Lia Chaer

Estudo para o estabelecimento de uma nova estratégia de clonagem *in vitro* de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados.

Study to develop a new strategy to *in vitro* propagation of *Cattleya* and *Cymbidium* (Orchidaceae) using the lateral buds of etiolated shoot.

São Paulo

2012

Lia Chaer

Estudo para o estabelecimento de uma nova estratégia de clonagem *in vitro* de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados.

Study to develop a new strategy to *in vitro* propagation of *Cattleya* and *Cymbidium* (Orchidaceae) using the lateral buds of etiolated shoot.

Versão revisada (o original encontra-se disponível no instituto de Biociências da USP).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy

São Paulo

2012

Chaer, Lia

Estudo para o estabelecimento de uma nova estratégia de clonagem in vitro de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados / Lia Chaer ; orientador Gilberto Barbante Kerbauy. -- São Paulo, 2012.

111 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

Versão revisada.

1. Orchidaceae. 2. Estiolamento. 3. Micropropagação. 4. Hormônios Vegetais. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica. II. Título.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Helenice Mercier

Prof. Dr. Rogério Mamoru Suzuki

Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy

Orientador

São Paulo

2012

Dedicatória

Dedico à Diana, minha irmã gêmea,
pelas alegrias de nossa infância.

Epígrafe

“Eu atravesso as coisas - e no meio da travessia não vejo! - só estava era entretido na ideia dos lugares de saída e de chegada. Assaz o senhor sabe: a gente quer passar um rio a nado, e passa; mas vai dar na outra banda é num ponto mais embaixo, bem diverso do que em primeiro se pensou (...) o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.”

(João Guimarães Rosa, 1986).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, pela amizade, pelo apoio e pela confiança ao longo de tantos anos de convívio e entusiasmo pela pesquisa. Agradeço por ter me incentivado quando tudo parecia perdido.

À Profa. Dra. Helenice Mercier, pelo exemplo de dedicação e seriedade na pesquisa. O sucesso de seus alunos comprova sua competência e seriedade.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi, por seus conselhos valiosos e por sua incontestável criatividade na execução de experimentos. Também por ser um exemplo de serenidade quando necessário e de dinamismo nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, por ter aberto as portas de seu Laboratório, possibilitando as quantificações de etileno e CO₂. Agradeço também sua disposição em ajudar na busca de explicações para os resultados obtidos.

Ao amigo, colega de trabalho e mestrando Lucas M. Félix, por ter suportado meus momentos de mau humor e pessimismo, quando tudo dava errado (e foram muitas as vezes em que isso aconteceu). Por sempre ter me mostrado um lado bom das coisas e ter sido meu braço direito na execução deste trabalho. Sem sua ajuda eu certamente teria desistido, obrigada.

À amiga Maria Aurineide Rodrigues (Auri), por ter tutorado os meus primeiros passos na pesquisa, mostrando que nunca é tarde para procurar novos caminhos. Por ter me dado tantas dicas valiosas ao longo deste percurso.

À amiga Aline Bertinatto, por ajudar a desviar de obstáculos que por vezes pareciam intransponíveis. Por auxiliar na finalização de relatórios com sua exímia organização e clareza.

Aos colegas de laboratório (em ordem alfabética): Alejandra, Aline T., Bruno, Cassia, Leo, Max, Michel, Nielda, Paula, Paulo, Paulo Marcelo, Rafael e Rosana; e também aos ex-colegas: Alessandra, Camila, Cíntia, Ilton e Thaís, pelos momentos de descontração na hora do café e por estarem sempre dispostos a ajudar e a conversar.

À Ana Maria, que auxiliou a organização, viabilizando o trabalho no laboratório, e por estar sempre disposta a ajudar e a trocar ideias.

À Suzy, por proporcionar muito mais do que um ambiente limpo, trazendo alegria e descontração aos corredores do departamento.

À minha mãe, Eliana, e ao Paulo, por terem me apoiado e aconselhado, por não terem me permitido deixar a bola cair, mesmo quando ela já estava murcha, e por cuidarem tão bem das minhas orquídeas (elas também agradecem).

Ao meu pai, Márcio, por ser um exemplo de dinamismo e praticidade a ser seguido (quase sempre), por me apoiar e incentivar a continuar e finalizar este trabalho.

Aos meus irmãos, Ivan e Iúri, por continuarem por perto (mesmo morando em outros países), por se preocuparem comigo e estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Tunico, por seu carinho e compreensão, principalmente nesse último ano tão difícil da minha vida. Agradeço por ter me mostrado que existe um mundo lá fora, que há muitas coisas mais importantes do que o trabalho e que não podem ser deixadas de lado.

Aos meus grandes e melhores amigos: Ana, Camila, João, Júlia, Lia, Marina, Pic, Rafael e Vivian pelos momentos de diversão e descontração e por estarem sempre por perto.

Ao carinho sincero de Lua, Sandro, Leo e Nina, essa família tão querida que me adotou quando eu mais precisei e me estimulou a ir atrás de meus objetivos.

À Frida e ao Zeh. Acho que eles foram os únicos que acompanharam de perto todo o percurso deste trabalho, às vezes me atrapalhando, mas na maior parte do tempo me ajudando e dando a força e o carinho necessários para seguir em frente.

Agradeço a todos aqueles aqui não nomeados que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes ao meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro nos primeiros 18 meses de execução deste trabalho.

Índice

I. Introdução	1
I.1 Família Orchidaceae	1
I.2 O cultivo de orquídeas e a cultura de tecidos	2
I.3 A organogênese vegetal <i>in vitro</i> e a estabilidade genética	6
I.4 Papel dos meristemas no desenvolvimento vegetal	7
I.5 Sinais envolvidos no controle meristemático	9
I.5.1 Crescimento no claro e no escuro	9
I.5.2 Condições <i>in vitro</i> e desenvolvimento vegetal	10
I.5.3 O etileno e o crescimento caulinar	11
I.5.4 A giberelina (GA) e o crescimento caulinar	13
I.5.5 O óxido nítrico em vegetais	16
I.6 O desenvolvimento vegetal e a relação entre fontes e drenos	17
I.7 <i>Catasetum fimbriatum</i> como modelo de estudo da organogênese <i>in vitro</i>	18
II. Objetivos	20
III. Material e métodos	21
III.1 Material vegetal.....	21
III.1.1 <i>Catasetum fimbriatum</i>	22
III.1.2 <i>Cymbidium</i>	22
III.1.3 <i>Cattleya labiata</i>	23
III.2 Determinação do controle experimental em <i>Catasetum fibriatum</i> e <i>Cymbidium</i>	24
III.3 Tratamentos	24
III.3.1 Efeitos do etileno, giberelina e NO sobre o estiolamento de <i>C. fimbriatum</i> e <i>Cymbidium</i>	24
III.3.2 Efeito do etileno e da giberelina no desenvolvimento de plantas de <i>Cattleya</i> no escuro	25
III.4 Condições de incubação	26
III.5 Parâmetros biométricos	26
III.6 Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de etileno e CO ₂ em <i>C. fimbriatum</i> , <i>Cymbidium</i> e <i>Cattleya</i>	27
III.6.1 Quantificação de etileno	27
III.6.2 Quantificação de CO ₂	28
III.7 Análise estatística dos dados	28

IV. Resultados	29
IV.1 <i>Catasetum fimbriatum</i>	29
IV.1.1 Determinação do controle experimental	29
IV.1.2 Efeitos da ausência de luz no desenvolvimento de <i>C. fimbriatum</i>	30
IV.1.3 Efeitos da giberelina no desenvolvimento de <i>C. fimbriatum</i>	31
IV.1.4 Efeitos do etileno no desenvolvimento de <i>C. fimbriatum</i>	37
IV.1.5 Efeitos do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento de <i>C. fimbriatum</i> ..	42
IV.1.6 Emissão de etileno em plantas de <i>C. fimbriatum</i>	46
IV.1.6.1 Efeito da giberelina na emissão de etileno em <i>C. fimbriatum</i>	48
IV.1.6.2 Efeito do etileno na emissão de etileno em <i>C. fimbriatum</i>	49
IV.1.6.3 Efeito do NO na emissão de etileno de <i>C. fimbriatum</i>	50
IV.1.7 Emissão de CO ₂ em plantas de <i>C. fimbriatum</i>	50
IV.2 <i>Cymbidium</i>	52
IV.2.1 Efeitos da ausência de luz no desenvolvimento de <i>Cymbidium</i>	52
IV.2.2 Efeitos da giberelina no desenvolvimento de <i>Cymbidium</i>	55
IV.2.3 Efeitos do etileno no desenvolvimento de <i>Cymbidium</i>	60
IV.2.4 Efeitos do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento de <i>Cymbidium</i>	64
IV.2.5 Emissão de etileno em plantas de <i>Cymbidium</i>	68
IV.2.5.1 Efeito da giberelina na emissão de etileno em <i>Cymbidium</i>	69
IV.2.5.2 Efeito do etileno na emissão de etileno em <i>Cymbidium</i>	70
IV.2.5.3 Efeito do NO na emissão de etileno em <i>Cymbidium</i>	71
IV.2.6 Emissão de CO ₂ em plantas de <i>Cymbidium</i>	72
IV.3 Efeito do etileno e da giberelina sobre o desenvolvimento e a emissão de etileno e CO ₂ em plantas de <i>Cattleya</i>	74
IV.4 Efeito do cultivo prolongado de plantas de <i>Cattleya</i> incubadas em frascos vedados no claro.....	76
V. Discussão	78
V.1 Análises morfológicas	78
V.2 Análises das emissões de gases	85
V.2.1 Emissão de etileno.....	85
V.2.2 Emissão de CO ₂	88
V.3 Efeito do etileno e da giberelina sobre o desenvolvimento e a liberação de etileno e CO ₂ em plantas de <i>Cattleya</i> e perspectivas no estudo do alongamento caulinar sob a luz....	90
V.4 Breve caracterização das diferentes relações filogenéticas, hábitos e estratégias de sobrevivência dos gêneros estudados	92
VI. Conclusão	94
Referências bibliográficas	95
Resumo.....	108
Abstract.....	110

Introdução

I.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas entre as angiospermas, sendo representada por mais de 850 gêneros e cerca de 35.000 espécies (Miller e Warren, 1996). Esse número corresponde a 8% de todas as espécies de plantas com sementes (Govaerts, 2006) e o índice tende a aumentar, já que apenas em 2008 o *International Plant Names Index* (IPNI), uma das mais importantes bases de dados taxonômicos, registrou cerca de 400 novas espécies de orquídeas. Estas plantas são encontradas em praticamente todas as regiões do planeta, desde as proximidades do polo Ártico até o polo Antártico. O maior número de espécies e gêneros se concentra nas regiões tropicais, onde predominam as formas epífitas e rupícolas, enquanto fora dos trópicos predominam as formas terrícolas (Kerbauy, 1995).

A ampla distribuição geográfica, climática e ambiental envolve a necessidade de numerosos caracteres adaptativos presente nas orquidáceas para sobrevivência nos diferentes habitats. As adaptações selecionadas evolutivamente refletem na diversidade dessa família, traduzida em diferentes padrões de crescimento, coloração, forma e suculência das folhas e flores das espécies.

O interesse do homem pelo cultivo e estudo e das plantas da família Orchidaceae existe há séculos, devido ao seu valor ornamental e à sua ampla diversidade, entre outros motivos (Hasegawa, 2005). Desde o início, entretanto, o cultivo de orquidáceas tem enfrentado problemas relacionados à multiplicação, tanto sexuada quanto vegetativa.

Sob condições naturais, a propagação de orquídeas ocorre por meio da dispersão de sementes extremamente reduzidas, produzidas aos milhares dentro de frutos do tipo cápsula (Figura 1). Apesar da elevada dispersão destas pelo vento, sua efetiva germinação é bastante reduzida. Isso se deve fundamentalmente ao fato de as sementes serem desprovidas de reserva nutritiva, ou endosperma, e apresentarem embriões extremamente pouco desenvolvidos, às vezes constituídos por apenas uma centena de células. A germinação destas sementes exige a associação simbiótica com fungos micorrízicos, que lhes garante sobrevivência e resulta na retomada do desenvolvimento do embrião.

Na germinação simbiótica, acredita-se que o fungo forneça os suplementos necessários ao desenvolvimento da orquídea, e que mesmo com a associação, apenas algo entre 0,2% e 0,3% das sementes germine em ambiente natural (Singh, 1992).

Figura 1. Cápsula aberta de um híbrido de *Cattleya* exibindo suas diminutas sementes. Barra = 1cm.

As dificuldades na multiplicação de orquídeas no ambiente natural, somadas ao extrativismo ilegal para comercialização e à destruição dos habitats destas plantas, tem conduzido muitas espécies à extinção. Atualmente, as orquídeas figuram de maneira proeminente na lista vermelha feita pela União Internacional da Conservação da Natureza e Recursos Naturais (*International Union of Conservation of Nature and Natural Resources* – IUCN). Além disso, a família Orchidaceae foi incluída na relação da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção, (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* – CITES), o que teve por resultado intenso controle e monitoramento do comércio internacional destas plantas, para assegurar que as transações econômicas não agravem o risco de sobrevivência e a biodiversidade das espécies (Chugh *et al.*, 2009).

I.2 O cultivo de orquídeas e a cultura de tecidos

Atualmente, o cultivo de orquídeas forma um mercado especializado, valorizado, com liquidez de mercado e altamente rentável. Este cenário resulta de um processo intensificado ao longo das últimas décadas, em que o cultivo de orquídeas envolveu colecionadores e pequenos agricultores. As coleções de orquídeas mais antigas eram compostas apenas por plantas extraídas da natureza, pois havia carência de técnicas de multiplicação (Hew e Yong, 1997).

Em 1921, Lewis Knudson, pesquisador da universidade de Cornell, nos Estados Unidos, desenvolveu um método para germinar assimbioticamente as sementes de orquídeas, fornecendo os nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião, na forma de um substrato gelatinoso e asséptico (Arditti, 1996). O método desenvolvido por Knudson foi o primeiro procedimento prático descrito de multiplicação *in vitro* de vegetais, trazendo inovações tecnológicas que abririam, décadas mais tarde, caminho para o surgimento da cultura de tecidos, e consolidando o elemento que faltava para o início de um mercado ainda inexplorado e de grande potencial.

A expansão do mercado de orquídeas e a produção crescente de novos híbridos de alta qualidade tornaram crucial o desenvolvimento de um método eficiente e rápido de propagar vegetativamente, ou clonar essas plantas. Ao longo de muito tempo, o único método disponível para a propagação clonal de orquídeas consistia na simples divisão de plantas adultas. Embora seja utilizado até os dias atuais, tal método é incompatível com a demanda atual do mercado. Ainda que sejam plantas herbáceas, as orquídeas apresentam um desenvolvimento vegetativo extremamente lento, podendo levar cerca de quatro anos ou mais para atingir a idade adulta. Mesmo após a polinização, o desenvolvimento da cápsula contendo as sementes pode levar mais de um ano para se completar (Figura 2).

Figura 2. Desenvolvimento da cápsula de um híbrido de *Cattleya* após a polinização. A - 60 dias, B - 1 ano e C - 1 ano e 2 meses. Barra = 1cm.

Muitas espécies apresentam crescimento monopodial, como é o caso das *Vandas* e gêneros afins, não produzindo ramificações laterais. Some-se a isso a sempre presente e significativa possibilidade de infestação por patógenos, decorrente de manuseios inadequados, e teremos um quadro nítido das limitações comerciais relacionadas com esse sistema tradicional de multiplicação. Assim, talvez mais do que outras plantas comerciais importantes,

a multiplicação clonal de orquídeas exigia, e ainda exige, o desenvolvimento de técnicas mais rápidas, eficientes e seguras (Kerbaudy e Chaer, 2011).

Em 1960, na França, Georges M. Morel, um virologista de plantas, descobriu, quase que por acaso, a importância do emprego da técnica de cultura de tecidos para a propagação clonal de orquídeas. A descoberta do potencial regenerativo de tecidos meristemáticos e submeristemáticos caulinares foi feita ao tentar obter plantas de *Cymbidium* livres de vírus a partir do isolamento de pequenas porções de ápice caulinar. Morel observou que, diferente do que esperava, formaram-se pequenas estruturas verdes e arredondadas, semelhantes aos protocormos de sementes germinadas de orquídea. Essas estruturas, se adequadamente manuseadas, se multiplicavam com relativa facilidade em progressão geométrica. Mais tarde estas estruturas viriam a ser cunhadas de “*protocorm-like bodies*” (PLBs), e até hoje são assim conhecidas. Em 1963 foi publicado o primeiro protocolo detalhado sobre a multiplicação *in vitro* de *Cymbidium*, com a utilização de cultura de meristemas (Wimber, 1963). Abria-se, dessa forma, o caminho para a micropropagação de orquídeas em escala comercial, que ensejou o início do emprego desta técnica para plantas não-orquidáceas (Kerbaudy e Chaer, 2011).

Entre as décadas de 1960 e 1970, as técnicas de micropropagação foram crescentemente aplicadas e aperfeiçoadas, inclusive em pequenos laboratórios comerciais dos Estados Unidos, Europa, Austrália e Ásia; num movimento que foi ainda mais acentuado nos anos 1980 (Hartmann *et al.*, 2002).

No Brasil, a aplicação comercial da micropropagação é relativamente recente. Há diversos grupos de pesquisa trabalhando com cultura de tecidos e clonagem de plantas de interesse comercial. No entanto ainda não é tão comum a instalação de laboratórios associados a viveiros, exceto em orquidários comerciais e em empresas especializadas em reflorestamento (Grattapaglia e Machado, 1998).

Atualmente, a cultura de tecidos é utilizada com sucesso para elevar a taxa de multiplicação vegetativa de plantas com crescimento lento, para a eliminação de patógenos, a redução de custos, a obtenção de plantas ornamentais com características valorizadas em países ou regiões, e para possibilitar a programação da produção ao longo do ano (Vuylsteke & Ortiz, 1996; Souza *et al.*, 1998; Kerbaudy, 2004). Os métodos de micropropagação facilitam a multiplicação de muitas espécies, apresentando o benefício inerente de fixar ganhos genéticos, originando plantas saudáveis em um período de tempo relativamente curto, e sem

necessidade de grande espaço físico quando comparado a outras técnicas (Grattapaglia e Machado, 1998).

No entanto, é preciso atentar ao fato de que, embora diversas técnicas de micropropagação sejam promissoras e resultem em plantas clonadas e de qualidade, é imprescindível ter cautela com o tempo de utilização do explante e com as substâncias corriqueiramente utilizadas para induzir divisões celulares. Embora sejam antigos os estudos que demonstram que a aplicação de substâncias como 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético, uma auxina sintética com efeito herbicida) podem resultar em efeitos indesejáveis, como crescimento anormal e alterações na síntese de clorofila (Fonnesbech, 1972), os hormônios sintéticos são utilizados de maneira equivocada até hoje, para a obtenção de um maior número de plantas em períodos de tempo mais reduzidos. A formação de calo (Figura 3) e a posterior indução de gemas refletem o mau uso desta técnica, pois proporciona intensa variação somaclonal, resultando em plantas com mutações, que são frequentemente indesejadas (Ganeshan *et al.*, 2006). O sucesso na obtenção de orquídeas através da cultura de calos se limita a um número restrito de gêneros (Chang e Chang, 1998; Ishii *et al.*, 1998; Roy e Banerjee, 2003). Dessa forma, o estudo aprofundado a respeito da clonagem de orquídeas, e o desenvolvimento de protocolos fornecendo informações sobre as diferentes técnicas passíveis de utilização na produção destas plantas, apresentam importância inestimável.

Figura 3. Cultivo *in vitro* de calos que podem dar origem a plantas com alterações somaclonais. Barra = 1cm.

Além de ser um método eficaz para a propagação em larga escala, suprimindo a elevada demanda comercial, o emprego da cultura de tecidos para multiplicação de orquídeas, quando realizado com a devida cautela, tem-se apresentado como uma ferramenta valiosa à manutenção de plantas clonadas para pesquisas de natureza básica. Muitos trabalhos têm sido

publicados sobre aspectos da fisiologia do desenvolvimento, da citogenética e da nutrição, entre outros temas, com a utilização de tecidos, órgãos e plantas intactas de orquídeas cultivadas *in vitro*. A técnica que vem sendo mais utilizada para a obtenção de plantas sem a ocorrência indesejável de variações somaclonais é a cultura de ápices meristemáticos (cultura de meristemas), visando à obtenção em larga escala de plantas geneticamente idênticas a partir da regeneração de órgãos (Kerbaudy e Chaer, 2011).

I.3 A Organogênese vegetal *in vitro* e a estabilidade genética

A compreensão dos mecanismos reguladores envolvidos no desenvolvimento vegetal tem como subsídio o estudo da organogênese *in vitro* (Hicks, 1994), representada pela formação de caules e raízes a partir de células somáticas (Skoog e Miller, 1957). O padrão da organogênese é dependente de diversos fatores, como o explante utilizado e as variantes físicas e químicas do meio (Thorpe, 1994). O estudo da diferenciação organogênica se mostra altamente vantajoso, pois permite reproduzir e analisar a formação de estruturas organizadas a partir da diferenciação celular em condições artificiais e controladas (Peres, 2002).

Em estudos sobre a organogênese de explantes foliares de *Convolvulus arvensis*, Christianson e Warnick (1985) compartimentaram esse processo em diferentes fases, caracterizando a desdiferenciação, a aquisição de competência, a indução, a determinação e posterior diferenciação para a formação de órgãos como gemas e folhas. De acordo com esses autores, a primeira fase da organogênese daria origem a células desdiferenciadas, ou competentes, etapa essencial para que haja resposta aos sinais hormonais do meio. As células competentes passam pela fase de indução tornando-se determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica do desenvolvimento.

Neste modelo, como se nota, a desdiferenciação com a formação de calo é indispensável para o ganho de competência em alguns tecidos maduros cultivados *in vitro*, embora nesse caso possa estar associado à indução de variações somaclonais nas plantas regeneradas. No entanto, o processo organogenético também pode ocorrer de maneira direta se as células do explante forem suficientemente competentes para formar órgãos sem necessidade de se desdiferenciarem (Peres, 2002).

A competência das células está associada com a expressão seletiva de genes (Wareing, 1982), e se refere à sensibilidade para perceber estímulos desencadeadores de vias específicas no desenvolvimento (Lyndon, 1990; McDaniel, 1992; Hicks, 1994). Quando competente, a

célula pode ser induzida à diferenciação na presença de um estímulo específico, sendo que esta rota de especificação celular é considerada praticamente irreversível (Lyndon, 1990; Link, 1998). Vale mencionar neste caso, que a capacidade de regeneração encontrada em algumas espécies de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é controlada por dois alelos dominantes denominados Rg1 e Rg2, sendo que a presença de apenas um deles, o Rg1, já é o suficiente para conferir capacidade para regeneração de gemas caulinares (Koorneef *et al.*, 1993).

O elevado grau de determinação das células meristemáticas na organogênese é considerado estável, podendo se manter inalterado ao longo das sucessivas divisões celulares, o que caracteriza a “memória celular” (Kerbaudy, 1999). No entanto, há exceções: após a diferenciação algumas células podem entrar em novo processo de desdiferenciação e dar origem a outros tipos celulares, com a possibilidade formar novos órgãos ou organismos. (Meins e Binns, 1979; Kerbaudy *et al.*, 1986).

Por organogênese direta entende-se o processo de micropropagação no qual não há o envolvimento de massas de células (calos), já que os primórdios de gemas e/ou raízes são formados diretamente do explante utilizado, o que aumenta substancialmente a probabilidade de se obter regenerantes geneticamente uniformes. Para tanto, é condição primordial a estabilidade genética dos explantes utilizados, como meristemas, por exemplo, além da suplementação adequada de substâncias nutritivas e hormonais ao meio de cultura (Gaspar *et al.*, 1996; Kerbaudy, 1997).

Assim explica-se a razão pela qual os tecidos meristemáticos são os mais utilizados na organogênese *in vitro*: eles possuem competência organogênica intrínseca, além de serem organizados e apresentarem maior estabilidade genética, sendo por isto menos suscetíveis a mutações (D’Amato, 1977; Ferreira *et al.*, 2006; Pescador *et al.*, 2008).

