Aline Bertinatto Cruz

Aspectos relacionados à competência organogenética de
meristemas caulinares de *Dendrobium* Second Love
(Orchidaceae).

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(a): Dr. Gilberto Barbante Kerbaux

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

Cruz, Aline Bertinatto

Aspectos relacionados à competência organogenética de meristemas caulinares de *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae).

75 p.

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

1. Organogênese 2. Meristemas caulinares
3. Hormônios vegetais

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Apoio de fomento: CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbaux

Orientador

Dedico:

*Aos meus amados e queridos pais,
Neto e Celeste, pelos ensinamentos de vida!
Ao meu querido amigo e companheiro, Renato,
pelo apoio imensurável e amor incondicional!*

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas
duram, mas na intensidade com que acontecem.
Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas
inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy pela orientação, apoio e, acima de tudo, pelo exemplo de caráter, humildade e seriedade na pesquisa e no convívio acadêmico.

À Profa. Dra Helenice Mercier pelo exemplo de dedicação e por todo aprendizado sobre a importância do trabalho em equipe.

Ao professor Dr Marcus Buckeridge pelo apoio e convivência durante o andamento do trabalho.

À amiga e Dra Auri Rodrigues, pelo exemplo de pesquisadora, por seu incentivo constante e conselhos profissionais, além de todo carinho e amizade, sobretudo, nessa etapa importante de minha vida.

Ao amigo e Dr Luciano Freschi, pela ótima convivência e amizade e valiosa ajuda nos experimentos de etileno, dentre tantos outros.

À amiga e mestrandia Lia Chaer, pela amizade, sinceridade e prontidão tanto profissional quanto pessoal.

À amiga e Mestre Thais Semprebom, pela amizade sincera, sua valiosa ajuda com a estatística e por todos os momentos agradáveis durante nossa convivência nos últimos anos.

Aos amigos de trabalho e de vida (Alessandra, Camila, Cássia, Cíntia, Adriana Yepes, Aline Cavalari e Patrícia) pelo companheirismo, apoio constante e amizade sincera.

Aos demais amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Fisiologia Vegetal (Ilton, Paulo, Priscilla, Adriana Grandis, Ivã, Maraba, Bruna, Leila, Laura, Flávia, Luís e Mari), pelo convívio diário repleto de alegria, respeito e colaboração mútua.

À Ana Maria, Leonor e Ingrid pela amizade e por viabilizar as condições técnicas necessárias para o desenvolvimento de parte desse trabalho.

À toda equipe de professores do departamento de Botânica que, direta ou indiretamente, auxiliaram em diferentes etapas da minha formação acadêmica.

Aos secretários do departamento de Botânica (Norberto, Carlos e Cesário) e da seção de Pós-graduação (Helder, Érika e Vera) por todo o auxílio nas questões institucionais.

À Suzy pela amizade e por proporcionarem limpeza e descontração no ambiente de trabalho.

Aos meus sogros, Sueli e Vivaldo, por todo apoio e por serem sempre tão solícitos e carinhosos.

Ao Renato, meu amigo e companheiro, inclusive em todas as etapas desse trabalho, por sua paciência, amizade, amor e dedicação impossíveis de serem expressos em palavras.

À minha querida irmã, pelo carinho e exemplo de perseverança e superação.

Finalmente aos meus pais, que nunca mediram esforços pela felicidade de suas filhas, sempre respeitando minhas escolhas e por estarem sempre ao meu lado.

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

À CAPES, pelo auxílio financeiro e institucional.

Índice

Lista de abreviaturas	ii
1. Introdução	01
1.1. Os meristemas no desenvolvimento vegetal	01
1.2. Os meristemas no controle da organogênese caulinar	02
1.3. O cultivo de tecidos vegetais <i>in vitro</i> no estudo da organogênese caulinar	08
1.4. Organogênese caulinar em <i>Dendrobium</i> “Second Love” (Orchidaceae)	12
2. Objetivos	16
3. Material e métodos	17
3.1. Material vegetal	17
3.2. Método de obtenção do material vegetal	17
3.3. Avaliação do potencial organogenético de segmentos caulinares estiolados de <i>Dendrobium</i>	19
3.4. Avaliação de parâmetros de crescimento durante o desenvolvimento das plantas de <i>Dendrobium</i>	21
3.4.1. Efeitos de diferentes citocininas na organogênese caulinar de plantas intactas	21
3.4.2. Modulação da organogênese caulinar vegetativa e reprodutiva pelo TDZ	22
3.4.3. Extração de açúcares solúveis totais	23
3.4.4. Tempo mínimo de exposição ao TDZ necessário para a indução da floração	24
3.4.5. Quantificação do conteúdo de etileno emitido pelas plantas de <i>Dendrobium</i> durante o período de tratamento com TDZ	25
4. Resultados	28
4.1. Potencial organogenético de segmentos caulinares estiolados	28
4.2. Processos de organogênese durante o desenvolvimento de plantas intactas	35
4.2.1. Efeitos de diferentes citocininas na organogênese caulinar de plantas intactas	36
4.2.2. Modulação da organogênese caulinar vegetativa e reprodutiva pelo TDZ	39
5. Discussão	46
6. Conclusão	61
Resumo	63
Abstract	63
Anexos	65
Referências bibliográficas	66

Lista de abreviaturas

AG – AGAMOUS

AIA – ácido indolilacético

AP – APETALA

BA – 6-benziladenina

CG – cromatografia a gás

Ck/AIA – balanço citocinina e auxina

CLV – CLAVATA

EDTA – etilenodiamino tetra-acetato

iP – isopenteniladenina

iPR – isopenteniladenosina

KNOX – do inglês “*KNOTTED1-like homeobox*”

LFY – LEAFY

MAC – meristema apical caulinar

MAR – meristema apical radicular

PI – PISTILLATA

RNA_m – RNA mensageiro

STM – SHOOT MERISTEMLESS

TDZ – thidiazuron

WUS – WUSCHEL

Z – zeatina

ZC – zona central

ZM – zona medular

ZP – zona periférica

ZR – zeatina ribosídica

Introdução

1.1. Os meristemas no desenvolvimento vegetal

O desenvolvimento das plantas é coordenado pelo crescimento articulado das diversas partes do vegetal e compreende tanto processos de divisão, expansão e diferenciação celular quanto a formação de novos tecidos e órgãos (PERES, 2002). Para tanto, as plantas apresentam um sistema de desenvolvimento aberto, pós-embrionário, no qual seus órgãos (raízes, caules, folhas e flores) são formados de maneira recorrente e modular durante todo o ciclo de vida do vegetal (SRIVASTAVA, 2002; VERNOUX & BENFEY, 2005).

Este processo continuado de formação de novos órgãos durante o desenvolvimento pós-embrionário representa uma importante estratégia adaptativa para sobrevivência das plantas, uma vez que confere uma maior plasticidade de respostas fisiológicas e morfológicas a estes organismos sésseis, os quais são, portanto, altamente vulneráveis às variações e adversidades ambientais. Tal capacidade adaptativa das plantas deve-se à presença e atividade de grupos de células que retêm características embrionárias, denominados meristemas (DINNENY & BENFEY, 2008; ALABADÍ & BLÁZQUEZ, 2009).

As células que compõem os meristemas são morfologicamente indiferenciadas e consideradas pluripotentes, ou seja, possuem o potencial de originar diversos tipos celulares e tecidos distintos. As células meristemáticas dividem-se regularmente para manter sua própria população em estado proliferativo e indiferenciado, assim como para produzir células derivadas que seguirão o caminho de diferenciação durante a sua incorporação nos órgãos em formação ou em crescimento (VERDEIL *et al.*, 2007; DINNENY & BENFEY, 2008).

Muitos tipos de meristemas podem ser encontrados no corpo de uma planta adulta atuando de maneira conjunta e coordenada ao longo de seu desenvolvimento. Durante a embriogênese vegetal ocorre o estabelecimento de dois meristemas primários, o meristema apical caulinar e o meristema apical radicular, os quais desempenham papel de destaque na formação dos diferentes tipos celulares da planta, incluindo os próprios meristemas de origem secundária. Assim, os meristemas secundários são originados durante a vida pós-embrionária do vegetal e incluem os meristemas axilares, meristemas de raízes laterais, periciclo, entre outros (CASTELLANO & SABLowski, 2005, SCOFIELD & MURRAY, 2006).

1.2. Os meristemas no controle da organogênese caulinar

O meristema apical caulinar (MAC) é responsável pela formação dos diferentes órgãos e tecidos caulinares formados durante o ciclo de vida vegetal, apresentando especificidades estruturais e funcionais ao longo da ontogênese da planta (WANG & LI, 2008). Dessa forma, sabe-se que o MAC passa por três fases de desenvolvimento relativamente bem definidas e sucessivas: a fase juvenil, a fase adulta vegetativa e a fase adulta reprodutiva (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Em linhas gerais, a fase juvenil pode ser caracterizada pela formação de tecidos e órgãos juvenis na base do MAC, tais como primórdios foliares, diferenciando-se das fases adultas por ainda não apresentar mudanças significativas nas características vegetais de ordem morfológica ou de filotaxia. Na fase adulta vegetativa, por sua vez, a atividade do MAC origina os tecidos caulinares, folhas e meristemas axilares, enquanto que durante a fase reprodutiva origina os meristemas florais (TAIZ & ZAIGER, 2004).

A atividade do MAC vegetativo forma o caule primário composto pela repetição de segmentos caulinares, os quais são delimitados pelos pontos de ligação das folhas aos caules, regiões estas conhecidas como nós. Desse modo, na região do nó podem ser formadas

uma ou mais folhas, assim como um ou mais meristemas axilares, sendo estes últimos, como o próprio nome sugere, formados na axila de cada folha (na base do pecíolo foliar) em decorrência da atividade do MAC (ONGARO & LEYSER, 2008).

Os meristemas axilares possuem o potencial de desenvolvimento semelhante ao MAC primário, podendo formar um caule secundário completo sob determinadas condições. No entanto, eles normalmente formam apenas algumas folhas e cessam a atividade meristemática, gerando uma gema axilar dormente. Posteriormente, esta gema pode ser reativada por sinais específicos, produzindo um ramo com seu próprio meristema caulinar, indicando que os meristemas axilares conferem uma flexibilidade considerável para a variação na arquitetura caulinar (ONGARO & LEYSER, 2008).

Sendo assim, a ativação dos meristemas axilares para a ramificação caulinar é altamente regulada por diversos sinais ambientais como quantidade e qualidade de luz, disponibilidade de nutrientes (CLINE, 1991; SNOWDEN & NAPOLI, 2003) e sinais endógenos como os hormônios vegetais. As auxinas e as citocininas são conhecidas como as classes hormonais mais relacionadas com o controle da atividade dos meristemas axilares, sendo que os diferentes balanços hormonais entre elas desempenham papel fundamental na manutenção da dormência ou na liberação das gemas axilares iniciadas a partir dos meristemas caulinares. A ação da auxina encontra-se relacionada à manutenção da dormência da gema axilar, ao passo que o balanço hormonal deslocado em favor das citocininas promove a liberação das gemas axilares, permitindo a ramificação da parte aérea (CLINE, 1991; EMERY *et al.*, 1998; LEYSER, 2005; DUN *et al.*, 2006).

Apesar de ser ainda pouco compreendido o mecanismo pelo qual a auxina controla a dormência dos meristemas axilares, sabe-se que parte desta regulação deve-se ao fenômeno conhecido como dominância apical, o qual representa o crescimento preponderante do caule principal de plantas intactas em detrimento do desenvolvimento das gemas axilares. Dentro desta perspectiva, o controle negativo da atividade dos meristemas axilares envolve a

produção abundante de auxina na região apical do caule e primórdios foliares, assim como o seu transporte rigidamente ordenado, que ocorre de maneira basípeta, polar e célula-a-célula, formando um gradiente de concentração deste hormônio ao longo do caule (LJUNG *et al.*, 2001; BLAKESLEE *et al.*, 2005; ONGARO & LEYSER, 2008).

Tanto os meristemas axilares quanto o MAC podem ser denominados genericamente de meristemas vegetativos caulinares, pois apresentam estruturas semelhantes (KERSTETTER & HAKE, 1997). A organização estrutural do MAC na maioria das angiospermas apresenta características relativamente bem conservadas, ainda que haja uma considerável variedade de formas, tamanhos e padrões de disposição foliar na parte aérea das plantas. Dessa maneira, o MAC possui diferentes zonas celulares, baseadas no número e na disposição das divisões celulares. Os limites entre estas zonas não se encontram claramente separados, no entanto, é possível verificar a existência de três regiões distintas no MAC: a zona central (ZC), a zona periférica (ZP) e a zona medular (ZM) (BOWMAN & ESHED, 2000) (Figura 1).

A ZC é formada por células indiferenciadas que se dividem em baixa frequência e conferem identidade meristemática caulinar à sua própria população celular e às células iniciais vizinhas, cujo conjunto forma o nicho de células-tronco do caule. A ZP, por sua vez, está localizada nas proximidades dos flancos do MAC e suas células se dividem em maior proporção, originando células progenitoras que darão origem aos novos órgãos laterais. Por fim, a ZM está localizada entre a ZP e abaixo da ZC, e suas células se dividem e expandem rapidamente dando origem, principalmente, aos tecidos do caule (KERSTETTER & HAKE, 1997; BOWMAN & ESHED, 2000; WANG & LI, 2008).

Figura 1. Regiões do meristema apical caulinar (MAC). Zona Central (ZC), Zona Periférica (ZP) e Zona Medular (ZM). Fonte: BOWMAN & ESHED (2000).

Assim, a diferenciação das células originadas no MAC ocorre em regiões específicas em seus flancos, onde há a formação, por exemplo, dos primórdios foliares. A definição do destino celular dentro do MAC se dá por meio de um processo dinâmico controlado por uma série de sinais ambientais e endógenos regulados, em última análise, pela ativação/repressão de genes específicos. Dentre os inúmeros genes descritos como essenciais para a manutenção da organização e atividade do MAC vegetativo em *Arabidopsis thaliana*, destacam-se os genes WUSCHEL (WUS), CLAVATA 1 (CLV1), CLAVATA 2 (CLV2), CLAVATA 3 (CLV3) e SHOOT MERISTEMLESS (STM) (WANG & LI, 2008)

O modelo vigente proposto para explicar o mecanismo geral de controle do MAC vegetativo indica a expressão do fator de transcrição WUS como responsável pela manutenção das células-tronco presentes na zona central (ZC), bem como pelo controle da expressão de CLV3. Este último, se expressa também na ZC do MAC e, em conjunto com o CLV1 e CLV2, regula o número de divisões celulares na ZC a medida que restringe o domínio de expressão de WUS. Já o gene STM age numa via paralela aos CLVs e WUS e pertence à classe dos fatores de transcrição KNOX (do Inglês “KNOTTED1-like homeobox”), os quais controlam a função dos meristemas caulinares e estão envolvidos na manutenção das divisões celulares e do caráter indeterminado do MAC (BOWMAN & ESHED, 2000; SHARMA &

FLETCHER, 2002; FLETCHER, 2002; CASTELLANO & SABLowski, 2005; WILLIAMS & FLETCHER, 2005).

