Lucas Macedo Félix

# Efeito de giberelina, óxido nítrico e etileno no estiolamento de *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae)

São Paulo

2013

Lucas Macedo Félix

# Efeito de giberelina, óxido nítrico e etileno no estiolamento 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: Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy

São Paulo

2013

# Ficha Catalográfica

Félix, Lucas Macedo

Efeito de giberelina, óxido nítrico e etileno no estiolamento de *Dendrobium* "Second Love" (Orchidaceae) / Lucas Macedo Félix; orientador Dr. Gilberto Barbante Kerbauy. – São Paulo, 2013.

103 páginas

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

1. Orchidaceae 2. *Dendrobium* "Second Love" 3. Hormônios Vegetais 4. Estiolamento

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

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy

Orientador

São Paulo

2013

# Dedicatória

Dedico às minhas avós,

que sempre tiveram muito orgulho de mim.

À meus pais, irmãos, André e Clébio, pelo amor incondicional.

# Epígrafe

“Ama e faz o que quiseres. Se calares, calarás com amor; se gritares, gritarás com amor; se corrigires, corrigirás com amor; se perdoares, perdoarás com amor. **Se tiveres o amor enraizado em ti, nenhuma coisa senão o amor serão os teus frutos**.”

- Santo Agostinho

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy, por ter me dado a oportunidade de vir realizar este trabalho na Universidade de São Paulo, uma das melhores universidades brasileiras, mesmo não me conhecendo pessoalmente. Pela confiança, disponibilidade, amizade que construímos durante esses anos e pelo exemplo de pesquisador dedicado e apaixonado pela botânica.

À Prof. Dra. Eliane Romanato Santarém e ao Prof. Dr. Leandro Astarita, por terem guiado meus passos inicias na pesquisa, me aceitando como estudante de iniciação científica. Por terem me acolhido como membro da “família” do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Nunca me esquecerei desses anos de convívio, aprendizado e amizade.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi, que sempre se demonstrou disponível para ajudar-me, mesmo eu não sendo seu aluno direto. Pelas ideias valiosas que me deu para incrementar e solucionar algumas dificuldades encontradas neste experimento. Por saber que sempre poderei contar com sua ajuda, agradeço.

Ao Prof. Dr. Eduardo Purgatto, por fazer tudo que estava a seu alcance para permitir o desenvolvimento deste projeto e por ter tido paciência em receber-me em seu laboratório muitas vezes ao longo destes anos.

À Prof. Dra. Helenice Mercier, por seu exemplo de profissionalismo, serenidade e dedicação aos alunos.

À amiga, conselheira, tutora e colega de profissão Lia Chaer, por ter tido paciência em me ensinar tudo que eu precisava aprender sobre o laboratório quando cheguei. Por me auxiliar em meus experimentos e dar ótimas dicas para desenvolvê-los da melhor forma possível. Por ter sido muito mais que colega, uma amiga. Sem sua ajuda, também não teria conseguido. Conte comigo sempre.

A todos os meus colegas de laboratório. Por todas as conversas, risadas, almoços, lanches, jantas, jogos e passeios, momentos que tornaram essa caminhada muito mais agradável e descontraída. Pelas críticas construtivas e por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso.

À Ana Maria, que muitas vezes interrompeu tudo que estava fazendo para me ajudar no que eu precisasse, sempre muito disposta e disponível. Agradeço pelas conversas e amizade construída.

Ao meu pai, meu exemplo, meu guia, meu conselheiro profissional e pessoal. Por ser esse homem cheio de qualidades e com um coração do tamanho do mundo. Por ser um pai exemplar e batalhador. Por estar sempre disponível para me ouvir, mesmo sempre tão cheio de coisas para fazer e resolver. Por sempre me incentivar a crescer e expandir meus horizontes. Por me amar acima de tudo, agradeço.

À minha mãe, a melhor mãe do mundo. Por ser essa pessoa maravilhosa, justa, verdadeira, piedosa, carinhosa e possuir um coração imenso. Por ser exemplo pessoal e profissional como educadora. Por acreditar em um futuro melhor. Por estar sempre ao meu lado. Por ser minha amiga. Por ter abdicado de momentos seus para me educar e cuidar. Por fazer de tudo para me agradar. Por me amar acima de tudo, agradeço.

Ao meu irmão, meu melhor amigo. Por me ouvir e me dar conselhos valiosos. Por colocar minha cabeça no lugar quando estou perdido. Por se preocupar comigo. Estar sempre ao meu lado. Por me incentivar a seguir a carreira que escolhi. Por ser essa pessoa que sei que posso contar sempre. Obrigado.

Ao André, por acreditar em mim e me mostrar o potencial que tenho, mesmo quando muitas vezes eu mesmo não consigo ver. Por me ajudar a crescer tanto pessoalmente, quanto profissionalmente. Por estar sempre ao meu lado. Pelo exemplo de profissional apaixonado pelo o que faz.

À Viviane, por sempre me apoiar e me incentivar a seguir em frente profissionalmente. Por ser exemplo de pessoa dedicada, competente e carismática que é. Por dispor algumas horas do seu dia para me ajudar.

Ao Clébio, que chegou há tão pouco tempo, mas que já conquistou seu espaço em nossos corações. Por sempre estar disposto a me ouvir, me aconselhar e me ajudar a ponderar nos momentos de inquietude.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que não puderam ser nomeados, mas que, no entanto, estiveram comigo durantes esses anos, me apoiando e torcendo pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

# Índice

**I. Introdução.....01**

I.1 Família Orchidaceae.....01

I.2 *Dendrobium* “Second Love”.....02

I.3 Cultura de tecidos.....04

I.4 Organogênese.....05

I.5 Meristemas.....06

I.6 Luz no desenvolvimento vegetal.....08

I.7 *Catasetum fimbriatum* como modelo de estudo.....09

I.8 Giberelina.....10

I.9 Etileno.....12

I.10 Óxido nítrico.....14

I.11 Gás carbônico.....17

**II. Objetivos.....19**

**III. Material e métodos.....20**

III.1 Tratamentos *Dendrobium*.....20

III.2 Quantificação de etileno.....23

III.3 Quantificação de $CO_2$.....24

III.4 Incubação no escuro e na penumbra.....25

III.7 Condições de incubação.....25

III.8 Parâmetros biométricos.....26

III.9 Análise estatística dos dados.....27

**IV. Resultados.....28**

IV.1 Efeito do escuro e da renovação do ar interno dos frascos por ar sintético sobre o alongamento caulinar e na emissão de etileno e $CO_2$.....28

IV.2 Efeitos da giberelina e do paclobutrazol sobre o alongamento caulinar e as emissão de etileno e de $CO_2$.....34

IV.3 Efeitos do etileno sobre o alongamento caulinar e as emissão de etileno e de $CO_2$.....42

IV.4 Efeitos do óxido nítrico sobre o alongamento caulinar e as emissão de etileno e de $CO_2$.....50

IV.5 Comparação ente os efeito do escuro e da penumbra sobre desenvolvimento de gemas laterais.....56

**V. Discussão.....58**

**VI. Conclusão.....73**

**Resumo.....74**

***Abstract*.....77**

**Anexos.....80**

**Referências bibliográficas.....85**

# I. Introdução

## I.1 Família Orchidaceae

Entre as plantas superiores, a família Orchidaceae é a maior e mais diversificada, sendo constituída por mais de 800 gêneros, 25 mil espécies e mais de 30 mil híbridos (Hew e Young, 1997; Blanchard e Runkle, 2006).

As plantas desta família podem ser encontradas em praticamente todas as regiões do mundo, salvos os polos e desertos. Sua distribuição se dá principalmente nos trópicos, onde predominam as formas epífitas e rupícolas, ao passo que em regiões de clima temperado, as formas terrícolas são predominantes (Kerbauy, 1995). Em função desta vasta distribuição, as orquídeas apresentam diferentes necessidades adaptativas, refletindo tanto na sua diversidade estrutural e morfológica, quanto fisiológica (Vaz e Kerbauy, 2007).

Na natureza, as orquídeas propagam-se por meio da dispersão de sementes ou por brotamento lateral. Apesar de produzirem muitas sementes, estas são diminutas e desprovidas de endosperma, o que dificulta sua germinação. Dessa forma, é necessária a associação com fungos micorrizicos que promovem a germinação das sementes, posto que estes fornecem elementos nutritivos essenciais para o desenvolvimento do embrião (Arditti *et al*., 1982). No entanto, mesmo com a suplementação proveniente do fungo, apenas entre 2% a 5% das sementes chegam a germinar em ambiente natural (Rao, 1997).

As orquídeas apresentam desenvolvimento demasiadamente lento quando comparadas às plantas de outras famílias, podendo levar, em alguns casos, mais de 8 anos para atingir a idade reprodutiva. Somando-se a dificuldade de

germinação, o desenvolvimento lento e os elevados graus de extrativismo e desmatamento, cria-se um quadro preocupante para as espécies de Orchidaceae, muitas das quais já extintas ou em processo de extinção.

### I.2 *Dendrobium* "Second Love"

O gênero *Dendrobium* é altamente evoluído e diversificado entre as orquídeas, compreendendo mais de 1.100 espécies (Yin e Hong, 2009). Sua distribuição se dá principalmente na Ásia e Austrália (Xu *et al*., 2011).

Ao longo da evolução, foram selecionados caracteres adaptativos que permitiram sua sobrevivência em ambientes terrícolas e epifíticos, pois estas se encontravam sujeitas a fragmentação e deterioração de seus ecossistemas naturais (Xue *et al*., 2010).

Mais de 45 espécies deste gênero são conhecidas e afamadas em países como a China por possuírem potencial terapêutico (Sha e Luo, 1980; Ma *et al*., 1995; Liu *et al*., 2009; Yuan *et al*., 2009). Um de seus principais usos é em uma infusão conhecida como "Shihu" (Yang *et al*., 2006), muito popular em tratamentos oftalmológicos. Estudos recentes demonstraram que as plantas de *Dendrobium* possuem efeitos anti-oxidantes (Luo *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2007), imuno-estimulatórios (Wang *et al*., 2010; Zha *et al*., 2007), anti-tumorais (Wang *et al*., 2010; Uma *et al*., 2009) e anti-hiperglicêmicos (Zhao *et al*., 2007).

Além do uso farmacêutico, as plantas de *Dendrobium* estão entre as mais populares dentre as orquídeas utilizadas na ornamentação e produção comercial de flores e plantas envasadas (Chen e Tsi, 2000). Por possuírem elevada relevância na indústria farmacêutica e ornamental, as plantas de *Dendrobium* estão sujeitas a exploração excessiva (Xue *et al*., 2010), fato este que conduziu

diversos pesquisadores a estudar e desenvolver novas técnicas de cultura de tecidos para este gênero (Arditti e Ernest, 1993; Ferreira, 2003; Martin e Madassery, 2006).

Segundo Gerhardt (2002), diversos híbridos de *Dendrobium* ganharam relevância no cenário comercial brasileiro nos últimos anos; no entanto, a multiplicação lenta e dispendiosa destas plantas são levadas em consideração por parte dos produtores nacionais, que tendem a buscar plantas comercialmente mais viáveis.

O híbrido *Dendrobium* "Second Love" é caracterizado por possuir pseudobulbos eretos e flores se formando na metade superior de pseudobulbos maduros. Este híbrido possui folhas verde-brilhantes de formato elíptico, podendo atingir até 15 centímetros de comprimento. As pétalas e sépalas possuem seu ápice tingido de rosa, e ao centro do labelo é possível verificar uma coloração amarelada (Ferreira, 2003).

O método de propagação mais utilizado por produtores de *Dendrobium* é o sexuado, sendo a propagação vegetativa utilizada em menor escala (Ferreira, 2003). Ambos os métodos são lentos e consequentemente podem não ser suficientes para suprir a demanda comercial desta planta. Segundo relatos de reconhecidos produtores de plantas de *Dendrobium* do grupo *nobile*, do qual faz parte o híbrido *D.* "Second Love", uma das sérias limitações no emprego da técnica convencional de micropropagação desta orquídea, ou seja, por meio de PLBs, tem sido a elevada frequência de variantes somaclonais. Tais fatos, evidenciam a importância e a urgência da realização de estudos e desenvolvimento de protocolos diferenciados para a micropropagação do referido gênero.

### I.3 Cultura de tecidos

O método de germinação assimbiótica de orquídeas foi desenvolvido em 1921 por Lewis Knudson, o qual facilitou a multiplicação sexuada e a realização de cruzamentos complexos com a obtenção de plantas híbridas. O advento da germinação de orquídeas *in vitro* abriu perspectivas para o início do desenvolvimento da cultura de tecidos (mais tarde cunhada de micropropagação), o que permitiu a manutenção dos ganhos genéticos em proporções até então desconhecidas (Torres *et al.,* 1998).

Em 1960, o virologista Georges Morel, objetivando eliminar vírus em plantas de *Cymbidium*, isolou o ápice caulinar da planta e o inoculou em meio de cultura. No entanto, ele descobriu quase que por acaso, que os tecidos meristemáticos de orquídeas apresentavam potencial regenerativo. Estruturas semelhantes a protocormos de sementes germinadas ou “protocorm-like-bodies” (PLBs) foram formados, as quais posteriormente davam origem à novas estruturas idênticas a anterior.

A cultura de tecidos vem sendo utilizada desde então com diferentes intuitos: elevar a taxa de multiplicação de plantas com desenvolvimento lento, cruzamentos para obtenção de híbridos, eliminação de patógenos, redução de custos, obtenção de plantas ornamentais com características valorizadas e programação de produção ao longo do ano (Vuylsteke e Ortiz, 1996; Souza *et al*., 1998; Kerbauy, 2004).

Com a técnica de micropropagação, plantas sadias podem ser clonadas com o benefício da manutenção genética, em tempo reduzido e sem a

necessidade de um grande espaço físico. Isto facilita a multiplicação de muitas espécies (Grattapaglia e Machado, 1998), limita o extrativismo e promove a perpetuação de plantas em seu ambiente natural.

### I.4 Organogênese

A técnica da cultura de tecidos possibilitou o estudo da organogênese *in vitro*, por meio do emprego de diferentes tipos explantes, tais como os ápices meristemáticos caulinares e radiculares, segmentos caulinares, gemas axilares e outros (Ferreira, 2006).

Na sua expressão mais simples, a organogênese vegetal diz respeito a formação de órgãos a partir de células somáticas diversas (Carvalho, 2003). Este processo possibilita o estudo dos mecanismos reguladores envolvidos no desenvolvimento vegetal (Hicks, 1994).

O processo organogenético é altamente complexo, pois está dividido em diversas fases que divergem entre si tanto do ponto de vista molecular, quanto do fisiológico (Sugiyama, 1999). A partir de estudos realizados com folhas de *Convolvulus arvensis*, Christianson e Warnick (1985) dividiram o processo de organogênese em seis etapas: desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e regeneração ou formação de órgãos.

Seguindo a subdivisão citada acima, os explantes utilizados para os experimentos necessitariam passar por um processo de desdiferenciação para ganho de competência, possibilitando a formação de um novo órgão. Este seria desencadeado por tratamentos com reguladores de crescimento (auxina e citocinina). Originando uma massa celular pouco diferenciada, denominada calo (Christianson e Warnick, 1988). A utilização de hormônios neste processo é

essencial à multiplicação. Sua relevância insofismável é refletida nas variações de respostas obtidas conforme as concentrações hormonais aplicadas e nos teores hormonais endógenos (Gaspar *et al*., 1996). As células do calo, após induzidas por sinais específicos, irão adquirir competência tornando-se determinadas para uma rota de desenvolvimento. Posteriormente estas células, já diferenciadas, irão formar um novo órgão (Christianson e Warnick, 1988).

Em alguns casos, o explante que será utilizado não precisa passar pela fase de desdiferenciação (formação de calos) para adquirir competência, processo esse intitulado de organogênese direta. Os tecidos meristemáticos que já possuem competência organogênica intrínseca além de serem mais organizados, apresentam maior estabilidade genética (D'Amato, 1977; Ferreira *et al*., 2006; Pescador *et al*., 2008).

### I.5 Meristemas

As plantas mantêm a capacidade de gerar novos tecidos de maneira recorrente ao longo da vida, podendo formar novos órgãos de acordo com os estímulos recebidos (Srivastava, 2002; Vernoux e Benfey 2005). Esta plasticidade fisiológica e morfológica parece decorrer do fato das plantas serem organismos sésseis e altamente sensíveis às variações ambientais e a predadores (Birnbaum e Alvarado 2008; Dinneny e Benfey 2008). Os tecidos responsáveis por conferir tal plasticidade evolutiva são os meristemas.

Os tecidos meristemáticos são aqueles que, por definição, mantém características de tecidos embrionários (Fosket, 1994) e suas células se dividem de forma organizada (Lyndon, 1990). Eles são considerados pluripotentes e

competentes para o desenvolvimento de novas células, tecidos e órgãos (Singh e Bhalla, 2006; Verdeil *et al*., 2007).

O estabelecimento das regiões onde serão localizados os tecidos meristemáticos ocorre em estágios precoces do desenvolvimento embrionário, sendo considerada uma etapa decisiva para o desenvolvimento (Wareing, 1982), apresentando papel primordial na determinação da arquitetura da planta e permitindo a formação de tecidos e órgãos ao longo de todo o ciclo de vida (Weigel e Jurgens, 2002). No entanto, os meristemas não contribuem para a formação do embrião, pois são ativados apenas após a germinação da semente (Doerner, 2003).

O meristema apical caulinar (MAC) provê as células que irão compor os tecidos e órgãos da parte aérea do vegetal, tais como ramos, folhas e verticilos florais (Reddy, 2008). Enquanto que, a atividade contínua do meristema apical radicular, irá resultar em um crescimento longitudinal das raízes já existentes e no desenvolvimento de novas raízes (Nakajima *et al.*, 2001).

