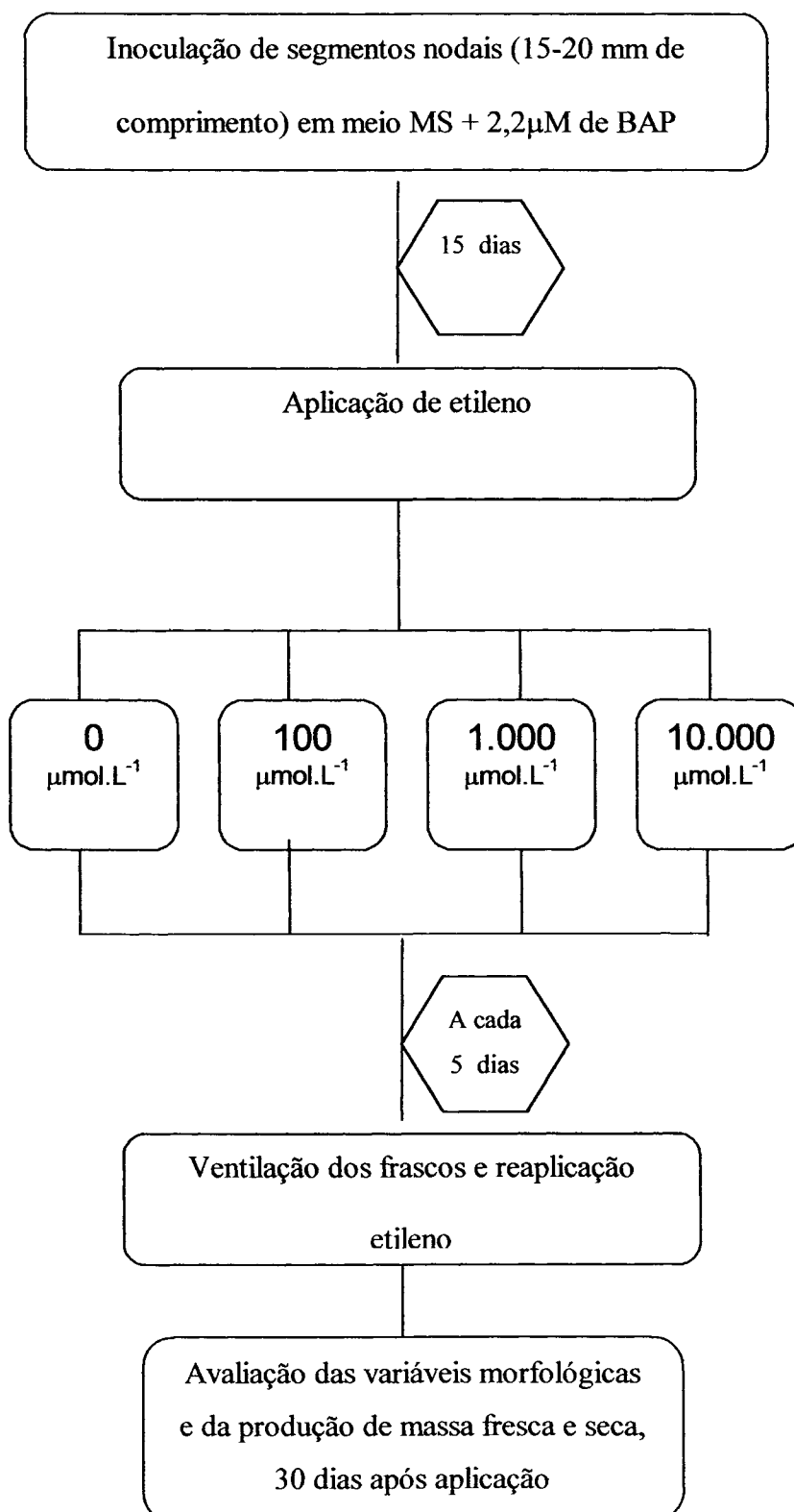


FIGURA 3.5 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O CRESCIMENTO DOS EXPLANTES EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM ETILENO

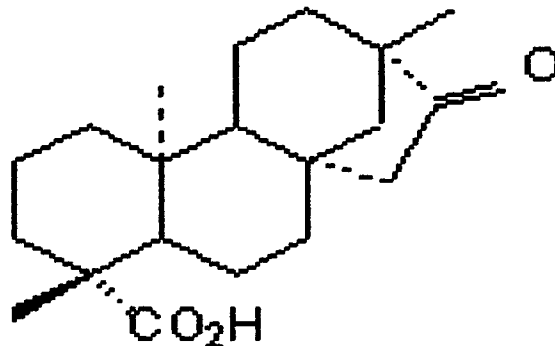


### 3.5. TESTE DO EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE A ARQUITETURA DE PARTES AÉREAS

Neste experimento, partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro* foram tratadas com isoesteviol e seus derivados amina e oxima de acordo com o procedimento descrito a seguir.

O isoesteviol (FIGURA 3.6) é um diterpenóide tetracíclico, com um esqueleto baierano, obtido pela hidrólise ácida do açúcar esteviosídeo glicosídico. Para obtenção do isoesteviol, 16g do esteviosídeo glicosídico são adicionados em 300mL de água contendo 5mL de ácido clorídrico (HCL) concentrado, sendo então a mistura aquecida sob agitação por 2 horas. Os produtos são então restabelecidos em CHCl<sub>3</sub> e cromatografados em sílica gel (AVENT *et al.*, 1990).

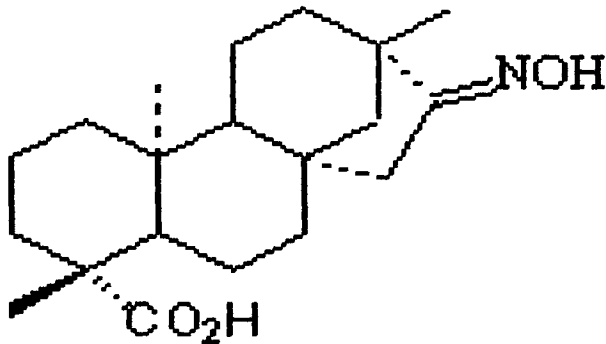
FIGURA 3.6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL



O isoesteviol-oxima (FIGURA 3.7) é sintetizado a partir do isoesteviol, através da dissolução de 318 mg de isoesteviol em 25mL (1mmol) de uma mistura de metanol e água (4:1). Em seguida, 120mg de acetato de sódio (2mmol) e 139mg de hidroxiamina. HCL (2mmol) são adicionados e a mistura agitada em sala com temperatura controlada por 12 horas; 50 mL de água são então adicionados e o produto extraído com acetato de etil (3x20 mL). O extrato é lavado com sulfato de sódio anidro, filtrado e o solvente destilado sob pressão reduzida. O resíduo sólido é então cristalizado a partir de metanol (Dr. B. H. de Oliveira, comunicação

peçoal). Comparando-se estruturalmente a molécula precursora com a molécula originada, ocorre uma modificação no grupamento do carbono 16, incorporando-se um grupamento oxima.

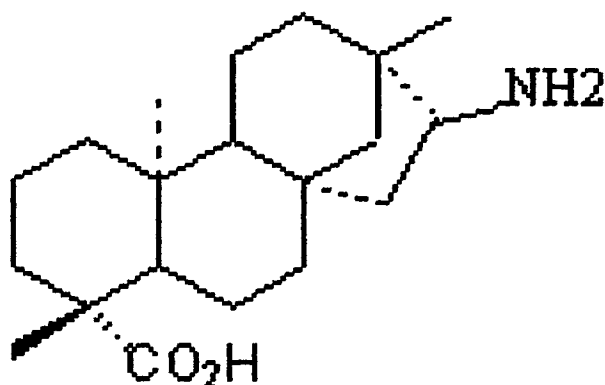
FIGURA 3.7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL-OXIMA



O isoesteviol-amina também é sintetizada a partir do isoesteviol, havendo uma modificação, com a adição de um grupamento amina no carbono 16 (FIGURA 3.8). As moléculas sintetizadas a partir do esteviosídeo glicosídico foram fornecidas pelo professor Dr. Brás H. de Oliveira (Departamento de Química – Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR).

Quinze dias após o subcultivo, partes aéreas formadas a partir de segmentos nodais (item 3.1), foram transferidas para frascos contendo 40 mL de meio de cultura. Em cada frasco foram cultivados 4 explantes, os quais receberam doses únicas de 0, 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (FIGURA 3.9) na forma de microgotas (5  $\mu\text{L}$ ), em soluções etanólicas (etanol P.A., Merck, Darmstadt, Alemanha), as quais foram aplicadas na folha mais próxima do ápice caulinar, medindo no mínimo 2 mm de largura, formadas durante o período de cultivo.

FIGURA 3.8 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ISOESTEVIOL-AMINA



### 3.5.1. Variáveis avaliadas

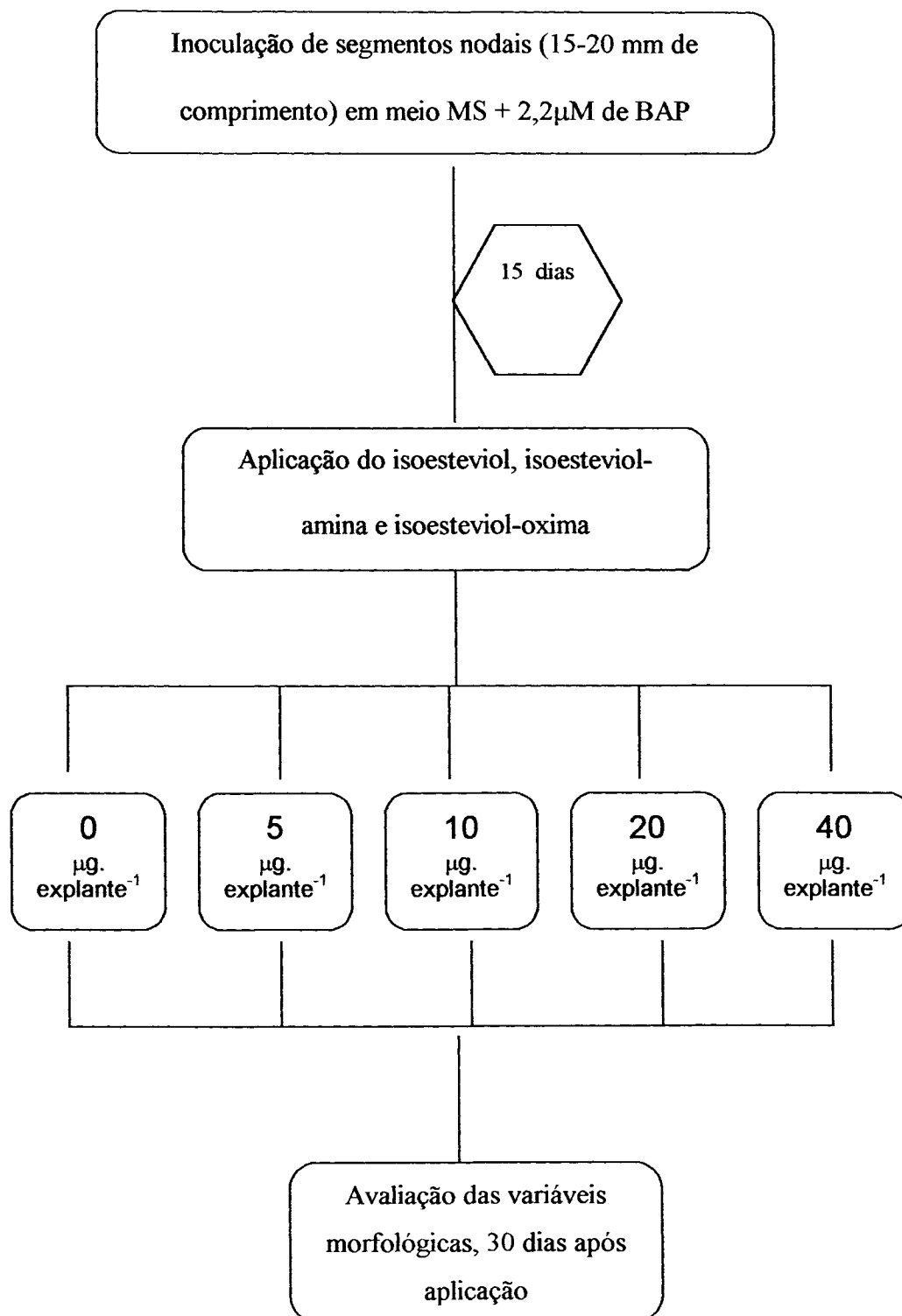
Trinta dias após o tratamento com o isoesteviol e seus derivados amina e oxima, as partes aéreas formadas foram avaliadas como descrito no item 3.4.1, exceto pela massa fresca e seca de plântulas e calos.

