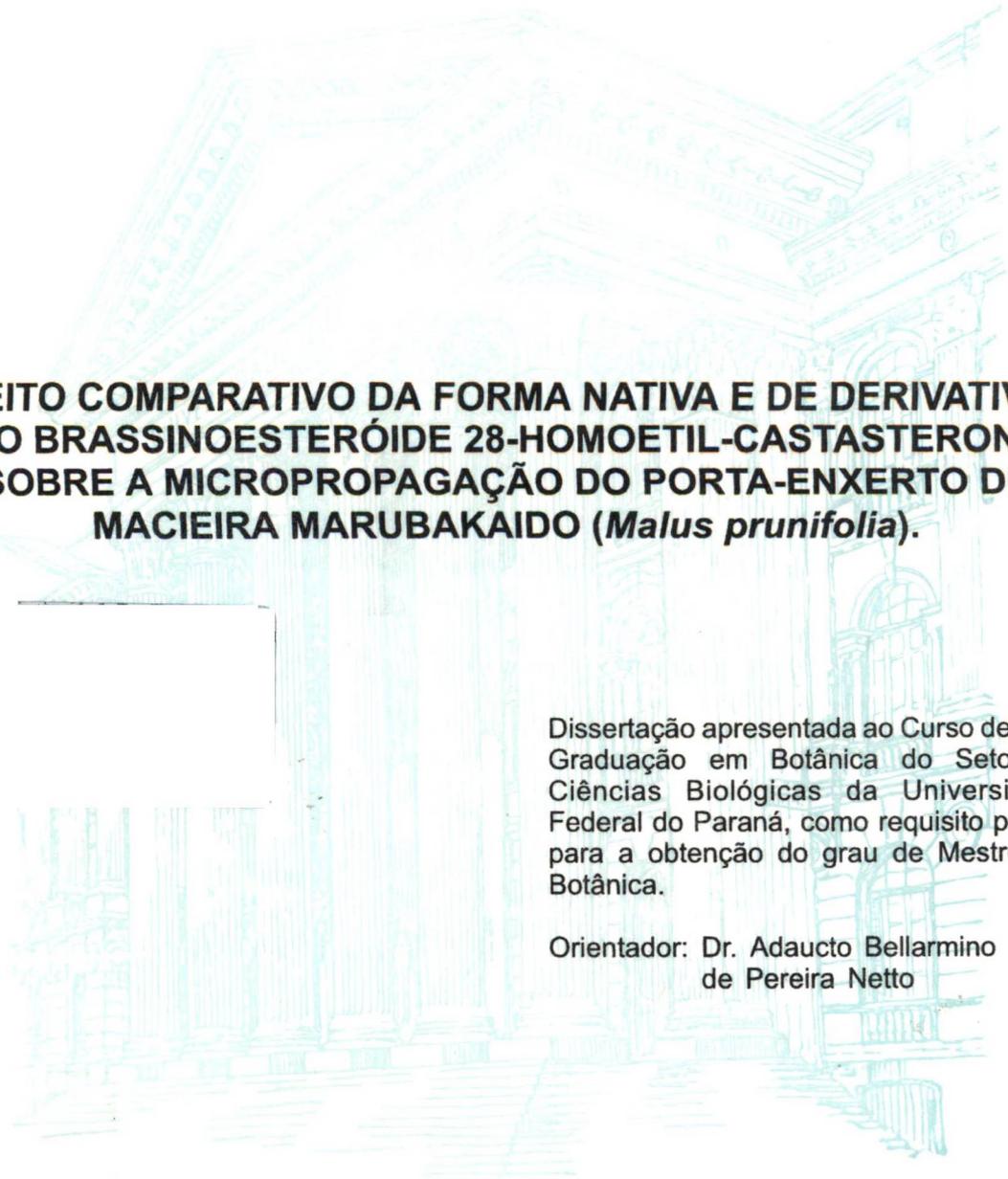


SILVIA SCHAEFER



**EFEITO COMPARATIVO DA FORMA NATIVA E DE DERIVATIVOS  
DO BRASSINOESTERÓIDE 28-HOMOETIL-CASTASTERONA  
SOBRE A MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE  
MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia*).**

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

Orientador: Dr. Aducto Bellarmino  
de Pereira Netto

CURITIBA

2002

SILVIA SCHAEFER

**EFEITO COMPARATIVO DA FORMA NATIVA E DE DERIVATIVOS  
DO BRASSINOESTERÓIDE 28-HOMOETIL-CASTASTERONA  
SOBRE A MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE  
MACIEIRA MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia*).**

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

Orientador: Dr. Adauto Bellarmino  
de Pereira Netto

CURITIBA

2002



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Botânica  
Curso de Pós-Graduação em Botânica  
Centro Politécnico – Jardim das Américas – Caixa Postal 19081  
CEP 81531-990 – Curitiba – Paraná  
Tel: (41) 361-1625 – Fax: (41) 269-2642  
E-mail: pgbotan@bio.ufrpr.br – home page: <http://www.ufrpr.br>

**“Efeito comparativo da forma nativa e de derivados do brassinoesteróide  
Homoetil-castasterona sobre a micropropagação do porta-enxerto de macieira  
marubakaido (*Malus prunifolia*)”.**

por

*Silvia Schaefer*

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. Adauto Bellarmino de Pereira Netto (Orientador)**

**Prof.ª. Dr.ª. Luciana Lopes Fortes Ribas (Titular/UFPR)**

  
**Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti (Titular/UFSC)**

Curitiba, 26 de março de 2002



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  
EP - 81531-980 - CURITIBA - Paraná  
Tel: (41) 361-1625 Fax: (41) 266-2042  
E-mail: pbotan@bio.ufpr.br - home page: http://www.ufpr.br

Título: **Mestre em Ciências Biológicas - Área de Botânica.**

Dissertação: **“Efeito comparativo da forma nativa e de derivados do brassinoesteróide Homoetil-castasterona sobre a micropropagação do porta-enxerto de macieira marubakaido (*Malus prunifolia*)”.**

Candidata: *Silvia Schaefer*

**Banca Examinadora:** Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto (Orientador)  
Prof.ª Dr.ª Luciana Lopes Fortes Ribas (Titular-UFPR)  
Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti (Titular-UFSC)

**Parecer:** A Comissão Examinadora reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, após exame e julgamento da Dissertação, atribui as seguintes notas: Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto: Nota 9,5; Prof.ª Dr.ª Luciana Lopes Fortes Ribas: Nota: 9,5; Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti: Nota: 9,5; é de parecer que constitui um trabalho Científico e recomenda a sua publicação após as correções sugeridas.

**APROVA A DISSERTAÇÃO COM A NOTA: 9,5 e CONCEITO: A.**

A candidata tem 30 (trinta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

Curitiba, 26 de março de 2002.

Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto: Aducto Bellarmino de Pereira Netto  
Prof.ª Dr.ª Luciana Lopes Fortes Ribas: Luciana Lopes Fortes Ribas  
Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti: Enio Luiz Pedrotti  
Ciente candidata: Silvia Schaefer

Dedico este trabalho aos meus pais, Anscar e Vania Schaefer, pelo grande amor, carinho e compreensão que sempre tiveram por mim e pelo incentivo à minha carreira de Bióloga e Botânica. Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto, pela orientação, por nossas valiosas discussões, pelos conselhos e pela amizade.

À Dra. Lydia Galagovsky, do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade de Buenos Aires, Argentina, pelos brassinoesteróides cedidos para a realização deste trabalho e pelas informações prestadas.

Ao Dr. Enio Luiz Pedrotti do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo fornecimento do clone do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) estabelecido *in vitro*.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Botânica, em especial à Dra. Elide dos Santos Jimena e à Dra. Thelma Veiga Ludwig, por sempre me receberem em momentos de dúvida e pelos auxílios prestados.

Ao meu irmão Henrique, pelas conversas, companheirismo e amor, tão importantes durante a realização deste trabalho.

Às minhas colegas de mestrado, que se tornaram acima de tudo minhas grandes amigas: Juliana Marzinek, Sonia, Juliana Martins, Marília, Nathieli, Viviane, Eliane, Daniela, Mirian e especialmente à Cláudia e à Patrícia, minhas irmãzinhas do coração. A todas, obrigada pelos papos, pelas risadas e por tornar a passagem pela Botânica ainda mais agradável.

Aos meus eternos e inesquecíveis amigos da Bioquímica, Luciane, Andréia, Gisele, Ana Paula, Ângela, Fabíola, Renato, Juan, Eliana, Cristina. Tenho certeza que a melhor coisa que aconteceu na bioquímica foi ter conhecido vocês e conquistado sua amizade. Obrigada por tudo: conversas (e foram muitas...), desabafos, festas, risadas, brincadeiras e passeios. Vocês são muito importantes para mim.

À Profa. Dra. Fany Reicher, pela orientação durante a Graduação e por sua amizade.

Aos meus amigos da Graduação, que na verdade são muito mais que amigos, são meus irmãos do coração: Adriano, Eloisa e Lilian. Adoro vocês demais...

E a uma pessoa muito especial: André Matos! Ouvindo sua voz de anjo encontrei alegria para substituir os momentos de tristeza, paz para os momentos de turbulência, e força e coragem para sempre seguir em frente. Admiro-te demais! Carry On, there's a meaning to life...

À CAPES, pelo suporte financeiro.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	ix
FLUXOGRAMA.....	xiii
LISTA DE FIGURAS - ANEXO 1 .....	xiv
LISTA DE TABELAS - ANEXO 2 .....	xv
RESUMO .....	xxiii
ABSTRACT .....	xxiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 Brassinoesteróides .....	2
2.1.1 Biossíntese dos brassinoesteróides .....	6
2.1.2 Transporte de brassinoesteróides.....	10
2.1.3 Genes de importância para o metabolismo ou mecanismo de ação de brassinoesteróides .....	10
2.1.4 Efeitos fisiológicos dos brassinoesteróides .....	14
2.1.4.1 Expansão celular .....	15
2.1.4.2 Divisão Celular.....	16
2.1.4.3 Diferenciação vascular .....	16
2.1.4.4 Alongamento da parte aérea .....	17
2.1.4.5 Efeitos sobre o desenvolvimento .....	18
2.1.4.6 Crescimento e desenvolvimento radicial .....	18
2.1.4.7 Respostas ao estresse .....	19
2.1.4.8 Promoção da biossíntese de etileno e epinastia	20

2.2 Porta-enxerto Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) .....	21
3 OBJETIVO GERAL .....	23
3.1 Objetivos específicos .....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
4.1 Material vegetal .....	24
4.2 Síntese dos Brassinoesteróides .....	24
4.3 Aplicação dos Brassinoesteróides .....	24
4.4 Aplicação do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) .....	25
4.5 Condições de cultivo .....	25
4.6 Análises estatísticas .....	26
4.7 Parâmetros avaliados .....	26
5 RESULTADOS .....	28
5.1 Brassinoesteróide 28-HCTS (forma nativa) .....	28
5.2 Brassinoesteróide OH-HCTS (forma hidroxilada) .....	33
5.3 Brassinoesteróide 5F-HCTS (forma fluoretada) .....	38
5.4 Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) .....	44
6 DISCUSSÃO .....	50
6.1 Atividade biológica de BRs: dependência da estrutura química .....	50
6.2 Mecanismo de ação do 28-Homoetil-castasterona: possível envolvimento do etileno .....	55
7 CONCLUSÃO .....	57
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

ANEXO 1 Efeito do comprimento do explante (segmento nodal) sobre a micropropagação do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) .....	63
ANEXO 2 Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados aos experimentos realizados com o brassinoesteróide HCTS e seus derivados e o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) .....	66

## FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Estrutura química dos BRs brassinolídio e castasterona.....	4
FIGURA 2. Estrutura química dos BRs 28-Homoetil-castasterona, OH-Homoetil-castasterona e 5F-Homoetil-castasterona. ....	5
FIGURA 3. Biossíntese do brassinolídeo via oxidação precoce e tardia do carbono 6. ....	9
FIGURA 4. Efeito do 28-HCTS sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	29
FIGURA 5. Efeito do 28-HCTS sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	29
FIGURA 6. Efeito do 28-HCTS sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	30
FIGURA 7. Efeito do 28-HCTS sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	30
FIGURA 8. Efeito do 28-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos principais (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	31
FIGURA 9. Efeito do 28-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	31

FIGURA 10. Efeito do 28-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	32
FIGURA 11. Efeito do OH-HCTS sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	34
FIGURA 12. Efeito do OH-HCTS sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	34
FIGURA 13. Efeito do OH-HCTS sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	35
FIGURA 14. Efeito do OH-HCTS sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	35
FIGURA 15. Efeito do OH-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos principais (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	36
FIGURA 16. Efeito do OH-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	36
FIGURA 17. Efeito do OH-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	37
FIGURA 18. Efeito do 5F-HCTS sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	40

FIGURA 19. Efeito do 5F-HCTS sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	40
FIGURA 20. Efeito do 5F-HCTS sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	41
FIGURA 21. Efeito do 5F-HCTS sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	41
FIGURA 22. Efeito do 5F-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos principais (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	42
FIGURA 23. Efeito do 5F-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	42
FIGURA 24. Efeito do 5F-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	43
FIGURA 25. Efeito do ACC sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	46
FIGURA 26. Efeito do ACC sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ...	46
FIGURA 27. Efeito do ACC sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	47

FIGURA 28. Efeito do ACC sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	47
FIGURA 29. Efeito do ACC sobre o comprimento médio dos ramos principais (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	48
FIGURA 30. Efeito do ACC sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	48
FIGURA 31. Efeito do ACC sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . .....	49

## FLUXOGRAMA

	Página
FLUXOGRAMA 1. Procedimento utilizado nos experimentos envolvendo a aplicação do brassinoesteróide 28-HCTS nas formas nativa, fluoretada e hidroxilada. ....	27

## ANEXO 1 - FIGURAS

	Página
FIGURA 32. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre a taxa média de multiplicação <i>in vitro</i> em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. ....	63
FIGURA 33. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o número médio de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	63
FIGURA 34. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o número médio de ramos laterais maiores ou iguais a 15 mm em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	64
FIGURA 35. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o comprimento médio dos ramos principais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	64
FIGURA 36. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o comprimento médio dos ramos laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo <i>in vitro</i> . ....	65

## ANEXO 2 - TABELAS

	Página
TABELA 1. Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	66
TABELA 2. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	66
TABELA 3. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	67
TABELA 4. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	67
TABELA 5. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	68
TABELA 6. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	68
TABELA 7. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	69

TABELA 8.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	69
TABELA 9.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	70
TABELA 10.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	70
TABELA 11.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	71
TABELA 12.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	71
TABELA 13.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	72
TABELA 14.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	72
TABELA 15.	Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 28-OH-HCTS aplicada. ....	73
TABELA 16.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da dose do	

	brassinosteróide OH-HCTS aplicada. ....	73
TABELA 17.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	74
TABELA 18.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	74
TABELA 19.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	75
TABELA 20.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	75
TABELA 21.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	76
TABELA 22.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	76
TABELA 23.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	77
TABELA 24.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	77

TABELA 25.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	78
TABELA 26.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.....	78
TABELA 27.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	79
TABELA 28.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada. ....	79
TABELA 29.	Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	80
TABELA 30.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	80
TABELA 31.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	81
TABELA 32.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	81

TABELA 33.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	82
TABELA 34.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	82
TABELA 35.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	83
TABELA 36.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.....	83
TABELA 37.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	84
TABELA 38.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	84
TABELA 39.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	85
TABELA 40.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.	85

TABELA 41.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada. ....	86
TABELA 42.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada. ....	86
TABELA 43.	Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	87
TABELA 44.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	87
TABELA 45.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	88
TABELA 46.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	88
TABELA 47.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	89

TABELA 48.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	89
TABELA 49.	Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	90
TABELA 50.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	90
TABELA 51.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ...	91
TABELA 52.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	91
TABELA 53.	Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	92
TABELA 54.	Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	92

TABELA 55. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido ( <i>Malus prunifolia</i> ) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	93
TABELA 56. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada. ....	93

## RESUMO

Brassinoesteróides (BRs) constituem um grupo de poli-hidroxiesteróides de ocorrência natural em plantas. BRs aplicados exogenamente estimulam a expansão e a divisão celular em tecidos vegetais. Com o objetivo de avaliar potenciais efeitos do BR 28-Homoetil-castasterona (28-HCTS) e de seus derivativos fluoretado (5F-HCTS) e hidroxilado (OH-HCTS) sobre o alongamento caulinar em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) cultivadas *in vitro*, segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2,2  $\mu\text{M}$  de benzilaminopurina. Quinze dias após a inoculação dos segmentos nodais, doses únicas de 0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  de 28-HCTS, OH-HCTS e 5F-HCTS foram aplicadas sobre a nervura central da folha mais próxima do ápice da parte aérea formada. Trinta dias após o tratamento com os BRs 28-HCTS e OH-HCTS, nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) foi encontrada para o número ou comprimento de ramos formados, e conseqüentemente para a taxa de multiplicação de partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido. Todavia, para partes aéreas tratadas com o BR 5F-HCTS, foi observado aumento significativo ( $p=0,05$ ) de 148% no número de ramos principais aptos para multiplicação (maiores ou iguais a 15 mm de comprimento) para a dose de 1,0  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ , quando comparada ao controle (0  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ ). Para o número de ramos laterais primários, um aumento significativo ( $p=0,05$ ) de 238% foi obtido para partes aéreas tratadas com 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  de 5F-HCTS. Entretanto, o número de ramos laterais secundários não foi alterado significativamente pela aplicação da molécula, em nenhuma das doses utilizadas. Aumento significativo ( $p=0,05$ ) de 30% no comprimento médio dos ramos laterais primários em relação ao controle ocorreu em partes aéreas tratadas com 5F-HCTS na dose de 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ . O aumento no número de ramos principais e laterais primários com comprimento mínimo de 15 mm resultou em aumento da ordem de 112% e 85% na taxa de multiplicação para partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido tratadas com 0,5 e 1,0  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  de 5F-HCTS, respectivamente, quando comparados ao controle. Foi observada uma tendência para o aumento da proliferação de brotações quando partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido foram crescidas na presença de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), o precursor imediato do etileno, embora nenhuma alteração estatisticamente significativa tenha sido verificada. Esta tendência indica que a estimulação da proliferação de brotações induzidas pelo 5F-HCTS pode ser mediada por um aumento na produção de etileno. Tendo em vista o aumento significativo na taxa de multiplicação associado à aplicação do BR 5F-HCTS, é sugerida a utilização comercial deste BR, para a obtenção de mudas clonais de genótipos de interesse do porta-enxerto de macieira Marubakaido livres de vírus em larga escala.

## ABSTRACT

Brassinosteroids comprise a group of naturally occurring polihydroxy steroids in plants. Exogenously supplied BRs stimulate cell expansion and division in plants tissues. In order to evaluate the potential effects of 28-homoetilcastasterona (28-HCTS) and its fluor (5F-HCTS) and hydroxil (OH-HCTS) derivatives on stem elongation of shoots of *in vitro*-grown apple rootstock Marubakaido (*Malus prunifolia*), nodal segments were grown in culture medium supplemented with 2.2  $\mu\text{M}$  benzylaminopurine. Fifteen days after the nodal segments inoculation, single doses of 0; 0.1; 0.5; 1.0; 5.0 and 10  $\mu\text{g.explant}^{-1}$  of 28-HCTS, OH-HCTS and 5F-HCTS were applied on the main vein of the leaf located closest to the apex of the newborn shoot. Thirty days after the treatment with BRs 28-HCTS and OH-HCTS no significant ( $p=0.05$ ) change was found for number or length of the newborn branches, and consequently no change on the multiplication rate was also found for the Marubakaido apple rootstock. However, a significant ( $p=0.05$ ) increase of 148% on the number of main branches suitable for propagation (minimum length of 15 mm) was found for shoots treated with 1.0  $\mu\text{g.explant}^{-1}$  5F-HCTS, when compared to control (0  $\mu\text{g.explant}^{-1}$  5F-HCTS). For the number of primary lateral branches, a significant ( $p=0.05$ ) increase of 238% was found for shoots treated with 0.5  $\mu\text{g.explant}^{-1}$  5F-HCTS; however, no significant change on the number of secondary lateral branches was found for shoots treated with 5F-HCTS in any of the doses used. A significant increase ( $p=0.05$ ) of 30% on the average length of primary lateral branches, compared to the control, was found for shoots treated with 0.5  $\mu\text{g.explant}^{-1}$  5F-HCTS. The increase on the number of main and lateral branches measuring at least 15 mm in length resulted in a 112% and 85% increase on the multiplication rate of shoots of the Marubakaido rootstock treated, respectively, with 0.5 and 1.0  $\mu\text{g.explant}^{-1}$  5F-HCTS, when compared to control. A trend, towards an increase on branching was found for shoots of the Marubakaido rootstock grown in the presence of 1-aminocyclopropane-1 carboxilic acid, the immediate precursor of ethylene,, although the trend was not statistically significant. This trend indicates that the 5F-HCTS-driven stimulation of branching for the Marubakaido rootstock found in this study might be mediated by increased ethylene production. The significant increase on the multiplication rate related to the BR 5F-HCTS treatments suggest that this BR can be used for the clonal propagules of desired genotypes of the Marubakaido apple rootstock, at a commercial level.

## 1 – INTRODUÇÃO

Marubakaido (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh cv Marubakaido), um dos porta-enxertos de macieira mais promissores introduzidos no Brasil, é um porta-enxerto vigoroso, que apresenta resistência à podridão de colo e à *Phytophthora*, além de grande adaptabilidade às cultivares de copa atualmente utilizadas, despertando por estas características, grande interesse entre os produtores de maçãs.

Técnicas de micropropagação desenvolvidas para o porta-enxerto Marubakaido permitem a propagação de genótipos de interesse, de fitossanidade comprovada. Todavia, a micropropagação em larga escala deste porta-enxerto é limitada pela taxa de multiplicação apresentada pelo mesmo, inadequada para fins comerciais.

Os brassinoesteróides (BRs) constituem um grupo de moléculas reguladoras do crescimento vegetal de ocorrência natural em plantas, com potente atividade moduladora sobre diversos processos fisiológicos. BRs aplicados exógenamente estimulam o alongamento e a divisão celular em segmentos caulinares e plântulas.