O MAC possui estrutura muito semelhante entre as dicotiledôneas, sendo basicamente constituído por três camadas celulares identificadas como camada 1, 2 e 3 (Doerner, 2003), e um centro de divisões celulares muito lentas, compartilhado entre as camadas. Esta baixa atividade parece estar relacionada com a prevenção de mutações genéticas (Furner e Pumfrey, 1992; Woodrick *et al.*, 2000; Irish e Sussex, 1992).

Quanto ao meristema radicular, este apresenta uma organização radial fundamentalmente similar a do meristema apical caulinar (Doerner, 2003). No

entanto, células pluripotentes envolvem o centro quiescente para impedir que as células meristemáticas se diferenciem (van den Berg *et al.*, 1997).

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

Os meristemas podem alterar sua atividade de acordo com os sinais provenientes do meio, de modo a flexibilizar suas respostas à fatores externos. Estes sinais são transduzidos por vias dependentes de fatores proteicos, hormonais e de mensageiros secundários (Shinozaki e Dennis, 2003).

### I.6 Luz no desenvolvimento vegetal

Os vegetais, além de utilizarem a luz como fonte de energia na fotossíntese, possuem a habilidade de perceber seus gradientes e sua composição espectral. A percepção do sinal proveniente da luz gera alterações morfológicas e estruturais, como fototropismo, fotonastias e fotomorfogênese (Majerowicz e Peres, 2004).

A presença ou ausência de luz, sua qualidade e intensidade, assim como o fotoperíodo exercem papel fundamental no desenvolvimento vegetal ao longo do ano, já que estes propiciam informações climáticas e ambientais de extrema importância à planta (Von Arnim e Deng, 1996).

As plantas, quando submetidas à ausência de luz, apresentam características fenotípicas diferentes, aalgumas vezes até opostas, àquelas

quando sob incidência luminosa. As folhas e caule alongam-se rapidamente, dando origem a entrenós alongados e esbranquiçados resultantes da perda de pigmentação clorofílica (Chory *et al*., 1996; Clouse, 2001; Suzuki *et al*. 2004). Nas plântulas, o gancho plumular persiste por mais tempo, os cotilédones permanecem dobrados e há uma redução no tamanho das folhas e nos proplastídios (Raven *et al*, 1996).

Outras características próprias às plantas estioladas referem-se à reduzida lignificação e suberificação das células, fazendo com que as paredes celulares sejam mais delgadas (Bassuk e Maynard, 1987). Tal característica traz vantagens para a micropropagação de plantas estioladas, posto que a redução na lignificação e suberização auxiliam no desenvolvimento de segmentos nodais quando isolados *in vitro*, como no caso do enraizamento que se torna facilitado devido à diminuição das barreiras mecânicas no tecido caulinar (Bassuk e Maynard, 1987).

Os segmentos nodais de caules estiolados representam, portanto, uma alternativa válida para fins de micropropagação de plantas *com* crescimento lento, como no caso das orquídeas epífitas em geral, dentre as quais incluem-se as espécies de *Catasetum* (Kerbauy *et al*., 1995) e *Dendrobium* (Cruz, 2009), ou até mesmo de plantas não-orquidáceas de crescimento rápido como alfafa (Dudits *et al*., 1991) e tabaco (Maliga *et al*., 1975).

### I.7 *Catasetum* como modelo de estudo

*Catasetum fimbriatum* vem sendo utilizado como planta modelo para estudos em nosso laboratório há mais de 20 anos. Este gênero da família Orchidaceae é representado por mais de 100 espécies e possuí características peculiares que as difere de outros vegetais (Lacerda, 1995).

Além de apresentar um crescimento relativamente vigoroso, seus meristemas, tanto apicais quanto radiculares, possuem características interessantes para o estudo da morfogênese vegetal. Estudos realizados por Kerbauy (1984) mostraram que os ápices radiculares isolados possuíam a capacidade de se converter em ápices caulinares quando em meio de cultura, sem a necessidade da adição de reguladores hormonais vegetais.

As plantas de C. *fimbriatum*, quando incubadas *in vitro* sob ausência de luz e de reguladores de crescimento, possuem outra característica que as difere das demais. Quando nesta condição, a atividade meristemática apical é retomada rapidamente, dando origem a caules estiolados aclorofilados com folhas extremamente reduzidas e entrenós alongados, por período indeterminado. Posteriormente, estes nós, contendo uma gema lateral cada, são isolados e inoculados à luz, originando uma planta completa rapidamente (Kerbauy *et al*., 1995).

Desta maneira a obtenção de material vegetal se dá de forma, rápida, dispendiosa e relativamente simples, tornando este gênero de orquídea excelente para o estudo de processos fisiológicos e de desenvolvimento.

### I.8 Giberelina

As giberelinas (GA) foram descobertas a partir de metabólitos provenientes do fungo *Gibberella fujikuroi* (Phinney, 1983) e, em 1958, sua ocorrência em plantas foi confirmada após a identificação de GA1 em sementes de feijão (MacMillan e Suter, 1958). Atualmente, são conhecidos 136 tipos diferentes de giberelinas, algumas delas isoladas de vegetais, outras produzidas por micro-

organismos ou obtidas sinteticamente (Jefferys, 1970; Blake *et al*., 2000; Hedden e Phillips, 2000; Bömke e Tudzynski, 2009).

A biossíntese de giberelinas ocorre principalmente em gemas apicais, folhas e entrenós jovens e ativos (Taiz e Zeiger, 2009). No entanto, folhas maduras também podem sintetizá-las (Silverstone *et al*., 1997). Seu transporte para as outras partes da planta se dá via floema (Eriksson *et al*., 2006).

As giberelinas constituem uma família de hormônios vegetais caracterizada por possuir 20 átomos de carbono (diterpenos tetracíclicos) e por estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal. Quanto ao desenvolvimento vegetal, destacam-se seus efeitos na germinação de sementes (Koornneef e Van der Veen, 1980; Yamauchi *et al*., 2004; Seo *et al*., 2009), no alongamento caulinar e expansão foliar em resposta à luz ou escuro (Ogawa *et al*., 2003; Alabadí *et al*., 2008; Feng *et al*., 2008; de Lucas *et al*., 2008; Gallego-Bartolomé *et al*., 2011), na indução à floração (Davies, 1995) e no desenvolvimento dos frutos (Matsuoka, 2003).

Dentre os efeitos deste fitormônio no desenvolvimento, um dos mais relevantes é certamente sobre o crescimento caulinar. Ele possui uma capacidade singular entre os demais hormônios vegetais em promover o crescimento em plantas geneticamente anãs e em roseta (Kerbauy *et al*., 1995). Associado ao expressivo alongamento do caule ocorre a redução de sua espessura, além da produção de folhas menores e com coloração mais clara (Taiz e Zeiger, 2009). Em trabalhos relativamente recentes, foi verificado que o tratamento de caules estiolados de *Catasetum fimbriatum* com paclobutrazol (um eficiente inibidor biossíntese da giberelina) resultam em uma profunda inibição do alongamento (Suzuki *et al*., 2004).

A transdução de sinal das giberelinas está envolvida com a modulação da estabilidade e/ou atividade das proteínas DELLA, as quais atuam como reguladores transcricionais negativos deste hormônio vegetal (Zentella *et al*., 2007). A ligação do GA com seu receptor GID1 faz com que o mesmo interaja com as proteínas DELLA marcando-as para a sua degradação via proteossomo 26S (Sun, 2010; Ueguchi-Tanaka *et al*., 2005; Ueguchi-Tanaka *et al*., 2008). Após a degradação das proteínas DELLA, os genes de resposta ao GA podem ser transcritos (Sasaki *et al*, 2003; Gomi *et al*. 2004).

Outra hipótese defendida por Feng *et al*. (2008) diz que na ausência de GA, as proteínas DELLA interagiriam com fatores de interação do fitocromo 3 (PIF3), impedindo-os de se ligarem ao gene alvo para a promoção do alongamento do hipocótilo pela luz. Na presença de GA, o GID1 (receptor de GA) elevaria sua interação com as proteínas DELLA no núcleo e promoveria a ubiquitinação das mesmas e posterior degradação via proteossomo 26S, o que liberaria o PIF3 do seu controle negativo e promoveria as respostas de alongamento pela luz.

Mesmo não conhecendo-se detalhadamente o mecanismo de ação das proteínas DELLA sobre a inibição dos genes de resposta às giberelinas, sabe-se atualmente que estas estão intimamente conectadas a outro fitormônio de grande relevância, o etileno. Este hormônio vegetal atua promovendo a estabilidade das proteínas DELLA (Achard *et al*. 2003).

### I.9 Etileno

Sendo um hidrocarboneto relativamente simples, o etileno ($C_2H_4$) é um fitormônio gasoso sintetizado em taxas reduzidas em quase todos os tecidos vegetais (Abeles *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2002; Tsuchisaka

*et al.*, 2004). Sob condições estressantes sua produção é intensificada (Abeles, 1992), o que é de extrema importância em diversos processos do desenvolvimento vegetal (Kieber e Ecker, 1993).

A biossíntese de etileno se dá a partir da metionina via S-adenosil-L-metionina (AdoMet) e do aminoácido cíclico não proteico 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Adams e Yang, 1979). As enzimas catalíticas que realizam a conversão do AdoMet à ACC, e do ACC à etileno, são respectivamente a ACC sintase e ACC oxidase (Kende, 1998).

Efeitos diversos do etileno têm sido descritos no controle do desenvolvimento de plantas (Colli e Purgatto, 2008), entre eles: a inibição da atividade do meristema apical caulinar (Cary *et al*., 1995) e da divisão celular (Kazama *et al*., 2004); alterações no balanço de outros hormônios (Peres *et al*., 1999), na senescência e amadurecimento de frutos (Abeles, *et al.* 1992; Wang, *et al*., 2002; Schaller, 2002), no desenvolvimento inicial das plântulas e cotilédones (Yoo *et al*., 2009), na promoção ou inibição da floração, e na iniciação de raízes e inibição de bulbos ou tubérculos (Schaller, 2012).

Abeles *et al*. em 1992, descreveu o efeito do etileno sobre o crescimento caulinar de plantas terrestres denominando-o de tríplice resposta. Ele observou que o etileno atua sobre o crescimento caulinar dos vegetais reduzindo o alongamento, promovendo o crescimento radial e aumentando o número de ramificações laterais do caule.

Em plântulas, as respostas promovidas pelo etileno são contrárias às resultantes da incidência luminosa, inibindo o estímulo da luz na expansão foliar e

no crescimento do hipocótilo, e promovendo a manutenção do gancho plumular (Goeschl *et al*., 1967).

Por outro lado, estudos descreveram um efeito promotor deste hormônio vegetal no alongamento caulinar em algumas espécies vegetais (Raskin e Kende 1984; Jackson 1985; Rijnders *et al*., 1997), principalmente em plantas semi aquáticas como o arroz (Bleecker e Kende, 2000). O alongamento dos entrenós de arroz em culturas de imersão é promovido pela ação conjunta do etileno com as giberelinas (Sauter *et al*., 1995).

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

Com a descoberta do 1-metilciclopropeno (1-MCP) como inibidor da ação do etileno, muitos estudos têm sido desenvolvidos para tentar entender sua ação, aplicação e efeitos sobre a inibição deste hormônio vegetal. O 1-MCP, possui efeitos variados sobre a respiração, produção de substâncias voláteis, degradação da clorofila e até mesmo na biossíntese de etileno através de um “feedback” negativo (Bleecker e Kende, 2000).

O 1-metilciclopropeno reduz a percepção do etileno através da ligação preferencial que ele realiza com os próprios receptores de etileno (Blankenship e Dole, 2003). Para que o etileno volte a ser “percebido” pela planta, novos receptores devem ser sintetizados (Sisler e Serek, 2003).

**I.10 Óxido Nítrico**

O óxido nítrico (NO) é um radical livre conhecido por sua atuação como mensageiro secundário em respostas fisiológicas em animais (Moilanen e Vapaatalo, 1995). Em vegetais, seu efeito já havia sido observado desde o final da década de 70 (Klepper, 1979), porém acreditava-se que sua produção se restringisse à aplicação de herbicidas ou em resposta a poluentes atmosféricos. Somente em 1997 foi comprovada sua biossíntese em várias espécies vegetais (Wildt *et al.,* 1997).

O óxido nítrico endógeno pode ser sintetizado por rotas enzimáticas ou não enzimáticas, envolvendo a nitrato redutase (NR) ou a enzima sintase do óxido nítrico (NOS), que é a principal fonte de NO em animais (Liu *et al.*, 2010).

Pesquisas recentes confirmaram o envolvimento desta molécula em processos fisiológicos de plantas (Leshem e Haramaty, 1996). O NO pode atuar em processos relacionados ao metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal, como, por exemplo, na germinação de sementes, síntese de clorofila, estiolamento caulinar (Beligni e Lamattina, 2000; Zhang *et al*., 2006), expansão foliar e radicular (Gouvea *et al*., 1997; Leshem e Haramaty, 1996; Zhao *et al*., 2007), desenvolvimento de raízes adventíceas (Pagnussat *et al*., 2002, 2003, 2004), atraso da senescência (Leshem e Haramaty, 1996; Mishina *et al*., 2007), morte celular programada (Magalhães *et al*., 1999; Pedroso *et al*., 2000), expressão de genes de defesa contra patógenos (Durner *et al*., 1998; Grün *et al*., 2006), fechamento estomático (Garcia-Mata e Lamattina, 2001, 2002, 2003; Neill *et al*., 2008), floração (He *et al*., 2004), divisão celular (Otvos *et al*.,2005), entre outros.

O NO é um radical livre conhecido por ter um tempo de meia-vida relativamente longo em sistemas biológicos, sobretudo em baixas concentrações

(Lamattina *et al*. 2003; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). Devido ao seu tamanho diminuto, ele é altamente difusível pelas células, tanto no citosol quanto através de membranas (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). Ainda não se sabe ao certo se o NO possui um receptor específico; no entanto, graças a alta reatividade e a capacidade que esta molécula possui em interagir e modificar uma grande variedade de proteínas levanta-se a hipótese, de que existam vários sensores de sua presença (Neill *et al.,* 2008).

Muitas dúvidas ainda permanecem quanto ao seu papel em plantas. Alguns pesquisadores consideram a possibilidade do NO ser um novo hormônio vegetal, posto que atua de maneira dose-dependente e é produzido em pequenas concentrações, podendo atuar como sinalizador em zonas distantes daquela onde foi produzido. Seu transporte quando a curta distância pode ser feito por difusão, ou quando a longa, através da ligação reversível com a glutationa, formando a S-nitrosoglutationa (Beligni e Lamattina, 2001; Leitner *et al*., 2009).

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

Estudos realizados com plantas de trigo crescidas no escuro mostraram que os tratamentos com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, aumentavam o conteúdo de clorofila em relação às plantas controle. Em plantas de alface e *Arabidopsis* tratadas com SNP, foi observada a inibição no alongamento

do hipocótilo na ausência de luz, evidenciando a atuação do NO na prevenção do estiolamento (Beligni e Lamattina 2000).

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

Apesar de sua importância, ainda são poucos os trabalhos sobre a sinalização promovida pelo NO em vegetais quando comparados às inúmeras publicações relacionadas à ação dessa molécula em animais (Neill *et al*., 2008). No entanto, pesquisas nesta área vêm crescendo significativamente a fim de demonstrar o envolvimento desta molécula sinalizadora nos processos fisiológicos nos vegetais. Mesmo assim, muitos estudos ainda são necessários para ampliar nosso conhecimento no que tange à interação de NO e plantas (Wilson *et al*., 2008).

### I.11 Gás carbônico

O dióxido de carbono ($CO_2$) é um gás composto por dois átomos de oxigênio ligados covalentemente a um de carbono. Segundo Thoning *et al*. (1989), as concentrações atmosféricas de $CO_2$ podem variar naturalmente ao longo das estações.

Acredita-se que este gás exerça papel importante sobre o aquecimento global (efeito estufa), processo que inibe a perda de calor provenientes dos raios solares quando atingem a atmosfera terrestre (Bolin e Doos, 1989).

A emissão de $CO_2$ pelo processo de combustão aumentou drasticamente após a revolução industrial: esta passou de 280 mmol mol ± 1 para 365 mmol mol ± 1 e continua subindo, aproximadamente 1,8 mmol mol ± 1 a cada ano (Mendelsohn & Rosenberg 1994). As projeções para as concentrações de $CO_2$ para a metade e fim deste século são, respectivamente, de 550 e 700 mmol mol ± 1 (Prentice *et al*., 2001) e as concentrações atuais deste gás são as maiores que a Terra já vivenciou nos últimos 800 mil anos (Lüthi *et al*., 2008).

Plantas submetidas à altas concentrações de $CO_2$ muitas vezes têm seu crescimento promovido, além de apresentarem uma melhoria da utilização do uso da água (Rogers e Dahlman 1993; Allen e Amthor 1995; Wittwer 1995), e um aumento nas taxas fotossintéticas (Long e Drake 1992; Amthor 1995).

O cultivo de plantas em frascos vedados pode elevar as concentrações de $CO_2$ no interior destes, mesmo com o ar interno sendo renovado semanalmente. Sua interação com hormônios vegetais, assim como com óxido nítrico, ainda não são bem conhecidas.