A mudança do MAC do estado vegetativo para o reprodutivo é um dos eventos mais complexos e pouco conhecidos do desenvolvimento de plantas superiores, e está atrelada ao estabelecimento da fase adulta do vegetal com a formação de flores para a reprodução (SCORZA, 1982; JAEGER *et al.*, 2006; VAZ & KERBAUY, 2008b). Esta transição no desenvolvimento do MAC está relacionada à alteração da competência e da sensibilidade de suas células para a percepção inicial dos estímulos indutores deste processo, sendo marcada pelo aumento na frequência das divisões celulares dentro da ZC, levando ao aumento no tamanho e à reorganização estrutural do MAC (MCDANIEL *et al.*, 1992; BERNIER *et al.*, 1993).

A organização geral do meristema floral é similar à organização do meristema caulinar vegetativo, pois apresenta ZC com células indiferenciadas e ZP com células progenitoras envolvidas na organogênese floral (FLETCHER, 2002). Apesar destas semelhanças estruturais, a floração constitui uma etapa singular do desenvolvimento vegetal que resulta na reprogramação das células tanto do MAC quanto dos meristemas axilares do caule, levando-os a uma nova rota do desenvolvimento decorrente de uma série de alterações fisiológicas, genéticas e morfológicas em resposta a sinais ambientais e endógenos (LYNDON, 1990; PEETERS *et al.*, 1991; MC DANIEL, 1992; AUKERMAN & AMASINO, 1998).

Dessa forma, a determinação floral de um meristema é desencadeada por sinais oriundos do ambiente como temperatura e fotoperíodo, bem como por sinais provenientes de diversas partes da planta como o estado nutricional, disponibilidade de açúcares e hormônios, os quais agem de maneira integrada e sincronizada (PEETERS *et al.*, 1991; KOSTENYUK *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2006; VAZ & KERBAUY, 2008b). Estudos recentes acerca da natureza dos sinais indutores externos da floração indicam que, se sensível, a planta é capaz de gerar uma sinalização endógena específica para a transição floral, a qual parece envolver as citocininas, sacarose, giberelinas e redução de compostos nitrogenados (CORBESIER &

COUPLAND, 2006). O papel indutor das citocininas na floração vem sendo corroborado consistentemente por diversos trabalhos (BERNIER *et al.*, 1993; LEJEUNE *et al.*, 1994; BONHOMME *et al.*, 2000).

Estudos recentes também identificaram diversas redes de interações moleculares que integram os sinais endógenos e ambientais na regulação do desenvolvimento meristemático (BERNIER & PÉRRILLEUX, 2005). Dentro desta perspectiva, sabe-se que a mudança do MAC do estado vegetativo para floral envolve a participação tanto de genes que conferem a identidade do meristema floral quanto de genes fundamentais para o estabelecimento da identidade dos próprios órgãos florais. Dentre estes genes identificados em *Arabidopsis thaliana* destacam-se LEAFY (LFY), AGAMOUS (AG), APETALA1 (AP1), APETALA 2 (AP2), APETALA 3 (AP3) e PISTILLATA (PI), dentre outros (BERNIER & PÉRRILLEUX, 2005; SABLÓWSKI, 2007).

AP1 e LFY promovem o estabelecimento da identidade do meristema floral e, conseqüentemente, a determinação do MAC. No entanto, a parada da atividade do MAC não ocorre devido à ação direta destes genes regulatórios, mas sim, como parte das respostas desencadeadas por AP1 e LFY para o desenvolvimento floral. Dentre estas respostas, destaca-se a ação promotora de LFY sobre a expressão de AG, um importante fator de transcrição que controla a determinação do MAC e cuja expressão também é regulada positivamente por WUS. Embora não esteja totalmente elucidado o mecanismo que integra estes sinais moleculares no controle da transição do meristema caulinar vegetativo para floral, há evidências que apontam para a possível atuação antagônica de AG sobre WUS e STM, genes mantenedores da função do MAC (SABLÓWSKI, 2007).

No entanto, sabe-se que tanto o AG quanto o LFY estão envolvidos na identidade do meristema floral, sendo que o primeiro é responsável por integrar os sinais provenientes de diversas rotas de expressão gênica envolvidas na transição floral, dentre as quais, devido ao grande número de fatores envolvidos na floração, destacam-se quatro rotas: do fotoperíodo;

da vernalização; das giberelinas, e de regulação autônoma (BERNIER & PÉRILLEUX, 2005). Por outro lado, o LFY também desempenha importante papel no desenvolvimento dos órgãos florais à medida que ativa a expressão de outros genes homeóticos florais tais como AP1, AP2, AP3 e PI. O modelo ABCDE de identidade de órgãos florais explica como tais genes atuam na formação das diversas peças florais (BERNIER & PÉRILLEUX, 2005; DORNELAS & DORNELAS, 2005; JAEGER *et al.*, 2006).

Em muitas plantas, uma das primeiras mudanças verificadas no estabelecimento da floração é a perda da dominância apical e a ativação de meristemas axilares, sugerindo a associação da transição floral a uma queda nos níveis endógenos de auxinas (THOMAS & VINCE-PRUE, 1997). Assim, na maioria das plantas, incluindo algumas espécies de orquídeas, tratamentos com auxinas tendem a ser inibitórios à formação de flores (METZGER, 1995). Entretanto, essa inibição parece ser um efeito secundário resultante da produção de etileno, induzida pela auxina (TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004). Estudos com *Arabidopsis* indicam que essa regulação se dá através do aumento da transcrição dos genes da enzima ACS (1-aminociclopropano-1- carboxílico sintase) (BLEECKER & KENDE, 2000) a qual é responsável pela síntese do ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), o precursor de etileno (WANG *et al.*, 2002).

1.3. O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* no estudo da organogênese caulinar

Sabe-se que a maioria dos fatores que afetam o crescimento dos órgãos, tecidos e células vegetais *in vitro* são semelhantes àqueles que atuam no crescimento *in vivo* (HEW & YONG, 1997). Portanto, a utilização dessa técnica é essencial para o estudo da organogênese na medida em que representa uma importante ferramenta de pesquisa. Sob condições *in vitro*, é possível avaliar diversos aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos através do controle eficiente e isolado da composição do meio de cultura (v.g. nutrientes, hormônios e

açúcares), da temperatura, do fotoperíodo e da irradiância, dentre outros fatores (VAZ & KERBAUY, 2008a). O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* também vem sendo utilizado em estudos moleculares com muita eficácia (SUGIYAMA, 1999).

De maneira geral, a técnica de cultura de tecidos possibilita a organogênese *in vitro* utilizando-se diferentes explantes tais como meristemas ou ápices meristemáticos, segmentos caulinares, gemas axilares, dentre outros (FERREIRA, 2003). O estudo da organogênese *in vitro* permite ainda analisar a maneira pela qual os tecidos vegetais percebem e respondem às diversas moléculas sinalizadoras dos processos de desenvolvimento, bem como estudar os eventos e sinais que determinam os diferentes passos da organogênese (VAZ & KERBAUY, 2008a).

A organogênese representa um processo altamente complexo, uma vez que é composta por diversas fases que diferem entre si tanto do ponto de vista molecular quanto fisiológico (SUGIYAMA, 1999). Por este motivo, CHRISTIANSON & WARNICK (1988), tomando como base os resultados obtidos com o estudo da organogênese induzida a partir de explantes foliares de *Convolvulus arvensis* L., propuseram a subdivisão do processo de organogênese *in vitro* em seis etapas subsequentes: (i) desdiferenciação; (ii) aquisição de competência; (iii) indução; (iv) determinação; (v) diferenciação e (vi) regeneração ou formação do órgão.

De acordo com esta subdivisão proposta pelos autores, as células dos explantes utilizados nos experimentos necessitam passar por um processo de desdiferenciação antes de adquirir competência para formar um novo órgão, o qual é desencadeado por tratamentos com reguladores de crescimento (balanço auxina/citocinina) que originaria um tecido composto por células pouco diferenciadas, denominado de calo. A partir de então, as células do calo adquirem competência e, uma vez induzidas por sinais específicos, se tornariam determinadas para uma nova rota de desenvolvimento finalmente, desencadeando a diferenciação e formação de um novo órgão (CHRISTIANSON & WARNICK, 1988).

De maneira diversa ao processo de organogênese acima relatado, alguns tecidos vegetais já possuem a necessária competência organogenética sem que haja a necessidade de passar pela fase de desdiferenciação de suas células. Nestes casos a formação do órgão será iniciada diretamente a partir das células do explante, sendo denominada organogênese direta. Por outro lado, quando o explante empregado não apresenta a competência inicial para responder ao estímulo indutor da organogênese *in vitro*, como no caso dos explantes utilizados por CHRISTIANSON & WARNICK (1988), o processo de organogênese é chamado de indireto, uma vez que conta com a etapa de desdiferenciação para que seja adquirida a necessária competência organogenética (PERES, 2002).

Inúmeras substâncias participam do controle da organogênese vegetal *in vitro*, sendo que as citocininas e auxinas desempenham um papel crítico nesse processo. SKOOG & MILLER (1957) demonstraram que a indução da organogênese a partir de calos de tabaco (*Nicotiniana tabacum*) é dependente de um balanço de citocinina/auxinas no meio de cultura onde o balanço favorável à auxina promove a formação de raízes e o balanço favorável às citocininas proporciona a formação de gemas caulinares (PERES, 2002).

De acordo com o apresentado anteriormente, o balanço entre estas duas classes hormonais também possui importante participação na regulação da quebra da dominância apical e na indução de brotamento lateral tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ONGARO & LEYSER, 2008). Todavia, o papel regulatório destes hormônios na floração ainda não está totalmente elucidado, sendo a compreensão dos sinais e dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que controlam este processo do desenvolvimento de grande importância tanto para a agricultura e horticultura quanto para a pesquisa básica sobre o desenvolvimento vegetal (METZGER, 1995).

Pesquisas realizadas nas últimas três décadas mostraram que a floração pode ser induzida em várias espécies mantidas sob cultivo *in vitro* (TEE *et al.*, 2008), sendo que cada uma delas necessita de condições de incubação e composições de meios de cultura específicos

para a indução deste evento organogenético. Na maioria dos estudos, destaca-se o uso de citocininas para desencadear a indução floral, porém, combinações entre outros reguladores de crescimento, açúcares e nutrientes também têm se demonstrado efetivas na indução floral de algumas espécies cultivadas *in vitro* (BERNIER, 1988; PEETERS *et al.*, 1991; KINTZIOS & MICHAELAKIS, 1999; LUO *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2006; SIM *et al.*, 2008; VAZ & KERBAUY, 2008b).

Além do papel estimulatório na floração *in vitro*, as citocininas também têm se mostrado importantes na indução e coordenação de outros processos organogenéticos *in vitro* em diversas espécies, como por exemplo, no brotamento caulinar (LEJEUNE *et al.* 1994; BERNIER *et al.*, 1993; BONHOMME *et al.* 2000; AMUTHA *et al.*, 2002). Dentre as citocininas utilizadas na cultura de tecidos destacam-se a benziladenina (BA) e o thidiazuron (TDZ), ambos efetivos no controle de diferentes processos de crescimento e organogenéticos, podendo atuar na regeneração de diversos tipos de órgãos, bem como na indução floral *in vitro* (HUETTEMAN & PREECE, 1993; MURTHY *et al.*, 1998).

O papel do TDZ, uma difeniluréia, tem sido intimamente relacionado à regulação indireta do metabolismo de hormônios endógenos e formação de brotos *in vitro* (MURTHY *et al.*, 1998). Todavia, não se descarta a possibilidade do TDZ agir diretamente na célula vegetal, uma vez ter sido verificada a ligação desta molécula aos receptores específicos de citocininas, havendo, portanto, a probabilidade de que ela mesma desencadeie uma cascata de sinalização endógena específica (INOUE *et al.*, 2001).

As interações hormonais demonstram-se cada vez mais complexas na regulação de diversos processos no desenvolvimento vegetal, uma vez que ocorrem não apenas entre os fitormônios clássicos como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno, mas também outras substâncias presentes nas plantas capazes de influenciar as respostas organogênicas (SMYTH & BERLETH, 2006).

1.4. Organogênese caulinar em *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae)

A família Orchidaceae é a maior e a mais diversificada dentre as angiospermas. Existem cerca 800 gêneros, 25.000 espécies naturais e mais de 30.000 híbridos (HEW & YONG, 1997; BLANCHARD & RUNKLE, 2006).

Distribuídas principalmente nos trópicos, podem ser encontradas em todos os continentes e nos mais variados climas, com exceção dos pólos e desertos. Nos trópicos predominam as formas epífitas e rupícolas, enquanto nas regiões de clima temperado predominam as formas terrestres (KERBAUY, 1995). Esta ampla distribuição faz com que as orquídeas apresentem necessidades adaptativas, refletidas na diversidade estrutural e morfológica, bem como diferentes hábitos de crescimento e fisiologia altamente especializada (VAZ & KERBAUY, 2008b).

Por sua vez, as orquídeas do gênero *Dendrobium* são originárias da Índia e podem também ser encontradas na Ásia tropical e subtropical, estendendo sua presença para leste até as Ilhas Fiji, com mais de 1100 espécies (PUCHOOA, 2004; LUO *et al.*, 2008). Várias espécies e híbridos de *Dendrobium* são importantes na indústria de flores de corte e plantas envasadas em vários países, bem como no Brasil, o que levou diversos pesquisadores a desenvolverem técnicas de cultura de tecidos para esse gênero (ARDITTI & ERNEST, 1993; FERREIRA, 2003; MARTIN & MADASSERY, 2006).

A floração de algumas espécies de *Dendrobium*, como em *D. nobile*, ocorre em pseudobulbos maduros, onde uma a três flores se formam a partir de gemas localizadas nas axilas das folhas, podendo ocorrer desde os nós mais apicais até as proximidades dos nós basais (DECKER, 1946). A indução da floração nesta espécie, quando cultivada sob condições *in vivo*, ocorre de maneira dependente do termoperíodo com aparente elevação nos teores endógenos de citocininas e auxina (CAMPOS & KERBAUY, 2004). De fato, diversos fatores

podem afetar a floração das orquídeas, tais como fotoperíodo, irradiância, temperatura, balanço hormonal, nutrientes e açúcares (GOH, 1984; CHIA *et al.*, 1999; TEE *et al.*, 2008).

Os estudos da floração *in vitro* de orquídeas têm se mostrado eficazes tanto na redução da fase juvenil quanto na elucidação dos mecanismos que controlam este processo do desenvolvimento, além de apresentarem importância para a indústria de flores de corte e plantas envasadas em vários países, inclusive no Brasil (KERBAUY, 1984; DUAN & YAZAWA, 1994; VAZ *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006; VAZ & KERBAUY, 2008b).

