

IARA ALVARENGA MESQUITA PEREIRA

**ÉPOCA DA INDUÇÃO E EVOCAÇÃO FLORAL EM *Citrus* spp E EFEITO
DO GA₃ EM SEU FLORESCIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997**

IARA ALVARENGA MESQUITA PEREIRA

**ÉPOCA DA INDUÇÃO E EVOCAÇÃO FLORAL EM *Citrus* spp E EFEITO
DO GA₃ EM SEU FLORESCIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Pereira, Iara Alvarenga Mesquita

Época da indução e evocação floral em *Citrus* spp e efeito do GA3 em seu
florescimento / Iara Alvarenga Mesquita Pereira. -- Lavras : UFLA, 1997.

xx p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Citrus - Floração - Indução. 2. Gema reprodutiva. 3. Anatomia. 4. Proteína.
5. Acido giberélico. 6. Fruta citrica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.1

-634.3

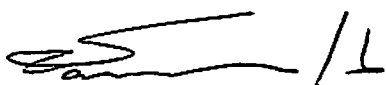
-634.304

IARA ALVARENGA MESQUITA PEREIRA

ÉPOCA DA INDUÇÃO E EVOCAÇÃO FLORAL EM *Citrus* spp E EFEITO DO GA₃ EM SEU FLORESCIMENTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA EM: 24 DE OUTUBRO DE 1997



Pesq. Dr. Sergio Alves de Carvalho



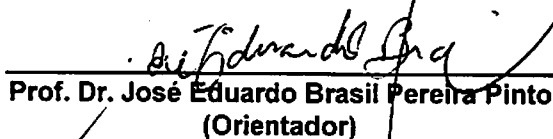
Profª Drª Lisete Chamma Davide



Pesq. Dr. Paulo César Magalhães



Prof. Dr. Mauricio de Souza



Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
(Orientador)

**Ao meu esposo, Sebastião Eduardo Pereira;
meus filhos Ivo e Evaristo Mesquita Pereira;
meus pais e minhas irmãs; presentes ao meu
lado durante esta jornada**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (orientador)

À Profª Drª Lisete Chamma Davide

Ao Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos

Ao Prof. Dr. Eduardo Bearzoti

À Profª Drª Maria das Graças Carvalho Guimarães Vieira

Ao Pesquisador Dr. João Luiz Palma Menegucci

Às amigas Renata Silva Mann e Drª Dulcinéia de Carvalho

Aos acadêmicos José Marcelo Nogueira, Vanessa Balbino, Edilene Carvalho Santos e
Ivan Bedin.

À laboratorista Ana Hortência Fonseca Castro

À Universidade Federal de Lavras - UFLA - MG

BIOGRAFIA DA AUTORA

Iara Alvarenga Mesquita Pereira, filha de José Furtado Mesquita e Maria Alvarenga Mesquita, casada com Sebastião Eduardo Pereira; mãe de Ivo Mesquita Pereira e Evaristo Mesquita Pereira, nasceu em 16 de novembro de 1958.

Em julho de 1981 concluiu o curso de Engenharia Agrônoma pela Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, em Lavras, MG.

Em 1982 ingressou no corpo docente do Instituto Gammon, como professora de Biologia, para 2º grau, permanecendo até dezembro de 1986.

Aprovada em concurso público pela ESAL em fevereiro de 1987, integrou o seu corpo docente pelo Departamento de Biologia, na área de Citologia.

Concluiu o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas em novembro de 1989, pela ESAL.

Iniciou o curso de doutorado em Fitotecnia em março de 1992, pela ESAL, hoje Universidade Federal de Lavras, concluindo o mesmo em outubro de 1997.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Surto primaveril.....	6
2.2 O controle do florescimento e características da planta	7
2.2.1 Morfologia da planta	7
2.2.2 Idade da planta.....	8
2.2.3 Presença do fruto na planta	10
2.2.4 Produção extemporânea	11
2.3 Controle do Florescimento pelo Anelamento.....	11
2.4 O controle do florescimento pela nutrição	12
2.5 Controle do florescimento pela luz	15
2.6 Controle do florescimento pela temperatura.....	16
2.7 Controle do florescimento pelo estresse hídrico.....	17
2.8 O controle do florescimento por reguladores de crescimento	18

2.8.1 Giberelinas	18
2.8.2 Citocininas	20
2.8.3 Auxinas	20
2.8.4 Poliaminas, ácido abscísico, etileno e fenólicos	21
2.9 Anatomia da gema	22
2.9.1 Meristema vegetativo.....	22
2.9.2 Transição para florescimento e meristema reprodutivo.....	24
2.10 Época da indução floral	26
2.11 Eventos citológicos e bioquímicos da indução floral	28
2.12 Controle genético da indução floral	31
2.13 Controle do florescimento é um fenômeno multifatorial.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Avaliações Anatômicas e Bioquímicas	35
3.1.1 Avaliação anatômica	36
3.1.2 Análise bioquímica	37
3.2 Análise Fisiológica com Aplicação de GA ₃	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Anatomia da gema	43
4.1.1 Características dos ramos vegetativos.....	43
4.1.2 Gema vegetativa	46
4.1.3 Transição para o florescimento	46
4.2 Análise bioquímica	58
4.2.1: Proteína total	58
4.2.2 Isoenzimas	61
4.3 Influência do GA ₃ na floração da Laranja Lima-sorocaba	64
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1	Resumo da análise de variância para diâmetro das gemas (micromêtros), de laranjeiras 'Pera Rio', para os anos 1993 e 1994, em diferentes datas do ano e desdobramento da interação Ano × Época. Lavras, UFLA, 1997.....52
2	Resumo da análise de variância para diâmetro das gemas (micromêtros), de tangerineiras 'Ponkam', para os anos 1993 e 1994, em diferentes épocas do ano e desdobramento da interação Ano × Época. Lavras, UFLA, 1997.....53
3	Valores para A, B, C, D, referentes à equação não linear ajustada para o comportamento dos diâmetros das gemas para os anos 1993 e 1994, em diferentes datas do ano. Lavras, UFLA, 1997.....55
4	Teores protéicos médios em µg/µl de 11 avaliações de gemas axilares de laranjeiras 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan', para os anos de 1993 e 1994, segundo a metodologia de Bradford (1996). Lavras, UFLA, 1997.....58
5	Atividades enzimáticas em laranjeiras 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan', nas épocas: 1 - (26/06/97); 2 - (04/07/97) e 3 - (07/07/97). Dados em nanomoles/minuto/grama de amostra. Lavras, UFLA, 1997.....64

- 6 Resumo da análise de variância para efeito da aplicação do GA₃ na floração de laranjeiras 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.65
- 7 Resumo da análise de variância para ajuste de uma equação de regressão para efeito da aplicação do GA₃ na floração da laranjeira 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.66
- 8 Médias do número de flores das dosagens de GA₃, dentro do 1º e 2º surtos de floração da laranja 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 Diagrama de uma inflorescência em ramo de crescimento determinado - simpodial - mostrando as posições das flores numeradas basipetamente. A numeração também diz respeito à ordem de abertura das flores. (Lord e Eckard, 1985). Lavras, UFLA, 1997.....	9
2 Diagrama da zonação citohistológica nos ápices vegetativos, segundo Fahn (1990).....	24
3 Secção longitudinal de uma gema lateral de laranjeira 'Pera Rio' onde: F-folha; C-caule; B-bráctea; E-rudimento de espinho; PF-primórdio foliar; G-gema. Lavras, UFLA, 1997.	44
4 Corte longitudinal de gema axilar de laranjeira 'Pera Rio' em ramo vegetativo. a - detalhe do espinho. b - em outro plano, na mesma axila detalhe da gema vegetativa coletada em 03/08/94. A= 32X. Lavras, UFLA, 1997.	45

- 5A Sequência dos eventos anatômicos da evocação e morfogênese floral, em laranjeira 'Pera Rio'. a) Gema vegetativa onde são observadas túnica e corpo, com formato cônico (31/05/94); b) evocação floral, com as setas mostrando áreas com de concentração de RNA (01/07/94); c) início da emissão das sépalas (setas) (01/07/94); d) primórdios de sépalas, sem observação da zonação vista em a. (13/07/94) A = 200 X. Lavras, UFLA, 1997.47
- 5B Sequência dos eventos anatômicos da evocação e morfogênese floral, em laranjeira 'Pera Rio'. e) Gema floral em início de emissão de pétalas S (sépalas) e p (pétalas); 03/08/94; f) gemas apical e subapical em diferentes estágios de desenvolvimento indicadas pelas setas. (03/08/94) A = 200X. Lavras, UFLA, 1997.48
- 6 a) Sequência dos eventos anatômicos da evocação e morfogênese floral, em tangerina 'Ponkan'. Gema vegetativa, com formato cônico, observando-se a túnica e corpo (31/05/94); b) Evocação floral com as setas indicando as regiões de maior concentração de RNA (13/07/94); c) Gemas apical e sub-apical em diferentes estágios de desenvolvimento, mostradas pelas setas (18/07/94); d) Emissão dos primórdios de sépalas (S) sem a zonação típica vista em a(18/07/94). A = 200 X. Lavras, UFLA, 1997.49
- 7 Secção longitudinal de uma gema do ápice baseada em corte histológicos de laranjeira 'Pera Rio' em estágio de quebra de dormência (início da morfogênese floral) B-brácteas; F-primórdio foliar; S-iniciação de uma sépala. Lavras, UFLA, 1997.50
- 8 Comportamento do diâmetro das gemas da laranjeira 'Pera Rio' durante a evocação e morfogênese floral, nos anos de 1993 e 1994. Lavras, UFLA, 1997.54

- 9 Comportamento do diâmetro das gemas da tangerineira 'Ponkan' durante a evocação e morfogênese floral, nos anos de 1993 e 1994. Lavra, UFLA, 1997.55
- 10 Padrão eletroforético de proteína total; A - laranja 'Pera Rio'; B - tangerina 'Ponkan', no ano de 1994. Da esquerda para a direita: 1 - Padrão protéico; 2 - 19/05; 3 - 31/05; 4 - 15/06; 5 - 24/06; 6 - 01/07; 7 - 08/07; 8 - 13/07; 9 - 18/07; 10 - 27/07; 11 - 03/08 ; 12 - 09/08.60
- 11 Dados médios, relativos aos últimos 30 anos e de 1997, de temperatura e chuva total, na região de Lavras (clima Cwb - classificação de Koppen) Minas Gerais.62
- 12 Padrões isoenzimáticos de gemas axiliares de laranjeira 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan', em 3 diferentes datas do ano de 1997 (26/06; 04/07 e 07/07). A espessura e tonalidade das bandas indicam intensidade relativa. Lavra, UFLA, 1997.63
- 13 Efeito da aplicação do GA₃ na redução florada da laranjeira 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.67
- 14 A - Moldura de 1 m² utilizada para procedimento de contagem de flores. B - Planta testemunha em relação à aplicação de GA₃ (0 ppm). Lavras, UFLA, 1997.68
- 15 Efeito das diferentes concentrações de GA₃ sobre a florada da laranja 'Lima Sorocaba'. A - 10 ppm; B - 20 ppm; C - 40 ppm; D - 120 ppm. Lavras, UFLA, 1997.69

RESUMO

PEREIRA, Iara Alvarenga Mesquita. **Época da indução e evocação floral em *Citrus* spp e efeito do GA₃ em seu florescimento.** Lavras: UFLA, 1997. 78p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

Este trabalho visou determinar a época da indução e evocação floral na laranjeira 'Pera Rio' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e tangerineira 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) no município de Lavras, sul de Minas Gerais. Para tal, efetuou-se estudo anatômico nos meristemas apical e axilar e análise histoquímica enzimática (eletroforética e colorimétrica). Coletou-se estacas de brotações novas em diferentes datas entre os meses de maio e agosto, das quais retirou-se os meristemas, que para o estudo anatômico serviram para cortes longitudinais, corados com pironina-y-metilgreen. Esta coloração diferenciou o meristema induzido do vegetativo, pela maior intensidade na cor em regiões da túnica e corpo com maior concentração de RNA. Os resultados mostraram que, para as duas espécies estudadas, a indução ocorre no

* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Sergio Alves de Carvalho, Lisete Chamma Davide, Paulo Cesar Magalhães e Maurício de Souza.

início do inverno (final do mês de junho a início do mês de julho) apresentando forte interação com condições climáticas, principalmente temperatura e chuvas. A histoquímica rastreou com géis de poliacrilamida e teste de BRADFORD, o teor de proteínas, sem terem sido encontradas diferenças significativas entre as amostras, para as diferentes épocas de coletas no campo. A análise de enzimas foi feita através de géis de poliacrilamida nos quais procedeu-se a coloração para duas enzimas respiratórias, a malato desidrogenase (MDH) e fosfoglicoisomerase (PGI). Não se conseguiu bandas diferenciadoras devido ao estresse hídrico atípico ocorrido em fevereiro e março, antecipando em mais de um mês a indução floral. Nas datas coletadas; 26/06 a 07/07, não se observou vegetativo nas gemas; todas estavam induzidas e evocadas a florescerem. Através de análise colorimétrica, confirmou-se a situação encontrada nas plantas cítricas, quanto ao estágio de floração adiantado. As enzimas pesquisadas integram 2 processos bastante requisitados na indução floral; a respiração (Succinato desidrogenase-SUDH) e a Rota da Pentose Fosfato (Glicose 6 - Fosfato desidrogenase - Glicose - P - DH). As atividades enzimáticas não foram diferenciadoras no decorrer do tempo, resultados estes coerentes com a situação climática observada em 1997 e com gemas já induzidas. De todos os fatores influenciadores da floração, a regularidade de chuvas foi a mais participativa, podendo ser um parâmetro facilmente monitorável pelo citricultor como ferramenta para se acompanhar a dinâmica da indução e evocação floral. Também pesquisou-se o efeito do GA₃ na floração da laranjeira 'Lima Sorocaba' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. O aumento da dosagem provocou queda linear e progressiva na floração com dosagem

de 10, 20, 40 e 120 ppm. O emprego do GA₃ mostrou ser uma prática bastante efetiva, objetivando redução na floração para controle da taxa de vingamento floral.

ABSTRACT

THE FLOWERING INDUCTION PERIOD AND THE FLOWERING EVOCATION PERIOD IN *CITRUS* ssp, AND GA₃ EFFECT IN ITS FLOWERING

This work aimed to determine the flowering induction period and the flower evocation period in orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio] and tangerine trees cv Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) in Lavras, south of Minas Gerais. Anatomic studies, histochemical and enzymatic analyses were performed in the apical and lateral meristems. Young apical shoot tips and lateral shoots were collected in different periods (from May to August) from which meristems were excised. For the anatomic studies these tissues were longitudinally cut and stained with pironina-y-metilgreen, that is specific for RNA detection. These RNA molecules showed increasing concentration in regions of induced meristems. The results showed that for both cultivars studied the flowering induction occurred at the beginning of winter season (end of June to the beginning of July). These characteristics were strongly correlated with environmental conditions, mainly with the temperatures and rainfall. The protein content was determined by polyacrilamide gel electrophoresis and BRADFORD assay

showing no significant differences between the data when field samples were collected. The studies of enzymes as a tool to follow this phenomena showed to be very effective. Since respiration is the first cell phenomena that changes after flowering induction, two respiratory enzymes (malate desidrogenase - MDH and fosfogluocosomerase - PGI) were analysed by poliacrilamide gel electrophoresis. No differences in this protein profiles were observed possibly due to a water stress that occurred in 1997 (during February and March - atipic for this months), the flowering induction was anticipated approximately in one month. All buds collected (fron 06.26.97 to 07.07.97) were already induced showing no vegetative state. The colorimetric studies confirmed the results observed from the electrophoretical analysis. The two enzymes studied play an important role in two crucial processes for flowering induction: the respiration (Succinate desidrogenase - SUDH) and pentose phosphate pathway (Glucose 6 - phosphate desidrogenase - Glucose - P - DH). The enzymatic activity of this enzymes did not differ in time as expected since the buds were already induced by the water stress in 1997. The effect of GA3 in the flowering process of orange cv. Lima Sorocaba [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] was also investigated. The increasing doses of GA3 from 10, 20, 40 and 120 ppm caused a linear and progressive decrease in the flowering index.

1 INTRODUÇÃO

O florescimento é importante. Não somente para dar continuidade à propagação das espécies vegetais mas também para a vida humana que depende totalmente dos produtos da reprodução sexuada para sua alimentação. Sementes e frutos são consumidos diretamente ou provêm material para manuseio como ingredientes para outros alimentos. Do ponto de vista não utilitário, as flores adornam e aumentam com sua beleza e variedade, nosso cotidiano (Jordan, 1993).

A compreensão do que determina o modo de florescimento das plantas é o "pivot" para a produção na agricultura sendo, portanto de considerável importância econômica. Do ângulo biológico, é um problema, intrinsecamente complexo, ainda com várias questões a serem elucidadas (Jordan, 1993).

Neste contexto, as frutíferas devem ser destacadas, uma vez que participam, em percentual elevado, da alimentação e enriquecimento da humanidade, ressaltando-se para nós brasileiros, o importante papel dos cítricos, em nossa mesa.

Um fator essencial em um pomar comercial é a obtenção de máximo retorno com o mínimo de dispêndio e isto, só é possível se produções regulares e adequadas forem obtidas anualmente (Randhawa e Dinsa, 1947).

O Brasil, ocupa a posição de 1º produtor mundial de frutas (Faria, 1997); estando com cerca de 200 milhões de plantas em campo, sendo o maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado, com 32% da safra mundial (Panorama..., 1996).

Além disto, estima-se que o brasileiro consome 1,2 bilhões de litro/ano de suco de laranja; porém em 1994, as vendas de suco pronto atingiram 3,9 bilhões de litro (Aumenta..., 1995).

O florescimento é a primeira etapa do processo de frutificação e, em certas ocasiões, determina de modo decisivo a quantidade e a qualidade da colheita.

É possível obter-se uma melhoria na qualidade da produção mediante a manipulação do florescimento, corrigindo-se ou pelo menos, amenizando-se algumas situações que se apresentam no cultivo dos cítricos, tais como pequena produção de frutos (Guardiola, 1992), alternância de colheitas (Erner, 1992; Godschimidt e Golomb, 1982), produção de frutos em florações extemporâneas (Marinho, 1994) e o tamanho diminuto ou excessivo do fruto (Guardiola, 1992).

A indução floral tem lugar nos cítricos em resposta a um período de baixas temperaturas (Jordan, 1993; Southwick e Davenport, 1986) e estresse hídrico (Jordan, 1993; Marinho, 1994; Melzer, Majeswski e Apel, 1990; Southwick e Davenport, 1986; Zeevaart, 1976) e por sua vez está marcadamente condicionada à fatores internos da árvore, determinando os ciclos de brotação e florescimento. Nos climas

subtropicais, o florescimento apresenta um período muito definido, determinado pelas baixas temperaturas durante o inverno. Em outras condições climáticas e nos climas subtropicais durante o verão, a brotação de flores é determinada pelos períodos de estresse hídrico (Southwick e Davenport, 1986).

A níveis baixos de florescimento a produção aumenta com o número de flores, enquanto que acima de um certo nível, o número pode resultar em prejuízo para o citricultor (Guardiola, 1992).