Tendo em vista que diversos derivados de BRs podem apresentar atividade biológica diferenciada em um mesmo sistema biológico, foi procurado investigar o efeito da 28-Homoetil-castasterona (28-HCTS) e de substituições com os íons flúor e hidroxila no carbono 5 da molécula sobre o alongamento caulinar em partes aéreas de *Malus prunifolia* cultivar Marubakaido. Este estudo, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação do 28-HCTS, também demonstra a possibilidade de estimulação do alongamento de brotações *in vitro* e conseqüentemente da taxa de multiplicação do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) induzida pelo brassinoesteróide.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As plantas são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos orgânicos. Dentre estes, os reguladores do crescimento vegetal, também conhecidos como hormônios vegetais, são compostos biologicamente ativos, influenciando processos fisiológicos tais como o crescimento e a diferenciação de células, tecidos e órgãos. Os efeitos de alguns reguladores do crescimento vegetal, como as auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno, tem sido descritos e caracterizados por mais de 50 anos. Em muitos casos, o papel fisiológico dos reguladores do crescimento vegetal “tradicionais” foi elucidado a partir de experimentos envolvendo suprimento exógeno destes compostos (Kende e Zeevaart, 1997).

Mais recentemente, vários compostos que apresentam efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, que não se classificam dentro do grupo dos reguladores do crescimento vegetal “tradicionais”, têm sido descritos. Em muitos casos, o papel destes compostos tem sido definido através da análise de mutantes ou plantas transgênicas com alterações no mecanismo de transdução do sinal ou no metabolismo do regulador do crescimento vegetal em estudo. Alguns exemplos destes reguladores do crescimento vegetal “não tradicionais” são jasmonatos, oligossacarinas e brassinoesteróides (Creelman e Mullet, 1997).

### 2.1 Brassinoesteróides

Brassinoesteróides (BRs) constituem um grupo de polihidroxiesteróides de ocorrência natural em plantas. As pesquisas em torno dos brassinoesteróides iniciaram-se a aproximadamente 30 anos, quando Mitchell e seus colaboradores descobriram que compostos de natureza hidrofóbica isolados a partir do pólen de *Brassica napus* L., promoviam o alongamento caulinar e divisão celular em plantas (Mitchell *et al*, 1970). O composto ativo do extrato de pólen de *B. napus*, o brassinolídio (Figura 1), isolado em 1979, foi o primeiro brassinoesteróide a ser quimicamente caracterizado (Grove *et al*, 1979).

BRs têm sido identificados em muitas plantas, incluindo dicotiledôneas, monocotiledôneas, gimnospermas e algas verdes. Estes compostos têm sido isolados a partir de diversos órgãos de plantas, tais como sementes, frutos, partes aéreas, folhas e flores, em concentrações entre 0,5 pg e 30 ng por grama de peso fresco. Em grãos de pólen, as concentrações de BRs são mais elevadas, situando-se entre 5 e 190 ng por grama de peso fresco (Sakurai e Fujioka, 1993). Em geral, o nível de BRs é mais elevado em tecidos em crescimento quando comparado a tecidos maduros, fato não surpreendente, levando-se em consideração que BRs apresentam efeitos fisiológicos mais acentuados em tecidos jovens (Clouse e Sasse, 1998).

Entre os brassinoesteróides de ocorrência natural em plantas, o brassinolídio e a castasterona são considerados como os mais importantes, tanto por sua ampla distribuição, quanto por sua potente atividade biológica (Davies, 1995).

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 radicial, aumentar o gravitropismo, retardar a abscisão foliar, aumentar a resistência ao estresse e promover a diferenciação do xilema (Sakurai e Fujioka, 1993).

BRs apresentam forte interação com outros reguladores do crescimento vegetal e através destas interações, regulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Sakurai e Fujioka, 1993). BRs interagem fortemente com auxinas, provavelmente sinergisticamente. Quando BRs são aplicados em plantas, isolados ou juntamente com auxinas, a síntese de etileno é estimulada. O ácido abscísico também apresenta grande interação com BRs, prevenindo os efeitos induzidos pelos últimos. Aplicação exógena de BRs e giberelinas induzem respostas vegetais que parecem ter mecanismos de ação independentes, porém com efeitos semelhantes e aditivos (Kozlowski e Pallardy, 1997).

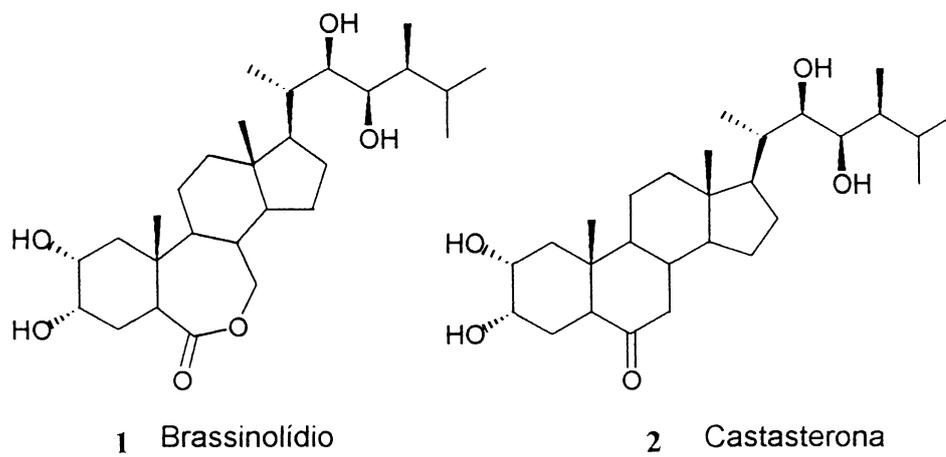


FIGURA 1. Estrutura química dos BRs brassinolídio e castasterona.

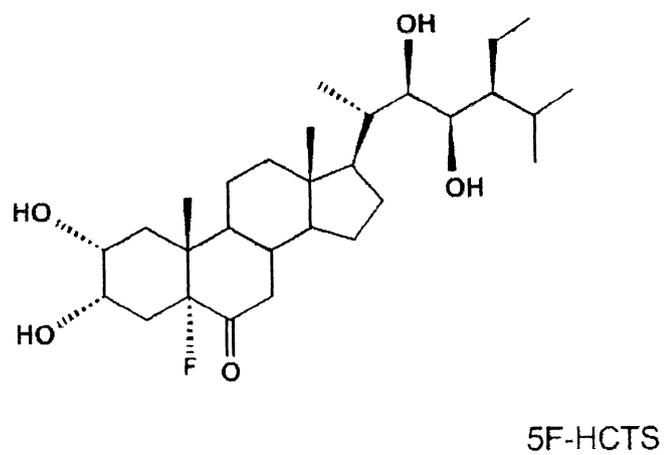
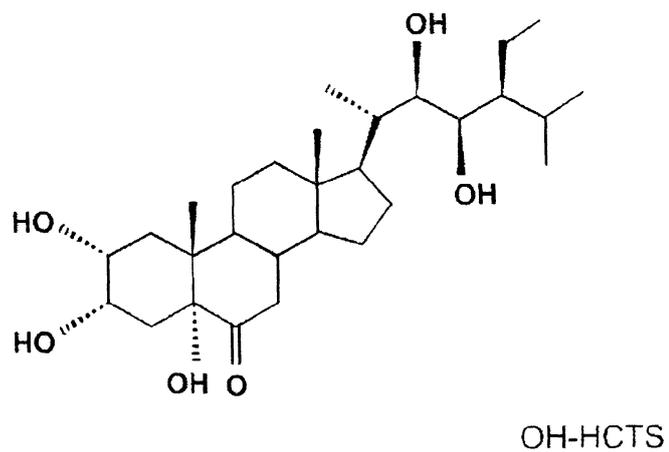
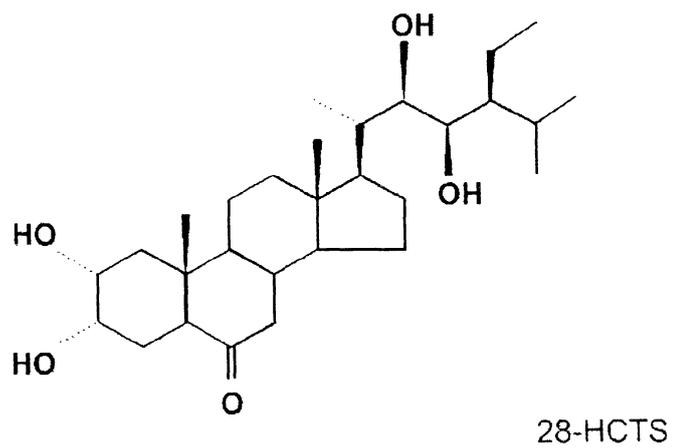


FIGURA 2. Estrutura química dos BRs 28-Homoetil-casterona, OH-Homoetil-casterona e 5F-Homoetil-casterona.

### 2.1.1 Biossíntese dos brassinoesteróides

Um entendimento detalhado sobre 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. Muitos pesquisadores, especialmente grupos japoneses, têm alcançado rápidos progressos na elucidação das vias biossintéticas dos BRs em culturas de células vegetais e plântulas (Clouse e Sasse, 1998). A elucidação das vias biossintéticas dos BRs também é importante para o desenvolvimento de inibidores específicos da biossíntese (Fujioka e Sakurai, 1997).

Baseado em fatores como a atividade biológica, semelhança da estrutura da cadeia lateral das duas moléculas e a co-ocorrência existente entre diversos BRs, tem sido sugerido que o brassinolídio é sintetizado a partir do campesterol através de diversos intermediários, à exemplo da teasterona, tifasterol e castasterona (Clouse e Sasse, 1998).

A redução do campesterol a campestanol (Figura 3) e a oxidação do campestanol a 6-oxocampestanol tem sido demonstrada através de experimentos envolvendo suplementação exógena de BRs. A hidroxilação do 6-oxocampestanol originando a catasterona é pressuposta, mas demonstração experimental direta deste passo não tem sido possível porque a quantidade endógena de catasterona é 500 vezes menor que a de 6-oxocampestanol. A grande diferença entre as quantidades endógenas da catasterona e do 6-oxocampestanol sugere que esta conversão pode ser o passo limitante na biossíntese do brassinolídio (Clouse e Sasse, 1998).

No passo final da conversão de castasterona a brassinolídio, algumas diferenças têm sido encontradas em plântulas. Em plântulas de *Catharanthus roseus*, a seqüência biossintética teasterona→ tifasterol→ castasterona→ brassinolídeo foi demonstrada, tendo sido a seqüência teasterona→ tifasterol→ castasterona também encontrada em tabaco e arroz, em experimentos onde substratos marcados com deutério foram empregados (Fujioka e Sakurai, 1997). Todavia, em arroz e tabaco, a conversão castasterona→brassinolídio não pôde ser demonstrada (Clouse e Sasse, 1998). Entretanto, desde que a castasterona e

o brassinolídio co-ocorrem como BRs endógenos em plântulas de arroz, provavelmente a via biossintética ocorre de maneira completa também nesta planta. Uma possível explicação para a impossibilidade de se demonstrar a conversão de castasterona em brassinolídio em arroz e tabaco é que a castasterona marcada fornecida exogenamente nos experimentos pode não ter alcançado o sítio de biossíntese do brassinolídeo (Clouse e Sasse, 1998).

A oxidação em C<sub>6</sub> na via biossintética do brassinolídio, através dos intermediários teasterona, tifasterol e castasterona, ocorre nos passos iniciais. Porém, quantidades razoáveis de intermediários desta via na forma 6-deoxo foram descobertos e estas moléculas também têm sido consideradas como precursoras do brassinolídio (Clouse e Sasse, 1998). Uma reavaliação dos BRs endógenos em cultura de células de *C. roseus*, resultaram na identificação de 6-deoxo-castasterona, 6-deoxo-tifasterol e 6-deoxo-teasterona, tendo os níveis endógenos de 6-deoxo-castasterona sido os mais elevados entre todos os BRs encontrados. Experimentos com BRs marcados com deutério demonstraram a conversão de 6-deoxo-teasterona em 6-deoxo-tifasterol. Além disso, foi mostrada a conversão da 6-deoxo-castasterona em castasterona e, em seguida, em brassinolídio. Desta forma, a via biossintética de oxidação tardia do carbono 6, parece constituir uma via alternativa para a síntese de BRs (Fujioka e Sakurai, 1997).

Em cultura de células de *C. roseus* e em plântulas de arroz, *Arabidopsis* e tabaco, as vias biossintéticas com oxidação em C<sub>6</sub> precoce (Figura 3) ou tardia (Figura 3) co-existem, podendo ambas as vias estar amplamente distribuídas no reino vegetal (Clouse e Sasse, 1998).

Entre os brassinoesteróides naturais, não era dirigida atenção aos 6-deoxo-BRs, tal como a 6-deoxo-castasterona, pois estas formas mostravam-se menos ativas em relação aos 6-oxo-BRs em vários bioensaios. Os 6-deoxo-BRs eram considerados produtos finais abortados, sem a capacidade de serem convertidos em BRs ativos. Porém, recentes estudos mostrando a ocorrência natural destas formas 6-deoxo em uma grande número de espécies vegetais, tem levado a uma reavaliação quanto ao seu envolvimento na via biossintética dos BRs (Fujioka e Sakurai, 1997).

Recentes estudos em plântulas de *Arabidopsis* demonstraram que ambas as vias biossintéticas descritas para BRs ocorrem nesta espécie, como mencionado anteriormente. 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 brassinolídio 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), sendo que estas diferenças de respostas podem ser especulativamente explicadas não somente pelas diferenças quantitativas observadas para as formas 6-oxo-BRs e 6-deoxo-BRs, mas também por eventuais diferenças de sensibilidade das plantas aos BRs, causada pelo hábito de crescimento.

Até pouco tempo atrás eram conhecidos dois pontos possíveis de oxidação do carbono 6 durante a biossíntese dos BRs: a conversão do campestanol em 6-oxo-campestanol (via de oxidação precoce) e a conversão da 6-deoxo-castasterona em castasterona (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, os autores sugerem 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.

Variações na estrutura dos vários tipos de BRs que são encontrados naturalmente em plantas resultam de diferentes substituições nos anéis A e B e cadeias laterais, que ocorrem a partir de reações de oxidação ou redução durante a sua biossíntese (Creelman e Mullet, 1997).

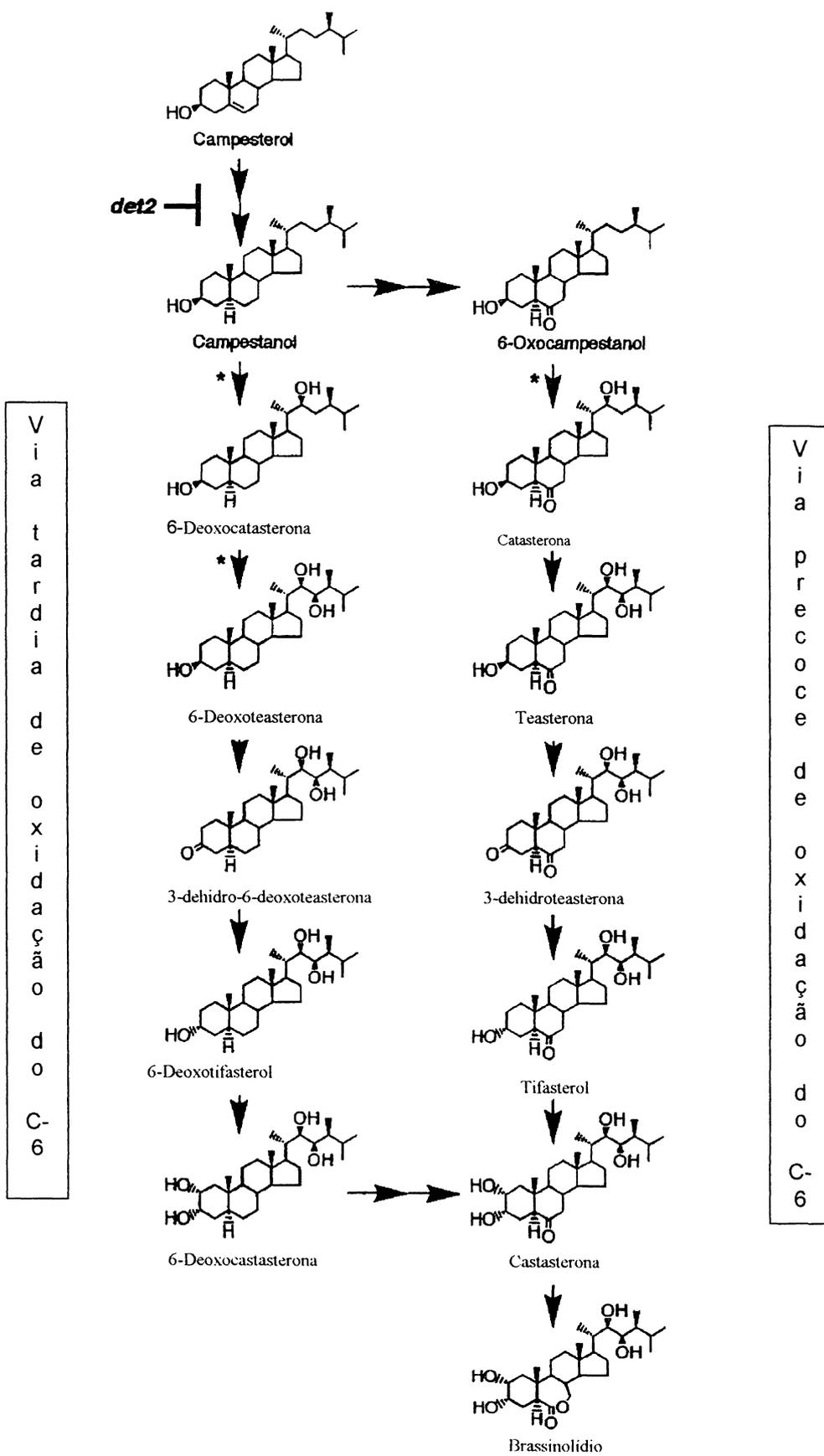


FIGURA 3. Biossíntese do brassinolídio via oxidação precoce e tardia do carbono 6. Noguchi et al, 2000.

### 2.1.2 Transporte de brassinoesteróides

Ainda não é conhecido se o transporte a longas distâncias é importante para a modulação dos níveis endógenos de BRs e, conseqüentemente, para o condicionamento dos padrões de crescimento e desenvolvimento normais da planta. Todavia, estudos onde foram empregados sementes e grãos de pólen têm sugerido a existência de transporte de BRs a curtas distâncias. BRs radio-marcados aplicados exógenamente são translocados das raízes para a parte aérea em arroz, pepino e trigo, ocorrendo este transporte provavelmente via xilema. Quando aplicados a folhas, isótopos radioativos de BRs são transportados de maneira menos eficiente quando comparados a isótopos supridos através do sistema radicial. Entretanto, tanto o transporte associado à aplicação foliar quanto o transporte associado à aplicação através do sistema radicial são predominantemente acrópetos (Sasse, 1997).

### 2.1.3 Genes de importância para o metabolismo ou mecanismo de ação de BRs

Considerável contribuição para o esclarecimento do papel dos BRs no crescimento e no desenvolvimento vegetal tem tido origem em estudos relacionados com a fotomorfogênese vegetal. Em plantas, o crescimento imediatamente após a germinação ocorre abaixo da superfície do solo e plântulas recém germinadas necessitam ter suas folhas expostas ao sol para que a fotossíntese seja iniciada. Uma plântula estiolada, apresentando, portanto, cotilédones fechados e rápido alongamento do hipocótilo, pode alcançar a superfície do solo rapidamente sem prejudicar suas folhas jovens. Uma vez exposta à luz solar, seu padrão de crescimento modifica-se: os cotilédones expandem-se, novas folhas se desenvolvem e muitos genes envolvidos na fotossíntese são induzidos. O hipocótilo, cujo alongamento é drasticamente inibido, torna-se mais espesso e atua como um suporte para as novas folhas em desenvolvimento. Este processo é conhecido como desestiolamento. Com o

objetivo de compreender os mecanismos moleculares que regulam o desestiolamento, um estudo genético foi iniciado para identificar mutantes de *Arabidopsis* que exibissem características de plantas crescidas na luz, quando crescidas no escuro. Os mutantes identificados possuem alelos recessivos para um gene chamado *DET2*. No escuro, os mutantes *det2* apresentam baixa estatura, com hipocótilos espessos, apresentando acúmulo de antocianinas, cotilédones abertos e expandidos, desenvolvimento de folhas primárias e expressão de genes regulados pela luz. Na presença de luz, os mutantes *det2* apresentam nanismo, coloração verde escura, dominância apical e fertilidade masculina reduzidas, além de mostrar respostas alteradas com relação ao fotoperíodo e senescência foliar. As diferenças fenotípicas observadas entre plantas selvagens e mutantes *det2*, indicam que o gene *DET2* exerce um importante papel sobre o desenvolvimento normal em *Arabidopsis* (Li e Chory, 1999).

O gene *DET2* codifica uma proteína que exibe uma seqüência de aminoácidos significativamente conservada quando comparada com a 5 $\alpha$ -esteróide redutase de mamíferos, enzima envolvida com o metabolismo de esteróides nos animais. Desta forma, pode-se sugerir que *DET2* pode estar envolvido na biossíntese de esteróides vegetais, tais como os brassinoesteróides. Mutantes *det2* acumulam somente de 8 a 15% dos níveis de campestanol encontrado no tipo selvagem e menos de 10% de outros brassinoesteróides, além de serem incapazes de converter H<sup>2</sup>-campesterol em H<sup>2</sup>-campestanol, mostrando que mutantes *det2* são deficientes em brassinoesteróides (Li e Chory, 1999). A recuperação, através de suprimento exógeno de brassinoesteróides, dos defeitos de crescimento de mutantes *det2* crescidos tanto na ausência quanto na presença de luz, fornecem suporte para esta hipótese (Li *et al*, 1996).