Diversos estudos com várias espécies e híbridos de orquídeas como *Oncidium varicosum* (KERBAUY, 1984), *Psychomorphis pusilla* (VAZ *et al.*, 2004; VAZ & KERBAUY, 2008a), *Dendrobium* (FERREIRA *et al.*, 2006; HEE *et al.*, 2007; SIM *et al.*, 2007; SIM *et al.*, 2008; TEE *et al.*, 2008), *Doritaenopsis*, *Phalaenopsis* (ERNEST, 1994; BLANCHARD & RUNKLE, 2008), *xDoriella Tiny* (DUAN & YAZAWA, 1994), *Cymbidium* (WANG, 1988), além de outras espécies não-orquidáceas (TEE *et al.*, 2008) utilizaram com sucesso diferentes concentrações e combinações de citocininas para induzir floração *in vitro*.

No Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica do IBUSP, o híbrido *Dendrobium* “Second Love” (Figura 3) vem sendo estudado com o objetivo de estabelecer procedimentos adequados para sua micropropagação e para compreensão dos mecanismos relacionados à indução sua floração *in vivo* e *in vitro* (FERREIRA, 2003; CAMPOS & KERBAUY, 2004).

Nos estudos conduzidos previamente com plantas jovens deste híbrido cultivadas *in vitro* verificou-se que a citocinina thidiazuron (TDZ) atuava como um forte promotor da indução floral e do brotamento vegetativo em plantas ainda jovens. De acordo com esta abordagem, verificou-se que após cinco dias de incubação destas plantas na presença de 1,8µM de TDZ ocorriam alterações fisiológicas e morfológicas na região meristemática das plantas. Dentre as alterações descritas, ressalta-se o aumento no conteúdo de hormônios endógenos, tais como citocininas e auxinas, bem como mudanças na organização do

meristema apical caulinar, as quais foram interpretadas como possíveis sinais desencadeados pelo TDZ para a indução floral (FERREIRA *et al.*, 2006).

Figura 2. Planta adulta do híbrido *Dendrobium* “Second Love”. Foto: Wagner de Melo Ferreira.

Indícios anteriores também apontaram para a possibilidade de utilizar plantas estioladas de *Dendrobium* “Second Love” para o isolamento de segmentos caulinares, os quais seriam utilizados como explantes para a regeneração de novas plantas a partir da liberação da gema axilar dormente contida em cada nó (FERREIRA, 2003).

Considerando-se todas as indicações prévias de que *Dendrobium* “Second Love” representa um material interessante para estudos *in vitro* sobre aspectos que controlam a organogênese caulinar tanto de natureza vegetativa quanto reprodutiva, fazem-se necessárias novas abordagens para aprofundar o entendimento sobre os fatores envolvidos nestes

processos do desenvolvimento. Nesta vertente, alguns dos pontos de interesse para a exploração estariam ligados ao estudo das condições que influenciam o potencial organogenético de diferentes tecidos destas plantas durante o desenvolvimento *in vitro*, bem como análises complementares sobre os sinais endógenos que mediam estas respostas de organogênese.

Objetivos

O presente trabalho teve com objetivo geral o estudo das condições fisiológicas relacionadas a diferentes respostas organogenéticas de natureza vegetativa ou reprodutiva em plantas de *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*. Para tanto, foram consideradas as seguintes abordagens experimentais:

- 1) Análise das variações no potencial organogenético de segmentos de caules estiolados de *Dendrobium* em função da porção caulinar de onde foram isolados e do período de incubação dos mesmos no escuro para o estiolamento caulinar;
- 2) Análise das variações morfológicas de plantas regeneradas a partir de segmentos caulinares isolados tanto da porção apical quanto subapical de caules estiolados mantidos no escuro por diferentes períodos de incubação;
- 3) Análise dos efeitos da aplicação de diferentes citocininas (Z, ZR, iP, iPR e TDZ) sobre as respostas organogenéticas caulinares de plantas intactas envolvendo tanto a formação de inflorescências quanto de novos brotos vegetativos;
- 4) Análise dos efeitos da aplicação de TDZ sobre as respostas organogenéticas caulinares de plantas intactas levando-se em consideração a duração do tratamento, a idade da planta, bem como as variações provocadas nos teores endógenos de açúcares solúveis totais e na emissão de etileno.

Material e métodos

3.1. Material vegetal

No presente estudo foram utilizadas plantas de *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae) obtidas a partir de micropropagação por meio da modificação da técnica de clonagem estabelecida por FERREIRA *et al.* (2006).

3.2. Método de obtenção do material vegetal

Conforme mencionado, as plantas de *Dendrobium* “Second Love” utilizadas foram clonadas inicialmente por FERREIRA *et al.* (2006). Para esse estudo, a fim de se evitar o contato destas plantas com o TDZ durante a micropropagação e desenvolvimento *in vitro*, procurou-se desenvolver uma técnica de clonagem *in vitro* na qual fosse possível evitar o uso de qualquer regulador de crescimento. Procurou-se, assim, tomar como referência a técnica de micropropagação utilizada nesse laboratório para plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae), fundamentada na capacidade destas em formar estolões com crescimento indeterminado quando incubadas no escuro (KERBAUY *et al.*, 1995) a qual também foi testada em plantas de *Dendrobium* anteriormente por FERREIRA (2003).

Para tanto, plantas crescidas inicialmente no claro e portadoras de pseudobulbos, foram transferidas para o escuro e mantidas em incubação em meio de cultura contendo os macronutrientes de VACIN & WENT (1949), micronutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962), 27,8mg/L de Fe-EDTA, 40g/L de sacarose, 100mg/L de inositol, 0,1mg/L de tiamina, 1,0g/L de peptona de soja e 2g/L de Phytigel® como elemento geleificante (Anexos I e II).

Conforme mostrado na figura 3A, antes de serem transferidas para a incubação no escuro, as plantas tiveram as folhas e raízes eliminadas. No escuro foram incubadas sob $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo que durante o período de incubação nesta condição ocorreu a formação de caules estiolados (estolões) a partir das gemas laterais mais inferiores.

Ao fim de diferentes períodos de incubação das plantas no escuro, que variou de acordo com cada objetivo experimental (60, 75 ou 90 dias), cada estolão aclorofilado foi retirado do frasco e seccionado sob condições assépticas, de forma a isolar os segmentos nodais, contendo uma gema lateral cada, bem como o segmento apical, contendo o meristema apical caulinar.

Para experimentos em que se utilizaram plantas intactas na presença de luz, estas foram obtidas a partir da regeneração de segmentos nodais que foram transferidos para um meio de cultura contendo macronutrientes de VACIN & WENT (1949), micronutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962), 27,8mg/L de Fe-EDTA, 20g/L de sacarose, 100mg/L de inositol, 0,4mg/L de tiamina e 2g/L de Phytigel[®] na ausência de TDZ (Anexos I e II), e mantidos em fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $50\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As plantas regeneradas a partir dos segmentos nodais estiolados foram mantidas sob estas condições até completarem 90, 120 ou 150 dias de idade, quando foram utilizadas nas análises experimentais (Figura 3).

Tanto para as plantas estioladas quanto para as plantas incubadas no claro foram utilizados frascos de vidro de 500mL fechados com tampa de plástico. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do “Phytigel[®]”. A autoclavagem dos mesmos foi obtida a 120°C durante 15 minutos.

Figura 3. Esquema representativo da sequência de passos experimentais para a micropropagação de plantas de *Dendrobium* "Second Love" por meio de segmentos nodais estiolados.

3.3. Avaliação do potencial organogênético de segmentos caulinares estiolados de *Dendrobium*

Após 90 dias de incubação no escuro, os caules estiolados foram seccionados em segmentos nodais e apicais (Figura 4) e colocados para crescer no claro por 120 dias. Após esse período de incubação, quantificou-se a porcentagem de explantes que regeneraram novas plantas provenientes dos segmentos nodais e apicais.

Figura 4. Ilustração no sistema estabelecido para seccionar o caule estiolado de *Dendrobium* em segmentos apicais e nodais.

Em vista da maior frequência de regeneração observada nos explantes de origem apical, foram realizados testes com estolões obtidos em diferentes períodos de incubação no escuro a fim de se avaliar a possível influência do período de incubação no escuro sobre a regeneração dos explantes.

Nesse experimento foram utilizadas apenas plantas com 120 dias de idade que foram regeneradas de ápices estiolados (Figura 5A). Tais plantas tiveram suas folhas e raízes cortadas e incubadas durante 60, 75 e 90 dias no escuro, após o que foi realizada a contagem do número de caules estiolados formados por planta, bem como o número de segmentos nodais formados (Figuras 5B e 5C). Após essa contagem, os segmentos nodais e apicais foram incubados separadamente em meio de cultura e colocados para crescer no claro de acordo com o método de obtenção de plantas acima exposto. Após 120 dias de crescimento no claro, contou-se a porcentagem de plantas regeneradas, bem como foram medidos o tamanho, a massa fresca e seca da parte aérea dessas plantas (Figura 5D).

Figura 5. Esquema representativo da sequência do experimento descrito no item 3.3.

3.4. Avaliação de parâmetros de crescimento durante o desenvolvimento das plantas de *Dendrobium*

As plantas de *Dendrobium* foram obtidas segundo método descrito no item 3.2 e incubadas durante 90, 120 e 150 dias, a fim de mensurar o tamanho longitudinal e a massa fresca e seca da parte aérea.

O tamanho longitudinal foi medido da base caulinar até o ápice da maior folha. A parte aérea foi isolada da parte radicular e utilizada para as medidas de massa fresca e seca.

3.4.1. Efeitos de diferentes citocininas na organogênese caulinar de plantas intactas

As plantas de *Dendrobium* obtidas de acordo com o item 3.2 e crescidas durante 120 dias na presença de luz foram transferidas para meios de mesma formulação descrita no anexo II, porém, suplementados com 1,8 μ M de zeatina (Z), zeatina ribosídica (ZR), isopenteniladenina (iP), isopenteniladenosina (iPR) ou thidiazuron (TDZ). As soluções de Z, ZR, iP e iPR foram esterilizadas por ultrafiltração em membrana Millipore[®] (0,22 μ M) e adicionadas aos meios de cultura previamente preparados e autoclavados.

Em cada um dos tratamentos acima descritos as plantas foram transferidas, inicialmente, para um meio de cultura líquido, no qual permaneceram por 20 dias. Uma vez decorrido esse período, foram re-transferidas para um meio de igual formulação, porém geleificado, e incubadas por mais 70 dias sob as condições ambientais citadas no item 3.2. No respectivo tratamento controle, após 20 dias em meio líquido, as plantas foram transferidas para um meio equivalente geleificado para a incubação por mais 70 dias, ambos destituídos de citocininas exógenas.

Cada tratamento consistiu de seis frascos com cinco plantas cada. O número de brotos e botões florais formados por explantes foi mensurado após 90 dias de tratamento.

3.4.2. Modulação da organogênese caulinar vegetativa e reprodutiva pelo TDZ

Conforme indicado na figura 6, para a obtenção do número de brotos, plantas floridas (% floração) e número de botões florais, plantas com 90, 120 e 150 dias (Figura 6A) crescidas no claro foram transferidas inicialmente para um meio de cultura líquido (crescimento - Anexo II) adicionado de $1,8\mu\text{M}$ de TDZ, no qual permaneceram por 20 dias (Figura 6B). Após isso, foram re-transferidas para esse mesmo meio de cultura, porém geleificado, onde foram mantidas por mais 70 dias de incubação (Figura 6C) sob $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $50\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para tanto, foram utilizados seis frascos, com cinco plantas cada um. O número de brotos, plantas floridas (% floração) e de botões florais por planta foram obtidos após 90 dias de cultivo em meio suplementado de TDZ (Figura 6D). Optou-se pela contagem após 90 dias de tratamento devido à queda dos botões florais formados que ocorre após esse período prejudicando assim a contagem dos mesmos.

Em vista de que, na presença de TDZ, as plantas originaram simultaneamente brotos e dos brotos formaram os botões florais, considerou-se, para fins de coleta dos dados de floração, o conjunto desses brotos como sendo uma única planta (Figura 6D).

Figura 6. Representação esquemática do tratamento com 1,8µM de TDZ em plantas com 90, 120 e 150 dias, das quais se mensurou o número de brotos, plantas floridas (% floração) e número de botões florais após 90 dias de incubação no TDZ.

3.4.3. Extração de açúcares solúveis totais

O material utilizado para a quantificação dos açúcares solúveis proveio dos brotos axilares formados nas plantas do tratamento descrito no item 3.6. Após incubadas em meio de cultura com as diferentes citocininas, os brotos axilares formados foram coletados, cortados e misturados. Dez amostras de 0,5g de material fresco obtidos de cada um dos tratamentos foram armazenadas em freezer a -20°C .

A técnica empregada para a determinação de açúcares solúveis totais foi baseada no método do fenol-sulfúrico de DUBOIS *et al.* (1956).

Após retiradas do freezer as amostras foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, o qual foi transferido para um tubo de ensaio de plástico e adicionado 3mL de etanol 80%. Os tubos permaneceram em banho-maria a 80°C por 20 minutos, após o que o sobrenadante foi coletado e, ao resíduo, foi novamente

adicionado 3mL de etanol 80%. Os tubos foram agitados em vórtex e levados ao banho-maria para nova extração. Tal procedimento foi realizado cinco vezes a fim de obter uma melhor extração de açúcares. Finalizada a última extração, todos os sobrenadantes foram reunidos para constituir um único extrato.

Ao extrato foram adicionados 5mL de clorofórmio e 3mL de água, e mantido por 5 minutos a -10°C para separação das clorofilas. Ao final desse procedimento foram obtidas três fases, sendo a primeira coletada e utilizada para determinação dos açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico.

Pipetou-se 100 μl do extrato coletado, sendo o volume completado para 500 μl com água destilada. Em seguida, foram adicionados 0,5mL da solução de fenol 5% e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado 96% na capela. Os tubos foram agitados vigorosamente a fim de homogeneizar os seus conteúdos. Finalmente, aguardou-se cerca de 20 minutos visando o resfriamento das amostras para a leitura em espectrofotômetro (absorbância no comprimento de onda de 490nm). Uma curva padrão foi obtida de soluções com concentrações conhecidas de glicose (2, 5, 10, 20, 30 e 50 μg glicose/mL), visando a determinação da quantidade de açúcares totais contidas nas amostras.

3.4.4. Tempo mínimo de exposição ao TDZ necessário para a indução da floração

Uma vez definida a idade mais favorável à floração com TDZ (120 dias), procurou-se determinar o tempo mínimo necessário na presença desse regulador de crescimento.

Para tanto, plantas com 120 dias de idade crescidas no claro, foram incubadas na presença de 1,8 μM de TDZ, por diferentes períodos de tempo, após o que foram transferidas para meios destituídos deste regulador de crescimento totalizando 90 dias de incubação

(tabela 1). No tratamento controle as plantas permaneceram 20 dias em meio líquido e 70 dias em meio gelificado, ambos destituídos de TDZ.