I.4 Papel dos meristemas no desenvolvimento vegetal

Os meristemas têm sido definidos como grupamentos de células com habilidade de manter certas características do tecido embrionário (Fosket, 1994), dividindo-se de forma organizada (Lyndon, 1990) e levando à formação de todos os órgãos da planta.

Os tecidos meristemáticos apresentam pronunciada capacidade de formação de órgãos, sendo considerados pluripotentes e competentes para o desenvolvimento de novos tipos de células (Scheres *et al.*, 1996). Após o comprometimento de células e tecidos meristemáticos

ocorre a diferenciação celular, processo inicial para a formação do primórdio de um órgão específico (Wareing, 1982).

A atividade contínua do meristema apical caulinar pode originar ramos, folhas e verticilos florais, enquanto o comprometimento e a atividade das células do meristema apical radicular resultam apenas no crescimento longitudinal e no desenvolvimento de novas raízes. Faz-se necessário, portanto, um controle fino das células iniciais dos meristemas, de forma a garantir a autoperpetuação e a determinação dos tipos celulares derivados da diferenciação (Nakajima e Benfey, 2002).

Os meristemas podem modificar sua atividade, alterando a rota de desenvolvimento de acordo com os sinais provenientes do meio, transduzidos por vias dependentes de fatores protéicos, hormônios e mensageiros secundários (Shinozaki e Dennis, 2003). Assim, as células vegetais integram os diferentes estímulos exógenos aos sinais endógenos, de forma a desencadear modificações bioquímica-metabólicas adaptativas, flexibilizando o desenvolvimento (Genoud e Métraux, 1999).

Segundo Kerbauy (1999), a regulação dos meristemas apicais caulinar e radicular seria controlada, entre outros fatores, pelo balanço das concentrações hormonais nesses tecidos, sendo o meristema apical caulinar o principal sítio de síntese de auxina e o radicular responsável pela de síntese de citocinina.

A iniciação de novas raízes deve-se à presença da auxina (Wightman *et al.*, 1980) que, de acordo com evidências experimentais, é sintetizada predominantemente nos caules (Davies, 1995), sendo transportada basipetamente (Goldsmith, 1977). Em contrapartida, as citocininas, hormônios indutores da iniciação de gemas caulinares (Pillary e Railton, 1983), são sintetizadas principalmente nas raízes (Itai e Birnbaum, 1996), e transportadas acropetamente (Van Staden & Davey, 1979).

A interação dessas duas classes hormonais é fator essencial no controle da dominância apical e do crescimento de caules e raízes, como foi demonstrado por Skoog e Miller (1957) em estudos de organogênese *in vitro* com culturas de calo de tabaco, no qual o balanço auxina/citocinina favorável à auxina origina raízes, enquanto o sinergismo favorável às citocininas promove o estabelecimento de primórdios de gemas caulinares.

I.5 Sinais envolvidos no controle meristemático

Encontra-se bem estabelecido que os sinais luminosos e a interação de hormônios regulam os principais eventos do desenvolvimento vegetal (Davies, 1995). Através da sinalização hormonal são geradas respostas regulatórias moduladas pelas condições ambientais. Assim, a atividade do meristema apical caulinar, e o crescimento e desenvolvimento de novas raízes a partir do meristema apical radicular, são alterados de acordo com condições do meio (Trewavas, 2000).

A maioria dos eventos fotomorfogênicos envolve diferentes classes hormonais, como auxinas, citocininas, giberelina, ácido abscísico, etileno e brassinosteróides (Symons *et al.*, 2008) além de mensageiros secundários como o cálcio e óxido nítrico (NO), um radical livre recentemente descoberto em plantas.

I.5.1 Desenvolvimento vegetal no claro e no escuro

Praticamente, todas as fases do crescimento e do desenvolvimento das plantas são influenciadas pela presença, intensidade e qualidade da luz, além do fotoperíodo, imprescindível para a adaptação das mesmas às variações ambientais ao longo do ano (Von Arnim e Deng, 1996).

Além de utilizar a luz como fonte de energia na fotossíntese, os vegetais têm também a habilidade de perceber seus gradientes e sua composição espectral. Desta forma, a percepção do sinal proveniente da luz gera alterações intrínsecas, tais como fototropismo, fotonastias, fotomorfogênese ou fotoperiodismo (Majerowicz e Peres, 2004), conforme a planta esteja no escuro, na sombra, sob iluminação plena, em diferentes horários do dia ou estações do ano (Suzuki, 2005). Essa plasticidade fenotípica é considerada uma adaptação à vida sésil (Von Arnim e Deng, 1996). Disto decorre que o controle do crescimento, seja na presença ou ausência de luz, se dê primariamente por meio das células meristemáticas, estas diretamente envolvidas no controle da divisão e da diferenciação celular e, por via de consequência, na formação de novos órgãos da parte aérea.

É bem conhecido o fato de que a ausência de luz resulta em alterações substanciais do fenótipo, originando plantas estioladas, que se alongam rápida e intensamente, dando origem a caules esbranquiçados (Chory *et al.*, 1996; Clouse, 2001; Suzuki *et al.* 2004). Nas plântulas,

o gancho plumular persiste por mais tempo, os cotilédones permanecem dobrados e folhas e proplastídios apresentam-se reduzidos (Raven *et al.*, 1996).

O estiolamento proporciona uma redução na lignificação e na suberificação das células, tornando as paredes celulares mais delgadas (Bassuk e Maynard, 1987). Tais propriedades inerentes ao caule estiolado propiciam a formação de tecidos com características vantajosas à multiplicação vegetativa *in vitro*, uma vez que o enraizamento dos segmentos nodais estiolados, quando isolados e cultivados *in vitro*, é facilitado pelo decréscimo das propriedades mecânicas do tecido caulinar (Bassuk e Maynard, 1987). A segmentação do caule estiolado, de forma a isolar as gemas laterais, ou segmentos nodais, do ápice caulinar, altera o balanço hormonal entre auxinas e citocininas, o que apresenta efeito promotor no desenvolvimento das gemas laterais, como será descrito com detalhe mais adiante.

Dessa forma, segmentos nodais de caules estiolados podem ser utilizados como explantes para a multiplicação de plantas de crescimento rápido como tabaco (Maliga *et al.*, 1975), batata (Heszky & Nagy, 1987) e alfafa (Dudits *et al.*, 1991); ou de crescimento lento, conforme verificado do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com a utilização de segmentos nodais de caules estiolados da orquídea *Catasetum fimbriatum* (Kerbaui *et al.*, 1995) e de abacaxizeiro, cultivar Pérola (Moreira *et al.*, 2003).

1.5.2 Condições *in vitro* e desenvolvimento vegetal

A despeito da importância da técnica de cultura de tecidos de plantas para fins de multiplicação massal e abordagens de pesquisa básica, é compreensível que os materiais cultivados sejam mantidos sob condições tais que limitem as trocas gasosas com o ambiente externo. O acúmulo de gases e a elevada umidade interna dos frascos podem atuar sobre o desenvolvimento das plantas *in vitro*. Decerto, o etileno, um hormônio vegetal gasoso, figura entre as mais importantes substâncias retidas em frascos de cultura.

O CO₂ também parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de plantas *in vitro*. Estudos realizados com plantas de *Actinidia deliciosa* cultivadas na presença de luz, e em frascos hermeticamente fechados, mostraram uma redução na concentração de CO₂ na atmosfera interna dos frascos que limitaria tanto a fotossíntese quanto o desenvolvimento da planta (Arigita *et al.*, 2002). No entanto, tem sido realmente raros os

estudos realizados a respeito dos efeitos do cultivo em frascos vedados, e da baixa concentração de CO₂, no desenvolvimento de plantas cultivadas no escuro.

Pesquisas iniciais a respeito do papel do CO₂ sobre o desenvolvimento das plantas indicaram que essa presença poderia neutralizar os efeitos do etileno em muitos casos (Burg e Burg 1967), daí a utilização de CO₂ em câmaras de armazenamento de frutos climatéricos, com resultados proeminentes na redução dos efeitos do etileno. Mais recentemente, tornou-se evidente que a interação destes dois gases é mais complexa. Assim, estudos sobre o desenvolvimento de plantas aquáticas, mostraram que o CO₂ intensificou o efeito promotor do etileno no alongamento caulinar dessas plantas (Suge e Kusanagi, 1975). Na germinação de sementes de alface, verificou-se que o CO₂ parecia atuar sinergeticamente com o etileno, estimulando a germinação (Negm *et al.* 1972).

Segundo Bufler (1986), Philosoph-Hadaset e colaboradores (1986), o aumento na biossíntese de etileno pode ocorrer pelo efeito estimulatório do CO₂ na biossíntese da enzima que converte o ACC em etileno (ACC oxidase), ou através do aumento da atividade desta enzima. O efeito do CO₂ na produção de etileno ocorre em teores muito menores do que a concentração necessária para gerar respostas inibitórias. Portanto, qualquer alteração na concentração de CO₂ pode provocar efeito substancial na taxa de biossíntese de etileno com reflexos sobre o desenvolvimento da planta (Sister e Wood, 1988).

I.5.3 O etileno e o crescimento caulinar

O etileno é um hormônio gasoso sintetizado em taxas reduzidas em diversos tecidos vegetais. Sua produção é influenciada pelo tipo e idade do tecido e estágio de desenvolvimento da planta, intensificada sob condições estressantes (Abeles, 1973), sendo muito relevante em diversos processos do desenvolvimento das plantas (Kieber e Ecker, 1993).

Vários efeitos do etileno no controle do desenvolvimento de plantas têm sido descritos (Colli e Purgatto, 2008). Dentre eles destacam-se a inibição da atividade do meristema apical caulinar (Cary *et al.*, 1995), a inibição da divisão celular (Kazama *et al.*, 2004), e alterações no balanço de outros hormônios (Peres *et al.*, 1999).

O crescimento caulinar de plantas terrícolas é afetado pelo etileno de forma a reduzir o alongamento, a promover o crescimento radial, e a aumentar o número de ramificações laterais no caule (Abeles *et al.*, 1992). Modo geral, as respostas promovidas pelo etileno são

opostas àquelas resultantes da incidência luminosa, inibindo o estímulo da luz na expansão foliar e no crescimento do hipocótilo, e promovendo a manutenção do gancho plumular (Goeschl *et al.*, 1967; 1994).

A redução do crescimento está geralmente associada com a divisão celular, por meio da inibição ou atraso das fases G1, G2 ou S do ciclo celular. Tal fato ocorre devido a redução do transporte ou da ação de substâncias promotoras da divisão e do alongamento celular (Colli e Purgatto, 2008). O etileno pode atuar na redução da dominância apical através do aumento da conjugação e do catabolismo (Sanyal and Bangerth 1998) das auxinas, além de inibir o seu transporte polar (Winer *et al.*, 2000).

Além da auxina, outra importante classe hormonal promotora do alongamento e da divisão celular que tem sua atividade reduzida por ação do etileno é a das giberelinas. O etileno parece aumentar a estabilidade de proteínas DELLA, que inibem a transcrição de genes de resposta à giberelina (Achard *et al.* 2003). Desta forma, a planta exposta ao etileno seria menos responsiva a aumentos nos teores endógenos de giberelina.

A via biossintética do etileno é bem conhecida, sendo o aminoácido metionina o seu precursor. Através do ciclo de Yang, a metionina é convertida em S-Adenosilmetionina (AdoMet) pela enzima AdoMet sintetase. A reação chave da via biossintética do etileno é a conversão do AdoMet em ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), reação esta catalisada pela enzima ACC sintase. O ACC é então convertido a etileno pela ACC oxidase (Rzewuski e Sauter, 2008). A atividade da ACC sintase é um dos pontos regulatórios mais importantes na síntese de etileno, sendo os teores dessa enzima afetados por mudanças ambientais e hormonais e por diversos eventos fisiológicos. O aumento na produção de etileno, verificado em certas fases do desenvolvimento, parece ser acompanhado por uma elevação na síntese ou na ativação da ACC sintase (Colli e Purgatto, 2008).

A utilização de substâncias com propriedades anti-etilênicas tem auxiliado nos estudos deste hormônio em diferentes processos biológicos. Dentre eles pode-se destacar o 1-metilciclopropeno (1-MCP). Tal inibidor age pela fixação preferencial e irreversível ao receptor do próprio etileno (Blankenship & Dole, 2003), reduzindo os efeitos do hormônio endógeno ou exógeno por inibir sua percepção pelo tecido vegetal até que sejam sintetizados novos receptores (Sisler e Serek, 2003). Por ser gasoso, o etileno difunde-se facilmente através dos espaços intercelulares e seu transporte é independente dos tecidos vasculares. Seu mecanismo de ação envolve a ligação a receptores específicos, seguido da ativação de uma ou

mais vias de transdução de sinais e desencadeando, então, a resposta celular (Colli e Purgatto, 2008).

Estudos realizados neste laboratório têm mostrado o efeito inibitório de elevadas concentrações de etileno sobre o crescimento caulinar de *C. fimbriatum* no claro (Rodrigues *et al.*, 2006) e na ausência de luz, reduzindo de forma conspícua o seu estiolamento e o desenvolvimento foliar (Suzuki e Kerbauy, 2006; Chaer *et al.*, 2007).

I.5.4 As giberelinas (GA) e o alongamento caulinar

Diversos aspectos do desenvolvimento vegetal são regulados pelas giberelinas, podendo-se destacar, dentre eles, a estimulação da germinação de sementes de cereais, o alongamento caulinar, a expansão foliar e a floração (Davies, 1995). A síntese de giberelinas ocorre em gemas apicais, folhas e entrenós jovens e ativos, e o transporte para as demais partes da planta se dá via floema (Taiz e Zeiger, 2002).

As giberelinas apresentam efeito promotor no alongamento caulinar e na divisão celular na região apical do caule. É bem conhecido o efeito de tratamentos com este hormônio promovendo o alongamento de entrenós em diversas espécies, especialmente em plantas geneticamente anãs e em roseta. Associada ao expressivo alongamento do caule ocorre a redução de sua espessura, além da produção de folhas menores e com coloração mais clara. (Taiz e Zeiger, 2002).

O aumento da expansão celular provocado pela giberelina tem sido interpretado como consequência da promoção da síntese de α -amilase que, ao hidrolisar o amido, impulsiona a liberação de açúcares solúveis, acarretando o aumento da pressão osmótica intracelular e a entrada de água por diferença de potencial, resultando em expansão celular (Pires, 1998). Todavia, tem-se hoje como uma das causas prevaletes a atuação destes hormônios diretamente no alongamento das paredes celulares, por meio da promoção da síntese da enzima xiloglucano-endotransglicosidase (XET) que, juntamente com as expansinas, promovem o afrouxamento da parede celular e a expansão celular (Ross *et al.* 2001).

As giberelinas podem interagir com outros hormônios também envolvidos no alongamento caulinar e na atividade do meristema apical caulinar, como é o caso das auxinas. Estas podem promover a ativação de giberelinas por meio da conversão da forma inativa GA20, para a forma ativa GA1. Por outro lado, as giberelinas atuam ainda no MAC juntamente com as citocininas e de maneira antagônica, sendo que as citocininas inibem a

síntese de GA, enquanto GA inibe as respostas às citocininas. No interior do meristema apical caulinar o balanço hormonal é favorável às citocininas, garantindo a manutenção das divisões celulares e a inibição da diferenciação. Já na região de alongamento e diferenciação ocorre uma alteração no balanço desses hormônios, com o acúmulo de GA na região de diferenciação dos primórdios foliares.

Estudos realizados com plantas mutantes com nanismo associado à deficiência na biossíntese e à sensibilidade às giberelinas, evidenciam o efeito promotor dessa classe hormonal sobre o alongamento caulinar (Gomi e Matsuoka, 2003).

Plantas de *Arabidopsis* submetidas a baixas concentrações de giberelina no escuro apresentaram fenótipos semelhantes ao das plantas crescidas no claro, como a ausência de gancho plumular, abertura dos cotilédones e redução no tamanho do hipocótilo (Alabadi *et al.*, 2004). A aplicação de concentrações reduzidas de giberelina para a promoção do alongamento do hipocótilo tem resultado similar ao obtido com a atuação da luz, no entanto, poucos estudos demonstraram a alteração da atividade de giberelinas em resposta à incidência luminosa.

A regulação da expressão das giberelinas parece estar relacionada com as proteínas DELLA, que agem como reguladoras da transcrição nuclear desse hormônio. O mecanismo preciso de sua função, coordenando a sinalização por giberelinas e sua expressão gênica, permanecem obscuros. No entanto, a utilização de abordagens moleculares tem levado a um considerável avanço na compreensão dos mecanismos de ação dessa classe hormonal (Sasaki *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, considera-se o mecanismo de ação das giberelinas semelhante ao modo de ação das auxinas (Bishopp *et al.* 2006), operando por meio de um sistema de desrepressão de genes envolvidos nas respostas ao GA. Isso depende da interação de GA com o seu receptor GID1, levando a sua interação com a proteína DELLA. Essa interação estimula a ligação da proteína DELLA a um complexo protéico chamado SCF_{gid2}. Após essa ligação, a proteína DELLA é ubiquitinada e degradada no proteossomo 26S. Com essa degradação, inicia-se a transcrição dos genes de resposta ao GA, que estavam inicialmente reprimidos (Sasaki *et al.* 2003, Gomi *et al.* 2004).

São relevantes aqui, entretanto, estudos recentes que descrevem a regulação da sinalização das giberelinas de forma diferente da acima citada. Segundo eles, as proteínas DELLA devem interagir com fatores de transcrição relacionados à fotomorfogênese. Um forte candidato é o fator de interação do fitocromo 3 (PIF3), pois este regula o crescimento do

hipocótilo na luz vermelha (Feng *et al.*, 2008). Tais estudos caracterizam a interação de uma cascata de proteínas nucleares mediando a transdução do sinal do GA para a regulação da atividade de do PIF3, de forma a prevenir que este se ligue ao seu promotor gênico alvo e regule a expressão gênica; e impedindo, assim, que ocorra o alongamento do hipocótilo controlado pela luz e mediado por PIF3 (Feng *et al.*, 2008). De forma diferente, quando na presença de GA, as proteínas receptoras desse hormônio (GID1) ampliam a sua interação com proteínas DELLA no núcleo, fazendo com que estas sejam ubiquitinadas e degradadas no proteossomo. Isso libera o PIF3 do controle negativo das proteínas DELLA, permitindo que ele regule a expressão gênica e promova o alongamento do hipocótilo. Em suma, isso implica na interação física entre PIF3 e DELLA, e na interação de PIF3 com o DNA, mediando a sinalização entre luz e expressão gênica (Feng *et al.*, 2008).

A descoberta das proteínas DELLA também fornece um excelente modelo para integrar a ação da auxina e do etileno com a giberelina na modificação do crescimento, já que os três hormônios afetam a abundância ou a estabilidade das proteínas DELLA (Achard *et al.*, 2003). Desta forma, estas proteínas podem representar um importante ponto de integração para os diferentes hormônios, determinando as respostas de crescimento.

Em trabalho publicado em 2004, Suzuki demonstrou que o GA está envolvido na sinalização para o estiolamento em *Catsetum fimbriatum*. O tratamento de caules estiolados dessa planta com giberelina promoveu um alongamento significativo em plantas cultivadas no escuro. A massa fresca do caule estiolado de plantas tratadas com GA também apresentou um aumento significativo, quando comparado ao controle, o que não ocorreu com a massa seca. Isso pode indicar que a giberelina está relacionada, nesse caso, ao aumento no alongamento celular e não à atividade do meristema apical caulinar.

Embora tenha sido observado um efeito estimulatório na divisão celular do MAC da ervilha anã tratada com giberelina (Daykin *et al.*, 1997), a manutenção de um meristema ativo em *Catsetum fimbriatum* tratado com paclobutrazol, um inibidor da segunda etapa de biossíntese de giberelina, que restringe o alongamento mas não a divisão celular no caule estiolado, sugere que a atividade do MAC nessa orquídea não depende inteiramente desse hormônio (Suzuki, 2004).

I.5.5 O Óxido nítrico em vegetais

O óxido nítrico (NO) é um radical livre conhecido por sua atuação como mensageiro secundário em respostas fisiológicas em animais (Moilanen e Vapaatalo, 1995). No entanto, pesquisas recentes demonstraram seu envolvimento, também, em processos fisiológicos de plantas (Leshem e Haramaty, 1996), atuando indiretamente no metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal como, por exemplo, na germinação de sementes, na síntese de clorofila, e no estiolamento caulinar (Beligni & Lamattina, 2000, Zhang *et al.*, 2006); na expansão foliar e radicular (Gouvea *et al.*, 1997, Leshem & Haramaty, 1996; Zhao *et al.*, 2007); no desenvolvimento de raízes adventícias (Pagnussat *et al.*, 2002, 2003, 2004); no atraso da senescência (Leshem & Haramaty, 1996; Mishina *et al.*, 2007); na morte celular programada (Magalhães *et al.*, 1999; Pedroso *et al.*, 2000); na expressão de genes de defesa contra patógenos (Durner *et al.*, 1998; Grün *et al.*, 2006); no fechamento estomático (Garcia-Mata & Lamattina, 2001, 2002, 2003; Neill *et al.*, 2008); na floração (He *et al.*, 2004); e na divisão celular (Otvos *et al.*, 2005), entre outros.

É conhecido que o NO apresenta um tempo de meia-vida relativamente longo em sistemas biológicos, principalmente em baixas concentrações (Lamattina *et al.* 2003; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). No entanto, muitas dúvidas permanecem quanto ao real papel dessa molécula nas plantas, tanto que alguns autores a classificam como um mensageiro secundário de fitormônios (Magalhães *et al.*, 2000; Pagnussat *et al.*, 2003, Neill *et al.*, 2008), enquanto outros sugerem ser ele próprio um novo hormônio vegetal, uma vez que é produzido em baixas concentrações, atua de maneira dose-dependente e possui fácil difusão nos tecidos (Beligni & Lamattina, 2001; Lamattina *et al.*, 2003).

Em várias espécies de plantas tem sido observado o aumento na produção endógena de NO pela aplicação de auxinas, citocininas ou ácido abscísico (Pagnussat *et al.*, 2002; Garcia-Mata & Lamattina, 2002). Além disso, a aplicação de NO induz a respostas fisiológicas semelhantes às desencadeadas por essas três classes hormonais (Neill *et al.*, 2003).

A participação do NO na germinação de sementes e no alongamento caulinar também sugere a atuação desse gás como mediador em processos controlados por giberelinas (Giba *et al.*, 1998; Beligni & Lamattina, 2000; Bethke *et al.*, 2007). Quando observada a relação do NO com a luz, pesquisas apontam que este radical livre tem efeito inibitório no desestiolamento e reduz o crescimento do hipocótilo e dos entrenós, sendo que a via

metabólica desencadeada pelo NO é similar àquela do fitocromo, o que pode indicar algum nível de interação entre essas duas moléculas (Beligni & Lamattina, 2000).

Estudos realizados com plantas de trigo crescidas no escuro mostraram que aquelas tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, tinham maior conteúdo de clorofila se comparadas às não tratadas. Em plantas de alface e *Arabidopsis* tratadas com SNP, foi observada inibição no alongamento do hipocótilo na ausência de luz, evidenciando a atuação do NO na prevenção do estiolamento (Beligni e Lamattina 2000).

Além disso, a relação do NO com os hormônios vegetais é evidenciada na interação com o etileno, em relação à maturação e à senescência de tecidos vegetais, sugerindo um efeito antagonista entre esses gases (Magalhães *et al.*, 2000; Leshem *et al.*, 1998; Leshem & Pinchasov, 2000). A possibilidade deste efeito tem sido corroborada pela descoberta do papel inibitório do NO sobre a expressão de enzimas-chaves na via de biossíntese de etileno (Parani *et al.*, 2004; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

Devido ao fato do NO ser uma molécula sinalizadora descoberta recentemente, poucos trabalhos abordam sua importância na organogênese vegetal, e em sua eventual atuação na atividade meristemática.