Um gene chamado *BRU1*, regulado primariamente por BRs foi identificado em experimentos de alongamento apical do epicótilo de *Glycine max*. Neste sistema, BRs promovem o alongamento do epicótilo independentemente de auxinas. O gene *BRU1* é regulado especificamente por BRs, ao menos durante as fases iniciais de crescimento. Existem ainda evidências de que *BRU1* codifica para

uma enzima envolvida no alongamento caulinar que atua sobre a parede celular, processo este demonstrado ser modulado por BRs. A expressão de *BRU1* é maior em epicótilos e hipocótilos de plantas jovens, ocorrendo um declínio nesta expressão com a maturidade, quando o crescimento é mais lento. O aumento inicial na transcrição do gene *BRU1*, promovida por BRs, e o acréscimo inicial da extensibilidade da parede celular acontece aproximadamente 2 horas após o tratamento dos epicótilos de *G. max* com BRs. Outra evidência de que realmente o gene *BRU1* é regulado por BRs é que as modificações estruturais que reduzem ou eliminam o alongamento caulinar em *G. max* também resultam em uma correspondente diminuição da expressão de *BRU1* (Clouse, 1997).

A clonagem do gene *BRU1* revelou sua alta homologia com genes de outras espécies que codificam para uma enzima conhecida como XET (xiloglucana endotransglicosilase). Esta enzima é responsável pela clivagem de cadeias de xiloglucanas presentes na parede celular, causando o afrouxamento da parede celular durante o alongamento celular, o que sugere que o gene *BRU1*, regulado por BRs, exerce um papel fundamental no aumento da extensibilidade da parede celular e alongamento caulinar. Estudos envolvendo a proteína codificada pelo gene *BRU1* demonstraram que a proteína apresenta atividade similar à XET e que esta atividade é aumentada pelo suprimento exógeno de BRs (Clouse *et al*, 1996).

Um mutante de *Arabidopsis thaliana* foi identificado em estudos realizados com o intuito de desvendar como os BRs podem agir como sinalizadores capazes de influenciar o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Este mutante (*bri1*) apresenta um defeito no gene *BRI1*, que o torna insensível a BRs, embora preserve a sensibilidade a outros reguladores do crescimento vegetal, tais como auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e giberelinas. O mutante *bri1* foi identificado por sua habilidade de apresentar alongamento de suas raízes primárias na presença de BRs, em concentrações nas quais este regulador do crescimento vegetal induz inibição do alongamento radicular no tipo selvagem, indicando que trata-se efetivamente de um mutante insensível a BRs. Outro gene do mutante *bri1* de *A. thaliana* foi clonado e investigado: o *TCH4*. Este gene

apresenta 70% de similaridade com o gene *BRU1* e seus níveis de transcrição são aumentados em tecidos tratados com BRs, fornecendo evidências de que este gene codifica para uma enzima com função similar à XET. Desta forma, supõe-se que o fenótipo anão do mutante *bri1* é resultado de uma reduzida atividade da enzima XET (Clouse *et al*, 1996).

Foi identificado em tomate (*Lycopersicon esculentum*), um mutante chamado *dpy*, mutante este caracterizado por baixa estatura, reduzida ramificação axilar e folhas verde escuras e rugosas. A forte alteração na morfologia foliar apresentada após o suprimento exógeno do mutante com o 24-epibrassinolídio e a quase completa recuperação do fenótipo característico do tipo selvagem após a aplicação de brassinolídio, sugerem que o mutante *dpy* é deficiente na produção de BRs e que o produto do gene *DPY* está envolvido na biossíntese de BRs. O fornecimento de intermediários da via biossintética de BRs tem sido amplamente utilizado para localizar o ponto exato da via afetado pela mutação. Com a aplicação de intermediários de ambas as vias de oxidação do carbono 6 (precoce e tardia) da biossíntese do brassinolídio, em plantas mutantes *dpy*, tanto na presença quanto na ausência de luz, a mais marcante diferença entre fenótipos ocorreu entre a conversão de 6-deoxocatasterona a 6-deoxoteasterona. O fato de que a aplicação de 6-deoxocatasterona não promoveu nenhuma diferença de fenótipo em relação ao mutante controle, enquanto a aplicação de 6-deoxoteasterona resultou em plantas com fenótipo idêntico ao tipo selvagem, sugere fortemente que o mutante *dpy* é bloqueado na conversão de 6-deoxocatasterona em 6-deoxoteasterona. Entretanto, o intermediário correspondente da via precoce de oxidação do carbono 6 (teasterona) não foi capaz de restaurar o fenótipo das plantas selvagens. Além disso, avaliação dos níveis endógenos de intermediários das vias biossintéticas de BRs por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) não detectou intermediários 6-oxo-BRs nestas plantas, indicando que a via de oxidação do carbono 6 tardia em tomate é predominante quando comparada avia precoce de oxidação do carbono 6 (Koka, *et al*, 2000).

#### 2.1.4 Efeitos fisiológicos dos brassinoesteróides

A habilidade que os brassinoesteróides apresentam de modular fortemente o crescimento vegetal, sugere que estes compostos podem atuar como reguladores endógenos do crescimento vegetal. Fortes evidências de que os BRs são essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal tem sido obtidas através do isolamento de mutantes insensíveis a BRs ou deficientes na biossíntese dos mesmos (Creelman e Mullet, 1997).

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 para enzimas envolvidas na via biossintética dos BRs. Já os mutantes insensíveis a 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).

Algumas características típicas podem ser observadas em mutantes deficientes na biossíntese ou insensíveis a BRs. No gênero *Arabidopsis*, por exemplo, todos os mutantes deficientes na biossíntese ou insensíveis a BRs exibem esterilidade masculina ou fertilidade feminina reduzida, nanismo drástico e reduzida dominância apical. Quando são crescidos no escuro, estes mutantes apresentam hipocótilo reduzido, abertura não regulada dos cotilédones e emergência das folhas primárias. Em ervilha, os mutantes apresentam fenótipos similares àqueles observados em *Arabidopsis*, mostrando, todavia, uma redução no comprimento do internó e pedúnculo, e diminuição da ramificação basal. Um fato interessante ocorre com algumas plântulas mutantes de ervilha crescidas no escuro, que não apresentam fenótipo desestiolado, sugerindo que em ervilhas,

BRs podem não ter um forte papel na fotomorfogênese como ocorre em *Arabidopsis* (Creelman e Mullet, 1997).

#### 2.1.4.1 Expansão celular

Aplicação de BRs em níveis que variam do nano ao micromolar, causam acentuado alongamento de hipocótilos, epicótilos e pedúnculos em dicotiledôneas, bem como coleóptiles e mesocótilos em monocotiledôneas. Tecidos vegetativos jovens são particularmente sensíveis a BRs e, se BRs endógenos estão diretamente envolvidos no controle da expansão celular, estas moléculas devem estar presentes em tais tecidos. Estudos para verificação desta hipótese foram realizados através da análise dos níveis de BRs em tecidos sensíveis a eles, como caules de ervilha, onde estas moléculas foram encontradas em maiores quantidades quando comparadas às regiões menos sensíveis. Após o fornecimento de um  $^{125}\text{I}$ -BR, detectou-se o acúmulo do mesmo na zona de alongamento de epicótilos de feijão e plântulas de pepino, região esta caracterizada por intensa expansão celular, observação que também fornece suporte a hipótese de que BRs estão presentes em tecidos vegetativos jovens (Clouse e Sasse, 1998).

A expansão celular induzida por BRs é acompanhada por extrusão de prótons e hiperpolarização de membranas. *In vitro*, uma ATPase vacuolar foi ativada por tratamento com brassinolídio, sugerindo que o alongamento induzido por BRs seja decorrente de uma redução no potencial da água do vacúolo via absorção de íons e/ou açúcares (Sasse, 1997). Segundo Romani *et al* (1983), em segmentos radiciais de milho, BRs estimulam, nas mesmas concentrações que se apresentam ativas para partes aéreas, o crescimento e secreção de prótons, sugerindo que a estimulação do crescimento depende, pelo menos em parte, do decréscimo do pH na parede celular, resultando em um afrouxamento da mesma, possibilitando a expansão celular.

Efeitos inibitórios de BRs sobre a expansão celular têm sido amplamente descritos para tecidos radiciais. Em geral, aplicação exógena de BRs inibe o

alongamento de raízes primárias e a formação de raízes laterais. Estimulação ocasional do alongamento ou da formação de raízes adventícias tem sido observada quando concentrações de ordem menor que o picomolar são utilizadas. Efeitos inibitórios, particularmente sobre a expansão, são freqüentemente mediados via indução da biossíntese de etileno. Entretanto, recentes estudos sobre os efeitos inibitórios induzidos por breve tratamento de sementes de mostarda com brassinolídio, mostraram que os níveis de etileno não sofreram acréscimos durante a germinação, sugerindo que o efeito inibitório de BRs não é mediado pelo etileno (Clouse e Sasse, 1998).

#### 2.1.4.2 Divisão Celular

Exames de microscopia em mutantes deficientes ou insensíveis a BRs mostraram que o fenótipo anão de *Arabidopsis* é causado pela redução do volume e não do número de células. Em cultura de células de parênquima de *Helianthus tuberosus*, a aplicação de BRs, em concentrações da ordem do nanomolar, aumentou a taxa de divisão celular em 50%, quando as células estavam crescendo na presença de auxina e citocinina (Clouse e Sasse, 1998). Em protoplastos de couve chinesa, o 24-epibrassinolídio, quando aplicado juntamente com 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e cinetina, promoveu a divisão celular de maneira dose-dependente, além de ter aumentado o agrupamento celular e a formação de colônias. Os resultados do estudo dos efeitos do 24-epibrassinolídio sobre protoplastos de couve chinesa sugerem que o BR estimula a desdiferenciação, além de promover ou acelerar a regeneração da parede celular necessária para que ocorra a divisão (Clouse e Sasse, 1998).

#### 2.1.4.3 Diferenciação vascular

Auxinas e citocininas são necessárias para a iniciação do desenvolvimento do xilema tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Entretanto, surgem cada vez mais evidências de que BRs podem exercer um papel significativo na diferenciação vascular. Em explantes de *H. tuberosus*, um dos sistemas *in vitro* mais utilizados para o estudo da diferenciação do xilema, foi observado que concentrações da

ordem de nanomolar de brassinolídio (BL) aplicado exogenamente aumentaram a diferenciação dos elementos traqueais em 10 vezes apenas 24 h após o tratamento. Em explantes não tratados com BL, a diferenciação de elementos traqueais requer aproximadamente 72 h (Clouse e Sasse, 1998).

#### 2.1.4.4 Alongamento da parte aérea

BRs têm se mostrado capazes de promover o alongamento de tecidos vegetativos em um amplo número de espécies quando usado em baixas concentrações. Estes efeitos têm sido claramente demonstrados quando o material vegetal é iluminado por luz branca, verde ou vermelha. Estudos têm mostrado que BRs podem estimular o alongamento do hipocótilo pelo aumento do relaxamento da parede celular (Davies, 1995).

Para avaliação do efeito do brassinolídio sobre a cinética de crescimento de secções de epicótilo de *Glycine max*, um experimento em que o alongamento caulinar foi monitorado continuamente foi realizado por Zurek *et al.* (1994). Após a aplicação de 0,1  $\mu\text{M}$  de brassinolídio, uma estimulação do alongamento começou a ser observada após um tempo de latência de  $46,5 \pm 4,4$  min. Uma vez que o período de crescimento foi iniciado, um aumento gradual da taxa de alongamento ocorreu por várias horas. Neste sistema, a aplicação de 0,1  $\mu\text{M}$  de brassinolídio, provocou potente estimulação do alongamento, resultando em um crescimento um pouco maior que o apresentado pelo controle 6 horas após a aplicação e crescimento 200% maior que o controle após 48 horas. A aplicação de 1,0  $\mu\text{M}$  de brassinolídeo não acarretou em diminuição do período de latência, tampouco na modificação do padrão da cinética de crescimento, indicando que o período necessário para a iniciação do alongamento e estabelecimento de sua razão máxima não depende da concentração de BRs fornecidos exógenamente e transporte para o sítio de ação das moléculas, e sim, do seu mecanismo de ação (Zurek *et al.*, 1994).

Os possíveis efeitos do brassinolídio sobre o crescimento de partes aéreas de vários cultivares de plântulas de arroz foram testados por Chon *et al.* (2000), tendo resultados significantes sido 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 em arroz. Nestes mesmos cultivares de arroz, o brassinolídeo estimulou o alongamento do mesocótilo, coleoptile e bainha foliar. 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 demonstram que o BL exerce efeito fisiológico tanto sobre o alongamento celular, quanto sobre a divisão celular e diferenciação de novas folhas em plântulas de arroz.

#### 2.1.4.5 Efeitos sobre o desenvolvimento

A esterilidade masculina dos mutantes deficientes ou insensíveis a BRs sugere que os altos níveis destes reguladores do crescimento vegetal encontrados no pólen tem importantes implicações para a fertilização de plantas, pois supõe-se que a fertilidade masculina esteja relacionada com os elevados níveis de BRs tipicamente encontrados nos grão de pólen (Sasse, 1997).

A senescência de folhas e cotilédones é muitas vezes retardada *in vitro* por tratamento com citocininas. Em contraste, o 24-epibrassinolídio acelera esta senescência (Sasse, 1997).

#### 2.1.4.6 Crescimento e desenvolvimento radicial

BRs são poderosos inibidores do crescimento e desenvolvimento radicial. Efeitos de BRs e AIA são geralmente similares e uma interação sinérgica entre os dois é geralmente relatada. Entretanto, no caso do alongamento radicial, os dois reguladores do crescimento vegetal agem diferentemente, AIA estimulando (dependendo de sua concentração) e BRs inibindo o alongamento. Como o etileno apresenta um efeito inibitório sobre o crescimento radicial e BRs estimulam a produção de etileno, é possível que a inibição do crescimento radicial induzida por BRs ocorra devido à estimulação da produção de etileno induzida por BRs (Davies, 1995).

Recentes estudos revelaram que a inibição do alongamento radicial por BRs depende da concentração de BR utilizada. Em raízes primárias de milho, possíveis efeitos do brassinolídio sobre o alongamento e a curvatura gravitropica foram investigados em concentrações de BL variando entre  $10^{-9}$  e  $10^{-5}$  M. A curvatura gravitropica foi aumentada pelo BL em todas as concentrações testadas, sendo o maior aumento observado na concentração de  $10^{-7}$  M. Em contraste, o alongamento radicial foi aumentado pelo BL em concentrações entre  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$  M, com a máxima estimulação em  $10^{-8}$  M. Porém, concentrações acima de  $10^{-6}$  M inibiram o alongamento. O fato de que o BL apresenta uma dose-resposta diferente para alongamento e gravitropismo em raízes de milho, indica que o brassinolídio pode controlar e/ou afetar estes eventos através de mecanismos independentes, pelo menos parcialmente, entre si (Kim *et al.*, 2000).

#### 2.1.4.7 Respostas ao estresse

O tratamento com BRs tem-se mostrado capaz de amenizar os efeitos deletérios associados ao estresse causado pelo frio. Em células de *Bromus inermis* cultivadas *in vitro*, a termo-tolerância foi aumentada após o tratamento com BRs. Entretanto, a germinação de sementes de *Vigna aconitifolia* em soluções de 24-epibrassinolídio não foi capaz de conferir às plântulas tolerância a altas temperaturas (Sasse, 1997).

A pulverização de uma solução aquosa de 0,01 ppm (m/v) de TS303, um BR sintético derivado do estigmasterol, em *Citrus*, durante o período de inverno, preveniu os efeitos nocivos causados pelas baixas temperaturas sobre as plantas testadas quando comparadas às plantas controle. Foi observada uma redução de 35% no desfolhamento e de 52% na queda dos frutos em condições de campo, indicando uma potencial utilização prática para este BR na agricultura (Watanabe *et al.*, 1997).

Em uma variedade de trigo sensível ao estresse hídrico, aumento no teor de proteínas solúveis e no conteúdo relativo de água, além da diminuição no vazamento de íons mostrou-se associada ao tratamento com 28-

homobrassinolídio (Sasse, 1997). Tratamento com 24-epibrassinolídio estimula o crescimento de plantas jovens de *Cicer arietinum*, além de aumentar o conteúdo relativo de água e diminuir a transpiração estomática em sorgo, em condições de estresse hídrico (Sasse, 1997).

#### 2.1.4.8 Promoção da biossíntese de etileno e epinastia

Em segmentos de hipocótilo estiolados de feijão, BRs aumentam a biossíntese de etileno através da estimulação da atividade da enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase (ACC sintase). A estimulação da produção de etileno por BRs pode ser inibida por ácido aminooxiacético (AOA), que bloqueia a formação do ACC através da inibição da enzima ACC sintase;  $\text{Co}^{2+}$ , que inibe a ação da enzima ACC oxidase, responsável pela conversão do ACC a etileno; e pelos inibidores do transporte de auxinas ácido 2,3,5-triidobenzóico e ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropiónico. Na produção de etileno, BRs agem sinergisticamente com auxinas, cálcio e citocininas. Aplicação de BRs em raízes de tomateiros crescidos hidroponicamente tem provocado grande aumento nos níveis endógenos de ACC e de etileno, além de aumentar a curvatura do pecíolo (Davies, 1995).

## 2.2 Porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*)

Um dos porta-enxertos de macieira mais promissores introduzidos no Brasil é o Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh). Este porta-enxerto, de origem japonesa, também conhecido por Maruba, já vem sendo utilizado na formação de pomares comerciais nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Schuch e Peters, 1993). Este porta-enxerto é vigoroso e apresenta boa afinidade com todas as cultivares-copa atualmente utilizadas (Flores *et al*, 1999).

O porta-enxerto Marubakaido vem despertando grande interesse entre os produtores devido à sua alta adaptabilidade às copas e resistência à podridão de colo e à *Phytophthora* (Zanol *et al*, 1998). Porém, o mesmo apresenta susceptibilidade a determinadas viroses, que normalmente causam sua morte, o que faz de mudas originadas a partir do uso de técnicas de propagação *in vitro* uma das formas mais promissoras de multiplicação para matrizes sadias (Flores *et al*, 1999).

Vários trabalhos na área de cultura de tecidos *in vitro* têm sido realizados utilizando-se porta-enxertos de macieira, inclusive o Marubakaido como material vegetal. Estes trabalhos abrangem vários aspectos de importância para a propagação da espécie, dentre estes podendo ser citados a influência de reguladores de crescimento sobre a proliferação de brotações (Schuch e Peters, 1993; Yui *et al*, 1993; Zimmerman e Steffens, 1995; Zanol *et al*, 1998), influência de diferentes concentrações de sacarose sobre a taxa de multiplicação (Flores *et al*, 1999), diferentes aspectos de sua aclimação (Pereira *et al*, 2001) e identificação e diferenciação de vários cultivares de porta-enxertos de macieira (Nakasu *et al*, 1991).

Um recente estudo, visando estabelecer um protocolo para produção massal *in vitro* de porta-enxertos de macieira Marubakaido, revelou que a utilização do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 2,2 µM de BAP (6-benzilaminopurina) como meio de cultura para multiplicação, resultou em uma taxa de multiplicação de 4,7 brotações por explante (Nunes *et al*, 1999). No mesmo trabalho, uma taxa de 100% de enraizamento foi obtida em

meio MS suplementado com 0,49  $\mu\text{M}$  de ácido indol butírico (AIB) aos 25 dias de cultivo.

Como BRs tem se mostrado eficientes na estimulação do alongamento caulinar em várias espécies vegetais tanto de monocotiledôneas quanto de dicotiledôneas (Clouse e Sasse, 1998), testamos neste trabalho, a hipótese de que uma eventual estimulação do alongamento caulinar de partes aéreas de macieira crescidas *in vitro*, induzida por BRs, poderia resultar em proliferação de brotações nestas partes aéreas, e conseqüentemente, em aumento na taxa de multiplicação *in vitro* para o porta-enxerto Marubakaido.

### 3. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo investigar a possibilidade de brassinoesteróides estimularem o alongamento de partes aéreas e a proliferação de brotações com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*).

#### 3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Investigar a possibilidade da 28-Homoetil-castasterona estimular o alongamento de partes aéreas e a proliferação de brotações com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*).

3.1.2 Investigar o potencial efeito de substituições com os íons flúor e hidroxila no carbono 5 da 28-Homoetil-castasterona sobre o alongamento de partes aéreas e a proliferação de brotações com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Segmentos nodais medindo entre 15 e 20 mm de comprimento (vide figuras 32 a 36 do Anexo 1), obtidos a partir de um clone do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh), já estabelecido *in vitro*, fornecido pelo Dr. Enio Luiz Pedrotti (Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC), foram cultivados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP (6-benzilaminopurina) (Nunes *et al*, 1999) e solidificado com ágar (0,6%, m/V).

### 4.2 Síntese dos brassinoesteróides

28-Homoetil-castasterona, foi sintetizada a partir do estigmasterol e derivativos apresentando substituições com o íon flúor ou hidroxila no carbono 5 da 28-Homoetil-castasterona foram sintetizados de acordo com Ramírez *et al* (2000a) e Ramírez *et al* (2000b). A 28-Homoetil-castasterona nas suas formas nativa, fluoretada e hidroxilada (figura 2) foram fornecidos pela Dra. Lydia R. Galagovsky (Departamento de Química Orgânica, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Universidade de Buenos Aires, Argentina).

### 4.3 Aplicação dos Brassinoesteróides (fluxograma 1)

Doses únicas do brassinoesteróide 28-HCTS (28-Homoetil-castasterona; (22R,23R)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahidroxi-5 $\alpha$ -estigmasteran-6-ona) nas formas nativa, fluoretada e hidroxilada, foram aplicadas sobre a nervura central da folha mais próxima do ápice, esta medindo no mínimo 2 mm de largura, formada durante o período inicial de cultivo (15 dias). Foram utilizadas doses de 0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10  $\mu\text{g}.\text{explante}^{-1}$  de 28-HCTS na forma de microgotas, com volume de 5  $\mu\text{L}$ , para as moléculas nativas e fluoretadas, e 1  $\mu\text{L}$  para as moléculas hidroxiladas. As

aplicações do 28-HCTS foram realizadas no 15<sup>o</sup> dia após a inoculação das culturas.