Para cada tratamento utilizaram-se cinco frascos, com cinco plantas cada um. O número de brotos formados por planta e a porcentagem de floração (plantas floridas) foram coletados após 90 dias de cultivo.

Tabela 1. Tempo de tratamento com 1,8 μ M de TDZ em plantas com 120 dias, visando à indução floral. As plantas foram inicialmente incubadas por diferentes períodos em meio líquido com ou sem TDZ até completar 20 dias de incubação e então transferidas para meio gelificado com ou sem TDZ por mais 70 dias. O tempo total foi de 90 dias.

meio líquido com TDZ	meio geleificado com TDZ	meio líquido sem TDZ	meio geleificado sem TDZ
-	-	20	70
01	-	19	70
02	-	18	70
03	-	17	70
04	-	16	70
05	-	15	70
10	-	10	70
20	-	-	70
20	10	-	60
20	20	-	50
20	30	-	40
20	40	-	30

3.4.5. Quantificação do conteúdo de etileno emitido pelas plantas de *Dendrobium* durante o período de tratamento com TDZ

Plantas de *Dendrobium* com 120 dias de idade, obtidas conforme descrito no item 3.2, foram incubadas em meio de cultura líquido contendo 1,8 μ M de TDZ, onde permaneceram por 20 dias. Após esse período, as plantas foram transferidas para meio geleificado de mesma formulação sendo metade dos frascos vedados com rolha de borracha e a outra metade foi mantida por mais 10 dias em meio geleificado antes de serem vedados (Figura 7).

Depois de vedados, todos os frascos foram submetidos a um fluxo de ar sintético contínuo durante 3 minutos para a eliminação dos gases acumulados. Dentre as condições testadas, verificou-se como a mais favorável para a quantificação de etileno um período de acúmulo de 24 horas.

Nesse experimento utilizaram-se frascos Erlenmeyers de 125mL de capacidade, contendo 30mL de meio e 5 plantas em cada um. Para os frascos controle foram utilizadas as mesmas condições, porém os meios de cultura eram desprovidos de TDZ.

Figura 7. Esquema utilizado para a dosagem de etileno. Rolha amarela – frascos não vedados; Rolha preta – frascos vedados.

Para quantificação da liberação de etileno pelas plantas de *Dendrobium*, utilizou-se o método descrito por PURGATTO *et al.* (2002). Foram retiradas amostras de 1mL do ar interno de cada frasco para a determinação do conteúdo de etileno em cromatógrafo a gás (CG) marca Thermo Electron modelo TRACE GC Ultra, com detector por ionização de chama (FID). Utilizou-se uma coluna de separação Plot RT-alumina (30m, I.D. 0,53mm, filme 6µm) e nitrogênio como gás de arraste num fluxo 30 de 1mL/min. Para permitir a injeção de 1mL de amostra foi empregado o modo de injeção “*pulsed splitless*”. O injetor e o

detector foram mantidos a 250°C e a coluna isothermal a 60°C. A quantificação do etileno produzido e quantificado foi realizada em relação à injeção de um padrão de 1ppm de etileno em nitrogênio.

Resultados

4.1. Potencial organogenético de segmentos caulinares estiolados

Ao longo dos experimentos percebeu-se a existência de heterogeneidade no potencial organogenético dos segmentos caulinares utilizados como explantes para a regeneração de novas plantas *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que este evento esteve relacionado à porção da planta estiolada de onde os segmentos caulinares foram isolados.

Dessa forma, verificou-se que a maior parte dos segmentos isolados da parte mais apical de cada caule (segmentos apicais) apresentou capacidade para a organogênese caulinar, originando, posteriormente, uma nova planta completa (cerca de 85% dos explantes). Por outro lado, uma pequena proporção dos segmentos isolados das demais porções subapicais do caule (segmentos nodais) apresentou a capacidade para a regeneração de uma nova planta (cerca de 20% dos explantes) (Figura 8).

Cabe ressaltar que parte dos segmentos nodais que não apresentaram resposta organogênica mantinha a coloração esverdeada, enquanto outros apresentavam coloração amarronzada (dados não apresentados).

Figura 8. Porcentagem de explantes que apresentaram regeneração de plantas de *Dendrobium* “Second Love” *in vitro*, os quais foram isolados das porções apicais (segmento apical) ou subapicais (segmento nodal) de plantas estioladas, sendo mantidos por 120 dias de incubação no claro. Barras indicam erro padrão (n variável).

(*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste *t*-student, $P < 0,05$).

A porção da planta estiolada de onde os explantes experimentais foram isolados, além de interferir na iniciação da organogênese, também se revelou uma variável importante no controle do potencial de desenvolvimento dos órgãos caulinares regenerados. Conforme ilustrado na figura 9, foi possível verificar que o desenvolvimento das plantas regeneradas na presença de luz diferiu de acordo com o tipo de explante utilizado (segmento apical ou nodal). Os dados obtidos revelaram que o crescimento da parte aérea das plantas regeneradas apresentou diferenças significativas tanto no tamanho caulinar (Figura 10A) quanto nas massas fresca (Figura 10B) e seca (Figura 10C), sendo que estes parâmetros morfológicos foram sempre superiores nas plantas regeneradas de explantes nodais em relação às formadas a partir de explantes apicais (Figura 10).

Figura 9. Fenótipo das plantas de *Dendrobium* com 120 dias de idade regeneradas a partir de segmentos apicais e nodais, ambos isolados de plantas estioladas.

Figura 10. Medidas de crescimento caulinar de plantas de *Dendrobium* regeneradas a partir de segmentos nodais e apicais, ambos isolados de plantas estioladas. (A) tamanho caulinar médio, (B) massa fresca média por planta e (C) massa seca média por planta. Barras indicam erro padrão (n=30).

(*) Diferenças significativas entre tratamentos (teste t-student, $P < 0,05$).

Com o intuito de avaliar uma possível influência do tempo de incubação das plantas no escuro sobre o grau de capacidade organogenética de seus segmentos caulinares, foram selecionadas apenas as plantas regeneradas a partir de explantes apicais (com fenótipo reduzido – Figura 9), as quais foram transferidas para o escuro a fim de se obter o estiolamento de seus caules para posterior análise morfológica.

Sendo assim, verificou-se que a incubação das plantas no escuro por período superior a 60 dias não acarretou em aumento na formação de novos caules estiolados a partir do brotamento lateral, tendência essa analisada até o 90º dia de incubação (Figura 11).

Figura 11. Número médio de caules estiolados formados a partir do brotamento lateral de plantas de *Dendrobium* incubadas no escuro por 60, 75 e 90 dias. Barras indicam erro padrão (n=20).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

Todavia, os caules estiolados apresentaram um aumento gradual no número de segmentos nodais à medida que o período de incubação no escuro foi prolongado. Após 90 dias de incubação no escuro, formaram-se cerca de 9,0 segmentos nodais por planta, ao passo que as plantas mantidas na ausência de luz por apenas 60 dias apresentaram cerca de 4,0 segmentos nodais (Figura 12).

Figura 12. Número médio de segmentos nodais formados em plantas estioladas de *Dendrobium* incubadas por 60, 75 e 90 dias no escuro. Barras indicam erro padrão (n=20).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

Embora o número de segmentos nodais de caules estiolados tenha aumentado conforme o período de incubação no escuro, quando os mesmos foram isolados e utilizados como explantes para regeneração de plantas no claro, verificou-se que a capacidade organogenética dos mesmos ainda se mostrou comparativamente reduzida frente aos respectivos segmentos apicais (Figura 13). Conforme pode ser observado ainda nesta figura, a resposta organogenética dos segmentos nodais tendeu a diminuir ainda mais à medida que se utilizou explantes isolados de caules incubados por 75 e 90 dias no escuro.

De maneira interessante, a porcentagem de segmentos apicais que regeneraram novas gemas caulinares foi praticamente total e não apresentou a tendência de redução do potencial organogenético ao longo do período de incubação no escuro (Figura 13). Complementarmente, obtiveram-se indícios de que a incubação das plantas no escuro por período superior a 90 dias levou a uma diminuição ainda mais acentuada na capacidade organogenética dos segmentos nodais (Dados não apresentados).

Figura 13. Porcentagem de segmentos caulinares que apresentaram regeneração de novas plantas de *Dendrobium*, os quais foram isolados da porção apical (Seg. apical) ou subapical (Seg. nodal) de caules estiolados formados a partir de plantas incubadas no escuro por 60, 75 e 90 dias (n=20).

Na figura 14 são apresentadas medidas de crescimento da parte aérea de plantas regeneradas tanto de segmentos apicais quanto nodais, sendo ambos os explantes isolados de caules estiolados de plantas incubadas por diferentes períodos no escuro. Conforme se observa, a tendência geral apresentada pelo crescimento caulinar (Figura 14A) acompanhou os valores obtidos de massa fresca (Figura 14B) e seca (Figura 14C) nas diferentes variáveis experimentais analisadas.

Verificou-se que as plantas regeneradas de segmentos apicais mantidos por 60 dias na ausência de luz apresentaram tamanho caulinar semelhante às plantas oriundas dos segmentos nodais submetidos ao mesmo período de incubação no escuro (Figura 14A), sendo o mesmo padrão observado em relação às massas fresca e seca (Figuras 14B e 14C, respectivamente).

No entanto, as plantas regeneradas de segmentos caulinares mantidos no escuro por período superior a 60 dias apresentaram características morfológicas que variaram de acordo com a origem do explante: as plantas regeneradas de segmentos apicais apresentaram a

tendência de redução tanto no tamanho caulinar quanto nas massas frescas e secas à medida que o período de incubação no escuro foi prolongado, ao passo que as plantas formadas a partir dos segmentos nodais não apresentaram variação conspícua nestes parâmetros até 75º dia de incubação (Figura 14). Entretanto, as plantas regeneradas a partir dos segmentos nodais mantidos no escuro por 90 dias apresentaram tendência de diminuição destes parâmetros de crescimento, principalmente em relação à massa fresca da parte aérea (Figura 14B).

Figura 14. Medidas de crescimento caulinar de plantas de *Dendrobium* regeneradas a partir de segmentos apicais (Seg. apical) e nodais (Seg. nodal), ambos isolados de plantas estioladas mantidas no escuro por 60, 75 e 90 dias. (A) tamanho caulinar médio, (B) massa fresca média por planta e (C) massa seca média por planta. Barras indicam erro padrão (Seg. apical n=30; Seg. nodal n=20)

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

4.2. Processos de organogênese durante o desenvolvimento de plantas intactas

Plantas intactas de *Dendrobium*, quando cultivadas *in vitro* e na presença de luz, tendem a cessar o crescimento longitudinal do caule primário à medida que a idade avança (Figura 15A). Sabe-se que juntamente a este processo ocorre o desenvolvimento do pseudobulbo e a formação brotos laterais na região basal das plantas, mesmo na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura.

De acordo com estas informações, observou-se que a partir de 120 dias de idade as plantas não apresentaram incremento significativo tanto no crescimento longitudinal do caule (Figura 15A) quanto na massa fresca da parte aérea (Figura 15B). No entanto, a massa seca caulinar apresentou um ganho significativo proporcional à idade das plantas (Figura 15C).

Figura 15. Medidas de crescimento caulinar de plantas intactas de *Dendrobium* incubadas na presença de luz durante 90, 120 e 150 dias. (A) tamanho caulinar médio, (B) massa fresca média por planta e (C) massa seca média por planta. Barras indicam erro padrão (n=30).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

4.2.1. Efeitos de diferentes citocininas na organogênese caulinar de plantas intactas

Conforme apresentado na figura 16, verificou-se que o tratamento de plantas intactas com os tipos de citocininas Z, ZR, iP e IPR proporcionou a formação de um menor número de brotos vegetativos em relação ao observado na condição controle. Em contrapartida, as plantas tratadas com TDZ apresentaram um aumento conspícuo na formação de novos brotos vegetativos quando comparadas às plantas controle.

Figura 16. Número médio de brotos vegetativos formados por planta de *Dendrobium* após 90 dias de tratamento com 1,8 μ M de Z, ZR, iP, iPR ou TDZ; C refere-se ao controle, onde a condição experimental foi equivalente, porém, sem a adição de quaisquer reguladores de crescimento ao meio de cultura. Barras indicam erro padrão (n=30).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

No entanto, os tratamentos com Z, ZR, iP e iPR não afetaram de maneira significativa o tamanho dos brotos formados em relação ao observado nas plantas controle, ao passo que o tratamento com TDZ apresentou efeito fortemente inibitório em relação ao tamanho dos brotos vegetativos (Figura 17).

Figura 17. Tamanho médio do maior broto de cada planta de *Dendrobium* após 90 dias de tratamento com 1,8 μ M de Z, ZR, iP, iPR ou TDZ; C refere-se ao controle, onde a condição experimental foi equivalente, porém, sem a adição de quaisquer reguladores de crescimento ao meio de cultura. Barras indicam erro padrão (n=30).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

Adicionalmente, verificou-se que o tratamento com TDZ também proporcionou o florescimento em 80% das plantas intactas, enquanto que as demais citocininas testadas, assim como o controle, não proporcionaram a formação de flores (Tabela 2). Na figura 18, são mostrados os fenótipos das plantas tratadas com as citocininas testadas.

Tabela 2. Porcentagem de florescimento em plantas intactas de *Dendrobium* que formaram flores em decorrência do tratamento com Z, ZR, iP, iPR e TDZ por 90 dias.

Tratamento	% de plantas floridas
Controle	0
Z	0
ZR	0
iP	0
iPR	0
TDZ	80%

Figura 18. Fenótipo das plantas de *Dendrobium* tratadas durante 90 dias com 1,8 μ M de Z, ZR, iP, iPR e TDZ, sendo que o controle refere-se à condição experimental equivalente, porém, sem a adição de quaisquer reguladores de crescimento ao meio de cultura.

4.2.2. Modulação da organogênese caulinar vegetativa e reprodutiva pelo TDZ

De acordo com o apresentado anteriormente, a aplicação de TDZ promoveu a formação de maior número de brotos vegetativos em plantas intactas com 120 dias de idade em relação às de idade equivalente mantidas na condição controle (Figura 19). Além disso, verificou-se que a intensidade desta resposta organogenética induzida pelo TDZ foi dependente da idade da planta submetida ao tratamento. Dessa forma, observou-se que plantas intactas com idades mais elevadas apresentaram a formação de maior número de brotos vegetativos, sendo que esta tendência manteve-se durante o período analisado, com plantas de até 150 dias de idade (Figura 19).

Figura 19. Número médio de brotos vegetativos formados em plantas de *Dendrobium* com diferentes idades (90, 120 e 150 dias) após 90 dias de incubação na presença ou ausência de 1,8 μ M de TDZ. Barras indicam erro padrão (n=30). * indicam resultados não analisados devido à perda de experimentos por contaminação.

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

Em contrapartida, o tratamento de plantas com diferentes idades com TDZ revelou que a porcentagem de plantas que responderam ao tratamento com o florescimento também esteve relacionado ao tempo de vida das mesmas. Sendo assim, verificou-se que a porcentagem de plantas com até 120 dias de idade que floresceram equivaleu a cerca de 70-80%, enquanto que apenas 35% das plantas com 150 dias de idade apresentaram tal evento organogenético. Na ausência de TDZ (tratamento controle) a floração não ocorreu independentemente da idade das plantas (Figura 20).