Um incremento no número de flores aumenta a competição para metabólitos durante o pegamento, processo este, muito sensível à situações de estresse nutricional (Lewis; Coggins e Hield, 1963). Além disso, o aumento no número de flores provoca uma redução no tamanho das mesmas; essas flores são de qualidade inferior e respondem com mais dificuldades ao pegamento, ou acabam produzindo frutos de tamanho reduzido. Mas não é só isto, a interferência do fruto na indução floral provoca um florescimento escasso no ano seguinte, reduzindo a colheita, estabelecendo-se o ciclo de alternância de produção (Erner, 1992; Goldschmidt e Golomb, 1982).

Essa situação de improdutividade pode ser reduzida, com operações culturais como poda, anelamento, irrigação, aplicação de fitorreguladores, que para maior eficiência, devem ser efetuadas no seu tempo adequado, antes das gemas florais diferenciarem-se. O momento mais apropriado para tais tratamentos culturais é o que antecede a indução e evocação floral, devido à uma maior sensibilidade das gemas vegetativas (Randhawa e Dinsa, 1947).

Considerando esta maior sensibilidade das gemas vegetativas neste período, depara-se, portanto, com uma questão: Em qual período do ano as plantas de citros são induzidas a diferenciarem suas gemas vegetativas em reprodutivas?

O objetivo principal deste trabalho foi identificar o período durante o qual as gemas vegetativas das laranjeiras 'Pera Rio' e tangerineiras 'Ponkan' são induzidas a diferenciarem-se em gemas reprodutivas. Também procurou-se constatar o efeito da aplicação do GA₃ como redutor de floração, da laranjeira 'Lima Sorocaba', na região de Lavras, MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A maioria das plantas usa sinais do meio para regularem a transição da fase vegetativa para a reprodutiva, que completam a reprodução sexual sob condições extremas favoráveis. Alguns fatores que exibem mudanças sazonais regulares, controlam o florescimento, sendo os mais importantes: fotoperíodo, temperatura e água (Bernier, 1988). Plantas que não requerem um fotoperíodo particular ou temperatura, apresentam florescimento autônomo, mas são sensíveis à irradiância, normalmente. Existem fortes interações entre estes fatores, sendo que cada um deles pode mudar o nível de interferência segundo a efetividade de outro/ As plantas sendo oportunistas, farão uso de diferentes fatores críticos em diferentes ambientes. Devido a estes diferentes fatores serem receptados por diferentes partes da planta, conclui-se que estas partes se interagem e que o destino do meristema apical do caule - permanecendo vegetativo ou tornando seja reprodutivo - é controlado por um conjunto de sinais à longa distância vindos de toda parte da planta (Bernier, 1988, Bernier et al., 1993).

A laranja 'Pera Rio' é considerada a cultivar cítrica de maior importância no país, onde é cultivada tanto para mesa como para a produção das diferentes modalidades de suco concentrado, obtendo boa valorização, pelas propriedades físicas e químicas de seus frutos (Donadio, Figueiredo e Pio, 1995). Dentre as tangerinas destaca-se a 'Ponkan' que também apresenta relevante valor na mesa do brasileiro. Entretanto, como várias frutíferas, as plantas cítricas apresentam problemas de considerável relevância para a produtividade, como é o caso do florescimento, fenômeno para o qual tenta-se um controle e manuseio, porém muito ainda existe a elucidar-se.

O florescimento é o resultado final de processos fisiológicos, seqüências bioquímicas e da ação gênica, com todo o complexo respondendo aos estímulos do ambiente e os efeitos do tempo (Murfet, 1977).

2.1 Surto primaveril

As plantas cítricas apresentam normalmente de dois a cinco surtos de crescimento anuais (Juan, 1960; Gallo et al., 1960; Jones e Parker, 1951, Ogata, 1980; Rodrigues, 1980 e Souza, 1979).

O surto que se inicia em meados de julho a meados de agosto é denominado de surto primaveril, podendo se dar em setembro (Rodrigues, 1980). Esses surtos apresentam estágios (início, pico e final). Sabe-se ainda que o surto primaveril é o mais importante e intenso (Cameron et al., 1952 e Ogata, 1980; Smith e

Reuther, 1950;) De dezembro a março outros surtos ocorrem na maioria das cultivares, ditos surtos de verão.

Em Minas Gerais, o início do surto primaveril se dá de meados de julho a meados de agosto, com pico em setembro (Andrade, 1984; Ogata, 1980; Ramalho Sobrinho, 1986 e Rodrigues, 1980), apresentando uma amplitude de variação de 3 meses, no hemisfério sul (Ramalho Sobrinho, 1986).

Nas culturas cítricas, o surto primaveril depende de fatores climáticos (Amaral, 1977 e Moreira, 1985) e fundamentalmente, da espécie e cultivar (Amaral, 1977; Guardiola, 1977 e Figueiredo, 1980) apresentando uma duração de 41 dias aproximadamente (Amaral, 1977).

O lançamento do surto, que torna-se visível a olho nu nas gemas, dá-se depois da diferenciação a nível de meristemas das brotações terminais. Não há referência quanto ao tempo decorrido entre o início da diferenciação e o aparecimento de novo lançamento. Portanto, variações endógenas e exógenas tornam-se visíveis após a ocorrência da diferenciação intracelular (Erickson, 1968).

2.2 O controle do florescimento e características da planta

2.2.1 Morfologia da planta

As plantas se preparam para florescer. Algumas mudanças são observadas na transição floral: em *Chenopodium* sp., *Perilla* sp. e *Xanthium* sp. ocorre aumento na alongação dos últimos internos lançados, forte redução no crescimento

foliar, mudança na forma foliar sendo as últimas folhas emitidas menores com simplificação do formato. Em maçã, como em outras espécies, ocorre um aumento do número de folhas iniciadas devido à particularidades na emissão dessas flores (Bernier, Kinet e Sachs, 1981).

O florescimento dos citros só se dá em ramos devidamente preparados pela planta. Significa que os ramos têm uma idade ou um desenvolvimento que permitiram mudanças internas predisponentes dos primórdios. Os ramos que nascem de fevereiro a abril estão preparados para as flores primaveris. Os ramos de outubro dão flores de fevereiro a abril e os de dezembro, dão flores em maio. Uma planta com carga excessiva de frutos não produz ramos vegetativos e com isto, não terá flores. (Souza, 1997)*

Em citros, em ramos de crescimento determinado, uma vez que seu crescimento é simpodial, existe uma correlação positiva entre comprimento do ramo emitido e o florescimento. Portanto ramos mais longos terão maior chance de emissão de maior número de flores (Figura 1). Algumas características de ramos reprodutivos em citros foram dectadas: menor área foliar, menor número de nós, poucos espinhos ou ausentes e ramificação frequente (Lord e Eckard, 1987).

2.2.2 Idade da planta

As plantas passam por uma fase de insensibilidade aos fatores que promovem o florescimento, chamado de juvenilidade, precisando portanto, o meristema

* Souza, M. (Comunicação pessoal) UFLA, Departamento de Agricultura.

estar competente para responder aos sinais evocativos (Bernier, Kinet e Sachs, 1981). O período juvenil ocorre normalmente em plantas perenes, nas quais a capacidade para florescer vem acompanhada de mudanças em características morfofisiológicas como largura e espessura da folha, filotaxia, conteúdo de pigmentos e capacidade de enraizamento (Bernier, 1988).



FIGURA 1: Diagrama de uma inflorescência em ramo de crescimento determinado - simpodial - mostrando as posições das flores numeradas basipetamente. A numeração também diz respeito à ordem de abertura das flores. (Lord e Eckard, 1985). Lavras, UFLA, 1997.

2.2.3 Presença do fruto na planta

A presença do fruto na planta é um forte inibidor do florescimento em citros, equivalendo-se ao efeito da aplicação de um fitorregular inibidor de florescimento (Furr e Armstrong, 1956; Garcia-Luiz et al., 1986; Erner, 1992).

A época de maturação do fruto coincide com a dormência das gemas, até a floração, com fruto e flor coexistindo na planta (Villafañe, Munoz e Torres, 1989).

Por consequência atribui-se esta inibição à maior drenagem de carboidratos pelo fruto e também a produção do GA_3 pelo mesmo acarretando um atraso no florescimento, que ocorre no início de setembro, sem frutos, e final de setembro com frutos na planta. Quanto mais cedo o fruto for removido, maior floração no ciclo seguinte. Porém, deve ser enfatizado que a época de remoção do fruto na planta é importante uma vez que quando efetuada, após as gemas terem diferenciado-se (final do inverno, início da primavera) a redução na floração é bem menor (Garcia-Luis et al., 1986; Lewis, Coggins e Hield, 1963). Atribui-se o efeito inibidor da floração bem mais à produção de fitohormônios inibidores do que à drenagem de fotoassimilados uma vez que esta inibição é bem maior em período no qual o fruto não acumula mais carboidratos. (Garcia-Luis et al., 1986).

Plantas que exibem grande produção de frutos terão redução no teor de carboidratos, hormônios e balanço mineral acarretando não floração nestes ramos ou pouca conversão de flor em fruto na safra seguinte (Erner, 1992; Marinho, 1994).

2.2.4 Produção extemporânea

Uma técnica que apresenta grande potencial é a produção de frutos fora da safra normal, obtendo-se o florescimento no verão, com remoção das flores da primavera (Marinho, 1994). Os ramos são emitidos no verão anterior, apresentando gemas maduras mas não diferenciadas, que florescerão no verão seguinte. Quanto menor for a produção na época normal, com desbaste, maior será a produção extemporânea, que não coincidirá com o período da emissão dos brotos.

2.3 Controle do Florescimento pelo Anelamento

O anelamento aumenta o florescimento em citros '*Satsuma Mandarin*'. Seu efeito é dependente da época em que é efetuado, aumentando significativamente o florescimento, quando procedido no final do verão a início do outono, quando efetuado no início do inverno, não afeta o florescimento (Agusti, Almela e Pons, 1992; Iwahori et al., 1990). Atribui-se à este período do final de verão à maior sensibilidade da planta a estímulos externos e endógenos. O anelamento afeta o acúmulo de carboidratos e outros metabólitos, cessa a alongação do caule e aumenta o acúmulo de proteínas, aumentando o número de inflorescências em árvores com grande produção anterior. Aumentos na produção de 70% tem sido relatados por Agusti, Almela e Pons, (1992).

2.4 O controle do florescimento pela nutrição

Na transição para o florescimento ocorre aumento no suprimento de carboidratos nas gemas vegetativas, pelo aumento da atividade fotossintética e hidrólise do amido. A sacarose é o açúcar de maior quantidade encontrados no exudatos de folhas e gemas (Bodson e Outlaw, 1980; Bernier, 1988; Bernier et al., 1993; Lejeune et al., 1993). Estes resultados foram encontrados para *Sinapis alba* L. mas são concordantes com aqueles encontrados para citros por Erner (1992). Como resultado da indução, a sacarose é acumulada muito precocemente no meristema apical, precedendo o processo de fornecimento de energia e deste modo, a ativação mitótica (Bernier, Kinét e Sachs, 1981; Bernier, 1988; Bernier et al., 1993; Zeevaart, 1976). Esses autores também constataram que pode não ocorrer aumento na fotossíntese e somente mobilização de reservas.

Mutantes para mobilização do amido provocaram florescimento tardio e quando colocado em baixa temperatura não influenciaram esta mobilização levando-se à conclusão que são fatores que pertencem a rotas diferentes (Bernier et al., 1993). Resultados divergentes foram encontrados por Casper et al. (1991) que relatam que mutantes deficientes em amido em *Arabidopsis*, tem crescimento normal.

Árvores com intenso crescimento vegetativo não florescem. Lewis, Coggins e Hield (1963) observaram que tratamentos que interrompem o crescimento vegetativo, em citros, como poda, seca e anelamento, promovem o florescimento. Essas condições favorecem o aumento na fixação de carbono, portanto, aumento na concentração de carboidratos nas folhas, com elevação da relação C/N. Porém, tem

sido constatado que esta relação é insuficiente para promover o florescimento, em plantas com grande influência ambiental. Algumas Plantas tem florescido com relação C/N baixa (Abdalla et al., 1986; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier et al., 1993; Zeevaart e Gage, 1993;). Os últimos autores encontraram, na abertura floral, valores elevados para, N, P e K, que somente declinaram na abscisão das peças florais.

Já em plantas fotoperiódicas, com baixo suprimento de nitrogênio e alto de sacarose, ocorreu 100% de florescimento (Bernier, Kinet e Sachs, 1981).

O meristema em condições vegetativas é pobre em nutrientes e para seu desenvolvimento em flor faz-se necessário elevação dessa concentração que é possível com o estresse hídrico, anelamento do tronco e ramos.

O aumento na concentração de sacarose se dá no início, antes de qualquer alteração morfológica, promovendo um aumento no potencial osmótico para sucessiva alongação (Barros e Rodrigues, 1992; Bodson e Outlaw, 1985), suprindo substrato para respiração, pela maior demanda de ATP (Bodson e Outlaw, 1985; Zeevaart, 1976). Neste contexto, mecanismos de hidrólise do amido são importantes como determinantes da eficiência respiratória na indução floral (Casper; Huber e Somerville, 1985; Casper et al., 1991; Lejeune et al., 1993).

Em pomares cítricos com baixa produção de frutos, o amido concentrou-se nas raízes. Nos períodos de maior produção, ocorreu a drenagem dos fotoassimilados para o desenvolvimento do fruto. Mecanismos do tipo "feedback" têm explicado a regulação da fotossíntese e portanto, a produção alternada. A elevação na taxa de assimilados promove maior floração e frutificação com elevação, por consequência, na fotossíntese. No ano seguinte, com poucas reservas fotoassimiladas

e baixa floração, ocorrendo pequeno estímulo à fotossíntese (Erner, 1992; Goldschmidt e Golomb, 1982; Sanz et al., 1987).

Jones e Parker (1951) e Lewis, Coggin e Hield (1963) analisaram folhas de árvores de citros com alta produção e constataram baixo teor de carboidratos e nitrogênio. Aplicação de ácido naftalenoacético (ANA) aumentou de 3 para 9 caixas de frutos/árvore. Houve correlação positiva entre amido e ANA. Os autores deduziram existir um mecanismo regulador do fruto, no controle hormonal. Em ausência do fruto ocorre um balanço favorável para reguladores de crescimento naturais.

A presença do amido não se faz obrigatória uma vez que mutantes deficientes de *Arabidopsis thaliana* L. tiveram comportamento normal no crescimento e floração (Casper et al., 1991).

Em soja, flutuações diurnas para sacarose fosfato sintase e frutose 1,6 bisfosfatase mostram a existência de um relógio interno, em relação a períodos de luz e escuro, com esgotamento do amido e sacarose no final do último. (Cheikh e Brener, 1992; Cheikh et al., 1992). Em citros, folhas velhas acumulam carboidratos até florescimento, com redução após antese. O maior pico para açúcares solúveis e amido foi entre brotamento e antese (Sanz et al., 1987).

O cálcio, em altas concentrações, é outra substância requerida, como mensageiro secundário, nas divisões celulares, em plantas induzidas (Amaral, 1995; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier et al., 1993; Thompson e White, 1991; Jordan, 1993). Também é o mensageiro que se liga à proteínas induzindo à mudanças conformacionais que podem por sua vez ativar proteinoquinases ao mesmo tempo ativando cálcio-ATPases, bombeando para fora o cálcio necessário para a formação

das paredes celulares nas células que se formam na evocação floral (Havelange e Bernier, 1993). Em *Sinapis alba* o pico de aumento do cálcio coincidiu com o pico de aumento mitótico, em plantas induzidas (Havelange e Bernier, 1993). O cálcio também quando aplicado na forma de nitrato de cálcio, em laranjeiras, mostrou efeito significativo na redução do abortamento floral, aumentando, a produção de frutos (Amaral, 1995). A concentração dos cátions K^+ e Mg^+ não aumenta nas gemas induzidas (Andrade, 1984).

Dos micronutrientes, o cobre mostrou-se efetivo na indução, quando quelado, em plantas fotoperiódicas (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Jordan, 1993).

2.5 Controle do florescimento pela luz

Plantas fotoperiódicas, em condições favoráveis de luz apresentam uma mudança abrupta no comportamento, florescendo. O comprimento de dia crítico pode ser alterado por condições ambientais. Conforme diversos autores, a luz é recebida nas folhas em plantas fotoperiódicas, (Bernier, 1988; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Havelange e Bernier, 1991; Jordan, 1993; Moses e Chua, 1988; Zeevaart, 1976; Zeevaart e Gage, 1993) porém, em experimentos, algumas espécies floresceram em total falta delas, levando a dedução de que não somente as folhas são importantes na recepção da luz. O requerimento do comprimento do dia atua em interação com baixas temperaturas, podendo a segunda suprimir o requerimento de luz para a fotoindução (Bernier, 1988). As espécies de citros são dia neutro (Lord e Eckard, 1987), portanto com controle endógeno determinando se a gema será vegetativa ou reprodutiva, sendo

controlado principalmente pelos níveis dos GA_s (giberelinas); porém de modo bem mais complexo que herbáceas anuais fotoperiódicas (Salisbury e Ross, 1991). São consideradas também de florescimento autônomo, ficando susceptíveis à controles externos como nível de irradiância, temperatura, água (Bernier, 1988).

2.6 Controle do florescimento pela temperatura

Plantas que são promovidas ou induzidas a florescerem por tratamentos com baixas temperaturas denominados vernalização (Jordan, 1993) requerem células passando por mitoses. As alterações induzidas pela vernalização referem-se à modificações no DNA, como metilações e demetilações de citosina (Bernier, Kinet e Sachs, 1981).

O período necessário de baixas temperaturas vai de 1 a 3 meses para plantas anuais, bianuais e perenes, sendo um processo quantitativo ou seja, com o aumento do número de dias em baixa temperatura, menor o número de dias para o florescimento (Southwick e Davenport, 1986; Martinez-Zapater e Somerville, 1990; Khatibu et al., 1985).

Gemas e primórdios foliares são os receptores para a baixa temperatura (Bernier; Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988; Hazebroek e Metzger, 1990; Zeevaart, 1976). Entretanto, as plantas podem florescer sem meristemas apicais em condições de baixas temperaturas, mostrando que esta também é recebida em outras partes da planta (Jordan, 1993). O mesmo autor atribuiu o efeito da baixa temperatura nas membranas biológicas onde atua aumentando o grau de insaturação dos ácidos

graxos, favorecendo uma maior fluidez da mesma, afetando de maneira benéfica seus receptores protéicos.

A baixa temperatura pode interagir com alta temperatura, levando à desvernalização, sendo no entanto, um processo reversível. Interage também com luz, diminuindo ou aumentando a quantidade requerida desta última ou até suprimindo (Bernier; Kinet e Sachs, 1981; Martinez-Zapater e Somerville, 1990; Zeevaart, 1976).

Hazebroek e Metzger (1990), rastreando o efeito das baixas temperaturas nos fitohormônios em *Thlaspi arvensi* L. (crucífera), mostram que a conversão do KA (ácido ent-kaurenóico), um precursor das giberelinas, em GA é regulada por uma rota específica em plantas termoinduzidas, levando à alterações quantitativas e qualitativas no caule, e não nas folhas. Também constatou que a concentração do KA é bem maior em plantas não termoinduzidas (tratamento com altas temperaturas). As baixas temperaturas também interagem com GA, sendo que mutantes de *Arabidopsis thaliana*, insensíveis a ele florescem nessas condições (Wilson, Heckman e Somerville, 1992).