28-HCTS, nas suas formas nativa e fluoretada, foi aplicado na forma de solução etanólica (Merck, Darmstadt, Alemanha), enquanto que o 28-HCTS na sua forma hidroxilada foi aplicado na forma de uma solução de dimetilsulfóxido (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As partes aéreas-controle receberam microgotas do solvente utilizado para a respectiva forma do HCTS.

#### 4.4 Aplicação do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

Segmentos nodais medindo entre 15 e 20 mm de comprimento foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) nas concentrações de 0; 12,5; 50 e 200  $\mu\text{M}$ . Uma solução estoque aquosa de ACC foi esterilizada por meio de ultrafiltração, através de membrana descartável de difluoreto de polivinilideno (MILLEX<sup>®</sup>, Millipore Co., M.A., E.U.A.) com diâmetro de poro igual a 0,22  $\mu\text{m}$ . Alíquotas da solução estoque foram adicionadas ao meio de cultura após a autoclavagem do mesmo, de maneira a perfazer a concentração final de ACC desejada.

#### 4.5 Condições de cultivo

As culturas foram mantidas em sala de ambiente controlado usando um delineamento completamente casualizado. Fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) foi fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria, gerando densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (400-700 nm) igual a 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , ao nível das culturas. A temperatura e a umidade relativa do ar foram mantidas em  $27 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  e  $70 \pm 5\%$ , respectivamente.

## 4.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com delineamento inteiramente casualizado e com o auxílio do programa estatístico JMP ("Statistical Analysis System", SAS Institute Inc., EUA, 1989-2000) versão 4.0.0. Cada experimento foi repetido pelo menos por duas vezes, tendo sido utilizados 6 tratamentos por experimento e 32 repetições (explantes) por tratamento, no caso dos experimentos envolvendo BRs. Nos experimentos envolvendo o uso do ACC, foram utilizados 4 tratamentos e 32 repetições por tratamento, sendo uma planta por repetição.

## 4.7 Parâmetros avaliados

Trinta dias após a aplicação do 28-HCTS e seus dois derivados e trinta dias após o início da cultura, no caso das partes aéreas crescidas em meio de cultura enriquecido com ACC, as partes aéreas formadas foram avaliadas para:

1. taxa de multiplicação (número total de ramos  $\geq 15$  mm em comprimento);
2. número de ramos principais  $\geq 15$  mm em comprimento;
3. número de ramos laterais primários  $\geq 15$  mm em comprimento;
4. número de ramos laterais secundários  $\geq 15$  mm em comprimento (quando estes ocorreram);
5. comprimento dos ramos principais, laterais primários e secundários (em mm).

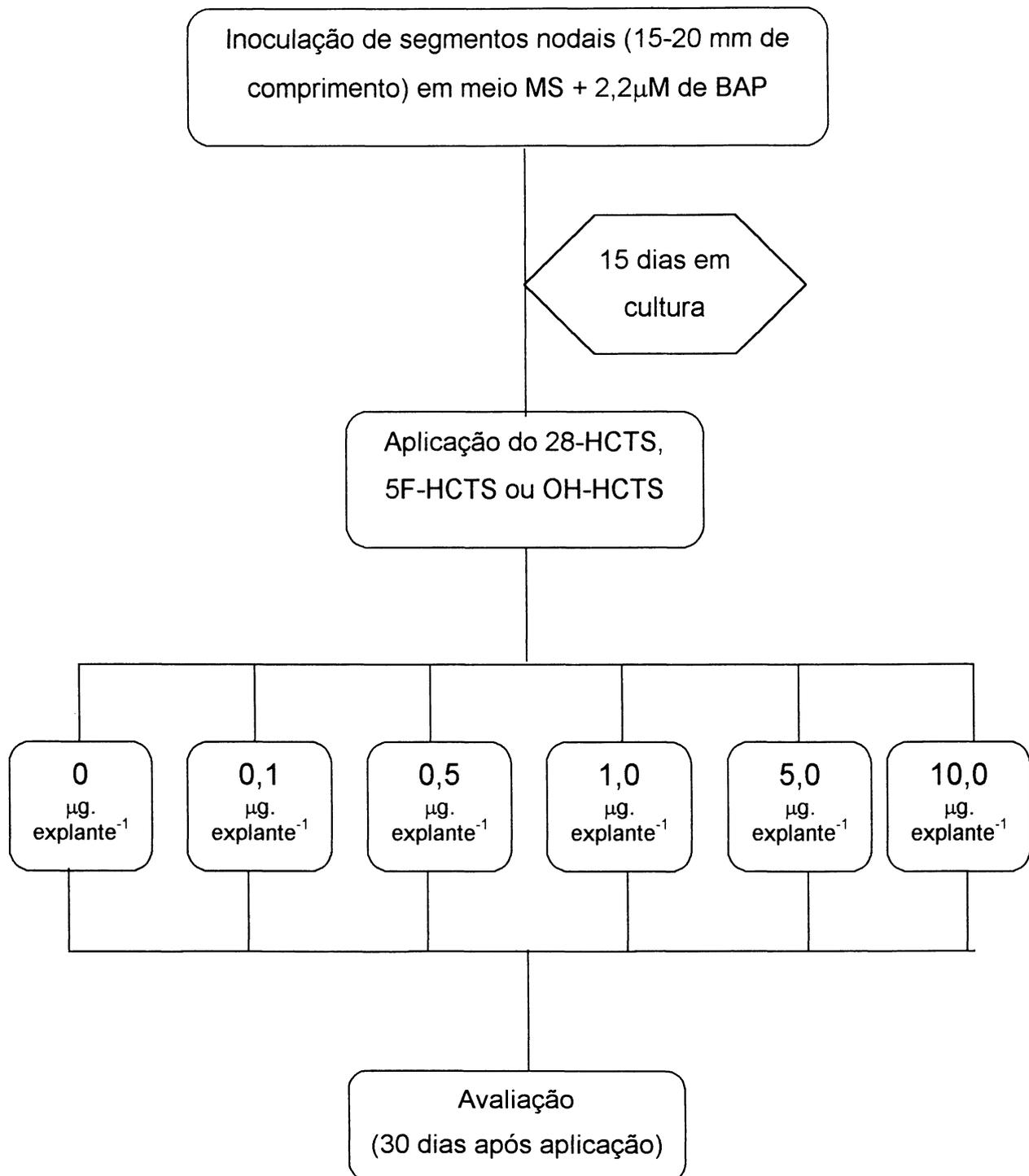
Definições utilizadas neste estudo:

1. Ramo principal: Ramo desenvolvido diretamente a partir do explante original inoculado.

2. Ramo lateral primário: Ramo desenvolvido diretamente a partir de um ramo principal.

3. Ramo lateral secundário: Ramo desenvolvido diretamente a partir de um ramo lateral primário.

Fluxograma 1 – Procedimento utilizado nos experimentos envolvendo a aplicação do brassinoesteróide 28-HCTS nas formas nativa, fluoretada e hidroxilada.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Brassinoesteróide 28-HCTS (forma nativa)

Nenhuma alteração estatisticamente significativa ( $p=0,05$ ) foi encontrada para quaisquer dos parâmetros avaliados, quando partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) foram tratadas com o brassinoesteróide 28-HCTS.

As figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 indicam que o brassinoesteróide 28-HCTS não exerce efeito sobre o alongamento caulinar ou sobre a proliferação de brotações laterais em partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido crescendo *in vitro*. Entretanto, a curva de regressão ajustada para o parâmetro número de ramos principais medindo no mínimo 15 mm de comprimento (figura 5) indica que partes aéreas tratadas com as doses mais elevadas do 28-HCTS apresentaram menor alongamento quando comparadas às partes aéreas controle.

Embora a figura 7, que apresenta os dados referentes ao número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm de partes aéreas tratadas com o 28-HCTS, apresente variação no parâmetro avaliado em função da dose do BR, estas variações não são estatisticamente significativas de acordo com o teste Tukey de diferença entre médias ( $p=0,05$ ), quando comparadas ao controle. Estas variações devem-se provavelmente à pequena frequência com a qual os ramos laterais secundários são formados e também à grande variabilidade dos dados obtidos para este parâmetro.

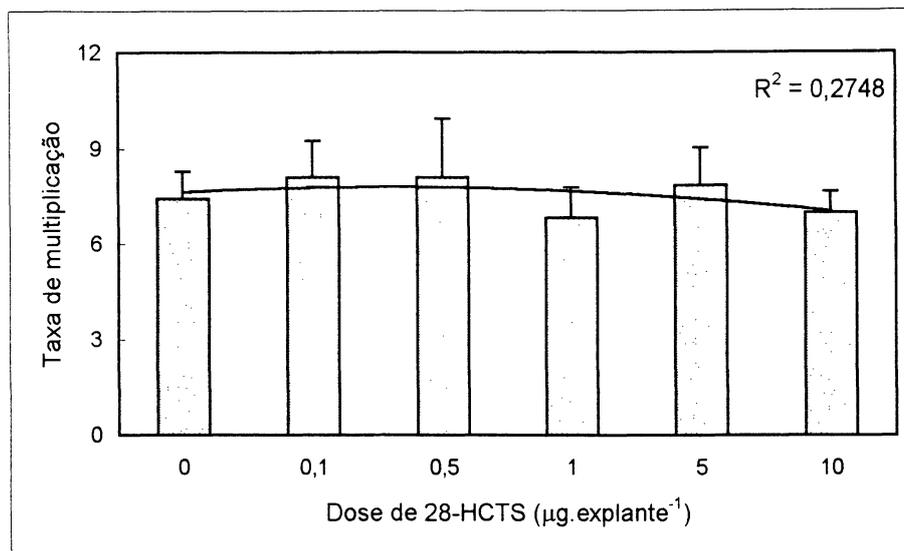


FIGURA 4. Efeito do 28-HCTS sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,0654 x^2 + 0,3355 x + 7,352$

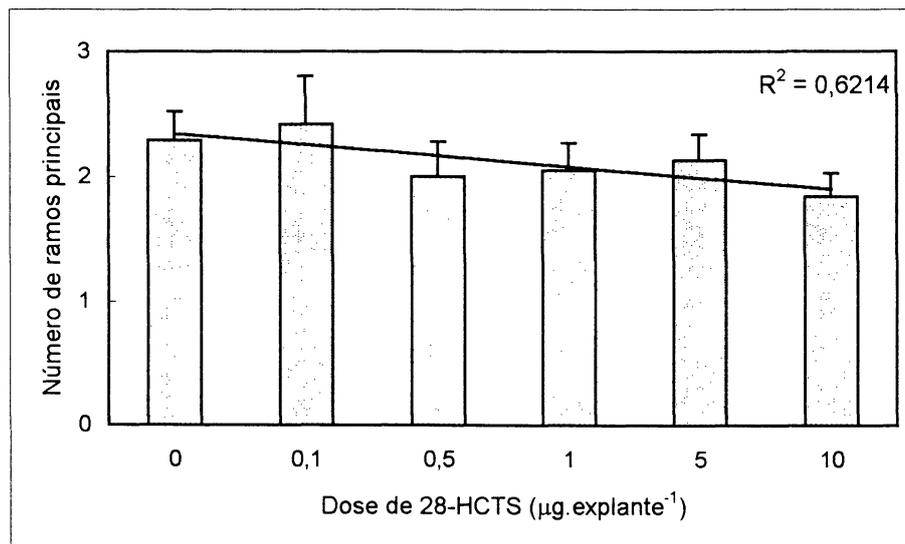


FIGURA 5. Efeito do 28-HCTS sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,0877 x + 2,4287$

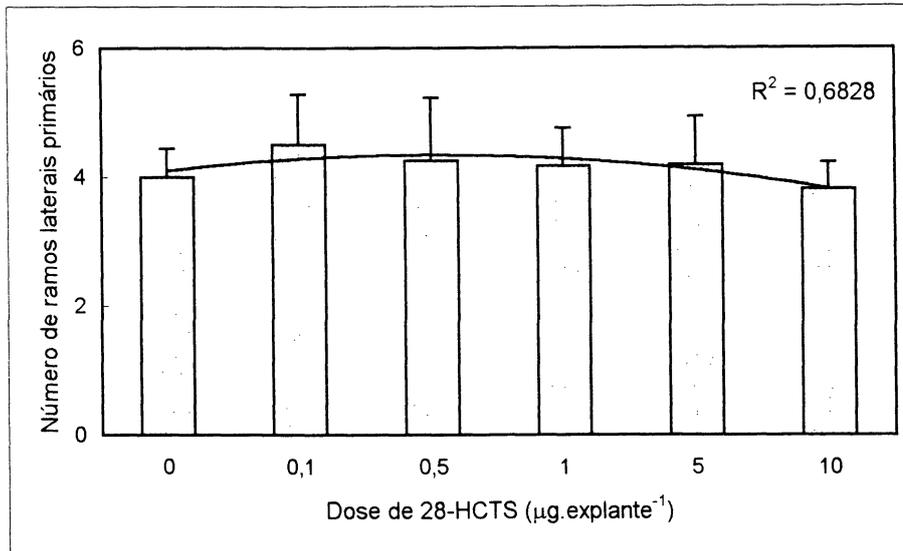


FIGURA 6. Efeito do 28-HCTS sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,0593 x^2 + 0,359 x + 3,796$

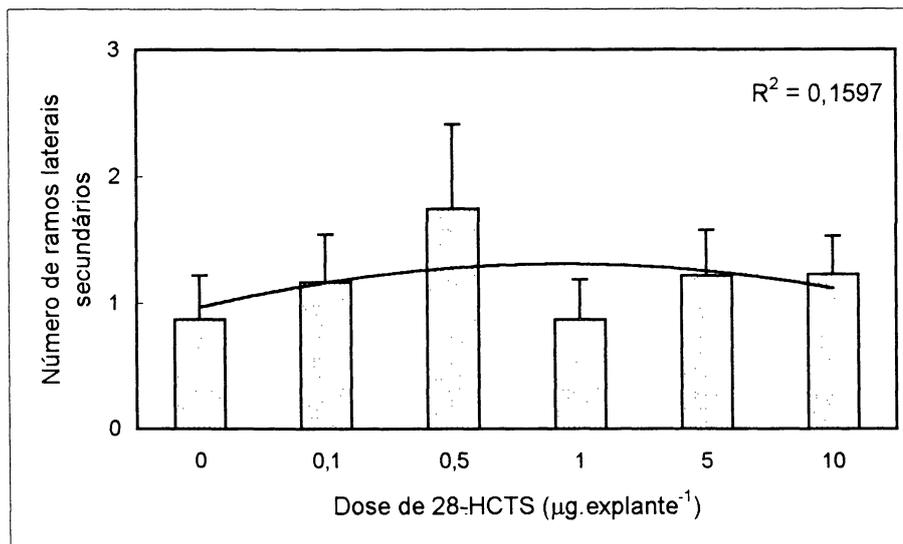


FIGURA 7. Efeito do 28-HCTS sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,0423 x^2 + 0,3268 x + 0,683$

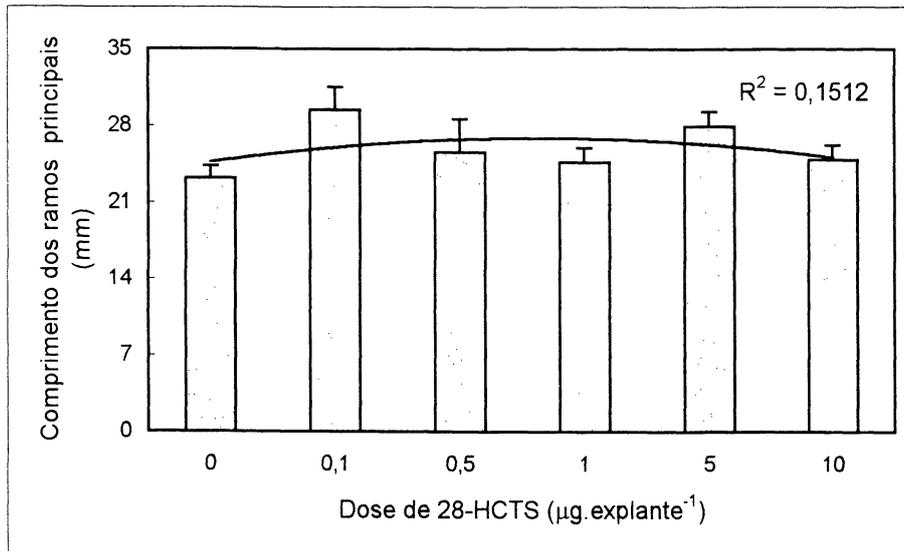


FIGURA 8. Efeito do 28-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos principais (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,3241 x^2 + 2,3599 x + 22,561$

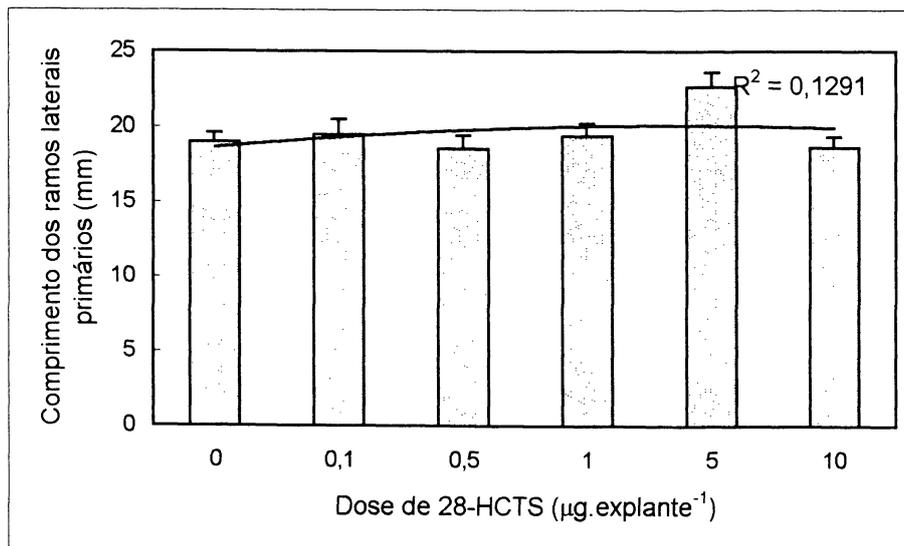


FIGURA 9. Efeito do 28-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,1063 x^2 + 0,9969 x + 17,729$

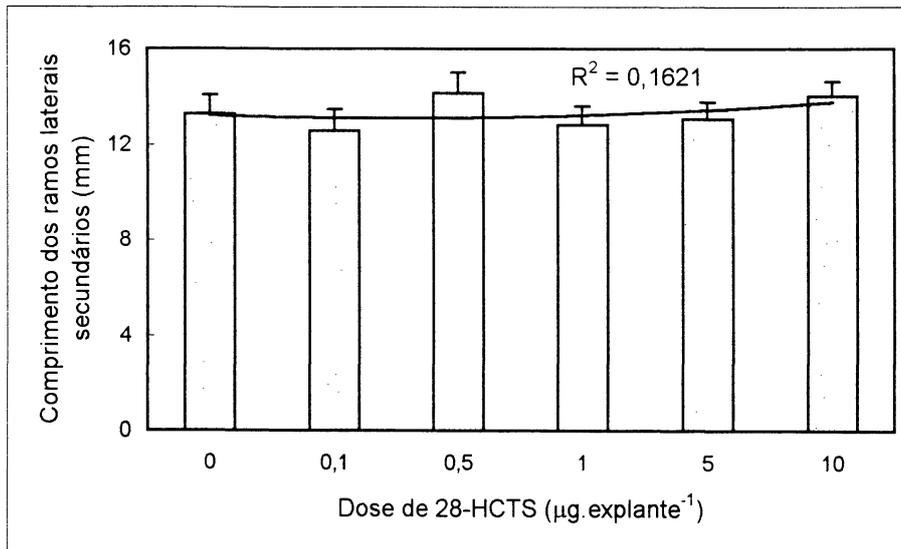


FIGURA 10. Efeito do 28-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = 0,0548 x^2 - 0,2715 x + 13,437$

## 5.2 Brassinoesteróide OH-HCTS (forma hidroxilada)

Da mesma forma que o encontrado para o brassinoesteróide 28-HCTS (forma nativa), o brassinoesteróide OH-HCTS também não se mostrou capaz de estimular a proliferação ou o aumento no comprimento dos ramos de partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido crescendo *in vitro*, nas doses testadas.

As figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam a variação da taxa de multiplicação, número de ramos principais, número de ramos laterais primários e número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm de comprimento, além de comprimento dos ramos principais, laterais primários e laterais secundários em função da dose de OH-HCTS administrada. De maneira similar ao que foi encontrado para a forma nativa do HCTS, nenhuma diferença estatística, de acordo com o teste Tukey de diferença entre médias ( $p=0,05$ ) foi observada para quaisquer dos parâmetros analisados. Todavia, as curvas de regressão ajustadas para os parâmetros comprimento dos ramos principais e comprimento dos ramos laterais primários indicam que partes aéreas tratadas com doses mais elevadas do OH-HCTS apresentaram maior alongamento quando comparadas ao controle.

Para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” (figura 14), novamente encontramos variação em função das diversas doses testadas, sem, entretanto ter sido observado qualquer estabelecimento de tendência evidente ou diferença estatística ( $p=0,05$ ) para os tratamentos utilizados. Esta variação provavelmente está associada aos mesmos fatores mencionados quando da discussão envolvendo a forma nativa do BR, ou seja, baixa frequência de formação para os ramos laterais secundários em todas as partes aéreas e grande variabilidade dos dados obtidos para este parâmetro.