Na figura 21, são apresentados os fenótipos vegetativos e florais das plantas de *Dendrobium* com diferentes idades após o tratamento com 1,8 μ M de TDZ durante 90 dias.

Figura 20. Porcentagem de plantas de *Dendrobium* com diferentes idades (90, 120 e 150 dias) que floresceram após o tratamento com 1,8 μ M de TDZ durante 90 dias. Barras indicam erro padrão (n=30).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

Figura 21. Fenótipos de plantas de *Dendrobium* com 90, 120 e 150 dias de idade após tratamento com 1,8 μ M de TDZ por 90 dias.

Adicionalmente, o tratamento de plantas intactas com TDZ por 90 dias provocou um aumento significativo no conteúdo endógeno de açúcares solúveis totais nos brotos formados. Dentre as citocininas testadas, o TDZ foi o único a exibir este tipo de resposta fisiológica, ao passo que as demais citocininas, com exceção de ZR, não provocaram modificações significativas nos teores endógenos de açúcares solúveis em relação ao controle (Figura 22).

Figura 22. Teores endógenos de açúcares solúveis totais em brotos formados a partir de plantas de *Dendrobium* tratadas por 90 dias com 1,8 μ M de TDZ, Z, ZR, iP e iPR. O controle refere-se à condição experimental equivalente, porém, sem a adição de quaisquer reguladores de crescimento ao meio de cultura. Barras indicam erro padrão (n=30).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P < 0,05$).

Em tentativa de analisar o período mínimo necessário de exposição das plantas ao TDZ para a obtenção das respostas organogenéticas de brotamento e florescimento, realizaram-se tratamentos com diferentes períodos de incubação das plantas na presença deste regulador de crescimento. Os resultados obtidos por meio destas abordagens revelaram que somente a partir do 20º dia de tratamento foram observadas diferenças significativas no número de brotos formados na presença de TDZ em relação ao controle, sendo que o aumento do período de tratamento (30 a 60 dias) acarretou em tendência de incremento no brotamento (Figura 23).

Figura 23. Número médio de brotos laterais formados em plantas de *Dendrobium* com 120 dias de idade, incubadas durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias com $1,8\mu\text{M}$ de TDZ. Valores obtidos após completarem-se 90 dias de incubação no claro. Barras indicam erro padrão ($n=25$).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P<0,05$).

Complementarmente, observou-se que na ausência de TDZ as plantas não floresciam e que houve a necessidade de exposição destas ao tratamento com este regulador de crescimento por pelo menos 10 dias para que ocorresse florescimento em um número significativo de plantas intactas. Após este período e até o 60º dia de tratamento não foram verificados incrementos significativos na porcentagem de plantas floridas em relação ao aumento do tempo de exposição ao TDZ (Figura 24).

Figura 24. Porcentagem de plantas de *Dendrobium* com 120 dias de idade que floresceram após o tratamento com 1,8 μ M de TDZ durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 dias. Valores obtidos após completarem-se 90 dias de incubação no claro. Barras indicam erro padrão (n=25).

Na figura 25 são apresentados, por fim, os teores emitidos de etileno por plantas de *Dendrobium* durante o período que abrangeu o 20º e o 40º dia de incubação na presença ou na ausência de 1,8 μ M de TDZ. Verificou-se que o tratamento com TDZ provocou uma emissão de etileno consideravelmente superior ao controle por volta do 20º dia de tratamento, a qual decresceu rapidamente até pelo menos o 26º dia mensurado, quando os valores médios de etileno emitido na presença de TDZ mostraram-se equiparados aos detectados no controle. Por outro lado, no período que abrangeu do 31º ao 38º dia experimental o teor de etileno emitido pelas plantas tratadas com TDZ foi superior ao das respectivas plantas controle (Figura 25).

Figura 25. Teores de etileno emitidos por plantas de *Dendrobium* incubadas na presença ou na ausência de 1,8 μ M de TDZ por diferentes períodos. O material controle foi mantido sob as mesmas condições experimentais, porém, em meio desprovido de TDZ. As quantificações dos 27º, 28º, 29º, 30º e 39º dia não foram possíveis de serem realizadas. Barras indicam erro padrão (n=15).

Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey, $P<0,05$).

Discussão

A organogênese em cultura de tecidos *in vitro* tem possibilitado o estudo de mecanismos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas (HICKS, 1994). No caso de orquídeas, o emprego da cultura de tecidos, órgãos ou plantas *in vitro* tem sido largamente utilizado como técnica de micropropagação, com finalidade de estudar os vários fatores envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal, como, por exemplo, os aspectos ambientais, nutricionais, hormonais, bioquímicos, genéticos e moleculares. Além de ser um método eficaz para propagação industrial de clones em larga escala (KERBAUY, 1999; MARTIN & MADASSERY, 2006; WINKELMANN & GEIER, 2006).

No presente estudo utilizou-se a técnica de incubação de plantas de *Dendrobium* “Second Love” no escuro a fim de induzir a formação de caules estiolados, permitindo a separação de segmentos caulinares que foram utilizados como explantes para regeneração de novas plantas *in vitro*. Essa técnica de micropropagação vem sendo utilizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP com bastante sucesso em plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) (KERBAUY *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 2004; RODRIGUES, 2008) e abacaxizeiro (Bromeliaceae) (NIEVOLA *et al.*, 2005) para a obtenção de clones utilizados em estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares.

Particularmente em relação às plantas de *Dendrobium* “Second Love”, FERREIRA (2003) verificou que a taxa de regeneração de segmentos caulinares formados no escuro e transferidos para o claro era de 70%, motivo pelo qual se utilizou desta técnica para obter material suficiente para o presente estudo. De acordo com este mesmo autor, tal processo de micropropagação de plantas de *Dendrobium* não necessita da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Sendo assim, as plantas de *Dendrobium* incubadas na

ausência de luz apresentam características de crescimento bastante semelhantes às de outras plantas com relação à promoção de um rápido alongamento caulinar, originando caules estiolados constituídos de nós, entrenós e folhas laterais curtas (KERBAUY *et al.*, 1995; KISS *et al.*, 1995; GRAY *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2004; NIEVOLA *et al.*, 2005).

Entretanto, no início do presente trabalho obteve-se, inesperadamente, uma proporção reduzida de segmentos caulinares estiolados com capacidade para a regeneração de novas plantas (Figura 9) além do que, as poucas plantas obtidas apresentaram grande heterogeneidade morfológica. Pensou-se, inicialmente, que tal evento pudesse ser decorrente de variações somaclonais, o que certamente viria inviabilizar esta técnica para fins de micropropagação. Entretanto, a realização de sucessivas etapas de padronização permitiu constatar que a causa principal da variação no potencial organogenético dos explantes utilizados derivava da região de origem dos mesmos na planta estiolada, bem como da idade do próprio tecido de origem, e não de alterações genéticas do clone empregado nos experimentos.

Assim, quando os segmentos apicais foram inoculados separadamente dos segmentos nodais, constatou-se que a maioria dos segmentos apicais possuiu capacidade para regeneração de uma nova planta enquanto uma proporção muito reduzida dos segmentos nodais apresentou tal evento organogenético (Figura 8). Tal padrão de resposta organogenética constatado neste material diferiu do comumente observado em outras plantas obtidas por meio de técnica de micropropagação equivalente à empregada neste trabalho, como é o caso de *Catasetum fimbriatum* e abacaxizeiro, os quais apresentam uma maior uniformidade no potencial regenerativo dos explantes de maneira independente da localização original dos segmentos no caule estiolado (SUZUKI *et al.*, 2004; NIEVOLA *et al.*, 2005).

O reduzido número de segmentos nodais que se mostraram capazes de responder ao isolamento seguido de incubação no claro de maneira a liberar a gema axilar dormente, formando uma nova planta, poderia estar relacionado a alguns aspectos ligados a não-

competência dos mesmos para tais respostas e/ou devido à ausência de um ou mais sinais necessários para a indução do processo de organogênese em questão. De fato, a ocorrência de processos de organogênese está atrelada ao pré-requisito básico que depende da presença de células competentes no explante empregado, sendo que este processo é regulado por uma série de fatores celulares que permitem que tais células percebam os sinais indutores da organogênese – por exemplo, devido à presença de receptores para sinais específicos –, assim como sejam capazes de responder a estes sinais – por exemplo, devido à presença de uma maquinaria celular específica para a transdução deste sinal. Dessa maneira, a presença de células competentes permite que sejam desencadeados os demais passos do evento organogenético, tornando-se determinadas para uma nova rota do desenvolvimento (PERES, 2002; DHALIWAL *et al.*, 2003).

Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de que a ausência de resposta organogenética nos segmentos nodais de caules estiolados de *Dendrobium* possa ter ocorrido em consequência da ausência da sinalização específica endógena indutora do processo organogenético em questão, podendo não estar necessariamente ligada ao controle da competência celular. Dessa forma, deve-se considerar também a possibilidade de que as células envolvidas neste processo organogenético possuam tanto a devida competência quanto os sinais endógenos indutores do processo de regeneração de novas plantas, porém, sejam destituídas de certos fatores essenciais envolvidos na evolução do processo de reestruturação celular e tecidual para a formação do órgão *per se*. Sendo assim, os dados obtidos não permitem a indicação precisa sobre qual(is) passo(s) da organogênese foi(ram) afetado(s) negativamente nos segmentos nodais para a regeneração de uma planta completa após o isolamento.

Possivelmente, análises histológicas comparativas da região meristemática axilar de segmentos nodais durante os primeiros momentos de isolamento e incubação poderiam auxiliar no esclarecimento de algumas dessas possibilidades levantadas, ao passo que seria

possível avaliar se a região axilar apresentaria alguma modificação histológica não perceptível a olho nu que denotasse o início da resposta organogenética, porém, sem evoluir para a organização de um novo órgão completo.

Esta abordagem poderia considerar ou excluir a possibilidade dos explantes nodais falharem na resposta organogenética apenas em passos mais adiantados da organogênese, equivalentes à diferenciação dos tecidos e regeneração do órgão propriamente dito. De acordo com as informações apuradas, estas abordagens também poderiam auxiliar na exclusão, por meio de indícios indiretos, da possibilidade de haver falta de competência celular e indisponibilidade do(s) sinal(is) necessário(s) para desencadear este evento organogenético.

Porém, caso este tipo de análise experimental não incorra em informações que permitam detectar a iniciação das respostas de organização celular relacionadas aos primeiros passos de formação da gema caulinar, possivelmente, os explantes nodais apresentam falha na resposta organogenética devido a um dos dois passos iniciais do evento (ou ainda nos dois), ou seja, na competência celular e/ou na presença de sinais específicos para induzir o processo. Tais possibilidades só poderiam ser conferidas por meio de análises comparativas com maior grau de refinamento fisiológico e molecular, o que demandaria a realização de um conjunto de experimentos envolvendo quantificações dos teores endógenos de certas moléculas que participam na sinalização dos passos em questão, tais como certas classes de hormônios vegetais, elementos do metabolismo primário, dos transcritos (RNAm) de determinados genes-chave, entre outras moléculas.

De fato, a delimitação e o estudo das diferentes etapas envolvidas na organogênese simbolizam desafios complexos e que são alvos de muitas pesquisas atuais sobre o desenvolvimento vegetal. Este cenário se deve ao fato de que o desenvolvimento vegetal envolve não apenas o crescimento (somatória de processos de divisão e expansão celular), mas também de diferenciação e especialização progressiva de células e tecidos,

levando à formação de órgãos completos. Dentro desta perspectiva, as células recebem sinais integrados e indutores para processos de especialização, tornando-se, dessa forma, determinadas para seguir um ou mais programas específicos de desenvolvimento (SMYTH & BERLETH, 2006).

Além disso, a separação dos passos iniciais de competência e indução do processo de organogênese em segmentos nodais de caules estiolados de *Dendrobium* impõe certas dificuldades adicionais, as quais se devem, em parte, ao fato de que este evento organogenético, assim como os demais processos de formação de órgãos estudados neste trabalho, representam um processo de organogênese direta (FERREIRA, 2003), ou seja, não necessita passar pela etapa de desdiferenciação para que a competência seja expressa (PERES, 2002).

No mais, este evento não necessita da adição de reguladores de crescimento exógenos para a indução da formação de novas gemas a partir dos explantes (FERREIRA, 2003), sendo que este conjunto de características confere uma grande autonomia ao explante em relação à progressão das etapas organogenéticas, tornando a delimitação das mesmas em termos experimentais relativamente mais difícil. Por sua vez, a organogênese direta também pode ser interpretada como uma vantagem em certos aspectos quando comparada à formação de órgãos por meio indireto, passando pela fase de calo, uma vez que a indução de calos em alguns sistemas vegetais tem se mostrado pouco eficiente, além de aumentar as chances de ocorrer variações somaclonais nas plantas regeneradas indiretamente (GANESHAN *et al.*, 2006).

Considerando-se que uma pequena parte dos segmentos nodais utilizados neste trabalho apresentou regeneração de plantas de *Dendrobium*, bem como que já se sabia que uma grande proporção destes era capaz de formar diretamente novas gemas caulinares (FERREIRA, 2003), buscou-se realizar análises complementares que pudessem auxiliar no entendimento dos fatores que poderiam estar relacionados ao controle desta resposta

organogenética. Um dos fatores estudados com este objetivo foi a duração do período de incubação das plantas no escuro para o estiolamento caulinar.

Os resultados obtidos revelaram que, de fato, a proporção de segmentos nodais capazes de regenerar novas plantas tendeu ao decréscimo com o aumento do tempo de incubação no escuro (Figura 13). No entanto, verificou-se que a manutenção das plantas no escuro por apenas 60 dias, sob as condições experimentais empregadas, já resultou em um número muito reduzido de explantes capazes de responder com a regeneração de novas plantas (cerca de 30%). Esta constatação leva à suposição de que o período mínimo testado de incubação das plantas no escuro possa ter sido superior ao tolerado pelos caules estiolados para que fosse mantido o potencial organogenético de seus meristemas axilares.

Considerando ainda esta possibilidade interpretativa acerca da redução da capacidade organogenética dos segmentos nodais de *Dendrobium*, relacionada ao processo de envelhecimento dos caules estiolados usados como fontes de explantes, supõe-se que este processo esteja relacionado ao próprio *status* fisiológico das células do explante, e não a alguma deficiência nutricional decorrente da exaustão de componentes do meio de cultura, ou ainda devido a algum sinal gasoso que, como o etileno, pudesse ter agido como promotor de senescência precoce dos tecidos.

Esta suposição baseia-se ainda no fato de que os segmentos apicais, mesmo que isolados de caules mantidos por períodos mais longos de até 90 dias no escuro, não apresentaram tendência de decréscimo na capacidade de regeneração de novas plantas (Figura 13), evento que seria esperado no caso de haver alguma deficiência nutricional severa ou algum sinal gasoso na atmosfera interna dos frascos que pudesse interferir no potencial organogenético dos segmentos caulinares.