Em cítricos, Garcia-Luis et al. (1992) demonstraram que o tratamento com baixas temperaturas parece ter dupla função: quebra da dormência das gemas e indução do florescimento.

2.7 Controle do florescimento pelo estresse hídrico

O estresse modifica o balanço entre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo promovendo o florescimento (Khatibu et al., 1985; Jordan, 1993; Nir, Gorden e Leshem, 1972). Quando o suprimento de água foi mantido em capacidade de

campo, com luz e temperatura adequados, plantas de limão 'Eureka' não floresceram, de acordo com os primeiros autores citados acima.

Tem sido constatado que a diferenciação do meristema é particularmente vulnerável ao estresse de água (Jordan, 1993; Khatibu et al., 1985; Nir, Goren e Leshem, 1972; Southwick e Davenport, 1987; Zeevaart, 1976) aumentando a concentração de amônia na planta, precedendo a biossíntese do etileno, com consequente diferenciação floral.

Plantas de lima ácida 'Thaiti' foram induzidas à floração em experimento com estresse hídrico (Southwick e Davenport, 1986). Essas plantas foram testadas com tratamentos inibidores observando-se que a presença do fruto no ramo foi um caráter inibitório, bem como a aplicação do GA₃ a 10⁻³M, que inibiu a expressão floral nas árvores estressadas.

2.8 O controle do florescimento por reguladores de crescimento

2.8.1 Giberelinas

As giberelinas (GAs) inibem o florescimento em tomate, maçã e citros (Barros e Rodrigues, 1992; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988; Bommineni e Greyson, 1990; Garcia-Luis et al., 1986; Monselise e Halevy, 1964;), reduzindo o número de flores e frutos/ramo. Goldschmidt e Monselise (1972), reportam que a inibição de frações de RNA ou de sua proteína resultante pode ser responsável pela inibição do florescimento. Pharis et al., (1987) relatam mudanças quantitativas e

qualitativas muito rápidas, em tratamento indutivo, em vários tipos de GA₃; alguns apresentando efeito significativo na fase vegetativa e outros, na fase reprodutiva. De acordo com Bernier (1988); Lord e Eckard, (1987); Monselise e Halevy (1964), a aplicação de GA₃ durante o período de formação e diferenciação floral, é capaz de deprimir consideravelmente ou mesmo, inibir o florescimento na primavera de laranjeiras e limoeiros. Para Bernier, Kinet e Sachs, (1981); Garcia-Luís, et al. (1986), Monselise e Halevy, (1964), um dos fatores importantes para uma resposta satisfatória é a época de aplicação do fitorregulador. A sensibilidade é muito maior no início do inverno tanto para laranjeiras, limoeiros ou tangerineiras (Barros e Rodrigues, 1992). A medida que se aumentou o número de aplicações de GA, maior foi a porcentagem de pequenas gemas e pôrtanto, grande redução nas flores abertas (Monselise e Halevy, 1964). Os mesmos autores ainda relatam que os picos de respostas à aplicação do GA, ocorrem no meses de outono e no primeiro mês de inverno, e que aplicações posteriores são pouco eficientes para inibir ou reduzir o florescimento.

Em condições naturais, após alta produção observou-se que o índice de GA endógeno reduziu sensivelmente o florescimento no ano seguinte (Garcia-Luis et al., 1986).

Bommineni e Greyson (1990), relatam o papel do GA como controlador da expressão gênica do sexo, após determinação floral, em milho.

Os GA₃ podem regular (modular) a atividade de enzimas nas folhas. Constatou-se efeito GA na atividade da enzima sacarose fosfato sintase (aumento). Confirmação para tal fato se deu com o uso do paclobutrazol, um inibidor da síntese do GA que reduz a atividade da enzima SPS em espinafre e soja. De modo geral tem

havido consenso o efeito modulador do GA no particionamento da sacarose e amido (Cheick e Brenner, 1992; Cheick et al., 1992).

2.8.2 Citocininas

As citocininas são inibidoras ou promotoras do florescimento podendo agir sinergisticamente com os GAs, estando seus efeitos na dependência das concentrações utilizadas, da espécie, local e época de aplicação. Têm efeito estimulando as divisões celulares (Bernier et al., 1977; Bernier, 1988; Bernier, Kinet e Sachs, 1981).

Em plantas que requerem frio, ocorre uma elevação na concentração de citocininas no sistema radicular, onde detectou-se um papel ativo da benziladenina (BA) e zeatina na elevação da taxa mitótica, principalmente nas zonas expostas a luz (Havelange, Bodson e Bernier, 1986; Zeevaart, 1976). Plantas tratadas com benziladenina (BA) exibiram maior número de vacúolos com menor tamanho, maior número de mitocôndrias e aumento na síntese de DNA e RNA, requisitos básicos para a evocação floral, segundo os últimos autores citados.

2.8.3 Auxinas

Tem sido observado, em diferentes ensaios, que o efeito das auxinas é altamente específico, promovendo ou retardando o florescimento, com inibição em doses elevadas e promoção em baixas, mostrando uma grande interação com

temperatura, luz e outros reguladores de crescimento. Porém existe uma tendência em se aceitar mais seu efeito inibitório, em diferentes espécies (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988; Peeters et al., 1991; Zeevaart, 1976).

Com a indução do florescimento, uma das características observadas nas plantas é a redução da dominância apical, que pode ser explicada pela redução no suprimento das auxinas. Bolduc, Cherry e Blair (1970) reportam que em trigo de inverno, a atividade da enzima AIA-oxidase (auxina-oxidase) é elevada em tecido com baixo teor de auxinas. Ainda inferem que, com tratamento a frio, ocorra alteração no teor de GA, aumentando a atividade de tal enzima.

2.8.4 Poliaminas, ácido abscísico, etileno e fenólicos

As poliaminas são substâncias que de modo geral, tem estimulado o florescimento, como é o caso da putrescina (Bernier, 1988; Bernier et al., 1993; Thomas, 1963; Kushad e Orvos, 1990). Seu nível nas gemas esta diretamente relacionado com as alterações na morfologia floral (Meyerowitz, Smyth e Bowman, 1989).

Em citros, putrescina e espermidina aumentam em concentração em condições reprodutivas (Kushad e Orvos, 1990).

O ácido Abscísico (ABA) de modo geral, tem efeito inibitório na indução floral; porém não é o mais determinante da floração (Bernier, 1988; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier et al., 1993; Garcia-Luis et al., 1986; Zeevaart, 1976).

O papel do etileno não é claro. Em limão induziu florescimento (Bernier, Kinet e Sachs, 1981).

Os resultados obtidos com fenólicos vêm de poucas espécies, portanto com bastante limitações. Têm papel obscuro, parecendo atuar na via de disponibilidade de auxinas. Alguns ensaios têm mostrado efeito estimulatório (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988).

2.9 Anatomia da gema

2.9.1 Meristema vegetativo

Os meristemas são regiões restritas da planta com características embrionárias, de célula que retêm a capacidade mitótica. São comumente domes baixos, formados por três camadas lineares de células distinguíveis pelos planos de divisões mitóticas: L₁ formará a epiderme exibindo divisões anticlinais; L₂, com divisões anticlinais, mostrará outros planos na diferenciação e L₃, com divisões em todas as direções (Cutter, 1987; Esau, 1960; Fahn, 1990). L₂ e L₃ formarão o corpo da planta. Essas camadas persistem na transição floral, porém em muitos casos, a zonação citológica não persiste no meristema reprodutivo (Huala e Sussex, 1993; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Meeks-Wagner, 1993).

As três camadas citadas anteriormente compõem a chamada túnica, que por sua vez recobre o corpo. O corpo apresenta divisões celulares em todos os sentidos. Com isto, tem-se a túnica promovendo crescimento na superfície do vegetal e

o corpo, o crescimento em volume (Cutter, 1987; Esau, 1960; Fahn, 1990; Meeks-Wagner, 1993)

Para a maioria dos meristemas vegetativos, sobrepondo-se a essas 2 regiões (túnica e corpo) existe uma zonação composta por **zona central**; incluindo células localizadas no centro da túnica e corpo, grandes, corando-se levemente com reagentes para RNA ou proteína devido à vacúolos grandes, apresentando pequenos nucléolos; **zona periférica**, em torno da zona central, incluindo túnica e corpo, localizada nos lados do meristema. Suas células são pequenas, coram-se intensamente quando comparadas com a zona central, apresentando vacúolos pequenos e grandes nucléolos. Os primórdios foliares derivam-se desta zona. **Zona do "pith-rib" meristema:** inclui uma fileira larga, com células aplanadas e vacuolizadas. Está situada abaixo da zona central (Bartholomew e Red, 1948; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Meeks-Wagner, 1993). A Figura 2 ilustra a zonação referida acima.

Os ápices das angiospermas são geralmente pequenos, com diâmetro, medido logo acima da inserção do primeiro primórdio foliar, em torno de 130 a 200 μm (Erikson, 1968; Fahn, 1990; Bernier, Kinet e Sachs, 1981).

Suas células são isodiamétricas, ricas em protoplasma, sem material de reserva e cristais, com plastídeos no estágio de pró-plastídio, vacúolos bastante pequenos, parede celular fina (Erikson, 1968).

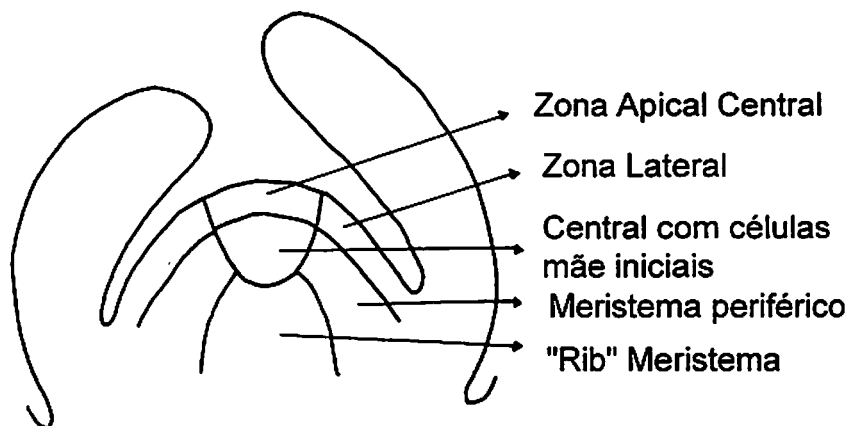


FIGURA 2: Diagrama da zonação citohistológica nos ápices vegetativos, segundo Fahn (1990).

2.9.2 Transição para florescimento e meristema reprodutivo

O florescimento pode ser dividido em 4 etapas (Jordan, 1993):

- 1) Indução floral - que poderá ocorrer nas folhas ou próprio meristema.
- 2) Transdução do estado induzido para os meristemas.
- 3) Evocação floral - primeiras mudanças bioquímicas e citológicas para o ápice reprodutivo.
- 4) Organogênese - formação das peças florais

O ápice reprodutivo vem do vegetativo, com persistência da túnica, onde brácteas, sépalas e pétalas derivam-se da zona lateral e estames e carpelos, da zona central (Fahn, 1990; Gifford e Tepper, 1961).

A primeira mudança noticiada é o aumento da atividade mitótica entre a zona central e o Rib-meristema, com células pequenas, ricas em protoplasma (Bernier, 1988, Thomas, 1963). As células acima do Rib-meristema são adicionadas à túnica, apresentando nucléolos maiores, com maior coloração em pironina. A zonação típica do meristema vegetativo não é observada. Verifica-se maior vacuolização do Rib-meristema. Após este aumento, as células meristemáticas superficiais se expandem sobre a superfície.

O primórdio aparece como resultado de divisões periclinais da terceira camada abaixo da superfície. Ainda pode ser detectada a zonação anteriormente descrita, no estágio pré-floral (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Erickson, 1968; Meeks-Wagner, 1993).

As mudanças apicais descritas acima, ocorrem paralelamente à expressão gênica não sendo a primeira consequência da segunda, uma vez que fatores ambientais podem atuar em determinados fenótipos sugerindo a não soberania da expressão gênica (Jordan, 1993; Zeevaart, 1976).

Uma característica que tem sido unânime entre os autores, é o achatamento do meristema durante a evocação floral, devido ao que sobra do meristema depois da iniciação de cada primórdio (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Coen e Carpenter, 1993; Cutter, 1987; Esau, 1960; Fahn, 1990; Popham e Chan, 1952;).

Em *Citrus* sp, o meristema apical é cônico na época da iniciação da primeira sépala sendo alargado e achatado durante a emissão de sépalas e pétalas. A forma cônica reaparece com o surgimento dos estames tornando-se achatado, com os carpelos (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Green, 1988; Lord e Eckard, 1985).

As gemas axiliares dormentes apresentam 3 brácteas protegendo de 6 a 7 primórdios e o meristema mais internamente (Lord e Eckard, 1987). Os meristemas das axilas das folhas, de modo idêntico, formam dentro uma flor ou um espinho, dependendo do ramo onde ocorre. Três tipos de ramos podem ser distinguidos:

a) Ramos com típica inflorescência com flor terminal com as 6 flores axiliares, sendo um ramo privilegiado na circulação da seiva e portanto com maior taxa de pegamento (Figura 1).

b) Ramos com 10 nós, espinhos axilares e flor terminal;

c) Ramos com 16 nós, espinhos axilares e ápice vegetativo (Lord e Eckard, 1987).

Observa-se que a posição da inflorescência é importante. Se o ápice produz sépalas, as laterais produzirão sépalas tendo-se portanto flores. Se o ápice produz folhas, as gemas laterais produzirão espinhos.

2.10 Época da indução floral

O período que vai da indução à mudanças morfológicas é longo em lenhosas. O achatamento da gema é a primeira evidência de diferenciação, e ocorre 2 a 3 semanas antes do fluxo que levará às flores (Ayalon e Monselise, 1959; Furr e Armstrong, 1956).

A gema diferenciada tem sido padronizada com cortes histológicos longitudinais, com alargamento do meristema e lobos laterais desenvolvidos (Randhawa e Dinsa, 1947). Não se pode definir com exatidão a data devido a

variedade, estação, posição da gema na árvore e tratos culturais, segundo esses autores; diferindo também de ano para ano.

A diferenciação inicia logo com o início do crescimento, com intervalo de tempo pequeno. Considerando que este período é curto, com crescimento e diferenciação ocorrendo simultaneamente na planta, todas as operações culturais, para maior retorno econômico com a cultura, deverão ser efetuadas antes do início do crescimento na primavera, como poda, adubação e irrigação. Em citros, não se diferencia a gema reprodutiva da vegetativa, antes da emissão das sépalas (Lord e Eckard, 1985; Randhawa e Dinsa, 1947).

O período de indução, como tem sido relatado por diversos autores, ocorre em janeiro (hemisfério norte) e julho (hemisfério sul), três semanas antes da primeira pré-diferenciação detectada. Alguma indução poderá ocorrer em novembro e dezembro (hemisfério norte), com porcentagem de florescimento, no entanto, baixa. No final dos meses de maior indução é que se detectou, de modo mais significativo, maior número de gemas prediferenciadas, percentual este bem maior para as gemas apicais (Ayalon e Monselise, 1959; Furr e Armstrong, 1956; Lord e Eckard, 1985; Lord e Eckard, 1987; Randhawa e Dinsa, 1947).

O desenvolvimento da flor ocorre, segundo os mesmos autores e também Monselise e Halevy (1964) cerca de 3 meses e meio (antese) após a indução.

Com relação à terminologia utilizada, todos os autores tem sido unânimes em utilizar **indução** para eventos ocorridos na planta como um todo, que desencadearão os processos típicos do florescimento e, **evocação** para eventos no

ápice, após indução, que preparam o meristema para a formação dos primórdios. A evocação precede a iniciação dos primórdios.

A dormência das gemas, tem ocorrido até meados do o primeiro mês de junho. Na segunda quinzena desde primeiro mês, geralmente ocorrem os primeiros eventos da indução. Neste período, de acordo com Ayalon e Monselise (1959) e Randhawa e Dinsa (1947) tem-se máxima eficiência com aplicação de substâncias químicas visando controle do florescimento.

As espécies de *Citrus* tendem a florescer mais ou menos na mesma época, sendo influenciadas pela precipitação e elevação da temperatura. *Citrus lemon* L. emite flor em setembro e outubro, com fruto simultaneamente, e *Citrus sinensis*,(L) Osbeck, em outubro e novembro (Khatibu et al., 1985).

2.11 Eventos citológicos e bioquímicos da indução floral

O primeiro sinal de transformação, com a indução floral, é a mudança de pH no citoplasma resultando em ativação de ATPase-H⁺ da membrana, com aumento de atividade de mRNA-polimerase, aumento de síntese de DNA e divisão celular (Jordan, 1993).

Inibidores respiratórios inibem a evocação floral. Também tem sido descrito aumento no conteúdo de sacarose e atividade de invertase, aumento no número de ribossomas, maior vacuolização e alongamento no Rib-meristema, aumento no número de mitocôndrias e maior biossíntese de fosfolípídeos insaturados (Bernier,

Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988; Bernier et al., 1993; Havelange e Bernier, 1991); que somente podem ser visualizadas após um mês decorrido a indução.

As mudanças ocorridas nos teores de mRNA não são tão elevadas, porém todos os trabalhos levam ao ponto em comum de que ocorre aumento transcricional com a indução (Bonner, Gifford e Reed, 1991; Jordan, 1993).

O aumento de mRNA no Rib-meristema (local de mudanças rápidas em síntese de RNA) é um dos eventos típicos, coincidindo com a determinação floral. Em ensaio utilizando cDNA conseguiu-se isolar genes especificamente expressados na iniciação floral (Bernier, 1988; Jordan, 1993).

Em determinadas espécies como *Pharbitis nil* L., as quantidades de RNA foram as mesmas, para tratamentos indutivos e não. Diferenças no padrão de bandas, foram detectadas, somente em gel bidimensional (Ono et al., 1991). Foi relatado também maior tamanho para o nucléolo na zona central (Bonner, Gifford e Reed, 1991).

A ativação de proteinoquinases tem se dado como resposta à diversos estímulos ambientais (temperatura, luz, sacarose) que por sua vez promoverão fosforilações reguladoras dos fatores de tradução como iniciação, alongação e terminação de determinados gens homeóticos (Jordan, 1993).

Gemas em condições indutivas apresentam acúmulo de células em interfase no período G_2 (Bernier, 1988; Jordan, 1993). A replicação, que se dá no período S, pode estar relacionada à fosforilações da H_1 quinase e proteínas do tipo cíclica, segundo estes mesmos autores.

Dois picos de aumento mitótico ocorrem após indução:

- a) 18 horas na zona periférica e 4 horas mais tarde na zona central
- b) 50 horas em ambas as zonas e 60 horas para a emissão do primórdio, em *Sinapis alba* L. Em outras herbáceas como *Chenopodium* sp. e *Pharbitis* sp. os mesmos picos mitóticos foram observados.

O padrão protéico de folhas constatado em gel bidimensional, é diferente antes e depois da indução,. Em *Pharbitis nil* L. houve o decréscimo de 4 polipeptídeos de 25,5; 39; 39 e 44 kDa. Em *Impatiens*, ocorrem o aumento no teor protéico, nas folhas de plantas induzidas (Bernier, Kinet e Sachs, 1981). Em *Xanthium strumarium* 2 polipeptídios desapareceram e houve o aparecimento de um de 50kDa (Kannangara et al., 1990).