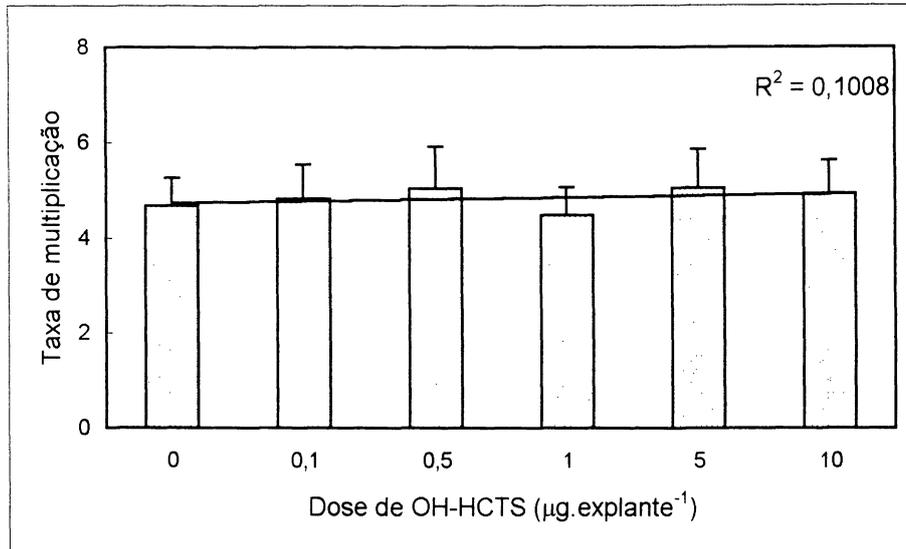


FIGURA 11. Efeito do OH-HCTS sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = 0,0369 x + 4,696$

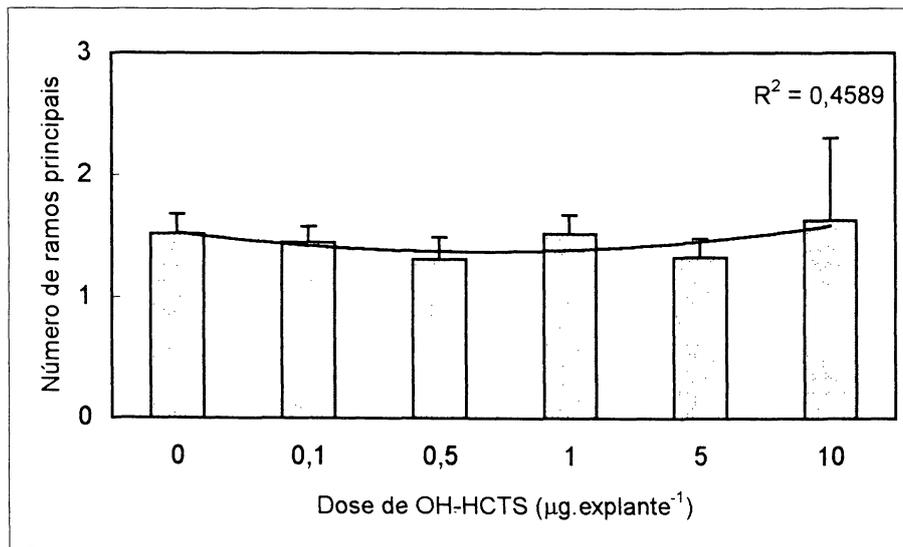


FIGURA 12. Efeito do OH-HCTS sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = 0,0295 x^2 - 0,1948 x + 1,695$

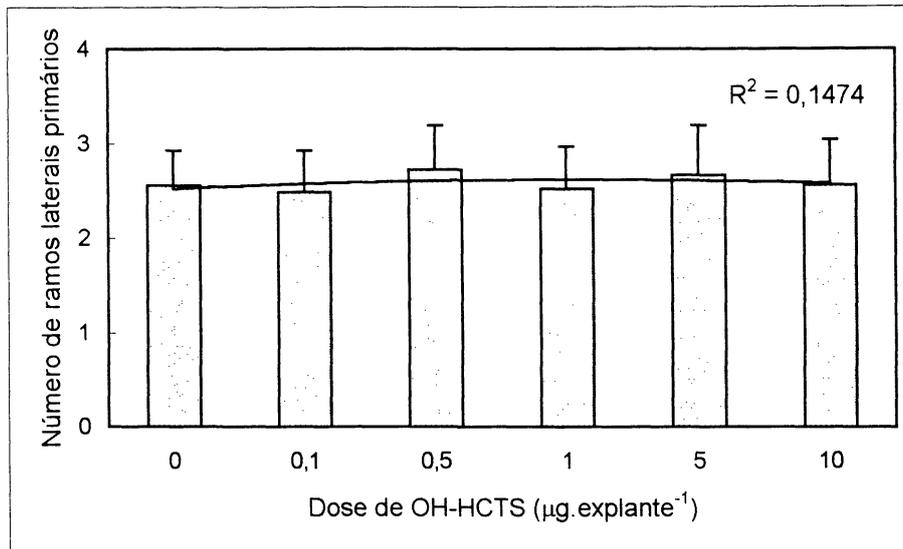


Figura 13. Efeito do OH-HCTS sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,01 x^2 + 0,082 x + 2,448$

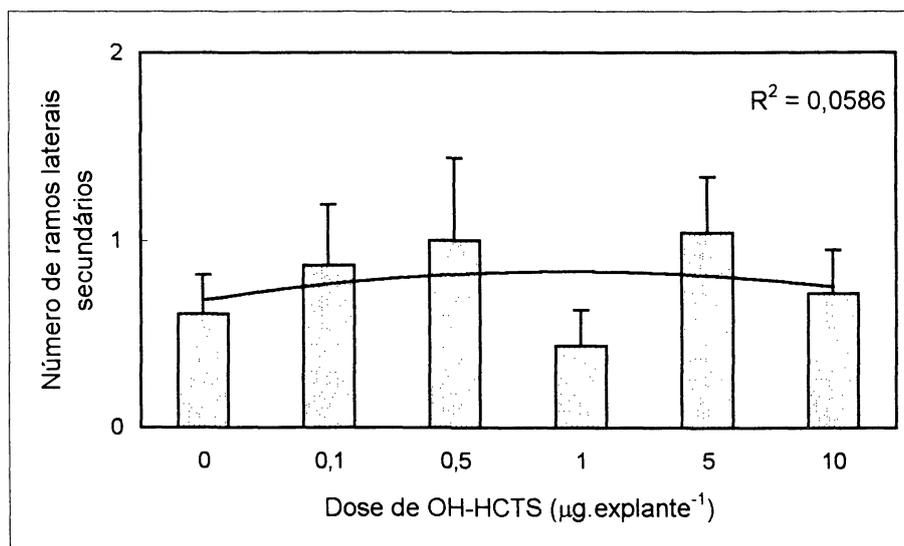


Figura 14. Efeito do OH-HCTS sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,0182 x^2 + 0,1418 x + 0,56$

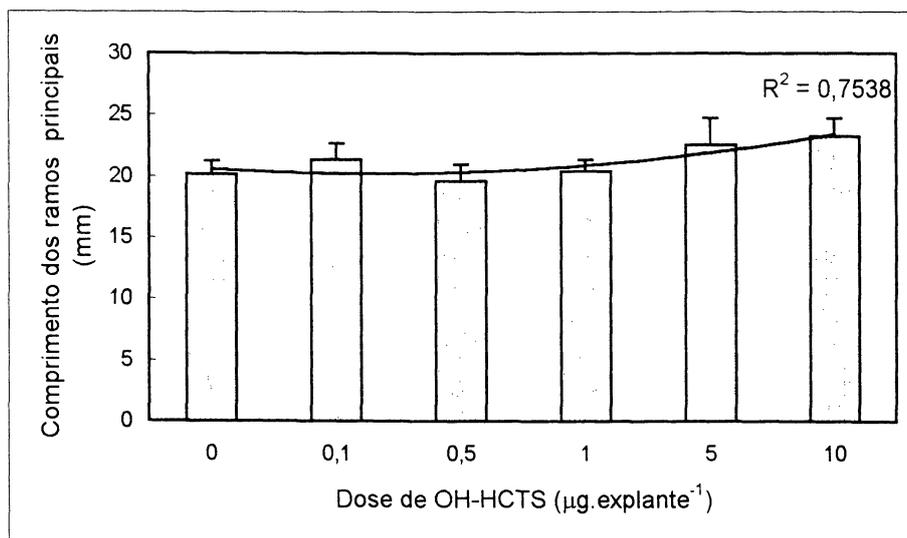


FIGURA 15. Efeito do OH-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos principais (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,2348 x^2 - 1,0683 x + 21,411$

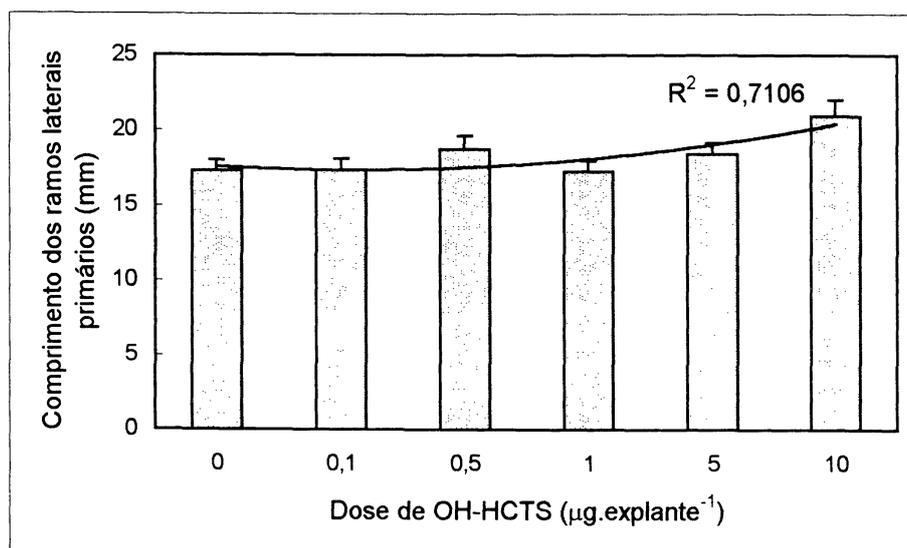


FIGURA 16. Efeito do OH-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = 0,2007 x^2 - 0,8356 x + 18,222$

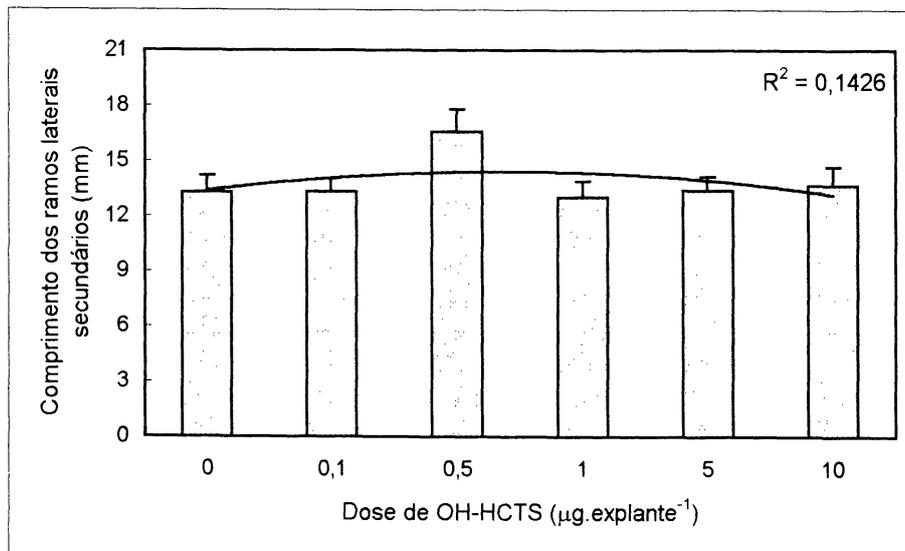


FIGURA 17. Efeito do OH-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,1846 x^2 + 1,2496 x + 12,3$

### 5.3 Brassinoesteróide 5F-HCTS (forma fluoretada)

Diferentemente dos resultados encontrados para o 28-HCTS nas suas formas nativa e hidroxilada, a forma fluoretada do 28-Homoetil-castasterona (5F-HCTS) foi capaz de estimular a proliferação de brotações laterais e o alongamento dos ramos formados ( $p=0,05$ ) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescidas *in vitro*.

Aumento da ordem de 85% e 112% na taxa de multiplicação (número de ramos maiores ou iguais a 15 mm; explantes úteis para micropropagação) mostrou-se associado à aplicação exógena de 5F-HCTS nas doses de 1,0 e 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ , respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 18). Aumento progressivo na taxa de multiplicação foi observado para partes aéreas tratadas com 5F-HCTS em doses crescentes variando de 0 a 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ . Diminuição subsequente na taxa de multiplicação foi verificada para doses de 5F-HCTS acima de 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ , sendo que na dose de 10,0  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  a taxa de multiplicação se igualou à taxa encontrada para o controle.

Em relação ao número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm (Figura 19), foi observado um aumento estatisticamente significativo de 148% em nível de 5% de probabilidade para o tratamento 1,0  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  em relação ao controle.

Aumento significativo ( $p=0,05$ ) de 238% no número de ramos laterais primários foi observado para partes aéreas tratadas com 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  de 5F-HCTS (Figura 20). Embora não apresentando diferença estatística ( $p=0,05$ ), um aumento de 88% no número de ramos laterais primários foi observado para partes aéreas tratadas com 0,1  $\mu\text{g.explante}^{-1}$  de 5F-HCTS quando comparado ao controle.

Um aumento progressivo no número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm (Figura 21) mostrou-se associado à aplicação exógena do 5F-HCTS, em doses crescentes de 0 a 0,5  $\mu\text{g.explante}^{-1}$ . Todavia, este aumento não se mostrou estatisticamente significativo em nível de 5% de probabilidade,

possivelmente devido à baixa frequência com a qual este tipo de ramo foi formado em todas as doses de 5F-HCTS aplicadas.

Aumento da ordem de 30%, significativo em nível de 5% de probabilidade, no comprimento dos ramos laterais primários quando comparado ao controle (Figura 23), mostrou-se associado à aplicação exógena de 5F-HCTS na dose de  $0,5 \mu\text{g.explante}^{-1}$ .

Em relação ao comprimento médio dos ramos principais e laterais secundários (Figuras 22 e 24), não foi observada nenhuma alteração significativa de acordo com o teste Tukey de diferença entre médias ( $p=0,05$ ) para quaisquer das doses de 5F-HCTS testadas, quando comparadas ao controle, indicando que o alongamento de ramos principais e laterais secundários de partes aéreas do porta-enxerto Marubakaido crescendo *in vitro* não é modulado por 5F-HCTS, nas doses testadas.

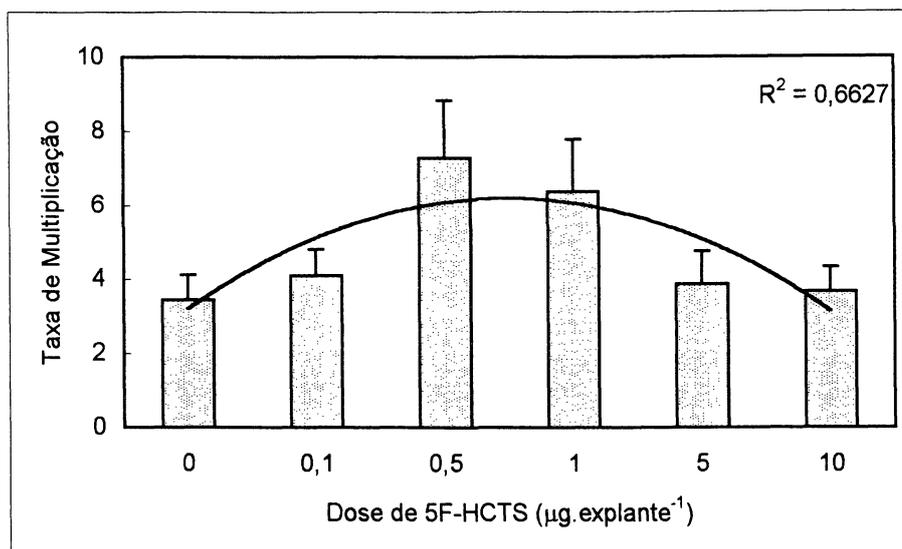


FIGURA 18. Efeito do 5F-HCTS sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,483 x^2 + 3,367 x + 0,325$

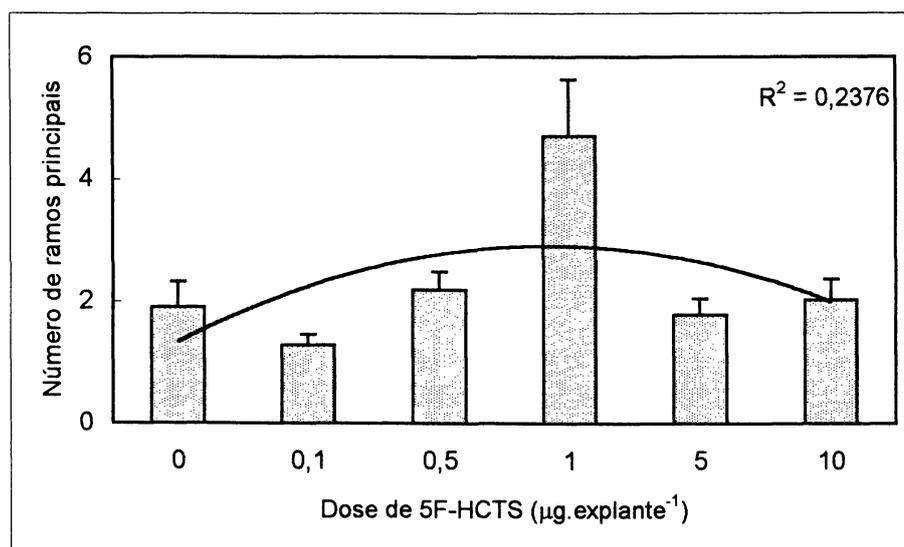


FIGURA 19. Efeito do 5F-HCTS sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,1954 x^2 + 1,4992 x + 0,034$

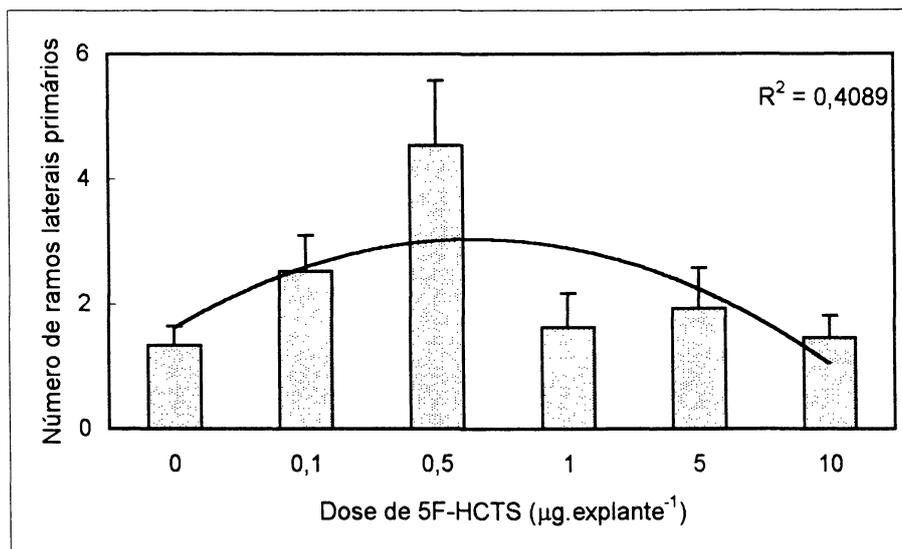


Figura 20. Efeito do 5F-HCTS sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,2695 x^2 + 1,77 x + 0,127$

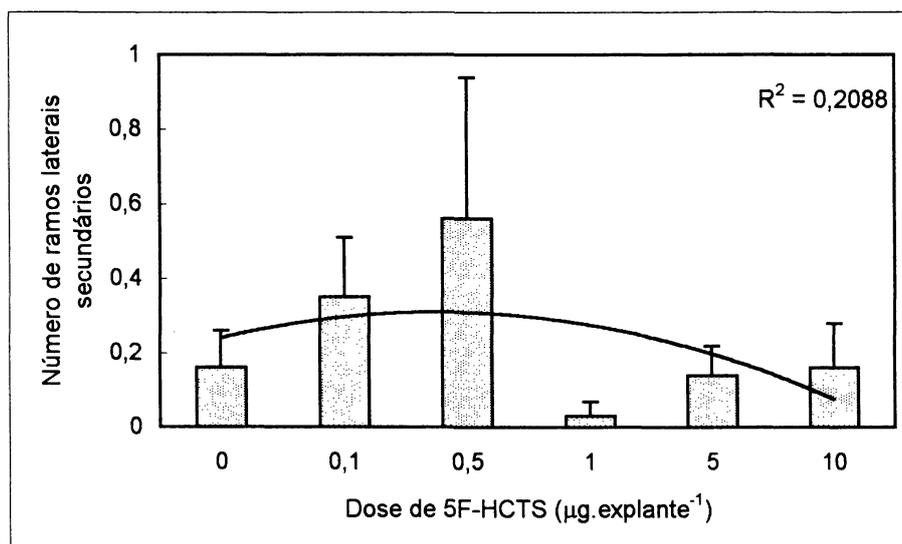


Figura 21. Efeito do 5F-HCTS sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,0223 x^2 + 0,1231 x + 0,141$

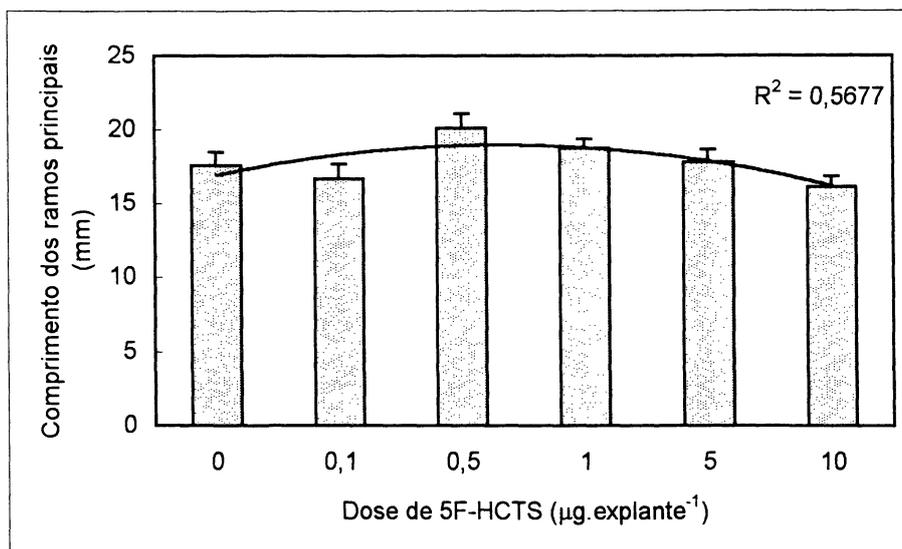


FIGURA 22. Efeito do 5F-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos principais (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,382 x^2 + 2,5295 x + 14,755$