De acordo com este raciocínio, os resultados obtidos indicaram a existência de diferenças conspícuas em relação ao controle da atividade das populações celulares destes dois tipos de tecidos caulinares durante o processo de estiolamento induzido pela incubação

de *Dendrobium* “Second Love” no escuro. Levando-se em consideração o fato de que os explantes capazes de regenerar novas plantas foram oriundos de regiões distintas do caule estiolado, ou seja, de regiões caulinares apicais e subapicais, deduz-se que grupos distintos de células estiveram envolvidos na iniciação da organogênese em cada um deles, os quais parecem corresponder, respectivamente, a um meristema apical caulinar (MAC) e um meristema axilar.

Certamente, a realização de análises histológicas em ambos os explantes nas regiões celulares envolvidas na iniciação da organogênese caulinar em questão forneceriam maiores informações em relação aos grupos de células responsáveis pelo início deste evento, assim como poderiam revelar possíveis diferenças na forma pela qual os tecidos são organizados durante a regeneração da gema caulinar. Apesar de tais dados ainda não estarem disponíveis especificamente para este material de estudo, a literatura especializada fornece dados que corroboram tal interpretação.

Dados consistentes e bem consolidados informam detalhes sobre o padrão geral de localização, organização e funcionamento do MAC nas plantas superiores, o qual desempenha papel essencial no suprimento de novas células pluripotentes capazes de seguir, portanto, diferentes destinos do desenvolvimento (WANG & LI 2008). O mesmo vale para os meristemas axilares, cujas características relacionadas à localização, organização e atividade também vêm sendo gradativamente elucidadas, bem como os mecanismos que controlam o seu potencial para a formação de novos brotos, quando mantidos em plantas intactas, ou novas estruturas caulinares, quando incubados *in vitro* (ONGARO & LEYSER, 2008).

Apesar dos meristemas axilares possuírem o potencial de eventualmente gerar estruturas caulinares derivadas da retomada de sua atividade, assumindo um papel e um funcionamento no novo caule formado equivalente ao observado no MAC do caule primário de uma planta, o mecanismo geral de controle destes dois tipos de meristemas caulinares possui certas peculiaridades que os distinguem inicialmente (ONGARO & LEYSER, 2008).

Sendo assim, seria esperado que os mecanismos de controle fisiológico dos meristemas axilares e do MAC dos respectivos caules estiolados de *Dendrobium* apresentassem determinadas diferenças em relação ao funcionamento e respostas organogenéticas por eles desencadeadas. Um dos elementos que, provavelmente, deve desempenhar algum papel diferencial neste tipo de controle seria a auxina, a qual é produzida prioritariamente no ápice caulinar e transportada em direção à base do caule, participando na manutenção da dominância apical do caule principal (BLAKESLEE *et al.*, 2005; ONGARO & LEYSER, 2008).

De maneira coerente com este raciocínio, verificou-se que os segmentos caulinares estiolados isolados de plantas estioladas não diferiram apenas no que diz respeito à capacidade de regeneração de novas plantas, mas também formaram plantas que apresentaram diferenças morfológicas entre si. Conforme os resultados obtidos, os meristemas axilares apresentaram em sua grande maioria a capacidade de regeneração de novas plantas, no entanto, estas apresentaram um tamanho reduzido quando comparadas àquelas provenientes dos segmentos nodais, estas maiores e mais vigorosas (Figuras 13 e 14A), o que foi corroborado pelos respectivos valores de massa fresca e seca (Figuras 14B e 14C). Tais resultados enfatizam a existência de mecanismos distintos de controle fisiológico e, conseqüentemente de respostas organogenéticas, nos dois tipos de meristemas caulinares em questão.

Tendo em vista que o crescimento dos caules de *Dendrobium* tanto no claro quanto no escuro é do tipo determinado, a cessação/redução da atividade do MAC de plantas incubadas no escuro parece ocorrer em período posterior ao comprometimento da função da maioria dos meristemas axilares, ressaltando-se o fato de que estes últimos são originados em decorrência da atividade do próprio MAC (ONGARO & LEYSER, 2008). Tais colocações sugerem que o MAC de *Dendrobium* possa, de fato, manter tanto a sua atividade quanto a sua função de maneira mais prolongada que os meristemas axilares, o que os levaria a perder, ao

menos em parte, seu potencial organogenético mais rapidamente que o MAC devido a um envelhecimento anterior dos tecidos subapicais do caule. Dessa maneira, o comportamento organogenético de explantes caulinares isolados de plantas estioladas de *Dendrobium* segue o consenso na cultura de tecidos vegetais, onde os tecidos mais jovens, especialmente os meristemas funcionais, são tidos como os mais competentes para a organogênese (NEHRA *et al.*, 1996; EUDES *et al.*, 2003).

De maneira interessante, na presença de luz, o MAC das plantas de *Dendrobium* parece cessar sua atividade à medida que a formação dos pseudobulbos é iniciada (Figura 10), no entanto, quando sob condições de escuro o ápice caulinar manteve a sua atividade, gerando um número crescente de nós e entrenós até o 90º dia de incubação. Isso parece indicar um papel inibitório de luz sobre a atividade do MAC nestas plantas. SUZUKI (1999) observou o mesmo evento em ápices caulinares de *Catasetum fimbriatum* incubados na presença e ausência de luz. Esse autor não pode definir se esta inibição no claro era devida a uma repressão da atividade mitótica ou ao estabelecimento de um dreno nos pseudobulbos. Ainda de acordo com SUZUKI (1999), os teores de auxina e citocininas nos ápices estiolados apresentaram-se relativamente elevados.

A fase do desenvolvimento das plantas de *Dendrobium* crescidas sob luz também influenciou a resposta organogenética de conversão dos meristemas caulinares vegetativos em reprodutivos. De acordo com os resultados obtidos, observa-se que as plantas com 150 dias de idade tiveram uma cessação do crescimento, o mesmo também ocorrido com a respectiva massa fresca (Figuras 15A e 15B). Entretanto, ao longo deste período, ocorreu um acúmulo de massa seca das plantas até o 150º dia de experimento. Esse aumento de massa seca pode ser devido ao início da formação de novos brotos laterais, pois a partir dessa idade, mesmo em meio de cultura na ausência de TDZ, as plantas começam a produzir ramificações laterais na porção basal do caule. Em plantas de *Catasetum fimbriatum*, as plantas param de crescer após 150 dias de cultivo, dando início à formação do pseudobulbo (SUZUKI *et al.*, 2004).

No que diz respeito aos açúcares e às citocininas, acredita-se que os mesmos estejam envolvidos na transição para a floração de orquídeas, bem como em outras espécies de plantas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (CHIA *et al.*, 1999; OTHO *et al.*, 2001; FERREIRA, 2003; CAMPOS & KERBAUY, 2004; BERNIER & PÉRILLEUX, 2005). Em *Dendrobium* “Second Love” (FERREIRA *et al.*, 2006) e em outros híbridos de *Dendrobium* (SIM *et al.*, 2007; TEE *et al.*, 2008), a floração tem sido induzida *in vitro* pela adição de citocininas ao meio de cultura.

Além de serem utilizadas para induzir a floração *in vitro*, as citocininas são amplamente empregadas também para induzir a proliferação celular e a regeneração de primórdios de gemas em orquídeas e em diversas outras espécies. Para tanto, as citocininas mais utilizadas tem sido a benziladenina (BA) e o thidiazuron (TDZ) (HUETTEMAN & PREECE, 1993; ERNST, 1994; MURTHY *et al.*, 1998; JAIN & RASHID, 2001; HUSAINI & ABDIN, 2007; CORREDOIRA *et al.*, 2008).

Foi verificado por FERREIRA *et al* (2006) que plantas de *Dendrobium* “Second Love” micropropagadas *in vitro* na presença de 1,8µM de TDZ são capazes de induzir a formação de brotos axilares e a floração.

No presente estudo, a presença de 1,8µM de TDZ mostrou-se suficiente para induzir tanto o brotamento quanto a floração em plantas com diferentes idades incubadas no claro (Figuras 19 e 20). Quando na presença dessa citocinina formaram-se primeiramente brotos laterais e destes, botões florais. A natureza física do meio de cultura também influenciou na floração, sendo acelerada quando as plantas foram incubadas inicialmente em meio líquido e em seguida transferidas para meio geleificado, ambos acrescidos de TDZ. Isso talvez se deva ao fato do meio líquido possibilitar uma maior absorção das substâncias nele presentes. Em plantas de kiwi (*Actinia deliciosa*) cultivadas *in vitro* com BA também foi verificado que o meio líquido promove maior absorção dessa citocinina (FEITO *et al.*, 2001).

Conforme demonstrado na figura 20, após 90 dias de exposição ao TDZ as plantas com 120 dias de idade crescidas no claro apresentaram uma maior porcentagem de floração,

enquanto que naquelas com 150 dias sob as mesmas condições, observou-se uma redução de 50% na taxa de floração. Estas últimas parecem perder a competência para o florescimento induzido pelo TDZ à medida que o tempo de cultura aumentava, indicando, assim, a inexistência de uma correlação inversa entre a parada do florescimento e a idade das plantas *in vitro*.

Se, de um lado, o TDZ induz maior brotamento nas plantas de 150 dias, de outro, sua capacidade de florescer é diminuída drasticamente (Figuras 19, 20 e 21). Fato este talvez relacionado à perda da competência em responder à floração, sendo os sinais endógenos insuficientes para sua indução. Dessa forma, a idade de 120 dias mostrou-se favorável à formação de botões florais o que de certa forma reforça sua maior susceptibilidade tanto à floração quanto a habilidade de produzir botões florais (Figura 20).

Frente a estes resultados e suas possíveis correlações descritas, procurou-se determinar o tempo mínimo necessário de exposição ao TDZ para indução da floração nas plantas de 120 dias de crescimento no claro e o número médio de brotos laterais formados por planta.

Em relação ao número de brotos formados, observou-se que aumentando-se o tempo de exposição ao TDZ, aumentou de maneira gradual o número de brotos formados por planta (Figura 23). Nesse caso, não foi possível um período de tempo mínimo crítico para a formação de brotos. De modo diverso, quanto à floração, constatou-se que o tempo mínimo necessário à indução pelo TDZ ocorria no 10º dia, quando cerca de 35% das plantas floresciam, com pequenas variações não significativas até o 60º dia de incubação. Entretanto, curiosamente algumas plantas chegaram a florescer em períodos inferiores a estes, só que em baixas porcentagens (Figura 24). É interessante notar que o TDZ provocou um aumento nos teores endógenos de citocininas totais no 5º dia de tratamento com o TDZ, o que foi interpretado por FERREIRA *et al.* (2006), como um pulso potencialmente ligado ao desencadeamento da floração de *Dendrobium Second Love*. Em *Psychmorchis pusilla* o

envolvimento das citocininas estaria relacionado à formação de hastes florais, conforme foi observado por VAZ *et al.* (2004).

Entretanto, tratamentos com as citocininas naturais Z, ZR, iP e iPR na concentração de 1,8 μ M não se mostraram capazes de induzir a floração em *Dendrobium* Second Love após 90 dias de incubação (Tabela 2). Ainda com essa mesma orquídea FERREIRA (2003) verificou que a influência do BA nas concentrações de 1,8 e 3,6 μ M, era bem inferior a do TDZ. Porém, em outras plantas híbridas de *Dendrobium*, originadas de espécies diferentes daquelas de *Dendrobium* Second Love, a utilização de BA revelou-se mais eficaz (SIM *et al.*, 2007; TEE *et al.*, 2008).

Portanto, pelo acima exposto, torna-se plausível sugerir que a ação do TDZ pode não ser mediada apenas pela elevação das concentrações endógenas de citocininas em plantas de *Dendrobium* Second Love, mas provavelmente, também em razão do termoperiodismo. Isto porque o efeito indutor do termoperiodismo na indução floral de plantas adultas, com da orquídea objeto deste estudo, foi demonstrado por CAMPOS & KERBAUY (2004), embora tais autores não tenham vinculado diretamente a elevação detectada nos níveis de citocininas endógenas com o desencadeamento da floração pelo frio. Além disso, tratamentos de plantas adultas de *Dendrobium* Second Love com soluções de BA não se mostraram eficientes para a indução floral nessas condições (dados não publicados). A questão, pois é de se discriminar na complexa rede de eventos relacionados à floração, o ponto comum entre o tratamento termoperiódico indutor e a participação do TDZ, ambos por rotas diferentes levando ao mesmo efeito final. Considerando o modelo de indução de floração detectado em plantas de *Arabidopsis thaliana*, seria presumível acreditar que por vias diferentes ambos tratamentos estimulasse a expressão de genes da floração como o LEAFY, APETALA 1 e AGAMOUS (BERNIER & PÉRILLEUX, 2005; DORNELAS & DORNELAS, 2005; VAZ *et al.*, 2008).

Nesse sentido, em relação ao número de brotos, verificou-se no presente trabalho que o TDZ estimula a formação de brotos quando comparado ao controle e as citocininas

utilizadas (Figura 16). O efeito promotor do TDZ sobre o brotamento lateral já foi constatado em outras plantas conforme demonstrado por NAYAK *et al.* (1997), em *Cymbidium* e *Dendrobium*. Porém, no presente estudo, os brotos formados na presença de TDZ foram significativamente menores do que nas respectivas plantas controle e nos tratamentos com Z, ZR, iP e iPR (Figura 17), evidenciando um forte efeito inibitório sobre o crescimento caulinar. Essa cessação, um tanto precoce no crescimento caulinar, com a formação simultânea de caules mais grossos (pseudobulbos – Figuras 18 e 21), pode estar refletindo um estado de maturação fisiológica dos mesmos, predispondo-os à uma maior sensibilização aos sinais indutores da floração como o TDZ, por exemplo. Uma relação entre a formação de pseudobulbos e o florescimento precoce *in vitro* de *Oncidium varicosum* foi sugerida por KERBAUY (1984), neste caso, contudo, em meios destituídos de citocininas.

Por sua vez, a quantificação dos teores de açúcares solúveis desses brotos (Figura 22) mostrou que a quantidade de açúcar era significativamente maior na presença de TDZ do que nas plantas controle e naquelas tratadas com as citocininas naturais. Ainda que de forma indireta, a presença de maiores níveis de açúcares nas plantas tratadas com TDZ e de pseudobulbos mais desenvolvidos, órgãos estes acumuladores de carbono, corroboram a hipótese da importância do estado fisiológico da planta e da relação carbono/nitrogênio como condições necessárias a passagem do estado vegetativo para a fase reprodutiva (VAZ *et al.*, 2008).

A sacarose representa a maior parte dos produtos do CO₂ fixado pela fotossíntese, sendo estocada principalmente no vacúolo (WINTER *et al.*, 1994). No tecido em crescimento os açúcares são utilizados como fonte de carbono e energia para a síntese de matéria celular (AVIGAD & DEY, 1997).