Em *Lemma*, inibidores de proteases impediram a indução. Jordan (1993) atribuiu tal fato a processos proteolíticos sobre polipeptídeos pré-existent.

Bernier, Kinet e Sachs, (1981) relatam que o complemento protéico nas brácteas e nas partes florais é bem diferente do encontrado em órgãos vegetativos; com repressão de genes que atuam na fase vegetativa e ativação de outros da fase reprodutiva. O emprego da eletroforese bidimensional poderia explicar uma vez que não se consegue detectar diferenças quantitativas para proteínas (Barber e Steward, 1968; Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988, Jordan, 1993).

Tem sido sugerido que o desaparecimento de alguns polipeptídios se deve à eliminação de algum efeito inibitório (Kannangara et al., 1990; Zeevaart, 1976; Nitsan, 1962) e, no mínimo parcialmente, a evocação floral vem de mudanças precoces e qualitativas na expressão gênica (Pierard et al., 1980).

2.12 Controle genético da indução floral

A evocação consiste em uma série de eventos no desenvolvimento da estrutura reprodutiva, envolvendo a expressão de novo material genético e associada à variações no metabolismo. Neste momento tem-se a convergência de várias rotas. A expressão de genes homeóticos que fazem os eventos ocorrerem em sequência na inflorescência, é controlada por genes heterocrônicos (Jordan, 1993). Segundo este autor, a análise génica leva à duas conclusões importantes:

- a) são fortes os motivos para a aceitação de um inibidor no florescimento, com papel crucial e talvez pivot, neste processo;
- b) são genes com ação independente para as maiores variáveis ambientais ou seja, luz e temperatura

A análise de mutantes de *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus* tem mostrado que a indução e evocação floral são controladas por muitos genes, alguns controlados e outros influenciados por estímulos ambientais (Bernier et al., 1993; Meyrowitz, Smyth e Bowman, 1989; Okamuro, den Boer e Jofuku, 1993; Veit et al., 1993); requerendo uma coordenação temporal e espacial (Jordan; 1993; Okamuro, den Boer e Jofuku, 1993; Meyerowitz, Smyth e Bowman, 1989; Moses e Chua, 1988; Veit et al., 1993; Schwartz-Sommer et al., 1990; Zeevaart, 1976).

Fatores reguladores da transcrição de determinados genes, têm sido caracterizados como sendo controlados por fosforilações (Jordan, 1993).

Segundo relatam Moses e Chua (1988) a regulação gênica pode se dar em 2 níveis: evocação e indução. Cicloheximida e Actinomicina inibem o florescimento

em muitas espécies. Aplicadas nas folhas, não foram translocadas para o ápice, mostrando atuarem aí, na biossíntese de um promotor, na indução. Conforme os autores, na evocação a presença de cicloheximida, thiouracil, 6-azauracil, 5-fluorouracil, 5-fluorodeoxyuridina e actinomycina inibiram o florescimento.

A sensibilidade aos fatores ambientais tem sido diferente nas diferentes espécies. Nisto inclui-se respostas ao comprimento do dia e frio, agindo os genes como recessivos em uma espécie e dominantes, em outras. O controle do florescimento parece estar envolvido com diferentes substâncias de planta para planta (Bernier, 1988; Okamoto, den Boer e Jofuku, 1993).

Em trigo, genes para controle de recepção do comprimento do dia e frio funcionam independentemente, apresentando também muitos com efeitos pleiotrópicos (Bernier, 1988).

Em *Arabidopsis thaliana*, uma PDL (planta de dia longo), encontra-se genes atuando para o florescimento nas folhas, cotilédones e gema, produzindo inibidores florais transmitidos ao ápice, suprimindo o florescimento. O gene EMF atua no ápice, na fase vegetativa e com o aumento da idade, a quantidade do seu produto cai e seu desaparecimento pode ser facilitado por um dia longo (Sung et al., 1992).

Fatores fisiológicos e ambientais afetam a capacidade de expressão dos genes homeóticos. Essa influência atinge o nível enzimático também, podendo interferir na expressão dos genes homeóticos nucleares (Van der Krol e Chua, 1993).

2.13 Controle do florescimento é um fenômeno multifatorial

O florescimento, por muitas décadas vem sendo rastreado tendo sido razão de centenas de ensaios. Em consequência desse número elevado de resultados algumas teorias surgiram para explicar a indução e a evocação floral.

A teoria florigeno/antiflorígeno consta que alguma informação é transmitida das folhas causando uma resposta floral nos meristemas, indo via floema, de natureza hormonal e universal. Foi baseada em algumas espécies de dias longos e dias curtos fotoperiódicas absolutas, porém a grande parte das outras espécies é fotoperiódica facultativa ou planta de dia neutro, a exemplo do citros. Consta que também existe um antiflorígeno universal em plantas não induzidas (Bernier, 1988).

Plantas termoinduzidas enxertadas em plantas não fotoinduzidas não floresceram mostrando que diferentes fatores regulam o florescimento. O promotor/inibidor vem das folhas, porém muitas mudanças no ápice ocorrem sem a influência de um promotor vindo das folhas. Também o destino imediato do material exportado pelas folhas não é conhecido, podendo ir tanto para o ápice como para as raízes. Análises em HPLC de exudatos de folhas induzidas revelam diferenças altamente significativas em diferentes compostos (Bernier, 1988; Jordan, 1993).

A hipótese da dispersão de nutrientes relata que o controle da indução se deve à fotoassimilados. Fatores que inibem a translocação de assimilados, inibem o florescimento, bem como aqueles que levam à maior atividade de drenos, como enraizamento, competem com o meristema, inibindo as flores. Agentes que suprem o meristema com assimilados aparecem como promotores. Fatores que controlam a

iniciação floral também influenciam taxa fotossintética e disponibilidade de assimilados (aumento da irradiância ou concentração de CO₂). O aumento do suprimento dos assimilados, de acordo com a variedade de informações atuais sobre florescimento, não suporta, sozinho, a hipótese de ser um sinal único para iniciação floral.

No controle multifatorial, os fatores individuais atuam em um ou outro nível do processo. Possíveis interações entre sacarose e citocininas, giberelinas e ácido abscísico, são conhecidas por interagirem cada um, no controle de muitos processos, podendo também interagir com sacarose uma vez que estes fitohormônios tem sido conhecidos por regularem diversas enzimas do metabolismo dos carboidratos e particionamento de assimilados (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988).

Segundo relata o controle multifatorial, várias substâncias têm provocado a evocação floral e morfogênese. Carboidratos, reguladores de crescimento, macro e micronutrientes, mostrando que o controle da evocação está sob influência de muitos fatores, quando presentes no ápice em concentração e época adequada. Cada fator não necessariamente atuará na mesma direção em todas as plantas. A variabilidade genética leva à comportamentos diferentes, para diferentes fatores. Tem sido a melhor teoria devido à complexidade encontrada em todos os níveis do processo. Inclui os fotoassimilados dentre os fatores controladores da indução e evocação (dispersão dos nutrientes) e não é contraditória com florigeno/antiflorígeno (Bernier, Kinet e Sachs, 1981; Bernier, 1988; Havelange, Bodson e Bernier, 1986; Jordan, 1993;).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de maio de 1993 a agosto de 1997, no pomar da Universidade Federal de Lavras e pomar particular, no município de Lavras, sul de Minas Gerais.

A cidade de Lavras encontra-se na latitude 21°14'06" sul e 45°00'00" de longitude oeste com altitude de cerca de 920 metros, apresentando estações do ano bem definidas, sendo uma chuvosa (de outubro a março) e outra seca (de abril a setembro) (Normais Climatológicas 61-90) apresentando clima Cwb, de acordo com a classificação de Koppen.

3.1 Avaliações Anatômicas e Bioquímicas

As laranjeiras utilizadas foram da cultivar 'Pera Rio' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], plantadas em fevereiro de 1982 e a tangerineira 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) de mesma idade, enxertadas em limoeiro 'Cravo'. (*Citrus limonia* Osbeck)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições, constituindo cada ramo uma parcela. Em cada coleta, recolheu-se cerca de 80 ramos, das plantas do pomar.

Os tratamentos foram as épocas nas quais foram efetuadas as coletas do material, com intervalo de maio a agosto (17/05; 02/06; 17/06; 30/06; 07/07; 13/07; 21/07 e 02/08).

3.1.1 Avaliação anatômica

Brotações novas, com idade aproximada de 4 meses, que pertenciam aos ramos das duas espécies, foram usadas para extração das gemas para a avaliação anatômica. Foram coletados vários ramos por planta, tomando-se o cuidado de retirar amostras em toda a área do pomar, para uma amostragem mais segura. Estes ramos eram colocados em gelo, até manuseio no laboratório. As avaliações anatômicas foram feitas no Laboratório de Citologia e Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

Desses ramos retirou-se a amostra para o estudo anatômico, tomando-se a região do nó, contendo portanto, uma gema apical ou axilar. De cada ramo foram aproveitadas 3 gemas, contando-se a partir do ápice para a base. Esses segmentos de caule de aproximadamente 5 a 7mm foram colocados para fixação em FAA (5% formol, 5% ácido acético e 90% de álcool etílico 70°C), de acordo com Joahansen (1940), por 48 horas, sendo posteriormente desidratadas com álcool etílico, diafanizados em xilol e

embebidos e emblocados em parafina (Johansen, 1940; Sass, 1951; Beçak e Paulete, 1976).

Utilizou-se um micrótomo rotativo para a confecção dos cortes longitudinais de 7 μm de espessura, que colocados em lâminas foram desparafinados e corados segundo a metodologia de Bhaduri e Mukherjee (1961), citado por Sharma e Sharma (1972) para coloração em pironinaY-metilgreen. A montagem final foi feita utilizando-se a resina Entellan (Johansen, 1940; Sass, 1951; Jensen, 1962).

As gemas foram medidas utilizando-se aumento de 200X, com auxílio da ocular OSM 0,5; sendo os diâmetros obtidos segundo recomendação de Bernier, Kinet e Sachs (1981) e Erickson (1968), Fahn (1990); e as alturas, partindo-se da linha imaginária de união entre os dois primeiros primórdios foliares, usada para a de medição do diâmetro, até o ápice.

Essas mesmas gemas utilizadas para medições foram objeto de fotografias, onde uma análise visual ao microscópio de luz, permitiu a detecção de fase onde se teve maior concentração de RNA, pela coloração em pironinaY-metilgreen, e também alterações nas características citológicas ocorridas durante a evocação floral.

3.1.2 Análise bioquímica

a) Extração da amostra para análise protéica

Os ramos coletados também foram empregados para a retirada das gemas que foram excisadas na linha de convergência do caule com pecíolo da folha.

Utilizou-se 300 mg de peso fresco do material, que foi macerado com o auxílio de N₂ líquido sendo adicionado depois 1 ml de tampão de extração contendo os requisitos recomendados por Goodwin e Mercer (1983) ou seja Tris HCl 0,2 M, pH 8,0 + 0, 1% de β.Mercaptoetanol, 0,4% de PVP (polivinilpirrolidona), 0,4% PEG (Polietileno glicol) e 1mM EDTA e transferidos para tubos tipo Ependorff que foram deixados em geladeira para melhor extração por 24 horas.

Procedeu-se a centrifugação do material por 60 minutos, a 14.000g, 4°C. eliminando-se o 'pellet' formado e acondicionando-se o sobrenadante em tubos Ependorff em freezer - 18°C até que todos os tratamentos fossem coletados do campo.

b) Proteína total

b-1) Análise qualitativa de proteína total

Foram colocados 30 µl de mistura de tampão da amostra (5 ml de glicerol; 2,5 ml de solução tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 2,5 mg de Azul de Bromofenol e completado volume para 25 ml com água deionizada) + 20 µl de extrato de proteína em cada canaleta do gel. Ao extrato de proteína foi acrescentado SDS (solução estoque a 10%) e β - mercaptoetanol. As corridas foram desenvolvidas a 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador.

A avaliação de proteína total extraída foi feita sob eletroforese SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina + SDS pH 8,9.

Para estimativa dos pesos moleculares, foi aplicada em cada gel uma amostra do padrão de proteínas, SIGMA M - 2789, com pesos moleculares variando de 14,2 a 205,0 KD (α - lactoalbumina, leite bovino - 1,42; Inibidor de tripsina, soja - 20,1; Anidrase carbônica, eritrócito bovino - 29,0; Albumina, ovo - 45,0; Soro albumina, bovino - 66,0; Fosforilase b, músculo do coelho - 97,4; β - galactosidase, *Escherichia coli* - 116,0; Miosina, músculo de coelho - 205,0).

Após a corrida, os géis foram corados em solução de Comassie Brilliant Blue a 0,05% conforme Alfenas et al., 1991, durante 12 horas e descoradas em solução, contendo 5% de etanol, 10% de ácido acético.

b-2) Análise quantitativa de proteína total

A quantificação de proteínas dos extratos das gemas foi feita com uma alíquota de 100 μ l de amostra em 5 ml de solução Comassie Blue G - 250 pelo Método de Bradford (100 mg de Comassie + 50 ml de etanol 95% + 100 ml de ácido fosfórico 85%, completar para 100 ml), (Bradford, 1976). Confeccionou-se uma curva padrão com a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro B - 295 - 22; Micronal, em 595 nm (nanômetro).

c) Análise qualitativa e quantitativa para atividade enzimática

c-1) Análise qualitativa da atividade enzimática

A eletroforese foi desenvolvida em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel de separação) e 4,5% (gel de concentração). O sistema tampão gel eletrodo utilizado foi tris-glicina pH 8,9. Cada canaleta do gel recebeu 20 µl de extrato da amostra, mais 30 µl de tampão da amostra, sem SDS. A migração foi efetuada por um período aproximado de 3:30 horas à 4°C, 12 mA no gel concentrador e 24 mA no gel separador.

Após a eletroforese, os géis foram corados para detecção da atividade das enzimas malato desidrogenase (MDH) e fosfoglicoisomerase (PGI), (Alfenas et al., 1991).

As análises enzimáticas foram efetuadas no Laboratório de Biotecnologia, Setor de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras

c-2). Análise quantitativa da atividade enzimática

Primeiramente foram feitas coletas no campo de estacas da laranjeira 'Pera Rio' e tangerina 'Ponkan' em 3 datas diferentes (26/06/97; 04/07 e 07/07). Procedeu-se a retirada das gemas, como descrito anteriormente, com posterior maceração em N₂ líquido. O pó obtido foi acondicionado em "deep freezer" a - 86°C. De posse de todas as amostras, pesou-se 70 mg em peso fresco de gemas, colocando-se

uma proporção de 1:10 partes de solução extratora; portanto, 700 µl de tampão extrator (item 3.1.2a), deixadas extraíndo a 4°C, por 24 horas,.

O substrato para a enzima Succinato Desidrogenase foi: tampão Tris HCL 0,0715 M pH 7,5 + succinato de sódio a 0,02858 M + KCN (cianeto de potássio) 0,001428 M + Triton X-100 2% (Santos e Terra, 1984).

O substrato para a enzima Glicose 6-fosfato desidrogenase foi: tampão Tris HCL 0,0715 M pH 7,5 + sulfato de magnésio (Mg SO₄) 5,14 mM + NADP (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato) 0,171 mM + Triton X-100.

O reagente de cor para as duas enzimas foi composto por INT (p - Iodonitrotetrazolium violet) a 1,0 mM e PMS (Phenazine Methosulfate) a 1,6 mM. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 500 nm. A metodologia seguida foi segundo Santos e Terra (1984).

3.2 Análise Fisiológica com Aplicação de GA₃

O experimento para a avaliação da aplicação do GA₃, foi conduzido em pomar particular no município de Lavras, com laranjeiras da cultivar Lima Sorocaba [Citrus sinensis (L) Osbeck] em delineamento em Blocos Casualizados, em 4 repetições. As árvores foram plantadas em outubro de 1991. As aplicações se deram em 1995.

O objetivo deste ensaio foi de verificar o efeito do PROGIB (Ácido Giberélico) na floração desta cultivar, em relação ao seu efeito inibitório.

Utilizou-se plantas testemunhas (0 ppm de GA₃) e quatro dosagens do regulador de crescimento: 10, 20, 40 e 120 ppm.

O produto foi aplicado por pulverizações, via pulverizador Costal, nos dias 14/04 e 15/04 (meados do outono) utilizando-se um espalhante adesivo, com pH da solução em torno de 6,0. Tomou-se o cuidado em se aplicar o produto no início da manhã e final da tarde, sem ocorrência de ventos para se evitar a deriva. Também foi realizado teste em branco, definindo o volume da calda a ser utilizado, possibilitando o molhamento da planta sem ocorrência de escorrimento.

Para a coleta de dados efetuou-se 2 contagens de flores nas árvores no surto primaveril: 28/08/95 e 21/09/95, utilizando-se uma moldura de 1m², procedendo-se a contagem sempre no quadrante sudeste, com amostragem em 3 árvores/parcela (Monselise e Halevy, 1964) (Figura 14a).

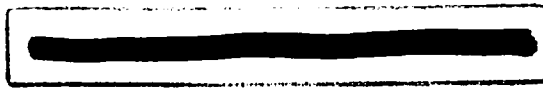
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Anatomia da gema

4.1.1 Características dos ramos vegetativos

Os meristemas vegetativos são regiões restritas da planta, protegidos por primórdios foliares, que por sua vez são protegidos por brácteas (Figura 3).

Os meristemas das axilas das folhas de ramos com espinhos, que apresentaram uma bráctea na axila permaneceram vegetativos. A Figura 4 mostra um corte longitudinal de uma gema lateral sub-apical, de laranjeira 'Pera Rio', onde, em dois planos distintos, captou-se a situação da gema axilar (b) e de seu espinho correspondente (a). A data da coleta desta gema (09/08/94) corresponde a uma época de planta floralmente determinada, já com algumas anteses. Isto representa dizer que, com a posição sub-apical na qual encontrava-se a gema, seria de esperar uma gema em processo de morfogênese floral. Estes fatos reforçam a descrição de Lord e Eckard



(1987) que observaram que a posição da inflorescência é importante: ramos com ápices produzindo folhas apicais, produzirão espinhos axiliares, com gemas em estágios vegetativo.