# II. Objetivos

Visando obter uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no controle do estiolamento de plantas de *Dendrobium* (Orchidaceae), procurou-se verificar os efeitos do escuro e dos hormônios etileno e giberelina, bem como do radical livre óxido nítrico e gás carbônico, no desenvolvimento vegetativo dessas plantas sob condições *in vitro*, particularmente da manutenção prolongada da atividade meristemática apical caulinar (estiolamento) e da quebra da dominância apical, conforme bem estabelecido neste laboratório para plantas de *Catasetum* sp e gêneros afins. Com isto, estar-se-ia produzindo subsídios importantes para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação a um só tempo simples, de baixo custo e seguro quanto a estabilidade genética das plantas produzidas.

# III. Material e Métodos

## III.1 *Tratamentos Dendrobium*

Plantas de *Dendrobium* “Second Love” (grupo nobile) foram obtidas de nosso estoque de germoplasma mantido sob condições *in vitro*. Para tanto, as plantas foram inoculadas em 30 ml de meio de cultura USP, rotineiramente utilizado neste laboratório, constituído por 0,165 g/L de (NH4)2SO4; 0, 6 g/L de Ca(NO3)2; 0,9 g/L de KNO3; 0,275 g/L de CaCl2; 0,435 g/L de KH2PO4; 0,442 g/L de K2SO4; 0,250 g/L de MgSO4; 10 ml/L de micronutrientes do meio de Murashige e Skoog (MS); 1 g/L de peptona de soja; 0,001 g/L de tiamina; 0,1 g/L de mioinositol; 20 ml/L de Fe-EDTA e 20 g/L de sacarose em frascos de 250 ml de volume.

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

Para evitar a manipulação excessiva dos caules e a oxidação dos tecidos causada por cortes sucessivos, foram inoculados segmentos caulinares que tiveram apenas o ápice excisado (Figura 1). Dessa forma, foram mantidas as gemas laterais e a dominância apical foi quebrada ao retirar o centro majoritário de síntese de auxina, localizado no meristema apical caulinar, e que seria transportada basipetamente (Taiz e Zeiger, 2009).

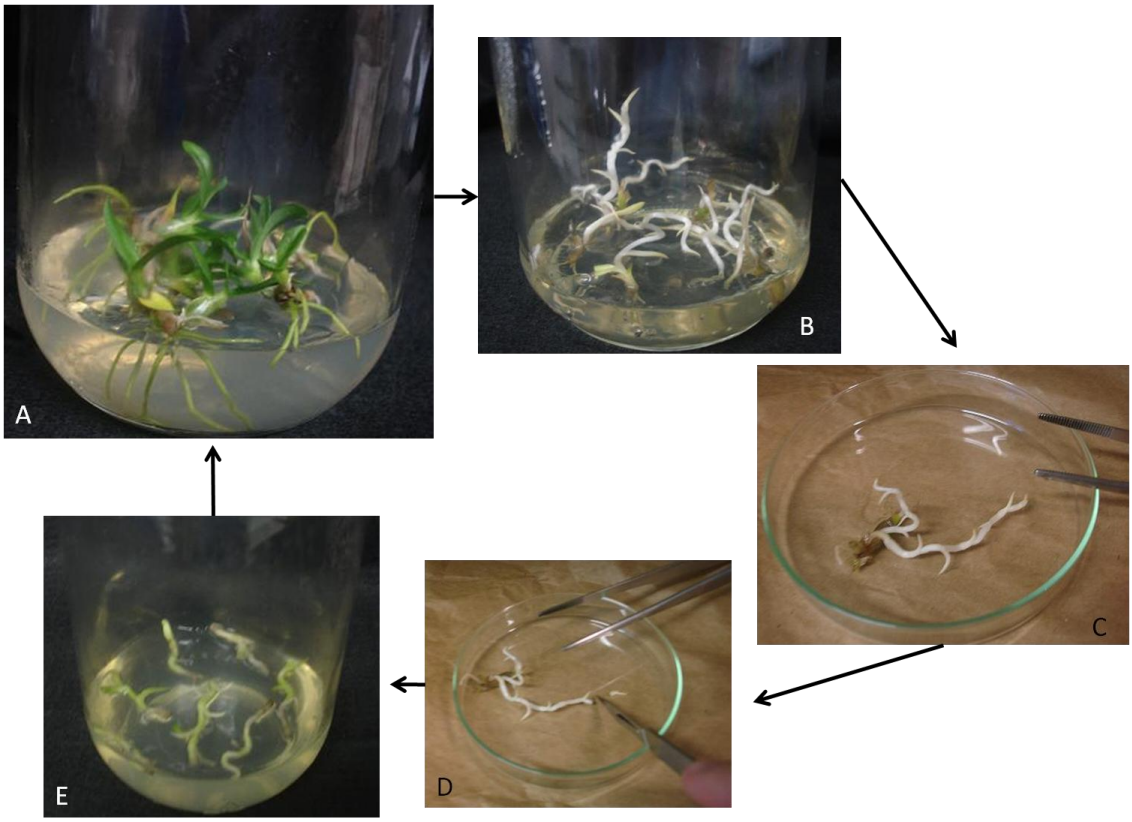



Figura 1. Esquema ilustrativo da micropropagação de *Dendrobium* “Second Love” por meio da utilização de segmentos caulinares estiolados com ápices isolados. (A) 90 dias no claro; (B) 120 dias no escuro; (C) Caules estiolados; (D) Excisão do ápice caulinar; (E) Estolões incubados no claro.

Após 120 dias de incubação no claro, as plantas obtidas segundo os procedimentos acima foram transferidas para o escuro e incubadas por 90 dias nos seguintes tratamentos: 5 e 50 µM de ácido giberélico (GA3); 5 e 50 µM de paclobutrazol – PA (inibidor de biossíntese de giberelinas); 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico (NO); 1 e 10 ppm de etileno; 100 ppm de 1-metilciclopropeno (1-MCP) - Smartfresh® (inibidor da ação do etileno). Também foram feitos mais dois tratamentos, nos quais as plantas foram mantidas apenas em meio de cultura USP nas seguintes condições: um deles foi mantido no escuro em frascos com rolhas perfuradas e preenchidas com algodão hidrófilo, facilitando assim as trocas gasosas com o meio externo (tratamento trocas gasosas); no outro as plantas

foram mantidas sob 50 $\mu mol.m^{-1}.s^{-2}$ de intensidade luminosa e fotoperíodo de 12h (tratamento claro). Por fim, para o tratamento controle, as plantas foram incubadas em frascos vedados e incubados no escuro, com substituição do ar interno por ar sintético (controle ar sintético), o qual era renovado semanalmente.

Tanto a giberelina quanto o paclobutrazol foram esterilizados juntos com o meio de cultura em autoclave a 120° C durante 15 minutos. O tratamento com 1-MCP foi preparado conforme as instruções indicadas pelo fabricante e injetado posteriormente no interior dos frascos com seringa e membrana ultrafiltrante de 0,45 µM de porosidade. Semanalmente as concentrações desejadas para os tratamentos gasosos (1 e 10 ppm de etileno, 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico e 100 ppm de 1-MCP) foram injetadas, afim de assegurar que elas se mantivessem constantes durante os três meses de experimento.

Com exceção dos materiais incubados sob fotoperíodo de 12 horas a 50 $\mu mol.m^{-1}.s^{-2}$ de intensidade luminosa (tratamento Claro), todos os demais tratamentos foram mantidos no escuro.

O ar no interior dos frascos foi renovado semanalmente com ar sintético por 45 segundos, exceto o do tratamento “trocas gasosas”, onde as trocas gasosas ocorreram por uma perfuração na tampa do frasco. O “controle ar sintético” foi submetido às mesmas condições de ausência de luz dos outros tratamentos, e a renovação do ar interno dos frascos foi feita com ar sintético comercial. O ar sintético utilizado era constituído por 20% de oxigênio e 1 ppm de monóxido de carbono + dióxido de carbono (Oxylumen do Brasil).

As injeções gasosas e a renovação do ar no interior dos frascos vedados foram feitas com seringas e membranas ultrafiltrantes de 0,45 µM de porosidade

previamente esterilizadas em autoclave. Para injetar os gases no interior dos frascos, foram adaptados septos de borracha aos frascos vedados (Figura 2). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, durante os 3 meses experimentais, totalizando 90 plantas por tratamento.

Figura 2. Esquema ilustrativo representando a troca de ar interno dos frascos, seta indica membrana ultrafiltrante de 0,45 µM de porosidade.

A cada trinta dias de incubação, as plantas foram analisadas em relação às modificações biométricas, massas fresca e seca, além dos teores emitidos de etileno e $CO_2$. O experimento foi conduzido pelo período total de noventa dias.

### III.2 Quantificação de etileno

A produção de etileno foi quantificada com base no método descrito por Purgatto *et al.* (2002) modificado. Para tanto, as plantas mantidas em frascos de 250 mL devidamente vedados, contendo dez plantas cada um, tiveram o ar interno renovado por ar sintético por 45 segundos dois dias antes da quantificação de etileno, de forma a eliminar os gases acumulados ao longo da semana e permitir o acúmulo de etileno para a leitura em cromatógrafo a gás (CG). Após o primeiro,

segundo e terceiro mês foram retiradas amostras de 10 mL do ar interno, utilizando para isto uma seringa de alta precisão (*gas tight*).

A amostra foi analisada em um cromatógrafo a gás (CG), da marca Hewlett-Packard (HP-6890). O conteúdo de etileno foi determinado por CG-FID (cromatografia gasosa - detector de ionização de chama), utilizando-se uma coluna HP-PlotQ (30m, I.D. 0.53mm, filme 6 µm) tendo hélio como gás condutor num fluxo de 1 mL/min. A injeção foi feita no modo “pulsed splitless” (20 psi por 2 minutos). O injetor e o detector foram mantidos a 250 ºC e a coluna isotermal a 30 ºC. Para a obtenção do padrão das curvas de calibração de etileno, utilizou-se uma amostra de 1 ppm de etileno. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### III.3 Quantificação de $CO_2$

A produção de $CO_2$ também foi quantificada com base no método descrito por Purgatto *et al.* (2002) modificado. Do mesmo modo que foram utilizados para quantificação de etileno, os frascos de 250 mL devidamente vedados, contendo dez plantas cada um, tiveram o ar interno renovado durante 45 segundos para eliminação dos gases acumulados na semana e, 48 horas após esta renovação, os teores de $CO_2$ emitidos pelas plantas foram mensurados. Após o primeiro, segundo e terceiro mês foram retiradas amostras de 1 mL do ar interno contido em cada frasco, utilizando para isso uma seringa de alta precisão (*gas tight*).

A amostra foi analisada em um cromatógrafo a gás (CG), da marca Hewlett-Packard (HP-6890). O conteúdo de $CO_2$ foi determinado, utilizando-se uma coluna HP-PlotQ (30m, I.D. 0.53mm, filme 6 µm) tendo hélio como gás condutor num fluxo de 4 mL/min. A injeção foi feita no modo “split” (50:1). O injetor e o detector foram mantidos a 250 ºC e a coluna isotermal a 30 ºC. Para a obtenção do padrão das

curvas de calibração de $CO_2$, utilizou-se uma amostra de 1 ppm de $CO_2$. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### III.4 Incubação no escuro e na penumbra

Plantas de *Dendrobium* com aproximadamente 120 dias de incubação no claro, obtidas segundo os parâmetros acima mencionados, foram submetidas a dois tratamentos distintos pelo período de 90 dias. No primeiro, as plantas foram mantidas na ausência total de luz, enquanto que, no segundo, foi feito um pequeno furo de aproximadamente 1 mm de diâmetro no papel alumínio que revestia o frasco, permitindo, assim, a entrada de um feixe de luz no seu interior. Este pequeno orifício no papel alumínio resultava em uma intensidade luminosa no interior do frasco de aproximadamente 0,02 ± 0,01 $\mu mol.m^{-1}.s^{-2}$. Em ambos os tratamentos, foram utilizados dois frascos com dez plantas cada. Os meios de cultura eram destituídos de hormônios e os frascos eram vedados e incubados sob fotoperíodo de 12h a 50 $\mu mol.m^{-1}.s^{-2}$ de intensidade luminosa e temperatura de 26 ± 1 ºC.

Neste experimento utilizou-se o meio de cultura USP básico, sem adição de hormônios, e todos os frascos encontravam-se vedados e incubados em sala de cultura na temperatura de 26 ± 1° C, sendo o segundo tratamento exposto a 12h de fotoperíodo sob 50 $\mu mol.m^{-1}.s^{-2}$ de intensidade luminosa.

### III.5 Condições de incubação

As plantas de *Dendrobium* “Second Love” foram mantidas por 90 dias em meio de cultura basal nos diferentes tratamentos, sob ausência de luz e à temperatura constante de 26 ± 1 ºC. Foram utilizados frascos hermeticamente vedados com volume de 250 ml e tampas apresentando septos de borracha

adaptados. A rosca das tampas foi envolvida em filme plástico, de forma a inibir qualquer troca gasosa com o meio externo. Os tratamentos que exigiam ausência de luz tiveram seus frascos envolvidos por folhas de papel alumínio e foram mantidos em armários climatizados no interior da sala de cultura.

Semanalmente os frascos tiveram seu ar interno renovado por ar sintético durante 45 segundos. O ar sintético utilizado era composto por 20% de oxigênio e 1 ppm de monóxido de carbono + dióxido de carbono (Oxylumen do Brasil). Posteriormente à renovação, as substâncias gasosas eram reaplicadas nos diferentes tratamentos.

### III.6 Parâmetros biométricos

Ao final de 30, 60 e 90 dias de tratamento no escuro, foi quantificado o número de caules estiolados (podendo ser oriundos de gemas laterais basais ou gemas apicais) e de gemas laterais totais formadas nesses estolões. Também mediu-se o tamanho dos estolões apicais e laterais, assim como a massa fresca e seca dos mesmos (Figura 3). Para tanto, foram utilizadas trinta plantas por tratamento para cada um dos três pontos de análise experimental (30, 60 e 90 dias).

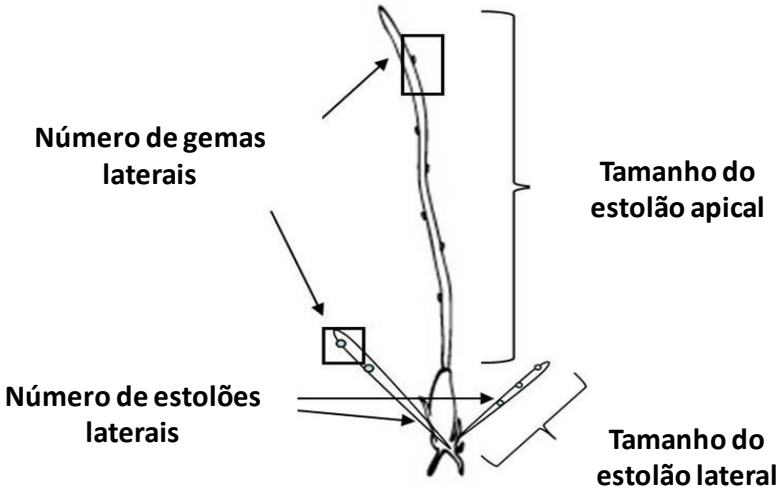



Figura 3. Esquema ilustrativo das diferentes regiões mensuradas nas plantas.

### III.7 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

# IV. Resultados

## IV. 1 Efeito do escuro e da renovação do ar interno dos frascos por ar sintético sobre o alongamento caulinar e na emissão de etileno e $CO_2$

As plantas incubadas no claro apresentaram um fenótipo mais vigoroso, com folhas maiores e mais clorofiladas, do que as cultivadas no escuro (Figura 4). Por outro lado, nesta última condição de cultivo, os fenótipos das plantas foram muito semelhantes entre si, independentemente dos frascos permitirem as trocas gasosas (rolhas perfuradas) ou não (frascos vedados, contendo ar sintético).

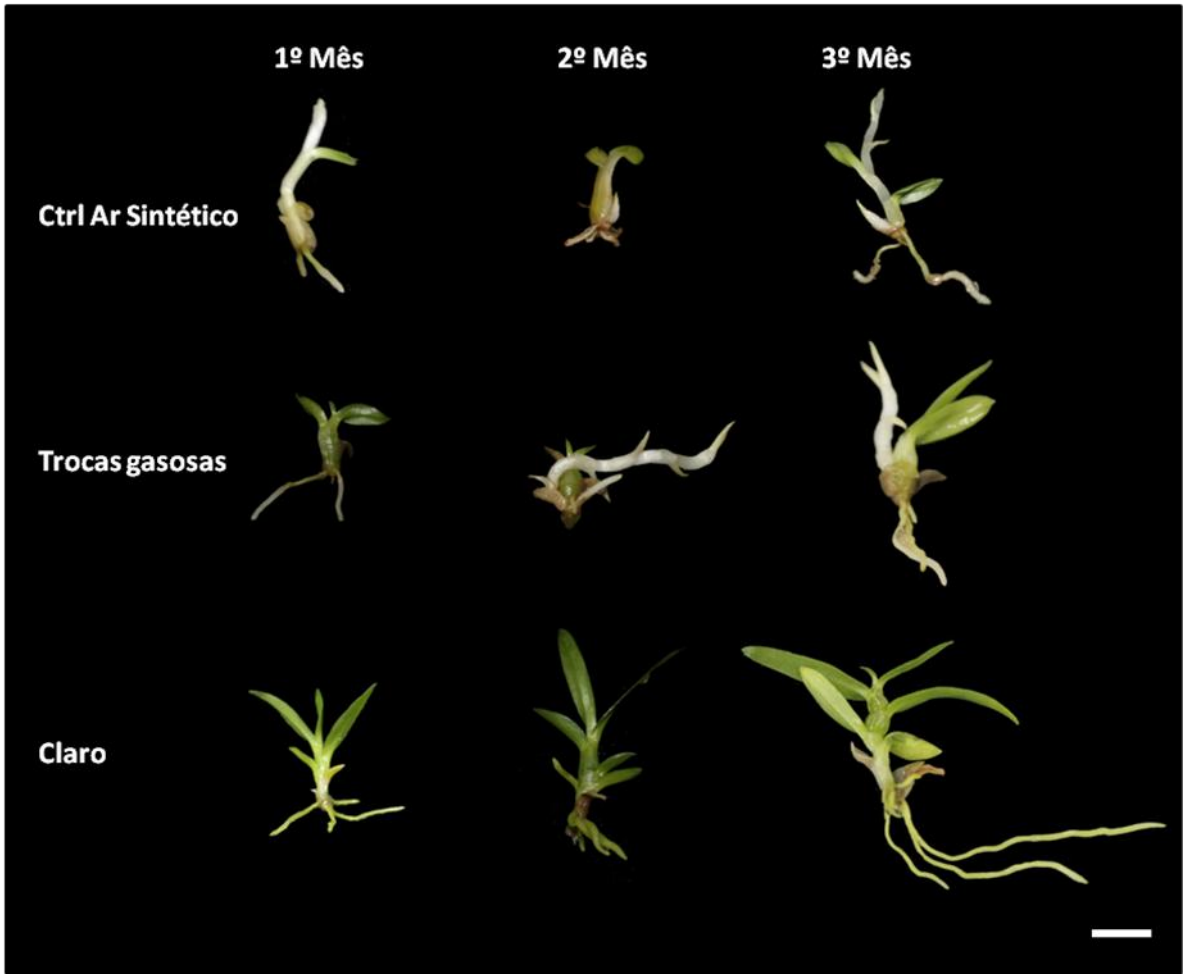


Figura 4. Fenótipos das plantas de *Dendrobium* “Second Love” após 30, 60 e 90 dias de incubação na presença e ausência de luz, com e sem trocas gasosas. Barra indica 1 cm.