Alguns autores sugerem que os açúcares desempenhariam função de fonte energética durante a iniciação floral, enquanto, para outros, eles teriam um papel regulatório

no metabolismo celular podendo atuar em nível de expressão gênica ou como molécula mensageira (OHTO *et al.*, 2001; BERNIER & PÉRILLEUX, 2005)

Diversos estudos reportam-se aos efeitos de concentrações de sacarose sobre a indução floral *in vitro*, como exemplo podem ser citados tomateiros mutantes (DIELEN *et al.*, 2001), *Arabidopsis* (OHTO *et al.*, 2001), *Psycmorchis pusilla* (VAZ *et al.*, 2002), dentre outras. Cabe ressaltar que em *Dendrobium*, FERREIRA (2003) só obteve floração *in vitro* quando o meio de cultura continha 1,8μM de TDZ e sacarose, sendo que, em seus experimentos, só o TDZ não foi suficiente para induzir a formação de botões florais. Como as plantas crescidas *in vitro* exibem baixa atividade fotossintética, faz-se necessário acrescentar açúcar ao meio de cultura.

Em rosa (hibrid tea) cv. “First Prize”, o número de botões florais é proporcional a concentração de sacarose do meio de cultura (VU *et al.*, 2006).

Por fim, em relação ao etileno, sabe-se que plantas cultivadas *in vitro* tendem a produzi-lo, e sendo um gás, o mesmo pode se acumular no frasco e interferir no desenvolvimento da planta conforme verificado em gerânio (HUTCHINSON *et al.*, 1997).

A presença de etileno no interior dos frascos mensurada já no primeiro dia de experimentação (Figura 25), na presença de TDZ, foi significativamente maior. A elevação dos níveis de etileno pelo TDZ foi observada também durante a indução da embriogênese somática *in vitro* em gerânio (HUTCHINSON *et al.*, 1997). No caso do *Dendrobium* Second Love, a maior concentração de etileno parece ter perdurado durante todo período de análise (20 dias), podendo ter interferido no metabolismo dessas plantas de orquídea. Não se descarta a possibilidade do etileno em concentrações mais elevadas, juntamente com o próprio TDZ, ter atuado complementarmente na limitação do crescimento caulinar e no seu intumescimento precoce, levando ao estabelecimento dos pseudobulbos

Em *Arabidopsis thaliana* (HU *et al.*, 2006) e *Brassica juncea* (PUA & LEE, 1995) foi demonstrado que o acúmulo de etileno na cultura *in vitro* afetava negativamente a

organogênese. É bem conhecido que etileno inicia o processo de senescência em vários órgãos das plantas e o mecanismo pelo qual as plantas sintetizam, percebem e transmitem os sinais (MUTUI *et al.*, 2007). Talvez, esse acúmulo de etileno nos frascos deva estar relacionado à senescência dos botões antes mesmo da antese.

No mais, o uso de citocininas e auxinas necessárias à indução de brotos estimula a produção de etileno através da indução ou modificação da biossíntese de enzimas específicas (CHATFIELD & RAIZADA, 2008). Tem-se, assim, que embora seja conhecido o seu envolvimento no florescimento de plantas bromeliáceas, o etileno exerce um efeito inibitório sobre a floração de outras plantas (HEW & CLIFFORD, 1993), especialmente, sobre o *Dendrobium*, como levou a crêr os resultados da presente pesquisa.

Conclusão

O presente estudo permitiu uma melhor definição e padronização das condições de cultura *in vitro* de plantas de *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae) à medida que foram desvendados e investigados certos aspectos fisiológicos relacionados ao controle de diferentes respostas organogênicas caulinares tanto de natureza vegetativa quanto reprodutiva.

O emprego da técnica de micropropagação com a incubação de tais plantas no escuro por diferentes períodos, junto à posterior avaliação das variações no potencial organogênico de seus segmentos caulinares apicais e subapicais para a regeneração de novas plantas, indicou que o potencial organogênico dos explantes utilizados derivou não apenas da região de origem do caule estiolado, mas também da idade do próprio tecido. Verificou-se que os segmentos apicais apresentaram maior potencial para regeneração de plantas, assim como se observou a relação entre um menor tempo de incubação no escuro e o aumento na porcentagem de segmentos nodais capazes de regenerar novas plantas. Além disso, notou-se que um menor período de incubação dos caules estiolados no escuro foi capaz de tornar as plantas regeneradas mais homogêneas em relação ao tamanho.

Sendo assim, dentre as condições testadas no presente trabalho para micropropagar plantas de *Dendrobium* Second Love por meio de segmentos caulinares estiolados, sugere-se que a situação mais promissora seja a incubação das plantas por 60 dias no escuro com a utilização da porção apical dos caules estiolados como explantes para regeneração de novas plantas. Foi também possível verificar que a idade das plantas regeneradas na presença de luz também influenciou as respostas organogênicas das mesmas, uma vez que plantas mais jovens responderam de maneira mais eficaz aos estímulos

desencadeadores da organogênese floral empregados neste trabalho. Nesse sentido, foi possível verificar o tratamento das plantas por 10 dias com thidiazuron (TDZ) foi capaz de desencadear a floração em boa parte do material de estudo, ao passo que as demais citocininas testadas (Z, ZR, iP e iPR) não foram eficazes na transição dos meristemas caulinares da condição vegetativa para a floral. No entanto, todas as citocininas empregadas, incluindo o TDZ, proporcionaram o aumento na formação de novos brotos laterais.

A ação promotora do TDZ sobre a floração de *Dendrobium Second Love* pareceu envolver certas modificações fisiológicas nas plantas tratadas, as quais estiveram relacionadas ao aumento nos teores endógenos de açúcares totais e variações na emissão de etileno. De maneira interessante, os teores relativamente elevados na concentração de açúcares solúveis foram detectados nos brotos caulinares em período coincidente ao evento de florescimento. Complementarmente, verificou-se que, apesar do TDZ ter desencadeado um aumento substancial na emissão de etileno logo no início do tratamento, esta se apresentou com valores equivalentes ao controle por volta do 23º e 26º dia de tratamento, indicando que durante este período haja algum mecanismo de controle negativo da produção de etileno que poderia participar na organogênese floral. Por outro lado, a tendência observada de estabelecimento de maior produção de etileno a partir do 30º dia em plantas tratadas com TDZ poderia ter relação com a não ocorrência da antese nas flores formadas.

Em suma, os dados obtidos neste trabalho revelaram que a duração do período de incubação de *Dendrobium Second Love in vitro*, tanto em condições de escuro quanto na presença de fotoperíodo, exerce papel determinante nas respostas organogenéticas da parte aérea desta planta, sendo importante não apenas no controle da organogênese caulinar vegetativa (regeneração de plantas e brotamento) como também reprodutiva (florescimento). Além disso, a ação promotora do TDZ sobre a transição dos meristemas caulinares da condição vegetativa para reprodutiva nestas plantas esteve envolvida com o aumento dos teores endógenos de açúcares totais, bem como com alterações na emissão de etileno.

Resumo

O emprego da cultura de tecidos, órgãos ou plantas *in vitro* tem sido largamente utilizado como técnica de micropropagação com finalidade de estudar os vários fatores envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal. O objetivo do presente trabalho foi estudar as condições fisiológicas relacionadas a diferentes respostas organogenéticas de natureza vegetativa e reprodutiva em plantas de *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*. Foi possível analisar através da técnica de micropropagação de incubação de tais plantas no escuro as variações no potencial organogenético de seus segmentos caulinares apical e subapical em formar explantes para a regeneração de novas plantas *in vitro* e as decorrente variações morfológicas das plantas assim regeneradas. A referida técnica foi também empregada com a incubação dessas plantas no claro para gerar material suficiente ao estudo do envolvimento do TDZ, Z, ZR, iP, iPR na indução de seu brotamento e de sua floração. Foi possível assim a análise das variações tanto dos teores endógenos de açúcares solúveis quanto de etileno decorrentes da aplicação dessas citocininas, bem como aferir a influência da duração do tratamento e da idade da planta. Os resultados mostraram que a idade de incubação das plantas no escuro e no claro é importante não apenas para gerar novas plantas como também para induzir o seu brotamento e o florescimento. Sucessivas etapas de padronização evidenciaram que a causa principal da variação no potencial organogenético dos explantes utilizados derivou da região de origem da planta estiolada, bem como da idade do próprio tecido, sendo que um menor tempo de incubação no escuro levou a um aumento na porcentagem de regeneração das plantas, da mesma forma que um menor período de escuro tornou as plantas mais homogêneas em relação ao tamanho. Dentre as condições estudadas, todas as citocininas induziram brotamento, porém em relação ao florescimento apenas o TDZ mostrou-se eficaz. Pôde-se ainda verificar que um período de exposição de 10 dias no TDZ induziu as plantas à floração. Os níveis de açúcares solúveis dos brotos submetidos aos tratamentos com Z, ZR, iP, iPR e TDZ mostrou-se mais elevado naqueles tratados com TDZ sugerindo uma maior utilização de açúcares nas plantas induzidas a floração. Em relação ao acúmulo de etileno dentro dos frascos verificou-se, por fim, que as plantas tratadas com TDZ induziram maior acúmulo de etileno em relação às plantas controle.

Abstract

In vitro tissues, organs or plants culture has been widely used as a micropropagation technique aiming to study a number of factors involved in vegetable growth and development. In the present study, we evaluated the physiological conditions related to different vegetative or reproductive organogenetic responses in *in vitro* *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae) plants. We evaluated the organogenetic potential of the shoot segments in inducing explants for the regeneration of new *in vitro* plants and their morphological changes. This technique was also micropropagated with light incubation of the plants in order to provide enough material for the study of the participation of TDZ, Z, ZR, iP, iPR in the induction of their budding and its flowering. Thus, it was possible to analyze the endogenous levels of soluble sugars, ethylene concentration, following the application of these cytokinins, as well as evaluated the effect of treatment duration and the plant age. The results showed that the plant incubation age is not only important to generate new plants, but also to induce its budding and flowering, irrespective of the dark/light condition. Successives tests showed that the main reason for changes in the organogenetic potential of the explants was due to the etiolated plant region, as well the tissue age. In this sense, lower dark incubation length led to an increase in the percentage of plants regeneration, and to more homogeneous plant sizes. Among the studied conditions, all cytokinins induced budding, however concerning flowering only TDZ was effective. It was also verified that a 10-day exposure to TDZ can induce plants to flowering. The level of soluble sugars in the buds submitted to the treatment with Z, ZR, iP, iPR and TDZ was higher in the ones treated with TDZ, suggesting a higher sugar use in the plants induced flowering. Regarding the ethylene accumulation in the flasks, it was observed that plants treated with TDZ induced higher ethylene accumulation when compared to control plants.

Anexos

Anexo I. Composição dos macronutrientes de Vacin & Went (1949), micronutrientes de Murashige & Skoog (1962) e Fe-EDTA utilizados nos meios de cultura

Macro Vacin & Went (1949)	mg/L
KNO ₃	525,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	500,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,0
KH ₂ PO ₄	250,0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	200,0
 Micro Murashige & Skoog (1962)	 mg/L
MnSO ₄ .H ₂ O	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0,830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,025
 Fe-EDTA	 mg/L
Na ₂ EDTA	37,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	28,0

Anexo II. Composição dos meios de cultura de estiolamento e crescimento

Estiolamento	Crescimento
Macro Vacin & Went (1949)	Macro Vacin & Went (1949)
Micros Murashige & Skoog (1962)	Micro Murashige & Skoog (1962)
Fe-EDTA	Fe-EDTA
40g/L de sacarose	20g/L de sacarose
100mg/L de inositol	100mg/L de inositol
0,1mg/L de tiamina	0,4mg/L de tiamina
1,0g/L de peptona de soja	-
2g/L de Phytigel®	2g/L de Phytigel®
pH 5.8	pH 5.8

Referências Bibliográficas

- ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M. A. (2009) Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Molecular Biology**, 69: 409-417.
- AMUTHA, S.; MURUGANANTHAM, M.; GANAPATHI, A. (2002) Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, 42: 26-30.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley and Sons, 1993. 640p.
- AUKERMAN, M. J.; AMASINO, R. M. (1998) Floral induction and florigen. **The Cell**, 93: 491-494.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. **Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates**. Plant Biochemistry. Academic Press Ltd., 1997. p. 143-204
- BERNIER, G. (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. **Annual Review in Plant Physiology and Molecular Biology**, 39: 175–219.
- BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. (1993) Physiological signals that induce flowering. **The Plant Cell**, 5: 1147-1155.
- BERNIER, G.; PÉRILLEUX, C. (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. **Plant Biotechnology Journal**, 3: 3-16.
- BLAKESLEE, J. J.; PEER, W. A.; MURPHY, A. S. (2005) Auxin transport. **Current Opinion in Plant Biology**, 8: 494-500.
- BLANCHARD, M. G.; RUNKLE, E. S. (2006) Temperature during the day, but not during the night, controls flowering of *Phalaenopsis* orchids. **Journal of Experimental Botany**, 57: 4043-4049.
- BLANCHARD, M. G.; RUNKLE, E. S. (2008) Benzyladenine promotes flowering in *Dorotaenopsis* and *Phalaenopsis* orchids. **Journal of Plant Growth Regulation**, 27: 141-150.
- BLASQUEZ, M. A.; GREEN, R.; NILSSON, O.; SUSSMAN, M. R.; WEIGEL, D. (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the Leafy promoter. **Plant Cell**, 10: 791-800.
- BLEECKER, A. B.; KENDE, H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review in Cellular Developmental Biology**, 16: 1–18

- BONHOMME, F.; KURZ, B.; MELZER, S.; BERNIER, G.; JACQMARD, A. (2000) Cytokinin and gibberellin activate SaMADSA, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. **The Plant Journal**, 24 (1): 103–111.
- BOWMAN, J. L.; ESHED, Y. (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in Plant Science**, 5 (3): 110-115.
- CAMPOS, K. O.; KERBAUY, G. B. (2004) Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Journal of Plant Physiology**, 161: 1385-1387.
- CASTELLANO, M. M.; SABLowski, R. (2005) Intercellular signaling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. **Current Opinion in Plant Biology**, 8: 26-31.
- CHATFIELD, S. P.; RAIZADA, M. N. (2008) Ethylene and shoot regeneration: *hookless1* modulates de novo shoot organogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Reports**, 24: 655-666.
- CHIA, T. F.; ARDITTI, J.; SEGEREN, M. I.; HEW, C. S. (1999) Review: *In vitro* flowering of orchids. **Lindleyana** 14: 60-76.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. (1988) Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hortiscience**, 23 (3): 515-519.
- CLINE, M. G. (1991) Apical dominance. **The Botanical Review**, 57: 318-358
- CORBESIER, L.; COUPLAND, G. (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. **Journal of Experimental Botany**, 57: 3395–3403.
- CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. (2008) Thidiazuron-induced high-frequency plant regeneration from leaf explants of *Paulownia tomentosa* mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 95: 197-208
- DAVOREN, J. D.; NYKIFORUK, C. L. C.; LAROCHE, A.; WESELAKE, R. J. (2002). Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40: 719-725.
- DECKER, J. S. **Cultura das orquídeas no Brasil**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado, 1946. 251p.
- DHALIWAL, H. S.; RAMESAR-FORTNER, N. S.; YEUNG, E.C.; THORPE, T. A. (2003) Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, 81: 611–621