## 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico JMP ("Statistical Analysis System", SAS Institute Inc. E.U.A., 1989-2000) versão 4.0.0. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada com a aplicação do Teste de "Student's" em nível de 5% de probabilidade.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada experimento foi realizado no mínimo por duas vezes.

FIGURA 3.9 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A APLICAÇÃO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVATIVOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFEITO DO BRASSINOESTERÓIDE 5F-HCTS SOBRE A TAXA DE LIBERAÇÃO DE ETILENO, CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE INTERESSE PARA MICROPROPAGAÇÃO E TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO

Trinta dias após a aplicação do 5F-HCTS (FIGURA 4.1) foi verificado aumento de 98 % na taxa de multiplicação, de 114 % no número de ramos laterais primários e um aumento de 0 para 10,5 mm no comprimento médio dos ramos laterais secundários das partes aéreas, quando comparado a partes aéreas-controle (tratadas com etanol), sendo todas estas alterações estatisticamente significativas em nível de 5% de probabilidade (TABELA 4.1).

Aumento da ordem de 28 e 17,5 % mostrou-se associado, respectivamente, as variáveis número de ramos principais e número de ramos laterais secundários. Para as variáveis comprimento dos ramos principais e comprimento dos ramos laterais primários foi verificado um aumento da ordem de 5 e 13%, respectivamente, em partes aéreas de *Malus prunifolia* tratadas com 5F-HCTS, quando comparado a partes aéreas-controle, embora estas alterações morfológicas não tenham sido estatisticamente significativas ( $p=0.05$ ).

Após a aplicação do brassinoesteróide 5F-HCTS ( $0,5 \mu\text{g.explante}^{-1}$ ) foi verificado um progressivo aumento da taxa de liberação de etileno por partes aéreas do porta enxerto marubakaido, entre o primeiro e o oitavo dia de cultivo. Após o oitavo dia de cultivo foi verificada uma redução da taxa de liberação de etileno que se manteve até o último dia do ciclo de cultivo (FIGURA 4.2). Para partes aéreas não tratadas com o brassinoesteróide, observou-se aumento na taxa de liberação de etileno entre o primeiro e o quinto dia de cultivo, quando a taxa de liberação de etileno passou a ser gradualmente reduzida até o final do período de cultivo. O aumento da ordem de 73% na taxa de liberação de etileno observado para partes aéreas tratadas com 5F-HCTS, no oitavo dia de cultivo, mostrou-se estatisticamente significativo ( $p=0,05$ ), quando comparado ao controle. Para os demais dias de cultivo avaliados nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada, embora tenha sido clara a tendência para maior liberação de etileno por parte de partes aéreas tratadas com o brassinoesteróide no período inicial

de cultivo. Partes aéreas tratadas ou não com brassinoesteróides não apresentaram liberação de etileno detectável ao final das primeiras 24 horas de cultivo

FIGURA 4.1 – ASPECTO GERAL DE PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO TRATADAS COM 5F-HCTS, TRINTA DIAS APÓS A APLICAÇÃO DO BRASSINOESTERÓIDE

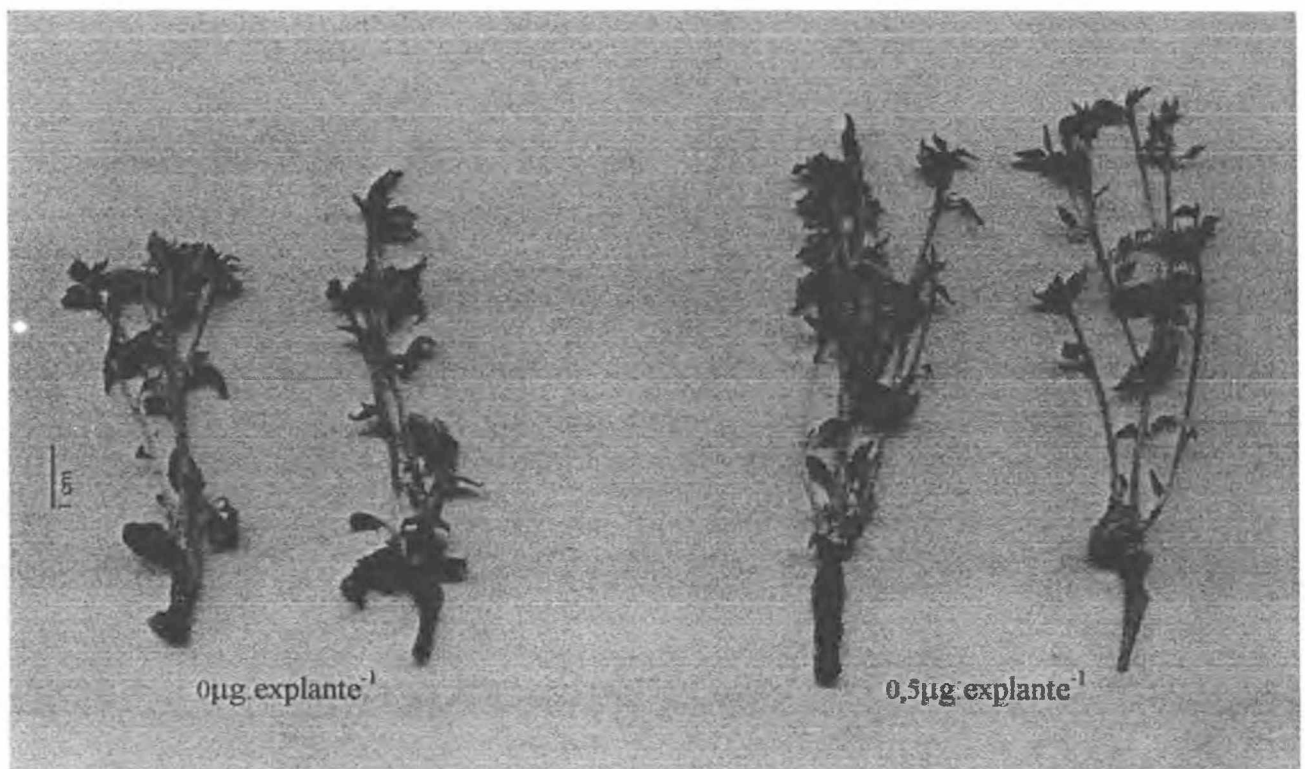
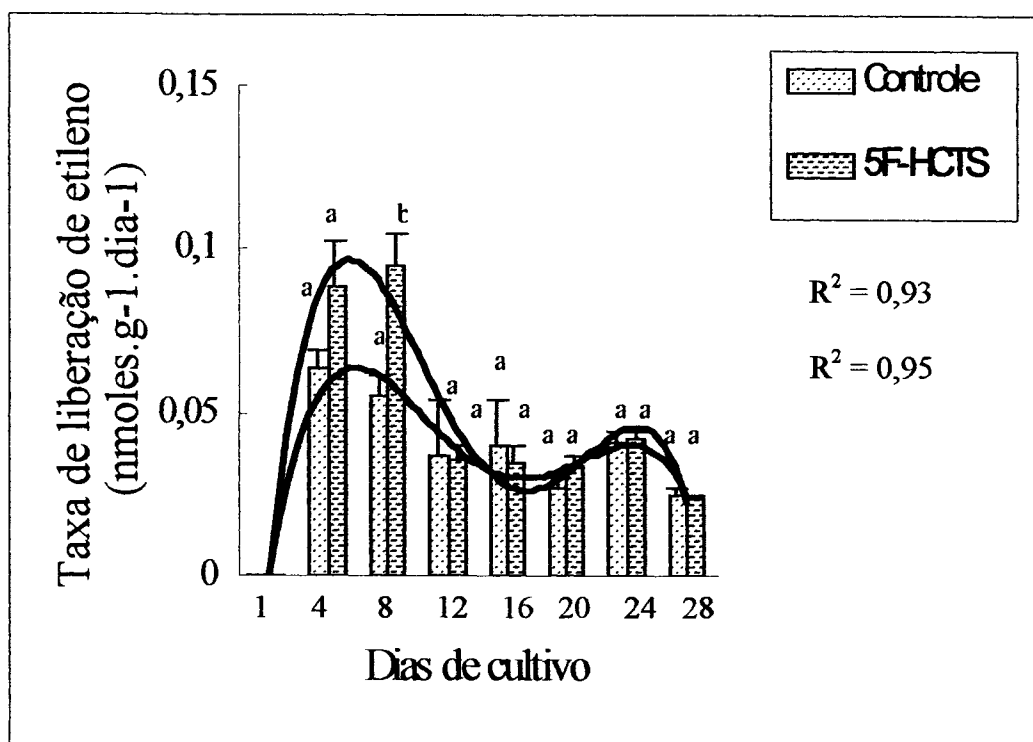


TABELA 4.1 – EFEITO DA APLICAÇÃO DO 5F-HCTS SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*

Variáveis		Médias	
		0	0,5
Taxa de multiplicação		$1,9 \pm 0,3^a$	$3,8 \pm 0,6^b$
Principais		$1,3 \pm 0,1^a$	$1,7 \pm 0,1^a$
Número de ramos	Laterais primários	$0,6 \pm 0,2^a$	$1,4 \pm 0,2^b$
	Laterais secundários	$0,0^a$	$0,2 \pm 0,1^a$
	Principais	$18,5 \pm 0,9^a$	$19,4 \pm 0,7^a$
Comprimento dos ramos	Laterais primários	$13,0 \pm 0,7^a$	$14,7 \pm 0,6^a$
	Laterais secundários	$0,0^a$	$10,4 \pm 0,9^b$

NOTA: Números representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%.

FIGURA 4.2 – EFEITO DO 5F-HCTS SOBRE A TAXA DE LIBERAÇÃO DE ETILENO DE PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



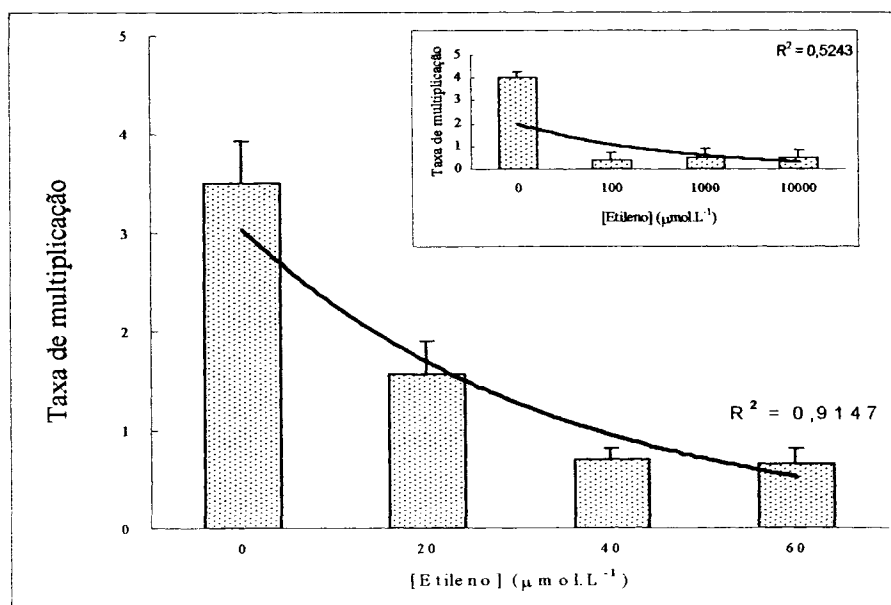
NOTA: Símbolos seguidos por letras diferentes indicam valores médios estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%. Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

## 4.2 EFEITO DE ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM ETILENO SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE INTERESSE PARA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO

Após o período de crescimento de trinta dias em atmosfera enriquecida com etileno foi verificada alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) em todas as concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.11).

Redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) da ordem de 55, 80 e 19 % na taxa de multiplicação foi observada para partes aéreas crescidas em atmosfera contendo 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, respectivamente. Redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), em torno de 90%, na taxa de multiplicação foi observada para partes aéreas crescidas na presença de 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, sendo que nenhuma diferença estatística foi observada para a taxa de multiplicação para partes aéreas crescidas em concentrações de etileno iguais ou superiores a 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (FIGURA 4.3).

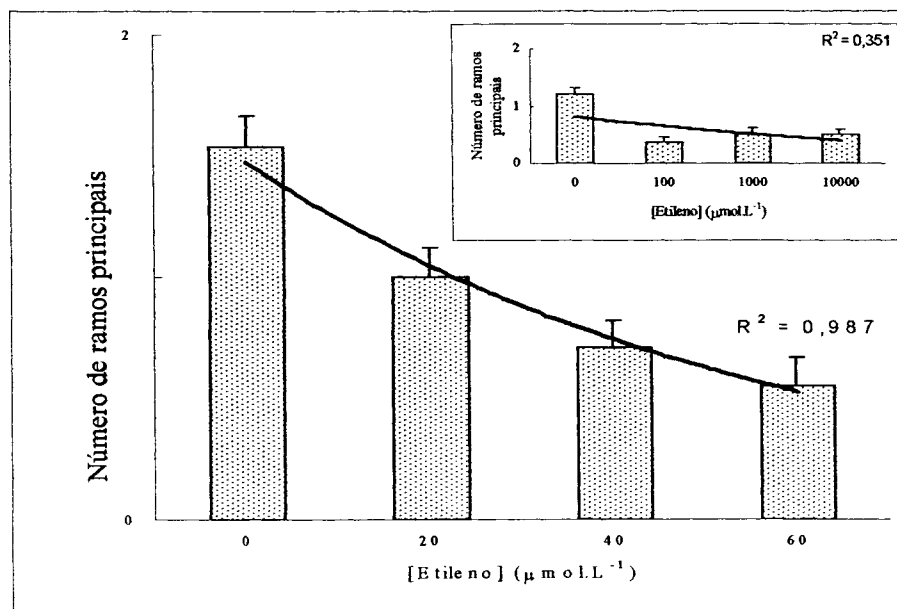
FIGURA 4.3 - EFEITO DO ETILENO SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

Redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), da ordem de 35, 54 e 64 % no número de ramos principais maior ou igual a 15 mm formados, foi observada para partes aéreas crescidas em atmosfera contendo 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, respectivamente. Redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) de 69, 59 e 59 %, foram verificadas para as concentrações de 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente, sendo que nenhuma diferença estatística foi observada para o número de ramos principais maior ou igual a 15 mm para partes aéreas crescidas nas três concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.4)

FIGURA 4.4 - EFEITO DO ETILENO SOBRE O NÚMERO DE RAMOS PRINCIPAIS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*

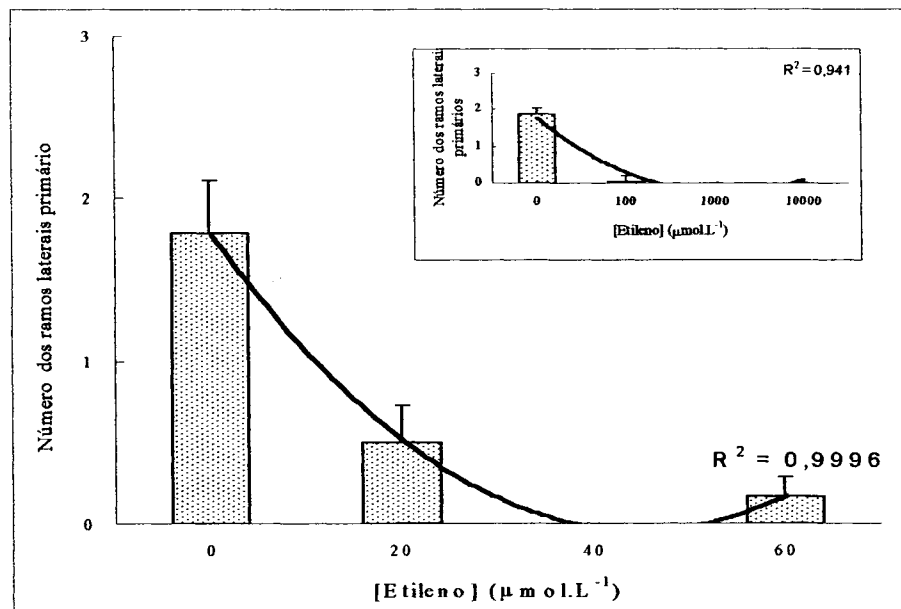


NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

Para a variável número de ramos laterais primários maior ou igual a 15 mm, redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), da ordem de 72, 100 e 91 % foi verificada para as concentrações de 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , enquanto que reduções de 98, 100 e 100 % foram observadas para partes aéreas crescidas na presença de 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno na atmosfera interna dos frascos de cultivo, sendo que nenhuma diferença estatística foi

observada para o número de ramos principais maior ou igual a 15 mm para partes aéreas crescidas nas 3 concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.5).

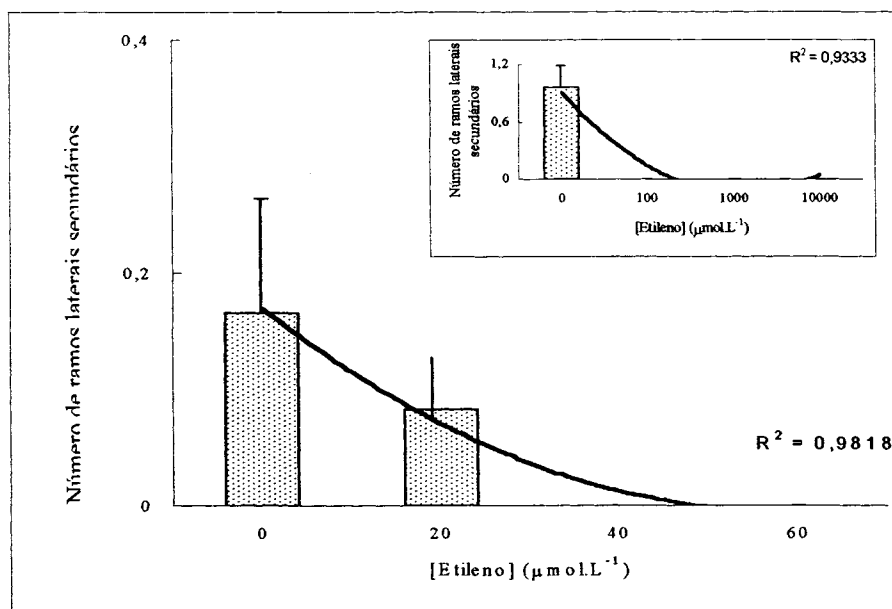
FIGURA 4.5 - EFEITO DO ETILENO SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

Para a variável número de ramos laterais secundários maior ou igual a 15 mm nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) foi observada para partes aéreas crescidas na presença de 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno. Exceto pela concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , que induziu redução à proliferação de ramos laterais secundários na ordem de 48 %, todas as demais concentrações de etileno testadas reduziram o número médio deste tipo de ramo para zero, sendo que no caso das concentrações de 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  não foi observada a formação de qualquer ramo lateral secundário maior ou igual a 15 mm (FIGURA 4.6).

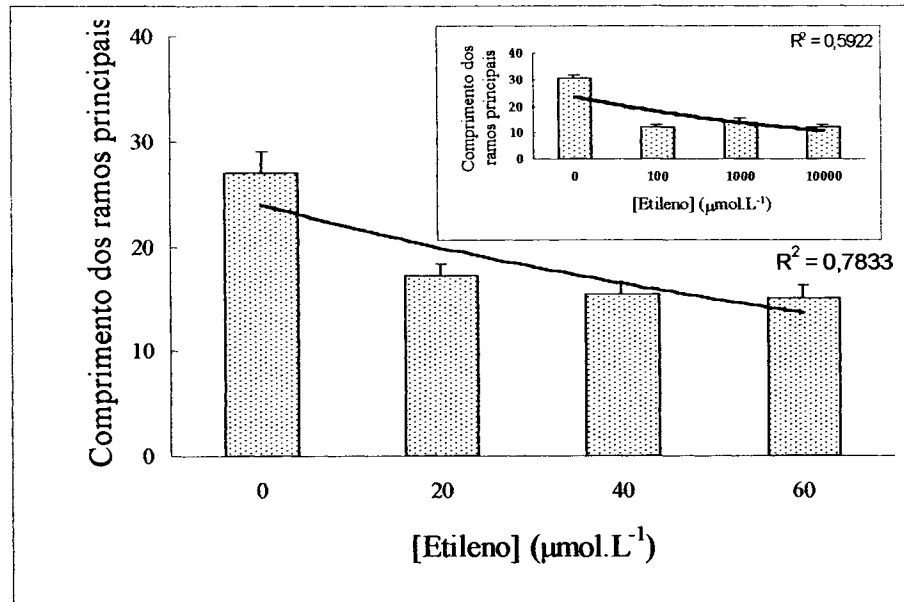
FIGURA 4.6 - EFEITO DO ETILENO SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

Inibição estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) do alongamento dos ramos principais, laterais primários e laterais secundários mostrou-se associada a todas as concentrações de etileno testadas. Quando comparadas a partes aéreas crescidas em atmosfera não enriquecida com etileno, partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida apresentaram redução no comprimento dos ramos principais, da ordem de 37, 43 e 45 %, respectivamente, para as concentrações de 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, enquanto que redução em torno de 58 % no comprimento dos ramos principais foi observada para partes aéreas crescidas na presença de 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, sendo que nenhuma diferença estatística foi observada para o comprimento dos ramos principais maior ou igual a 15 mm para partes aéreas crescidas nas 3 concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.7).