I.6 O desenvolvimento vegetal e a relação entre fontes e drenos

A manutenção do crescimento coordenado do vegetal é garantida por um mecanismo de regulação do uso dos recursos de acordo com a sua disponibilidade (Foyer e Paul, 2001). Os tecidos vegetais apresentam diferentes graus de atividade com relação à fotossíntese, sendo que os órgãos fotossinteticamente ativos, como as folhas maduras, que disponibilizam fotoassimilados para o restante da planta, podem ser chamados de órgãos fonte; enquanto aqueles que não produzem recursos o suficiente, e precisam importar os fotoassimilados para suprir sua demanda, são chamados de órgãos dreno, tais como flores, frutos e raízes não fotossintetizantes (Roitsch e Ehneb, 2000).

O principal carboidrato resultante do processo fotossintético é a sacarose (Dennis e Blakeley, 2000) que, ao ser sintetizada nos órgãos fonte, é exportada e utilizada no desenvolvimento dos drenos. Embora diversos estudos sejam voltados à compreensão dos mecanismos de partição de carboidratos entre a fonte e o dreno, a regulação de tais processos ainda é pouco conhecida (Wardlaw, 1990)

A distribuição de fotoassimilados nos diferentes tecidos define a partição de matéria seca na planta, o que parece ser primariamente regulado pelo próprio dreno (Gifford e Evans, 1981). Sabe-se que outro mecanismo de regulação da partição dos recursos é feito no transporte dos carboidratos via floema (Van Bel, 2003), sendo que essa taxa de translocação depende do gradiente existente entre a fonte e o dreno (Lang e Durrant, 1991).

Os órgãos classificados como drenos podem ainda ser divididos em drenos de utilização ou drenos de estocagem. Quando os recursos importados são utilizados para sustentar o crescimento e o desenvolvimento de um órgão, como folhas ou raízes jovens e regiões meristemáticas, o órgão é chamado de dreno de utilização. No caso dos carboidratos importados serem armazenados no órgão, como é o caso de frutos, sementes, tubérculos ou pseudobulbos, o dreno é de estocagem (Suzuki, 2005).

É importante considerar que a planta apresenta diversos órgãos dreno e que deve haver um mecanismo de prioridade para definir qual órgão receberá maior influxo de recursos. Há, portanto, uma competição entre os diferentes órgãos da planta, o que define a intensidade do dreno de acordo com o seu tamanho e atividade (Farrar, 1993). Além disso, as relações entre as fontes e os drenos em um vegetal não são constantes, a translocação de carboidratos ao longo dos órgãos pode variar ao longo do dia e do desenvolvimento vegetal (Patrick, 1988), dependendo de condições como disponibilidade de recursos como água nutrientes e luz (Coll *et al.*, 1992). O balanço hormonal na planta também interfere de maneira intensa na partição de fotoassimilados entre os drenos. A inibição na formação de drenos é associada principalmente às giberelinas (Lowell e Booth, 1967). De forma contrária, as citocininas são relacionadas ao aumento na exportação de recursos pelo floema (Clifford *et al.*, 1986) e ao desenvolvimento e formação de drenos de estocagem (Palmer e Smith, 1970). Similarmente, as auxinas atuam promovendo a intensificação da importação de fotoassimilados pelos órgãos drenos (Melis e van Staden, 1984). Pelo exposto, o estabelecimento e a manutenção dos drenos envolvem a intensidade de atividade enzimática e metabólica do órgão.

1.7 *Catasetum fimbriatum* como modelo de estudo da organogênese *in vitro*

O gênero *Catasetum* é representado por mais de 200 espécies que se destacam por apresentar crescimento relativamente rápido e vigoroso (Lacerda, 1995) (Figura 4).

Figura 4. Planta de *Catasetum fimbriatum* envasada (A) e em seu ambiente natural (B).

Catasetum fimbriatum é um material interessante para pesquisas sobre as variáveis morfogênicas reguladas por hormônios vegetais, pois seus meristemas apicais caulinar e radicular têm características organogenéticas incomuns. Ápices meristemáticos isolados de raízes de *Catasetum fimbriatum* apresentam competência para se converterem diretamente em gemas vegetativas. Tal evento é desencadeado primariamente pela separação física dos ápices radiculares da planta-mãe, sem necessidade de suplementação hormonal no meio de cultura (Kerbaudy, 1984).

Outra característica morfogênética interessante dessa orquídea refere-se à atividade do meristema apical caulinar de plantas incubadas na ausência de luz. Sob essa condição, as plantas apresentam crescimento indeterminado, dando origem a estolões aclorofilados, com folhas muito reduzidas e entrenós alongados. Cada nó apresenta uma gema lateral que, quando isolada e inoculada na presença de luz e na ausência de qualquer regulador de crescimento, origina uma planta completa, possibilitando a micropropagação em culturas *in vitro*, de forma relativamente simples, para obtenção de plantas geneticamente idênticas (Kerbaudy *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Suzuki *et al.* (2004) direcionados à compreensão do efeito modulatório da luz sobre os teores hormonais endógenos de *Catasetum fimbriatum* mostraram que, após cinco dias da transferência das plantas da condição iluminada para o escuro, elas apresentaram uma elevação de cerca oito vezes nos teores de citocininas, e de aproximadamente cinco vezes nos de auxinas. Suprimentos de GA3 ao meio de cultura resultaram em estímulo do alongamento caulinar em plantas mantidas no escuro. Corroborando esse efeito promotor das giberelinas sobre o crescimento dos estolões cultivados no escuro, foi observado que a utilização de paclobutrazol, um inibidor potente da

síntese de giberelinas, reduziu o alongamento caulinar dessas plantas, sendo a resposta intensamente proporcional à dose aplicada (Suzuki, 2004).

Estudos subsequentes mostraram o efeito inibitório de elevadas concentrações de etileno sobre o crescimento caulinar de plantas de *C. fimbriatum* incubadas no claro (Rodrigues *et al.*, 2006) e no escuro, reduzindo de forma conspícua o seu alongamento (Chaer *et al.*, 2007), um forte indicador do envolvimento desse hormônio na modulação da atividade do meristema apical caulinar dessas plantas (Figura 5).

Figura 5. Plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro por 90 dias e tratadas com diferentes concentrações de etileno.

I. Objetivos

No presente estudo, procurou-se dar continuidade e aprofundamento aos estudos envolvendo a atividade do meristema apical caulinar de *C. fimbriatum* no escuro, de modo a obter uma compreensão mais abrangente das alterações morfológicas e dos sinalizadores envolvidos no estiolamento dessa orquídea. Ademais, pesquisou-se dois outros importantes gêneros da família Orchidaceae: *Cymbidium* e *Cattleya*, visando ao estabelecimento de uma metodologia de micropropagação baseada naquela utilizada para *C. fimbriatum*, através da utilização de segmentos nodais de caules estiolados. Para tanto, as seguintes abordagens experimentais foram consideradas:

- 1) Quantificação da emissão de etileno e CO₂, e análise da morfologia em plantas de *Catasetum* e *Cymbidium* mantidos no escuro ao longo de 1 e 2 meses de tratamento com giberelina e etileno, além de seus inibidores e do radical livre óxido nítrico.
- 2) Quantificação da emissão de etileno e CO₂ e análise das alterações morfológicas em plantas de *Cattleya* mantidas por 30 dias no escuro e tratadas com giberelina, com o inibidor de sua biossíntese, paclobutrazol, e com etileno.

II. Material e métodos

III.1 Material vegetal

III.1.1 *Catasetum fimbriatum*

As plantas de *Catasetum fimbriatum* Morren Lindl. foram obtidas por meio da multiplicação vegetativa *in vitro* do clone CFC1, utilizando-se como explantes segmentos nodais caulinares de plantas estioladas. Para tanto, as plantas foram inoculadas no meio de cultura Universidade de São Paulo (USP), rotineiramente utilizado neste laboratório, constituído por 0,165 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 g/L de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,9 g/L de KNO_3 ; 0,275 g/L de CaCl_2 ; 0,435 g/L de KH_2PO_4 ; 0,442 g/L de K_2SO_4 ; 0,250 g/L de MgSO_4 ; 10 mL/L de micronutrientes do meio de Murashige & Skoog (MS); 1 g/L de peptona de soja; 0,001 g/L de tiamina; 0,1 g/L de mioinositol; 0,074g/L de Na_2EDTA ; 0,056g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 g/L de sacarose.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com KOH e, como geleificante, foram utilizados 2 g/L de Phytigel, após o que foi realizada esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

As plantas com cerca de 60 dias de crescimento no claro foram incubadas no escuro sob $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Nesta condição, a partir das gemas laterais e apicais, são formadas estruturas caulinares aclorofiladas e estioladas com crescimento contínuo (estolão), contendo uma gema lateral em cada nó. As plantas utilizadas foram obtidas a partir dos segmentos nodais estiolados que, quando isolados e inoculados na presença de luz, originam rapidamente plantas completas (Figura 6).

Os segmentos nodais estiolados foram inoculados no meio de cultura USP, e incubados sob $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$ de radiação fotossinteticamente ativa, 12 horas de fotoperíodo e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 7).

Figura 6. Esquema ilustrativo da propagação vegetativa *in vitro* de *Catasetum fimbriatum* a partir da utilização de segmentos nodais de caules estiolados. Barra = 1cm.

Figura 7. Sala climatizada onde as plantas são incubadas *in vitro*.

Decorridos aproximadamente 60 dias de cultivo nas condições citadas, as plantas foram transferidas para os diferentes tratamentos no escuro.

III.1.2 *Cymbidium*

Testes preliminares realizados com híbridos de *Cymbidium* doados por produtores mostraram, de forma surpreendente, que esse gênero apresenta um comportamento muito semelhante àquele observado em plantas de *Catasetum* incubadas na ausência de luz. A retomada e a manutenção da atividade do meristema apical caulinar dessas plantas permitiram a sua micropropagação através da utilização de segmentos nodais estiolados, assim como foi

feito no caso de *Catasetum fimbriatum*. Para tanto, as plantas com cerca de 60 dias foram inoculadas no meio de cultura USP no escuro, sob $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Os caules estiolados formados foram segmentados, mantendo apenas uma gema lateral por segmento nodal de cerca de 1 cm, que quando inoculados na presença de luz originaram plantas em um breve período de tempo (Figura 6).

As plantas foram mantidas em crescimento nas mesmas condições de cultivo de *Catasetum fimbriatum*, em sala climatizada (Figura 7) com $50 \mu\text{M.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$ de intensidade luminosa, 12 horas de fotoperíodo e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, por 60 dias, quando foram iniciados os tratamentos no escuro.

III.1.3 *Cattleya labiata*

As plantas do gênero *Cattleya* foram obtidas por germinação assimbiótica. As sementes foram desinfestadas em solução 20% (v/v) de água sanitária por 15 minutos, com adição de 3 gotas de detergente doméstico, seguida pela tríplice lavagem com água destilada autoclavada, e inoculadas em capela de fluxo de ar estéril em meio de cultura USP. A incubação ocorreu sob $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$ de radiação fotossinteticamente ativa, 12 horas de fotoperíodo e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

As plantas foram transferidas mensalmente para um novo meio e, após o período de 6 meses, atingiram cerca de 3 centímetros de tamanho (medido da base da planta até a extremidade da maior folha), quando foram submetidas a diferentes tratamentos na ausência de luz.

Infelizmente, plantas de *C. labiata* e espécies afins têm a característica inerente de se desenvolverem muito lentamente. Foi necessária a realização de uma seleção das plantas para integrar um lote experimental uniforme, o que reduziu a quantidade de material. O número limitado de plantas disponíveis para esta pesquisa não permitiu a realização de todos os tratamentos e análises previstos para essas plantas, portanto, foi necessário limitar as etapas experimentais, na expectativa de que houvesse algum alongamento caulinar observável, ou emissão significativa dos gases quantificados após o primeiro mês de tratamento.

III.2 Determinação do controle experimental em *Catasetum fimbriatum* e *Cymbidium*

Os tratamentos utilizados nos experimentos exigiram uma avaliação prévia para definir o melhor controle a ser empregado: se de plantas mantidas em meio básico em frasco com troca de ar com o meio externo (com respiro), ou daquelas em frascos vedados com renovação semanal do ar interno por ar sintético.

Ocorre que os tratamentos com etileno e NO foram realizados com a troca semanal do ar interno dos frascos de cultura por uma diluição de etileno ou NO em ar sintético, respectivamente. É importante ressaltar que o ar sintético utilizado apresenta composição diferente do ar presente no exterior dos frascos, com 20% de oxigênio e 1 ppm de monóxido de carbono + dióxido de carbono. Desta forma, optou-se por realizar um teste preliminar comparando o desenvolvimento das plantas em frascos com respiro e sem respiro, com troca semanal do ar interno por ar sintético, e assim definir o melhor controle a ser utilizado.

Para tanto, plantas de *Catasetum fimbriatum* (clone CFC1) e de *Cymbidium*, com 60 dias de idade, obtidas segundo os parâmetros acima mencionados, foram incubadas no escuro, em meio básico, em frascos de 250 ml hermeticamente vedados com a troca semanal do ar interno por ar sintético, ou em frascos com a tampa perfurada, permitindo a troca de ar com o meio externo.

Após 30 e 60 dias, foram medidos o tamanho dos caules e o número de segmentos nodais e de gemas liberadas na base dos pseudobulbos. Também foram medidas as massas fresca e seca dos caules e do restante da planta (pseudobulbo com folhas e raízes). Para a realização das análises foi utilizado um número amostral de 30 plantas por tratamento.

III.3 Tratamentos

III.3.1 Efeitos do etileno, giberelina e NO sobre o estiolamento de *Catasetum fimbriatum* e *Cymbidium*.

Plantas de *Catasetum fimbriatum* (clone CFC1) e de *Cymbidium* com 60 dias de idade foram submetidas aos seguintes tratamentos: 0; 5 e 50µM de ácido giberélico, 0; 5 e 50µM de

paclobutrazol – PA (inibidor de biossíntese de giberelina), 0; 1 e 10 ppm de etileno, 0 e 100 ppm de 1-metilciclopropeno (1-MCP - Smartfresh®), substância inibidora da ação do etileno ou 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO.

Tanto a solução de giberelina quanto a de paclobutrazol foram esterilizadas por meio de membranas ultrafiltrantes de 0,45µM de porosidade, e adicionadas ao meio de cultura sob condição de câmara de fluxo de ar laminar estéril. Todos os tratamentos foram mantidos no escuro, em frascos vedados, sendo o ar interno renovado por ar sintético semanalmente.

No caso do 1-MCP, o preparo foi realizado conforme indicado pelo fabricante. Os tratamentos com etileno e 1-MCP, ambos gasosos, foram renovados semanalmente, com o objetivo de assegurar maior constância em suas concentrações ao longo dos experimentos. As injeções das substâncias gasosas foram feitas com seringas através de septos de borracha adaptados aos frascos vedados, de forma a evitar trocas gasosas com o meio, após a substituição do ar interno por ar sintético. Para a realização das análises foi utilizado um número amostral de 30 plantas por tratamento.

Após 30 e 60 dias de incubação, as plantas tratadas foram analisadas em relação às modificações morfológicas, bem como foram quantificados os teores emitidos de etileno e CO₂ – procedimentos que serão detalhados adiante.

III.3.2 Efeito do etileno e da giberelina no desenvolvimento de plantas de *Cattleya labiata* no escuro

As plantas de *C. labiata* foram obtidas por germinação assimbiótica e, após 6 meses de crescimento com repiques mensais, foram transferidas para os diferentes tratamentos. O tempo para obter plantas com tamanho adequado e a limitação no número amostral restringiram a quantidade de tratamentos, assim como o período experimental, conforme anteriormente explicado. Diante dos resultados obtidos com *C. fimbriatum* e *Cymbidium* foram realizados apenas os tratamentos com etileno, com giberelina e com o inibidor de sua biossíntese, o paclobutrazol, no referido gênero de orquídea.

Foram inoculadas 10 plantas por frasco, que tiveram os septos de borracha acoplados na tampa e foram vedados de forma a impedir a troca com o meio externo. Cada tratamento foi realizado em triplicada. Semanalmente, o ar interno foi substituído por ar sintético, nos tratamentos com giberelina e paclobutrazol, para não haver acúmulo de etileno, CO₂ ou outros gases emitidos pelas plantas, que poderiam alterar as respostas fisiológicas de

crescimento no escuro. O ar sintético, por sua vez, é composto por 20% de oxigênio e 1 ppm de monóxido de carbono + dióxido de carbono. Nos tratamentos com etileno, os frascos tiveram o ar interno substituído semanalmente por misturas prontas de 1 e 10 ppm do hormônio gasoso diluído em ar sintético.

Após 30 dias, foram medidos o tamanho dos caules, o número de segmentos nodais e de gemas liberadas, a massa fresca dos caules e do restante da planta (pseudobulbo com folhas e raízes). Foram quantificados os teores de etileno e CO₂ emitidos pelas plantas e acumulados nos frascos por 48 horas, após a renovação do ar interno por ar sintético.

Para a realização das análises foi utilizado um número amostral de 30 plantas por tratamento.

III.4 Condições de incubação

As plantas foram mantidas por 30 ou 60 dias em meio de cultura basal sob total ausência de luz e à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Os frascos utilizados tinham volume de 250ml e foram hermeticamente vedados com o auxílio de uma tampa, com septo de borracha adaptado, envolvida por filme plástico. Semanalmente foi realizada a substituição do ar interno por ar sintético durante 1 minuto, com a reaplicação das substâncias gasosas requeridas nos diferentes tratamentos. O ar sintético utilizado é composto por 20% de oxigênio e 1 ppm de monóxido de carbono + dióxido de carbono (Oxylumen do Brasil).

III.5 Parâmetros biométricos

Após 30 e 60 dias de tratamento no escuro, foram medidos o número e o tamanho dos estolões (caules formados, sendo eles a partir de gemas liberadas ou do ápice caulinar), o número de segmentos nodais formados nos caules de cada planta, as massas fresca e seca dos estolões e do restante da planta (pseudobulbo com folhas e raízes) (Figura 8). Para a realização das análises morfológicas foi utilizado um número amostral de 30 plantas por tratamento.

Figura 8. Esquema ilustrativo das diferentes regiões mensuradas nas plantas.

III.6 Efeito dos tratamentos com etileno, giberelina e NO sobre a produção de etileno e CO₂ em *Catasetum fimbriatum*, *Cymbidium* e *Cattleya*.

III.6.1 Quantificação de etileno

Para a quantificação do etileno, foram utilizados frascos vedados, submetidos semanalmente a um fluxo de ar sintético contínuo durante 1 minuto para a eliminação dos gases acumulados. Após 30 ou 60 dias de tratamento foram mensurados os teores de etileno acumulados durante 48 horas.

A quantificação foi conduzida segundo o método de Purgatto *et al.* (2002) modificado. Para tanto, as plantas foram mantidas em frascos com volume de 250 mL, contendo 10 plantas cada. Após o período de tratamento, três amostras de 10 mL do ar interno de cada frasco foram retiradas com uma seringa *gas tight* e injetadas em um cromatógrafo a gás (CG) marca Hewlett-Packard modelo HP6890, com detector por ionização de chama (FID). Utilizou-se uma coluna de separação HP PlotQ (30m, I.D. 0,53mm, filme 6µm) e hélio como gás de arraste num fluxo de 1 mL/min. A injeção deu-se segundo o modo *pulsed splitless*. O injetor e o detector foram mantidos a 250° C e a coluna isoterma a 30° C. A quantificação do etileno produzido foi realizada em relação à injeção de um padrão de 0,1 ppm de etileno em ar sintético (Oxylumen do Brasil).

Após a quantificação, todos os frascos tiveram o ar interno renovado com ar sintético por 1 minuto. Essas análises foram realizadas em triplicatas.

III.6.2 Quantificação de CO₂

A quantificação do CO₂ foi realizada de maneira semelhante à do etileno, de forma que todos os tratamentos foram realizados em frascos vedados, submetidos semanalmente a um fluxo de ar sintético contínuo durante 1 minuto para a eliminação dos gases acumulados. Após 30 ou 60 dias de tratamento foram mensurados os teores de etileno acumulados durante 48 horas.

A quantificação foi conduzida segundo o método de Purgatto *et al.* (2002) modificado. Foram retiradas três amostras de 1 mL do ar interno de cada frasco com uma seringa *gas tight*, para determinar o conteúdo de etileno em um cromatógrafo a gás (CG) marca Hewlett-Packard modelo HP6890, com detector por ionização de chama (FID). Utilizou-se uma coluna de separação HP PlotQ (30m, I.D. 0,53mm, filme 6µm) e hélio como gás de arraste num fluxo de 4 mL/min. Para a injeção da amostra foi empregado o modo de injeção *split* (50:1). Utilizou-se um detector por condutividade térmica (TCD) mantido a 250° C, mesma temperatura do injetor, enquanto a coluna isotermal foi mantida a 30° C. O teor de CO₂ no ar do interior dos frascos foi calculado com base na área do pico de um padrão de CO₂ a 326 ppm em ar sintético (Air Liquid do Brasil).

Após a quantificação, todos os frascos tiveram o ar interno renovado com ar sintético por 1 minuto. Essas análises foram realizadas em triplicatas.

III.7 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos a partir das medidas biométricas foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância.

III. Resultados

IV.1 *Catasetum fimbriatum*

IV.1.1 Determinação do controle experimental

Considerando que os tratamentos com etileno e NO foram realizados com a troca semanal do ar interno dos frascos de cultura por uma diluição de etileno ou NO em ar sintético, optou-se por realizar um teste comparando o desenvolvimento das plantas em frascos que permitem a troca de ar com o meio externo, com aqueles que são hermeticamente vedados e submetidos a renovação semanal com ar sintético, procedimento este também realizado em plantas de *Cymbidium*. É importante ressaltar que o ar sintético utilizado apresenta composição diferente à do ar presente no exterior dos frascos, com 20% de oxigênio e 1 ppm de monóxido de carbono + dióxido de carbono, o que motivou este teste preliminar para definir o melhor controle a ser utilizado.

Após 30 e 60 dias, as plantas com renovação de ar apresentaram desenvolvimento semelhante ao das plantas incubadas em frascos com rolhas de borracha perfuradas (dados não apresentados). Não se registrou diferença significativa no tamanho caulinar, no número de gemas liberadas, e no número de segmentos nodais/planta, massa fresca ou seca, em vista do que se optou por manter todos os tratamentos em frascos vedados, com troca semanal do ar interno por ar sintético, de forma a padronizar os tratamentos e permitir a comparação segura entre eles.

IV.1.2 Efeitos da ausência de luz no desenvolvimento de *C. fimbriatum*

De maneira geral, até o 30º dia de incubação no escuro, as plantas de *Catasetum fimbriatum* não apresentaram diferenças marcantes entre si, no que diz respeito à atividade meristemática e à quebra da dominância apical, exceto nos tratamentos com paclobutrazol (Figuras 9 e 10).

Em ambos os períodos não se observou qualquer manifestação de atividade do meristema apical caulinar, não havendo a formação do caule principal, com exceção daquelas que receberam tratamento com 50 µM de paclobutrazol. No entanto, em todos os tratamentos

ocorreu o desenvolvimento de gemas na base do pseudobulbo, que se alongaram formando caules estiolados, aqui chamados de gemas liberadas. Mais detalhes acerca de cada um dos tratamentos serão descritos nas páginas seguintes.

Figura 9. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA), 50 μ M de paclobutrazol (50PA), 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno), 100 ppm de 1-MCP (100MCP), 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

Figura 10. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA), 50 μ M de paclobutrazol (50PA), 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno), 100 ppm de 1-MCP (100MCP), 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

IV.1.3 Efeitos da giberelina sobre o desenvolvimento de *C. fimbriatum*

Os resultados obtidos com as diferentes concentrações de giberelina utilizadas indicam que esse hormônio apresenta efeito promotor sobre o alongamento caulinar de plantas incubadas no escuro, especialmente após 60 dias de tratamento (Figuras 11 e 13). Curiosamente, o tratamento das plantas com paclobutrazol (PA), inibidor da biossíntese de giberelina, embora tenha reduzido significativamente o alongamento caulinar, resultou em aumento no número das gemas liberadas quando comparadas ao controle (Figura 12).