Enquanto a luz inibia totalmente a retomada de atividade do meristema apical (Figura 5), esta ocorria no escuro, já no primeiro mês de cultivo, tanto nos frascos com rolhas perfurações (trocas gasosas), quanto nos frascos vedados contendo ar sintético (Figura 5).

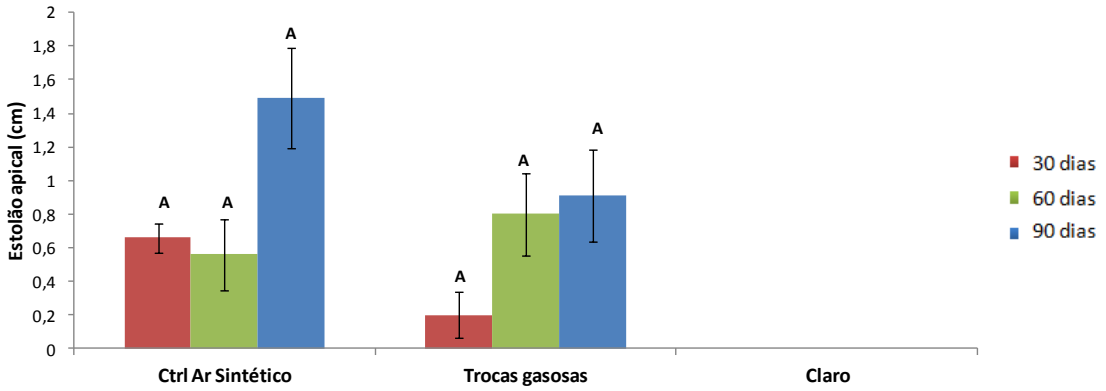



Figura 5. Tamanho de estolões apicais de *Dendrobium* “Second Love” cultivados durante 30, 60 e 90 dias no escuro e no claro, com e sem trocas gasosas. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Como as plantas cultivadas no claro, via de regra, não apresentaram a retomada da atividade meristemática apical caulinar (Figura 5) e lateral (Figuras 6 e 7), não dando origem, por consequência, a estolões, o número de gemas presentes nesta circunstância não foi considerada. Conforme indicado na figura 6, o número médio de gemas presentes nas plantas incubadas no escuro com e sem trocas de ar não apresentaram diferenças significativas ao longo dos últimos 60 dias de cultivo. No entanto, nos primeiros 30 dias experimentais, o controle ar sintético apresentou número de gemas laterais, aproximadamente 4 vezes superior ao tratamento trocas gasosas.

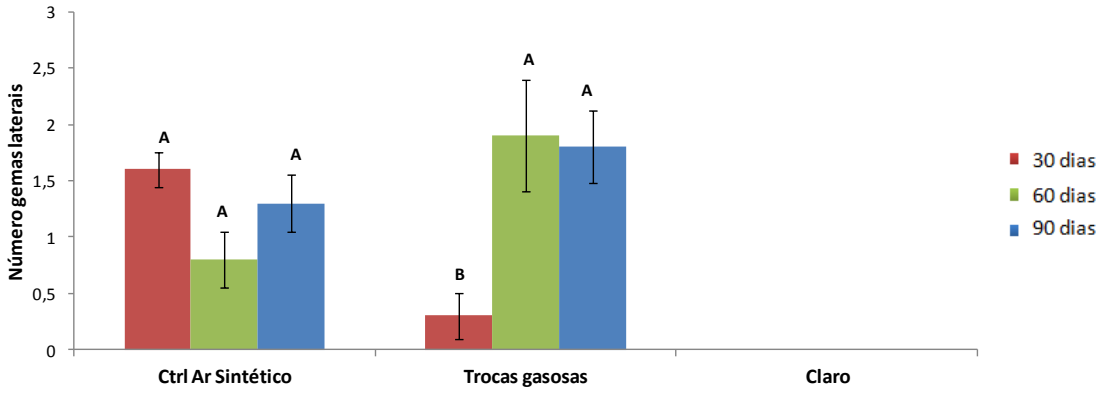



Figura 6. Número médio de gemas laterais em plantas de *Dendrobium* "Second Love" incubadas no escuro por 30, 60 e 90 dias, com e sem trocas gasosas. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

De acordo com o que foi mencionado acima com relação à formação de gemas apicais e laterais na presença de luz, o desenvolvimento destas no claro também não foi alterado (Figura 7). Todavia, quando no escuro, observou-se a quebra da dominância apical com a formação de estolões e tirando o fato do tratamento trocas gasosas ter apresentado estolões laterais já a partir do 30º dia, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas neste quesito e nem no tamanho dos mesmos (Figura 8).

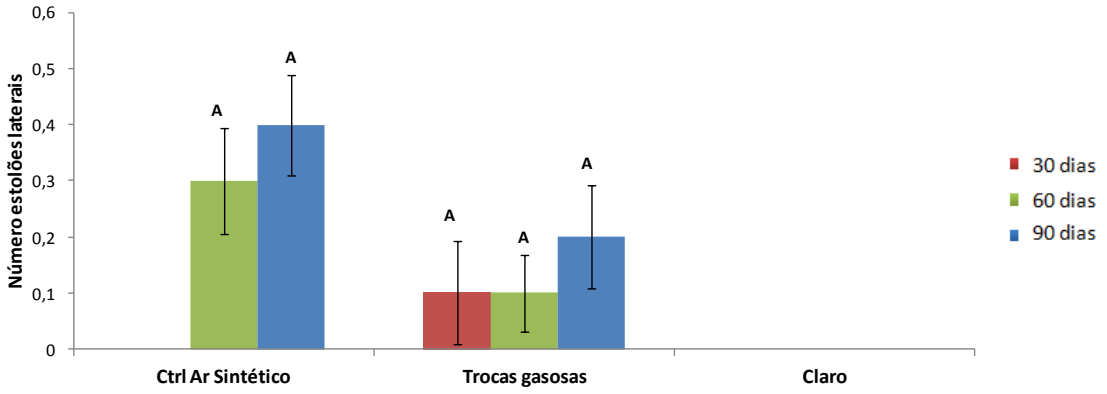


Figura 7. Número de estolões laterais de *Dendrobium* “Second Love” formados em plantas incubadas por 30, 60 e 90 dias na presença e ausência de luz com e sem trocas gasosas. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

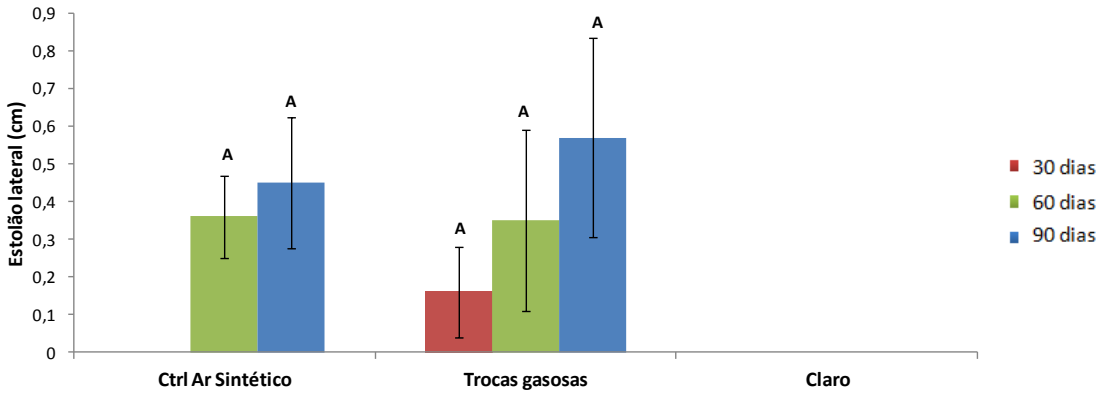



Figura 8. Tamanho dos estolões laterais de plantas de *Dendrobium* tratadas na luz ou com trocas gasosas e incubadas por 30, 60 e 90 dias. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Quanto aos valores de massa fresca e seca verificou-se um incremento progressivo durante o período de incubação, sendo significativamente superiores nos materiais incubados na presença de luz do que no escuro, neste caso, independentemente da troca ou não do ar interno dos frascos (Figuras 9 e 10).

Tanto a massa fresca, quanto a massa seca das plantas tratadas no claro, apresentaram valores superiores a partir do segundo mês experimental quando comparadas as plantas incubadas no escuro (controle e trocas gasosas). Não foram observadas diferenças em ambos os tratamentos entre as plantas cultivadas no escuro ao longo dos três meses de observação. (Figuras 9 e 10).

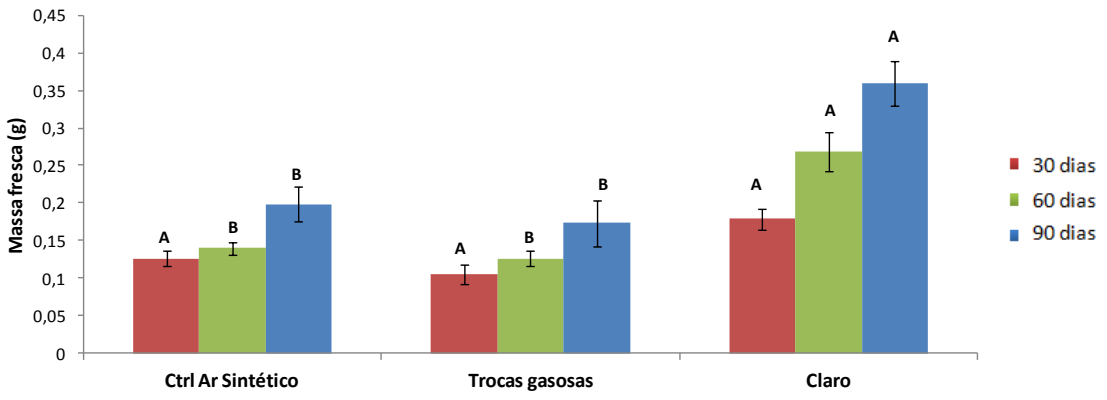



Figura 9. Massa fresca de plantas de *Dendrobium* “Second Love” incubadas por 30, 60 e 90 dias no claro e no escuro, com e sem trocas do ar interno dos frascos. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

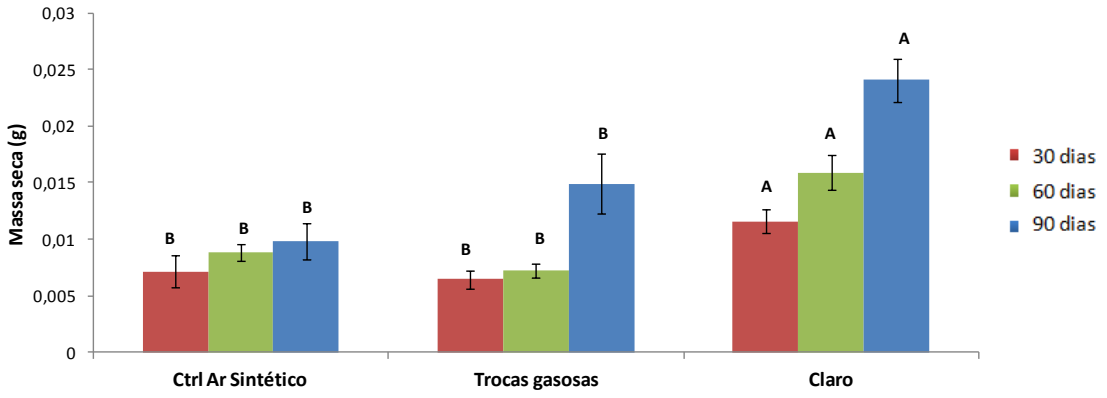



Figura 10. Massa seca de plantas de *Dendrobium* “Second Love” incubadas por 30, 60 e 90 dias na presença e ausência de luz, com e sem trocas gasosas. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

No que diz respeito à emissão de etileno (Figura 11), esta se deu na presença e na ausência de luz. Contudo, enquanto na presença de luz os níveis deste hormônio não apresentaram diferenças significativas durante o tempo de incubação, no escuro a sua concentração foi significativamente maior nos frascos vedados tendo o máximo ocorrido no 60º dia, decrescendo significativamente no

90º dia, ficando cerca de duas e quatro vezes em relação ao primeiro e segundo mês de cultivo, respectivamente (Figura 11).

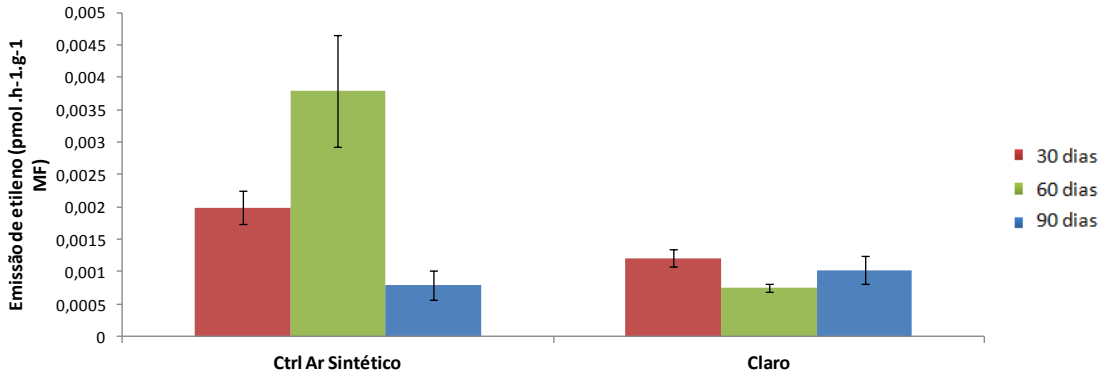



Figura 11. Emissão de etileno por plantas de *Dendrobium* "Second Love" incubadas por 30, 60 e 90 dias na presença e ausência de luz.

Relativamente ao acúmulo de $CO_2$ no interior dos frascos, observou-se uma tendência muito parecida àquela mencionada para o etileno (Figura 12). Entretanto, em termos quantitativos, as emissões deste gás chegaram a ser 25 vezes superiores ao final dos 90 dias de experimento no controle quando comparado ao tratamento claro.

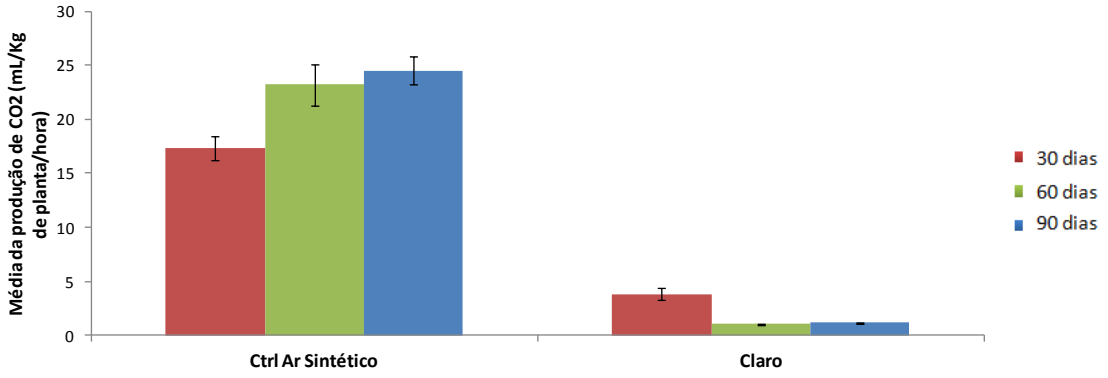



Figura 12. Emissão de $CO_2$ por plantas de *Dendrobium* "Second Love" incubadas por 30, 60 e 90 dias na presença e ausência de luz.

### IV.2 Efeitos da giberelina e do paclobutrazol sobre o alongamento caulinar e as emissão de etileno e de $CO_2$

Na Figura 13, a partir do 30º dia, são mostradas algumas diferenças quanto ao fenótipos das plantas de *Dendrobium* nos tratamentos com giberelina e paclobutrazol.