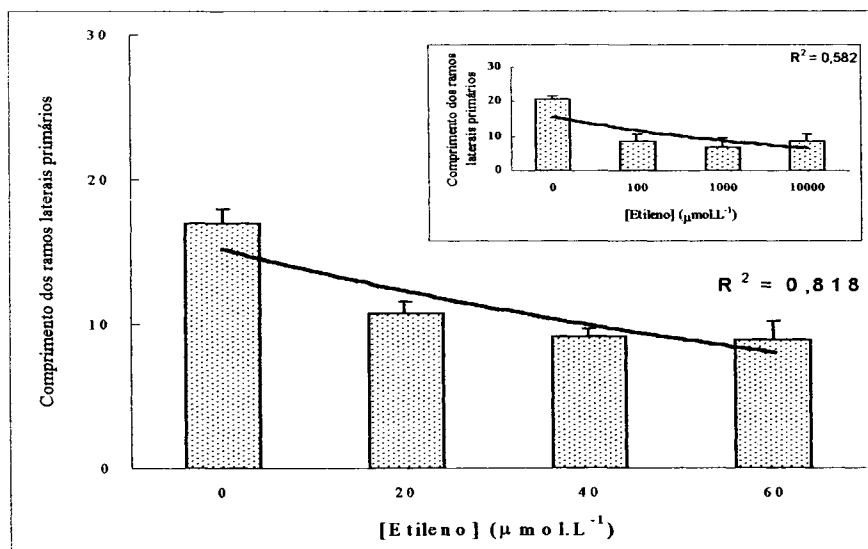
FIGURA 4.7 - EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS PRINCIPAIS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

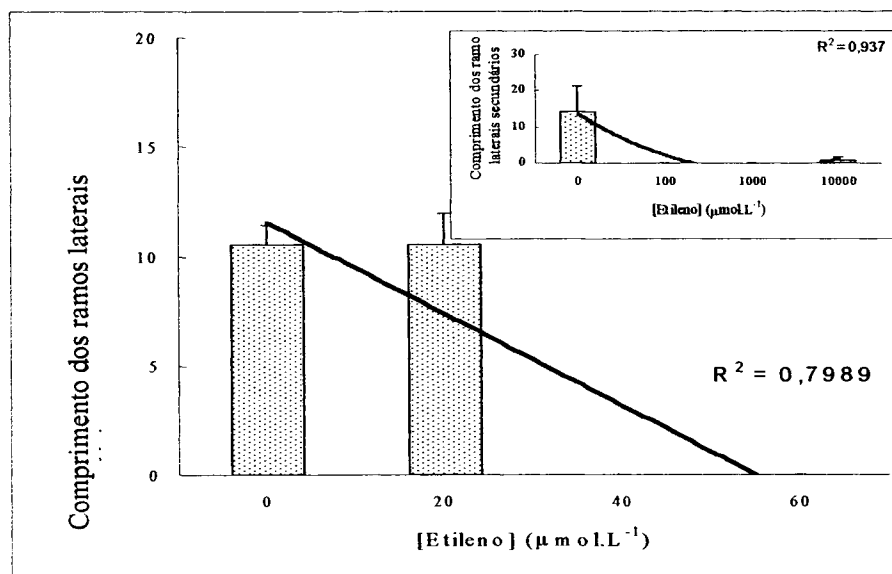
Para o comprimento dos ramos laterais primários foi observada redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) da ordem de 37, 47 e 48%, respectivamente, para as concentrações de 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, ao passo que inibição ( $p=0,05$ ) em torno de 61 % foi observada para as partes aéreas crescidas em todas as concentrações de etileno maiores ou iguais a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , sendo que nenhuma diferença estatística foi observada para o comprimento dos ramos laterais primários maior ou igual a 15 mm para partes aéreas crescidas em todas as concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.8). Para a variável comprimento de ramos laterais secundários, partes aéreas crescidas na concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno não diferiram estatisticamente do controle, sendo que partes aéreas crescidas na presença de 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno apresentaram média igual a zero. Redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), em torno de 97 %, no comprimento dos ramos laterais secundários foi observada para partes aéreas crescidas na presença de 100, 1.000 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , sendo que nenhuma diferença estatística foi observada para as partes aéreas crescidas nestas 3 concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.9).

FIGURA 4.8- EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

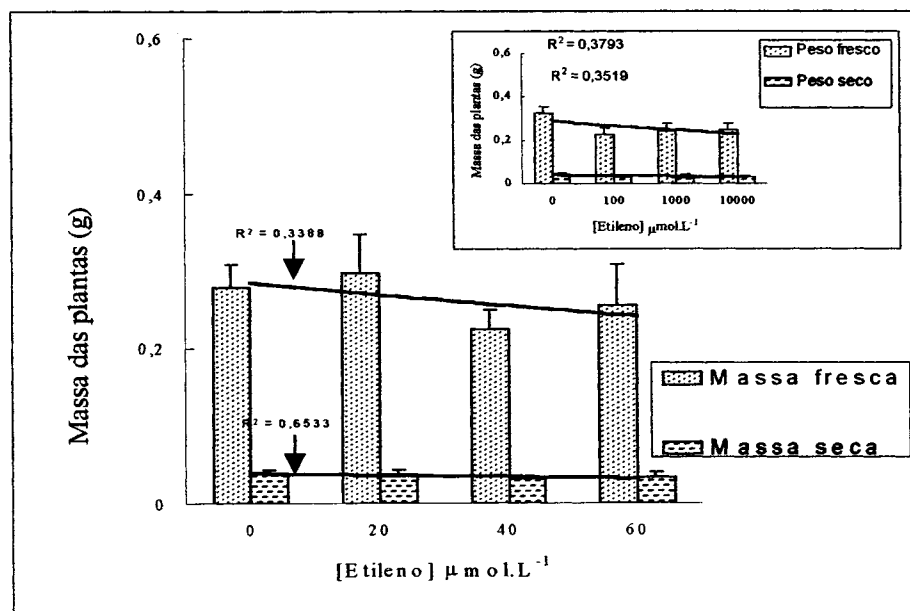
FIGURA 4.9 - EFEITO DO ETILENO SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

Nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) foi observada na massa fresca e massa seca de plântulas crescidas em atmosfera enriquecida com 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno. Porém, redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), da ordem de 31% para a massa fresca foi observada para partes aéreas crescidas na presença de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno. Já para variável massa seca, redução estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ), da ordem de 34 e 28 %, foi observada para partes aéreas crescidas nas concentrações de 100 e 10.000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno, quando comparadas ao controle (FIGURA 4.10).

FIGURA 4.10- EFEITO DO ETILENO SOBRE A MASSA FRESCA E A MASSA SECA EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

Partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com etileno apresentaram significativa ( $p=0,05$ ) formação de tecido de calo na base dos explantes, em todas as concentrações de etileno testadas (FIGURA 4.11). Aumento na formação de massa fresca de tecido de calo da ordem de 931, 1.300 e 1.210 % foi observado na base de partes aéreas mantidas em atmosfera contendo 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno. Para a variável massa seca de tecido de calo foi observado aumento

da ordem de 337, 544 e 455 % para calos crescidos na base de explantes cultivados na presença de 20, 40 e 60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno (FIGURA 4.12).

FIGURA 4.11 – EFEITO DO ETILENO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS E FORMAÇÃO DE TECIDO DE CALO NA BASE DOS EXPLANTES EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*

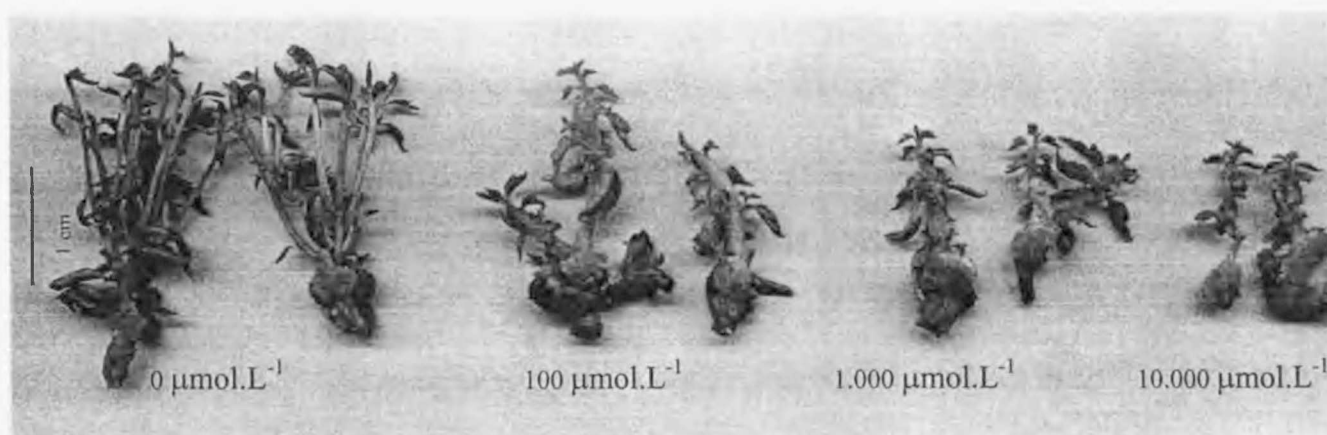
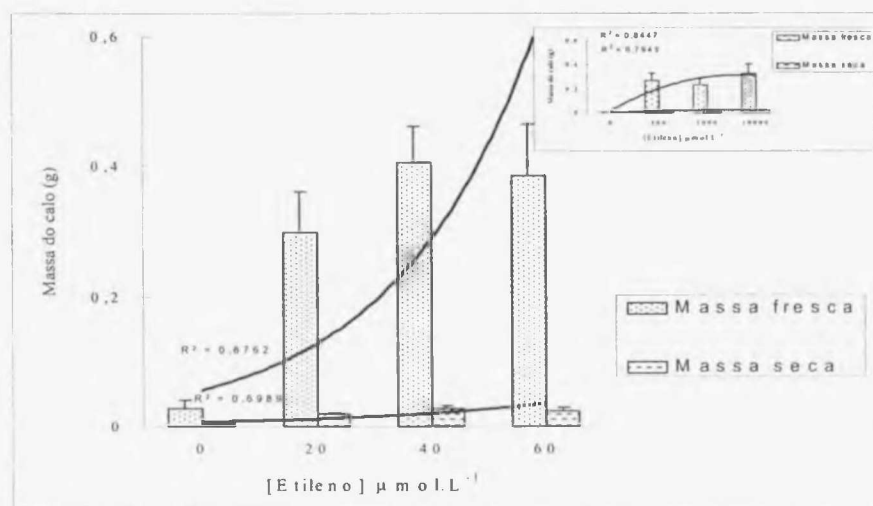


FIGURA 4.12 – EFEITO DO ETILENO SOBRE A MASSA FRESCA E A MASSA SECA DOS CALOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

#### 4.3 EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE INTERESSE PARA MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO

Nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) foi encontrada para quaisquer das variáveis avaliadas, quando partes aéreas do porta-enxerto de macieira foram tratadas com 0, 5, 10, 20 ou 40  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  de isoesteviol (FIGURA 4.13) ou de seus derivados amina e oxima, demonstrando que o isoesteviol e seus derivados não exercem efeito sobre a taxa de multiplicação (FIGURA 4.14), e, conseqüentemente sobre o número (FIGURAS 4.15, 4.16, 4.17) e comprimento dos ramos (FIGURAS 4.18, 4.19, 4.20) formados no período de cultivo, em partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido crescendo *in vitro*.