Figura 11. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA), 50 μ M de paclobutrazol (50PA).

No 30º dia de incubação, o tratamento com 50 μ M de giberelina resultou em aumento significativo do número (Figura 12) e no tamanho (Figura 14) das gemas liberadas, assim como número de segmentos nodais por planta (Figura 15). Tanto no tratamento com 50 μ M quanto no com 5 μ M de GA, o incremento de gemas liberadas foi de cerca de 60%, quando comparado ao controle após 30 dias (Figura 12).

Os tratamentos com paclobutrazol, por sua vez, apresentaram efeito significativo sobre o número de gemas liberadas após 60 dias de crescimento; na presença de 50 μ M deste inibidor o incremento foi de aproximadamente o dobro do observado no controle (Figura 12).

Figura 12. Número de gemas liberadas em plantas de *Catasetum fimbriatum* tratadas com 0; 5 e 50 μ M de giberelina e 0; 5 e 50 μ M de paclobutrazol e mantidas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Verificou-se, ademais, um aumento de 86% e de 78% no tamanho total das gemas liberadas e no número de segmentos nodais no tratamento com 50 μ M de GA, respectivamente, em relação ao controle, já nos primeiros 30 dias de incubação (Figuras 14 e 15).

Conforme já demonstrado na figura 10, no segundo mês de incubação as diferenças morfológicas tornaram-se ainda mais evidentes. O tratamento com 50 μ M de GA resultou em um aumento de 2,25 vezes no número de segmentos nodais (Figura 15) e 3,42 vezes no tamanho das gemas liberadas em relação ao controle (Figura 14). Comparativamente ao material controle, a presença de 5 μ M de GA não resultou em diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros analisados ao final do experimento (Figuras 14 e 15).

Figura 13. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA), 50 μ M de paclobutrazol (50PA).

Contrariamente, o tamanho total das gemas liberadas nos tratamentos com 5 e 50 μ M paclobutrazol foi reduzido em cerca de 73% e 89% após 30 dias, e em cerca de 68% e 96% no 60º dia de cultivo, respectivamente, em relação ao controle (Figura 14).

Figura 14. Tamanho das gemas liberadas em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 5 e 50 μ M de giberelina e 0; 5 e 50 μ M de paclobutrazol e mantidas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Figura 15. Número de segmentos nodais em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 5 e 50 μ M de giberelina e 0; 5 e 50 μ M de paclobutrazol e incubadas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

É interessante salientar que, apesar dos efeitos inibitórios do paclobutrazol sobre o crescimento caulinar, as plantas apresentaram aumento significativo da massa fresca quando comparado ao material controle (Figura 16). A massa seca dessas plantas, por outro lado, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle, havendo apenas uma redução no tratamento com 50 μ M de paclobutrazol após 60 dias de incubação (Figura 17).

Conforme é evidenciado na figura 11, os estolões das plantas tratadas com GA apresentaram-se mais longos e delgados, sugerindo que a maior espessura dos estolões das plantas do controle poderia estar compensando a diferença em comprimento, já que suas massas não foram significativamente diferentes. Contrariamente, a profunda inibição do crescimento longitudinal concomitante a um incomum espessamento caulinar induzido por 5 μ M de PA, indica que a inibição na expansão celular fez-se acompanhar por um aumento no diâmetro caulinar (Figura 11), o qual, no entanto, não foi acompanhado por uma aumento na massa seca (Figura 17).

Figura 16. Massa fresca dos estolões de plantas de *Catasetum fimbriatum* tratadas com 0; 5 e 50 μM de giberelina e 0; 5 e 50 μM de paclobutrazol, e incubadas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Figura 17. Massa seca dos estolões de plantas de *Catasetum fimbriatum* tratadas com 0; 5 e 50 μM de giberelina e 0; 5 e 50 μM de paclobutrazol, e incubadas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

De acordo com o que já foi visto, nas plantas incubadas em presença de 5 μM de PA ocorreu uma significativa inibição do crescimento dos estolões, mas ainda era possível quantificar o número de segmentos nodais (Figura 18). Já no tratamento com 50 μM deste inibidor de giberelina, essa quantificação não foi possível, devido a estreita proximidade dos segmentos nodais (Figura 19). Neste tratamento, o tamanho das gemas liberadas foi cerca de 96% inferior ao controle, um indicador de que a inibição da biossíntese da giberelina pode atuar promovendo a liberação das gemas laterais, porém, a ausência do hormônio não permite que ocorra alongamento das mesmas. Não obstante a profunda inibição provocada no

alongamento das gemas liberadas, no tratamento com a maior concentração do inibidor de giberelina a atividade do meristema apical caulinar parece ainda ter se mantido, ocorrendo a formação de um caule principal extremamente reduzido (Figura 19).

Deve-se ainda assinalar que, não obstante a inibição profunda do alongamento dos entrenós causada por 5 μ M de PA, houve a manutenção da atividade mitótica das gemas liberadas, refletida pelo crescimento longitudinal do estolão, originado na base do pseudobulbo, ainda que limitado (figura 18B).

Figura 18. Fenótipo de planta de *C. fimbriatum* tratada por 60 dias com 5 μ M de paclobutrazol (A), e detalhe da gema liberada (B).

Figura 19. Fenótipo de planta de *C. fimbriatum* tratada por 60 dias com 50 μ M de paclobutrazol.

IV.1.4 Efeitos do etileno sobre o desenvolvimento de *C. fimbriatum*

Conforme será mostrado adiante, o etileno atuou de maneira conspícua na liberação de gemas laterais em plantas de *C. fimbriatum* cultivadas no escuro. Além disso, não foi observada a retomada na atividade do meristema apical caulinar na presença deste hormônio. Os estolões formados apresentaram-se curtos, porém acompanhados de intensa ramificação lateral, formando estruturas esbranquiçadas de aspecto coraliforme (Figura 20), algo semelhantes àqueles formados nas plantas tratadas com 5 μ M de PA.

Figura 20. Fenótipo de plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 10 ppm de etileno após 60 dias de incubação.

De acordo com o mostrado na figura 21A, no primeiro mês de tratamento o etileno não provocou modificações visíveis sobre o fenótipo das plantas, apesar de elas apresentarem maior liberação de gemas e de as folhas evidenciarem sinais de senescência, os estolões ainda pequenos não se ramificaram de maneira tão intensa como observado no segundo mês de incubação. Na presença de 1-MCP as plantas não apresentaram qualquer indício de senescência (Figura 21B).

Figura 21. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 30 (A) ou 60 dias (B) de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno) e 100 ppm de 1-MCP (100MCP).

Após 30 dias de incubação no escuro, o tratamento com 1 ppm de etileno elevou em 72,7% o número de gemas liberadas, enquanto a concentração de 10 ppm chegou a dobrar a quantidade das mesmas em relação ao controle. O tratamento com 100 ppm de 1-MCP apresentou efeito contrário, reduzindo a menos da metade este parâmetro, quando comparado às plantas controle (Figura 22).

Figura 22. Número de gemas liberadas em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com etileno e 1-MCP, por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

A Figura 23 mostra que as concentrações de etileno utilizadas não foram suficientes para promover alterações significativas no crescimento dos estolões formados. Porém, na presença de 100 ppm de 1-MCP ocorreu redução de 100% no tamanho das pouquíssimas gemas liberadas após 30 dias (Figura 23).

Figura 23. Tamanho dos estolões formados em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com etileno e com 1-MCP, por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Além disso, ao se considerar o número de segmentos nodais formados, a presença de 100 ppm de 1-MCP reduziu à metade este parâmetro em relação ao controle. De maneira diferente, houve aumento significativo no número de segmentos nodais em ambos os tratamentos com etileno, tanto no 30º quanto no 60º dia de incubação, indicando algum efeito estimulatório deste hormônio sobre a atividade meristemática caulinar (Figura 24). No entanto, deve-se considerar que houve também um incremento no número de gemas liberadas, portanto, o efeito do etileno promovendo o aumento na quantidade de segmentos nodais pode ser associado à quebra da dominância apical e à formação de um maior número de estolões em relação ao controle, mas que não se alongaram de maneira significativa, como é mostrado nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 24. Número de segmentos nodais em plantas de *Catasetum fimbriatum* tratadas com etileno e com 1-MCP, por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

A massa fresca dos estolões de plantas tratadas com 10 ppm de etileno foi incrementada após 60 dias (Figura 25), assim como ocorreu com a massa seca, no 30º e 60º dias de incubação (Figura 26). O tratamento com 1 ppm de etileno promoveu o aumento na massa seca dos estolões formados apenas após 30 dias, acompanhando, dessa forma, o aumento no número de gemas laterais liberadas (Figura 22 e 26).

Figura 25. Massa fresca dos estolões de plantas de *Catasetum fimbriatum* tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-MCP, incubadas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Figura 26. Massa seca dos estolões de plantas de *Catasetum fimbriatum* tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-MCP, incubadas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

IV.1.5 Efeito do óxido nítrico (NO) sobre o desenvolvimento de *C. fimbriatum*

Conforme as Figuras 27 e 28, as plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 1.000 ppm de NO formaram estolões nos períodos analisados.

Figura 27. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO). Setas indicam raízes.

A adição de 5.000 ppm de NO semanalmente nos frascos foi responsável, ainda, por promover o crescimento dos estolões formados (Figura 30), além de um significativo incremento no número de segmentos nodais no primeiro mês de tratamento (Figura 31).

Figura 28. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

Na Figura 29 observa-se que o efeito do NO variou de acordo com o tempo de incubação. Após 30 dias, o tratamento com 1.000 ppm de NO resultou no aumento da liberação de gemas em 82%, enquanto a concentração de 5.000 ppm de NO aumentou o parâmetro em cerca de 63% em relação ao controle, o que indica que o NO apresentou efeito positivo na quebra da dominância apical até o 30º dia de incubação. Contudo, após 60 dias ambos os tratamentos com esta substância resultaram em um decréscimo no número de gemas liberadas em relação ao controle (Figura 29).

Figura 29. Número de gemas liberadas em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Em relação ao tamanho dos estolões e ao número de segmentos nodais, após 60 dias as plantas tratadas com 5.000 ppm de NO apresentaram um incremento de 96% e 118,4%, respectivamente, quando comparadas ao controle (Figuras 30 e 31). Ambas as concentrações de NO mostraram-se significativamente estimulatórias ao alongamento caulinar em relação ao controle, podendo mesmo se constatar um efeito dose-resposta (Figura 30).

Com 30 dias de tratamento, apenas a maior concentração de NO promoveu o alongamento caulinar em relação ao controle. Estes resultados indicam, fortemente, um efeito promotor deste radical livre sobre o crescimento de caules estiolados de *C. fimbriatum*. Levando-se em conta o número de segmentos nodais formados no 30º dia (Figura 31), é presumível sugerir algum envolvimento do NO na estimulação da atividade meristemática apical caulinar.

Figura 30. Tamanho dos estolões em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Figura 31. Número de segmentos nodais em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Conforme é dado observar na Figura 32, a massa fresca dos estolões em plantas tratadas com NO apresentou um aumento sutil com a aplicação da concentração de 5.000 ppm da substância após 30 dias. No 60º dia, no entanto, ambas as concentrações utilizadas foram responsáveis por reduzir a massa fresca e a massa seca dos caules formados (Figuras 32 e 33).

Figura 32. Massa fresca dos estolões de plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Figura 33. Massa seca dos estolões de plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

IV.1.6 Emissão de etileno em plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro

Considerando os efeitos bastante pronunciados do etileno sobre o desenvolvimento de plantas de *C. fimbriatum* no escuro, procurou-se quantificar a sua emissão, de forma a verificar se o mesmo estaria se acumulando nos frascos vedados em quantidades significativas a ponto de alterar o desenvolvimento destas plantas, quando na ausência ou presença de outros reguladores de crescimento, como a giberelina, o NO e o próprio etileno.

Conforme se verá a seguir, as análises de amostras do ar interno dos frascos mostraram que todos os tratamentos influenciaram a emissão detectável de etileno, cujos valores foram sempre superiores ao material controle. Ademais, conforme se observou, os teores de etileno produzidos pelas plantas controle mostraram-se muito baixos, ou quase inexistentes após 60 dias de incubação no escuro.

Figura 34. Conjunto de resultados de emissão de etileno referente aos diferentes tratamentos com plantas de *C. fimbriatum* após 30 e 60 dias na ausência de luz. Barra indica erro padrão.

Os resultados obtidos na quantificação de etileno, após 30 e 60 dias de incubação, mostraram de forma surpreendente que todas as plantas tratadas emitiram quantidades significativamente superiores de etileno em relação ao controle (Figura 34). Também fica claro, a partir destes resultados, que as plantas de *C. fimbriatum* emitem teores muito reduzidos de etileno sob as condições experimentais utilizadas. Embora inesperado para as plantas crescidas sob condições *in vitro*, no caso desta orquídea tal resultado é coerente quando confrontado com a manutenção da atividade meristemática e o alongamento caulinar, processos severamente inibidos pela presença de etileno (figuras 20 e 21).

IV.1.6.1 Efeito da giberelina na emissão de etileno em plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro

Conforme revela a Figura 35, a produção de etileno pelas plantas controle de *C. fimbriatum*, no 30º e 60º dias de cultura pode ser considerada bastante baixa. É interessante observar que as plantas tratadas com 5 µM de GA apresentaram emissão de etileno aproximadamente 13 vezes superior ao controle. Já nas plantas tratadas com 50 µM de GA, 5 µM de PA e 50 µM de PA, houve emissões de etileno cerca de 6 vezes superiores ao quantificado no material controle (Figura 35).

Figura 35. Emissão de etileno por plantas de *C. fimbriatum* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

No segundo mês de tratamento, houve um aumento considerável na emissão de etileno nas plantas incubadas na presença de 50 µM de GA, sendo cerca de 19 vezes superior ao controle. De forma semelhante, os tratamentos com 5 µM de PA e 50 µM de PA apresentaram o teor de etileno quantificado aproximadamente 13 e 14 vezes maiores do que observado no controle, respectivamente.

IV.1.6.2 Efeito do tratamento com etileno sobre a emissão de etileno em plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro

Os efeitos de tratamentos com etileno sobre a sua própria síntese mostraram-se um tanto quanto surpreendentes durante o período de incubação. As plantas incubadas na presença de 1 ppm de etileno apresentaram emissão muito superior à verificada em todos os outros tratamentos, e cerca de 180 vezes maior do que o quantificado nas plantas controle. Nos tratamentos com 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-MCP os teores de etileno quantificados também foram elevados: 30 e 35 vezes superiores ao controle, respectivamente, após 30 dias de incubação (Figura 36).

Figura 36. Emissão de etileno por plantas de *C. fimbriatum* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

No segundo mês de incubação, a relação entre os tratamentos se alterou, havendo uma liberação mais intensa de etileno nas plantas incubadas na presença de 10 ppm do hormônio, tratamento que promoveu a emissão de teores aproximadamente 100 vezes superiores ao observado nas plantas controle.

IV.1.6.3 Efeito do NO na emissão de etileno em plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro

Comparativamente às plantas controle, os tratamentos com NO promoveram significativamente a emissão de etileno, sendo esta na presença de 1.000 ppm de NO inferior apenas àquelas obtidas com 1 e 10 ppm de etileno (Figura 34). Após 30 e 60 dias de incubação, as plantas tratadas com 1.000 ppm de NO apresentaram teores de etileno aproximadamente 47 e 20 vezes maiores do que o quantificado no controle, respectivamente (Figura 37). O tratamento com 5.000 ppm de NO também promoveu de forma conspícua a emissão de etileno pelas plantas, sendo que após 30 e 60 dias foram quantificados teores de etileno 35 e 19 vezes superiores aos das plantas não tratadas, respectivamente (Figura 37). Curiosamente, a menor concentração utilizada de NO apresentou um padrão de síntese de etileno semelhante àquele obtido com a menor concentração aplicada de etileno (Figura 36).

Figura 37. Emissão de etileno por plantas de *C. fimbriatum* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

IV.1.7 Emissão de CO₂ em plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro.

Considerando que plantas de *C. fimbriatum* cultivadas em frascos vedados e sem a renovação semanal de ar apresentam um fenótipo característico, com inibição do alongamento caulinar e aumento da ramificação do estolão, procurou-se mensurar o acúmulo de CO₂ na

atmosfera interna dos frascos contendo as plantas tratadas com os diferentes reguladores de crescimento.

Os dados obtidos revelaram que todos os tratamentos promoveram aumento na emissão de CO₂ após 30 dias de incubação, sendo esta praticamente nula nas plantas controle. No entanto, é interessante observar que, ao contrário do que seria de se esperar, os teores quantificados deste gás mostraram-se significativa e intrigantemente reduzidos após 60 dias (Figura 38).

Figura 38. Teores de CO₂ em plantas de *C. fimbriatum*, após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

Dentre os tratamentos utilizados, a presença de 1 ppm de etileno foi o mais efetiva na liberação de CO₂, enquanto a presença de 5µM de PA foi o que proporcionou os níveis mais reduzidos deste gás.

Apesar de no 60º dia ter ocorrido uma redução muito evidente na liberação de CO₂ em todos os tratamentos, ainda assim a produção de CO₂ manteve-se, em geral, mais elevada do que nas plantas controle. Destaca-se porém, que os resultados obtidos nos tratamentos com giberelina no 60º dia de incubação apresentaram efeitos menos intensos do que os restantes. No tratamento com 50 µM de GA houve aumento de apenas 1,3 vezes na emissão de CO₂ em relação ao controle, enquanto que a concentração de 5 µM de GA não apresentou efeitos

estatisticamente significativos. Já o tratamento com paclobutrazol aumentou a quantificação do CO₂, principalmente nas plantas tratadas com 5 µM de PA, nas quais houve aumento de cerca de 6 vezes em relação aos resultados obtidos com as plantas controle (Figura 38).

IV.2 *Cymbidium*

IV.2.1 Efeito da ausência de luz sobre o desenvolvimento de *Cymbidium*

Os resultados obtidos com plantas de *Cymbidium* incubadas no escuro foram muito semelhantes aqueles observados em plantas de *Catasetum fimbriatum* (Figura 39), constituindo-se por um caule com crescimento indeterminado, alongado e aclorofilado, com uma gema lateral em cada segmento nodal.

Figura 39. Fenótipos de plantas de *C. fimbriatum* (A) e de *Cymbidium* (B) incubadas por cerca de 1 ano no escuro. Destaque para um caule estiolado de *Cymbidium* crescendo para fora do frasco, através da rolha de borracha.

O alongamento caulinar mostrou-se mais expressivo após dois meses de crescimento no escuro, assim como o efeito dos diferentes tratamentos (Figuras 40 e 41).

Figura 40. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA), 50 μ M de paclobutrazol (50PA), 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno), 100 ppm de 1-MCP (100MCP), 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

Figura 41. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA), 50 μ M de paclobutrazol (50PA), 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno), 100 ppm de 1-MCP (100MCP), 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

Mesmo as plantas controle cultivadas na ausência de reguladores de crescimento experimentaram aumentos significativos no crescimento caulinar após 60 dias (Figura 42A e 42B). Comparando-se as plantas incubadas durante 30 e 60 dias no escuro, verifica-se que estas últimas apresentaram um incremento de 6,82 vezes no tamanho do caule principal (Figura 42A) e um aumento de 6,85 vezes no número de segmentos nodais (Figura 42B), respectivamente.

Figura 42. Tamanho do caule principal (A) e número de segmentos nodais (B) de plantas de *Cymbidium* incubadas por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

De modo distinto do que acontece com as plantas de *C. fimbriatum*, a formação do estolão, ou caule principal, nas plantas de *Cymbidium* ocorreu exclusivamente a partir da retomada da atividade do meristema apical caulinar. Dessa forma, para as plantas de *Cymbidium* os segmentos nodais quantificados são aqueles formados ao longo do caule principal (Figura 43).

Figura 43. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* e de *C. fimbriatum* incubadas em meio básico por 60 dias na ausência de luz, indicando as diferentes estruturas caulinares mensuradas e destacando a origem dos estolões.

IV.2.2 Efeito da giberelina sobre o desenvolvimento de *Cymbidium*

No 30° e 60° dias de tratamento eram notórias as diferenças fenotípicas entre as plantas tratadas com paclobutrazol, e aquelas tratadas com a giberelina, quando comparadas ao controle (Figuras 44 e 46). Após 30 dias o tratamento com 5 μ M de paclobutrazol reduziu o tamanho do caule principal em cerca de 90%, enquanto que a presença de 50 μ M do inibidor foi suficiente para impedir inteiramente o alongamento caulinar (Figura 45).

Figura 44. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μ M de GA (5GA), 50 μ M de GA (50GA), 5 μ M de paclobutrazol (5PA) e 50 μ M de paclobutrazol (50PA).

Por outro lado, diferentemente do paclobutrazol, a presença de 5 μ M giberelina no meio de cultura não resultou em aumento significativo no tamanho do caule, tendo inclusive a concentração de 50 μ M se mostrado inibitória sobre o alongamento caulinar, com redução de cerca de 48% em relação ao controle (Figura 45).

Figura 45. Efeito da giberelina e de seu inibidor, paclobutrazol, sobre o alongamento caulinar de plantas de *Cymbidium* mantidas por 30 dias na ausência de luz. Barra indica erro padrão.

Contudo, após 60 dias ocorreu uma alteração significativa no crescimento caulinar (Figura 46). A concentração de 5 μ M de GA promoveu elevação do crescimento caulinar da ordem de 38% quando comparado ao controle, enquanto o tratamento com 50 μ M de GA apresentou efeito inibitório, indicando que em elevadas concentrações este hormônio pode ser prejudicial ao desenvolvimento dessas plantas (Figura 47). Os resultados sugerem indiretamente que as plantas de *Cymbidium* incubadas no escuro devem possuir níveis endógenos de GA relativamente elevados e maiores do que os encontrados nas plantas de *C. fimbriatum*, conforme é dado observar na figura 46.

Os tratamentos com 5 e 50 μM de paclobutrazol também mantiveram a inibição no alongamento caulinar após 60 dias, havendo uma redução intensa de 87% e 100% no tamanho do caule em relação ao controle (Figuras 46 e 47).

Figura 46. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 5 μM de GA (5GA), 50 μM de GA (50GA), 5 μM de paclobutrazol (5PA) e 50 μM de paclobutrazol (50PA).

Figura 47. Efeitos da giberelina e do paclobutrazol, sobre o crescimento caulinar de plantas de *Cymbidium* incubadas por 60 dias na ausência de luz. Barra indica erro padrão.

A respeito do número de segmentos nodais presentes nos caules estiolados, observou-se que após 30 dias de tratamento houve um incremento de cerca de 15% nas plantas tratadas com 5 μM de GA, e uma redução de 92% e 100% nos tratamentos com 5 e 50 μM de paclobutrazol, respectivamente, em relação ao controle. O tratamento com 50 μM de GA mostrou-se significativamente efetivo apenas no segundo mês de tratamento, reduzindo o número de segmentos nodais em cerca de 30%, enquanto as concentrações de 5 e 50 μM de paclobutrazol inibiram esse mesmo parâmetro em 66% e 100%, respectivamente, em relação ao material controle (Figura 49). É importante ressaltar que a intensa inibição no alongamento do caule e a sobreposição dos segmentos nodais no tratamento com 5 μM de paclobutrazol dificultaram a quantificação do número de segmentos nodais, como pode ser observado a seguir (Figuras 47 e 48).

Figura 48. Aspecto do ápice caulinar de uma planta de *Cymbidium* após 60 dias de tratamento com 5 μM de paclobutrazol, evidenciando a inibição do alongamento caulinar e seu intumescimento.

Figura 49. Efeitos da giberelina e do paclobutrazol sobre o número de segmentos nodais em plantas de *Cymbidium* incubadas na ausência de luz por 60 dias. Barra indica erro padrão.

Os resultados de massa revelaram-se congruentes com os valores de crescimento. No primeiro mês de tratamento ocorreu redução intensa nas massas fresca e seca das plantas tratadas com giberelina e paclobutrazol. No 60º dia de tratamento foi observado um aumento sutil nas massas fresca e seca dos caules de plantas tratadas com 5µM de GA, enquanto o restante dos tratamentos manteve seu efeito inibitório (Figuras 50 e 51).