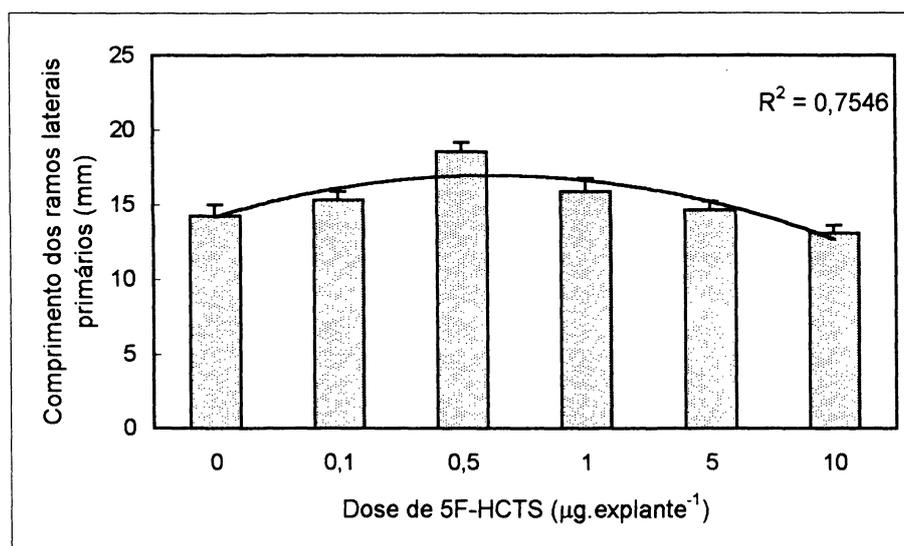


FIGURA 23. Efeito do 5F-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,5589 x^2 + 3,6088 x + 11,138$

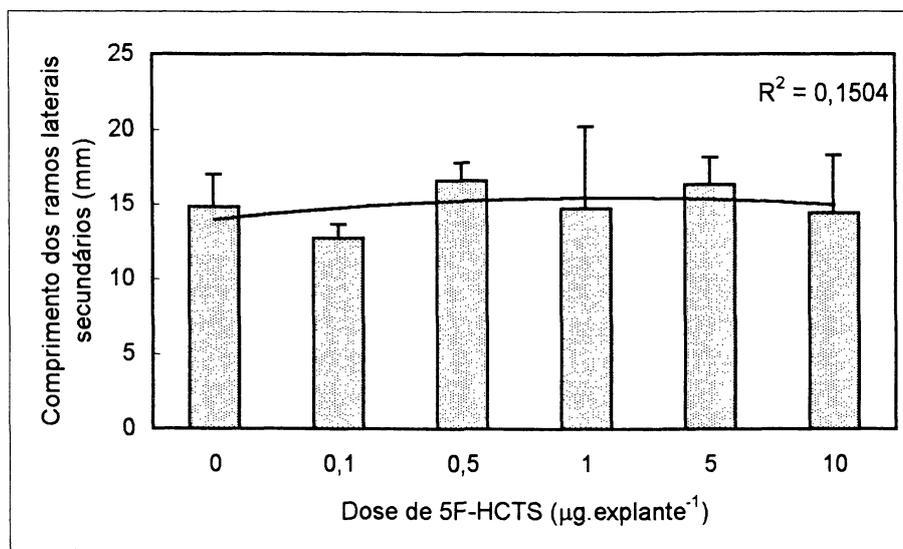


FIGURA 24. Efeito do 5F-HCTS sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,1462 x^2 + 1,2232 x + 12,887$

## 5.4 Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

Nos experimentos envolvendo suprimento exógeno de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), não foram verificadas alterações estatisticamente significativas de acordo com o teste Tukey de diferença entre médias ( $p=0,05$ ) para quaisquer dos parâmetros avaliados. Entretanto, uma tendência para aumento principalmente na taxa de multiplicação (figura 25), assim como no número de ramos laterais primários (figura 27) foi observada para partes aéreas crescidas em meio de cultura enriquecido com ACC.

Para o parâmetro “taxa de multiplicação”, aumento da ordem de 47% foi encontrado para partes aéreas crescidas em meio de cultura contendo  $12,5 \mu\text{M}$  de ACC, quando comparado a partes aéreas crescidas em meio de cultura sem adição de ACC. Aumento da ordem de 39% e de 33% para a taxa de multiplicação, mostrou-se associado à presença de ACC no meio de cultura nas concentrações de  $50$  e  $200 \mu\text{M}$ , respectivamente.

Para o número de ramos principais maiores ou iguais a  $15 \text{ mm}$  (figura 26) foi observado um aumento de 17% relacionado ao suprimento exógeno de ACC na concentração de  $12,5 \mu\text{M}$  quando comparado ao controle.

Analisando o parâmetro número de ramos laterais primários  $\geq$  a  $15 \text{ mm}$  (figura 27), observou-se que todas as concentrações de ACC utilizadas acarretaram aumento no número dos ramos em questão, em relação ao controle. Este aumento atingiu o pico máximo de 100%, associado à concentração de  $12,5 \mu\text{M}$ .

O número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a  $15 \text{ mm}$  sofreu acréscimo de 244% associado à concentração de  $12,5 \mu\text{M}$  de ACC, embora este efeito não tenha sido estatisticamente significativo em nível de 5% de probabilidade, possivelmente devido à baixa frequência com a qual este tipo de ramo foi formado em todas as concentrações de ACC utilizadas no meio de cultura. Esta tendência de aumento também foi observada para o parâmetro comprimento dos ramos principais (mm) (figura 29), sendo o comprimento dos

ramos principais 22% maior em partes aéreas crescidas em meio de cultura enriquecido com 12,5  $\mu\text{M}$  de ACC, quando comparadas às partes aéreas crescidas em meio de cultura não enriquecido com ACC.

Ocorreu um aumento de 33%, associado à concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  de ACC em relação ao controle, para o comprimento dos ramos laterais primários (mm) (figura 30). Queda progressiva no comprimento dos ramos laterais primários, dependente da concentração, foi observada para partes aéreas crescidas em meio de cultura contendo ACC em concentrações acima de 12,5  $\mu\text{M}$ .

Houve, para os ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm (figura 31), tendência de inibição progressiva do alongamento em partes aéreas crescidas em meio de cultura contendo ACC em concentrações até 50  $\mu\text{M}$ , não tendo sido observada redução adicional no comprimento destes ramos para partes aéreas crescidas na presença de 200  $\mu\text{M}$  de ACC no meio de cultura.

Aparentemente, o alongamento de ramos principais, laterais primários e laterais secundários apresenta resposta diferencial com relação à presença de ACC no meio de cultura. Na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ , o ACC estimula a proliferação de ramos principais, laterais primários e laterais secundários, além de estimular o alongamento de ramos principais e laterais primários, e de inibir o alongamento de ramos laterais secundários. Na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , o ACC estimula a formação de ramos laterais primários e inibe a formação de ramos laterais secundários, além de estimular o alongamento de ramos principais e de laterais primários, e inibir o alongamento de ramos laterais secundários.

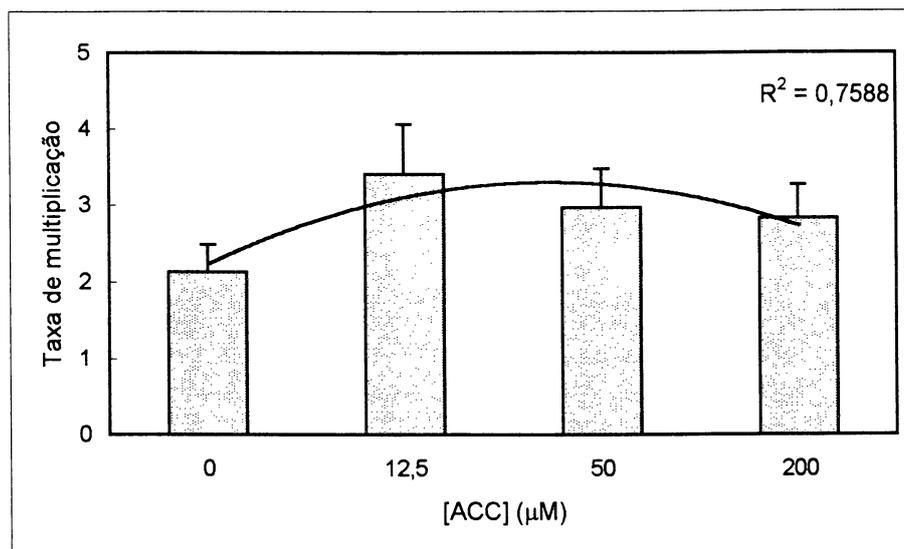


FIGURA 25. Efeito do ACC sobre a taxa de multiplicação (número total de ramos medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,355 x^2 + 1,941 x + 0,645$

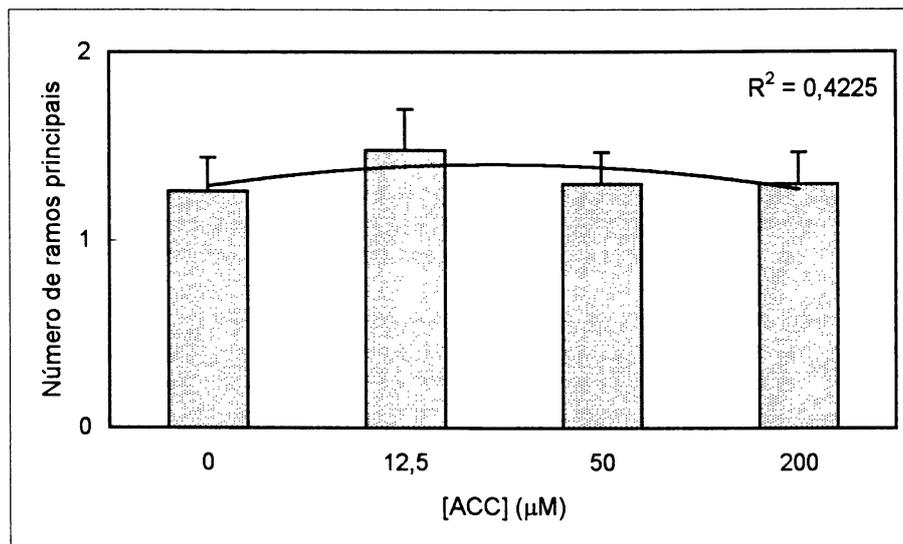


FIGURA 26. Efeito do ACC sobre o número de ramos principais (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,05 x^2 + 0,269 x + 1,075$

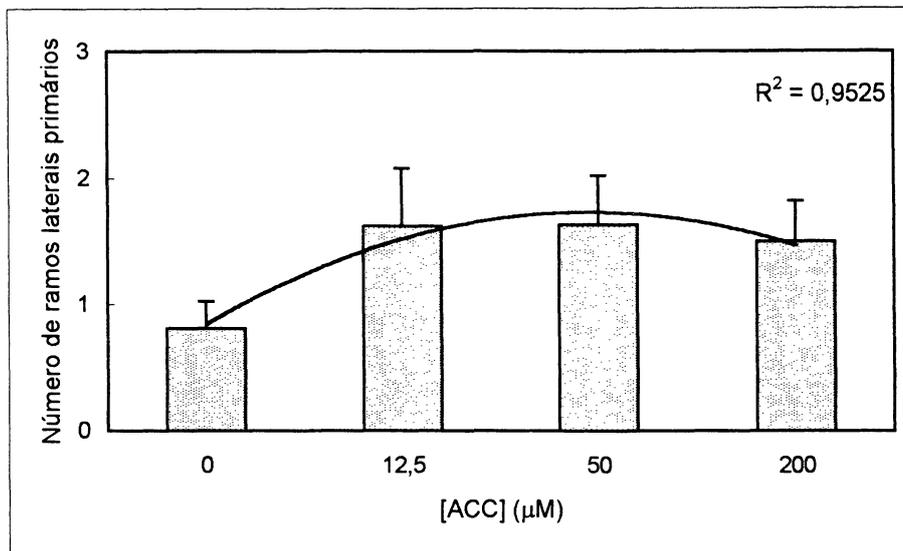


FIGURA 27. Efeito do ACC sobre o número de ramos laterais primários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,235 x^2 + 1,383 x - 0,305$

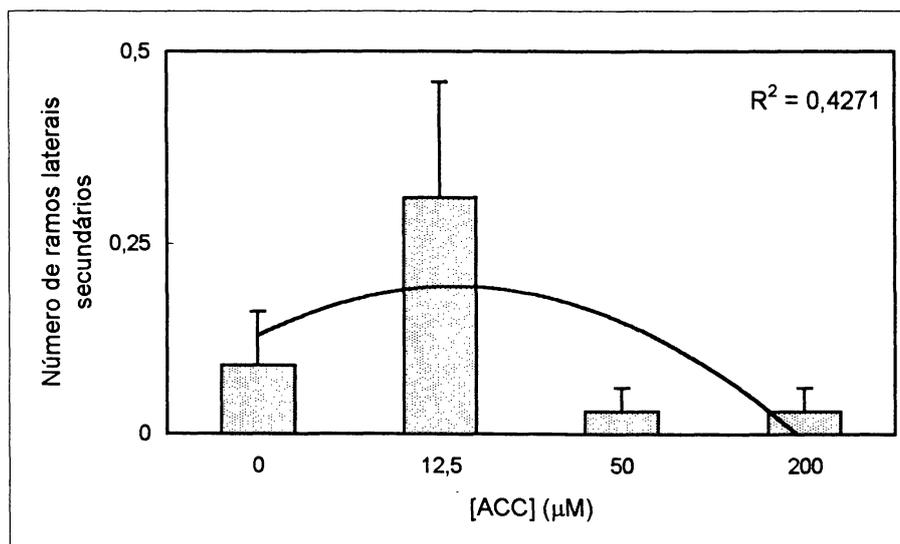


FIGURA 28. Efeito do ACC sobre o número de ramos laterais secundários (medindo no mínimo 15 mm de comprimento) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,055 x^2 + 0,229 x - 0,045$

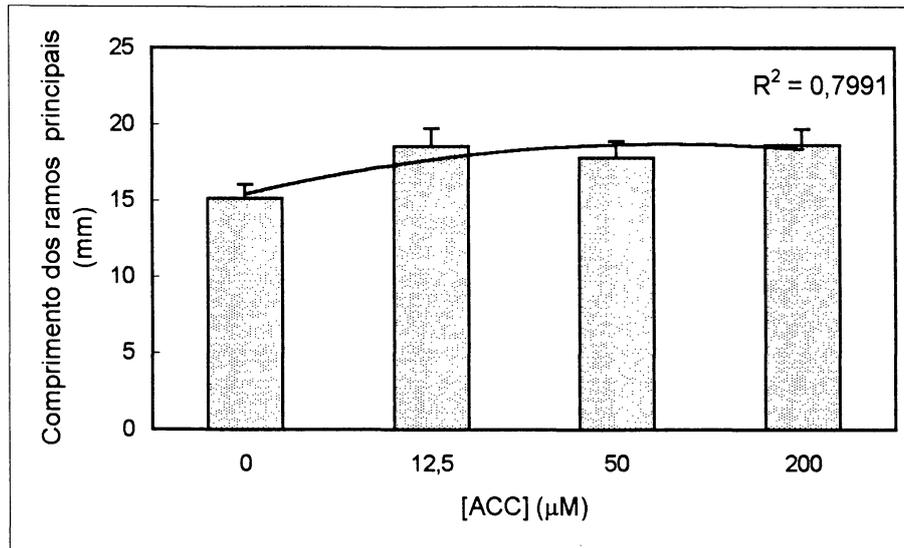


FIGURA 29. Efeito do ACC sobre o comprimento médio dos ramos principais (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,6425 x^2 + 4,1955 x + 11,863$

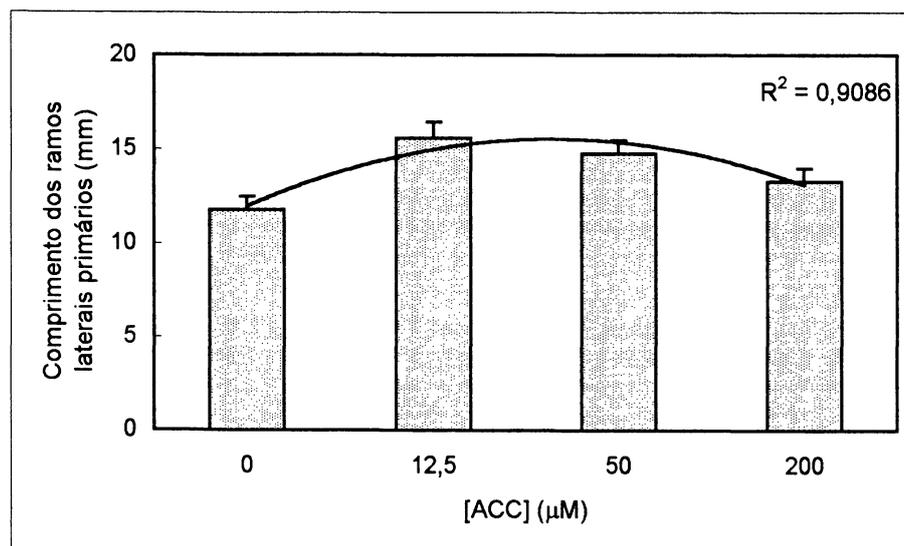


FIGURA 30. Efeito do ACC sobre o comprimento médio dos ramos laterais primários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 1,35 x^2 + 7,028 x + 6,25$

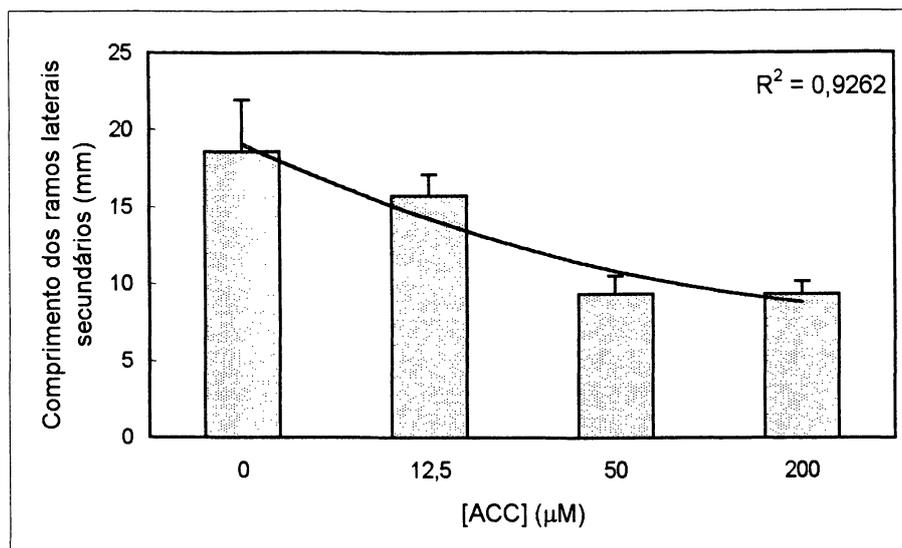


FIGURA 31. Efeito do ACC sobre o comprimento médio dos ramos laterais secundários (em mm) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,7125 x^2 - 6,9795 x + 25,358$

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Atividade biológica de BRs: dependência da estrutura química

A atividade biológica de BRs é dependente de sua estrutura química. Por exemplo,  $\beta$ -hidroxilação no carbono 12 dos compostos 24-epicastasterona e 24-epibrassinolídeo reduzem sua atividade biológica, enquanto que uma  $\beta$ -hidroxilação no carbono 15, é capaz de aumentá-la. Na cadeia lateral, uma hidroxilação no carbono 25 do composto 24-epibrassinolídeo é capaz de provocar aumento da sua atividade biológica, porém, o mesmo não ocorre quando a hidroxila é adicionada ao carbono 26 do mesmo composto (Sasse, 1997).

Muitos estudos têm investigado os requerimentos estruturais para que BRs exerçam atividade biológica. Zurek *et al.* (1994), testaram a capacidade de vários BRs e análogos estruturais sintéticos em aumentar o alongamento do epicótilo e regular a expressão do gene *BRU1* em *Glycine max*, gene que codifica para uma enzima envolvida no alongamento caulinar, processo este demonstrado ser modulado por BRs. O brassinolídeo causou aumento na expressão do gene *BRU1* em epicótilos de *Glycine max*, tendo sido observado aumento do comprimento do epicótilo concomitante com o aumento da expressão gênica. Da mesma forma, o 24-epibrassinolídeo, iso-epibrassinolídeo e 28-homobrassinolídeo, promoveram o alongamento do epicótilo e provocaram um acréscimo nos níveis de transcrição do gene *BRU1*. Em contrapartida, a aplicação do iso-homobrassinolídeo, que difere do 28-homobrassinolídeo apenas pela configuração das hidroxilas dos carbonos 22 e 23, resultou em um alongamento do epicótilo 10 vezes menor e um reduzido nível de transcrição do gene *BRU1*. Todos os análogos sintéticos testados, com diferenças nos grupos funcionais do oxigênio nos anéis A e B de sua estrutura, não foram eficientes na promoção do alongamento do epicótilo, além de não apresentarem efeito na modificação dos níveis de transcrição do gene *BRU1*, ou ainda apresentarem efeito inibitório, quando comparado ao controle (Zurek *et al.*, 1994).