Os tratamentos com 5 e 50 µM de paclobutrazol apresentaram redução significativa no crescimento do estolão apical, no entanto, estes tratamentos estimularam a liberação dos estolões laterais das plantas quando comparados ao tratamento controle com ar sintético.

Podemos observar também, que as plantas tratadas com 5 e 50 µM de giberelina, durante os três meses experimentais, não apresentaram o efeito esperado na promoção do alongamento caulinar. Além do fato das plantas não terem se alongado na presença de 50 µM de giberelina, observou-se já no primeiro mês de incubação que essa concentração de giberelina provocou sintomas de toxidez às plantas, o qual se intensificou mês a mês, resultando em necrose e morte destas (Figura 13).

Figura 13. Fenótipos das plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm.

Nos primeiros 30 dias de incubação verificou-se que os tratamentos com giberelina se mostraram profundamente inibitórios ao alongamento caulinar das

plantas, reduzindo-o em aproximadamente 3 e 6 vezes em relação ao tamanho dos estolões apicais das plantas incubadas no escuro na ausência deste regulador de crescimento vegetal., respectivamente (Figura 14). Aparentemente, a presença de giberelina não estimulou a atividade do meristema apical caulinar.

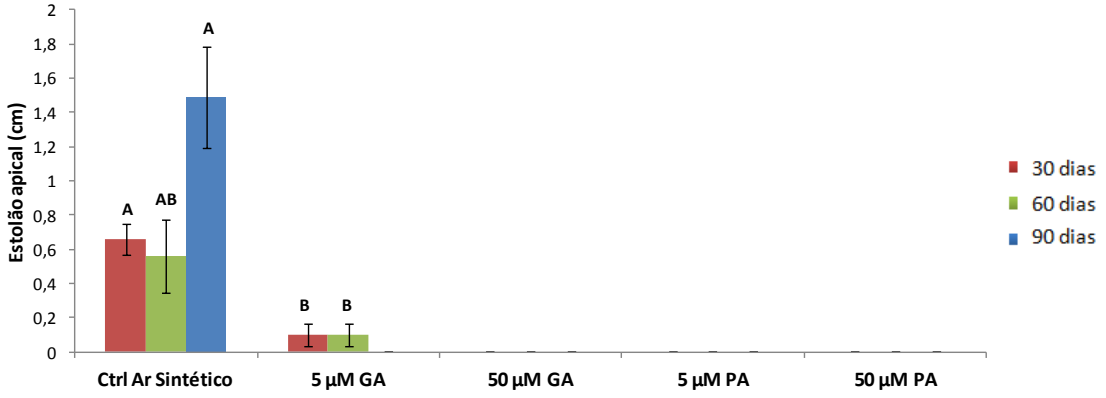



Figura 14. Tamanho do estolão apical de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Por consequência, também não foi verificado incremento no número de gemas laterais (Figura 15). O tratamento com 5 µM de giberelina apresentou conspícua redução no número de gemas laterais a partir do segundo mês de incubação, chegando a não apresentar nenhuma gema lateral ao terceiro mês (Figura 15). O tratamento com 50 µM de giberelina, por sua vez, não chegou a retomar a atividade meristemática apical (Figuras 13 e 14)

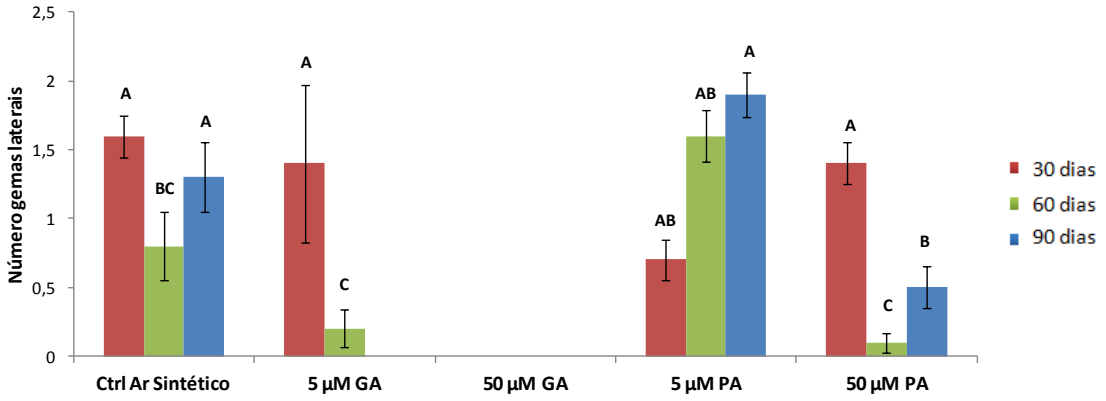



Figura 15. Número de gemas laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Os tratamentos com paclobutrazol inibiram, significativamente, o crescimento do estolão apical (Figura 14), igualando-se, neste aspecto, aos efeitos da giberelina. No entanto, ambas as concentrações utilizadas promoveram um aumento na formação de estolões laterais a partir do segundo mês de tratamento quando comparado ao respectivo controle destituído deste regulador de crescimento (Figura 16).

É interessante observar que, ao contrário do que se poderia esperar, o tratamento com 50 µM de paclobutrazol promoveu um incremento significativo no tamanho dos estolões laterais (Figura 17) no primeiro mês de cultivo, desaparecendo, todavia, nos meses subsequentes.

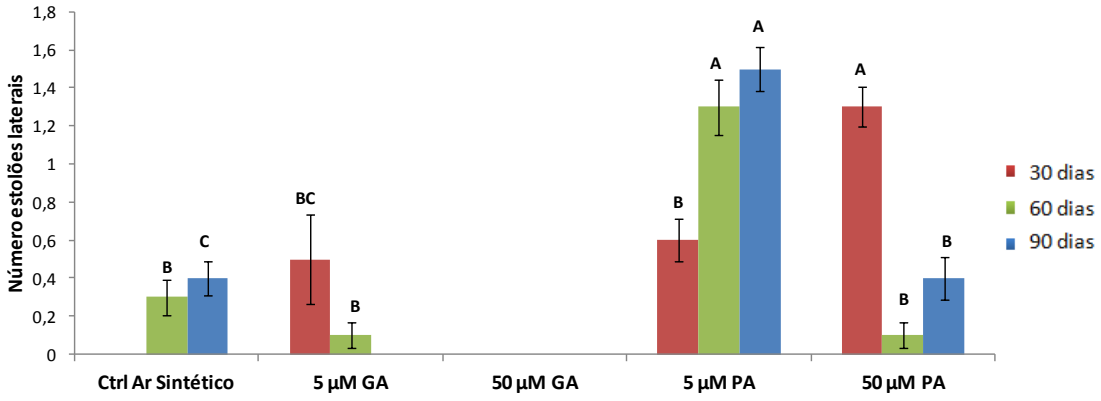



Figura 16. Número de estolões laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

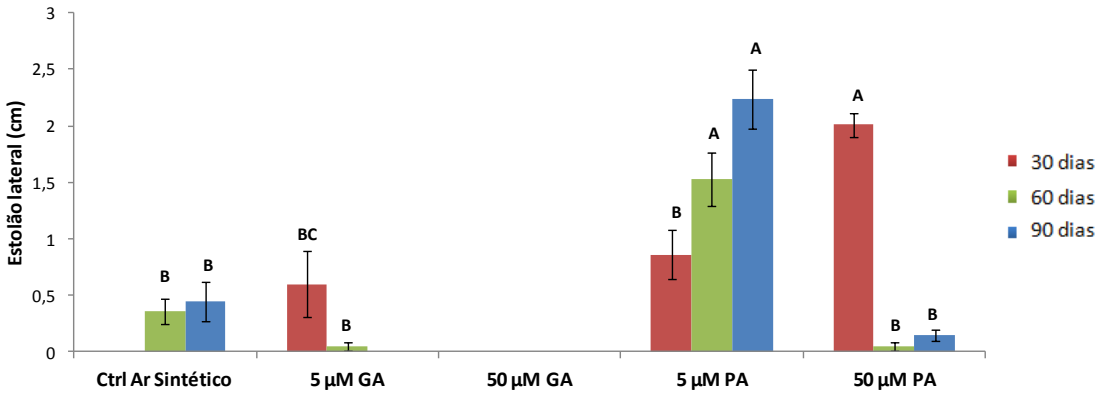



Figura 17. Tamanho dos estolões laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Comparativamente aos materiais crescidos na ausência de giberelina, aqueles incubados com 5 e 50 µM deste regulador de crescimento apresentaram uma redução significativa nos valores de massa fresca e seca após três meses de incubação (Figura 18 e 19). Todavia, quando na presença de paclobutrazol

observou-se uma resposta exatamente contrária, com incrementos significativos mês após mês.

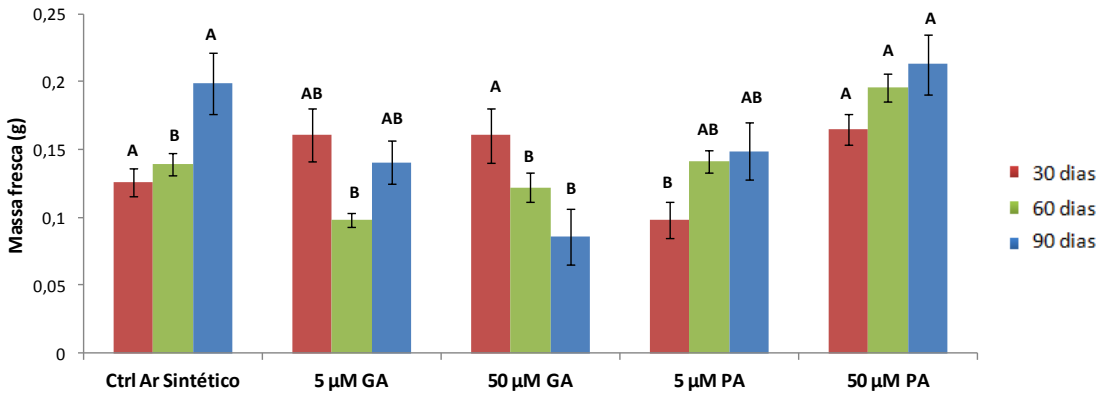



Figura 18. Massa fresca de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

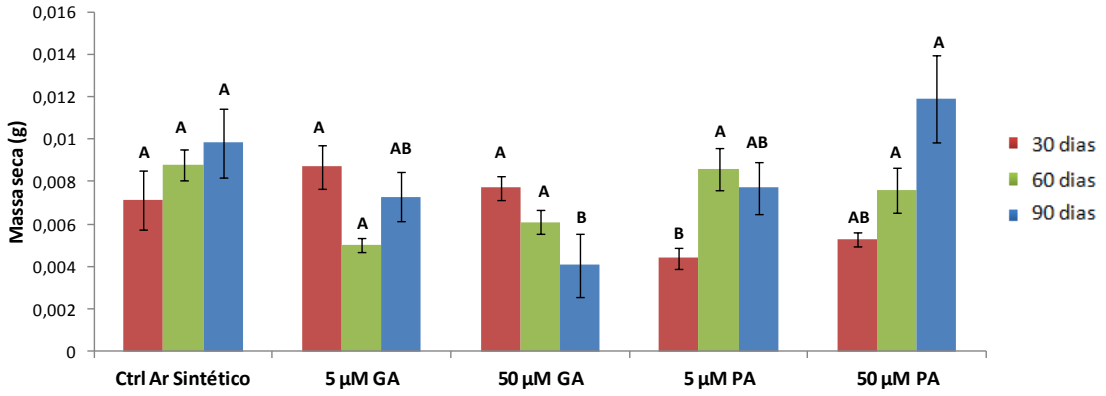



Figura 19. Massa seca de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Com base nos resultados obtidos nas emissões de etileno pelas plantas de *Dendrobium* “Second Love”, verificou-se que no segundo mês de cultivo, com

exceção do tratamento com 5 µM de paclobutrazol, os demais tratamentos com giberelina e paclobutrazol não mostraram variações substanciais na emissão deste gás ao longo dos três meses de incubação (Figura 20).

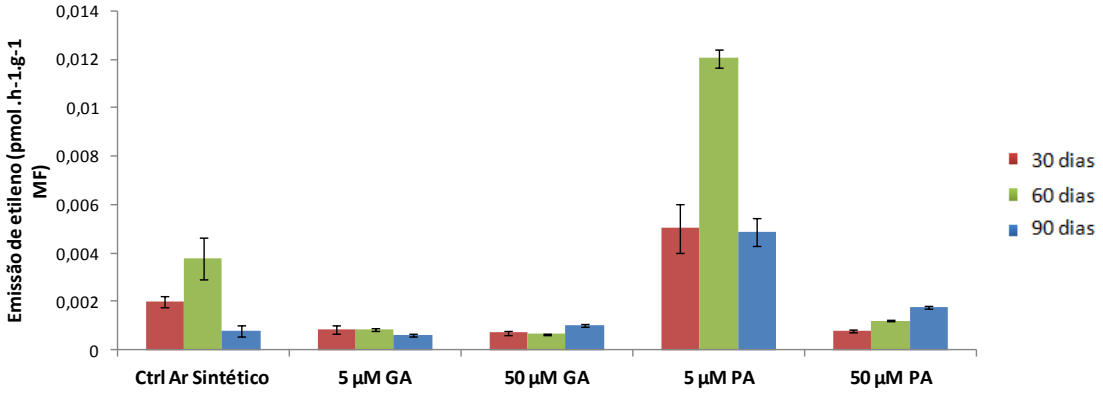



Figura 20. Emissão de etileno por plantas de *Dendrobium* "Second Love" tratadas com 5 e 50 µM de giberelina ou 5 e 50 µM de paclobutrazol e incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro.

No que tange a emissão de $CO_2$ pelas plantas de *Dendrobium* "Second Love" foi verificado que em relação ao meio controle, tanto a presença de giberelina quanto de paclobutrazol resultaram em redução na liberação deste gás, sendo o efeito do paclobutrazol mais intenso neste processo do que a giberelina (Figura 21).

As plantas tratadas com giberelina apresentaram níveis superiores na emissão de $CO_2$ do que aqueles observados em plantas tratadas com paclobutrazol durante os três pontos de análise. A liberação de $CO_2$ foi cerca de 6 vezes maior com 5 µM de giberelina a 5 e 50 µM de paclobutrazol (Figura 21). Estes resultados indicam que ambos os reguladores apresentaram um efeito inibitório sobre a liberação de $CO_2$ sendo o paclobutrazol mais efetivo nesta redução (Figura 21).

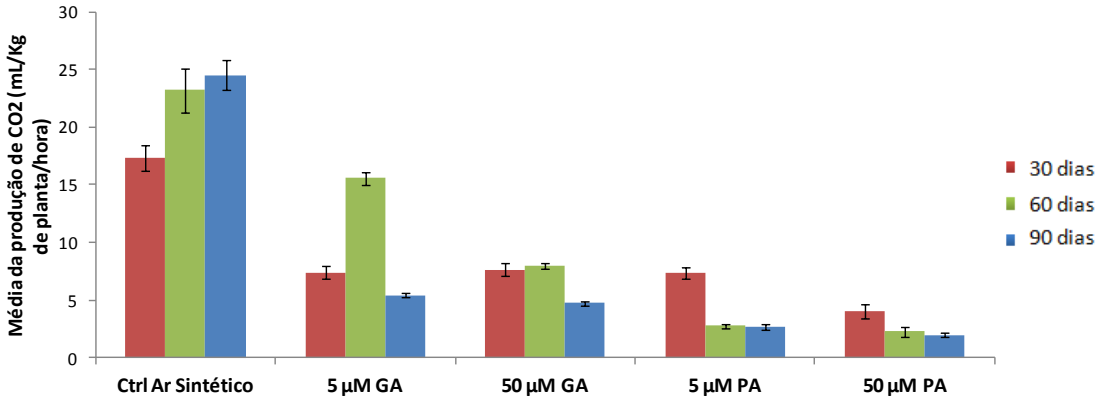



Figura 21. Emissão de $CO_2$ por plantas de *Dendrobium* tratadas com 5 e 50 µM de giberelinas e 5 e 50 µM de paclobutrazol, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro.

### IV.3 Efeitos do etileno sobre o alongamento caulinar e as emissão de etileno e de $CO_2$

Conforme é mostrado na figura 22, modo geral, os tratamentos com etileno apresentaram efeitos positivos sobre a quebra da dominância apical e o estiolamento dos estolões formados, quando comparados aos respectivos controles com ar sintético e com 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Figura 22). A partir do segundo mês de cultivo, a presença do etileno adiantou a formação de estolões apicais e laterais. Ainda que incubadas no escuro em frascos vedados, o fenótipo das plantas tratadas com 1-MCP era muito parecido ao de plantas incubadas na presença de luz (Figura 4), tanto pela manutenção da coloração verde quanto pela ausência de quebra da dominância apical.