Figura 50. Massa fresca dos caules de plantas de *Cymbidium* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

Figura 51. Massa seca dos caules de plantas de *Cymbidium* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

As plantas tratadas com a concentração mais elevada de paclobutrazol (50 µM) apresentaram intensa inibição na atividade do meristema apical caulinar e no alongamento dos entrenós, enquanto, diferentemente, não foi observada a promoção do alongamento caulinar de maneira significativa nos tratamentos com GA em relação ao controle (Figura 45), indicando que os teores endógenos desse hormônio podem estar em níveis adequados para promover a manutenção da atividade do meristema apical caulinar.

IV.2.3 Efeito do etileno sobre o desenvolvimento de *Cymbidium*

A despeito das semelhanças apontadas até então entre as plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, quando na presença de etileno ambas apresentaram fenótipos bem diferentes entre si, principalmente no que diz respeito à liberação de gemas laterais e à ramificação dos caules estiolados. As diferenças nas respostas ao etileno entre estes dois gêneros ficaram mais evidentes após 60 dias de incubação, como pode ser observado, comparativamente, nas Figuras 52 e 54.

Figura 52. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno) e 100 ppm de 1-MCP (100MCP).

Os caules das plantas tratadas com 10 ppm de etileno cresceram cerca de mais do que o material controle já no primeiro mês de tratamento, enquanto na presença de 1 ppm deste hormônio o crescimento foi inferior (cerca de 30%) ao controle, diferença esta que deixou de ser significativa no segundo mês de incubação (Figura 53). O tratamento com 100 ppm de 1-MCP inibiu intensamente o crescimento caulinar já nos primeiros 30 dias (Figura 53).

Figura 53. Tamanho do caule principal de plantas de *Cymbidium* tratadas com etileno e com 1-MCP por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Mesmo após 60 dias, as plantas tratadas com 10 ppm de etileno mantiveram e incrementaram significativamente o crescimento caulinar, com aumento de cerca 35% em relação ao controle; enquanto a presença de 100 ppm de 1-MCP resultou em redução do tamanho caulinar de aproximadamente 70% quando comparado ao controle (Figura 53). Entretanto, esse inibidor de etileno manteve o vigor e o tamanho das folhas (Figuras 52 e 54), além de reduzir o crescimento caulinar e a consequente formação de estolão (Figura 53).

Figura 54. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1ppm de etileno (1 etileno), 10 ppm de etileno (10 etileno) e 100 ppm de 1-MCP (100MCP).

Conforme é mostrado na Figura 55, no primeiro mês de incubação o número de segmentos nodais formados no caule principal foi reduzido 3,5 vezes na presença de 1 ppm de etileno, enquanto a concentração de 10 ppm do hormônio aumentou-o 3,85 vezes em relação ao controle. No tratamento com 1-MCP não foram observados segmentos nodais, já que não houve a formação de estolões.

Decorridos 60 dias de incubação, a concentração de 1 ppm de etileno não resultou em diferenças significativas no número de segmentos nodais em relação ao controle. No entanto, na presença de 10 ppm do hormônio ocorreu um acréscimo de 33%, enquanto a presença de 100 ppm de 1-MCP resultou na redução de 70% no número de segmentos nodais em relação ao controle (Figura 55). Conforme é dado observar, o número de segmentos nodais formados está diretamente relacionado ao tamanho alcançado pelo caule estiolado formado no escuro (Figuras 53 e 55). Frente aos resultados de massa fresca obtidos nos dois tratamentos com

etileno, deduz-se que o aumento do crescimento estimulado por 100 ppm de etileno não foi acompanhado por elevação da massa fresca (Figura 56)

Figura 55. Número de segmentos nodais de plantas de *Cymbidium* tratadas com etileno e com 1-MCP por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Além de incrementar o tamanho do caule e o número de segmentos nodais após 30 e 60 dias, o tratamento com 10 ppm de etileno aumentou as massas fresca e seca dos estolões (Figuras 56 e 57). O tratamento com 1 ppm deste hormônio também promoveu o aumento nas massas fresca e seca do caule de *Cymbidium*, conforme pode ser observado nas Figuras 56 e 57.

Figura 56. Massa fresca do caule de plantas de *Cymbidium* tratadas com etileno e com 1-MCP por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

Figura 57. Massa seca do caule de plantas de *Cymbidium* tratadas com etileno e com 1-MCP por 30 e 60 dias no escuro. Barra indica erro padrão.

IV.2.4 Efeito do óxido nítrico (NO) sobre o desenvolvimento de *Cymbidium*

Não obstante a presença de NO tenha levado a alterações no fenótipo das plantas, atuando na manutenção do crescimento foliar (Figura 58), após 30 dias de incubação, a concentração de 1.000 ppm de NO inibiu de forma proeminente o crescimento caulinar (Figura 59), bem como o número de segmentos nodais (Figura 60) e a massa fresca do caule (Figura 62), em relação ao controle. As plantas tratadas com 5.000 ppm de NO, não apresentaram diferenças fenotípicas em relação ao controle (Figuras 59 e 60), havendo apenas uma redução na massa fresca do caule das plantas incubadas após 30 dias (Figura 62).

Figura 58 Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 30 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

Figura 59. Tamanho do caule principal de plantas de *Cymbidium* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO e mantidas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Figura 60. Número de segmentos nodais de plantas de *Cymbidium* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO e mantidas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Decorridos 60 dias de incubação, o crescimento caulinar das plantas tratadas com NO não diferiu significativamente das plantas controle (Figura 61). O número de segmentos nodais, por outro lado, apresentou redução de 14% e de 37,5% nos tratamentos com 1.000 e 5.000 ppm de NO, respectivamente, em relação ao controle (Figura 60).

Figura 61. Fenótipos de plantas de *Cymbidium* após 60 dias de incubação no escuro sob os tratamentos: Controle, 1000 ppm de NO (1000NO) e 5000 ppm de NO (5000NO).

Pelo visto, portanto, nas plantas de *Cymbidium* incubadas no escuro ao longo de 60 dias, o NO exógeno (1000 ppm) provocou diminuição substancial no número de segmentos nodais formados nos estolões (Figura 60), no alongamento (Figura 59) e na massas fresca (Figura 62) do caule, embora a maior concentração do radical livre não tenha influenciado de maneira significativa nestes parâmetros.

Figura 62. Massa fresca do caule de plantas de *Cymbidium* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO e mantidas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

Figura 63. Massa seca do caule de plantas de *Cymbidium* tratadas com 0; 1.000 e 5.000 ppm de NO e mantidas no escuro por 30 e 60 dias. Barra indica erro padrão.

IV.2.5 Emissão de etileno por plantas de *Cymbidium*

De maneira semelhante às plantas de *C. fimbriatum*, grande parte dos tratamentos realizados com plantas de *Cymbidium* apresentou produção de etileno superior à observada no respectivo controle (Figura 64). Além disso, vale notar ainda nesta figura que as plantas controle produziram teores comparativamente baixos.

Figura 64. Emissão de etileno em plantas de *Cymbidium* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

Pelo menos dois aspectos sobre a liberação de etileno poderiam ser destacados da figura 64. Um deles diz respeito aos efeitos significativamente estimulatórios do NO e das menores concentrações utilizadas de GA e de PA sobre a sua síntese. O segundo aspecto a se destacar é a ausência de respostas, de certa forma surpreendente, das plantas de *Cymbidium* aos tratamentos com o próprio etileno (1 e 10 ppm), levando-se em conta o efeito autocatalítico deste hormônio.

Conforme mostrado na figura 65, comparando-se a produção de etileno entre as plantas de *Cymbidium* e as de *C. fimbriatum*, após 30 dias de tratamento, as primeiras emitiram teores de etileno inferiores às das plantas de *C. fimbriatum*, exceto quando na presença de 5 μM de GA e 5 μM de PA. O conjunto destes resultados obtido com plantas de *Cymbidium* pode apontar para uma relação entre os baixos níveis produzidos de etileno por estas, e a maior facilidade na retomada da atividade meristemática do ápice caulinar, com eventuais reflexos sobre a maior dominância apical, inibindo o desenvolvimento das gemas laterais.

Figura 65. Níveis comparativos de emissão de etileno entre plantas de *C. fimbriatum* e de *Cymbidium* incubadas no escuro por 30 dias sob diferentes tratamentos. Barra indica erro padrão.

IV.2.5.1 Efeito da giberelina na emissão de etileno em plantas de *Cymbidium*

Após 30 dias de incubação com giberelina, as plantas de *Cymbidium* apresentaram emissão de etileno conspicuamente superior à quantificada no controle. Em presença de 5 e 10 µM de GA, houve detecção de valores de etileno cerca de 2 e 21 vezes superiores ao controle. O tratamento com 5 µM de PA promoveu um aumento de 13 vezes na emissão de etileno, enquanto 50 µM de PA ampliou a detecção dos teores do hormônio em cerca de 94%, ambos quando comparados ao controle (Figura 66).

Figura 66. Emissão de etileno por plantas de *Cymbidium* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

Ainda em termos comparativos, vale notar que no 30º dia de incubação as plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 5 μM de GA apresentaram a produção de etileno, aproximadamente 13 vezes superior ao controle (Figura 66). Esse resultado indica que na presença da concentração mais baixa de GA pode ocorrer a promoção na liberação de etileno, efeito este, entretanto, não detectado nas plantas de *Cymbidium* tratadas com a concentração mais alta utilizada, tanto no 30º quanto no 60º dia de incubação. Estranhamente, no caso presente, as plantas de *Cymbidium* aumentaram a liberação de etileno também quando tratadas com PA, um anti-giberelina (Figura 66).

IV.2.5.2 Efeito do tratamento com etileno na emissão de etileno por plantas de *Cymbidium*

As plantas de *Cymbidium*, apresentaram um discreto aumento na produção de etileno após 30 dias no tratamento com 100 ppm desse hormônio. No entanto, a presença do inibidor da percepção do etileno (1-MCP) promoveu a liberação mais intensa do mesmo (Figura 67).

Figura 67. Emissão de etileno em *Cymbidium* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

O efeito da incubação das plantas com um 1 ppm de etileno por 30 dias resultou na emissão de teores de etileno 60% superiores aos obtidos no controle, enquanto o tratamento com 10 ppm do hormônio promoveu o aumento na concentração de etileno em cerca 160% quando comparado ao controle. No caso do tratamento com 100 ppm de 1-MCP, a intensificação na detecção do hormônio foi superior, atingindo níveis aproximadamente 5,3 vezes superiores em relação ao controle (Figura 67). O tratamento com 1-MCP manteve seu efeito estimulatório na emissão de etileno também no 60º dia de tratamento.

IV.2.5.3 Efeito do NO na emissão de etileno em plantas de *Cymbidium*

A incubação das plantas de *Cymbidium* com óxido nítrico promoveu a produção de etileno de maneira substancial nos dois períodos analisados.

Após 30 dias de tratamento, em comparação às plantas controle, aquelas incubadas com 1.000 ppm de NO apresentaram um aumento de cerca de 13 vezes na emissão de etileno, enquanto na concentração de 5.000 ppm de NO a produção aumentou em 15 vezes (Figura 68).

Figura 68. Emissão de etileno em *Cymbidium* após 30 e 60 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

No segundo mês de incubação houve uma intensificação dos efeitos observados no 30º dia no caso do tratamento com 5.000 ppm de NO, que promoveu aumento de cerca de 20 vezes na emissão etileno em relação ao controle. Já no tratamento com 1.000 ppm de NO houve aumento de aproximadamente 7,5 vezes na quantificação do hormônio quando comparado ao controle (Figura 68).

Vale notar que os resultados obtidos com as plantas de *Cymbidium* tratadas com NO mostraram-se bastante semelhantes àqueles obtidos com as de *C. fimbriatum*, no que diz respeito à liberação de etileno em ambos os períodos analisados (Figura 65).

IV.2.6 Emissão de CO₂ em plantas de *Cymbidium*

A produção de CO₂ pelas plantas de *Cymbidium* no 30º e no 60º dias de incubação mostrou-se bastante variável, com uma discreta tendência favorável ao primeiro mês de tratamento (Figura 69). De modo geral, a liberação de CO₂ foi mais intensa nos materiais tratados do que no respectivo controle. Dentre as substâncias que promoveram maior emissão do gás, podem-se destacar o 1-MCP, 50µM de PA, etileno e NO. A presença de 5µM de PA foi a menos efetiva nos primeiros 30 dias (Figura 69).

Figura 69. Teores de CO₂ emitidos por plantas de *Cymbidium* no 30º e 60º dias de incubação. Barra indica erro padrão.

Após 30 dias de tratamento com 5 µM de GA as plantas apresentaram aumento de cerca de 20% na liberação de CO₂, enquanto que na presença de 50 µM do hormônio, as diferenças em relação ao controle não foram significativas. Já no tratamento com paclobutrazol, houve redução de 85% na concentração com 5 µM, enquanto 50 µM promoveu aumento de cerca de 130% na emissão de CO₂, ambos em relação ao controle, após 30 dias de incubação (Figura 69).

Comparando-se com os resultados obtidos em plantas de *C. fimbriatum*, as de *Cymbidium* apresentaram taxa respiratória inferior (Figura 70). Vale destacar ainda que, neste mesmo período, as plantas de *Cymbidium* liberaram significativamente menos etileno do que as plantas de *C. fimbriatum* submetidas aos mesmos tratamentos (Figura 65).

Figura 70. Teores de CO₂ liberados por plantas de *Cymbidium* e de *C. fimbriatum* após 30 dias de incubação no escuro em diferentes tratamentos. Barra indica erro padrão.

IV.3 Efeito do etileno e da giberelina sobre o desenvolvimento e a emissão de etileno e CO₂ em plantas de *Cattleya labiata*

Conforme mostra a Figura 71, após 30 dias de incubação na ausência de luz não foram observados efeitos marcantes no crescimento caulinar ou no desenvolvimento de gemas laterais em plantas de *Cattleya labiata* nos tratamentos utilizados.

Figura 71. Fenótipos das plantas de *Cattleya labiata* sob os diferentes tratamentos durante 30 dias no escuro. Barra indica 1 cm.

De certa forma estes resultados foram corroborados pelos valores de massa fresca e seca apresentados por estas plantas sob os mesmos tratamentos, os quais não apresentaram diferenças significativas entre si (dados não apresentados).

A liberação de etileno pelas plantas de *Cattleya labiata* demonstrou que praticamente todos os tratamentos resultaram em alguma produção, ainda que discreta, deste hormônio. Além disso, observou-se que, de maneira semelhante ao ocorrido com as plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, a produção de etileno foi sempre mais proeminente nas plantas tratadas do que nas plantas controle (Figura 72).

As plantas incubadas na presença de 5 μM de GA apresentaram aumento de 2 vezes na emissão de etileno, enquanto 50 μM de GA aumentou a emissão em cerca de 6,5 vezes em relação ao controle. O tratamento com 5 μM de paclobutrazol apresentou efeito mais evidente, aumentando a emissão em cerca de 11,5 vezes em relação ao controle. Nestas plantas, os tratamentos com etileno foram os mais estimulatórios à síntese deste hormônio. Os valores emitidos nos tratamentos com 1 e 10 ppm de etileno foram 43 e 76,5 vezes superiores ao controle, respectivamente. (Figura 72).

Figura 72. Teores de etileno por plantas de *Cattleya labiata* e sob os diferentes tratamentos durante 30 dias de incubação no escuro. Barra indica erro padrão.

Comparadas às plantas controle, os níveis de CO_2 produzidos pelas plantas de *Cattleya labiata* tratadas com 5 e 50 μM de PA e com o com 10 ppm de etileno, promoveram significativamente a emissão de CO_2 (Figura 73).

Figura 73. Teores de CO₂ produzidos por plantas de *Cattleya labiata* após 30 dias de incubação. Barra indica erro padrão.

IV.4 Efeito do cultivo prolongado de plantas de *Cattleya* incubadas em frascos vedados no claro

Não obstante a relativa falta de evidências do efeito do etileno sobre o desenvolvimento de plantas de *Cattleya*, vale ressaltar que quando estas foram incubadas prolongadamente no claro em frascos hermeticamente fechados, surpreendentemente as mesmas mantiveram a atividade do meristema apical, concomitantemente à inibição do crescimento foliar, originando caules alongados constituídos por nós e entrenós (Figura 74A), cujo fenótipo distinguia-se claramente das plantas incubadas em frascos com rolhas perfuradas (Figura 74B).

A quantificação do etileno presente na atmosfera interna dos frascos revelaram teores conspicuamente superiores aos observados nos tratamentos controle dos outros gêneros aqui estudados (Figura 75). Há que se considerar que são marcantes as diferenças entre as condições de cultivo, já que as plantas de *Cattleya* em questão foram incubadas na presença de luz e mantidas em frascos vedados por aproximadamente 1 ano, sem a renovação semanal do ar interno com ar sintético como realizado com as plantas de *Cattleya*, *Catasetum* ou *Cymbidium* cultivadas no escuro. No entanto, faz-se necessário salientar que nas condições supracitadas a detecção de etileno destas plantas foi bastante elevada e concomitante ao crescimento caulinar.

Figura 74. Fenótipo de plantas de *Cattleya labiata* incubadas por cerca de 6 meses na presença de luz em frascos hermeticamente fechados, destacando a manutenção da atividade do meristema apical caulinar com a formação de caules alongados e folhas reduzidas (A); e em frasco com trocas gasosas, ressaltando as folhas alongadas e o caule curto (B).

Figura 75. Emissão de etileno por plantas de *Cattleya*, *Cymbidium* e *Catasetum* cultivadas em condições diferentes de luminosidade e trocas gasosas. Barra indica erro padrão.

IV. Discussão

V.1 Análises morfológicas

O gênero *Catasetum* tem se apresentado como um modelo interessante para estudos organogenéticos, já que quando mantidas no escuro as plantas retomam a atividade do meristema apical caulinar, originando caules alongados e com uma gema lateral por nó, que quando isoladas e incubadas sob incidência luminosa, originam novas plantas. Essa técnica de micropropagação vem sendo utilizada nos últimos anos para multiplicação de *Catasetum fimbriatum* e abacaxizeiro, sem a ocorrência de variabilidade genética (Suzuki *et al.*, 2004; Nievola *et al.*, 2005).

Trabalhos anteriores realizados com *C. fimbriatum* mostraram que as plantas cultivadas no claro por 150 dias apresentam a interrupção na atividade do MAC, que seria um dreno de atividade, para a formação do pseudobulbo, um dreno de armazenamento. No entanto, a transferência das plantas para o escuro alteraria a intensidade destes drenos, tornando a atividade meristemática mais competitiva e levando à retomada das divisões celulares na região, com consequente alongamento caulinar (Suzuki, 2005).

A partir da análise dos resultados, ficam evidentes as particularidades dos três diferentes gêneros de orquídeas estudados. Surpreendentemente, as plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, embora taxonomicamente bastante distintos, apresentaram um padrão de desenvolvimento muito semelhante, representado pela manutenção da atividade meristemática caulinar, com formação de estolões constituídos por nós e entrenós, com uma gema lateral por segmento e folhas escamiformes (Figura 39). De forma oposta, as plantas de *Cattleya* incubadas nas condições experimentais utilizadas, não originaram estolões como as anteriores, levando a acreditar na ausência da retomada da atividade meristemática (Figura 71).

Contudo, apesar de as plantas de *Cymbidium* e de *C. fimbriatum* compartilharem semelhanças profundas no que se refere ao crescimento caulinar contínuo no escuro, ambas apresentaram diferenças consistentes quanto à responsividade de seus meristemas frente à ausência de luz e aos tratamentos utilizados. Assim, enquanto nas plantas de *Cymbidium* o crescimento foi retomado a partir apenas do meristema apical caulinar; nas de *C. fimbriatum* os estolões formaram-se de gemas laterais basais, sinalizando, desta forma, o envolvimento da quebra de dominância apical (Figura 43). Postula-se, diante disto, que para cada uma destas

plantas haja um balanço hormonal diferenciado. A ausência marcante de quebra da dominância apical nas plantas de *Cymbidium* parece decorrer da retomada da atividade do meristema apical caulinar e da auxina nele sintetizada e translocada basipetamente.

Nas condições experimentais utilizadas, os tratamentos com giberelina não se mostraram suficientes para a retomada da atividade do meristema apical caulinar nas plantas de *C. fimbriatum*, não havendo formação de caule principal, embora tenha ocorrido uma significativa liberação de gemas laterais a partir da base do pseudobulbo após 60 dias de incubação (Figura 12). Esses resultados coincidem com o padrão observado nos estudos realizados com *C. fimbriatum* na luz, em que o tratamento com GA não foi suficiente para a retomada da atividade meristemática apical caulinar, estimulando apenas a formação de brotos laterais (Suzuki, 2005).

A não retomada da atividade do meristema apical, nesse caso, poderia decorrer do fato de a concentração de hormônio aplicada ter sido insuficiente para retomar a atividade do meristema apical caulinar. Entretanto, considerando que foram utilizadas elevadas concentrações de giberelina no presente estudo, pode-se afirmar que este hormônio não apresenta efeito sobre a retomada da atividade do meristema apical caulinar ou que já existe uma concentração endógena ótima de giberelina nestas plantas (Suzuki, 2005). Estudos reportam o efeito do GA na promoção do alongamento do hipocótilo de plantas de *Arabidopsis* crescidas no claro (Xu *et al.*, 1997), mas não naquelas incubadas no escuro (Cowling e Harberd, 1999).

Nas plantas de *Catasetum*, os resultados obtidos com diferentes concentrações de giberelina indicam que esse hormônio apresenta efeito promotor sobre a liberação de gemas laterais e sobre o alongamento caulinar (Figuras 12 e 14) nas plantas incubadas no escuro, corroborando os resultados obtidos por Suzuki (2004). O aumento no número de gemas liberadas nos tratamentos com giberelina pode ter ocorrido pelo fato desse hormônio, associado às citocininas, ter estimulado a liberação das gemas da dominância apical e seu crescimento subsequente (Allan *et al.*, 1993), enquanto o ápice caulinar permaneceu inibido. Não se descarta, no caso, uma menor força de drenagem do ápice caulinar, liberando, com isto, o crescimento das gemas laterais. A presença de raízes nestas plantas aponta para possíveis sítios de síntese de citocininas que, na ausência do crescimento caulinar, estariam se concentrando na base caulinar, junto às gemas laterais liberadas (Figura 13). De fato, pesquisas recentes mostraram que em plantas de *C. fimbriatum* incubadas no escuro, há incrementos substanciais dos teores de citocininas endógenas (Suzuki *et al.* 2010).

Os tratamentos com paclobutrazol mostraram-se inibitórios à liberação e ao alongamento das gemas laterais de *C. fimbriatum*, com exceção do tratamento com 50 μ M do inibidor que, após 60 dias, resultou no aumento da liberação das gemas de maneira intensa, mas com redução significativa do alongamento das mesmas quando comparadas ao controle (Figuras 12 e 14). Isso indica que, quando a biossíntese de giberelina é inibida por um período relativamente prolongado, a ausência desse hormônio não impede que as gemas sejam liberadas, no entanto o alongamento caulinar é reduzido de maneira conspícua. Considerando a premissa acima exposta sobre a eventual ausência do efeito do GA sobre a retomada da atividade do ápice caulinar, juntamente com a quebra da dominância apical na presença do PA, é razoável acreditar que este hormônio não atue diretamente sobre os meristemas caulinares inativos, mas talvez, predominantemente, sobre o alongamento celular no caule.

Quanto a isto faz sentido lembrar que a giberelina apresenta efeito indireto no aumento da síntese e da sensibilidade à auxina, esta sabidamente uma proeminente inibidora do desenvolvimento das gemas laterais, o que poderia explicar a liberação de gemas nos tratamentos com o inibidor da biossíntese desse hormônio (Cline, 1991). Também é importante destacar que há trabalhos que descrevem a ação do paclobutrazol no aumento dos teores endógenos de citocininas, reduzindo dessa forma a dominância apical (Fletcher, 2000).