FIGURA 4.13 – EFEITO DO ISOESTEVIOL SOBRE O ALONGAMENTO CAULINAR DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*

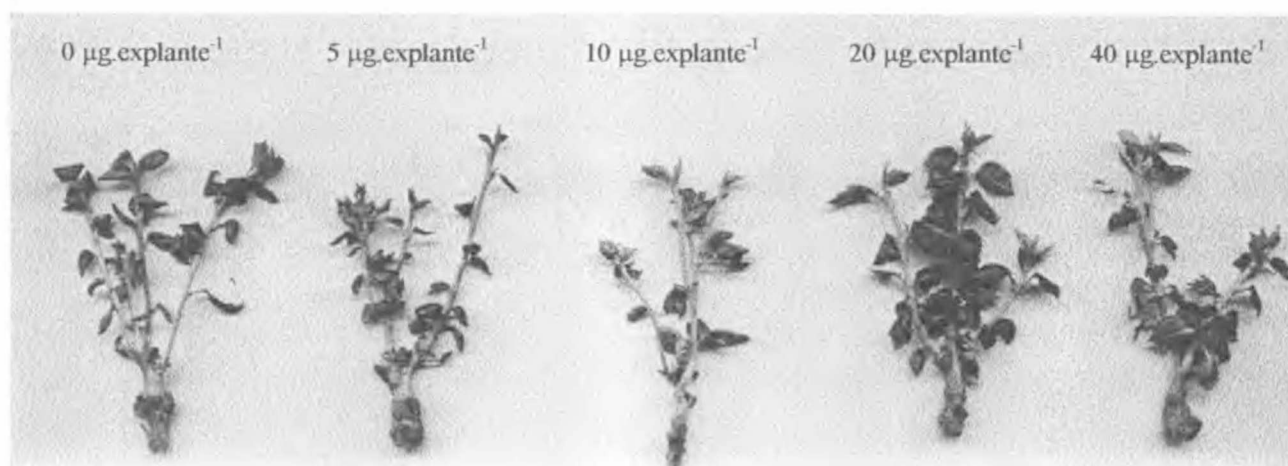
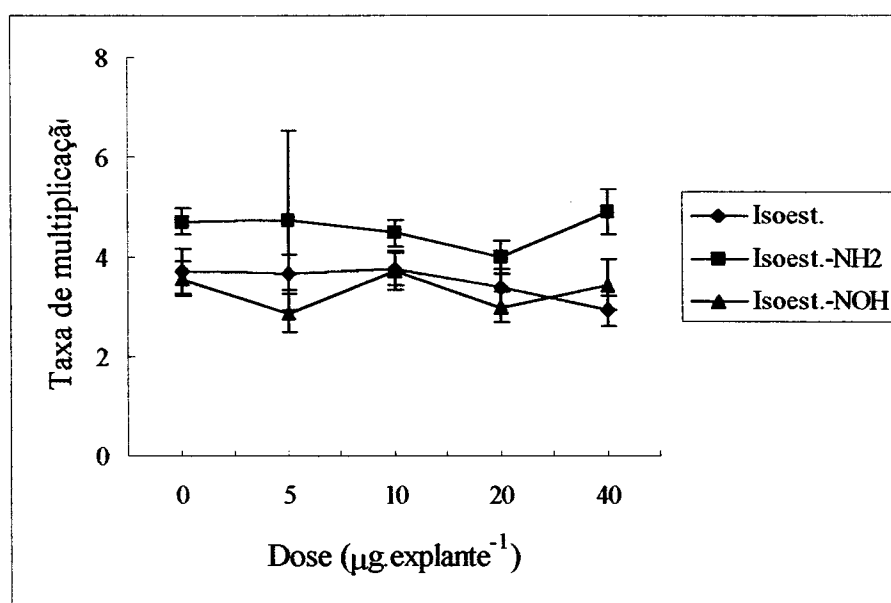
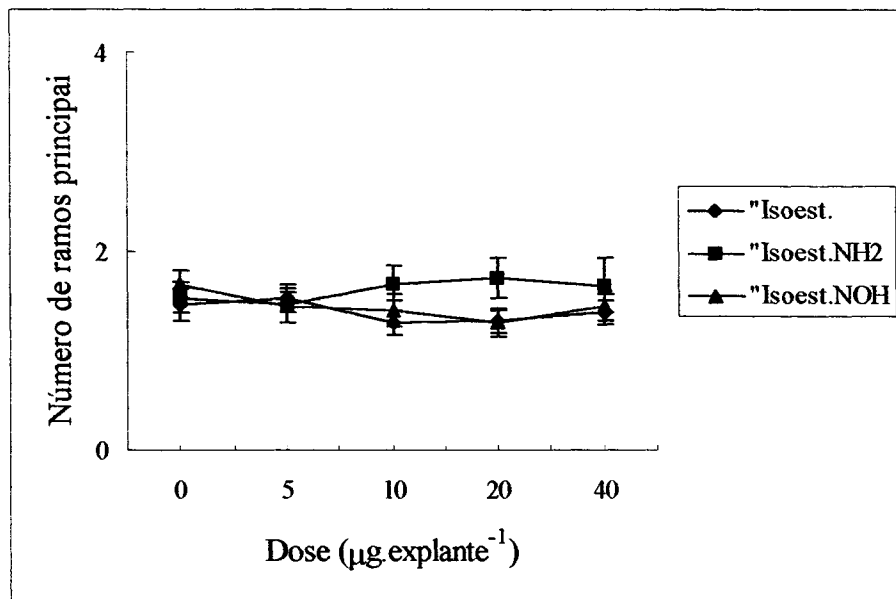


FIGURA 4.14 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE A TAXA DE MULTIPLICAÇÃO DE PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



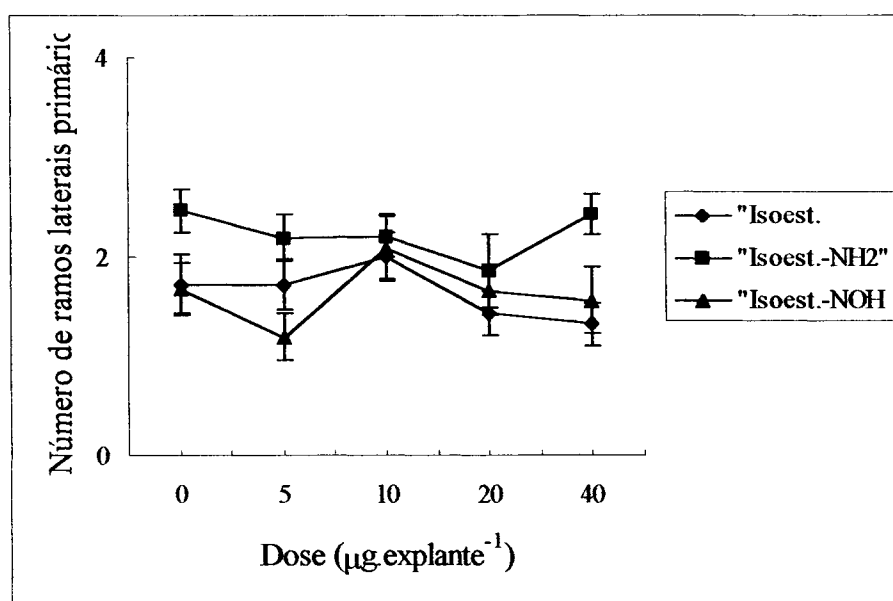
NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

FIGURA 4.15 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O NÚMERO DE RAMOS PRINCIPAIS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



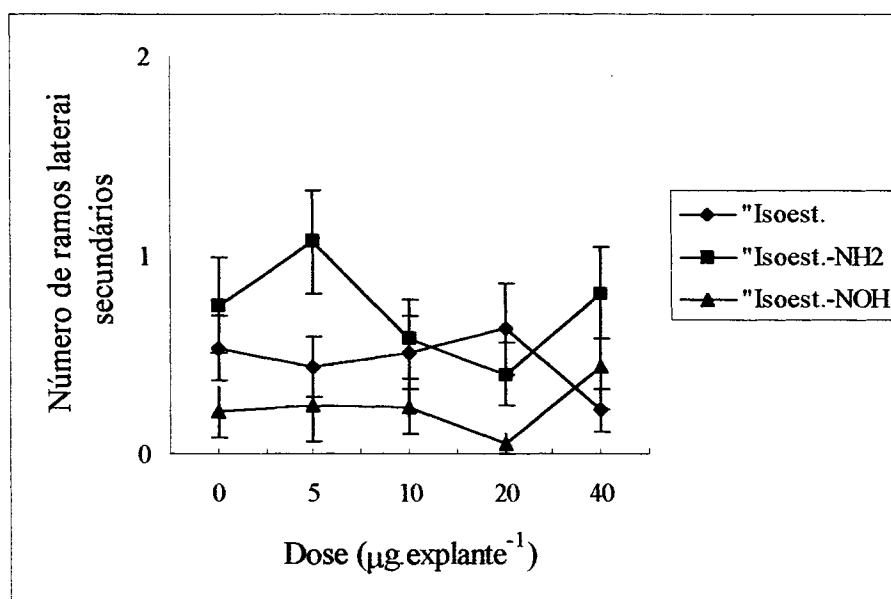
NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

FIGURA 4.16 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



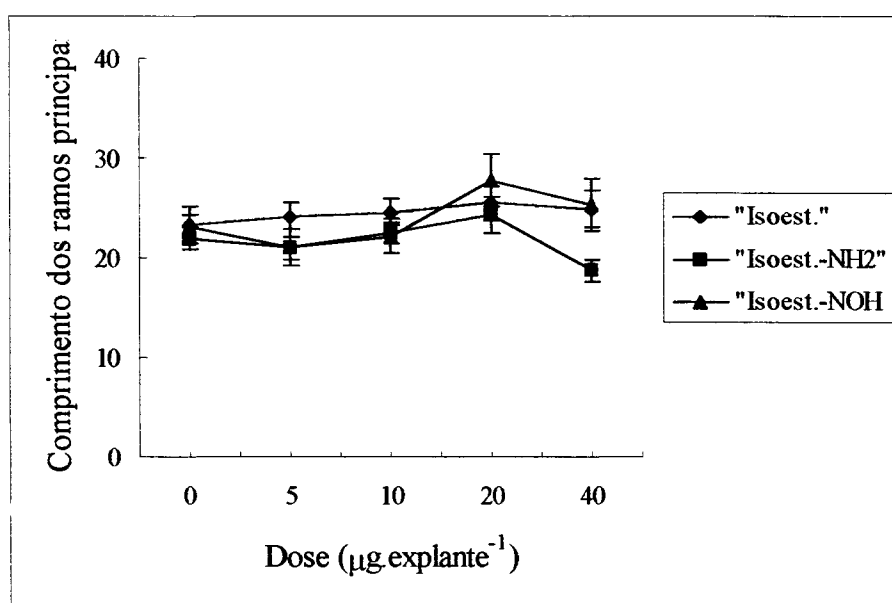
NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

FIGURA 4.17 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O NÚMERO DE RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS MAIORES OU IGUAIS A 15 mm DE COMPRIMENTO EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



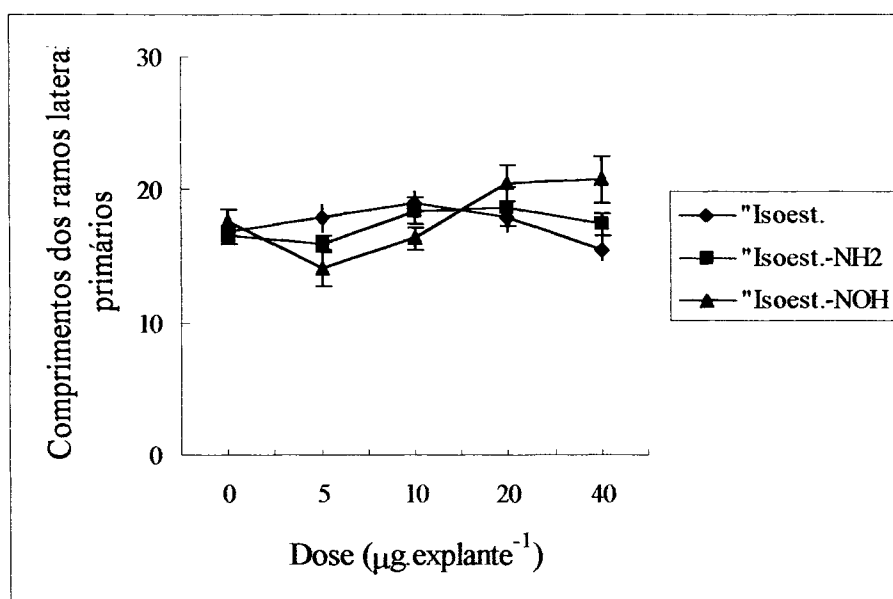
NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