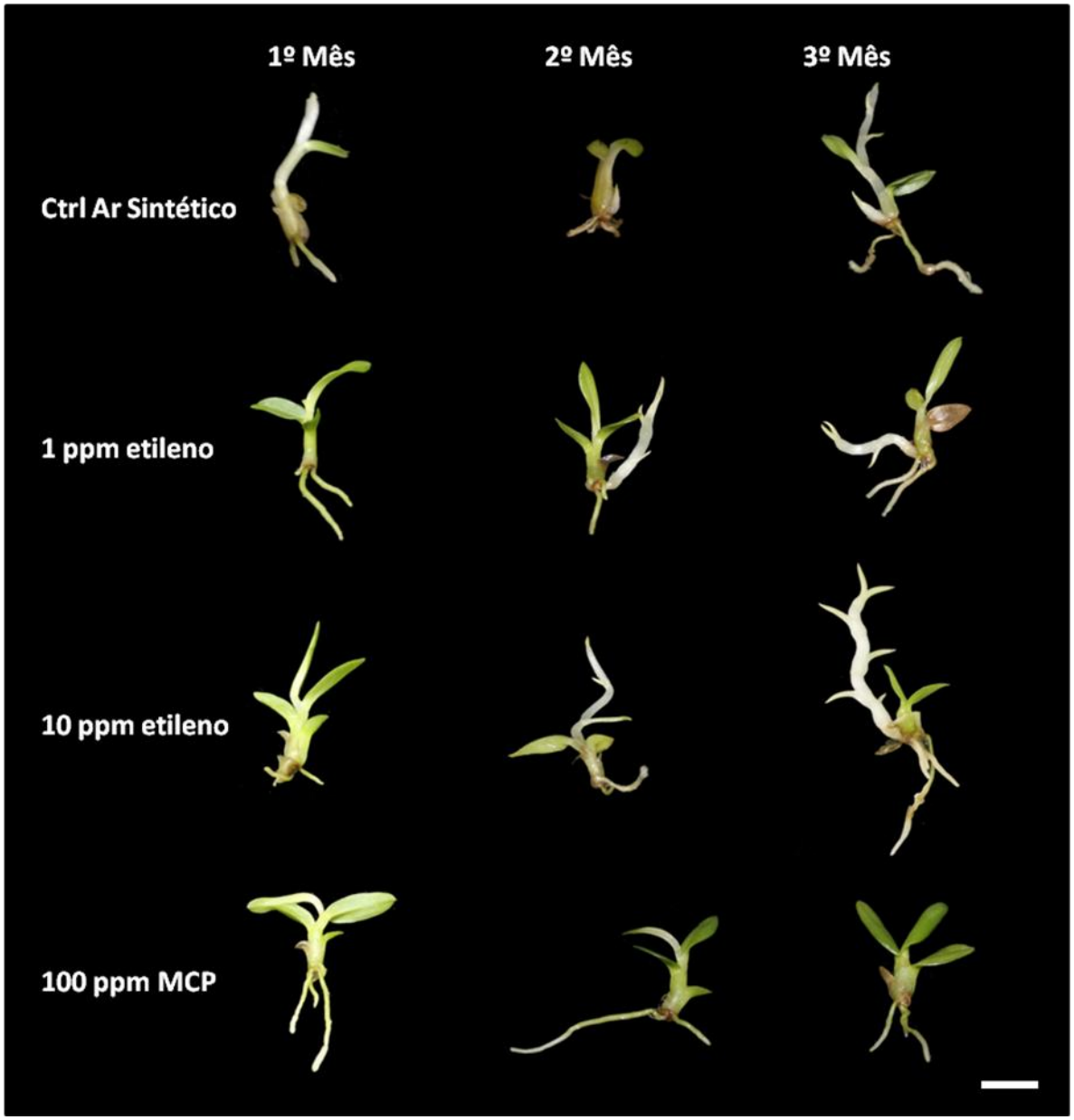



Figura 22. Fenótipos das plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm.

No segundo mês de incubação os estolões apicais crescidos na presença de 10 ppm de etileno apresentaram um aumento significativo de tamanho quando comparados aqueles crescidos na ausência deste hormônio (ar sintético), mantendo-se estável até o terceiro mês (Figura 23). O crescimento do estolão apical em plantas tratadas com 10 ppm de etileno ocorreu já no primeiro mês,

efeito não observado em plantas tratadas com 1 ppm de etileno (Figura 23). Verifica-se ainda nesta figura que a retomada da atividade meristemática apical foi completamente inibida pela presença de 1-metilciclopropeno.

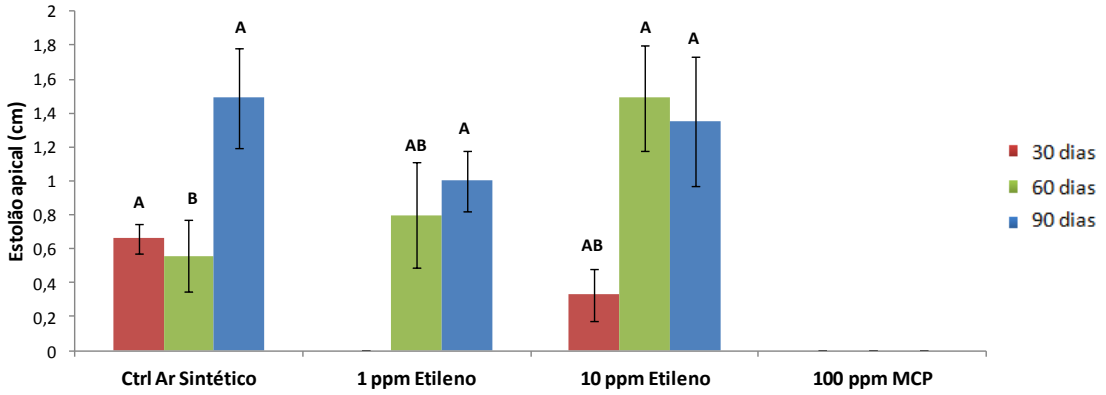



Figura 23. Tamanho do estolão apical de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Em comparação às plantas incubadas nos frascos controle (ar sintético), aquelas tratadas com etileno apresentaram uma elevação significativa na formação de gemas laterais a partir do segundo mês, alcançando um valor máximo no terceiro mês (Figura 24). Como o tratamento com 100 ppm de 1-metilciclopropeno inibiu fortemente o alongamento caulinar, tanto do estolão apical (Figura 23) quanto dos estolões laterais (Figura 25), não observou-se, por óbvio, gemas laterais neste tratamento (Figura 14).

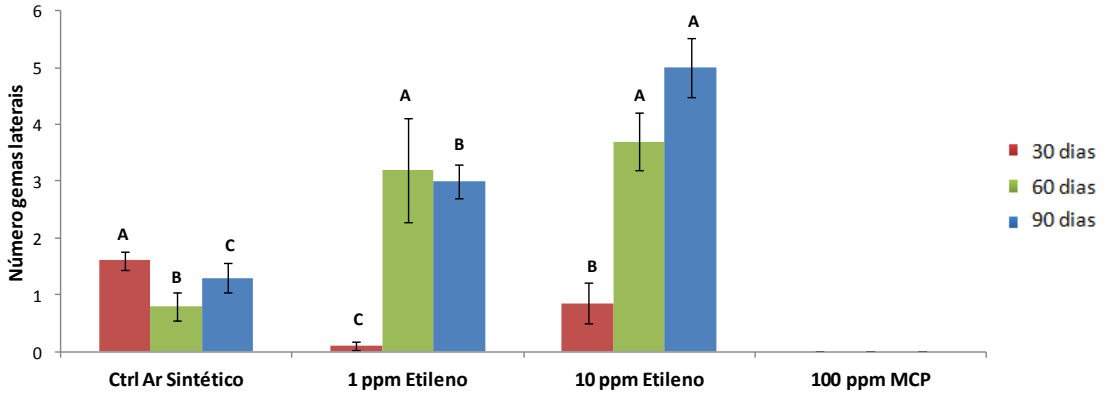



Figura 24. Número de gemas laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

É notável o efeito do etileno sobre o desenvolvimento dos estolões laterais de plantas. Pode-se observar na figura 25 que as plantas tratadas com 10 ppm de etileno liberaram mais do que o dobro do número de estolões laterais em relação às plantas controle mantidas sob ar sintético no 60º e 90º dia de incubação. Além disso, pode-se verificar que o tratamento com 1 ppm de etileno mostrou-se efetivo para a promoção do número de estolões laterais no primeiro e segundo mês de incubação quando comparado ao controle ar sintético (Figura 25).

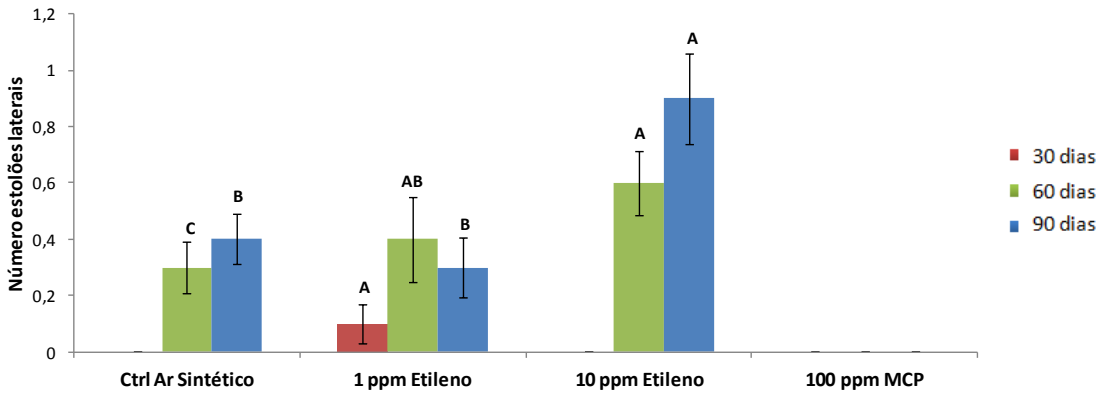


Figura 25. Número de estolões laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Além de apresentarem maior número de estolões laterais do que o tratamento controle, os tratamentos com 1 e 10 ppm de etileno também promoveram um aumento significativo no tamanho dos mesmos (Figura 26). No terceiro mês de incubação, os tratamentos com etileno aumentaram o tamanho dos estolões em cerca de duas e três vezes nas concentrações de 1 e 10 ppm do hormônio, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 26).

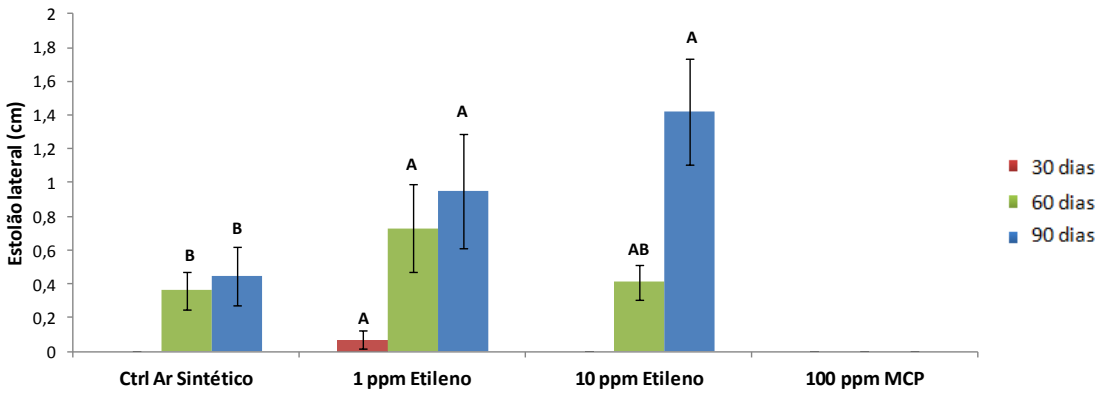



Figura 26. Tamanho dos estolões laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Quanto às massas fresca e seca das plantas tratadas com etileno e 1-metilciclopropeno, vale destacar antes, as semelhanças de valores entre os materiais controle (ar sintético), os tratados com 1-MCP e etileno (Figuras 27 e 28).

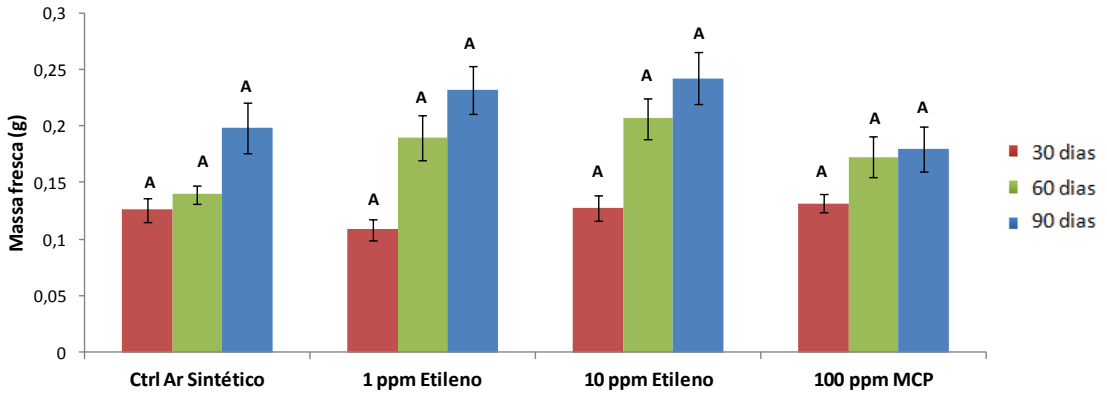



Figura 27. Massa fresca de plantas de *Dendrobium* "Second Love" tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

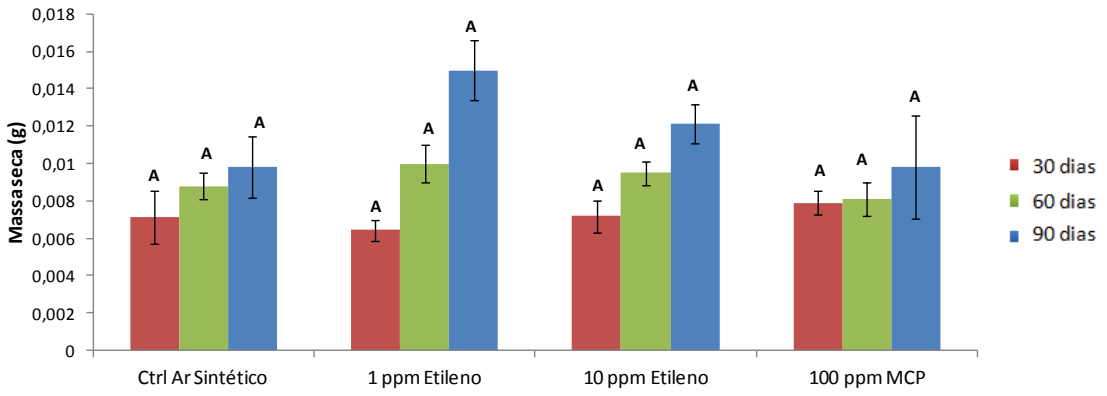



Figura 28. Massa seca de plantas de *Dendrobium* "Second Love" tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Os resultados de emissão de etileno pelas plantas tratadas com 100 ppm de 1-metilciclopropeno mostraram-se surpreendentes. No primeiro, segundo e terceiro mês de incubação na presença deste inibidor da ação do etileno, os níveis de etileno acumulados nos frascos chegaram a ser 9, 5 e 26 vezes superiores aos

teores deste hormônio produzidos pelas plantas incubadas na sua ausência (ar sintético), respectivamente (Figura 29).

No que diz respeito aos tratamentos com etileno, observou-se que, diferentemente do 1-MCP, ocorreu incrementos significativamente crescentes nos níveis deste hormônio apenas no primeiro mês de cultivo, decaindo abruptamente nos períodos subsequentes (Figura 29).

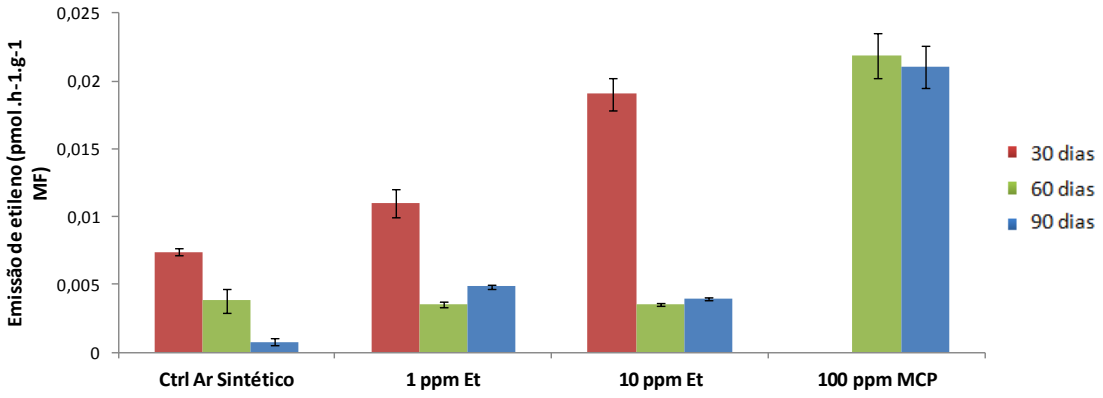



Figura 29. Emissão de etileno por plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro.

A produção de $CO_2$ pelas plantas tratadas com etileno apresentou-se mais intensa apenas nos primeiros meses de cultivo, quando alcançou valores maiores do que nos frascos com ar sintético e no tratamento com 1-MCP, decrescendo nos meses seguintes, especialmente no tratamento com 1 ppm de etileno (Figura 30).