Desta forma, a maior liberação das gemas laterais pela aplicação de 50 μ M de paclobutrazol após um período prolongado de incubação, poderia ser explicada pela inibição da biossíntese de giberelina e, conseqüentemente, pela alteração no balanço hormonal entre auxinas e citocininas e promoção do desenvolvimento das gemas laterais. Suzuki (2005) verificou que após 20 dias de incubação no escuro, ocorre um aumento conspícuo nos teores de citocininas totais no pseudobulbo, que atuaria sinalizando o estabelecimento de um novo dreno, representado pela liberação e pelo desenvolvimento das gemas laterais. Após 40 dias de incubação no escuro, quando as gemas laterais já começaram a se desenvolver, os teores de auxinas e citocininas na porção basal do pseudobulbo se modifica novamente, ocorrendo um aumento nos teores de auxinas, o que pode sinalizar para o alongamento dos estolões originados das gemas laterais (Suzuki, 2005).

É interessante destacar que as gemas liberadas nas plantas tratadas com paclobutrazol não formaram caules alongados, mas permaneceram como pequenas protuberâncias no pseudobulbo, ou caules com entrenós extremamente reduzidos, com segmentos nodais sobrepostos (Figuras 18 e 19). Tal efeito é associado à redução nos teores endógenos de giberelina, como é sustentado em estudos realizados com *Pisum sativum*, nos quais a

aplicação de GA3 levou a um aumento no comprimento do caule, sem a ocorrência de divisões celulares, indicando, portanto, que o crescimento decorreu somente do alongamento celular (Daykin *et al.*, 1997). Além disso, o efeito da giberelina, aumentando o tamanho caular mas não sua massa seca (Figuras 14 e 17), vem novamente corroborar resultados obtidos por Suzuki (2005) com *C. fimbriatum* tratados com GA3. Nesses casos, observou-se um acréscimo no comprimento caular sem incremento na taxa de divisão celular, enfatizando o papel das giberelinas no alongamento caular. À vista destes resultados, para que haja uma maior compreensão dos efeitos da giberelina, seria necessária a quantificação dos teores endógenos desse hormônio.

Comparando o desenvolvimento de *C. fimbriatum* com o de *Cymbidium*, a diferença mais evidente refere-se, basicamente, à retomada da atividade do meristema apical caular, formando um caule principal em *Cymbidium*, sem liberação de gemas laterais, ramificação do caule ou redução no crescimento caular na presença de etileno (Figura 54). Tais resultados levam à percepção de que, em plantas de *Cymbidium*, a dominância apical parece ser mais intensa do que em *C. fimbriatum*. Decerto, a procedência ou não desta hipótese poderia futuramente ser avaliada por meio de quantificações de auxinas e citocininas endógenas. Além disso, parece razoável supor que as plantas de *Cymbidium* apresentam elevados níveis endógenos de giberelina, já que a aplicação desse hormônio resultou em um aumento muito sutil do alongamento caular, apenas nas plantas tratadas com a menor concentração do hormônio e após 60 dias de incubação (Figuras 45 e 47). Adicionalmente, houve redução acentuada de todos os parâmetros considerados nas plantas tratadas com o paclobutrazol, inibindo drasticamente o alongamento do estolão e originando caules extremamente curtos ou ausentes (Figuras 45 e 47). Esse resultado aponta que a giberelina, a exemplo do que ocorre com as plantas de *C. fimbriatum*, deve exercer importante função sobre o alongamento das células caulinares de plantas de *Cymbidium* incubadas no escuro.

De maneira algo semelhante ao efeito causado pelo paclobutrazol, o etileno também apresentou efeito inibitório na retomada da atividade do meristema apical caular, atuando predominantemente na liberação de gemas laterais e na ramificação dos estolões nas plantas de *C. fimbriatum* cultivadas no escuro (Figura 21). Assim como descrito por Abeles (1992), naquilo que ficou conhecido como a resposta tríplice das plantas ao etileno, as plantas de *C. fimbriatum* tratadas com esse hormônio apresentaram comportamento até certo ponto semelhante, já que ocorreu redução do alongamento caular, apenas após 30 dias, promoção do crescimento radial e uma discreta alteração no crescimento horizontal dos caules (Figura

21). Esta intensificação da quebra da dominância apical dos estolões pela ação do etileno pode ser considerada um evento bastante incomum nas plantas vasculares. Vale ainda destacar que, não obstante a eficiência do paclobutrazol sobre a inibição do crescimento dos estolões de *C. fimbriatum*, os fenótipos destes mostraram-se substancialmente diferentes em relação aquelas tratadas com etileno, já que o paclobutrazol, nas concentrações utilizadas, inibiu intensamente o alongamento caulinar e o alongamento das gemas laterais (Figura 18), enquanto os tratamentos com etileno aumentaram a liberação de gemas laterais e ramificação dos estolões (Figura 21).

Estudos relacionam diretamente o etileno à regulação da biossíntese de giberelina (Vanderbussche, 2007). Partindo da premissa de que o etileno inibe a biossíntese de giberelina, a inibição do primeiro promoveria o aumento nos teores de giberelina e, conseqüentemente, o alongamento caulinar. No entanto, a aplicação do inibidor de etileno, o 1-MCP, inibiu completamente a formação de caules, além de originar plantas consideravelmente mais vigorosas (Figura 21). Donde se pode inferir que a inibição da percepção do etileno apresentou efeito na redução da senescência das plantas e na manutenção de pseudobulbos robustos, com folhas grandes e clorofiladas, além de raízes alongadas e espessas. Dessa forma, a ausência de alongamento caulinar poderia ser explicada pela manutenção destes drenos, dificultando a retomada da atividade meristemática apical e o alongamento caulinar.

Nos tratamentos com etileno, tanto o aumento no número de gemas liberadas quanto no número de segmentos nodais em *C. fimbriatum* (Figuras 23 e 24) pode ser explicado por sua propriedade de reduzir a dominância apical através do aumento da conjugação e do catabolismo (Sanyal e Bangerth 1998) das auxinas, além de inibir o seu transporte (Winer *et al.*, 2000). Dessa forma, a auxina reduziria seu controle negativo sobre as gemas laterais que, sob ação das citocininas, poderiam dar início ao desenvolvimento.

Os resultados obtidos com as massas fresca e seca dos estolões de plantas de *C. fimbriatum* tratadas com etileno são relevantes, já que houve aumento nestes parâmetros (Figuras 25 e 26), o que não foi acompanhado pelo incremento no tamanho dos estolões formados. Estes dados evidenciam o efeito do etileno no aumento das divisões celulares sem que, no entanto, haja alongamento, o que fica mais claro ao se observar o fenótipo das plantas, com entrenós reduzidos e caules mais espessos do que os formados no controle (Figura 21).

Sabe-se que o etileno possui um papel marcadamente inibitório sobre o alongamento caulinar na maioria das plantas terrestres (Goeschl e Kays, 1975; Chen e Bleecker, 1995).

Entretanto, em muitas plantas macrófitas como *Ranunculus sceleratus* (Musgrave e Walters, 1973), *Oryza sativa* (Metraux e Kende, 1983) e *Rumex palustris* (Voesenek e Blom, 1989; Banga *et al.*, 1996), o etileno estimule o alongamento caulinar como um mecanismo de tolerância à inundação (Vanderbussche, 2007). Algumas variedades de arroz apresentam mecanismo semelhante, tendo sido comprovado que o GA atua na mediação da sinalização do etileno para que ocorra o alongamento caulinar (Vriezen *et al.*, 2003). Os trabalhos realizados com *C. fimbriatum*, constituem um dos poucos relatos sobre a influência do etileno no alongamento caulinar de plantas de hábito epifítico como, por exemplo, os estudos realizados por Kerbaudy *et al.* (1995) e Peres *et al.* (1999).

De maneira antagônica, as plantas de *Cymbidium* tiveram o crescimento caulinar promovido pela aplicação da maior concentração de etileno e não ocorreu ramificação caulinar ou liberação de gemas laterais, sugerindo a existência de uma dominância apical mais intensa (Figura 53). Aparentemente, a ocorrência de uma dominância apical mais pronunciada nesta planta teria relação com a retomada da atividade meristemática e com a produção da auxina, que ao ser translocada basipetamente, inibiria o desenvolvimento das gemas laterais. O efeito estimulatório do etileno sobre o crescimento caulinar de *Cymbidium* parece estar relacionado ao conhecido efeito inibitório deste hormônio sobre o crescimento das folhas e raízes em relação ao controle (Figura 54). Sob um ponto de vista finalista, a manutenção das folhas em plantas crescidas no escuro representaria um gasto energético dispensável, pois já que não há possibilidade de realizar fotossíntese, a redução no seu alongamento representa a diminuição da força deste dreno. Dessa forma, poderia ocorrer a alteração na relação entre fonte e dreno das plantas tratadas com etileno, o que promoveria, de maneira indireta, o crescimento caulinar através da manutenção da atividade meristemática. Isso explicaria, em princípio, o fato do tratamento com 1-MCP, um eficiente inibidor da percepção do etileno, ter mantido o vigor e o tamanho das folhas paralelamente a ausência de crescimento caulinar e formação de estolão.

Os tratamentos com óxido nítrico também apresentaram resultados divergentes em plantas de *C. fimbriatum* e de *Cymbidium*. A maior concentração de NO utilizada (5.000 ppm), foi responsável por promover o crescimento dos estolões de *C. fimbriatum* com aumento no número de segmentos nodais (Figuras 30 e 31). O incremento significativo no crescimento caulinar nos tratamentos com 1.000 ppm de NO, após 30 dias de tratamento, e de 5.000 ppm de NO após 30 e 60 dias de incubação na ausência de luz, indicam fortemente o efeito estimulatório deste radical livre sobre o estiolamento caulinar de *C. fimbriatum*. Tendo

em vista que este maior crescimento caulinar no escuro fez-se acompanhar por um incremento no número de nós, pode-se deduzir que o NO tenha atuado positivamente sobre a atividade meristemática apical dos estolões. Trata-se, sem dúvida, de um efeito altamente promissor sob a perspectiva de micropropagação em *Catasetum* e gêneros afins. No 60º dia de incubação, as massas fresca e seca dos estolões de *C. fimbriatum* apresentaram redução em relação ao controle, indicando que, possivelmente, o aumento em comprimento não foi acompanhado por um aumento em espessura dos caules.

De maneira diferente, em *Cymbidium*, a menor concentração aplicada deste radical livre inibiu fortemente o alongamento; a formação de segmentos nodais e a massa fresca do caule nas plantas tratadas após 30 dias (Figuras 59, 60 e 62); enquanto a maior concentração de NO não promoveu alterações fenotípicas significativas, o que dificulta uma conclusão mais aprofundada a respeito da aplicação deste sinalizador em plantas incubadas no escuro e exige que seja realizada uma investigação mais direcionada num período de estudo extenso.

São ainda bastante raros na literatura os estudos relacionados às propriedades do radical livre óxido nítrico no alongamento caulinar e no estiolamento de plantas. Segundo Beligni & Lamattina (2000), o NO atuaria na prevenção do estiolamento, sendo observada a inibição no alongamento do hipocótilo na ausência de luz em plantas de *Arabidopsis* tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP – doador de NO), o que parece duvidoso a primeira vista, já que a atividade do SNP é dependente da incidência luminosa.

Outros trabalhos descrevem o efeito inibitório do NO na biossíntese de etileno (Parani *et al.*, 2004; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007), sugerindo, inclusive, que em nível molecular o NO teria a capacidade de regular negativamente a síntese desse hormônio, inibindo efeitos do etileno tal como a senescência (Besson-Bard, 2008) e podendo reduzir os efeitos inibitórios do etileno no alongamento caulinar.

Dessa forma, pode-se relacionar os efeitos do NO no alongamento caulinar de *C. fimbriatum* e de *Cymbidium* a esse efeito negativo na regulação da biossíntese de etileno, já que em ambos os gêneros os tratamentos com NO apresentaram efeitos opostos aos resultantes com a aplicação de etileno. Em *C. fimbriatum* o NO promoveu o alongamento caulinar, enquanto o etileno o inibiu nos primeiros 30 dias de incubação (Figuras 30 e 23). Já em *Cymbidium*, o etileno apresentou efeito promotor no alongamento caulinar, enquanto a inibição de sua biossíntese, supostamente promovida pela aplicação de NO, resultou na redução deste parâmetro (Figuras 53 e 59), além de originar plantas com folhas alongadas,

fenótipo semelhante ao observado com a aplicação de 1-MCP, podendo as folhas atuar como drenos e, portanto, reduzir a atividade do meristema apical caulinar (Figura 40).

No entanto, a quantificação das emissões de etileno nas plantas tratadas com NO não corroboram estes efeitos, já que em ambos os gêneros os tratamentos com este radical livre promoveram a emissão de etileno, como será discutido adiante. Portanto, considerando o fato de serem restritos os estudos e as publicações a respeito dos efeitos do NO no desenvolvimento vegetal, parece ser ainda precoce adiantar explicações sobre os resultados obtidos até o momento. Além disso, se faz necessário ressaltar a importância de realizar análises diferenciadas, tais como a quantificação de etileno no tecido e a atividade das enzimas ACC sintase e ACC oxidase.

V.2 Análises das emissões de gases

V.2.1 Emissão de Etileno

Em sendo um hormônio gasoso, o etileno tem seus efeitos potencializados em plantas cultivadas em condições *in vitro*, pois tende a se acumular nos frascos vedados resultando na alteração do fenótipo vegetal. Em estudos realizados por Peres e colaboradores (1999) com ápices radiculares de *C. fimbriatum* tratados com etileno, ocorreu redução nos níveis de auxinas endógenas que se refletiu no aumento da taxa de conversão dos meristemas radiculares em gemas caulinares. Contudo, não há ainda estudos que demonstrem alguma relação hormonal semelhante para os ápices caulinares de *Cymbidium* ou *Catasetum*.

A quantificação de etileno após 30 e 60 dias de incubação, mostrou que todas as plantas de *C. fimbriatum* tratadas emitiram quantidades significativamente superiores desse hormônio em relação ao controle (Figura 34). Além disso, em termos comparativos, constatou-se que as plantas de *C. fimbriatum* emitem teores de etileno superiores às plantas de *Cymbidium* sob as condições experimentais utilizadas (Figura 65). Estes resultados parecem ser coerentes com a atividade meristemática e o alongamento caulinar nestes dois gêneros, tendo em vista que ambos os processos são inibidos em diferentes graus pela presença de etileno. Dessa forma, a menor detecção nas plantas de *Cymbidium* coincide com a retomada da atividade meristemática caulinar e seu crescimento, sem a liberação de gemas laterais ou a ramificação caulinar, efeitos estes típicos da aplicação de etileno (Figura 41). Já nas plantas de *C. fimbriatum*, nas quais houve uma maior detecção de etileno, não foi observada a

retomada da atividade do meristema apical caulinar, mas sim a liberação e ramificação das gemas laterais com a formação de caules com entrenós relativamente reduzidos (Figura 10).

As plantas de *C. fimbriatum* tratadas com 5 μ M de GA emitiram níveis de etileno superiores às plantas controle (Figura 35), o que foi acompanhado pela promoção do crescimento caulinar e a liberação de gemas nos primeiros 30 dias de incubação (Figuras 14 e 12). No segundo mês de tratamento, houve um aumento considerável na emissão de etileno nas plantas incubadas na presença de paclobutrazol e da maior concentração utilizada de giberelina (Figura 35), período no qual houve maior liberação de gemas laterais nestes tratamentos (Figura 12). Embora o crescimento dos estolões tenha sido bastante diferente entre os tratamentos (Figura 14), a liberação das gemas pode estar relacionada ao aumento dos teores endógenos de etileno, hormônio este potencialmente associado com a redução da dominância apical através do aumento da conjugação e do catabolismo das auxinas (Sanyal e Bangerth, 1998). Em ápices radiculares desta orquídea, verificou-se que tratamentos com etileno levavam à redução nos teores endógenos de auxina, pouco influenciando, contudo, os teores de citocininas (Peres *et al*, 1999).

De maneira semelhante às plantas de *C. fimbriatum*, também nas de *Cymbidium* grande parte dos tratamentos resultou na produção de teores de etileno superiores aos observados nas plantas controle (Figura 64). No entanto, nas plantas de *Cymbidium* os teores de etileno foram inferiores àqueles produzidos pelas plantas de *C. fimbriatum*, exceto quando em presença de 5 μ M de GA e 5 μ M de PA (Figura 65), o que poderia estar relacionado à manutenção da dominância apical, já que não houve ramificação ou liberação de gemas laterais, em nenhum dos tratamentos, havendo a retomada da atividade do meristema apical caulinar e formação de um caule principal alongado, com exceção dos tratamentos com paclobutrazol e com 1-MCP, que inibiram completamente a formação de estolões (Figuras 46 e 54).

Os tratamentos com etileno intensificaram a sua biossíntese após 30 ou 60 dias de incubação nas plantas de *C. fimbriatum*, o mesmo ocorrendo em menor intensidade no tratamento com 1-MCP (Figura 36). Os resultados obtidos corroboram estudos realizados com o sistema radicular de *Arabidopsis* sob efeito de etileno, que indicam que esse hormônio regula positivamente a sua síntese autocatalítica por meio da ativação de genes que participam da rota biossintética deste hormônio (Dugardeyn, 2008).

Conforme já mencionado, as respostas de desenvolvimento das plantas de *Cymbidium* ao etileno foram bastante distintas daquelas apresentadas pelas plantas de *C. fimbriatum*. O

mesmo pode-se dizer da emissão de etileno, com exceção da liberação aumentada deste hormônio na presença de 1-MCP (Figura 67). A elevação na síntese de etileno nas plantas de *Cymbidium* tratadas com o inibidor já foi observada em estudos de fisiologia pós-colheita, embora não se conheça a razão para tal resposta (Purgatto, comunicação pessoal).

Vale ressaltar aqui a forma de ação do inibidor: as moléculas de 1-MCP ligam-se de forma preferencial e irreversível ao receptor do próprio etileno (Blankenship & Dole, 2003). Essa inibição diminui os efeitos do hormônio endógeno ou exógeno e é muito utilizada para aumentar o tempo de armazenamento do fruto na pós-colheita (Lima *et al.*, 2005). A ação do inibidor é mediada através da interatividade com o receptor e da competição com o etileno pelo sítio de ligação, inibindo, dessa forma, a percepção do hormônio pelo tecido vegetal (Sisler e Serek, 2003).

Uma das consequências da inibição da percepção do etileno seria a ocorrência de mudanças no padrão de expressão de genes do tecido. Neste contexto, pode ser que os genes de biossíntese de etileno sejam estimulados, o que explicaria a elevação de sua síntese nas plantas tratadas com 1-MCP. Conforme Purgatto (comunicação pessoal), uma hipótese para o aumento na biossíntese de etileno nas plantas tratadas com 1-MCP seria a de que a S-adenosil-metionina, substrato da sintase do ACC, se acumularia no tecido como resultado do bloqueio dos receptores pelo 1-MCP. Dessa forma, quando o tecido recuperasse a responsividade ao etileno, com a síntese de novos receptores, o tecido passaria a sentir novamente a presença do hormônio e ocorreria uma elevação rápida e substancial da expressão de sintase do ACC e/ou ACO com a intensificação na produção de etileno. No entanto, embora tenha havido o aumento na biossíntese do hormônio, é importante salientar que as plantas tratadas com 1-MCP não apresentaram fenótipo semelhante àquele observado em plantas tratadas com etileno (Figura 41), indicando que a reaplicação do inibidor foi suficiente para manter os receptores do hormônio ocupados e não permitir que houvesse efeitos visíveis da ação do etileno sob o desenvolvimento das plantas tratadas.

Quanto aos efeitos do NO, observou-se que as plantas de *C. fimbriatum* (Figura 37) comportam-se de maneira bastante semelhantes às de *Cymbidium* (Figura 68), no que diz respeito à síntese de etileno.

Os tratamentos com NO promoveram de maneira conspícua a emissão de etileno nas plantas de *C. fimbriatum* (Figura 37), não havendo diante disto como deixar de assinalar que esses resultados contrapõem-se de forma proeminente àqueles obtidos nos tratamentos com esse radical livre, quando estas plantas apresentaram um aumento no tamanho dos estolões e

na liberação de gemas (Figuras 29 e 30). As plantas de *Cymbidium* tratadas com NO também apresentaram aumento na síntese de etileno (Figura 68). A literatura mais recente sobre este tema não corrobora os resultados obtidos e aponta para um efeito inibitório do NO na biossíntese de etileno (Parani *et al.*, 2004; Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007; Besson-Bard *et al.*, 2008), restringindo, dessa forma, os seus efeitos.

Em *Cymbidium*, a intensificação na biossíntese de etileno em plantas tratadas com NO poderia estar mascarando os efeitos deste sinalizador secundário, levando a interpretações equivocadas sobre seus efeitos, já que a inibição do alongamento caulinar observada em plantas tratadas com 1000 ppm de NO no 30º dia (Figura 61) poderia ser causada diretamente pelo etileno (Figura 59).

A partir dos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que o NO parece estar envolvido na sinalização de eventos morfogênicos relacionados à atividade do meristema apical caulinar, podendo agir juntamente com o etileno, atuando como sinalizador secundário em respostas de estresse ou na regulação da atividade meristemática caulinar. Apesar de não estar claro o seu papel na promoção ou na inibição do alongamento caulinar, há que se destacar que em várias espécies de plantas tem sido observado o aumento na produção endógena de NO pela aplicação de auxinas, citocininas ou ácido abscísico (Pagnussat *et al.*, 2002; Garcia-Mata & Lamattina, 2002).

No entanto, devido ao fato do NO ser uma molécula sinalizadora descoberta recentemente, muitas dúvidas persistem quanto ao seu real papel sobre as plantas, havendo poucos trabalhos abordando sua importância na organogênese vegetal, e em sua eventual atuação na atividade meristemática.

V.2.2 Emissão de CO₂

As análises dos teores de CO₂ emitidos por plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium* incubadas no escuro mostraram resultados interessantes, e em parte, semelhantes aos obtidos nas quantificações de etileno. Nas condições experimentais utilizadas, embora ambos os gêneros tenham originado caules alongados, a produção de etileno e CO₂ foi mais restrita nas plantas de *Cymbidium* do que nas de *C. fimbriatum* (Figura 70), refletindo talvez uma menor taxa respiratória e/ou uma menor susceptibilidade aos estresses decorrentes dos manuseios inerentes à técnica de cultura de tecidos em plantas. Ao se comparar a emissão de CO₂ das plantas submetidas aos diferentes tratamentos foi observado um padrão semelhante ao de

etileno, no que diz respeito à intensificação de ambos os gases, principalmente nas plantas tratadas após 30 dias de incubação, em relação ao controle (Figuras 38 e 69). Estes resultados levam a admitir uma associação entre a elevação da respiração e o estresse químico, representado pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, que levaria ao aumento da taxa metabólica das plantas. Dessa forma, a intensificação da emissão de CO₂ após 30 dias pode estar relacionada ao período de maior atividade metabólica após os tratamentos e as manipulações das plantas necessárias à inoculação.

Resultados obtidos com a liberação de CO₂ em plantas de *C. fimbriatum* tratadas com giberelina e paclobutrazol também indicam que o estresse químico causado pelas concentrações mais elevadas das substâncias utilizadas ocasiona aumento da taxa respiratória. Isso é explicado pela relação positiva entre as concentrações de GA utilizadas e a liberação de CO₂, o mesmo sendo observado nos tratamentos com paclobutrazol (Figura 38).

Os resultados parecem indicar que as plantas de *Cymbidium* apresentaram uma taxa respiratória média inferior à de *C. fimbriatum*, no entanto, não é possível relacionar esse fato com a manutenção da atividade de meristema caulinar dessas plantas, já que as plantas controle de *C. fimbriatum* também apresentaram taxas reduzidas de emissão de CO₂, não ocorrendo a formação de caule principal, como ocorreu em *Cymbidium*. Parece razoável supor que as plantas de *Cymbidium* seriam menos sensíveis às condições de estresse, ou seja, emitiriam menos etileno e manteriam a taxa respiratória mais reduzida, em relação às plantas de *C. fimbriatum* em situações de alteração metabólica em reação às substâncias moduladoras do desenvolvimento, já que, estando incubadas sob as mesmas condições, *Cymbidium* liberou teores inferiores de etileno e de CO₂ quando comparados aos teores emitidos por *C. fimbriatum* (Figura 70).