Ramírez *et al* (2000b), avaliaram a bioatividade, em testes de inclinação em lâmina de arroz, comparando cinco compostos do tipo 28-homobrassinosteróides sintéticos e seus compostos precursores naturais. Os compostos sintéticos sofreram a adição de radicais hidroxila ou flúor no carbono 5. Dentre os compostos sintéticos, os mais efetivos na indução da resposta biológica foram as formas fluoretadas, derivadas dos BRs naturais 28-homocasterona e 28-homotifasterol. Os resultados mais significativos nos testes de inclinação de lâmina de arroz foram alcançados através do derivado fluoretado obtido a partir do 28-homotifasterol, superando inclusive os valores encontrados para as formas naturais, que apresentam alta atividade biológica. A maior eficiência dos derivativos fluoretados no aumento da inclinação da lâmina de arroz fornece clara evidência de que a introdução de um átomo de flúor no carbono 5 pode aumentar a atividade biológica do composto resultante em relação ao natural. O composto hidroxilado derivado do BR natural 28-homocasterona apresentou atividade 20% mais baixa em comparação com o composto que lhe deu origem. Esta redução na atividade pode ser explicada provavelmente pelo decréscimo na habilidade do composto em estabelecer ponte de hidrogênio com o seu receptor ou de formar uma ponte de hidrogênio intramolecular entre os grupamentos do carbono 3 e carbono 5, interferindo no complexo receptor/substrato (Ramírez *et al*, 2000b).

No presente estudo, foram testados os efeitos dos brassinosteróides 28-homoetil-casterona (28-HCTS – forma nativa), sua forma hidroxilada (OH-HCTS) e sua forma fluoretada (5F-HCTS) sobre a arquitetura de partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido, visando investigar a possibilidade destes BRs estimularem o alongamento de partes aéreas e a proliferação de brotações nesta espécie.

A forma nativa (28-HCTS) não exerceu efeito modulador sobre o alongamento caulinar ou sobre a proliferação de brotações laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro*. Segundo os resultados obtidos por Ramírez *et al* (2000b), utilizando cinco compostos do tipo 28-homobrassinosteróides sintéticos e comparando sua

bioatividade com seus precursores naturais, as formas nativas ou naturais dos BRs testados apresentaram uma alta atividade biológica, resultados não encontrados no presente estudo.

A forma hidroxilada do brassinoesteróide HCTS (OH-HCTS) também não se mostrou capaz de alterar significativamente ( $p=0,05$ ) o padrão de alongamento caulinar ou a proliferação de brotações laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Ramírez *et al* (2000b), mostraram que a introdução de um grupamento hidroxila no carbono 5 da 28-homocastasterona, resulta em um significativo decréscimo na atividade biológica da molécula, em experimentos de inclinação de lâmina de arroz. Este decréscimo da atividade do OH-HCTS em relação à molécula na sua forma nativa, observado por Ramírez *et al* (2000b) não foi encontrado nos experimentos com o porta-enxerto de macieira Marubakaido, onde ausência de controle sobre a proliferação de brotações laterais ou alongamento caulinar para esta espécie foi verificada quando tratada com OH-HCTS e a forma nativa 28-HCTS.

Diferentemente dos resultados encontrados para o HCTS na sua forma nativa e hidroxilada, a forma fluoretada (5F-HCTS) do 28-homoetil-castasterona foi capaz de estimular significativamente a proliferação de brotações laterais e o alongamento do comprimento dos ramos ( $p=0,05$ ) em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescidas *in vitro*, o que resultou em aumento significativo ( $p=0,05$ ) na taxa de multiplicação *in vitro* para o porta-enxerto de macieira objeto deste estudo. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com o encontrado por Ramírez *et al* (2000b), onde a adição de um átomo de flúor no carbono 5 na molécula nativa HCTS manteve o índice de atividade biológica da forma nativa ou o aumentou.

Em diversos reguladores do crescimento vegetal, a exemplo das giberelinas, outra classe de compostos diterpenóides, a atividade biológica é dependente da estrutura química da molécula. As giberelinas A<sub>4</sub> e A<sub>9</sub>, por exemplo, que não apresentam grupamento hidroxila na posição 13, promovem o alongamento de partes aéreas em pepino, enquanto giberelinas hidroxiladas na posição 13, tais como GA<sub>1</sub> e GA<sub>20</sub> não apresentam esta capacidade. Entretanto,

este controle sobre o crescimento vegetal apresentado por GAs hidroxiladas ou não hidroxiladas é dependente da espécie testada. Ao contrário do que ocorre com pepino, em arroz, ervilha e milho, as GAs hidroxiladas na posição 13 promovem alongamento das partes aéreas, o que não acontece para as GAs não hidroxiladas (Saito *et al.* 1998).

A adição de átomos de flúor a giberelinas exerce efeito sobre suas propriedades biológicas, sendo a magnitude destes efeitos dependente do grau de fluorização e do tipo de tecido vegetal envolvido no bioensaio. Por exemplo, um derivativo monofluoretado da GA<sub>5</sub> (MFA<sub>5</sub>) apresentou-se mais ativo do que o derivado difluoretado (DiFA<sub>5</sub>) da mesma giberelina em bioensaios de alongamento de hipocótilos de alface. Porém, o oposto foi observado quando os mesmos compostos foram testados em bioensaio envolvendo plântulas do arroz anão Tanginbozu (Jones, 1976).

Saito *et al.* (1998), prepararam as giberelinas fluoretadas 3β-flúor-GA<sub>9</sub> (1), 3β-flúor-GA<sub>20</sub> (2), 3β-flúor-desidroxigiberelina-C (3) e 13-flúor-GA<sub>9</sub> (4) e investigaram seus efeitos sobre o alongamento de partes aéreas de arroz (*Oryza sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). Em arroz, as giberelinas 1 e 2 estimularam o alongamento das plântulas em 180 e 320% em relação ao controle, nas doses de 300 e 3000 ng.plântula<sup>-1</sup>, respectivamente. Todavia, as GAs fluoretadas 1 e 2 não foram capazes de estimular o alongamento além do provocado pelas giberelinas A<sub>1</sub> e A<sub>20</sub> (GAs nativas), também testadas neste experimento. Já a 13-flúor-GA<sub>9</sub> (4), promoveu alongamento caulinar equivalente ao encontrado quando as plantas foram tratadas com GA<sub>20</sub> em todas as doses testadas. Em pepino, as GAs fluoretadas 2 e 3 não foram capazes de promover o alongamento das plântulas em qualquer das doses testadas. As GAs fluoretadas 1 e 4 promoveram o alongamento das partes aéreas, sem, entretanto, igualar este crescimento aquele provocado pelas GAs A<sub>4</sub> e A<sub>9</sub>, testadas no mesmo experimento.

A natureza química dos substituintes também é importante. A giberelina 7-flúordihidro GA<sub>5</sub>, derivada da GA<sub>5</sub>, foi capaz de causar uma estimulação do alongamento do hipocótilo de alface, maior que a provocada pela GA<sub>5</sub>, enquanto a

7,8-dihidro GA<sub>5</sub> (DiHA<sub>5</sub>), com a mesma estereoquímica do derivativo fluoretado, não foi capaz de causar tal estimulação. Além disso, a DiHA<sub>5</sub> provou ser inativa quando testada em bioensaio com o arroz anão Tan-ginbozu, enquanto a resposta provocada pelo derivado monofluoretado da GA<sub>5</sub> (MFA<sub>5</sub>) foi equivalente à resposta da GA<sub>5</sub> neste sistema (Jones, 1976).

Em experimentos realizados com o intuito de avaliar o efeito de derivados metilados e fluoretados de GA<sub>9</sub> sobre a estimulação do alongamento em hipocótilos de alface e pepino (Hoad *et al.* 1981), os derivados 2β-MeOGA<sub>9</sub>; 2β-MeGA<sub>9</sub>; 2,2-diMeGA<sub>9</sub>; 2β-flúorGA<sub>9</sub> e 2α-flúorGA<sub>9</sub> foram fornecidos exógenamente às plantas, além de GA<sub>9</sub>. Para o bioensaio envolvendo comprimento de hipocótilos de alface, a ordem de atividade biológica das moléculas foi 2β-MeOGA<sub>9</sub> < 2,2-diMeGA<sub>9</sub> < 2β-flúorGA<sub>9</sub> < 2α-flúorGA<sub>9</sub> < 2β-MeGA<sub>9</sub> = GA<sub>9</sub>. Para o bioensaio envolvendo comprimento de hipocótilos de pepino, a ordem de atividade biológica foi 2β-MeOGA<sub>9</sub> < 2,2-diMeGA<sub>9</sub> < 2β-MeGA<sub>9</sub> < 2β-flúorGA<sub>9</sub> < 2α-flúorGA<sub>9</sub> = GA<sub>9</sub>. Estes resultados mostram que a atividade biológica de determinado regulador de crescimento vegetal depende de vários fatores, tais como a natureza do substituinte (no caso de derivados), a posição da substituição, bem como o material vegetal no qual as moléculas são testadas.

A atividade biológica de três auxinas naturalmente encontradas em ervilha, ácido indol-3-acético (IAA), ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-IAA) e ácido indol-butírico (IBA), bem como de sete derivados sintéticos de IAA, substituídos pelos alogênios cloro (Cl) e flúor (F): 5-, 6- e 7-Cl-IAA e 4-, 5-, 6- e 7-F-IAA, foi testada sobre o crescimento de pericarpo de ervilha. O crescimento do pericarpo aumentou linearmente com o acréscimo da concentração de 4-Cl-IAA e 5-Cl-IAA (que variou entre 1 e 100 μM), sendo o 4-Cl-IAA (que ocorre naturalmente em ervilhas), significativamente mais ativo que o 5-Cl-IAA, tendo o 4-Cl-IAA provocado um crescimento 142% maior do pericarpo de ervilha quando comparado ao 5-Cl-IAA na concentração de 100 μM. No mesmo experimento, os derivados 6- e 7-Cl-IAA não foram capazes de aumentar o comprimento do pericarpo de ervilha, quando comparados ao controle. O efeito dos derivados de IAA substituídos por flúor sobre o crescimento de pericarpo de ervilha variou de acordo com a

concentração e a posição do íon flúor nos derivativos testados. O comprimento do pericarpo decresceu linearmente quando tratado com concentrações crescentes de 4-F-IAA (concentrações entre 1 e 100  $\mu\text{M}$ ), enquanto o 5-, 6- e 7-F-IAA não exerceram efeito sobre o comprimento do pericarpo de ervilha neste trabalho (Reinecke *et al.* 1995).

Neste trabalho, de maneira similar ao que foi encontrado para 7-fluordihidro  $\text{GA}_5$ , derivada da  $\text{GA}_5$  (Jones, 1976),  $2\beta$ -flúor $\text{GA}_9$  e  $2\alpha$ -flúor $\text{GA}_9$  (Hoad, 1981) e ao contrário do que foi observado para GAs fluoretadas  $3\beta$ -flúor- $\text{GA}_{20}$  e  $3\beta$ -flúor-desidroxigiberelina-C em pepino (Saito *et al.*, 1998) o brassinoesteróide fluoretado (5F-HCTS), foi capaz de promover aumento tanto no comprimento de ramos, quanto na proliferação de brotações laterais do porta-enxerto de macieira Marubakaido, diferentemente do brassinoesteróide 28-HCTS (BR nativo).

Assim, podemos dizer que, além da natureza do radical adicionado ao regulador de crescimento vegetal e do local da molécula onde o radical é adicionado, o tipo de atividade biológica adquirida pela molécula, após a modificação, também depende da espécie vegetal e sistema que recebe a molécula, ou seja, diferentes espécies podem responder de maneiras distintas ao mesmo regulador de crescimento vegetal, seja ele modificado ou não.

## 6.2 Mecanismo de ação do 28-Homoetil-castasterona: possível envolvimento do etileno

Em plantas superiores, o etileno é sintetizado a partir da L-metionina. A L-metionina é convertida em S-adenosil metionina (SAM), pela enzima metionina adenosil transferase. No passo seguinte, a SAM é convertida a ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC-sintase. Finalmente, a ACC-oxidase, também conhecida como enzima formadora do etileno (EFE), catalisa a conversão do ACC para etileno (Osborne, 1989; English *et al.*, 1995).

A dominância apical é descrita como o controle exercido pelo meristema apical da parte aérea, ou raiz de uma planta, sobre o desenvolvimento das gemas laterais (Martin, 1987). A dominância apical é quem determina o grau de

ramificação e conseqüentemente a arquitetura da parte aérea da planta (Cline, 1994). A taxa de produção de reguladores do crescimento vegetal, como o etileno, influencia a diferenciação, a proliferação e o crescimento de células e tecidos cultivados *in vitro*, podendo promover, inibir ou não afetar a formação de brotações laterais (Lambardi *et al.*, 1997). Embora os brassinoesteróides apresentem, aparentemente, atividade regulatória sobre o crescimento das plantas por si, estas moléculas têm-se mostrado capazes de estimular a biossíntese do etileno através do aumento da atividade da ACC-Sintase (Arteca, 1995).

Com o objetivo de investigar mais aprofundadamente um possível envolvimento do etileno como mediador do efeito do BR sobre a proliferação de ramos laterais no porta-enxerto de macieira Marubakaido observado neste trabalho, fornecemos ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em diversas concentrações às partes aéreas do porta-enxerto.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste Tukey de diferença entre médias, foi observada uma tendência para o aumento da proliferação de ramos em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescidas em presença de ACC no meio de cultura, o que aponta para um possível envolvimento do etileno no mecanismo de ação dos BRs empregados neste estudo. Todavia, esta possibilidade precisa ser melhor investigada.

Os resultados alcançados no presente trabalho, quando comparados aos dados obtidos na literatura, demonstram que a atividade biológica dos brassinoesteróides testados (28-HCTS, OH-HCTS e 5F-HCTS) depende da estrutura química dos mesmos.

Tendo em vista o aumento significativo na taxa de multiplicação resultante da aplicação do BR 5F-HCTS, propomos a utilização comercial deste BR para o aprimoramento da técnica de micropropagação utilizada para o porta-enxerto Marubakaido, com a finalidade de obtenção de mudas clonais de genótipos superiores do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) de fitossanidade comprovada, em larga escala.

## 7 CONCLUSÃO

A forma nativa do brassinoesteróide 28-homoetil-castasterona (28-HCTS), bem como sua forma hidroxilada (OH-HCTS) não exerceram efeito modulador significativo sobre o alongamento caulinar ou sobre a proliferação de brotações laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) crescendo *in vitro*.

A forma fluoretada (5F-HCTS) do 28-homoetil-castasterona foi capaz de estimular significativamente a proliferação de brotações laterais e o alongamento do comprimento dos ramos ( $p=0,05$ ), em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescidas *in vitro*, o que resultou em aumento significativo ( $p=0,05$ ) na taxa de multiplicação *in vitro* para o porta-enxerto de macieira objeto deste estudo.

A tendência para o aumento da proliferação de ramos em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescidas em presença de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) aponta para um possível envolvimento do etileno no mecanismo de ação dos BRs empregados neste estudo.

Em função dos resultados apresentados neste estudo, é recomendada a dose de  $0,5 \mu\text{g.explante}^{-1}$  de 5F-HCTS para o aprimoramento da taxa de multiplicação *in vitro* para o porta-enxerto de macieira Marubakaido.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTECA, R. N. Brassinosteroids. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 206-213, 1995.

CHON, N. M.; NISHIKAWA-KOSEKI, N.; HIRATA, Y.; SAKA, H.; ABE, H. Effects of Brassinolide on mesocotyl, coleoptile and leaf growth in rice seedlings. **Plant Production Science**, Tokyo, 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. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, p. 230-237, 1994.

CLOUSE, S. D.; SASSE, J. M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 427-451, 1998.

CLOUSE, S. D. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 702-709, 1997.

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

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Oligosaccharins, Brassinolides and Jasmonates: Non-traditional Regulators of Plant Growth, Development and Gene Expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1211-1223, 1997.

DAVIES, P. J. **Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833p.

ENGLISH, P. J. *et al.* Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1435-1440, 1995.

FLORES, R.; LESSA, A. O.; PETERS, J. A.; FORTES, G. R. L. Efeito da sacarose e do benomyl na multiplicação *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 2363-2368, 1999.

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

GROVE, M.; SPENCER, G.; ROHWEDDER, W.; MANDAVA, N.; WORLEY, J. WARTHEN, J.; STEFFENS, G.; FLIPPEN-ANDERSON, J.; COOK Jr., J. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. **Nature** (London), v. 281, p. 216-217, 1979.

HOAD, G. V.; PHINNEY, B. O.; SPONSEL, V. M.; MacMILLAN. The biological activity of sixteen gibberellin A<sub>4</sub> and gibberellin A<sub>9</sub> derivatives using seven bioassays. **Phytochemistry**, Oxon, v. 20, n. 4, p. 703-713, 1981.

JONES, T. W. A. Biological activities of fluorogibberellins and interactions with unsubstituted gibberellins. **Phytochemistry**, Oxon, v. 15, p. 1825-1827, 1976.

KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five "classical" plant hormones. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1197-1210, 1997.

KIM, S.; CHANG, S. C.; LEE, E. J.; CHUNG, W.; KIM, Y.; HWANG, S.; LEE, J. S. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p.997-1004, 2000.

KOKA, C. V.; CERNY, R. E.; GARDNER, R. G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S. D. A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 85-98, 2000.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of Woody Plants**. 2 ed. Academic Press, 1997.

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

LI, J. & CHORY, J. Brassinosteroid action in plants. ***Journal of Experimental Botany***, Oxford, v. 50, n. 332, p. 275-282, 1999.

LI, J.; NAGPAL, P.; VITART, V.; McMORRIS, T. C.; CHORY, J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. ***Science*** (Washington D C), v. 272, p. 398-401, 1996.

MARTIN, G. C. Apical dominance. ***Hortscience***, Alexandria, v. 22, p. 824-833, 1987.

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*** (London), v. 225, p. 1065-1066, 1970.

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

NAKASU, B. H.; AUGUSTIN, E.; MACHADO, C. A. E. Identificação de cultivares de porta-enxertos de macieira (*Malus* sp.), através de padrões isoenzimáticos. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, v. 13, n. 2, p. 123-128, 1991.

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

NUNES, J. C. O.; BARPP, A.; SILVA, F. C.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir de cultura de meristemas. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, Brasília, v. 21, n. 2, p. 191-195, 1999.

OSBORNE, J. D. The control role of ethylene in plant growth and development. In: CLIJSTER, H. *at al.* ***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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 89-95, 2001.

RAMIREZ, J. A.; CENTURIÓN, O. M. T.; GROS, E. G.; GALAGOVSKY, L. R. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. **Steroids**, New York, 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**, Oxon, v. 56, p. 6171-6180, 2000 b.

REINECKE, D. M.; OZGA, J. A.; MAGNUS, V. Effect of halogen substitution of indole-3-acetic acid on biological activity in pea fruit. **Phytochemistry**, Oxon, v. 40, n. 5, p. 1361-1366, 1995.

ROMANI, G.; MARRÈ, M. T.; BONETTI, A.; CERANA, R.; LADO, P.; MARRÈ. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in maize root segments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, p. 528-532, 1983.

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

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

SASSE, J. M. Recent progress in brassinosteroid research. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 696-701, 1997.

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**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433-437, 1993.

WATANABE, T.; NOGUCHI, T.; KURIYAMA, H.; KADOTA, M.; TAKATUTO, S.; KAMURO, Y. Effects of brassinosteroid compound [TS303] on fruit-setting, fruit-growth, taking roots and cold-resistance. **Fruit Production**, p. 1-4, 1997.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; NAGIG, N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J. S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira M-7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 597-602, 1993.

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**, Santa Maria, v. 28, n.3, p. 387-391, 1998.

ZIMMERMAN, R. H.; STEFFENS, G. L. Cultivar, planting density, and plant growth regulator effects on growth and fruiting of tissue-cultured apple trees. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 2, p. 183-193, 1995.

ZUREK, D. M.; RAYLE, D. L.; McMORRIS, T. C.; CLOUSE, S. D. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p. 505-513, 1994.