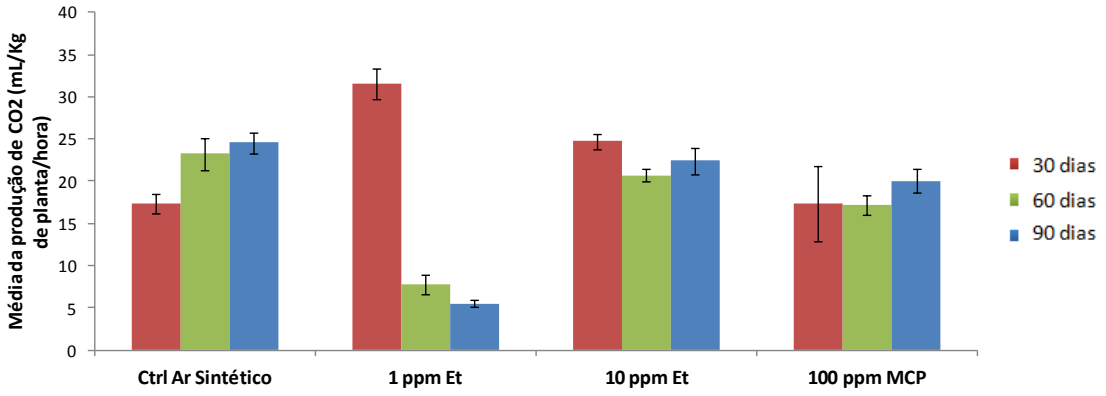



Figura 30. Emissão de $CO_2$ por plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno e 100 ppm de 1-metilciclopropeno, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro.

### IV.4 Efeitos do óxido nítrico sobre o alongamento caulinar e as emissão de etileno e de $CO_2$

O efeito do óxido nítrico (NO) sobre o fenótipo das plantas de *Dendrobium* “Second Love” é mostrado na figura 31. A presença deste radical livre apresentou um efeito notável sobre a liberação de gemas laterais e o alongamento dos estolões. No caso, os efeitos da presença de 1.000 ppm de NO mostraram-se superiores, em termos quantitativos e qualitativos, ao tratamento com 5.000 ppm, Em termos comparativos, os efeitos do NO foram superiores a aqueles encontrados para a giberelina (Figura 13) e o etileno (Figura 22). A despeito disto, a maior concentração de NO utilizada resultou ao final do período de incubação em necroses severas às plantas, um efeito semelhante ao tratamento com 50 µM de giberelina (Figura 13).

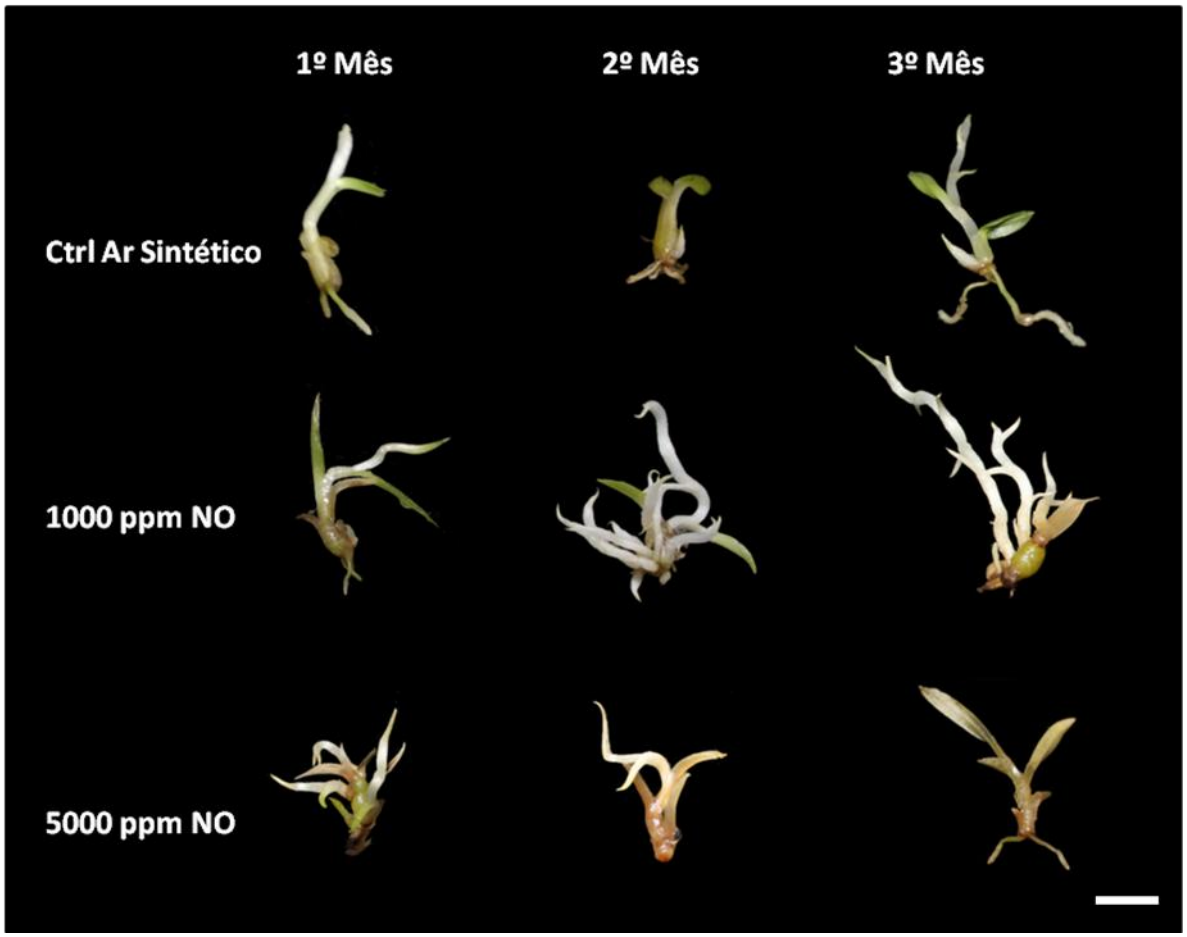


Figura 31. Fenótipos das plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Barra indica 1 cm.

Mesmo não tendo apresentado um alongamento do estolão apical significativamente maior em relação às plantas controle tratadas com ar sintético, o tratamento com 1.000 ppm de óxido nítrico, demonstrou-se mais efetivo para a promoção do alongamento caulinar em plantas de *Dendrobium* quando comparado aos tratamentos com giberelina (Figura 32). O alongamento do estolão promovido pelo tratamento com 1.000 ppm de NO, assemelha-se ao observado nos tratamentos com 1 e 10 ppm de etileno (Figuras 23 e 32).

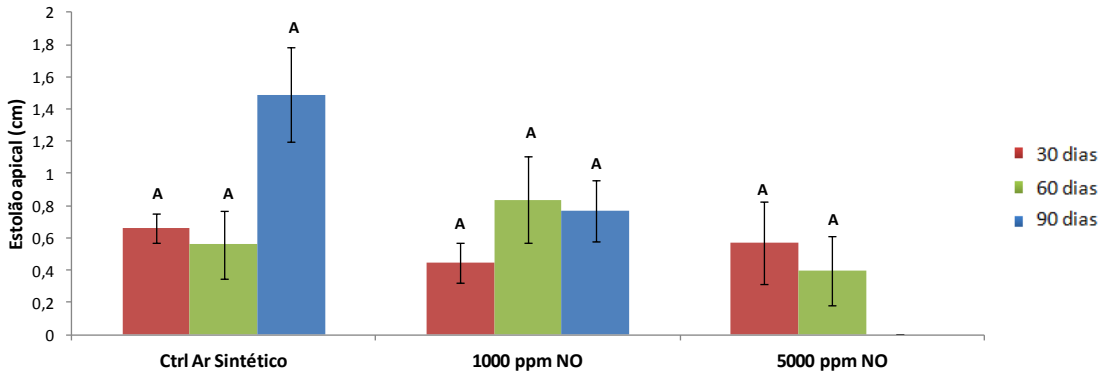



Figura 32. Tamanho do estolão apical de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Ainda que os tratamentos com NO não tenham apresentado efeitos positivos sobre o crescimento dos estolões apicais (Figura 32), o mesmo já não se pode dizer de seu efeito sobre o número de gemas laterais formadas (Figura 33), parâmetro este substancialmente incrementado pela presença de 1.000 ppm de NO, especialmente no segundo e terceiro mês de incubação. Dentre os reguladores de crescimento utilizados neste estudo, o NO mostrou ser o mais

efetivo sobre este importante parâmetro. Além do mais, conforme é mostrado na figura 34 e 35, neste tratamento foram observados também aumentos significativos tanto no número de estolões formados quanto no crescimento dos mesmos, respectivamente. A quantidade de estolões formados na presença de 1.000 ppm de NO foi cerca de 7 e 5 vezes maior no segundo e terceiro mês de cultivo, respectivamente (Figura 34). Neste tratamento, ocorreu uma elevação de 21 vezes no número de estolões laterais em relação ao tratamento controle no segundo mês de incubação (Figura 7 e 34). Vale ressaltar que esta concentração de NO promoveu bem mais o crescimento dos estolões do que a giberelina (Figura 17) e o etileno (Figura 26).

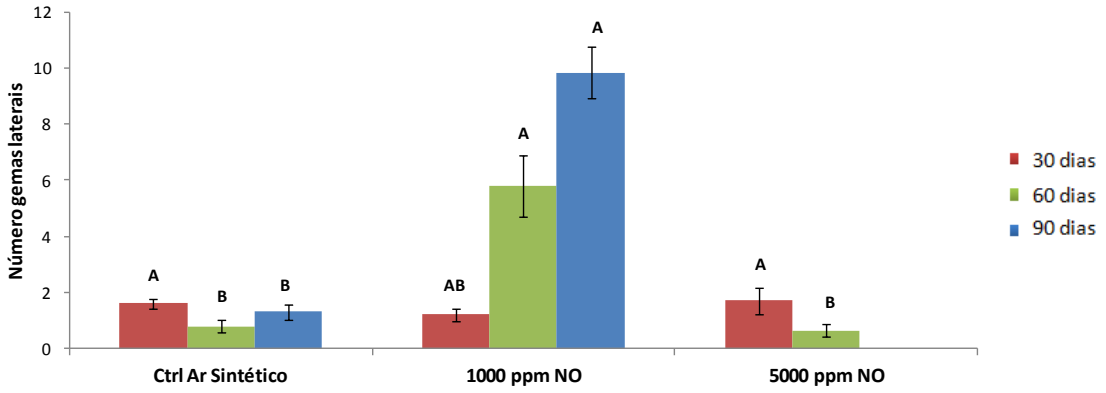



Figura 33. Número de gemas laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

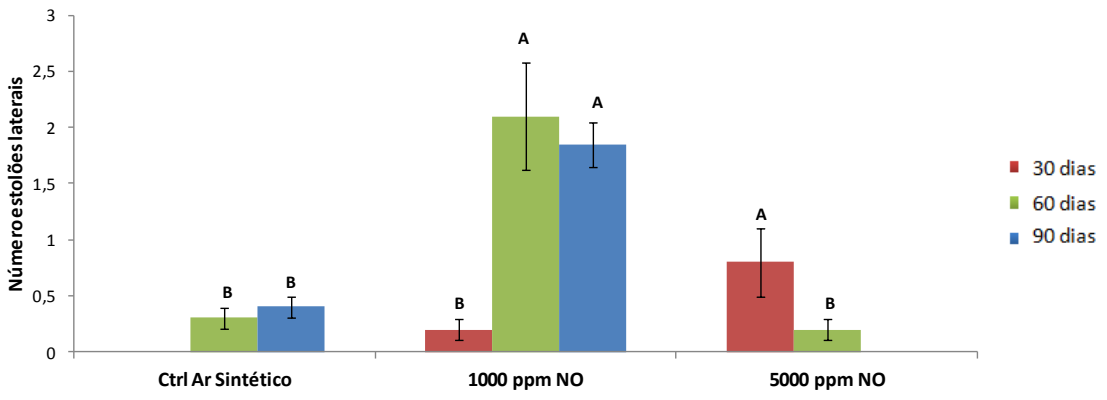



Figura 34. Número de estolões laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

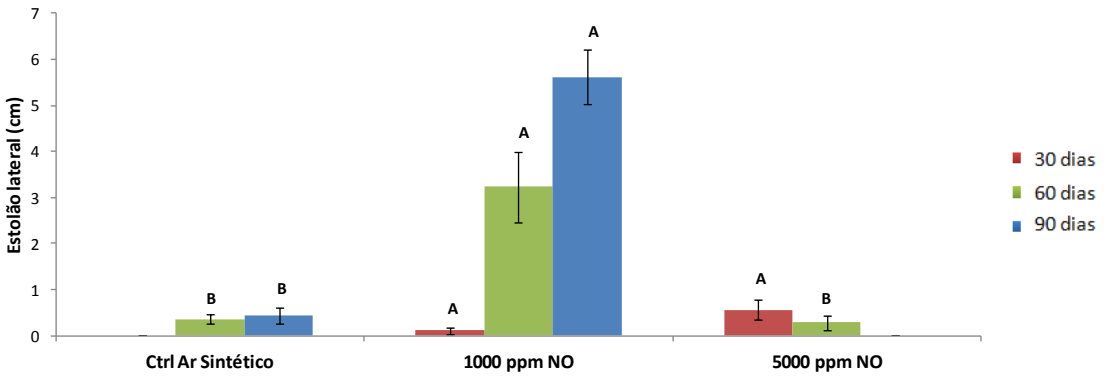



Figura 35. Tamanho dos estolões laterais de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

A partir dos resultados obtidos verifica-se que a massa fresca das plantas tratadas com 1.000 ppm de óxido nítrico (Figura 36), a partir do segundo mês foi superior à massa fresca do tratamento controle com ar sintético, equiparando-se quantitativamente, aos valores de massa das plantas mantidas na presença de luz (Figura 9). O tratamento com 5.000 ppm de NO mostrou-se claramente

desfavorável a este parâmetro de crescimento. Os resultados de massa seca corroboraram amplamente as variações de peso fresco (Figura 37).

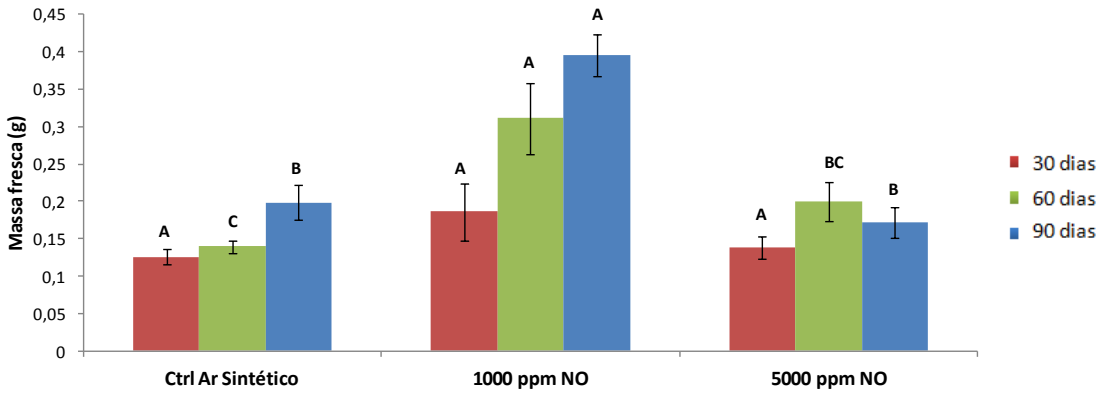



Figura 36. Massa fresca de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

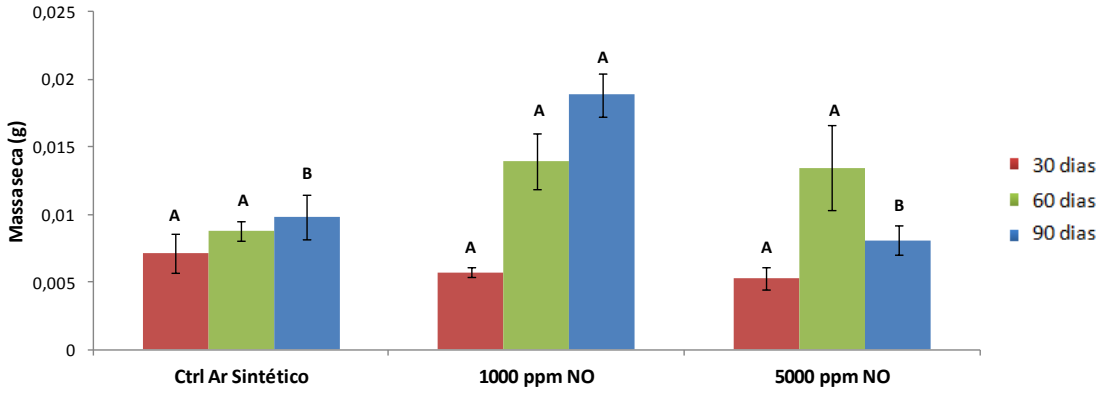



Figura 37. Massa seca de plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos (teste Turkey, P<0,05).

Os tratamentos com NO fizeram-se sentir, também de forma proeminente, sobre a liberação de etileno pelas plantas de *Dendrobium* “Second Love”. Desperta a atenção também neste aspecto, e mais uma vez, o papel altamente estimulatório

do tratamento com 1.000 ppm deste radical livre, particularmente no primeiro e último mês de incubação (Figura 38). Conforme consta ainda nesta figura, as plantas tratadas com 5.000 ppm de NO emitiram menos da metade de etileno das plantas tratadas com 1.000 ppm de NO.