FIGURA 4.18 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS PRINCIPAIS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



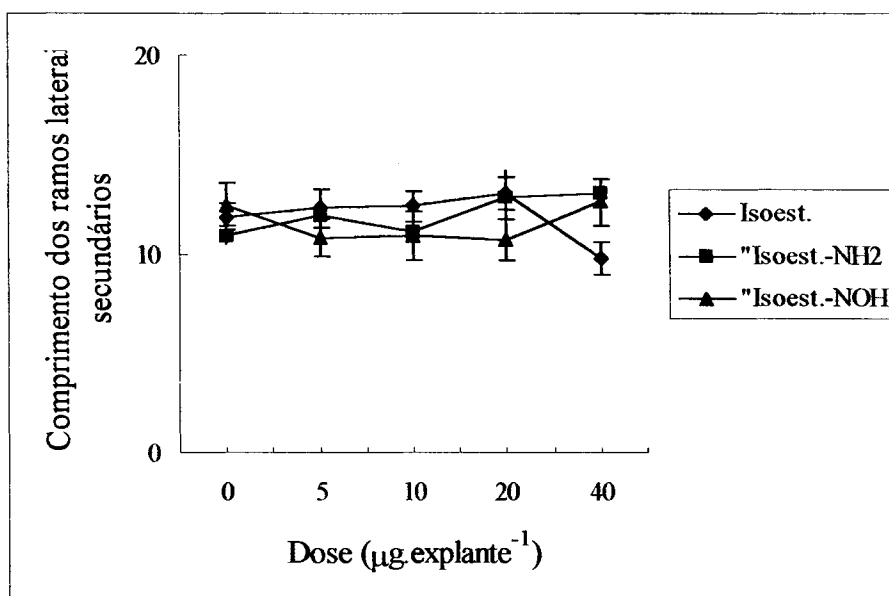
NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

FIGURA 4.19 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS PRIMÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

FIGURA 4.20 – EFEITO DO ISOESTEVIOL E DE SEUS DERIVADOS AMINA E OXIMA SOBRE O COMPRIMENTO DOS RAMOS LATERAIS SECUNDÁRIOS EM PARTES AÉREAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*



NOTA: Barras verticais indicam o erro-padrão da média.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 ESTIMULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ETILENO PELA 5F-HOMOETILCASTASTERONA

A taxa de produção de reguladores do crescimento vegetal, dentre os quais o etileno e brassinoesteróides, influenciam a diferenciação, a proliferação e o crescimento de células e tecidos vegetais cultivados *in vitro*, podendo promover, inibir ou não afetar a formação de brotações laterais (LAMBARDI *et al.*, 1997).

Embora os brassinoesteróides apresentem atividade regulatória sobre o crescimento das plantas por si, em segmentos de hipocótilo estiolado de feijão, brassinoesteróides mostraram-se capazes de aumentar a biossíntese de etileno através da estimulação da atividade da ACC sintase, (ARTECA, 1995a), enzima responsável pela conversão do ácido aminociclopropano carboxílico em etileno (OSBORNE, 1989), indicando que o etileno poderia agir como um mensageiro secundário na via de transdução de sinal do brassinoesteróide.

Em plantas de tomate crescidas em solução hidropônica, foi observado aumento na produção de etileno e ACC, quando as plantas foram tratadas com 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  de brassinolídeo, sendo este efeito reduzido quando foram utilizados inibidores da biossíntese de etileno juntamente com o brassinoesteróide (SCHLAGNHAUFER e ARTECA, 1985). Em ensaios de inclinação de lâmina foliar de arroz (CAO e CHEN, 1995), foi verificado aumento da produção de etileno, em plântulas tratadas com 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$  de brassinoesteróide, e concomitantemente, aumento na atividade biológica. Entretanto, quando foi utilizado o cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), um inibidor da biossíntese de etileno, houve redução no grau de inclinação na lâmina foliar de arroz, demonstrando que a resposta é dependente do etileno formado.

WOESTE *et al.*, (1999) avaliando o efeito do EB sobre a biossíntese de etileno em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, verificaram que o mesmo promoveu um aumento na taxa de liberação de etileno quando foi utilizado na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ , com um alto declínio nesta taxa de liberação de etileno quando concentrações mais elevadas foram utilizadas.

O efeito estimulatório dos brassinoesteróides sobre a biossíntese de etileno é similar ao efeito induzido pelas auxinas, visto que as auxinas também estimulam a biossíntese de etileno

através da estimulação da síntese de ACC sintase, resultando em um aumento da produção de ACC, o precursor imediato do etileno (SCHLAGNHAUFER e ARTECA, 1985).

Diversos estudos têm sugerido a existência de uma relação entre auxina e etileno, inibindo o crescimento das gemas laterais (CLINE, 1991; JOHN, 1997). RUSSEL e THIMANN (1988) demonstraram que a dominância apical é removida se a produção de etileno for bloqueada. O AVG, um inibidor da biossíntese de etileno, tem se mostrado capaz de induzir a quebra de dormência em gemas laterais em plantas de macieira crescidas a campo (WILLIAMS, 1980), demonstrando que a indução da brotação de ramos é estimulada pela remoção do etileno. Em estudos realizados por PEREIRA-NETTO e McCOWN (1999) em mangabeira, demonstraram que a inibição da biossíntese de etileno induzida por aumento da temperatura ou tratamento com inibidores da biossíntese de etileno, estimulavam o alongamento dos ramos laterais, e, conseqüentemente, a quebra da dominância apical.

O crescimento e o desenvolvimento de plantas *in vitro* não é governado somente pela composição do meio de cultura, mas também por constituintes da atmosfera interna do frasco, tais como o oxigênio, o dióxido de carbono e o etileno (LAI *et al.*, 2000). O etileno é um dos componentes mais importantes na atmosfera interna do frasco de cultivo, sendo sempre produzido pelos tecidos e células cultivados *in vitro* (RIGHETTI *et al.*, 1990).

A taxa de liberação de etileno tem sido monitorada em experimentos com células e tecidos de plantas cultivados *in vitro* (MARINO *et al.*, 1995), sendo o regulador do crescimento produzido a uma taxa que varia de  $0,05$  a  $100 \text{ nl.g}^{-1} (\text{peso fresco})^{-1} .\text{h}^{-1}$  (OSBORNE, 1989).

Estudos anteriores demonstraram que um derivativo fluoretado da 28-homoetilcastasterona (28-HCTS), a 5F-HCTS, estimulava a proliferação de brotações laterais no porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro*, enquanto que um derivativo hidroxilado (OH-HCTS) e a forma nativa (28-HCTS) não apresentavam qualquer efeito detectável (SCHAEFER, 2002). Quando usado na dose de  $0,5 \mu\text{g.explante}^{-1}$ , a 5F-HCTS estimulou a proliferação de brotações laterais, o que resultou em aumento de 112% na taxa de multiplicação de partes aéreas do porta-enxerto marubakaido (SCHAEFER *et al.*, 2002). Com o objetivo de investigar um possível envolvimento do etileno na proliferação de brotações laterais do porta-enxerto de macieira marubakaido estimulada por brassinoesteróides, foi monitorada a taxa de liberação de etileno por partes aéreas tratadas com  $0,5 \mu\text{g.explante}^{-1}$  de 5F-HCTS, e

também foram crescidas partes aéreas do porta-enxerto de macieira em atmosfera enriquecida com diferentes concentrações de etileno.

De maneira similar ao que tem sido encontrado para partes aéreas de outras espécies crescidas *in vitro*, a exemplo da mangabeira (PEREIRA-NETTO e McCOWN, 1999), observou-se neste estudo aumento na taxa de liberação de etileno no período inicial de cultivo, sendo este aumento seguido de uma redução progressiva que se prolongou até o final do período de cultivo, tanto para partes aéreas tratadas com o brassinoesteróide, quanto para partes aéreas não tratadas com o brassinoesteróide. Todavia, partes aéreas tratadas com o 5F-HCTS tenderam a apresentar maior taxa de liberação de etileno, quando comparadas a partes aéreas não tratadas com o 5F-HCTS. Este efeito estimulatório do brassinoesteróide sobre a liberação de etileno por parte do porta-enxerto marubakaido está de acordo com resultados encontrados por KORABLEVA *et al.* (2002), onde a aplicação de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de 24-epibrassinolídeo (EB) aumentou a produção de etileno entre o primeiro e sétimo dia após o tratamento de tubérculos de batata com a molécula, tendo sido observado que o efeito estimulatório do EB desapareceu após o sétimo dia de cultivo.

Partes aéreas do porta-enxerto marubakaido tratadas com  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{explant}^{-1}$  de 5F-HCTS, mantidas em ambiente hermeticamente fechado, por 10 dias, apresentaram padrão de liberação de etileno semelhante ao observado para partes aéreas ventiladas a cada 48 horas, todavia, as taxas de liberação de etileno apresentaram valores aproximadamente 10 vezes maiores do que aqueles apresentados por partes aéreas crescidas por 48 horas sem ventilação (dados não apresentados), sugerindo que partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido apresentam produção autocatalítica de etileno.

Diversos estudos com o intuito de verificar o efeito do etileno na indução, formação e crescimento de partes aéreas têm sido realizados. O etileno apresenta efeito estimulatório ou inibitório sobre a diferenciação e crescimento de partes aéreas, dependendo da espécie considerada (ECONOMOU, 1991).

DIMASI-THERIOU e ECONOMOU (1995), ao aplicar 0,1 ppm de etileno, durante as primeiras duas semanas de cultivo, verificaram aumento no número e comprimento de ramos laterais em um híbrido entre *Prunus persica* e *P. amygdalus*.

Ao estudar o efeito do etileno sobre a proliferação de ramos laterais em plantas de mamão crescendo *in vitro*, LAI *et al.*, (1998) verificaram um aumento de 41% no número de ramos quando o nível endógeno de etileno atingiu 0,06 ppm durante a primeira semana de cultivo,

momento a partir do qual se procedeu a aeração dos frascos, aeração esta continuada nas duas semanas subseqüentes. Também em experimentos com mamão, LAI *et al.*, (2000) observaram aumento de 36% no número de ramos e de 45% no número de folhas formadas em plantas tratadas com 0,2 ppm de etileno.

Tendo em vista que a aplicação de 5F-HCTS, além de resultar na proliferação de ramos laterais no porta-enxerto marubakaido, também provocou aumento na taxa de liberação de etileno, foram realizados testes com o objetivo de verificar a possibilidade do etileno agir como um mensageiro secundário na via de transdução de sinal do brassinoesteróide. Todavia, partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com etileno em concentração igual ou superior a  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , apresentaram inibição da formação de ramos laterais e do alongamento caulinar. Partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com 2,5; 5 e  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de etileno (dados não apresentados) não apresentaram qualquer alteração no comprimento ou número de ramos formados, quando comparadas a partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  etileno.

Os resultados obtidos para partes aéreas crescidas em atmosfera enriquecida com etileno demonstram que o aumento na taxa de multiplicação, resultante da estimulação da proliferação de ramos laterais no porta-enxerto marubakaido (SCHAEFER *et al.*, 2002) induzida pelo brassinoesteróide 5F-HCTS, não é dependente, pelo menos diretamente, do aumento da taxa de liberação de etileno.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO POTENCIAL DO ISOESTEVIOL E DE DOIS DERIVADOS SOBRE O PADRÃO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO PORTA-ENXERTO MARUBAKAIDO CRESCENDO *IN VITRO*

O isoesteviol é um diterpenóide tetracíclico obtido a partir do esteviosídeo (COSTA e ALVAREZ, 1994). Brassinoesteróides, esteviosídeos e giberelinas são conhecidos por apresentarem precursor biossintético comum, sendo os três grupos de compostos derivados do metabolismo do ácido mevalônico (MVA) (BRANDLE *et al.*, 2002).