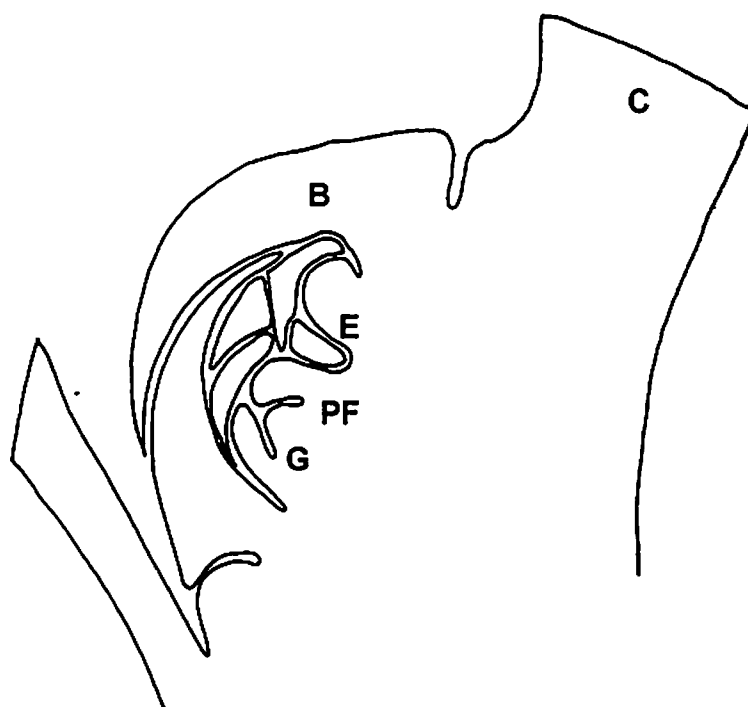


FIGURA 3: Secção longitudinal de uma gema lateral de laranjeira 'Pera Rio' onde: F-folha; C-caule; B-bráctea; E-rudimento de espinho; PF-primórdio foliar; G-gema. Lavras, UFLA, 1997.



FIGURA 4: Corte longitudinal de gema axilar de laranjeira 'Pera Rio' em ramo vegetativo. a - detalhe do espinho. b - em outro plano, na mesma axila detalhe da gema vegetativa coletada em 03/08/94. A= 32X. Lavras, UFLA, 1997.

4.1.2 Gema vegetativa

Para as laranjeiras 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan' observou-se, anatomicamente, as mesmas características para os meristemas: domes baixos, com formato aproximadamente cônico, formado por uma túnica composta por 3 camadas celulares recobrando o corpo. (Figuras 5a e 6a).

Outra zonação que pôde ser notada nos ápices, sobrepondo as duas regiões anteriormente descritas, foi a zona central onde observou-se células grandes, corando-se mais levemente com a pironina-metilgreen (Figura 5b e 6b). Nesta região encontra-se células com vacúolos maiores justificando esta menor intensidade de coloração. Situação contrária foi observada região periférica que, por apresentar células menores, mostrou maior densidade na coloração. Ainda pôde ser dectado o "pith-rib" meristema, incluindo uma fileira de células aplanadas e vacuolizadas.

A análise dos ápices vegetativos ainda permitiu incluir as espécies cítricas estudadas dentro da média das angiospermas, no que diz respeito ao diâmetro da gema. Este ficou em torno de 100 μ m, nas duas espécies estudadas, dados estes concordantes com Bernier, Kinet e Sachs (1981) e Erickson (1968), Fahn (1990).

4.1.3 Transição para o florescimento

Gemas reprodutivas apresentaram uma alteração morfológica que foi seu achatamento ou aumento no diâmetro, devido ao que sobrou do meristema com a iniciação das sépalas (Figuras 5b e 6b). a Figura 7 ilustra em desenho a transição observada onde tomou-se como base um corte histológico de laranjeira 'Pera Rio'.

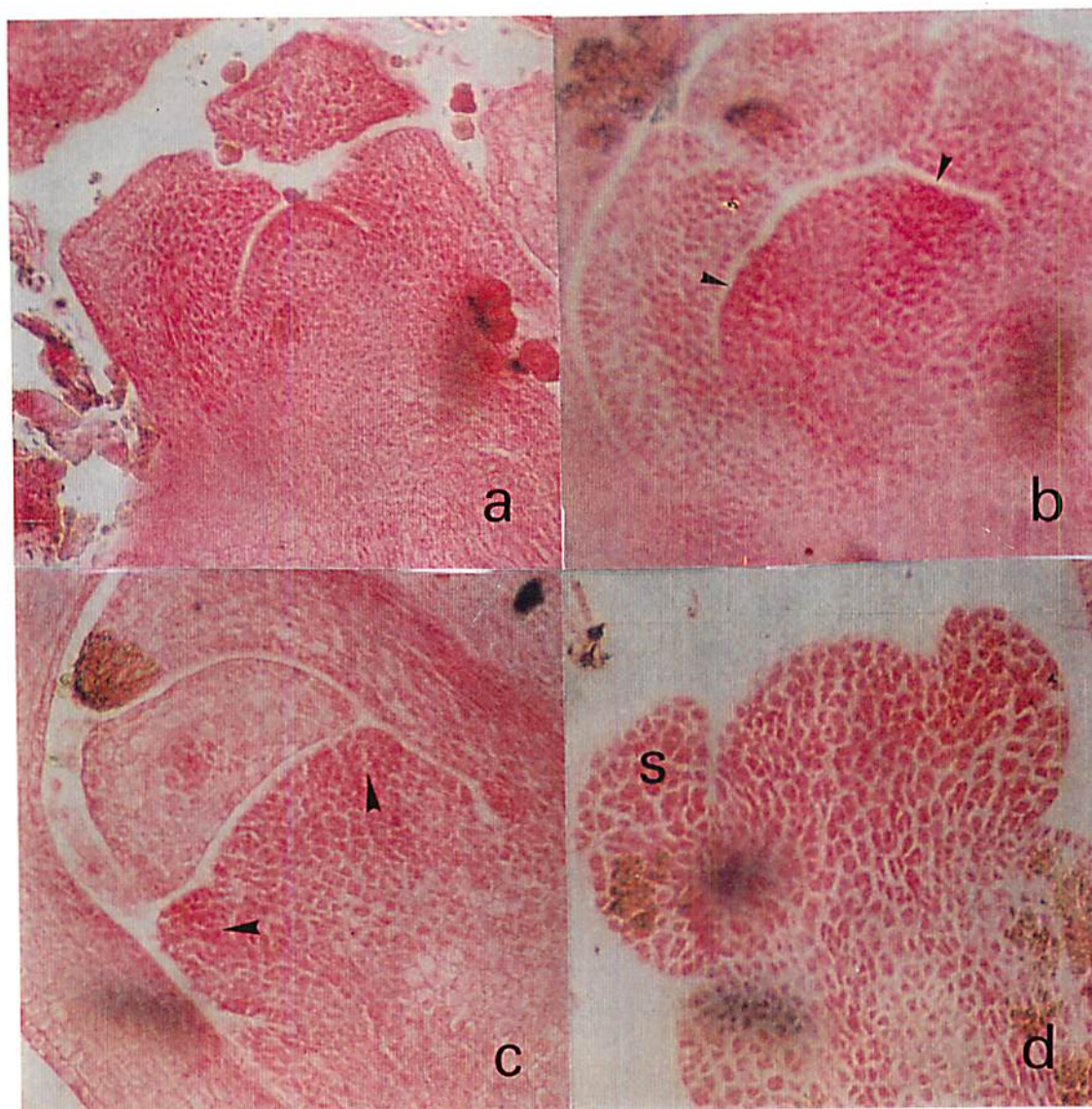


FIGURA 5a: Sequência dos eventos anatômicos da evocação e morfogênese floral, em laranjeira 'Pera Rio'. a) Gema vegetativa onde são observadas túnica e corpo, com formato cônico (31/05/94); b) evocação floral, com as setas mostrando áreas com de concentração de RNA (01/07/94); c) início da emissão das sépalas (setas) (01/07/94); d) primórdios de sépalas, sem observação da zonação vista em a. (13/07/94) A = 200 X. Lavras, UFLA, 1997.



FIGURA 5B: Sequência dos eventos anatômicos da evocação e morfogênese floral, em laranja 'Pera Rio'. e) Gema floral em início de emissão de pétalas S (sépalas) e p (pétalas); 03/08/94; f) gemas apical e subapical em diferentes estágios de desenvolvimento indicadas pelas setas. (03/08/94) A = 200X. Lavras, UFLA, 1997.

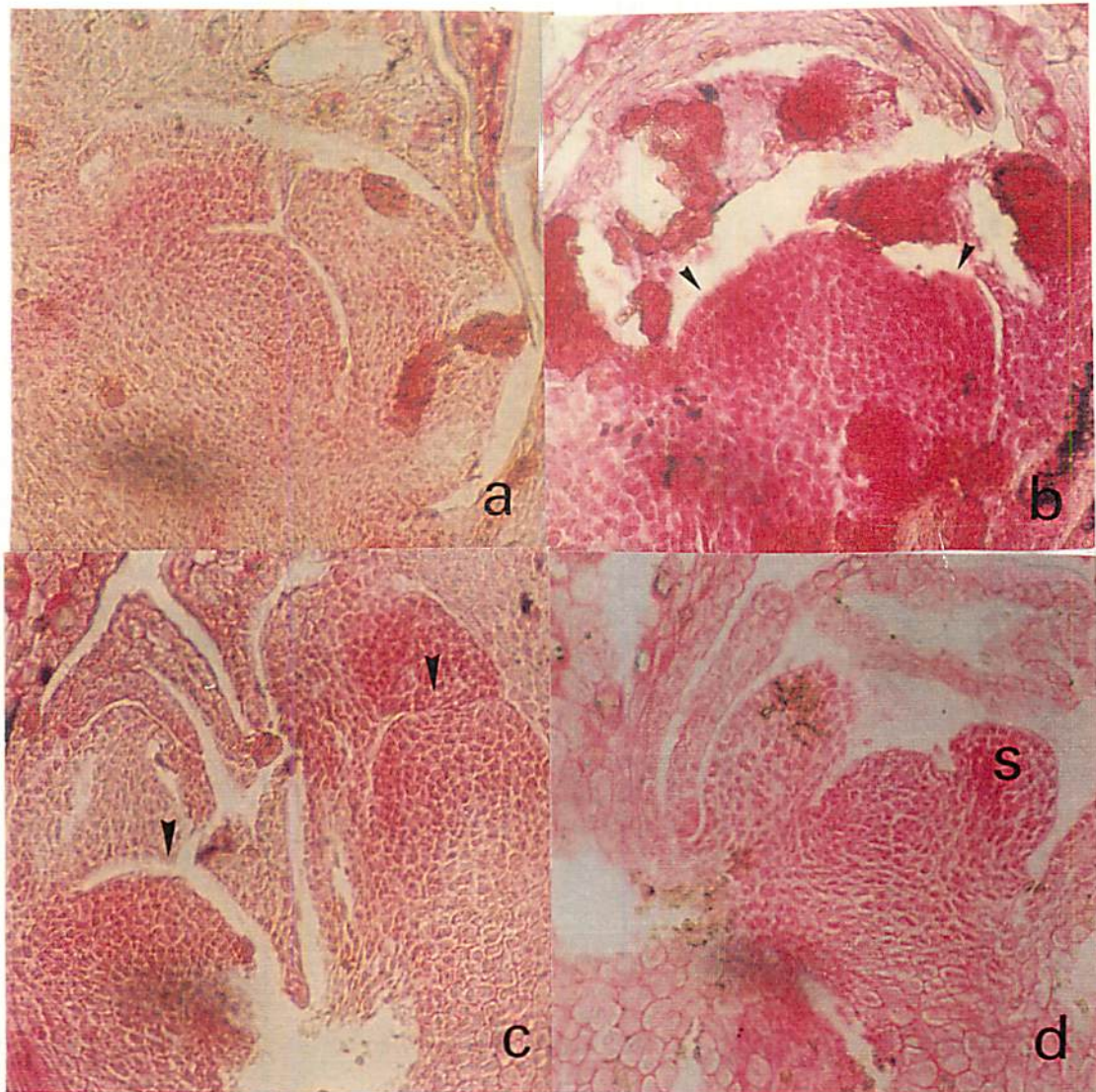


FIGURA 6: a) Sequência dos eventos anatômicos da evocação e morfogênese floral, em tangerina 'Ponkan'. Gema vegetativa, com formato cônico, observando-se a túnica e corpo (31/05/94); b) Evocação floral com as setas indicando as regiões de maior concentração de RNA (13/07/94); c) Gemas apical e sub-apical em diferentes estágios de desenvolvimento, mostradas pelas setas (18/07/94); d) Emissão dos primórdios de sépalas (S) sem a zonação típica vista em a) (18/07/94). A = 200 X. Lavras, UFLA, 1997.

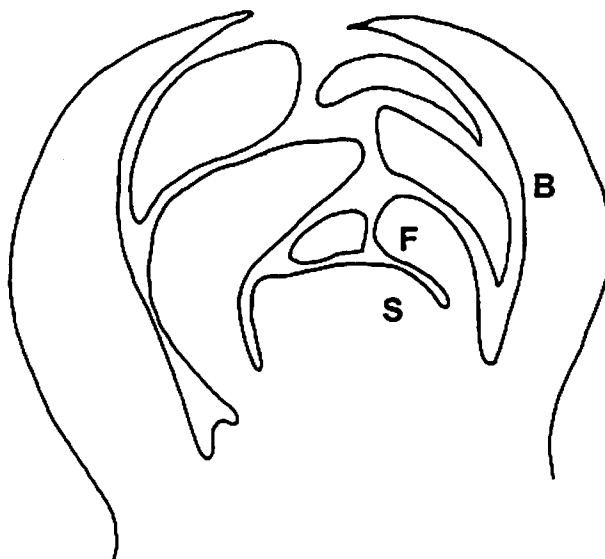


FIGURA 7: Secção longitudinal de uma gema do ápice baseada em corte histológicos de laranjeira 'Pera Rio' em estágio de quebra de dormência (início da morfogênese floral) B-brácteas; F-primórdio foliar; S-iniciação de uma sépala. Lavras, UFLA, 1997.

Observou-se um formato cônico precedendo à emissão das sépalas, tornando-se mais alargada e achatada durante o estágio da emissão dessas sépalas e pétalas. Estes eventos ocorreram de 2 a 3 semanas antes do fluxo que levou às flores (Figura 5d a f). Esta situação de gema achatada, com iniciação das sépalas, é o estágio padronizado para uma gema considerada diferenciada, segundo, Randhawa e Dinsa (1947). A Figura 7 mostra um desenho esquemático onde caracteriza-se uma gema floralmente diferenciada, em início da emissão das sépalas.

A técnica empregada foi a de coloração com pironina-metilgreen, que permitiu acompanhamento das alterações bioquímicas e citológicas nos ápices. As fotos das Figuras 5b e 6b ilustram o fato. Nota-se, no sentido das setas, uma maior

coloração na zona periférica das gemas, o que vem corroborar descrições anteriores de que, com o advento da diferenciação floral, ocorre uma maior concentração de RNA nesta região, precedendo a emissão das sépalas (Figuras 5c e 6c) (Bonner, Gifford e Reed, 1991; Jordan, 1993). A cronologia não pode ser definida com exatidão devido à variações e particularidades do ápice, estação do ano, posição da gema na árvore, tratos culturais e características climáticas do ano em questão. O que tem sido feito é determinar-se um período aproximado. Um estágio de morfogênese floral já bem adiantado é visto nas Figuras 5e e 5f para a laranjeira 'Pera Rio' e, na Figura 6d, para tangerineira 'Ponkan', ambos os fenômenos captados na primeira semana do mês de agosto.

As análises de variância para a variação nos diâmetros das gemas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Observou-se variações nos diâmetros das gemas, no decorrer dos tempos de coleta. Para esta característica, a interação ano × época foi significativa, concluindo-se que as condições ambientais, dos anos em questão, interferiram nos eventos anatômicos da indução floral. Assim, a interação foi desdobrada, ou seja, ajustou-se um modelo de regressão para cada ano separadamente. O modelo de regressão não linear foi semelhante à função logística (Hoffmann e Vieira, 1987), com a inclusão de um termo constante como modificação:

$$Y = D + \frac{A}{1 + e^{-B-CX}}$$

com os valores de A, B, C e D mostrados na Tabela 3.

TABELA 1: Resumo da análise de variância para diâmetro das gemas (micromêtros), de laranjeiras 'Pera Rio', para os anos 1993 e 1994, em diferentes datas do ano e desdobramento da interação Ano x Época. Lavras, UFLA, 1997.

CV	GL	QM	F
Ano	1	544,500	0,53
Época	7	45.150,110	44,40***
Ano x Época	7	5.718,010	5,62**
Resíduo	12	1.016,840	
CV = 25,03%			
Época dentro de 93	(7)	29.171,344	28,69**
Regressão	3	65.653,991	64,57**
Desvios	4	1.809,358	1,78
Época dentro de 94	(7)	21.696,780	21,34**
Regressão	3	49.163,695	48,35**
Desvios	4	1.096,594	1,08**
Resíduos	112	1016,836	-

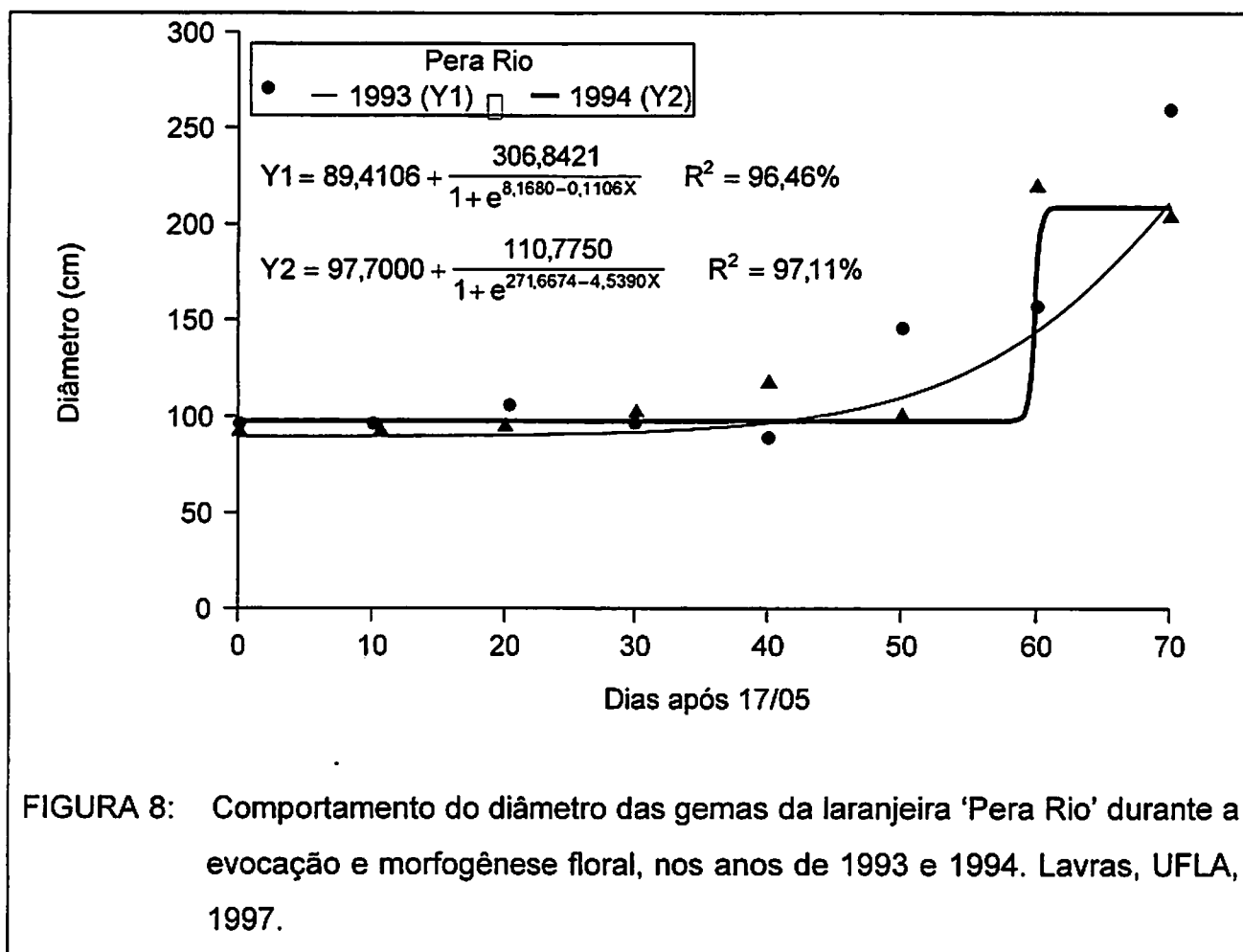
Para as duas espécies estudadas observou-se uma grande interferência das condições do ano base. Os gráficos mostrando o comportamento dos diâmetros das gemas, no decorrer do tempo, são mostrados nas Figuras 8 e 9. Vê-se claramente um primeiro período de menor diâmetro, com gemas vegetativas e um segundo período, ascendente para esses diâmetros, correspondente aos eventos da evocação e morfogênese floral.