## Anexo 1

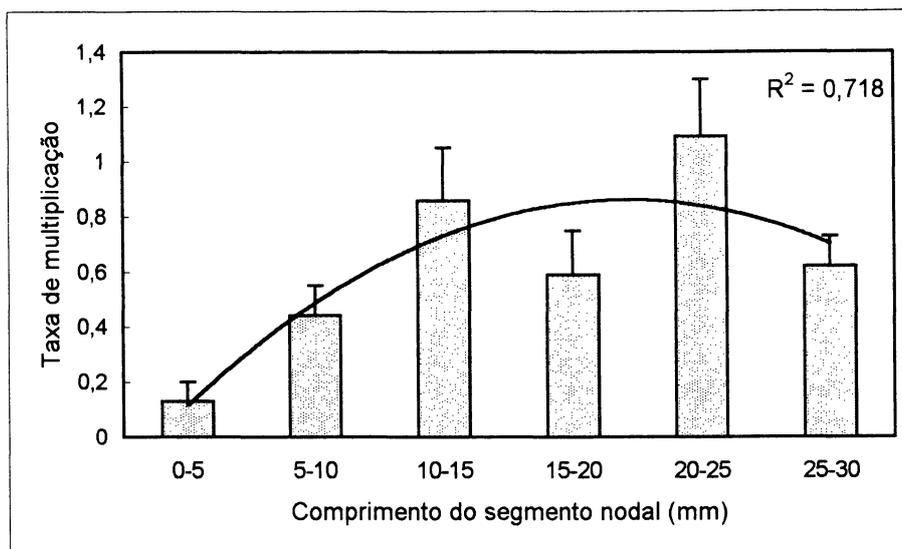


FIGURA 32. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre a taxa de multiplicação média *in vitro* em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. Equação da reta:  $y = -0,0639 x^2 + 0,5655 x - 0,388$

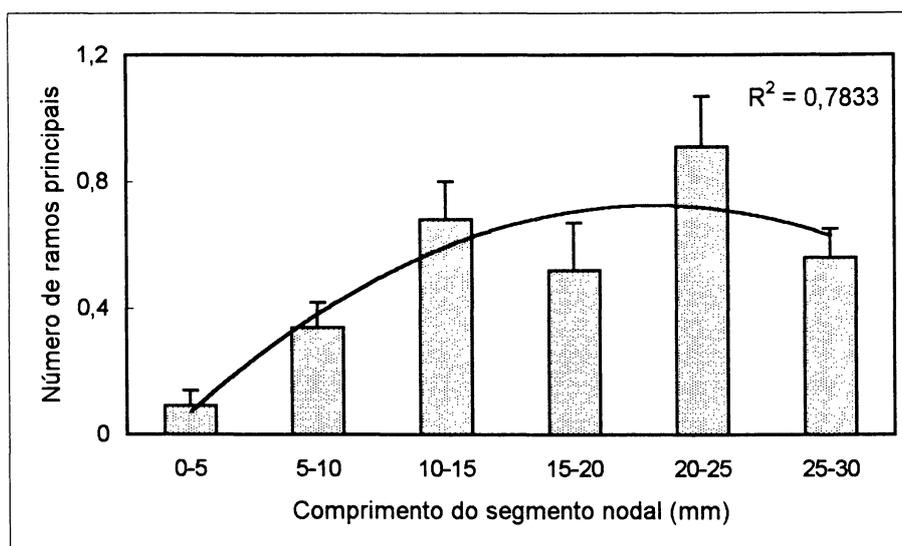


FIGURA 33. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o número médio de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,05 x^2 + 0,4614 x - 0,34$

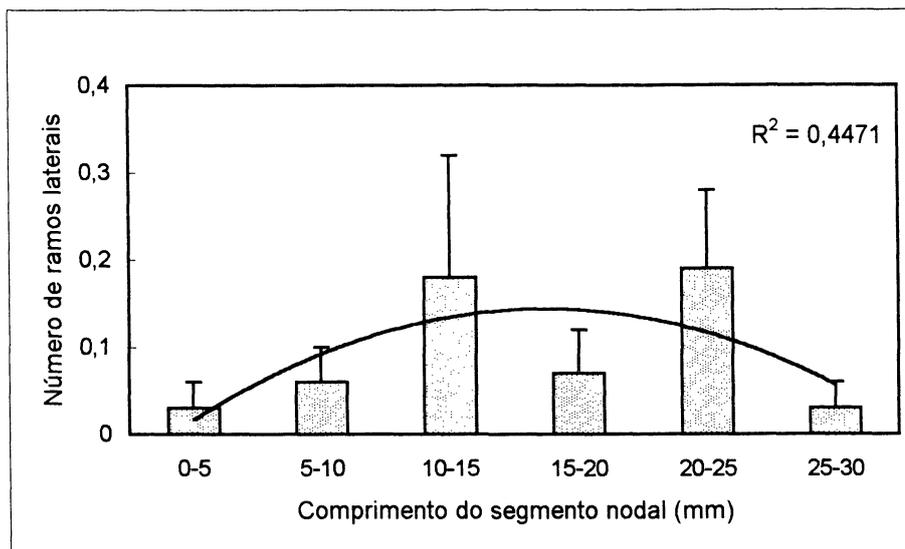


FIGURA 34. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o número médio de ramos laterais maiores ou iguais a 15 mm em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,017 x^2 + 0,1267 x - 0,093$

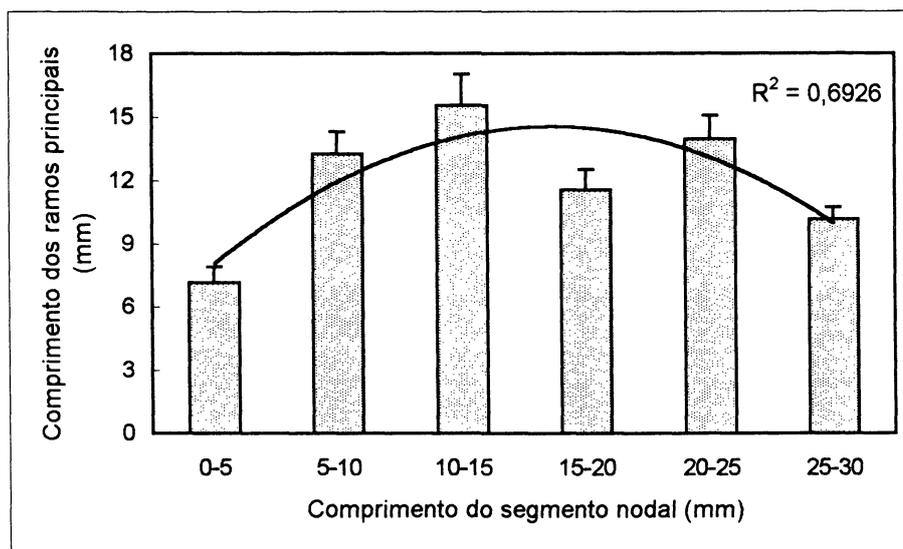


FIGURA 35. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o comprimento médio dos ramos principais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = -0,8777 x^2 + 6,5275 x + 2,407$

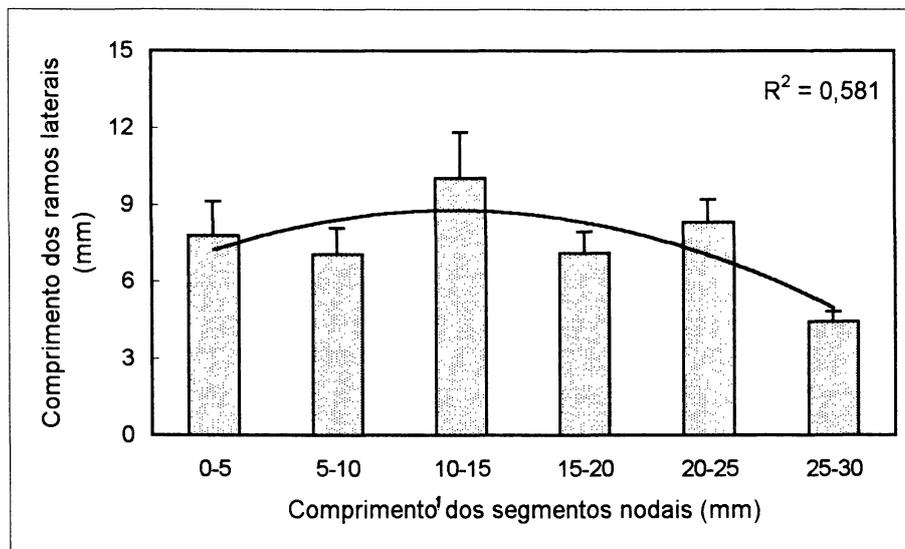


FIGURA 36. Efeito do comprimento do explante inicial (segmento nodal) sobre o comprimento médio dos ramos laterais em partes aéreas do porta-enxerto de macieira Marubakaido crescendo *in vitro*. Equação da reta:  $y = - 0,4034 x^2 + 2,3709 x + 5,275$

## Anexo 2

Médias, desvios padrão e erros padrão associados aos experimentos realizados com o Brassinoesteróide HCTS.

### 28-HCTS

TABELA 1. Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	29,659	5,932	0,2233	0,9519
Erro experimental	130	3453,870	26,568		
Total	135	3483,529			

TABELA 2. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	7,42 <sup>a</sup>	4,80	0,86
0,1	8,08 <sup>a</sup>	4,01	1,16
0,5	8,08 <sup>a</sup>	6,46	1,86
1,0	6,83 <sup>a</sup>	4,59	0,94
5,0	7,84 <sup>a</sup>	6,65	1,19
10,0	6,96 <sup>a</sup>	3,55	0,69

TABELA 3. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	4,119	0,834	0,632	0,6751
Erro experimental	122	159,122	1,304		
Total	127	163,242			

TABELA 4. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	2,29 <sup>a</sup>	1,27	0,23
0,1	2,41 <sup>a</sup>	1,31	0,38
0,5	2,00 <sup>a</sup>	0,96	0,28
1,0	2,05 <sup>a</sup>	1,06	0,22
5,0	2,10 <sup>a</sup>	1,17	0,21
10,0	1,84 <sup>a</sup>	1,01	0,19

TABELA 5. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	5,329	1,065	0,112	0,9894
Erro experimental	130	1230,428	9,464		
Total	135	1235,757			

TABELA 6. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	4,00 <sup>a</sup>	2,44	0,44
0,1	4,50 <sup>a</sup>	2,71	0,78
0,5	4,25 <sup>a</sup>	3,41	0,98
1,0	4,17 <sup>a</sup>	2,93	0,59
5,0	4,19 <sup>a</sup>	4,19	0,75
10,0	3,81 <sup>a</sup>	2,13	0,42

TABELA 7. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	8,815	1,763	0,530	0,7529
Erro experimental	130	432,060	3,323		
Total	135	440,875			

TABELA 8. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	0,87 <sup>a</sup>	1,98	0,35
0,1	1,17 <sup>a</sup>	1,34	0,38
0,5	1,75 <sup>a</sup>	2,30	0,66
1,0	0,87 <sup>a</sup>	1,59	0,32
5,0	1,22 <sup>a</sup>	1,99	0,36
10,0	1,23 <sup>a</sup>	1,53	0,30

TABELA 9. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	1354,903	270,981	2,393	0,0378
Erro experimental	297	33624,767	113,228		
Total	302	34983,670			

TABELA 10. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	23,11 <sup>a</sup>	10,75	1,13
0,1	29,40 <sup>a</sup>	12,19	2,12
0,5	25,55 <sup>a</sup>	15,08	3,08
1,0	24,61 <sup>a</sup>	10,37	1,39
5,0	27,91 <sup>a</sup>	12,26	1,41
10,0	24,84 <sup>a</sup>	11,08	1,39

TABELA 11. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	1983,038	398,608	3,873	0,0018
Erro experimental	841	86114,117	102,395		
Total	846	88097,155			

TABELA 12. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	18,95 <sup>a</sup>	8,89	0,65
0,1	19,46 <sup>a</sup>	9,60	1,01
0,5	18,55 <sup>a</sup>	7,21	0,85
1,0	19,38 <sup>a</sup>	10,59	0,84
5,0	22,67 <sup>a</sup>	12,69	0,94
10,0	18,63 <sup>a</sup>	9,05	0,71

TABELA 13. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	124,663	24,932	0,5169	0,7635
Erro experimental	443	21368,059	48,235		
Total	448	21492,722			

TABELA 14. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 28-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	13,28 <sup>a</sup>	7,62	0,79
0,1	12,57 <sup>a</sup>	6,29	0,89
0,5	14,14 <sup>a</sup>	7,43	0,97
1,0	12,82 <sup>a</sup>	6,16	0,79
5,0	13,07 <sup>a</sup>	7,62	0,70
10,0	14,03 <sup>a</sup>	5,24	0,63

## OH-HCTS

TABELA 15. Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	6,571	1,314	0,83	0,9947
Erro experimental	171	2692,999	15,748		
Total	176	2699,571			

TABELA 16. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	4,68 <sup>a</sup>	3,17	0,57
0,1	4,81 <sup>a</sup>	4,04	0,72
0,5	5,03 <sup>a</sup>	5,04	0,89
1,0	4,48 <sup>a</sup>	3,03	0,58
5,0	5,04 <sup>a</sup>	4,06	0,82
10,0	4,91 <sup>a</sup>	4,00	0,71

TABELA 17. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	2,142	0,428	0,564	0,7273
Erro experimental	171	129,868	0,759		
Total	176	132,011			

TABELA 18. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	1,52 <sup>a</sup>	0,86	0,16
0,1	1,45 <sup>a</sup>	0,72	0,13
0,5	1,31 <sup>a</sup>	1,03	0,18
1,0	1,52 <sup>a</sup>	0,80	0,15
5,0	1,33 <sup>a</sup>	0,76	0,15
10,0	1,63 <sup>a</sup>	0,94	0,67

TABELA 19. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	1,225	0,245	0,038	0,9992
Erro experimental	171	1081,837	6,326		
Total	176	1083,062			

TABELA 20. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	2,55 <sup>a</sup>	2,12	0,38
0,1	2,48 <sup>a</sup>	2,51	0,45
0,5	2,72 <sup>a</sup>	2,71	0,47
1,0	2,52 <sup>a</sup>	2,35	0,45
5,0	2,67 <sup>a</sup>	2,58	0,52
10,0	2,56 <sup>a</sup>	2,72	0,48

TABELA 21. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	7,474	1,494	0,5474	0,7401
Erro experimental	171	466,932	2,730		
Total	176	474,406			

TABELA 22. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	0,61 <sup>a</sup>	1,17	0,21
0,1	0,87 <sup>a</sup>	1,78	0,32
0,5	1,00 <sup>a</sup>	2,52	0,44
1,0	0,44 <sup>a</sup>	1,01	0,19
5,0	1,04 <sup>a</sup>	1,48	0,30
10,0	0,72 <sup>a</sup>	1,32	0,23

TABELA 23. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	657,367	131,473	1,209	0,3040
Erro experimental	358	38911,916	108,693		
Total	363	39569,283			

TABELA 24. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	20,16 <sup>a</sup>	8,69	1,06
0,1	21,34 <sup>a</sup>	10,35	1,32
0,5	19,61 <sup>a</sup>	11,32	1,33
1,0	20,44 <sup>a</sup>	6,93	0,93
5,0	22,56 <sup>a</sup>	14,91	2,17
10,0	23,29 <sup>a</sup>	12,09	1,46

TABELA 25. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	1308,503	261,701	2,887	0,0136
Erro experimental	746	67607,889	90,627		
Total	751	68916,392			

TABELA 26. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	17,29 <sup>a</sup>	8,21	0,71
0,1	17,37 <sup>a</sup>	8,41	0,74
0,5	18,75 <sup>a</sup>	10,88	0,88
1,0	17,28 <sup>a</sup>	7,42	0,69
5,0	18,42 <sup>a</sup>	7,56	0,76
10,0	20,94 <sup>a</sup>	12,42	1,08

TABELA 27. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	655,851	131,170	2,167	0,0572
Erro experimental	364	22030,173	60,522		
Total	369	22686,024			

TABELA 28. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide OH-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	13,28 <sup>a</sup>	6,49	0,90
0,1	13,32 <sup>a</sup>	6,60	0,71
0,5	16,60 <sup>a</sup>	10,87	1,23
1,0	13,00 <sup>a</sup>	5,68	0,88
5,0	13,37 <sup>a</sup>	5,70	0,78
10,0	13,67 <sup>a</sup>	8,24	1,02

## 5F-HCTS

TABELA 29. Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	401,666	80,333	2,447	0,0358
Erro experimental	174	5711,445	32,824		
Total	179	6113,111			

TABELA 30. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média*	Desvio padrão	Erro padrão
0	3,44 <sup>a</sup>	3,87	0,68
0,1	4,09 <sup>a</sup>	3,97	0,71
0,5	7,28 <sup>b</sup>	8,78	1,55
1,0	6,37 <sup>a,b</sup>	7,35	1,41
5,0	3,86 <sup>a</sup>	4,68	0,88
10,0	3,66 <sup>a</sup>	3,64	0,66

\*Letras diferentes mostram pares estatisticamente significativos ( $p=0,05$ )

TABELA 31. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	202,369	40,473	6,763	< 0,0001
Erro experimental	174	1041,291	5,984		
Total	179	1243,661			

TABELA 32. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média*	Desvio padrão	Erro padrão
0	1,91 <sup>a</sup>	2,31	0,41
0,1	1,29 <sup>a</sup>	0,94	0,17
0,5	2,19 <sup>a</sup>	1,67	0,29
1,0	4,70 <sup>b</sup>	4,86	0,93
5,0	1,79 <sup>a</sup>	1,39	0,26
10,0	2,03 <sup>a</sup>	1,83	0,33

\*Letras diferentes mostram pares estatisticamente significativos ( $p=0,05$ )

TABELA 33. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	226,650	44,330	3,758	0,0029
Erro experimental	174	2098,549	12,061		
Total	179	2325,200			

TABELA 34. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média*	Desvio padrão	Erro padrão
0	1,34 <sup>a</sup>	1,73	0,31
0,1	2,52 <sup>a,b</sup>	3,24	0,58
0,5	4,53 <sup>b</sup>	5,86	1,04
1,0	1,63 <sup>a</sup>	2,82	0,54
5,0	1,93 <sup>a</sup>	3,39	0,64
10,0	1,46 <sup>a</sup>	1,91	0,35

\*Letras diferentes mostram pares estatisticamente significativos ( $p=0,05$ )

TABELA 35. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	5,496	1,099	0,987	0,4271
Erro experimental	174	193,748	1,113		
Total	179	199,244			

TABELA 36. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	0,16 <sup>a</sup>	0,57	0,10
0,1	0,35 <sup>a</sup>	0,88	0,16
0,5	0,56 <sup>a</sup>	2,14	0,38
1,0	0,03 <sup>a</sup>	0,19	0,04
5,0	0,14 <sup>a</sup>	0,45	0,08
10,0	0,16 <sup>a</sup>	0,65	0,12

TABELA 37. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	1199,530	239,906	3,029	0,0103
Erro experimental	681	53933,116	79,197		
Total	686	55132,646			

TABELA 38. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g.explante}^{-1}$ )	Média*	Desvio padrão	Erro padrão
0	17,54 <sup>a,b</sup>	9,19	0,91
0,1	16,65 <sup>a,b</sup>	8,75	1,00
0,5	20,06 <sup>a</sup>	10,85	1,03
1,0	18,74 <sup>a,b</sup>	8,53	0,62
5,0	17,79 <sup>a,b</sup>	7,66	0,85
10,0	16,11 <sup>b</sup>	8,11	0,70

\*Letras diferentes mostram pares estatisticamente significativos ( $p=0,05$ )

TABELA 39. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	3070,215	614,043	9,888	< 0,0001
Erro experimental	816	50669,025	62,094		
Total	821	53739,241			

TABELA 40. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média*	Desvio padrão	Erro padrão
0	14,25 <sup>a</sup>	7,94	0,73
0,1	15,32 <sup>a</sup>	7,37	0,57
0,5	18,57 <sup>b</sup>	9,52	0,62
1,0	15,90 <sup>a,b</sup>	7,78	0,86
5,0	14,65 <sup>a</sup>	6,42	0,56
10,0	13,06 <sup>a</sup>	5,99	0,56

\*Letras diferentes mostram pares estatisticamente significativos ( $p=0,05$ )

TABELA 41. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	5	255,008	51,001	1,029	0,4056
Erro experimental	88	4361,417	49,561		
Total	93	4616,425			

TABELA 42. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da dose do brassinoesteróide 5F-HCTS aplicada.

Dose ( $\mu\text{g. explante}^{-1}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	14,83 <sup>a</sup>	7,94	0,73
0,1	12,73 <sup>a</sup>	7,37	0,57
0,5	16,62 <sup>a</sup>	9,52	0,62
1,0	14,75 <sup>a</sup>	7,78	0,86
5,0	16,33 <sup>a</sup>	6,42	0,56
10,0	14,44 <sup>a</sup>	5,99	0,56

## Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)

TABELA 43. Análise de variância para o parâmetro “Taxa de Multiplicação” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	137,268	34,317	5,538	0,0004
Erro experimental	147	910,830	6,196		
Total	151	1048,098			

TABELA 44. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “Taxa de Multiplicação” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	2,13 <sup>a</sup>	1,99	0,36
12,5	3,41 <sup>a</sup>	3,51	0,65
50	2,97 <sup>a</sup>	2,81	0,51
200	2,83 <sup>a</sup>	2,44	0,44

TABELA 45. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	19,774	4,943	5,353	0,0005
Erro experimental	147	135,745	0,923		
Total	151	155,519			

TABELA 46. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos principais maiores ou iguais a 15 mm” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	1,26 <sup>a</sup>	0,99	0,18
12,5	1,48 <sup>a</sup>	1,18	0,22
50	1,30 <sup>a</sup>	0,95	0,17
200	1,30 <sup>a</sup>	0,95	0,17

TABELA 47. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	46,682,	11,671	3,777	0,0059
Erro experimental	147	454,132	3,089		
Total	151	500,815			

TABELA 48. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais primários maiores ou iguais a 15 mm” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	0,81 <sup>a</sup>	1,16	0,21
12,5	1,62 <sup>a</sup>	2,47	0,46
50	1,63 <sup>a</sup>	2,17	0,39
200	1,50 <sup>a</sup>	1,77	0,32

TABELA 49. Análise de variância para o parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	1,861	0,465	2,751	0,0303
Erro experimental	147	24,849	0,169		
Total	151	26,710			

TABELA 50. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “número de ramos laterais secundários maiores ou iguais a 15 mm” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	0,09 <sup>a</sup>	0,39	0,07
12,5	0,31 <sup>a</sup>	0,81	0,15
50	0,03 <sup>a</sup>	0,18	0,03
200	0,03 <sup>a</sup>	0,18	0,03

TABELA 51. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	2637,463	659,366	8,817	< 0,0001
Erro experimental	352	26323,780	74,783		
Total	356	28961,244			

TABELA 52. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos principais (mm)” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	15,13 <sup>a</sup>	8,49	0,94
12,5	18,54 <sup>a</sup>	10,10	1,19
50	17,81 <sup>a</sup>	9,62	1,11
200	18,65 <sup>a</sup>	7,95	1,04

TABELA 53. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	1448,076	362,019	7,065	< 0,0001
Erro experimental	448	22954,070	51,237		
Total	452	24402,146			

TABELA 54. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais primários (mm)” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	11,75 <sup>a</sup>	6,53	0,70
12,5	15,58 <sup>a</sup>	7,91	0,83
50	14,77 <sup>a</sup>	7,29	0,70
200	13,28 <sup>a</sup>	7,71	0,72

TABELA 55. Análise de variância para o parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado médio	Valor de F	Probabilidade
Tratamentos	4	787,595	196,899	8,351	< 0,0001
Erro experimental	51	1202,404	23,577		
Total	55	1990,000			

TABELA 56. Médias, desvios-padrão e erros-padrão associados ao parâmetro “comprimento dos ramos laterais secundários (mm)” em função da concentração do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) utilizada.

[ACC] ( $\mu\text{M}$ )	Média	Desvio padrão	Erro padrão
0	18,60 <sup>a</sup>	7,53	3,37
12,5	15,72 <sup>a</sup>	6,01	1,41
50	9,36 <sup>a</sup>	3,88	1,16
200	9,33 <sup>a</sup>	3,28	0,84