O isosteviol é uma molécula derivada do esteviol, que por sua vez apresenta como precursor imediato o ácido *ent*-caurenóico (BRANDLE *et al.*, 2002). Nas vias biossintéticas de giberelinas e do esteviol (BRANDLE *et al.*, 2002) os passos anteriores à formação do ácido *ent*-

caurenóico são idênticos. Tendo em vista as similaridades entre as vias biossintéticas, das giberelinas e do esteviol; as semelhanças estruturais entre giberelinas, esteviol e brassinoesteróides, o fato de giberelinas estimularem o alongamento caulinar (JUNTILA, 1993) e brassinoesteróides estimularem a proliferação de brotações laterais (SCHAEFER, *et al.*, 2002), testamos a possibilidade do isosteviol e de dois derivados, o isoesteviol-oxima e o isoesteviol-amina, respectivamente, com a adição de um grupamento oxima e amina, no carbono 16, de estimularem o alongamento caulinar e/ou a proliferação de brotações laterais no porta-enxerto de macieira marubakaido.

De maneira algo que surpreendente, o isoesteviol e seus dois derivados não exerceram qualquer efeito modulador sobre o alongamento caulinar ou sobre a proliferação de brotações laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido crescendo *in vitro*. Todavia, outros estudos relacionados com o isoesteviol verificaram que o mesmo apresenta atividade inseticida, sendo ativo contra o mosquito *Aedes aegypti*, além de também apresentar efeito herbicida (IKAN *et al.*, 1992).

Estudos realizados por MIYAZAWA *et al.*, (1997) com arroz, demonstraram que a aplicação de esteviol (isômero do isoesteviol) juntamente com cálcio-prohexadiona, um inibidor da biossíntese de giberelinas, aumentou o comprimento da bainha da segunda folha quando baixas concentrações de cálcio-prohexadiona foram utilizadas. Entretanto, quando a cálcio-prohexadiona foi utilizada isoladamente, esta diminuiu o comprimento da bainha da segunda folha de arroz, com um efeito pronunciado na dose de 10 ng.plântula<sup>-1</sup>. Assim, podemos supor que o esteviol e seus derivados esteviosídeos podem apresentar atividade biológica semelhante a giberelinas e brassinoesteróides, o que não foi comprovado neste estudo.

Muitos trabalhos relatam que diferenças na estrutura molecular de reguladores do crescimento vegetal podem ser responsáveis por diferentes efeitos no desenvolvimento de células, tecidos e órgãos vegetais. RAMÍREZ *et al.* (2000), por exemplo, sintetizaram e avaliaram a atividade biológica de cinco análogos do brassinoesteróide 28-homoetilcastasterona através de testes de inclinação de lâmina de arroz (*Oriza sativa*, var. Chuy) e de atividade antiviral, demonstrando que a magnitude do efeito dependia da modificação estrutural na molécula. Já SAITO *et al.* (1998), relataram que as giberelinas com grupamento hidroxila na posição 3 $\beta$ , tais como GA1 e GA4 são ativas na promoção do alongamento caulinar em plantas superiores, enquanto que GA20 e GA9, que não possuem o grupamento hidroxila na posição 3 $\beta$ ,

não apresentam capacidade de estimular o alongamento caulinar. As giberelinas A4 e A9 (giberelinas não 13-hidroxiadas) promovem alongamento da parte aérea de pepino e de abóbora (espécies da Família Cucurbitaceae), ao passo que as giberelinas GA1 e GA20 (giberelinas 13-hidroxiadas) não estimulam o alongamento de partes aéreas em pepino e abóbora, mas o fazem em plantas de arroz, ervilha e milho. Desta forma, verifica-se que a presença ou não do grupamento hidroxila no carbono 3 ou 13 é determinante para que giberelinas apresentem ou não capacidade de estimular o alongamento caulinar, sendo ainda a capacidade de resposta espécie-dependente. Todavia, neste trabalho, nem a molécula de isosteviol na sua forma nativa nem em duas formas derivadas apresentaram qualquer efeito sobre a arquitetura de partes aéreas do porta-enxerto marubakaido crescendo *in vitro*.

As razões pelas quais o isosteviol e seus derivados não apresentaram qualquer efeito evidente sobre a arquitetura de partes aéreas do porta-enxerto marubakaido crescendo *in vitro* não são claras. Considerando que o isoesteviol tem apresentado atividade biológica tão diversa como atividade inseticida, sendo ativo contra o mosquito *Aedes aegypti*, e atividade herbicida (IKAN *et al.*, 1992), foi com relativa surpresa que não foi observado nenhum efeito desta molécula ou de seus dois derivados no sistema descrito nesta dissertação.

## 6. CONCLUSÕES

1. A aplicação do brassinoesteróide 5F-HCTS resulta na estimulação da liberação de etileno por partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro*.
2. O etileno possivelmente não age como mensageiro secundário na via de transdução de sinal do 5F-HCTS no sistema utilizado neste trabalho uma vez que partes aéreas do porta-enxerto marubakaido crescendo *in vitro* não apresentam estimulação de proliferação de ramificações laterais quando crescidas na presença de etileno exógeno.
3. As moléculas derivadas do esteviosídeo, isoesteviol e seus dois derivados, isoesteviol-amina e isoesteviol-oxima, não exerceram efeito modulador sobre o alongamento caulinar ou sobre a proliferação de brotações laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira marubakaido crescendo *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTECA, R. N. **Plant Growth Substances: Principles and Applications**. Chapman & Hall : New York, 1995a, 332p.

ARTECA, R. N. Brassinoesteroids. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2.ed., London : Kluwer Academic Publishers, 1995b, 833 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ (ABPM). Informações estatísticas da produção de maçã. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/estatisticas/informacoesestatisticasbrasil.html>> Acesso em: 12 dez. 2003, 10:45hs.

AVENT, A. G.; HANSON, J. R.; OLIVEIRA, B. H. Hydrolysis of the Diterpenoid Glycoside, Stevioside. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2712-2715, 1990.

BERTONI, M. S. El. Cáa-ehê (*Eupatorium rebaudiamum*, Species novas). **Revista de Agronomia**, v. 1, p.35-37, 1899.

BIASI, L. A. Reguladores de Crescimento Vegetal. In: WACHOWCZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia Vegetal: Produção e Pós-colheita**. Champagnat : Curitiba, p. 63-94, 2002.

BRANDLE, J. E.; STARRAT, A. N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana* Its Biological, Chemical and Agricultural Proprieties. Disponível em: <[http://res.2agr.ca/london/pmrc/english/faq/stevia\\_ver.html](http://res.2agr.ca/london/pmrc/english/faq/stevia_ver.html)> Acesso em: 19 abr. 2002, 16hs.

CAO, H. ; CHEN, S. Brassinosteroid-induced rice lamina joint inclination and its relation to indole-3-acetic acid and ethylene. **Plant Growth Regulation**, v. 16, p. 189 – 196, 1995.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de Auxinas Sintéticas no Enraizamento *in vitro* da Macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 181-186, 1999.

CHOE, S.; DILKES, B.P.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; SAKURAI, A.; FELDMANN, K.A. The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Cell**, n. 10, p. 231-243, 1998.

CHOI, S.; HARADA, A.; YOKOTA, T.; TAKATSUTO, S.; SAKURAI, A. A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone. **Phytochemistry**, v. 43, p. 593-596, 1996.

CHOI, Y. H.; FUJIOKA, S.; NOMURA, T.; HARADA, A.; YOKOTA, T.; TAKATSUTO, S.; SAKURAI, A. 1997. An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. **Phytochemistry**, v. 44, p. 609-613, 1997.

CHON, N. M.; NISHIKAWA-KOSEKI, N.; HIRATA, Y.; SAKA, H. e ABE, H. Effects of Brassinolide on mesocotyl, coleoptile and leaf growth in rice seedlings. **Plant Production Science**. v. 3, n. 4, p. 360-365, 2000.

CLINE, M.G. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. **Physiol Plantarum**, v. 90, p. 230-237, 1994.

CLINE, M. G. Concepts and terminology of apical dominance. **Am. Journal of Botany**, v. 84, p.1064-1069, 1997.

CLINE, M. G. Execution of the auxin replacement apical dominance experiment in temperate woody species. **Am. Journal of Botany**, v. 87, p. 182-190, 2000.

CLOUSE, S. D. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. **Physiol. Plant.** v.100, p. 702-709, 1997.

CLOUSE, S. D.; LANGFORD, M. E MCMORRIS, T. C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 671-678, 1996.

CLOUSE, S. D.; SASSE, J. M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. **Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.** v. 49, p. 427-451, 1998.

COLLETT, C. E.; HARBERD, N. P.; LEYSER, O. Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. **Plant Physiol.**, v. 124, p. 553-561, 2000.

COSTA, S. C.; ALVAREZ, M. Metabolism of isoesteviol as a low specific substrate by a wild strain of *Gibberella fugikuroi*. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 37, p. 1013 – 1022, 1994.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. **The Plant Cell**, v.9, p.1211-1223, 1997.

CRONQUIST, A. **The evolution and classifications of flowering plants.** 2.ed., New York : The York Botanical Garden, 1988, 555 p.

DIMASI-THERIOU, K.; ECONOMOU, A. S. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*). **Plant Cell Rep.**, v. 15, p. 87-90, 1995.

ECKER, J. R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, v. 284, p. 667-675, 1995.

ECONOMOU, A. S. Ethylene and shoot formation *in vitro*. **Acta Horticulture**, v. 300, p. 35-43, 1991.

FIORINO, P.; LEVA, A. R. Propagation of apple cultivars. **Acta Horticulture**, v. 131, p. 95-99, 1983.

FLORES, R.; LESSA, A. O.; PETERS, J. A.; FORTES, G. R. L. Efeito da sacarose e do benomyl na multiplicação *in vitro* da macieira. **Pesq. Agropec. Brasil.**, v. 34, p. 2363-2368, 1999.

FUJIOKA, S.; SAKURAI, A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. **Physiol. Plant.**, v. 100, p. 710-715, 1997.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2. England : Ed. Exegetics, 1993b.

GUZMAN, P.; ECKER, J. R. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. **Plant Cell**, v.2, p.513-523, 1990.

HERSHENHOM, J.; ZOHAR, M.; CRAMMER, B.; ZIV, Z.; WEINSTEIN, V.; KLEIFELD, Y.; LAVAN, Y.; IKAN, R. Plant-growth Regulators Derived From the Sweetener Stevioside. **Plant Growth Regulation**, v. 23, p. 173-178, 1997.

IGLESIAS-ARTEAGA, M. A. Brassinolide. Disponível em:  
<<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/brassinolide/brassinolideh.htm>> Acesso em: 31 out. 2002, 11:45hs

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 6. ed. São Paulo: Nacional, 1983. 777 p.

JONH, P. Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. **Physiol. Plant.**, v. 100, p. 583 – 592, 1997.

JUNTILLA, O. Interaction of growth retardants, daylength, and gibberellins A<sub>19</sub>, A<sub>20</sub>, and A<sub>1</sub> on shoot elongation in birch and alder. **J. Plant Growth Regul.**, v. 12, p. 123 – 127, 1993.

IKAN, R.; CRAMMER, V.; WEINSTEIN, V.; ZIV, Z. Sweet diterpene glycosides and their biological activity. **Israel J. Of Botany**, v.41, p.106, 1992.

KAUSCHMANN, A.; JESSOP, A.; KONCZ, C.; SZEKERES, M.; WILLMITZER, L.; ALTMANN, T. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. **Plant J.**, v. 9, p. 701–713, 1996.