Fazendo-se um paralelo entre as fotografias (Figuras 5 e 6) e o comportamento dos diâmetros das gemas pelos gráficos (Figuras 8 e 9) pode-se ter a exata noção da dinâmica do processo da indução, evocação e morfogênese floral.

TABELA 2: Resumo da análise de variância para diâmetro das gemas (micromêtros), de tangerineiras 'Ponkam', para os anos 1993 e 1994, em diferentes épocas do ano e desdobramento da interação Ano x Época. Lavras, UFLA, 1997.

CV	GL	QM	F
Ano	1	468,80	1,39
Época	7	27.249,46**	80,99**
Ano x Época	7	8879,01**	26,39**
Resíduo	12	336,44	
CV = 15,62%			
Época dentro de 93	(7)	15.322,14	45,54**
Regressão	3	29.387,73	87,35**
Desvios	4	4.772,94	14,19
Época dentro de 94	(7)	20.806,32	61,84**
Regressão	3	46.743,15	138,93
Desvios	4	1.353,7	4,02
Resíduos	112	336,44	-

Com a expressão $X = \frac{-B}{C}$ (Tabela 3) retirada da equação tem-se a taxa de crescimento máxima, ou seja, o estágio de **gema floralmente determinada**. Para a laranjeira 'Pera Rio', encontrou-se a época 74 dias após o dia 17/05 (ano 1993) o que representa a data de 30/07/93, para a gema floralmente determinada. Para o ano de 1994, a época foi de 17/07/94. Isto equivale afirmar que , para o ano de 1993, a laranjeira 'Pera Rio' teve suas gemas induzidas no início do mês de julho e para o ano de 1994, a indução ocorreu com pequeno adiantamento, por volta da última semana de junho.



A tangerineira 'Ponkan' exibiu comportamento semelhante, com estágio de gema determinada em 06/07/93 e 23/07/94, equivalendo a uma indução em final de junho, início de julho.

É muito importante ser ressaltado que este processo de se rastrear o fenômeno da indução e evocação floral no citros, não apresentará uma data limítrofe, uma vez que, como já citado anteriormente, esta característica sofre grande interferência ambiental. Variações de dias, e até semanas, serão previsíveis e explicáveis.

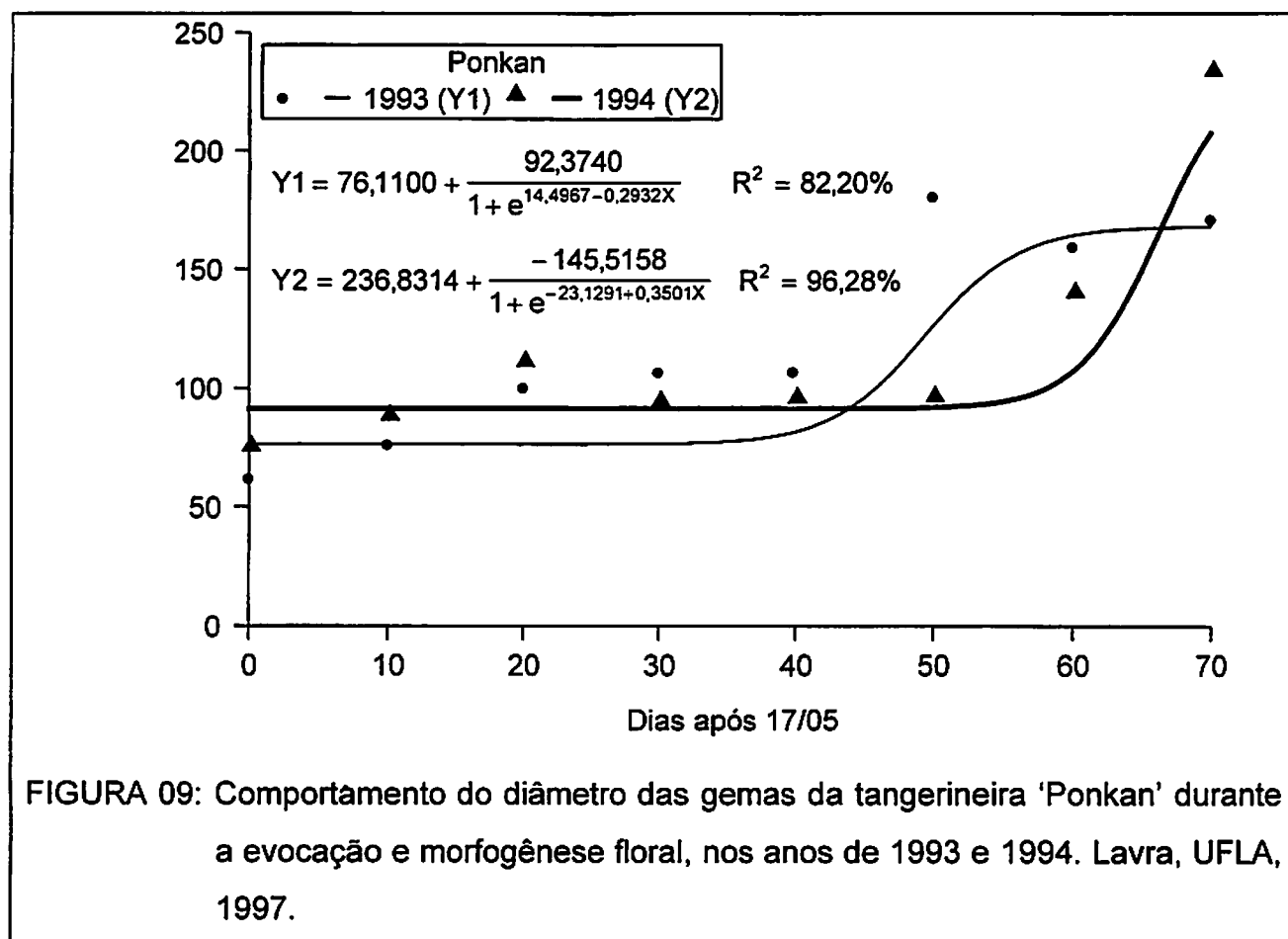


TABELA 3: Valores para A, B, C, D, referentes à equação não linear ajustada para o comportamento dos diâmetros das gemas para os anos 1993 e 1994, em diferentes datas do ano. Lavras, UFLA, 1997.

Variáveis da equação de regressão	'Pera Rio'		'Ponkan'	
	1993	1994	1993	1994
A	306,84	110,78	92,37	-145,52
B	-8,17	-271,67	-14,50	23,13
C	0,11	4,54	0,29	-0,35
D	89,41	97,70	76,11	236,83

Para complementar o estudo anatômico, foram efetuadas medições das alturas das gemas, nas mesmas onde foram efetuadas as medições dos diâmetros; numa tentativa de se anular possíveis interferências de variações no tamanho das gemas, existentes naturalmente nas plantas.

Os resultados foram analisados em forma de relação diâmetro/altura uma vez que uma gema vegetativa grande poderia mascarar o resultado juntamente com uma gema reprodutiva pequena.

As análises de variância bem como o ajuste de modelo de regressão para os dados mostraram comportamento semelhante aos resultados do diâmetro das gemas; com coincidência dos períodos para indução e morfogênese floral. Optou-se portanto, pela exibição dos dados dos diâmetros, que são medições mais frequentes em estudos anatômicos.

A avaliação fotográfica desses eventos veio confirmar o que se constatou na análise estatística.

Para a laranjeira 'Pera Rio', o padrão fotográfico ilustra os dados coletados da análise de variância para diâmetro das gemas. A Figura 5a exibe uma gema com todas as características vegetativas discutidas no item 4.1.2. Na Figura 5b, pode ser vista a maior intensidade de coloração com pironina-metilgreen na zona periférica, sendo esta, uma alteração citológica que precede a emissão das sépalas. Nessa zona ocorrerá uma mudança no sentido das mitoses que, de anticlinais, passarão a periclinais, para aumento da massa celular que levará à formação deste verticilo que pode ser visto na Figura 5c, e em estágio mais avançado, na Figura 5d.

Este período corresponde à segunda quinzena de julho, levando-nos a deduzir que a indução floral ocorreu na última semana do mês anterior. Na Figura 5e tem-se já o início da emissão das pétalas, estando bem nítido o formato plano da gema. Em menor aumento vê-se na Figura 5f, duas gemas em estágios diferentes, onde a apical encontra-se em fase de formação de pétalas, pedúnculo alongado e outra gema em posição imediatamente inferior, já plana porém mais atrasada na morfogênese floral.

Na tangerineira 'Ponkan', a zonação característica de uma gema vegetativa pode ser vista na Figura 6a, com manto (túnica) composto por 3 camadas recobrando o corpo e com as características citológicas descritas anteriormente (4.1.2). A Figura 6b exhibe uma gema floralmente determinada, correspondendo a um estágio de meados do mês de julho, onde podem ser notadas as zonas periféricas intensamente coradas com pironina-metilgreen, estágio este no qual já pode ser visualizada a emissão das sépalas. Nesta Figura vê-se os lóbulos formados nas zonas periféricas, indicando a emissão deste verticilo. Na Figura 6c vê-se 2 gemas, em estágios diferentes, por tratar de uma inflorescência simpodial, onde a gema superior, já bem aplanada, inicia suas sépalas e, a gema inferior encontra-se em estágio não determinado.

Na Figura 6d, tem-se a morfogênese floral, onde vê-se duas sépalas emitidas e principalmente o desaparecimento da zonação característica da gema vegetativa. Este estágio corresponde a um período relativo ao início do mês de agosto.

Para as avaliações anatômicas, o estudo foi iniciado com a coloração SAFRA-BLAU (saframina/azul de astra). Não conseguiu-se a detecção da fase bioquímica que precede a evocação floral. A coloração com pironina Y - MetilGreen

detectou com clareza a fase de evocação floral, precedendo a emissão das sépalas, pelo fato do meristema apresentar maior intensidade de coloração na região periférica da túnica e corpo.

4.2 Análise bioquímica

4.2.1: Proteína total

Os resultados da quantificação de proteína total, dos extratos das gemas, exibiram valores que não variaram significativamente dentro das diferentes épocas. Os valores médios, segundo metodologia de Bradford (1976), dentro dos anos 1993 e 1994 estão apresentados na Tabela 4. Verificou-se que a laranja 'Pera Rio' mostrou comportamento semelhante ao da tangerina 'Ponkan'.

TABELA 4: Teores protéicos médios em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de 11 avaliações de gemas axilares de laranjeiras 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan', para os anos de 1993 e 1994, segundo a metodologia de Bradford (1996). Lavras, UFLA, 1997.

Espécie/Ano	'Pera Rio'	'Ponkan'
93	59,12	60,90
94	75,41	73,62

Esses valores constantes na Tabela acima são referentes às médias das diferentes épocas nas quais foram coletadas as gemas, resultante de 11 avaliações por ano. Não se observou diferenças entre as diferentes épocas do ano nas quais foram coletadas as gemas. As diferenças observadas nos teores médios entre os dois anos, de aproximadamente $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ pode ser atribuída principalmente à perdas protéicas

devido ao armazenamento das amostras em freezer -18°C . Nesta temperatura ainda são observadas reações de autólise ou degradação celular. As amostras do ano de 1993 permaneceram um tempo maior no freezer.

O padrão eletroforético para as duas espécies veio confirmar os resultados acima. Observou-se que, no decorrer das onze coletas efetuadas de maio a agosto o padrão de bandas não mostrou diferenças qualitativas ou quantitativas.

A Figura 10 exhibe os padrões obtidos para a laranja 'Pera Rio' e para a tangerina 'Ponkan', para o ano de 1994

A ausência de diferenças no teor protéico e padrão eletroforético não confirmam resultados anteriores, por ter sido utilizada a eletroforese unidirecional, onde Bernier, Kinet e Sachs (1981) observaram complemento protéico nas brácteas e peças florais bem diferente do encontrado em órgãos vegetativos; com repressão de genes que atuam na fase vegetativa e ativação de outros da fase reprodutiva; Essas diferenças foram somente detectadas com o emprego da eletroforese bidimensional, relatadas também por Barber e Steward, (1968); Jordan, (1993).

As diferenças encontradas, a nível metabólico, nas células, frente aos resultados obtidos, são atribuídas à mudanças a nível enzimático, onde pequeno percentual de alteração, já provoca grandes mudanças nas células. Também, alterações no complemento protéico ocorrem, segundo Kannangara et al., (1990); Nitsan (1962) e Zeewaart (1976), devido à eliminação de algum efeito inibitório, sendo a evocação floral resultado de mudanças precoces e qualitativas na expressão gênica (Pierard et al., 1980).

Apesar de observadas algumas diferenças na intensidade das bandas, na figura 10, não foi feita a análise densitométrica por achar-se que estes dados possam ter sido influenciados pelo armazenamento, provocando estas flutuações no padrão das bandas.

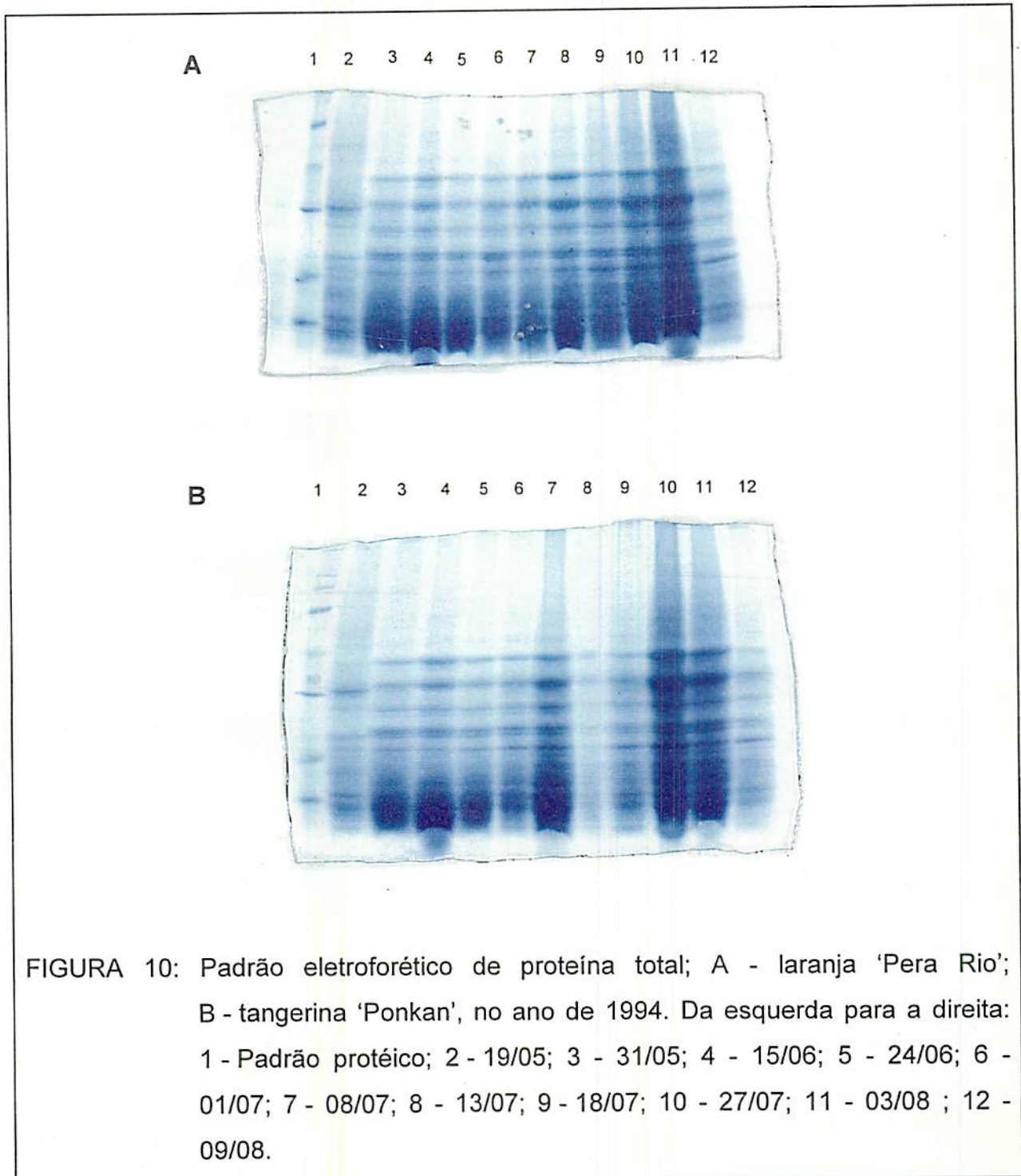


FIGURA 10: Padrão eletroforético de proteína total; A - laranja 'Pera Rio'; B - tangerina 'Ponkan', no ano de 1994. Da esquerda para a direita: 1 - Padrão protéico; 2 - 19/05; 3 - 31/05; 4 - 15/06; 5 - 24/06; 6 - 01/07; 7 - 08/07; 8 - 13/07; 9 - 18/07; 10 - 27/07; 11 - 03/08 ; 12 - 09/08.

Novas medições, com amostras colhidas recentemente ou acondicionadas em freezer - 85° C, fazem-se necessárias.

4.2.2 Isoenzimas

a) Análise eletroforética

Em relação à análise eletroforética, não pode ser observado pelos zimogramas das enzimas estudadas, malato desidrogenase (MDH) e fosfoglicose isomerase (PGI) (Figura 12), diferenças significativas na intensidade das bandas que justificassem uma afirmação de aumento da atividade respiratória com a indução floral.

Os resultados obtidos não surpreenderam, uma vez que, as amostras foram preparadas com gemas coletadas neste ano (1997). Observações visuais nas plantas, detectaram grande número de gemas florais precedendo a antese, nos períodos da coleta. A Figura 11 exhibe o comportamento da temperatura e chuvas ocorridas neste ano de 1997, notando-se com clareza um grande estresse hídrico nos meses de fevereiro e março, em relação à média dos últimos 30 anos; com uma elevada precipitação no mês de junho. Essas condições induziram as gemas a uma quebra de dormência em aproximadamente um mês de antecedência, em relação ao período normal nos outros anos.

Em condições normais, pela Figura 11, observa-se que o estresse hídrico e temperaturas baixas ocorrem em período que antecede a quebra de dormência, que se dá no final do mês de junho. O estresse hídrico de aproximadamente 3 meses, bem como o abaixamento da temperatura, no outono, são os grandes contribuintes para a

principal florada nas plantas cítricas. As condições climáticas observadas este ano levaram a uma indução floral precoce, nas plantas.