- DIELEN, V.; LECOUVET, V.; DUPONT, S.; KINET, J. M. (2001) *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mil.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering *uniflora* mutant. **Journal of Experimental Botany**, 52: 715-723.
- DINNENY, J.R.; BENFEY, P.N. (2008) Plant stem cell niches: standing the test of time. **Cell**, 132: 553-557.
- DORNELAS, M. C.; DORNELAS, O. (2005) From leaf to flower: revisiting Goethe's concepts on the "metamorphosis" of plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17 (4): 335-343.
- DUAN, J. X.; YAZAWA, S. (1994) *In vitro* floral development in *Doriella Tiny* (*Doritis pulcherrima* x *Kingiella philippinensis*). **Scientia Horticulturae**, 59: 253-264.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Annals of Chemistry**, 28: 350-356.
- DUN, E. A.; FERGUSON, B. J.; BEVERIDGE, C. A. (2006) Apical dominance and shoot branching. Divergent opinion or divergent mechanisms? **Plant Physiology**, 142:812-819.
- EMERY, R. J. N.; LONGNECKER, N. E.; ATKINS, C. A. (1998) Branch development in *Lupinus angustifolius* L. II. Relationship with endogenous ABA, IAA and cytokinins in Axillary and main stem buds. **Journal of Experimental Botany**, 49: 555-562
- ERNEST, R. (1994) Effects of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 39: 273-275.
- EUDES, F.; ACHARYA, S.; LAROCHE, A.; SELINGER, L. B.; CHENG, K. J. (2003) A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 73: 147-157.
- FARRAR, J.; POLLOCK, C.; GALLAGHER, J. (2002). Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. **Plant Science**, 154: 1-11.
- FEITO, I.; GONZÁLEZ, A.; CENTENO, M. L.; FERNÁNDEZ, B.; RODRIGUEZ, A. (2001) Transport and distribution of benzyladenine in *Actinidia deliciosa* explants cultured in liquid and solid media. **Plant Physiology and Biochemistry**, 39: 909-916.
- FERREIRA, W. M. **Comportamento Organogenético de Meristemas Caulinares de *Dendrobium Second Love* (Orchidaceae) *in vitro***. 2003. 142 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

- FERREIRA, W. M.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; PESCADOR, R.; SUZUKI, R. M. (2006) Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. **Journal of Plant Physiology**, 163: 1126-1134.
- FLETCHER, J. C. (2002) Shoot and floral meristems maintenance in *Arabidopsis*. **Annual Review in Plant Biology**, 53: 45-66.
- GANESHAN, S.; CHODAPARAMBIL, S. V.; BAGA, M.; FOWLER, D. B.; 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**, 85: 63–73.
- GAUDIN, V.; LUNNESS, P. A.; FOBERT, O. R.; TOWERS, M. N.; RIOU-KHAMLICHE, C.; MURRAY, J. A. H.; COEN, E.; DOONAN, J. H. (2000). The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. **Plant Physiology**, 122: 1137-1148.
- GOH, C. J. (1984) Flowering in tropical orchids. **Malayan Orchid Review**, 18: 84- 91.
- GRAY, W. M.; OSTIN, A.; SANDENBERG, G.; ROMANO, C. P.; ESTELLE, M. (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 95: 7197-7202
- HEE, K. H.; LOH, C. S.; YEOH, H. H. (2007) Early in vitro flowering and seed production in culture in *Dendrobium* Chao Praya Smile (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, 26 (12): 2055-2062.
- HEW, C. S.; CLIFFORD, P. E. (1993) Plant growth regulators and the orchid cut flower industry. **Plant Growth Regulation**, 13: 231-239.
- HEW, C. S.; YONG, J. W. H. (1997) **The physiology of tropical orchids in relation to the industry**. Singapore: World scientific, 331p.
- HICKS, G. S. (1994) Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, 1: 10-15.
- HU, W. W.; GONG, H. B.; PUA, E. C. (2006) Modulation of SAAMDC expression in *Arabidopsis thaliana* alters in vitro shoot organogenesis. **Physiologia Plantarum**, 128: 740-750.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and organ Culture**, 33: 105-119.
- HUSAINI, A. M.; ABDIN, M. Z. (2007) Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, 43: 576-584.

- HUTCHINSON, M. J.; MURR, D.; KRISHNARAJ, S.; SENARATNA, T.; SAXENA, P. K. (1997) Does ethylene play a role in thidiazuron-regulated somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x Hortorum* bailey) hypocotyl cultures? **In vitro cellular and developmental biology – plant**, 33: 136-141.
- INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, 409: 1060-1063.
- IRAQI, D.; TREMBLAY, F. M. (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. **Journal of Experimental Botany**, 52: 2301-2311.
- JAEGER, K. E.; GRAF, A.; WIGGE, P. A. (2006) The control of flowering in time and space. **Journal of Experimental Botany**, 57 (13): 3415-3418.
- JAIN, P.; RASHID, A. (2001) Stimulation of shoot regeneration on *Linum* hypocotyls segments by thidiazuron and its response to light and calcium. **Biologia Plantarum**, 44: 611-613.
- KERBAUY, G. B. (1984) *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones (Orchidaceae). **Plant Science Letters**, 35: 73-75.
- KERBAUY, G. B. (1995) Biofábrica de orquídeas. In: Gerald, L. T. S. **Biofábrica: produção industrial de plantas “in vitro”**. Araras: Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias, p.22-37.
- KERBAUY, G. B. (1999) Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de planta. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Volume 2. Brasília: CBAB/EMBRAPA, 1999. p. 519-531.
- KERBAUY, G. B.; COLLI, S. MAJEROWICZ, N. (1995) Manutenção da atividade meristemática apical em caules de *Catasetum* (Orchidaceae) pelo etileno e escuro: implicações com uma estratégia de micropropagação. In: **Resumos do V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, Lavras, p. 3.
- KERSTETTER, R. A.; HAKE, S. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. **Plant Cell**, 9 (7): 1001-1010.

- KING, R. W.; BEN-TAI, Y. (2001). A florigenic effect of sucrose in *Fuschia hybrida* is blocked by gibberellins-induced assimilate competition. **Plant Physiology**, 125: 488-496.
- KINTZIOS, S.; MICHAELAKIS, A. (1999) Induction of somatic embryogenesis and *in vitro* flowering from inflorescence of chamomile (*Chamomilla recutita* L.). **Plant Cell Reports**, 18 (7-8): 684-690.
- KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L. E. (1995) A novel method for rapid micropropagation on pineapple. **Hortscience**, 30: 127-129.
- KOSTENYUK, I.; OH, B. J.; SO, I. S. (1999) Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*. **Plant Cell Reports**, 19: 1-5.
- LEJEUNE, P.; BERNIER, G.; REQUIER, M.C.; KINET, J.E. (1994) Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. **Physiologia Plantarum**, 90 (3): 522–528.
- LEYSER, O. (2005) The fall and rise of apical dominance. **Current Opinion in Genetics and Development**, 15: 468-471.
- LJUNG, K.; BHALERAO, R. P.; SANDBERG, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **The Plant Journal**, 28: 465-474.
- LUO, J-P., WANG, Y.; ZHA, X-Q; HUANG, L. (2008) Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall. Through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 93: 333-340.
- LUO, P.; YE, Q.; LAN, Z. (2000) A study on floral biology of seedlings *in vitro* in *Orychophragmus violaceus*: induction of flowers in seedlings of *O. violaceus* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 63 (1): 73-75.
- LUUN, J.; MACRAE, E. (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. **Current Opinion in Plant Biology**, 6: 208-214.
- LYNDON, R. F. **Plant development: the cellular basis**. Boston: Unwin Hyman, 1990. 320p.
- MARTIN, K. P.; MADASSERY, J. (2006) Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. **Scientia Horticulturae**, 108: 95-99.
- McDANIEL, C. N.; SINGER, S. R.; SMITH, S. M. E. (1992) Developmental states associated with the floral transition. **Developmental Biology**, 153: 59-69.
- METZGER, J. D. Hormones and reproductive development. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.617-649.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497.
- MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* morphogenesis. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, 34: 267-275.
- MUTUI, T. M.; MIBUS, H.; SEREK, M. (2007) Influence of thidiazuron, ethylene, abscisic acid and dark storage on the expression levels of ethylene receptors (ETR) and ACC synthase (ACS) genes in Pelargonium. **Plant Growth Regulation**, 53: 87-96.
- NAYAK, N. R.; RATH, S. P.; PATNAIK, S. (1997) *In vitro* propagation of three orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, 71: 243-250.
- NEHRA, N. S.; KARTHA, K. K. CHIBBAR, R. N. (1996) Enhanced regeneration system. **United States Patent Number**, 5:589,617.
- 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.
- OHTO, M.; ONAI, K.; FURUKAWA, Y.; AOKI, E.; ARAKI, T.; NAKAMURA, K. (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**. 127: 252-261.
- ONGARO, V.; LEYSER, O. (2008) Hormonal control of shoot branching. **Journal of Experimental Botany**, 59(1): 67-74.
- PEETERS, A. J. M.; GERARDS, W.; BARENDSE, G. W. M.; WULLEMS, G.J. (1991) *In vitro* flower bud formation in tobacco: interaction of hormones. **Plant Physiology**, 97 (1): 402-408.
- PERES, L. E. P. (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, 25: 44-48.
- PUA, E. C.; LEE, J. E. E. (1995) Enhanced de novo shoot morphogenesis in vitro by expression of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene in mustard plants. **Planta**, 196: 69-76.
- PUCHOOA, D. (2004) Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). **International Journal of Agriculture and Biology**, 6: 884-888.

- PURGATTO, E.; DO NASCIMENTO, J.R.O.; LAJOLO, F.M.; 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. **Journal of Plant Physiology**, 159: 1105-1111.
- RODRIGUES, M. A. **Sinalização no ganho de competência para a conversão de meristemas apicais radiculares de *Catsetum fimbriatum* em gemas caulinares**. 2008. 175f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- SABLOWSCKI, R. (2007) Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, 58: 899-907.
- SCOFIELD, S.; MURRAY, J. A. H. (2006) The evolving concept of the meristem. **Plant Molecular Biology**, 60: v–vii.
- SCORZA, R. (1982) *In vitro* flowering. **Horticultural Review** 4: 106-127.
- SHARMA, V. K.; FLETCHER, J. C. (2002) Maintenance of shoot and floral meristems cell proliferation and fate. **Plant Physiology**, 129: 31-39.
- SIM, G. E.; GOH, C. J.; LOH, C. S. (2008) Induction of *in vitro* flowering in *Dendrobium* Madame Thong-In (Orchidaceae) seedlings is associated with increase in endogenous N6-(D2-isopentenyl)-adenine (iP) and N6-(D2-isopentenyl)-adenosine (iPA) levels. **Plant Cell Reports**, 27: 1281-1289.
- SIM, G. E.; LOH, C. S.; GOH, C. J. (2007) High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Madame Thong-in (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, 26: 383-393.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, 11: 118-231.
- SMYTH, D. R.; BERLETH, T. (2006) Growth and development integrating signals and differentiating tissues - the ‘calculus’ of plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, 9:1–4.
- SNOWDEN, K. C.; NAPOLI, C. A. (2003) A quantitative study of lateral branching in petunia. **Functional Plant Biology**, 30: 987-994.
- SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; ENDRES, L.; MERCIER, H. (2003) Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41: 733-739.

- SRIVASTAVA, L.M. Special Features of Plant Development. In: SRIVASTAVA, L.M. (ed.) **Plant Growth and Development – Hormones and Environment**. USA: Academic Press, 2002. p. 3-22.
- SUGIYAMA, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, 2: 61–64.
- SUZUKI, R. **Efeito hormonal endógeno e exógeno sobre o desenvolvimento de plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) incubadas na presença e ausência de luz**. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- SUZUKI, R. M.; KERBAUY, G. B. ZAFFARI, G. R. (2004) Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, 161: 929-935.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 719.
- TEE, C. S.; MAZIAH, M; TAN, C. S. (2008) Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17. **Biologia Plantarum**, 52 (4): 723-726.
- THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. (1997) The nature and identity of photoperiodic signals. In: **Photoperiodism in plants**. Califórnia Academic Press. p.180-223.
- THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. (1986) Cytokinin activity induced by TDZ. **Plant Physiology**, 81: 681-683.
- TSUCHISAKA, A.; THEOLOGIS, A. Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate synthase gene family members. **Plant Physiology**, 136: 2982-3000.
- UGGLA, C.; MAGEL, E.; MORITZ, T.; SUNDBERG, B. (2001). Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. **Plant Physiology**, 125: 2029-2039.
- VACIN, E. F.; WENT, F. W. (1949) Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, 110: 605-617.
- VAZ, A. P. A. **Crescimento vegetativo e floral de plantas de *Psychomorphis pusilla* (Orchidaceae)** 2002. 139 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002
- VAZ, A. P. A.; FIGUEIREDO, R. C. L. R. ; KERBAUY, G. B. (2004) Photoperiodic and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42 (05): 411-415.

- VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. *In vitro* flowering studies in *Psychomorphis pusilla*. In: Jaime A. Teixeira da Silva. (Org.). **Floriculture, Ornamental and Plant: advances and topical issues**. Volume V. Isleworth: Global Science Books, 2008a. p. 427-432.
- VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B. *In vitro* precocious orchid flowering: a strategy for basic research and commercial approaches. In: Jaime A. Teixeira da Silva. (Org.). **Floriculture, Ornamental and Plant: advances and topical issues**. Volume V. Isleworth: Global Science Books, 2008b. p. 421-426.
- VAZ, A. P. A.; SANTOS, H. P.; ZAIDAN, L. B. P. Floração. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 340-357.
- VERDEIL, J-L; AEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, 12 (6): 245-252.
- VERNOUX, T.; BENFEY, P. (2005) Signals that regulate stem cell activity during plant development. **Current Opinion in Genetics & Development**, 15 (4): 388-394.
- VU, N. H.; ANH, P. H.; NHUT, D. T. (2006) The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (Hybrid tea) cv. "First Prize". **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 87: 315-320
- WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, 14 Supplement: S131–S151
- WANG, X. (1988). Tissue culture of *Cymbidium*: plant and flower induction *in vitro*. **Lindleyana**, 3: 184-189.
- WANG, Y.; LI, J. (2008) Molecular basis of plant architecture. **Annual Review of Plant Biology**, 59: 253–79.
- WILLIAMS, L.; FLETCHER, J. C. (2005) Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. **Current Opinion in Plant Biology**, 8: 582–586.
- WINKELMANN, T.; GEIER, T. (2006) Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86: 319-327.
- WINTER, H.; ROBINSON, D. G.; HELDT, H. W. (1994) Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. **Planta**, 193: 530-535.