KAMURO, Y.; TAKTSUTO, S. Pratical application of brassinosteroids in agricultural fields. In: SAKURAI, A.; YOKOTA, T. S.; CLOUSE, D. (Eds.). **Brassinosteroids Steroidal Plant Hormones**, 1999.

KIM, K. K.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Hydroxilation of *ent*-Kaurenoic Acid to Steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni – Purification and Partial Characterization of the Enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 332, 2, p.223-230, 1996.

KOKA, C.V.; CERNY, R.E.; GARDNER, R.G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S. e CLOUSE, S.D. A Putative Role for the Tomato Genes *DUMPY* and *CURL-3* in Brassinosteroid Biosynthesis and Response. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 85-98, 2000.

KORABLEVA, N. P. ; PLATONOVA, T. A.; DOGONADZE, M. Z.; EVSUNINA, A. S. Brassinolide effect on growth of apical meristems, ethylene production, and abscisic acid content in potato tubers. **Biologia Plantarum**, v. 4, p. 39-43, 2002.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody Plants**. 2.ed., New York : Academic Press, 1996.

LAI, C. C.; YU, T. A.; YEH, S. D.; YANG, J. S. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 53, p. 221-225, 1998.

LAI, C. C.; YEH, S. D.; YANG, J. S. Enhancement of papaya axillary shoot proliferation *in vitro* by controlling the available ethylene. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 41, p. 203-212, 2000.

LAMBARDI, M.; BENELLI, C.; FABBRI, A. In vitro axillary shoot proliferation of apple rootstocks under different ethylene conditions. **In Vitro Cell Devel. Biol. Plant.** v. 33, p. 70-74, 1997.

LI, J.; CHORY, J. Brassinosteroid actions in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 50, p. 275-282, 1999.

LIMA, M. I. S. Substâncias do Metabolismo Secundário de Algumas Espécies Nativas e Introduzidas no Brasil. In: LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos: RiMa, 2000, 531 p.

LOCATELLI, L. M.; VITOVSKI, C. A.; LOVATO, P. E. Shoot growth and root architecture modifications of a micropropagated apple rootstock (*Malus prunifolia*) clone rooted ex vitro and inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. In: 2<sup>ND</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRHIZA, 1998. Uppsala. Proceedings... Uppsala Swedish University, 1998.

MANDAVA, N. B. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.** v.39, p.23-52, 1988.

MARINO, G.; BERARDI, G.; ANCHERANI, M. The effect of the type of closure on the gas composition of the headspace and the growth of GF 677 peach x almond rootstock cell suspension cultures. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 31, p. 207-210, 1995.

MARTIN, M. N.; COHEN, J. D.; SAFTNER, R. A. A new 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-conjugating activity in tomato fruit. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 917-926, 1995.

MATTHYS, D.; GIELIS, J.; DEBERGH, P. Ethylene. In: AITKEN, C. J.; KOZAI, T.; SMITH, L. (Ed.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**, Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, p. 473-491, 1995.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. 1998 Disponível em: <<http://www.bio.mtu.edu/campbell/lec18-00/lec18-part3.pdf> > Acesso em: 23 dez. 2002, 16:25hs.

McKEON, T.; YANG, S. F. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: DAVIES, J. P. **Plant Hormones and their role in plant growth and developmental**, Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, p. 118-139, 1995.

MITCHELL, J. W.; MANDAVA, N. B.; WORLEY, J. F.; PLIMMER, J. R. ; SMITH, M. V. Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, v. 225, p. 1065-1066, 1970.

MIZUKAMI, H.; SHIIBA, K.; OHASHI, H. Enzymatic Determination of Stevioside in *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, v. 21, p. 1927-1930, 1982.

MIYAZAWA, T.; NAKAYAMA, I.; MATSUZAWA, M. Studies on mode of action and practical use of a plant growth regulator, prohexadione-calcium. *Chem. Regul. of Plant.*, v. 32, p. 17 – 26, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tabaco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; CHOE, S.; TAKATSUTO, S.; TAX, F. E.; YOSHIDA, S.; FELDMANN, K. A. Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 124: 201-209, 2000.

NORDIN, O. **Stereoselective Synthesis of Semiochemicals Related to Pine Sawflies: Stereochemical and synthetic studies on 1,6-germacradien-5-ol and *Pseudomonas* lipase catalysed transesterification of primary 2-methylalcohols**, Stockholm, 1999, 54 p. Tese – Department of Chemistry and Process Technology, Mid Sweden University and Royal Institute of Technology Stockholm.

NUNES, J. C. O.; BARPP, A.; SILVA, F. C.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto de Marubakaido (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal: , v.21, p.191 - 195, 1999.

OLIVEIRA, M. F.; FORTES, G. R. L. Seleção *in vitro* de material somático do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*) para tolerância ao alumínio. IX REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Porto Alegre, 1996.

OLIVEIRA, B. H.; SANTOS, M. C.; LEAL, P. C. Biotransformation of the Diterpenoid, Isoesteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 737-741, 1999.

OSBORNE, D. J. The control role ethylene in plant growth and development. In: CLISJSTER, H. *et al.* (eds), Biochemical and Physiological aspects of production in lower and higher plants. Oxford : Kluwer Academic Publishers, 1989, p. 1-11.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesq. Agropec. Brasil**, v. 36, p. 89-95, 2001.

PEREIRA-NETTO, A. B.; McCOWN, B. H. Thermally and chemically-induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evidence of mediation by ethylene. **Tree Physiol.**, v. 19, p. 733 – 740, 1999.

PÉREZ-PÉREZ, J. M.; PONCE, M. R.; MICOL, J. LUIS. The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like-kinase requires for cell expansion along the proximodistal axis. **Developmental Biol.**, n. 242, p. 161-173, 2002.

RAMIREZ, J. A.; CENTURIÓN, O. M. T.; GROS, E. G.; GALAGOVSKY, L. R. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. **Steroids**, v. 65, p. 329 - 337, 2000 a.

RAMIREZ, J. A.; GROS, E. G.; GALAGOVSKY, L. R. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs. **Tetrahedron**, v. 56, p. 6171-6180, 2000 b.

RIGHETTI, B., et al. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by prunus avium shoot cultures. **Plant.**, v.78, p.507-510, 1990.

RUSSEL, W.; THIMANN, K. V. The second messenger in apical dominance controlled by auxin. In: PHARIS, R. P.; ROOD, S. B. (Ed.). **Plant growth substances**. New York : Springer-Verlag, p. 419 – 427, 1988.

SAITO, T.; KAMIYA, Y.; YAMANE, H.; MUROFUSHI, N.; SAKURAI, A. E. TAKAHASHI, N. Effects of fluorogibberellins on plant growth and gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylases. **Plant Cell Physiology**, n.36, v.6, p. 574-580, 1998.

SAKURAI, A.; FUJIOKA, S. Studies on biosynthesis of brassinosteroids. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 61, p. 757–762, 1997.

SAKURAI A.; FUJIOKA, S. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids: A review. **J. Plant Growth Reg.**, v. 13, p. 147-159, 1993.

SAKURAI, A.; FUJIOKA, S. *Catharanthus roseus (Vinca rosea)*: *In vitro* production of brassinosteroids. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.), **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Springer-Verlag, Berlin., p. 87–96, 1996.

SAKURAI, A. Brassinosteroid biosynthesis. **Plant Physiology Biochemistry**. v.37, p. 351-361, 1999.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4. ed., Wadsworth Publishing Company : Belmont, 682 p., 1992.

SMALLE, J.; HAEGMAN, M.; KUREPA, J.; VanMONTAGU, M.; VANDERSTRAETEN, D. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 2756-2761, 1997.

SASSE, J. M. Recent progress in brassinosteroid research. **Physiol. Plant.**, v. 100, p. 696-701, 1997.

SCHAEFER, S. **Efeito comparativo da forma nativa e de derivados do brassinoesteróide homoetil-castasterona sobre a micropropagação do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*)**, Curitiba, 2002, 93 p. Dissertação - Curso de Pós-graduação em Botânica – Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCHAEFER, S.; MEDEIRO, S.A.; RAMIREZ, J.A.; GALAGOVSKY, L.R.; PEREIRA-NETTO, A.B. Brassinosteroid-driven enhancement of the *in vitro* multiplication rate for the marubakaido apple rootstock [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh]. **Plant Cell Rep.**, v. 20, p. 1093-1097, 2002.

SCHLAGNHAUFER, C. D.; ARTECA, N. R. Inhibition of brassinosteroid-induced epinasty in tomato plants by aminooxyacetic acid and CO<sub>2</sub>. **Plant Physiol.**, v. 65, p. 151-155, 1985.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e megumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 433-437, 1993.

SHIBATA, H.; SAWA, Y.; OKA, T.; SONOKE, S.; KIM, K. K.; YOSHIOKA, M. Steviol and Steviol-Glycoside: Glucosyltransferase Activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni – Purification and Partial Characterization. **Arch. of Bioch. and Bioph.**, v. 321, p. 390-396, 1995.

SILVA, A. L. C. Cultura de tecidos. Disponível em: <<http://geocities.yahoo.com.br/alccoelho/calogenese.html>> Acesso em: 12 nov. 2002, 15hs.

SMAGGHE, G.; DECOMBEL, L.; CARTON, B.; VOIGT, B.; ADAM, G.; TIRRY, L. Action of brassinosteroids in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. **Insect Bioch. and Mol. Biol.**, v. 32, p. 199-204, 2002.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.Ç LEFKOWITZ, R. J.Ç HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica: Aspectos Gerais**. 7. ed., Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 1983, 785p. capítulo 7 p.102-119.

SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness. **J. Nat. Prod.**, v. 45, p. 590-599, 1982.

STEBER, C. M.; McCOURT, P. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 763-769, 2001.

THOMPSON, M. J.; MEUDT, W. J.; MANDAVA, N. B.; DUTKY, S. R.; LUSBY, W. R.; SPAULDING, D. W. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. **Steroids**, v. 39, p. 89-105, 1982.

TORRENEGRA, R.; GOMEZ, D. L.; TELLEZ, A. N. Actividad giberelica de los compuestos diterpenicos derivados de kaureno aislados de *Espeletiaopsis santanderensis* Cuatr. **Actualidades Biol. Medellin**, v. 75, p. 19-22, 2001.

VILLALOBOS, N.; MARTIN, L.; MACÍAS, M. J.; MANCHENO, B.; GRANDE, M. Gibberellin-like Activity of Some Tetracyclic Diterpenoids From *Elaeoselinum* Species and Their Derivatives. **Phytochemistry**, v. 37, p. 635-639, 1994.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol.**, v. 35, p. 155 – 189, 1984.

YOKOTA, T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 137–143, 1997.

YOKOTA, T.; OGINO, Y.; SUZUKI, H.; TAKAHASHI, N.; SAIMOTO, H.; FUJIOKA, S.; SAKURAI, A. Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids. In: H.G. Cutler; T. Yokota & G. Adam (Eds.), *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Application*, Amer. Chem. Soc., Washington, DC., p. 86–96, 1991.

WANG, K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, p. 131-151, 2002.

WANG, T. W.; COSGROVE, D. J.; ARTECA, N. R. Brassinosteroids stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (*Brassica chinensis* cv Lei-Choi). **Plant Physiol.**, v. 101, p. 965-968, 1993.

WILLIAMS, M. W. Retention of fruit firmness and increase in vegetative growth and fruit set of apples with aminoethoxyvinilglicine. **Hortscience**, v. 15, p. 76 – 77, 1980.

WOESTE, K. E.; VOGEL, J. P.; KIEBER, J. J. Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Physiol. Plant.**, v. 105, p. 478 – 484, 1999.

ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B.; FARIA, J. T. C.; GOTTINARI, R. A. & CENTELLAS, A. Q. Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido. **Ciência Rural**, v. 28, p. 387-391, 1998.