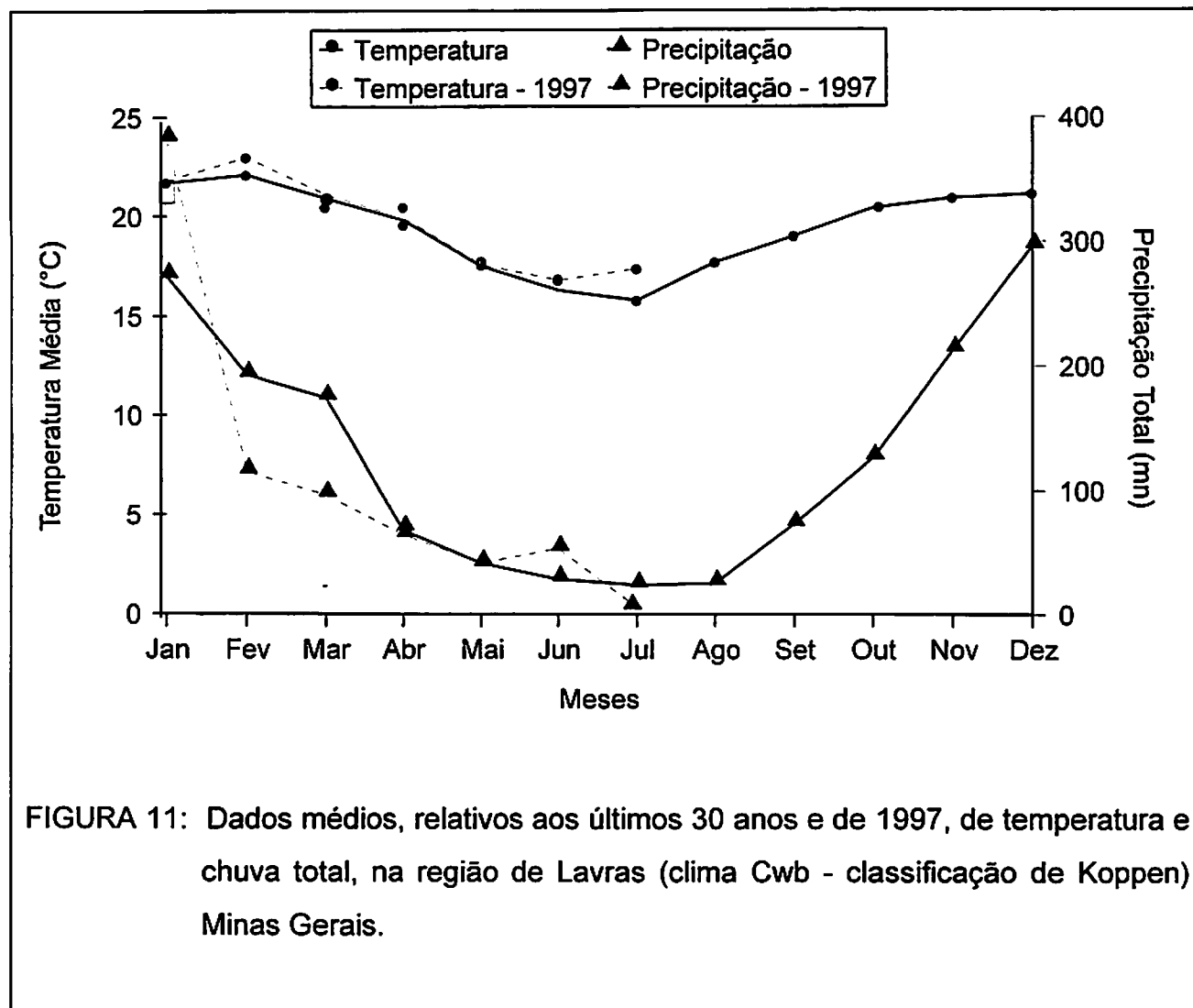


FIGURA 11: Dados médios, relativos aos últimos 30 anos e de 1997, de temperatura e chuva total, na região de Lavras (clima Cwb - classificação de Koppen) Minas Gerais.

b) Análise da atividade enzimática

A literatura é unânime em afirmar que ocorre aumento da atividade respiratória em gemas induzidas, bem como aumento na biossíntese de compostos precursores de ácidos nucleicos, nos tecidos em formação.

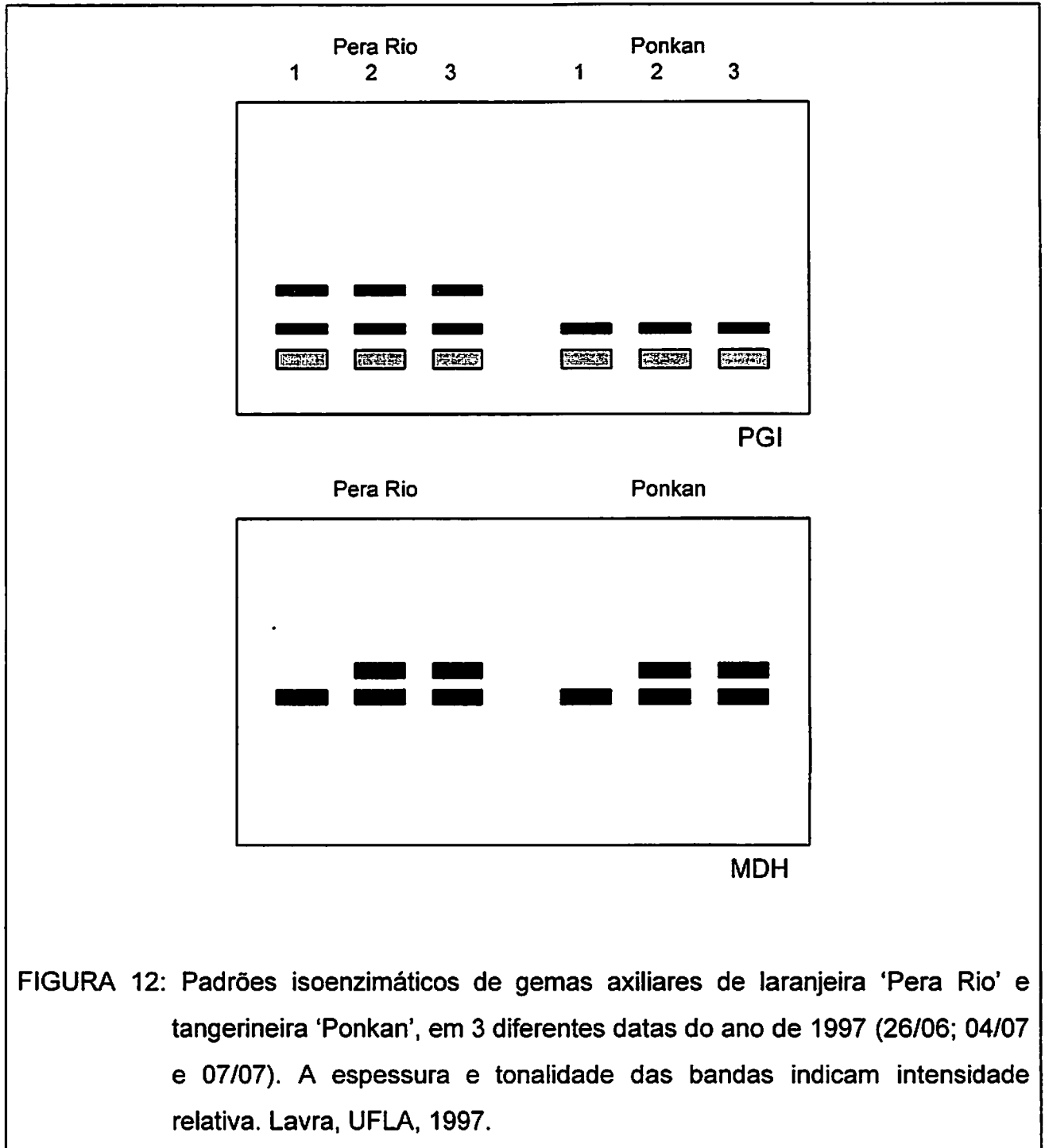


FIGURA 12: Padrões isoenzimáticos de gemas axiliares de laranjeira 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan', em 3 diferentes datas do ano de 1997 (26/06; 04/07 e 07/07). A espessura e tonalidade das bandas indicam intensidade relativa. Lavra, UFLA, 1997.

Baseado nestes aspectos mediu-se a atividade enzimática da Succinato Desidrogenase (SUDH) uma enzima exclusiva do Ciclo de Krebs, e da Glicose 6 - fosfato Desidrogenase (Gli-6-P-DH) uma enzima produtora de poder redutor, pela Rota da Pentose Fosfato.

Os resultados estão exibidos na Tabela 5, onde nota-se, alguma diferença em relação aos resultados obtidos com as enzimas MDH e PGI, entre as épocas de coletas. Porém não se caracterizou o aumento de atividade esperado com a indução, uma vez que seguiremos um melhor domínio da técnica, para se inferir de modo seguro.

TABELA 5: Atividades enzimáticas em laranjeiras 'Pera Rio' e tangerineira 'Ponkan', nas épocas: 1 - (26/06/97); 2 - (04/07/97) e 3 - (07/07/97). Dados em nanomoles/minuto/grama de amostra. Lavras, UFLA, 1997.

Tempo/ Enzima	'Pera Rio'			'Ponkan'		
	1	2	3	1	2	3
SUDH	90	90	60	20	50	50
Gli-6-P-DH	70	60	50	80	200	110

A medição da atividade enzimática, tanto em géis de poliacrilamida como em análise colorimétrica não funcionou nas condições presentes podendo ser repetida futuramente. Poderá ser uma ferramenta a mais para acompanhamento dos fenômenos da indução e evocação floral.

4.3 Influência do GA₃ na floração da Laranja Lima-sorocaba

O GA₃ inibiu o florescimento da laranjeira 'Lima-Sorocaba', reduzindo drasticamente o número de flores/ramo, com o aumento da dosagem (Tabela 6). Esses

resultados vão ao encontro de observações feitas por Garcia-Luis et al., (1986); Monselise e Halevy (1964); Bernier (1988); Bernier, Kinet, Sachs (1981); Barros e Rodrigues (1980) que detectaram mesmo comportamento, em outras cultivares.

A dosagem de 10 ppm já promoveu uma queda na floração, sendo que a dosagem de 120 ppm mostrou-se como a mais rigorosa no seu efeito redutor (Tabela 8). Os dados observados foram ajustados em uma equação de regressão linear (Tabela 7).

A Figura 13 ilustra o comportamento da floração em função do aumento da concentração de GA₃ aplicado.

TABELA 6: Resumo da análise de variância para efeito da aplicação do GA₃ na floração de laranjeiras 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	VALOR F	PROB.>F
BLOCO	3	42,0692503	14,023000834	3,6145	0,04515
DOSE	4	194,9501324	48,7375331	12,5624	0,00052**
RESÍDUO (A)	12	46,5555285	3,8796274		
PARCELAS	19	283,5749112			
AVALIAÇÕES	1	104,1639798	104,1639798	44,1966	0,00581*
RESÍDUO (B)	3	7,0704915	2,3568305		
Ava.*DOS	4	1,3366824	0,3341706	0,1434	0,96011
RESÍDUO (C)	12	27,9660457	2,3305038		
TOTAL	39	424,1121105			

Coeficiente de variação (A) = 29,306%

Coeficiente de variação (B) = 39,563%

Coeficiente de variação (C) = 22,714%

Transformação de dados = $\sqrt{x + 0,5}$

TABELA 7: Resumo da análise de variância para ajuste de uma equação de regressão para efeito da aplicação do GA₃ na floração da laranjeira 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.

CV	GL	SQ	QM
Regressão linear	1	191,8818	191,8818**
Resíduo	12	46,5555	3,8796

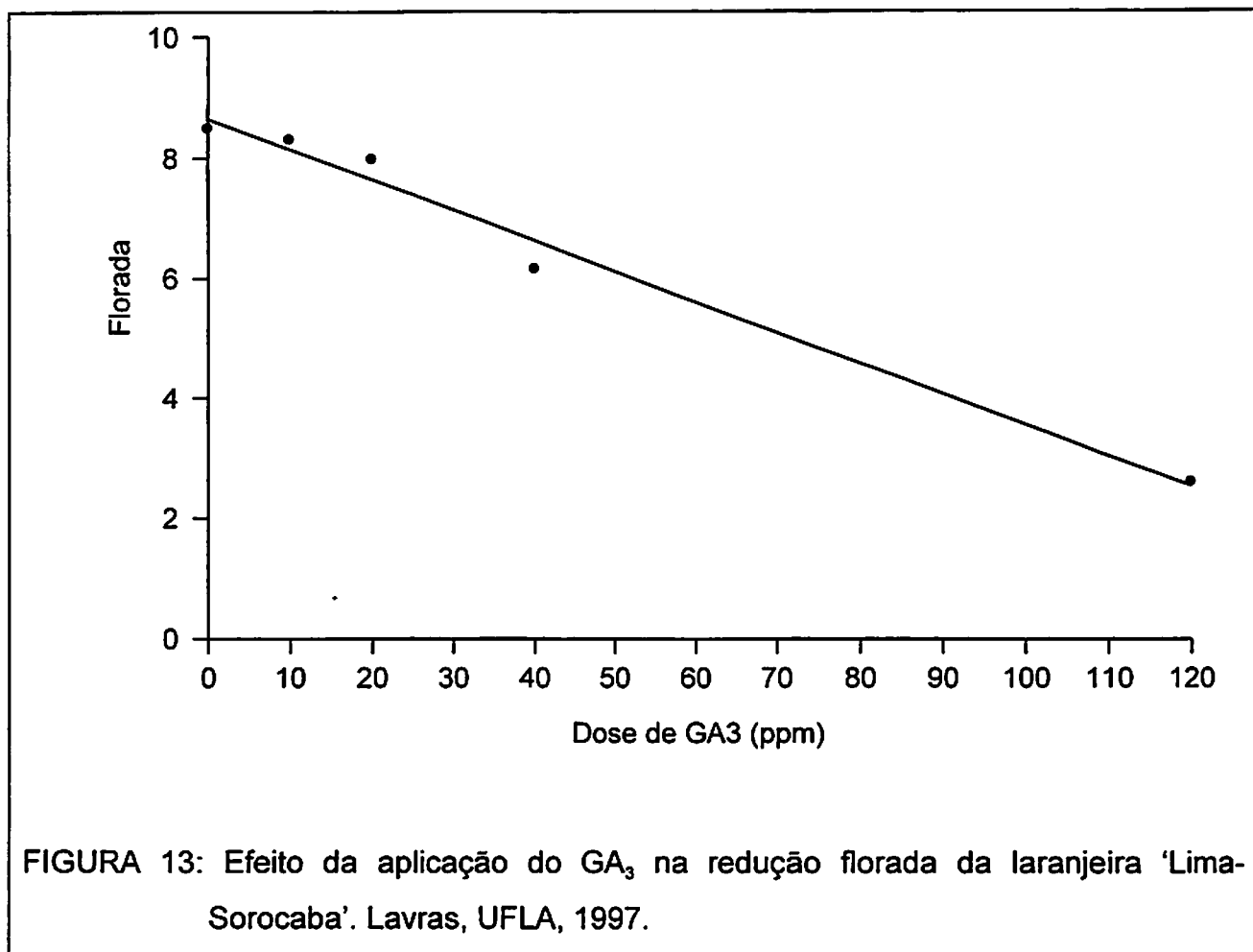
TABELA 8 Médias do número de flores das dosagens de GA₃, dentro do 1º e 2º surtos de floração da laranja 'Lima-Sorocaba'. Lavras, UFLA, 1997.

GA ₃	1ª Avaliação (28/08/95)	2ª Avaliação (21/09/95)
0	47,08 a	101,89 a
10	48,18 a	92,60 b
20	41,54 b	89,54 c
40	18,24 c	63,37 d
120	0,20 d	19,08 e

A análise das médias, na 1ª avaliação mostra que a concentração de 10 ppm não atuou de modo significativo, igualando-se à testemunha. Seu efeito foi significativo na 2ª avaliação, onde tem-se a florada principal da planta (Figuras 14b e 15a).

Os dois extremos, na produção dos frutos cítricos, são problemas: uma pequena floração não garantirá uma boa produção, bem como uma florada excessiva, não garantirá boa safra, seja pelo percentual de pegamento ou tamanho diminuto dos

frutos. Faz-se necessário, portanto, a manipulação da floração visando maior rentabilidade com a cultura cítrica.



Neste contexto, o uso de GA₃ mostrou-se muito eficiente na redução da floração da laranjeira 'Lima Sorocaba', principalmente na maior dosagem utilizada, de 120 ppm (Figura 15d).

A sua utilização poderá vir a contornar problemas como a alternância de colheitas oriundas de floradas irregulares nas diferentes safras; obter produções de frutos em florações extemporâneas e corrigir o tamanho diminuto ou excessivo do fruto; consequência de florada excessiva e escassa, respectivamente.



FIGURA 14: A - Moldura de 1 m² utilizada para procedimento de contagem de flores.
B - Planta testemunha em relação à aplicação de GA₃ (0 ppm). Lavras, UFLA, 1997.



FIGURA 15: Efeito das diferentes concentrações de GA_3 sobre a florada da laranja 'Lima Sorocaba'. A - 10 ppm; B - 20 ppm; C - 40 ppm; D - 120 ppm. Lavras, UFLA, 1997.

É importante ser salientado que, para a obtenção desta resposta satisfatória, foi observada com atenção a época de aplicação do fitohormônio, que se deu em meados do outono, uma vez que, a sensibilidade da gema é muito maior nesta época, tanto para laranjeiras como limoeiros e tangerineiras (Barros e Rodrigues, 1992).

Os resultados anatômicos e histoquímicos obtidos na primeira parte deste trabalho fornecem subsídios suficientes para que, desejando-se manipular a planta em seu período de dormência ou de gemas não induzidas, deve-se fazê-la até meados de junho. Ressalta-se que o monitoramento das distribuições das precipitações no período é uma conduta essencial.

5 CONCLUSÕES

- As gemas das axilas de ramos com espinhos não floresceram.
- A medição do diâmetro das gemas mostrou-se um procedimento eficiente para acompanhar os fenômenos decorrentes da indução, evocação e morfogênese floral. Gemas vegetativas apresentam diâmetro médio de 100 μm , com túnica composta por 3 camadas celulares, de formato cônico, recobrimdo o corpo. As gemas da laranjeira 'Pera Rio' mostraram valores um pouco maiores que os da tangerineira 'Ponkan' (80 μm).
- O estágio de gema floralmente determinada ocorreu, para a laranjeira 'Pera Rio', de meados a final de julho
- A tangerineira 'Ponkan' exibiu comportamento semelhante, com estágio de gema floralmente determinada variando dentro do mês de julho.
- O padrão eletroforético para proteína total não foi suficiente para determinar alterações a nível protéico nos meristemas; alterações essas detectáveis com a focalização isolétrica, sensível o suficiente para se captar mudanças a nível enzimático.