Em ambas estas plantas os tratamentos com etileno promoveram liberação de CO₂ detectável tanto no 30º quanto no 60º dias de incubação, o que pode ser relacionado à sinalização do estresse por este hormônio e ao aumento da respiração em plantas. De maneira semelhante e inversamente ao esperado, o 1-MCP promoveu o aumento na liberação de CO₂ em ambos os gêneros, já que a redução na percepção de etileno deveria, teoricamente, reduzir a taxa respiratória (Fan *et al.*, 1999) (Figuras 38 e 69). Porém, tanto em *Cymbidium* quanto em *C. fimbriatum*, a aplicação de 1-MCP foi acompanhada pela intensificação na liberação de etileno. Portanto, o etileno liberado por estas plantas poderia sinalizar uma condição estressante, o que levaria ao aumento da taxa respiratória e a maior liberação de CO₂.

Considerando que a maior elevação nos níveis de CO₂ ocorreu nos primeiros 30 dias de incubação, coincidindo com o período de intensa reprogramação das vias de desenvolvimento, torna-se inescapável a constatação de que os processos morfogenéticos apresentados pelas plantas foram estabelecidos sob níveis bastante elevados de CO₂.

O incremento concomitante na liberação de etileno e de CO₂ pode ter sido promovido pela intensificação da taxa respiratória, pois o CO₂ pode promover a biossíntese da enzima ACC oxidase, que converte o ACC em etileno, ou aumentar a atividade desta enzima (Bufler, 1986 e Philosoph-Hadas *et al.*, 1986). De acordo com Sister e Wood (1988), o efeito do CO₂ na biossíntese de etileno pode ocorrer sob teores muito reduzidos, de forma que qualquer alteração na sua concentração pode resultar na ampliação da produção de etileno.

V.3 Efeito do etileno e da giberelina sobre o desenvolvimento e a liberação de etileno e CO₂ em plantas de *Cattleya* e perspectivas no estudo do alongamento caular sob a luz.

As dificuldades em se obter um lote homogêneo de plantas resultaram em número amostral restrito de *Cattleya*. Dessa forma, o delineamento experimental proposto para esse gênero de orquídea foi reduzido, limitando-se aos tratamentos com giberelina, paclobutrazol e etileno, que promoveram alterações fenotípicas mais evidentes nos outros dois gêneros estudados. Além disso, as análises foram feitas apenas após 30 dias de incubação no escuro.

Estudos recentes realizados com plantas de *Cattleya mesquittae*, um híbrido resultante do cruzamento de *C. walkeriana* com *C. nobilior*, cultivadas no escuro por 60 dias, levaram à liberação de gemas laterais, com a formação de caules estiolados, após a excisão das folhas e raízes (Ramos e Carneiro, 2007). A adição de citocininas promoveu aumento do número de gemas liberadas, enquanto a adição de auxinas estimulou a produção de um maior número de segmentos nodais. Sendo esta planta filogeneticamente próxima às de *Cattleya labiata* utilizadas no presente trabalho, esperava-se um comportamento semelhante entre elas, no que diz respeito à liberação de gemas laterais quando mantidas no escuro, o que, todavia, não ocorreu.

Após 30 dias de incubação não foram observadas mudanças morfológicas entre os tratamentos propostos, inclusive quanto ao alongamento caular (Figura 71). A manutenção das folhas e raízes das plantas de *C. labiata*, visando a limitar a produção excessiva de etileno, pode estar envolvida na falta de resposta. Conforme já proposto para *Catasetum fimbriatum* e

Cymbidium, a permanência de tais órgãos pode ter atuado como drenos preferenciais de substâncias em detrimento da atividade meristemática apical.

Ainda que em todos os tratamentos tenha ocorrido alguma produção de etileno, não foram observados efeitos característicos deste hormônio sobre as plantas de *Cattleya*. De qualquer forma, a exemplo do verificado com as plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, em todos os tratamentos a emissão de etileno superior ao das plantas controle (Figura 72).

É relativamente bem conhecido o efeito inibitório do etileno sobre a atividade do meristema apical caulinar (Cary *et al.*, 1995), o que leva a acreditar que sua produção pelas plantas de *Cattleya labiata* poderia ser inibida pelos tratamentos com giberelina, hormônio conhecido por sua atuação na promoção do alongamento caulinar (Davies, 1995). O fato do tratamento com 5 μ M de PA ter sido mais efetivo na promoção da emissão de etileno do que a dos tratamentos com giberelina (Figura 72) corrobora indiretamente esta possibilidade. A realização de experimentos mais detalhados a este respeito poderia esclarecer esta diferença.

Conforme se observou com as plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, as plantas de *Cattleya* tratadas com etileno também apresentaram um aumento na biossíntese deste hormônio. Efeitos de retroestimulação do etileno foram relacionados por Dugardeyn e colaboradores (2008) a genes envolvidos na sua síntese.

Os níveis de CO₂ foram significativamente promovidos nos tratamentos com paclobutrazol e na presença da maior concentração utilizada de etileno. Embora isto não tenha se refletido de forma perceptível sobre o fenótipo das plantas, é nítido seu efeito sobre a taxa respiratória das mesmas (Figura 73).

O conjunto dos resultados sobre a emissão de CO₂ e etileno pelas plantas de *Cattleya labiata* mostrou que nas condições experimentais utilizadas não foi possível detectar efeitos estimulatórios sobre o estiolamento *in vitro* destas plantas. Embora estes resultados não corroborem o preceito do etileno como fator prejudicial ao crescimento das plantas cultivadas *in vitro*, ressalta-se que o período de análise pode ter sido reduzido, insuficiente para ocorrência de respostas visíveis em sua morfologia ou na emissão de etileno e gás carbônico.

Não obstante a relativa carência de evidências acerca do efeito do etileno sobre o desenvolvimento de plantas de *Cattleya*, e embora o período de incubação e as diferentes concentrações de GA, etileno e paclobutrazol não tenham promovido variações significativas no fenótipo das plantas, não havendo a retomada da atividade do meristema apical caulinar ou formação de estolão, vale ressaltar que, quando incubadas prolongadamente no claro e na ausência de trocas gasosas (frascos hermeticamente fechados), surpreendentemente as

mesmas mantiveram a atividade do meristema apical, concomitantemente à forte inibição do crescimento foliar, originando caules alongados (Figura 74). Estes resultados acenam positivamente para uma potencial importância da ausência de trocas gasosas com a atmosfera externa sobre a manutenção da proliferação celular caulinar apical, com a formação prolongada de nós e entrenós. Provavelmente, o acúmulo de alguma substância no interior do frasco, ou a ausência de alguma substância provinda do ambiente externo, estaria gerando um fenótipo semelhante àquele de plantas incubadas no escuro (Figura 74).

Análises de amostras do ar interno destes frascos realizadas por meio de cromatografia gasosa revelaram, além da presença elevada de etileno (Figura 75), a de uma outra substância que não pode ser identificada por meio dessa técnica. Dessa forma, estão sendo providenciadas análises por CG-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa), para identificar a natureza desta substância acumulada, de maneira a permitir a avaliação e o estudo mais aprofundado de seus eventuais efeitos moduladores do crescimento nesta, bem como em outras espécies de orquídeas incubadas no claro e no escuro.

V.4 Breve caracterização das diferentes relações filogenéticas, hábitos e estratégias de sobrevivência dos gêneros estudados

Dentre os resultados obtidos nesse trabalho, podemos brevemente destacar algumas características peculiares de cada gênero. *C. fimbriatum* forma estolões a partir das gemas laterais, enquanto *Cymbidium* não libera gemas, formando apenas um caule principal oriundo da atividade do meristema apical caulinar. Isso indica que em *Cymbidium* pode ocorrer um balanço hormonal diferenciado, resultando em uma dominância apical mais intensa. Já em *Cattleya*, Não ocorreram diferenças morfológicas após 30 dias no escuro, independente do tratamento. Além disso, a emissão de etileno e principalmente de CO₂ foi superior nas plantas de *Catasetum*, que apresentou uma emissão mais intensa no primeiro mês, o que pode sinalizar que essas plantas respondem mais prontamente às alterações, ocorrendo uma respiração mais intensa, acarretando no acúmulo de CO₂ no interior dos frascos. Os comportamentos extremamente diversos observados nos diferentes gêneros aqui estudados, poderiam ser relacionados com a distância filogenética existente entre as plantas. *Cymbidium* e *Catasetum* apresentam maior proximidade, já que as subtribos Catasetinae e Cymbidiinae pertencem à tribo Cymbidieae. Já as *Cattleyas* fazem parte da subtribo Laeliinae, na tribo Epidendreae.

No entanto, apesar de compartilharem semelhanças, as diferenças encontradas no comportamento de *Catasetum* e *Cymbidium* também são marcantes, o que poderia ser associado a alguns fatores. *Catasetum* é um gênero com hábito epifítico e metabolismo fotossintético C3, que apresenta diversas características que permitem a sobrevivência em condições de estresse hídrico, como a formação precoce de pseudobulbo, perda das folhas na estação seca e formação de “cesto” com raízes ageotrópicas, responsável pela retenção de umidade e matéria orgânica. Assim, considerando que se trata de uma planta evolutivamente adaptada para sobreviver em ambientes que proporcionam estresse, isso poderia ser relacionado à rápida resposta de emissão de elevados teores de etileno e CO₂ em reação às substâncias moduladoras de crescimento. Já o gênero *Cymbidium* apresenta hábito terrícola e é uma planta C3, com pseudobulbos se formam tardiamente, suas folhas delgadas são mantidas ao longo do ano. Ocorrem naturalmente na Ásia, geralmente em elevadas altitudes e baixas temperaturas com umidade constante, o que poderia ser associado à não interrupção da atividade apical para formação de pseudobulbo, mantendo uma dominância apical intensa e contínua. *Cattleya labiata* é uma planta de hábito rupícola e epífita, com metabolismo CAM. Apresenta crescimento lento, suas folhas são suculentas e pseudobulbos em geral são mantidos ao longo do ano. Ocorrem naturalmente na Região Nordeste do Brasil com variações extremas na temperatura e umidade. Tais características talvez possam ser associadas à manutenção do crescimento foliar e radicular no escuro sem haver atividade do meristema apical caulinar no período analisado.

V. Conclusão

O conjunto dos resultados obtidos com plantas de *Catasetum*, *Cymbidium* e *Cattleya*, tratadas com diferentes reguladores de crescimento, mostrou que as mesmas apresentam padrões distintos de crescimento quando incubadas na ausência de luz, sinalizando tratar-se de um desenvolvimento modulado, aparentemente, em algum grau, pela base genética. Considerando, no caso, as distâncias filogenética e geográfica que separam os gêneros de *Catasetum* (naturais das Américas do Sul e Central) e os de *Cymbidium* (asiáticos), é presumível supor que a habilidade de formar estolões dever-se-ia a genes bastante conservados em ambos os táxons, cuja expressão ou inibição seria desencadeada pela ausência prolongada de luz. Além disso, as diferenças observadas no comportamento dos gêneros pode ser relacionada com as estratégias de sobrevivência e hábitos distintos selecionadas evolutivamente.

Nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, nenhuma das substâncias reguladoras de crescimento mostrou-se suficientemente eficaz no estabelecimento de um padrão de crescimento em *Cattleya*, semelhante ao dos caules estiolados de *Catasetum* e *Cymbidium*. Contudo, vale observar que estruturas caulinares muito semelhantes a estes estolões formaram-se em plantas de *Cattleya* incubadas na presença de luz em frascos de cultura fechados hermeticamente, abrindo assim perspectivas para a indução de estolões sob condições muito diferentes daquelas observadas para plantas de *Catasetum* e *Cymbidium*. Dessa forma, estes resultados acenam positivamente, para uma aparente influência da ausência de trocas gasosas com a atmosfera externa do frasco sobre a manutenção da proliferação celular caulinar apical, assim como com a formação de nós e entrenós.

A despeito das dificuldades encontradas para efeito de uma análise mais aprofundada de cada um dos fatores estudados, os resultados apresentados apontam para aspectos que poderão ser utilizados como subsídios para a continuação da atual abordagem experimental, cuja compreensão, sob um ponto de vista de aplicabilidade, poderá auxiliar no desenvolvimento de protocolos para a micropropagação de plantas em vias de extinção ou de interesse comercial.

Referências bibliográficas

- ABELES, F.B. (1973). **Ethylene in plant biology**. New York: Academic Press.
- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. (1992). **Ethylene in Plant Biology**. 2nd ed. New York: Academic Press.
- ACHARD, P.; VRIEZEN, W.H.; VAN DER STRAETEN, D. HARBERD, N. (2003) Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell*. v. 15, p. 2816–2825. Disponível em: <http://www.plantcell.org/content/15/12/2816.short>. Acesso em: 28/08/2011.
- ALABADI, D.; GIL, J.; BLAZQUEZ, M. A.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. (2004). Gibberellins repress Photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol*. v. 134, p. 1050-1057. *American Society of Plant Biologists*. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/134/3/1050>. Acesso em: 03/03/2011.
- ALLAN, P.; TAYLER, S.; ALLWOOD, M. (1993). Lateral bud induction and effects of fungicides on leaf retention and rooting of Honey Gold papaws. *Journal of the South African Horticulture Science*, Stellenbosch, v.3, p.5-8. Disponível em: <http://www.sahs.co.za/>. Acesso em 09/09/2010.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172: 876–887. Elsevier.
- ARDITTI, J. (1996). Orchid micropropagation: The path from laboratory to Commercialization and a account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 122: 183-241.
- ARIGITA, L.; GONZÁLES, A.; TAMÉS, R.S (2002). Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.115, p. 166-173, 2002. Também disponível em:
- BANGA, M.; BLOM, C.W.P.M.; VOESENEK, L.A.C.J. (1996). Sensitivity to ethylene: the key factor in submergence-induced shoot elongation of Rumex. *Plant Cell Environ*. 19: 1423-1430. Também disponível online em: Sensitivity to ethylene: the key factor in submergence-induced shoot elongation of Rumex. Acesso em: 12/07/2010.
- BASSUK, N.; MAYNARD, B. Stock (1987). Plant etiolation. *Hortscience*, v.22, n.5, p.749-750.
- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. In: *Planta*. Vol. 210. p. 215-221. Oxford: Elsevier.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. (2001). Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *In: Trends in Plant Science*. Vol. 6. p.508-509. Oxford: Elsevier.

BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. (2008). New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *The Annual Review of Plant Biology*.

BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; AOYAMA, N.; CHUNG, Y.Y.; STILL, D.W.; JONES, R.L. (2007). The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology*, v. 143, p. 1173-1188.

BISHOPP, A.; MAHOONEN, A.P.; HELARIUTTA, Y. (2006). Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development*, 133:1857–1869.

BUFLER, G. 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of development. *Plant Physiol.* v.80, p. 539-543.

BURG, S. P.; BURG, E. A. (1967). Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* v.42, p. 144-152.

CARVALHO, R. F. (2003). **Uso de mutantes fotomorfogênicos no estudo da competência para regeneração in vitro em micro tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv micro-tom)**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba: USP.

CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S. H. (1995). Cytokinin action is coupled to ethylene in effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Physiol.*, 107, 1075-1082.

CHAER, L.; RODRIGUES, M.A.; PURGATTO, E.; KERBAUY, G.B.(2007). Efeito do etileno sobre o estiolamento de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). **Resumo apresentado ao XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. Gramado.

CHANG, C., CHANG, W.C. (1998) Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensuifolium* var. *misericors*. *Plant Cell Rep.* 17, 251-255

CHEN, Q.G.; BLEECKER, A.B. (1995). Analysis of ethylene signal-transduction kinetics associated seedling growth response and chitinase induction in wild type and mutant Arabidopsis. *Plant Physiol.*, Bethesda, v.108, p.597-607.

CHORY, J. *et al.* (1996). From seed germination to flowering, light controls, plant development via the pigment phytochrome. **Symposium Paper. Proceedings of the National Academy of Sciences**. Vol. 93, p. 12066-12071. PNAS: La Jolla, Disponível: <http://www.pnas.org/cgi/reprint/93/22/12066?ck=nck>.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. (1985). Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *In: Developmental Biology*. Vol. 112. p. 494-497. Beltsville: NAL.USDA.

CHUNG, S.; GUHA, S.; RAO, I.U (2009) Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Sci Hortic* 122:507-520.

CLIFFORD, P.E.; OFFER, C.E.; PATRICK, J.W. 1986. Growth regulators have rapid effects on photosynthate unloading from seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 88: 635-637.

CLINE, M.G. (1991). Apical dominance. *Bot. Rev.* 57: 318–358.

CLOUSE, S.D. (2001). Integration of light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth. In: *Trends in Plant Science*. Vol. 6. p. 443-445. Oxford: Elsevier.

COLL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCIA, B.S.; TAMÉS, R.S. **Fisiologia vegetal**. Madrid: Piramide, 1992. 662p

COLLI, S.; PURGATTO, E. (2008). Etileno. In **Fisiologia Vegetal**; Kerbaudy, G. B. Coord.; 271–295; Editora Guanabara Koogan; 431 p. R.J. ,Brasil.

CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES - IUCN. **2006 IUCN red list of threatened species**. Cambridge: IUCN Species Survival Commission. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>.

COWLING, R. J.; HARBERD, N. P. (1999) Gibberellins control Arabidopsis hypocotyls growth via regulation of cellular elongation. *J. Exp. Bot.* 50: 1351-1357.

D'AMATO, F. (1977). Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. p. 343-357. Berlin: Springer Verlag.

DAVIES, P.J. (1995). The plant hormones: Their nature, occurrence and functions. In: DAVIES, P.J. (ed.). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. p. 1-12. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

DAYKIN, A.; SCOTT, I. M.; FRANCIS, D.; CAUSTON, D. R. (1997). Effects of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. *Planta*, Berlin, v. 203, n. 4, p. 526-535, Apr.

DENNIS, D.T.; BLAKELEY, S.D. 2000. **Carbohydrate metabolism**. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (eds). American Society of Plants Physiologists, Rockville, pp. 630-675

DUDITS, D.; BORGRE, L.; GYORGYEV, L. (1991). Embryo development from somatic plants cells in vitro: molecular and cellular basis. In: *Journal of Cell Science*. Vol. 99. p. 473-482. Cambridge: The Company of Biologists.

DUGARDEYN, J.; VANDENBUSSCHE, F.; VAN DER STRAETEN, D. (2008). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene – gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis?. *Journal of Experimental Botany*. v. 59, n. 1, p. 1–16.

- DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 10328-10333.
- EAKS, I. L. (1970) Respiratory Response, Ethylene Production, and Response to Ethylene of Citrus Fruit during Ontogeny. *Plant Physiol.*, v. 45(3), p. 334-338.
- FAN, X.; MATTHEIS, J.P.; BLANKENSHIP, S.M. (1999). Development of apple superficial scald, soft scald, core flush and greasiness is reduced by MCP. *J Agric Food Chem*, v. 47, p.3063-3068.
- FARRAR, J.F. 1993. Sink strength: what is it and how we measure it? *Plant Cell Environ.* 16: 1015.
- FENG, S.; MARTINEZ, C.; GUSMAROLI, G., WANG, Y.; ZHOU, J. WANG, F.; CHEN, L. YU, L.; IGLESIAS-PEDRAZ, J.M.; KIRCHER, S. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*. v. 451, p. 475–479.
- FERREIRA, W.M.; KERBAUY, G.B; PIMENTEL, A.P. (2006). Micropropagation and genetic stability of a Dendrobium hybrid (Orchidaceae). *In Vitro Cellular & Develop. Biology-Plant* 42:568-571.
- FONNESBECH, M. (1972) Growth Hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro. *Plant Physiol.* 27, 310-316.
- FOSKET, D. E. (1994). Plant growth and development: a molecular approach. San Diego: [s.n.], 580 p.
- FOYER, C.H.. PAUL, M.J. 2001. **Source-Sink Relationships**. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group pp. 1-11.
- GANESHAN, S.; CHODAPARAMBIL, S. V.; BAGA, M.; BRIAN FOWLER, D.; HUCL, P.; ROSSNAGEL, B. G.; CHIBBAR, R. N. (2006) *In vitro* regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to Thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 85, n. 1, p. 63-73.
- GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.*, v. 126, p. 1196-1204.
- GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.*, v. 128, p. 790-792.
- GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2003). Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science*, v. 8, p. 20-26.
- GASPAR, T. *et al.* (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In: In vitro cellular & developmental biology*. In: Plant. San Francisco: World Congress on In Vitro Biology.

- GENOUD, T.; METRAUX, J.P. (1999). Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends in Plant Science*, 4, 503-507.
- GIBA, Z.; GRUBISIC, D.; TODOROVIC, S.; SAJC, L.; STOJAKOVIC, D.; KONJEVIC, R. (1998). Effect of nitric oxide - releasing compounds on phytochrome - controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regulation*, v. 26, p. 175-181.
- GIFFORD, R.M.; EVANS, L.T. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 485-509.
- GOESCHL, J. D.; PRATT, H.K.; BONNER, B. A. (1967). An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.* 42: 1077-1080.
- GOESCHL, J. D.; KAYS, S. J. (1975). Concentration dependencies of some effects of ethylene on etiolated pea, peanut, bean, and cotton seedlings. *Plant Physiol.* 55, 670-677.
- GOESCHL, J.D.; PRATT, H.K.; BONNER, B.A. (1994). An effect of light on the production of ethylene and growth of the plumular portion of etiolated pea seedling. In: *J. of Plant Physiol.* Vol. 105. p. 643-650. Stanford: American Society of Plant Biologists. Disponível: <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/42/8/1077>.
- GOLDSMITH, M. H. M. (1977). The polar transport of auxin. In: *Annual Review of Plant Physiol.* Vol. 28. p. 439-478. Palo Alto: Annual Reviews.
- GOMI, K.; MATSUOKA, M. (2003). Gibberellin signaling pathway. In: *Plant Biology*. Vol. 6. n.5. p. 489-493. Oxford: Elsevier.
- GOMI, K., SASAKI, A., ITOH, H., UEGUCHI-TANAKA, M., ASHIKARI, M., KITANO, H., AND MATSUOKA, M. (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.* 37: 626-634.
- GOUVEA, C.; SOUZA, J.F.; MAGALHAES, A.C.N.; MARTINS, I.S. (1997). NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, v. 21, p. 183-187.
- GOVAERTS, R. (2006). World Checklist of selected plant families. Orchidaceae. Disponível em: <http://www.kew.org/science/directory/teams/MonocotsIII/index.html>
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. (1998). **Micropropagação**. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J.A. (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CNPq. p.183-260.
- GRÜN, S.; LINDERMAYR, C.; SELL, S.; DURNER, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. of Exp. Bot.*, v. 57, p. 507-516.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D.E. (1990). **Propagation de plantas: principios e practices**. Continental, Mexico. p.760

HASEGAWA, N. (2005). The Evolution of the Orchid Hobbyist Through the Centuries. **Resumo apresentado ao 18th World Orchid Conference**. Dijon, França.

HE, Y.K.; TANG, R.H.; HAO, Y.; STEVENS, R.D.; COOK, C.W.; AM, S.M.; JING, L.F.; YANG, Z.G.; CHEN, L.G.; GUO, F.Q.; FIORANI, F.; JACKSON, R.B.; CRAWFORD, N.M.; PEI, Z.M. (2004). Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. **Science**, v. 305, p. 1968-1971.

HESZKY, L. E.; NAGY, M. (1987). *In vitro* conservation of potato germplasm in Hungary. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, p. 465-490.

HEW, C.S.; YONG, J.W.K. (1997) **Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry**. Worlds Scientific Publishing.

HICKS, G.S. (1994). Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. In: *In vitro* cellular & developmental biology. **Plant**. Vol. 30. p. 10-15. San Francisco: World Congress on In Vitro Biology.

ISHII, Y., TAKAMURA, T., GOI, M., TANAKA, M. (1998). Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. **Plant Cell Rep**. 17, 251-255.

ITAI, C.; BIRNBAUM, H. (1996). Synthesis of plant growth regulators by roots. In: WASEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, V. (ed.). **Plant roots: the hidden half**. p. 273-284. New York: Marcel Dekker.

JACOBS, W. P.; CASE, D. B. (1965) Auxin transport, gibberellins apical dominance. **Science**. 148: 1729 – 1731.

KAZAMA, H.; DAN, H.; IMASEKI, H.; WASTENEYS, G.O. (2004). Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells. **Plant Physiol**. 134:1614-1623.

KERBAUY, G.B. (1984) Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**. v. 113. p.287-291.

KERBAUY, G.B.; PETERS, J.A.; HELL, K.G. (1986). Cytokinin autotrophy and differentiation in tissue cultures of haploid tobacco plants. **Pl. Science** 45:125-132.

KERBAUY, G. B.; COLLI, S.; MAJEROWICZ, N.. (1995). **Manutenção da atividade meristemática apical em caules de *Catasetum* (Orchidaceae) pelo etileno e escuro: implicações como uma nova estratégia de micropropagação**. In: Resumos de V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. p.3. Lavras: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.

KERBAUY, G.B. (1995). **Biofábrica de Orquídeas**. In: Gerald, L.T.S (coord) p. 22-37. *Biofábrica: Produção industrial de plantas in vitro*. Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP.

KERBAUY, G.B. (1997). Clonagem de plantas *in vitro*: uma realidade. *Biotec., Ciênc. & Desenvol.* 01: 30 – 33.

KERBAUY, G.B. (1999). **Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vol. 2. Brasília: Embrapa.

KERBAUY, G.B. (2004). Estágio atual do emprego de técnicas biotecnológicas para a pesquisa em plantas orquídeas. In *Orquidologia sul-americana: uma compilação científica* p.51-58.

KERBAUY, G.B.; CHAER, L. (2011). Micropropagação Comercial de Orquídeas: Conquistas, Desafios e Perspectivas. In: Gerald, L.T.S (coord) p. 178-205. *Biofábrica de plantas: Produção Industrial de Plantas in vitro*. São Paulo: Antiqua.

KIEBER, J. J.; ECKER, J. R. (1993). Ethylene gas: its not just for ripening anymore. *Trends Genet.* 9, 356-363.

KOORRNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKERK, R.; ZABEL, P. (1993) Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant J* . 3:131-141.

LACERDA, K. G. (1995.) **Amazon: discovery of new species and extinction**. In: LACERDA, K. *et al* (ed.). *Brazilian Orchids*. p. 9-123. Tokyo: Sodo Publish.

LAMATTINA, L.; GARCIA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* v. 54. p. 109-136.

LANG, A.; DURING, H. 1991. Partitioning control by water potential gradient: evidence for compartmentation breakdown in grape berries. *J. Exp. Bot.* 42:1117-1122.

LESCHEM, Y.Y.; HAMARATY, E. (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage. *J. of Plant Physiol.* Vol. 148. p. 258-263. Stanford: American Society of Plant Biologists.

LESCHEM, Y. Y.; WILLS, R. B. H.; KU, V. V. V. (1998). Evidence for function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. In: *Plant Physiol. Biochem.* American Society of Plant Biologists. Stanford. Vol. 36. p. 825-833. Palo Alto: Annual Reviews.

LESCHEM, Y.Y.; PINCHASOV, D. (2000). Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea Americana* (Mill.). *J. of Exp. Bot.* 51, pp. 1471–1473.

- LIMA, L.C.; COSTA, S.M.; DIAS, M.S.C.; MARTINS, R.N.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M. (2005) Controle do amadurecimento de banana 'Prata-Anã' armazenada sob refrigeração e atmosfera modificada passiva com o uso do 1-Metilciclopropano. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.29, p.476-480.
- LINK, G. (1998). What is development? In: Westhoff, P. (ed.). *Molecular plant development*. New York: Oxford University Press.
- LOWELL, P.; BOOTH, A. 1967. Effect of gibberellic acid on growth, tuber formation and carbohydrate distribution in *Solanum tuberosum*. *New Phytol.* 66: 525-537.
- LYNDON, R.F. (1990). **Plant Development – The Cellular basis**. Cambridge: University Press.
- MAGALHÃES, J.R., MONTE, D.C., DURZAN, D. (2000). Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. and Molec. Biol. of Plants*, v. 6, p. 117-127.
- MAGALHÃES, J.R., PEDROSO, M.C., DURZAN, D. (1999). Nitric oxide, apoptosis and plant stress. *Physiol. and Molec. Biol. of Plants*, v. 5, p. 115-125.
- MAJEROWICZ, N.; PERES, L. E. P.. (2004). **Fotomorfogênese em Plantas**. In: Fisiologia Vegetal. London: Kerbaury.
- MALIGA, P. *et al.* (1975). Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature Magazine*. n. 225. p. 401-405. New York: Nature Publishing Group.
- McDANIEL, C.N. (1992). **Introduction and determination: developmental concepts**. FNL. Vol. 14. p. 3-6. Department of Biology. New York: Rensselaer Polytechnic Institute, Troy.
- MEINS, JR., F.; BINNS, A. (1979). Cell determination in plant development. In: *Bioscience Journal*. n. 29. p. 221-225. Washington: The American Institute of Biological Science.
- MELIS, R.J.M.; VAN STADEN, J. 1984. Tuberization and hormones. *Z. Pflanzenphysiol.* 113: 271-276.
- METRAUX, J. P.; H. KENDE, (1983). The role of ethylene in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol* 72: 441– 446.
- MILLER, D.; WARREN, R. (1996). **Orquídeas do alto da serra da mata atlântica pluvial do sudeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Salamandra Consultoria.
- MISHINA, T.E.; LAMB, C.; ZEIER, J. (2007). Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, v. 30, p. 39-52.
- MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. (1995). Nitric oxide in the inflammation and immune response. Medical School. University of Tampere, Finland. *Annals of Medicine*. Vol. 27. p. 359-367. London: Informa Healthcare/Taylor & Francis Group.

- MOREIRA, M. A.; PASQUAL, J. G. de Carvalho; FRÁGUAS, C. B. (2003). Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. *In: Ciência Agrotécnica*. Vol. 27. p. 1002-1006. Lavras.
- MOREL, G. (1960). Producing virus-free cymbidiums. *In: American Orchid Society Bulletin*. Vol. 29. p. 495-497. West Palm Beach, Fla.: American Orchid Society.
- MUSGRAVE A.; WALTERS J. (1973). Ethylene-stimulated growth and auxin transport in *Ranunculus sceleratus* petioles. *New Phytologist* 72, 83-789.
- NAKAJIMA, K.; BENFEY, P. N. (2002). Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root. *The Plant Cell* S265–S276.
- NEGM, F. B., SMITH, O. E.; KUMAMOTO, J. (1972). Interaction explants of carbon dioxide and ethylene in overcoming thermodormancy of lettuce seed. *Plant Physiol.* v.49, p. 869-872.
- NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. of Exp. Bot.*, v. 59, p. 165-176.
- NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. (2003). Nitric oxide signaling in plants. *In: New Phytologist*. Vol. 159. p. 11-35. Oxford: Blackwell Publishing.
- NIEVOLA, C.C.; KRAUS, J.E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v.41, p. 832-837.
- OTVOS, K; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZUCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHER, A. (2005). Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant J.* 43, 849–860.
- PAGNUSSAT, G. C. *et al.* (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *J. of Plant Physiol.* Vol. 129. 954-956. Stanford: American Society of Plant Biologists.
- PAGNUSSAT, G.C.; LANTERI, M.L.; LAMATTINA, L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.*, v. 132, p. 1241-1248.
- PAGNUSSAT, G.C.; LANTERI, M.L.; LOMBARDO, M.C.; LAMATTINA, L. (2004). Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.*, v. 135, p. 279-286.
- PALMER, C.E.; SMITH, O.E. 1970. Effect of kinetin on tuber formation in isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell Physiol.* 11: 303-307.

PARANI, M.; RUDRABHATLA, S.; MYERS, R.; WEIRICH, H.; SMITH, B.; LEAMAN, D. W.; GOLDMAN, S. L. (2004). Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *Plant Biotech J* 2:359–366

PATRICK, J.W. 1988. Assimilate partitioning in relation to crop productivity. *HrtSci*. 23: 33-40.

PEDROSO, M. C.; MAGALHAES, J. R.; DURZAN, D. (2000). **A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues.** *J. of Exp. Bot.*, v. 51, p. 1027-1036.

PERES, L.E.P. *et al.* (1999). Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). *In: J. of Plant Physiol.* Vol.155. p. 551-555. Stanford: American Society of Plant Biologists.

PERES, L.E.P. (2002). Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *In: Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. n. 25. p. 44-48. Brasília: KL3 Publicações.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; VIVIANE, D.; KRAUS, J.E. (2008). Anomalous somatic embryogenesis in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Mirtaceae). *Rev. Brasil. Bot.* 31:155-164.

PHILOSOPH-HADAS, S., AHARONI, N.; YANG, S. F. (1986). Carbon dioxide enhances the development of the ethylene forming enzyme in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* v. 82, p. 925-929.

PILLARY, I.; RAILTON, I. D. (1983). Complete release of axillary buds from apical dominance in intact light-grown seedlings of *Pisum sativum* L. following a single application of cytokinin. *In: J. of Plant Physiol.* Vol. 71. p. 972-974. Stanford: American Society of Plant Biologists.

PIRES, E.J.P. (1998). Emprego de reguladores de crescimento em viticultura tropical. *In: Revista Informe Agropecuário*. Vol. 19. n.194. p.40-43. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - Epamig.

PURGATTO, E. ; LAJOLO, F. M. ; NASCIMENTO, J. R. O. ; CORDENUNSI, B. R. (2002). The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *J. of Plant Physiol.* v. 159, n. 10, p. 1105-1111.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. (2007) Multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquiae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. Goiânia, v. 37, n. 1, p. 10-15, mar.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. (1996). **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

RODRIGUES, M. A. *et al.* (2006). Envelhecimento provoca mudanças morfológicas e ganho de competência no meristema apical radicular de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) para conversão em gemas caulinares. **Resumo apresentado ao XVI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo - SBSP**. Piracicaba.

ROITSCH, T; EHNEB, R. 2000. Regulation of source/sink relation by cytokinins. *Plant Growth Reg.* 359-367.

ROSS, J.; LI, Y. LIM, E. K.; BOWLES, D.J. (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* 2: 3004.1–3004.6

ROY, J., BANERJEE, N. (2003). Induction of callus and plant regeneration from shoot tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum*. H.K. f. *Sci. Hortic.* 97, 333-340.

RZEWUSKI, G., SAUTER, M. (2008). Ethylene biosynthesis and signaling in Rice. *Plant Science*, 175:32-42.

SANYAL, D.; BANGERTH, F. (1998). Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots of apple seedlings and bearing apple trees. *Plant Growth Regulat.* 24, pp. 127–134.

SASAKI, A., ITOH, H., GOMI, K., UEGUCHI-TANAKA, M., ISHIYAMA, K., KOBAYASHI, M., JEONG, D.-H., AN, G., KITANO, H., ASHIKARI, M., AND MATSUOKA, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896–1898.

SAUERBREY, E.; GROSSMAN, K.; JUNG, J. (1987). Influence of growth retardants on the internode elongation and ethylene production of sunflower plants. *Physiol. Plant.* 70: 8-12.

SCHERES, B.; MCKHANN, H.; VAN DEN BERG, C.; WILLEMSSEN, V.; WOLKENFELT, H.; DE VRIEZE, G.; WEISBEEK, P. (1996). **Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana***. In: Plant roots: from cells to systems, Kluwer Dordrecht, The Netherlands, in press.

SHINOZAKI, K.; DENNIS, E.S. (2003). Cell signaling and gene regulation global analyses of signal transduction and gene expression profiles. *Curr Opin Plant Biol* 6:5 , pp. 405-409.

SINGH, F. (1992). Micropropagation of orchids - *Spathoglottis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y.P.S (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, high-tech and micropropagation IV**. Vol. 20. p. 223-245. Berlin: Springer.

SISLER, E. C.; SEREK, M. (1997). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia plantarum*, 100:577-582.

SISLER, E.C., SEREK, M. **Compounds interacting with the ethylene receptor in plants**. Acta Horticulturae, Leuven v.5, p.473-480, 2003.

SISLER, E. C.; WOOD, C. (1988). Interaction of ethylene and CO₂. *Physiologia Plantarum*. V. 73, p. 440–444.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. Vol. 11. p. 118-131.

SOUZA, A. S. *et al.* (1998). **Propagação**. In: ALVES, E.J. (org.). A cultura da banana. Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. p.151-195. Cruz das Almas: Embrapa/SPI.

SUGE, H.; KUSANAGI, T. (1975). Ethylene and carbon dioxide: Regulation of growth in two perennial aquatic plants, arrowhead and pond weed. *Plant Cell Physiol*. v.16, p. 65-72.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. (2004) **Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum***. *J. of Plant Physiol*. Vol. 161(8). p. 929 – 935. Stanford: American Society of Plant Biologists.

SUZUKI, R.M. (2005). **Efeitos da luz, fitormônios e alguns nutrientes sobre o comportamento do meristema caulinar de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. São Paulo: USP.

SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B. (2006). Effect of light and ethylene on the endogenous hormones and development of *Catasetum*. *Braz. J. Pl. Physiol*. 18:359-365.

SUZUKI, R. M. ; KERBAUY, G. B. ; PESCADOR, R. ; PURGATTO, E. ; Ceccantini, G.C.T. ; FERREIRA, W. M. (2010). Dark-induced hormone changes coincide with the resumption of light-inhibited shoot growth in *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *J. of Plant Physiol*. v. 167, p. 375-381.

SYMONS, G.M.; SMITH, J.J.; NOMURA, T.; DAVIES, N.W.; YOCOTA, T.; REID, J.B. (2008). The hormonal regulation of de-etiolation. *Planta* 227 1115–1125.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2002). *Plant Physiol*. 3 ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

THORPE, T.A. (1994). Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (ed.). *Plant Cell and Tissue Culture*. p. 17-36. London: Kluwer Academic.

TREWAVAS, A. (2000). Signal perception and transduction. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. cap. 18. p. 930-987. Rockville: American Society of Plant Physiology.

VAN BEL, A.J.E. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell & Environment*. 26: 125-149.

VANDENBUSSCHE, F.; VANCOMPERNOLLE, B.; RIEU, I. AHMAD, M.; PHILLIPS, A.; MORITZ, T.; HEDDEN, P.; VAN DER STRAETEN, D. (2007) Ethylene-induced Arabidopsis hypocotyl elongation is dependent on but not mediated by gibberellins. *J. of Exp. Bot*. 58:4269-4281

VAN STADEN, J.; DAVEY, E. (1979). The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. In: *Plant, Cell and Environment*. Vol. 2. p. 93-106. Oxford: Blackwell Publishing.

- VOESENEK, L. A. C. J.; BLOM C. W. P. M. (1989). Growth responses of *Rumex* species in relation to submergence and ethylene. *Plant Cell and Environment* 12, 433–439.
- VON ARNIM, A.; DENG, S. W. (1996). Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Physiology. Molecular Biology*. Vol. 47. p. 215-243. Palo Alto: Annual Reviews.
- VRIEZEN, W.H.; ZHOU, Z.; VAN DER STRAETEN, D. (2003) Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* 91, 263-270
- VUYLSTEKE, D.R.; ORTIZ, R. (1996). Field performance vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB GROUP). In: *HortScience*. Vol. 31. n.5. p.862-865. Alexandria: American Society for Horticultural Science/HighWire Press.
- WARDLAW, I.F. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.* 116: 341-381.
- WAREING, P.F. (1982). **Determination and related aspects of plant development**. In: SMITH, H. e GRIENSON, D. (ed.). The molecular biology of plant development. Vol. 18. p. 517-541. Oxford: Blackwell Scientific.
- WIGHTMAN, F.; SCHNEIDER, E. A.; THIMANN, K. V. (1980). Hormonal factors controlling the initiation and development of lateral roots II. Effects of exogenous growth factors on lateral root formation in pea roots. In: *Physiologia Plantarum*. Vol. 49. p. 304-314. Oxford: Blackwell Publishing.
- WILLIAM, P. J.; DAVID, B.C (1965). Auxin Transport, Gibberellin, and Apical Dominance. *Science*, New Series, Vol. 148, No. 3678, pp. 1729-1731.
- WIMBER, D.E. (1963) Clonal Multiplication of Cymbidiums through tissue culture of the shoot meristem. *Am Orchid Soc. Bull.* 32, 105-107. INTERNATIONAL UNION FOR
- WINER, L.; GOREN, R.; RIOV, J. (2000). Stimulation of the oxidative decarboxylation of indole-3-acetic acid in citrus tissues by ethylene. *Plant Growth Regulation*. v. 32, p. 231–237.
- XU, Y.L.; GAGE, D.A.; ZEEVAART, J.A.D. (1997) Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*: Effects of photoperiod on expression of the GA₄ and GA₅ loci. *Plant Physiol.* 114: 1471-1476.
- ZHANG, Y.Y.; WANG, L.L.; LIU, Y.L.; ZHANG, Q.; WEI, Q.P.; ZHANG, W.H. (2006). Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta*, v. 224, p. 545-555.
- ZHAO, D.Y.; TIAN, Q.Y.; LI, L.H.; ZHANG, W.H. (2007). Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. *Annals of Botany*, v. 100, p. 497-503.

Resumo

Catasetum fimbriatum (Morren) Lindl. é uma orquídea estudada no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP desde 1990. As plantas deste gênero, quando incubadas *in vitro* no escuro, apresentam crescimento contínuo do caule na ausência de qualquer regulador de crescimento. Quando as gemas laterais dos caules estiolados são isoladas e incubadas na presença de luz, originam novas plantas, constituindo-se, desta forma, uma técnica relativamente simples e geneticamente segura de clonagem de plantas. Baseando-se no conhecimento consolidado com esta planta, procurou-se por um lado aprofundar conhecimentos básicos a respeito dos processos envolvidos na indução do crescimento caulinar em *C. fimbriatum*, e por outro, tomando-a como parâmetro de referência, estendê-los às plantas de *Cymbidium* e *Cattleya labiata* tratadas com etileno, giberelina (GA) e óxido nítrico (NO).

Foram utilizadas plantas micropropagadas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, enquanto as de *Cattleya* foram obtidas por meio de germinação assimbiótica. Após 120 dias de incubação, as plantas foram transferidas para o escuro e tratadas com diferentes concentrações de GA, paclobutrazol (PA), um inibidor de biossíntese de GA, etileno, 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do etileno, e NO. No 30º e 60º dia de incubação no escuro, foram mensurados o número de nós formados e de gemas laterais liberadas, bem como o tamanho e as massas fresca e seca dos estolões. Análises dos teores de etileno e CO₂ acumulados nos frascos foram determinadas por meio de cromatografia gasosa.

Os três gêneros estudados apresentaram respostas diferentes quanto ao estiolamento. Nitidamente, sob as condições utilizadas, as plantas de *Cattleya labiata* mostraram-se recalcitrantes à formação de estolões e à quebra da dominância apical, mantendo inalterado o crescimento foliar ao longo de todo o período de tratamento. Não obstante os caules de *C. fimbriatum* e *Cymbidium* tenham estiolado conspicuamente, na primeira planta eles se

formaram na base do pseudobulbo, enquanto na segunda houve a retomada da atividade meristemática apical já nos primeiros 30 dias de incubação. Os tratamentos com GA promoveram significativamente o alongamento caulinar em *C. fimbriatum*, enquanto que nas plantas de *Cymbidium* a concentração mais elevada inibiu esse processo. Os tratamentos com PA e 1-MCP reduziram o alongamento caulinar em ambos os gêneros. O etileno aumentou a liberação de gemas laterais e a ramificação das mesmas em *C. fimbriatum* e promoveu incremento no tamanho do caule principal e no número de segmentos nodais em *Cymbidium*. Os efeitos mais marcantes da aplicação de NO ocorreram após 30 dias de tratamento, refletindo positivamente sobre o alongamento caulinar e o número de segmentos nodais em *C. fimbriatum*. Nas plantas de *Cymbidium*, contudo, a presença de NO inibiu esse processo.

No que se refere à emissão de etileno e CO₂, observou-se uma variação acentuada entre os gêneros e os tratamentos realizados. Quanto ao etileno, a liberação mais elevada deu-se nos tratamentos com etileno nas três plantas estudadas. A liberação deste hormônio foi mais proeminente nas plantas de *C. fimbriatum* do que nas de *Cymbidium*, o que, em princípio, poderia ser relacionado à rápida retomada da atividade meristemática nestas últimas e a manutenção da dominância apical, tendo aparentemente o oposto ocorrido com plantas de *C. fimbriatum*. Embora ambas originem estolões, os meristemas envolvidos comportam-se de forma distintas, podendo ser separados em três grupos. Nos primeiros dois se enquadrariam os gêneros *Catasetum* e *Cymbidium*, com inibição do crescimento foliar e formação de estolões a partir apenas da atividade do MAC (*Cymbidium*), ou a partir da liberação de gemas laterais (*Catasetum*), enquanto no terceiro grupo se enquadraria o gênero *Cattleya*, com manutenção do crescimento foliar e não formação de caules estiolados.

Abstract

Catasetum fimbriatum (Morren) Lindl. is an epiphytic orchid that has been studied since 1990 in our Laboratory. Plants of this genus have the peculiarity of being easily propagated, using the lateral buds of its etiolated shoot. This is possible because the shoot apical meristem shows a sustained activity when kept in darkness, resulting in an expressive shoot elongation. When the etiolated nodal segments are incubated under light, they rapidly form new plants. This micropropagation process dismisses the application of any plant growth regulators, representing an efficient in vitro multiplication method.

The aim of this study was to apply the existing knowledge about the physiology of dark-grown *C. fimbriatum* plants, to other two genera, *Cymbidium* and *Cattleya*, intending to characterize the role of ethylene, gibberellin and nitric oxide in the signaling of shoot elongation process of these plants. *C. fimbriatum* and *Cymbidium* plants were obtained by micropropagation technique, using etiolated nodal segments, whereas *Cattleya* plants were obtained by assimbiotic germination. After 3 months, these plants were incubated in the dark under different levels of concentration of gibberellin (GA), ethylene, nitric oxid (NO), paclobutrazol (PA, inhibitor of gibberellin biosynthesis) and 1-methylcyclopropene (1-MCP, inhibitor of ethylene perception),. After 30 and 60 days, the treatments effects were measured through the number of nodal segments of the stolons, shoot size, and wet and dry mass. Ethylene and CO₂ contents were determined using gas chromatography.

The three studied genera showed different responses to dark incubation and treatments. *Cattleya* was not able to recover shoot apical meristem (SAM) activity and its phenotype remained unaltered, maintaining foliar growth until the end of the treatment. *C. fimbriatum* originated stolons from the base of the pseudobulb, forming etiolated shoots. On the other hand, *Cymbidium* showed a different meristematic activity, giving rise to an

elongated stem from the apical end of the pseudobulb within the first 30 days of the experiment. GA promoted a significant increase in stem elongation in *C. fimbriatum* whereas in *Cymbidium* plants this parameter was inhibited at the highest level of hormone. PA and 1-MCP reduced stem elongation in both *C. fimbriatum* and *Cymbidium* plants. Ethylene treatment increased the development of lateral buds and their branching in *C. fimbriatum* and increased the size of *Cymbidium* etiolated stem and the number of node segments. The most conspicuous effects of the application of NO occurred after 30 days of treatment, increasing shoot elongation and number of node segments in *C. fimbriatum* and reducing these parameters in *Cymbidium* plants. With regard to ethylene and CO₂ emission the different genera presented different responses. *C. fimbriatum*, *Cattleya* and *Cymbidium* showed increasing hormone liberation within the ethylene treatments. Furthermore, *C. fimbriatum* showed conspicuously higher ethylene and CO₂ emission than *Cymbidium* plants. When incubated in the absence of light, the three orchid genera showed distinct behavior, separated into three groups: (1) etiolated stem formation only from SAM activity, and development of reduced leaves (*Cymbidium*) (2) etiolated stem formation from lateral buds and development of reduced leaves (*C. fimbriatum*), (3) absence of etiolated stems, with maintenance of foliar growth (*Cattleya*).