- Os resultados obtidos para a amostragens efetuadas no ano de 1997 mostram a necessidade de se acompanhar a distribuição de chuvas nos meses que antecedem a florada principal dos citros. O estresse hídrico mostrou-se um fator regulador da floração bastante importante.
- O GA₃ é um regulador de crescimento inibidor da floração em laranja 'Lima Sorocaba', com grande redução na florada nas dosagens de 40 e 120 ppm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, K.M.; MELIGI, M.A.; HUSSEIN, A.H.; AHMED, T.A. Mineral aspects of floral development in *Citrus*. 1. Changes in floral nitrogen, potassium e phosphorus. *Acta Horticulturae*, Brisbane, v.175, p.199-207, 1986.
- AGUSTI, M.; ALMELA, V.; PONS, J. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.67, n.2, p.203-210, May 1992.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- AMARAL, A.M. do. **Efeito de fontes de cálcio via foliar no abortamento de laranjeiras [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Pera Rio']**. Lavras: UFLA, 1995. 60p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- AMARAL, J.D. **Os citrinos**. Lisboa: Livraria Clássica, 1977. 753p.
- ANDRADE, J.M.B. **Avaliação das brotações em ramos com deficiência de magnésio e zinco em laranjeiras [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]**. Lavras: ESAL, 1984. 68p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- AUMENTA consumo interno de suco de laranja. **Circuito Agrícola/ABRACEN**, São Paulo, v.3, p.11, maio/jun. 1995.
- AYALON, S.; MONSELISE, S.P. Flower bud induction and differentiation in the shamouti orange. **Proceeding of the American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v.75, p.216-221, June 1959.

- BARBER, J.T.; STEWARD, F.C. The proteins of *Tulipa* and their relation to morphogenesis. **Developmental Biology**, New York, v.17, p.326-349, 1968.
- BARROS, S.A.; RODRIGUES, J.D. Efeito do ácido giberélico ($GA_3 + GA_{4+7}$) no controle da floração de primavera da limeira ácida "Tahiti" (*Citrus latifolia* Tanaka). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.3, p.137-140, jan. 1992.
- BARTHOLOMEW, E.T.; REED, H.S. General morphology, histology and physiology. In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1948. v.1, p.669-717.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.1, 305p.
- BERNIER, G. The control of floral evocation and morphogenesis. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.39, p.175-219, 1988.
- BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. Physiological signals that induce flowering. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1147-1155, Oct. 1993.
- BERNIER, G.; KINET, J.M.; JACQMARD, A.; HAVELANGE, A.; BODSON, M. Cytokinin as a possible component of the floral stimulus in *Sinapis alba*. **Plant Physiology**, Maryland, v.60, p.282-285, 1977.
- BERNIER, G.; KINET, J.M.; SACHS, R.M. **The physiology of flowering**, Boca Raton: CRC, 1981. v.1-3.
- BODSON, M.; OUTLAW, Jr.W. Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristema of *sinapis alba* at floral evocation. **Plant Physiology**, Maryland, v.79, n.2, p. 20-24, Aug. 1985.
- BOLDUC, R.J.; CHERRY, J.K.; BLAIR, B.O. Increase in, indoleacetic acid oxidase activity of winter wheat by cold treatment and gibberellic acid. **Plant Physiology**, Maryland, v., n.4, p.461-464, Apr. 1970.
- BOMMINENI, V.R.; GREYSON, R.I. Effect of gibberellic acid and indole -3- acetic acid on rowth and differentiation of cultured ear inflorescences of maize. **Plant Science**, Berkely, v.68, n. 2 p.239-247, 1990.
- BONNER, B.A.; GIFFORD, E. M; REED, N.M.R. Differential RNA synthesis in the shoot apex of *Pharbitis nil* during floral evocation. **Americam Journal of Botany**, Iowa, v.78, n.3 p.401-407, Mar. 1991.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-251, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Normais climatológicas**. Brasília, DF, 1990. P.7.
- CAMERON, S.H.; MÜLLER, R.T.; WALLAGE, A.; SARTORI, E. Influence of age of leaf, season of growth and fruit production on the size and inorganic composition of valencia orange leaves. **Proceeding of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.60, p.42-50, Dec. 1952.
- CASPAR, T.; LIN, T-P; KAKEFUDA, G.; BENBSOW, L.; PREISS, J. E SOMERVILLE, C. Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. **Plant Physiology**, Maryland, v.94, n.1 p.1181-1188, Apr. 1991.
- CASPER, T.; HUBER, S.C.; SOMMENVILLE, C. Alterations in growth photosynthesis and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Sinapis alba*. **Plant Physiology**, Maryland, v.79, n.2 p.11-17, Sept. 1985.
- CHEIKH, N.; BRENNER, M.L. Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves - effect of dark and light conditions and role of gibberellins and abscisic acid. **Plant Physiology**, Maryland, v.100, n.3, p.1230-1237, Nov. 1992.
- CHEIKH, N.; BRENNER, M.L.; HUBER, J.L.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose phosphate synthase by gibberellins in soybean and spinach plants. **Plant Physiology**, Maryland, v.100, n.3, p.1238, Nov. 1992.
- COEN, E.S.; CARPENTER, R. The metamorphosis of flower. **The Plant Cell**, Rockville v.5, p.1175-1181, Oct. 1993.
- CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. São Paulo: Livraria Rocca, 1987. Pt. 1-2.
- DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.D. de; PIO, R.M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 228p.
- ERICKSON, L.G. The general physiology of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (eds.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1968. v.2, p.86-122.
- ERNER, Y. Carbohydrate content associated with bud differentiation. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.6, p.489-716, June 1992.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. New York: J. Willey, 1960. 376p.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. New York: Pergamon, 1990. 588p.

- FARIA, A. de; BNDES, BNB, frutas e emprego. **Gazeta Mercantil Latino Americana**, São Paulo, 31 mar. 1997.
- FIGUEIREDO, J.O. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUES, O.; VIEGAS, F.C.P. (coords.). **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.1 p.241-278.
- FURR, J.R.; ARMSTRONG, W.W. Flower Induction in Marsh Grapefruit in the Coachella Valley, California. **Proceeding of the American Society for Horticultural Science**, Beltsville, n.67, p.176-182, June 1956.
- GALLO, J.R.; MOREIRA, S.; RODRIGUES, O.; FRAGA, C.G. Composição inorgânica das folhas de laranjeira baianinha, com referência à época de amostragem e adubação química. **Bragantia**, Campinas, v.19, n.16, p.229-246, mar. 1960.
- GARCIA-LUIS, A.; ALMELA, V.; MONERRI, C.; AUGUSTI, M.; GUARDIOLA, J.L. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiv*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.66, n.3, p.515-520, Mar.1986.
- GARCIA-LUÍS, A.; KANDUSER, M.; SANTAMARINA, P.; GARDIOLA, J.L. Low temperature influence on flowering in *Citrus*. The separation on inductive and bud dormancy releasing effects. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.86, p.648-652, Dec. 1992.
- GIFFORD Jr. E.M.; TEPPER, H. B. Ontogeny of the inflorescence in *Chenopodium album*. **American Journal of Botany**, Iowa, v.48, p.637-67, 1961.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; GOLOMB, A. The carbohydrate balance of alternate - bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. **Journal American Society for Horticultural Science**. Mount Vermon, v.107, n.2, p.206-208, 1982.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; MONSELISE, S.P. Hormonal control of flowering in citrus trees and other woody perennials. In: CARR, D.J. **Plant growth substances**. Heidelberg: Springer, 1972. p.758-766.
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. 2. ed. New York: Pergamon, 1983. 677p.
- GREEN, P.B. A theory for inflorescence development and flower formation based on morphological and biphysical analysis in *Echeveria*. **Planta**, New York, v.175, n.1, p.153-169, July 1988.

- GUARDIOLA, J.L. Varietal response to nutrition. In: INTERNACIONAL CITRUS CONGRESS, Florida, 1977. **Proceeding...** Florida: International Society of Citriculture, 1977. v.1, p.26-30.
- ∅ GUARDIOLA, J.L. Florescimento e produtividade dos citrus. **Laranja & Cia.**, Matão, v.33, p.4-6, jul./set. 1992.
- HAVELANGE, A. BERNIER, G. Elimination of flowering and most cytological changes after selective long-day exposure of the shoot tip *Sinapis alba* L. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.81, n.3, p.399-402, Mar. 1991.
- HAVELANGE, A. BERNIER, G. Cation fluxes in the of *Sinapis alba* during the floral transition. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.87, n.3, p.353-358, Mar. 1993.
- ∅ HAVELANGE, A.; BODSON, M.; BERNIER, G. Partial floral evocation by exogenous cytokinin in the long-day *Sinapis alba*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.67,n.4, p.695-701. Aug. 1986.
- HAZEBROEK, J.P. ; METZGER, J. D. Thermoinductive regulation of gibberelin metabolism in *Thilaspia arvensis* L. I - metabolism of [²H]-ent-Kaurenoic acid and [¹⁴C] Gibbereliin A₁₂ - Aldehyde. **Plant Physiology**, Maryland, v.94, n.1, p.157-165, Sept. 1990.
- HOFFMANN, R.; VIEIRA, S. **Análise de regressão: uma introdução à econometria**. 2. ed. São Paulo: Hucitec, 1987. p.379.
- HUALA, E.; SUSSEX, I.M. Determination and cell interactions in reproductive meristems. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1157-1165, Oct. 1993.
- ∅ IWAHORI, S.; GARCIA-LUIS, A.; SANTAMARINA, P.; MONERRI, C.; GUARDIOLA, J.L. The influence of ringing on bud development and flowering in *Satsuma mandarin*. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.231, p.1341-1346, Oct. 1990.
- JENSEN, W.A. **Botanical microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1962. 408p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.
- JONES, W.W.; PARKER, E.R. Seasonal trends in mineral composition of valência orange leaves. **Proceeding of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.57, p.101-103, June 1951.
- ∅ JORDAN, B.R. **The molecular biology of flowering**. Wallingford: CAB, 1993. 266p.
- JUAN, E.G.S. de. **El cultivo de los agrios**. Madri: Instituto Nacional de Investigaciones Agronomicas, 1960. 801p.

- KANNANGARA, T.; DURKIN, J.P.; APSIMON, J.; WIGHTMAN, F. Changes in the polypeptide profile during photoinduction of *Xanthium strumarium*, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.78, n.4, p.519-525, Apr. 1990.
- KHATIBU, A.I.; CARPENTER, A.J.; MAKAME, M.H.; SALEH, M.M. Climatic effects on the flowering and fruiting of woody perennial fruit trees in Zanzibar. **Acta Horticulturae**, Brisbane, v.153, p.7-61, June 1985.
- KUSHAD, M.M.; ORVOS, A.R. Relative changes in polyamines during citrus flower development. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.8, p.946-948, Aug. 1990.
- LEJEUNE, P.; BERNIER, G.; REQUIER, M. C.; KINET, J.M. Sucrose increase during induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long day plant *Sinapis alba* L. **Planta**, Würzburg, v.190, n.1, p.71-74, May 1993.
- LEWIS, L. N.; COGGINS Jr., C.W.; HIELD, H.Z. The effect of biennial bearing and NAA on the carbohydrate and nitrogen composition of wilking Mandarin leaves. **Proceeding of American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v.84, p.147-151, June 1963.
- LORD, E.M.; ECKARD, K.J. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington Navel Orange) I floral and inflorescence ontogeny. **Botanical Gazette**, Chicago, v.146, n.3, p.320-326, Sept. 1985.
- LORD, E.M.; ECKARD, K.J. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington Navel Orange) II alteration of development fate of flowering shoots after GA₃ treatment. **Botanical Gazette**, Chicago, v.148, n.1, p.17-22, Mar. 1987.
- MARINHO, C.S. Manejo para a produção extemporânea de frutos de tangoreira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck × *Citrus reticulata* Blanco cv. Murcote). Lavras: ESAL, 1994. 73p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; SOMERVILLE, C.R. Effect of light quality and vernalization on late-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Maryland, v.91, n.3, p.770-776, Mar. 1990.
- MEEKS-WAGNER, R. Gene expression in the early floral meristem. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1167-1174, Oct. 1993.
- MELZER, S.; MAJESWSKI, D.M.; APEL, K. Early changes in gene expression during the transition from vegetative to generative growth in the long-day plant *Sinapis alba*. **The Plant Cell**, Rockville, v.2, p.953-961, Oct. 1990.
- MEYEROWITZ, E.M.; SMYTH, D.R.; BOWMAN, J.L. Abnormal flowers and pattern formation in floral development. **Development**, Cambridge, v.106, p.209-217, 1989.

- MONSELISE, S.P.; HALEVY, A.H. Chemical inhibition and promotion of citrus flower bud induction. **Proceeding of American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v.84, p.141-145, June 1964.
- MOREIRA, C.S. Clima e produtividade na citricultura. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUTIVIDADE DE CITRUS, 1, Jaboticabal, 1985. **Anais ... 2.ed.** Jaboticabal: FCAV, 1985. p.13-19.
- MOSES, P.B.; CHUA, N.H. Light switches for plant genes. **Scientific American**, Madison, v.258, n.4, p.64-69, Apr.1988.
- MURFET, I.C. Environmental interaction and the genetics of flowering. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.253-278, 1977.
- NIR, I.; GOREN, R.; LESHEM, B. Effects of Water Stress Gibberellic Acid and 2-*Chloroethyltrimethylammoniumchloride* (CCC) on flower differentiation in "Eureka" lemon trees. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Mount Vermon, v.97, n.6, p.774-748, Nov. 1972.
- NITSAN, J. Eletrophoretic patterns of *Xanthium* leaf extracts as affected by physiological age leaf, photoperiod e age of plant. **Plant Physiology**, Maryland, v.37, n.3, p.291-295, May 1962.
- OGATA, T. **Influência das cultivares, surtos vegetativos e tamanho das folhas nos teores de nutrientes foliares dos citros**. Lavras: ESAL, 1980. 79p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- OKAMURO, J.K.; DEN BOER, B. G.W.; JOFUKU, K.D. Regulation of *Arabidopsis* Flower. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1183-1193, Oct. 1993.
- ONO, M.; YAMADA, K.; SAGE, K.; OKAZAKI, M.; HARADA, H.. Changes in vitro translated polypeptides of *Pharbitis nil* chois; strain Violet Cotyledons during the first flower inductive and non inductive photoperiods. **Plant Science**, Berkeley, v.78, n.1, p.11-18, 1991.
- PANORAMA da citricultura brasileira. **Circuito Agrícola/ABRACEN**, São Paulo, v.4, p.7-9, jun. 1996.
- PEETERS, A.J.; GERARDS, W.; BARENDSE, G.W.M.; WULLEMS, G.J. In vitro flower bud formation in tabbaco: interaction of hormones. **Plant Physiology**, Maryland, v.97, n.1, p.402-408, Sept. 1991.
- PHARIS, R.P.; EVANS, L.T.; KING, R.V.; MANDER, L.N. Gibberellins endogenous and applied, in relation to flower induction in long-day plant *Lolium temulentum*. **Plant Physiology**, Maryland, v.84, n.4, p.1132-1138, Aug. 1987.

- PIERARD,D.; JACQMARD, A., BERNIER,G.; SALMON,J. Apearance and Disappearance of proteins in the shoot apical meristem of *Sinaps alba* in transition to Flowering. **Planta**, New York, v.150, n.5, p.397-405, Dec. 1980.
- POPHAM, R.A.; CHAN, A.P. Origin and development of the receptacle of *Chrysanthemum morifolium*. **American Journal of Botany**, Iowa, v.39, p.329-339, 1952.
- RAMALHO SOBRINHO, R. **Caracterização do surto de desenvolvimento primaveril em 3 espécies de citros**. Lavras: ESAL, 1986. 106p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- RANDHAWA, G.S.; DINSA, H.S. Time of blossom-bud differentiation in citrus. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v.50, p.165-171, June 1947.
- RODRIGUES, O. Nutrição e adubação dos citros. In: RODRIGUES, O.; VIEGAS, F.C.P. (coords.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980.v.2, p.385-430.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. California: Wadsworth, 1991. 682p.
- SANTOS, C.D.; TERRA, W.R. Plasma Membrane - associated amylase and trypsin - intracelular distribution of digestive enzymes in the midgut of the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Insect Biochemistry**, Elmsford, v.14, n.15, p.587-594, 1984.
- SANZ, A.; MONERRI, C.; GONZALEZ-FERRER, J.; GUARDIOLA, J.L. Changes in carbohydrate and mineral elements in *Citrus* leaves during flowering and fruit. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.69, p.93-98, Jan. 1987.
- SASS, J. **Botanical microtechnique**. Iowa: Iowa College, 1951. 228p.
- SCHWARZ-SOMMER, Z.; HUIJSER, P.; NACKEN, W.; SAEDLER, H.; SOMMER,H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. **Science**, Washington, v.250, n.4983, p.931-936, 1990.
- SHARMA,A.K.;SHARMA,A. **Chromossome techniques theory and practice**, butterworths. 2. ed. London: University Park, 1972. 575p.
- SMITH, P.F.; REUTHER, W. Seasonal changes in valencia orange tress. I. Changes in leaf dry weight, ash and macronutrientes elements. **Proceeding of the American Society for Horticultural Science**, Michigan, v.55, p.61-72, June 1950.

- SOUTHWICK, S.M.; DAVENPORT, T.L. Characterization of water stresses and low temperature effects on flower induction in *Citrus*. **Plant Physiology**, Maryland, v.81, n.1, p.26-29, May 1986.
- SOUTHWICK, S.M.; DAVENPORT, T.L. Modification on the water stress-induced floral response in "Tahiti" lime. **Journal American Society Horticulturæ Science**, Mount Vermon, v.112, n.2, p.231-136, Mar. 1987.
- SOUZA, M. Adubação das plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.5, n.52, p.26-31, abr. 1979.
- SUNG, Z.R.; BELACHEW, A.; SHUNONG, B.; BERTRAND-GARCIA, R. EMF, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. **Science**, Washington, v.258, p.1645-1647, Dec. 1992.
- THOMAS, R.G. Floral induction and the stimulation of cell division in *Xanthium*. **Science**, Washington, v.140, n.3562, p.332-349, 1963.
- THOMPSON, W.F.; WHITE, M.J. Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Washington, v.2, p.23-66, 1991.
- VAN DER KROL, A.R.; CHUA, N.H. Flower development in petunia. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, 1195-1203, Oct. 1993.
- VEIT, B.; SCHIMIDT, R.J.; HAKE, S.; YANOFISKY, M.F. Maize floral development: new genes and old mutants. **Plant Cell**, Rochville, v.5, p.1205-1215, Oct. 1993.
- VILLAFANE, V.E.; MUNOZ, F.J.E.; TORRES, H.R. Floracion crecimiento y maduracion de la Naranja Valle Washington *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Acta Agronomia**, Palmira, v.39, n.3/4, p.142-149, jul-dec. 1989.
- WILSON, R.N.; HECKMAN, J.W.; SOMERVILLE, C.R. Gibberelin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. **Plant Physiology**, Maryland, v.100, n.1, p. 403-408, Sept. 1992.
- ZEEVAART, J.A.D. Physiology of flower formation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto. v.27, p.321-348, 1976.
- ZEEVAART, J.A.D.; GAGE, D.A. Ent-kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants *Spinacia oleacea* L. and *Agrostemma githago* L. **Plant Physiology**, Maryland, v.101, n.1, p.25-29, Jan. 1993.