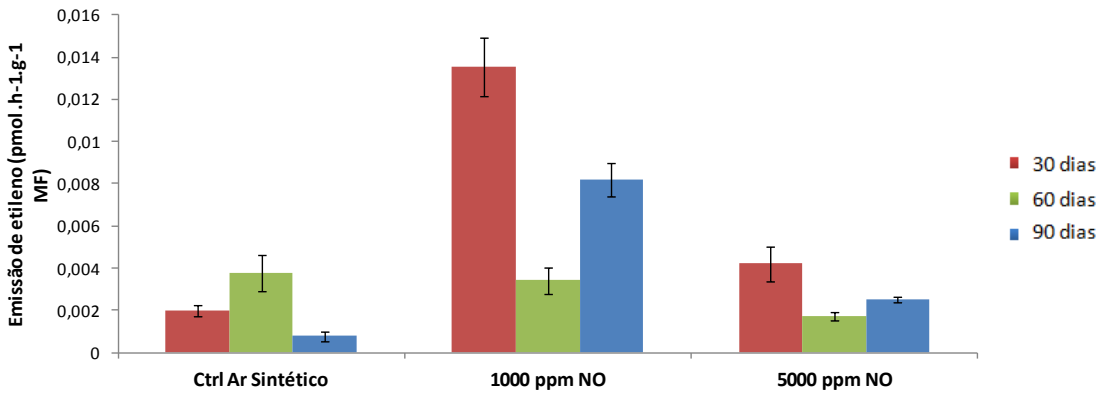



Figura 38. Emissão de etileno por plantas de *Dendrobium* "Second Love" tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro.

Quanto a produção de $CO_2$, com exceção do terceiro mês das plantas tratadas com 5.000 ppm de NO, é possível verificar que os tratamentos com 1.000 e 5.000 ppm de NO apresentaram níveis de emissão de $CO_2$ próximos aqueles emitidos pelas plantas controle incubadas apenas com ar sintético (Figura 39).

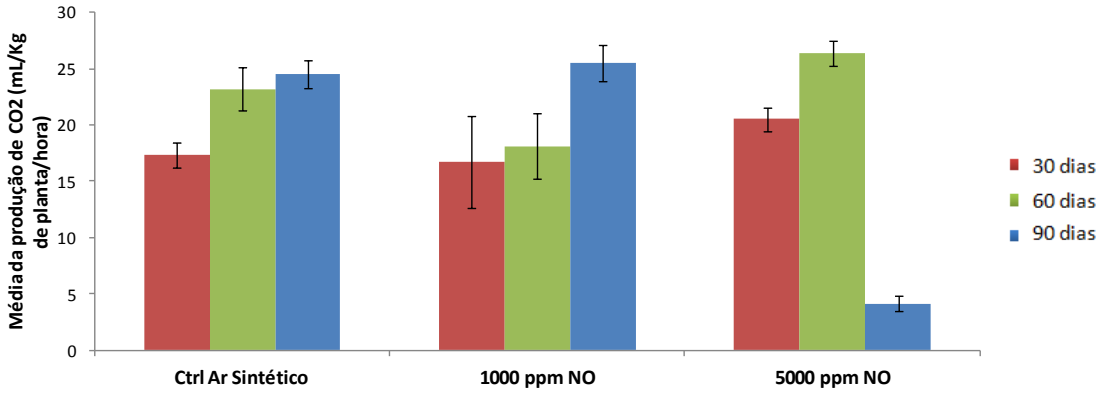



Figura 39. Emissão de $CO_2$ por plantas de *Dendrobium* "Second Love" tratadas com 1.000 e 5.000 ppm de óxido nítrico, incubadas por 30, 60 e 90 dias no escuro.

**IV.5 Comparação ente os efeito do escuro e da penumbra sobre desenvolvimento de gemas laterais**

A importância da incubação sob condições de penumbra em relação ao escuro sobre o desenvolvimento de estolões mostraram que ao final de 120 dias de incubação as plantas mantidas na penumbra apresentavam caules e folhas mais alongadas e levemente clorofiladas em comparação àquelas crescidas na ausência total de luz (Figura 40).

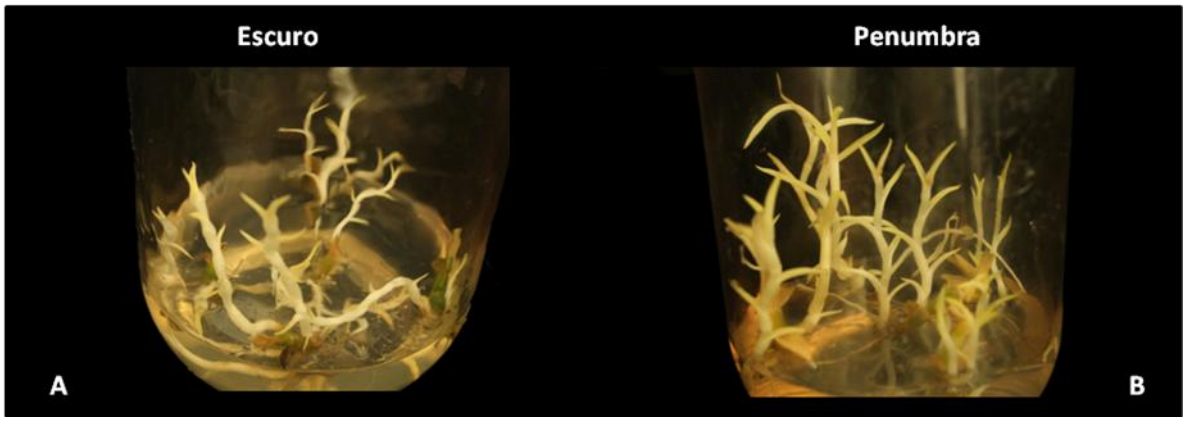



Figura 40. Fenótipos de plantas de *Dendrobium* “Second Love” incubadas na ausência total de luz (A) e na penumbra (B) durante 120 dias.

Quando decapitados e transferidos para a presença de luz em meios destituídos de hormônios os estolões oriundos da penumbra formavam plantas geralmente maiores e mais vigorosas as quais enraizavam mais rapidamente (Figura 41).

Figura 41. Estolões obtidos a partir das plantas estioladas no escuro (A) ou na penumbra (B) após 90 dias na luz. Barra = 1 cm.

Levando-se em consideração os fenótipos das plantas mostradas na figura 40, despertou a atenção o fato da frequência de gemas laterais que se desenvolviam quando os estolões eram transferidos para o claro era 13% maior naqueles formados no escuro (Figura 42).

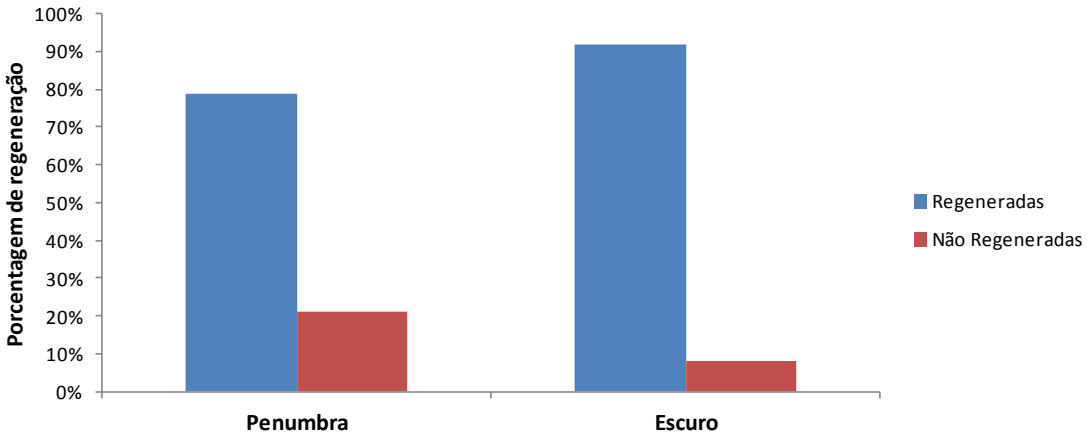



Figura 42. Porcentagem de gemas laterais formadas sobre estolões de *Dendrobium* crescidos previamente na penumbra e no escuro após 90 dias de incubação na presença de luz.

# V. Discussão

De maneira diferente das plantas de *Catasetum fimbriatum* incubadas no escuro, as de *Dendrobium* "Second Love" não são dotadas da mesma rapidez de resposta e eficiência na retomada da atividade meristemática apical. Quando na ausência de luz, as plantas de *Catasetum* retomam a atividade meristemática apical e lateral, dando origem a caules estiolados aclorofilados, com folhas reduzidas e entrenós alongados por tempo indeterminado (Kerbauy *et al.*, 1995). Já as plantas de *Dendrobium* "Second Love", por sua vez, apresentam crescimento caulinar comparativamente lento e bastante limitado. Face a importância dos hormônios vegetais no controle da atividade meristemática caulinar, é presumível admitir que ambas estas características de crescimento de plantas de *Dendrobium* "Second Love" sejam influenciadas hormonalmente. Pesquisas conduzidas com plantas de *Catasetum fimbriatum* incubadas no claro e no escuro evidenciaram diferenças marcantes nos respectivos teores endógenos de auxina, citocininas e ácido abscísico (Suzuki *et al.* 2004; 2010). Tratamentos com paclobutrazol, um potente inibidor da síntese de giberelinas, demonstraram de forma indireta, porém conspícua, a importância deste hormônio sobre o crescimento de estolões desta orquídea crescidos no escuro.

No presente estudo buscou-se adquirir uma melhor compreensão dos papeis presumíveis da giberelina, do etileno e do óxido nítrico no processo de retomada do crescimento e o subsequente estiolamento dos caules de plantas ainda jovens de *Dendrobium* "Second Love" incubadas no escuro e seus reflexos sobre o número de gemas laterais. Tais conhecimentos básicos poderiam resultar

em subsídios importantes ao estabelecimento de uma estratégia de multiplicação clonal desta espécie de orquídea, baseada naquela já consagrada para *Catasetum fimbriatum*. Estudos conduzidos anteriormente em nosso laboratório com plantas de *Dendrobium* “Second Love” e outras espécies de orquídeas pertencentes aos gêneros *Cattleya*, *Oncidium*, *Laelia* e *Paphiopedilum,* todas elas consagradas no mercado global de flores, demonstraram a ocorrência de dificuldades de estiolamento das mesmas, aliada a baixas taxas de formação de gemas laterais.

Contudo, mesmo que os estolões de *Dendrobium* “Second Love” sendo curtos, ainda assim são perfeitamente utilizáveis desde que não sejam seccionados, mas apenas decapitados, conforme é mostrado na figura 1, procedimento este que se mostrou deveras efetivo no incremento de formação de gemas (Cruz, 2009). Por certo, este procedimento está diretamente relacionado à quebra da dominância apical. É sabido que a gema apical do caule é o principal sítio de síntese de auxina, a qual por sua vez, é responsável pela inibição das gemas laterais. A auxina produzida no ápice meristemático é transportada basipetamente em direção às raízes, inibindo o desenvolvimento das gemas laterais caulinares por alterar o balanço auxinas/citocininas na região dos meristemas laterais. Ao se eliminar o sítio de produção de auxina, o fluxo basípeto que antes inibia o desenvolvimento das gemas laterais é interrompido, permitindo assim que as citocininas oriundas principalmente das raízes atuem no desenvolvimento das gemas laterais (Kerbauy, 2008). As proteínas PIN participam ativamente do transporte basípeto da auxina.

O emprego da técnica da quebra da dominância apical nos caules estiolados de plantas de *Dendrobium* mostrou-se pivotal na obtenção de novos brotos, aumentando assim, a eficiência da multiplicação *in vitro* dessas plantas e

permitindo que fossem executados os tratamentos propostos no presente estudo. A despeito disto, conforme já assinalado, um dos fatores preponderantes para o devido sucesso desta estratégia de multiplicação *in vitro*, de orquídeas recalcitrantes ao crescimento no escuro depende ainda amplamente do sucesso na indução de crescimento caulinar indeterminado, associado a maior ou menor habilidade de formar gemas laterais e a redução do tamanho e/ou atividade de drenos como folhas e pseudobulbos, por exemplo. De acordo com Suzuki (2005), a manutenção da atividade meristemática caulinar em estolões de *Catasetum fimbriatum* incubados no escuro resultaria da não formação de pseudobulbos, um dos órgãos-drenos mais conspícuos em orquídeas epífitas. O ápice calinar, além de ser um importante sítio de síntese de auxina, está também envolvido na produção de giberelinas (Sheldrake, 1973), que, juntamente com etileno e citocininas, possui participação no balanço para a manutenção ou quebra da dominância apical (Phillips, 1975). Dessa forma, fica clara a complexidade da sinalização hormonal que rege o desenvolvimento de gemas laterais ou a atividade meristemática apical das plantas, pois envolve o balanço entre diferentes hormônios e moléculas com rotas de sinalização ainda não plenamente conhecidas.

As plantas clorofiladas de *Dendrobium* “Second Love” crescidas no claro mantiveram o crescimento das folhas e raízes, com valores de massas fresca e seca superiores praticamente a quase todos os demais tratamentos, com exceção do tratamento com 1.000 de NO (Anexos I, VI e VII).

Tanto para as emissões de etileno quanto para as de $CO_2$ os valores observados no claro foram muito inferiores aos das plantas incubadas no escuro, efeito este talvez devido ao fato das plantas não se encontrarem sob efeito de

nenhum estresse ambiental (escuro) ou na presença de reguladores de crescimento (Anexos VIII e IX). É sabido que plantas expostas a estresses externos apresentam um aumento nas emissões de etileno (Abeles, 1973) e que as plantas de *Dendrobium* são sensíveis à este hormônio (Ketsa e Rugkong, 2000). Também foi verificado por Chaer (2012), que em plantas de *C. fimbriatum* e *Cymbidium*, as emissões elevadas de etileno promoveram um aumento nas emissões de $CO_2$, sugerindo uma possível relação entre esses dois gases.

É interessante destacar que os efeitos da vedação dos frascos (acoplado a renovação semanal com ar sintético), não chegaram a alterar de forma sensível nenhum dos parâmetros considerados neste estudo, seja na retomada da atividade meristemática apical e lateral (Figuras 5 e 7) ou no número total de gemas laterais (Figura 6), validando assim a utilização do ar sintético nos experimentos subsequentes.

As plantas de *Dendrobium* “Second Love” não responderam de forma positiva aos tratamentos com 5 ou 50 µM de giberelina durante os 3 meses de experimentação (Figuras 14 e 17). Esses resultados parecem não corroborar os estudos consolidados com um grande e diversificado número de plantas nas quais este hormônio apresenta extrema relevância para a promoção do alongamento celular (Cowling *et al*., 1998; Wenzel *et al*., 2000; Cheng *et al*., 2004; Ubeda-Tomas *et al*., 2008) e crescimento caulinar (Kerbauy *et al*., 1995). Não por acaso, plantas mutantes com habilidade reduzida de sintetizar este hormônio, ou de responder a ele, apresentam tamanho bastante reduzido, as assim chamadas de “plantas anãs” (Peng e Harberd, 1993; Sun e Kamiya, 1994). Nestas, via de regra, a aplicação de giberelina é suficiente para reverter o nanismo.

A despeito disto, os resultados obtidos com as plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com giberelina, corroboram experimentos recentes com plantas de *Catasetum fimbriatum* crescidas no escuro e tratadas com este hormônio (Chaer, 2012), as quais também não apresentaram promoção no alongamento caulinar. Além disso, a presença de 50 µM de giberelina apresentou efeitos deletérios às plantas de *Dendrobium* já no primeiro mês de incubação (Figura 13). Vale mencionar, que tal efeito inibitório, foi anteriormente observado com plantas de tomate (Liverman e Johnson, 1957), rabanete (Armstrong, 1958), videira (Dass e Randhawa 1968) e cebola (Kato, 1955). A partir destes resultados em particular, somados a aqueles obtidos com as plantas controle incubadas com ar sintético e em frascos com rolhas perfuradas (trocas gasosas) (Figuras 13 e 14), é plausível supor que os níveis endógenos de giberelina já se encontrassem suficientemente elevados para promover o alongamento em plantas de *Dendrobium*, e que a adição deste regulador de crescimento ao meio de cultura pode ter sido irrelevante na promoção do alongamento caulinar dessas plantas no escuro.

Nos tratamentos com paclobutrazol, não foi observado o desenvolvimento do estolão apical das plantas de *Dendrobium* (Figura 13 e 14). Supõe-se que as plantas tratadas com paclobutrazol, tenham níveis de giberelina nulos ou muito reduzidos. Levando em consideração a importância da giberelina na atividade meristemática apical caulinar, fato já discutido anteriormente, levanta-se a hipótese de que, para a planta retomar a atividade meristemática apical, seria necessário um nível endógeno ótimo de giberelinas. A quantificação dos níveis endógenos de giberelina em plantas incubadas no escuro poderia lançar alguma luz sobre este processo.

Os tratamentos com paclobutrazol parecem estimular a formação de estolões laterais. Tanto que na presença de 5 µM deste inibidor de giberelinas ocorreu um incremento marcante na formação de estolões laterais a partir do segundo mês de incubação, equiparando-se ao tratamento controle com ar sintético quanto o número de gemas laterais (Figura 15 e 16). De forma indireta, os tratamentos com paclobutrazol apontam para um efeito negativo da giberelina no processo da quebra da dominância nesta orquídea. A propósito, vale lembrar que já foi descrita a atuação do paclobutrazol aumentando os teores de citocininas (Fletcher *et al.*, 2000) e ampliando a quantidade de brotos em bromélias (Daquinta *et al.*, 1999). Dessa forma, o inibidor poderia estar atuando no balanço auxina/citocinina, acarretando a quebra de dominância apical. Além disso, a inibição na biossíntese de giberelina pelo paclobutrazol também pode atuar indiretamente na elevação dos teores endógenos de auxinas, posto que as giberelinas parecem estimular a síntese de auxina.

Estudos têm demonstrado que as giberelinas também são sintetizadas em folhas jovens e transportadas preponderantemente, em direção às regiões inferiores das plantas (Jones e Phillips, 1966; Jones e Phillips, 1967), e que as mesmas estão envolvidas diretamente na inibição das gemas laterais (Jacobs e Case, 1965; Pharis *et al*., 1970; Pharis *et al.,* 1965; Ruddat e Pharis, 1966; Scott *et al*., 1967). Várias plantas intactas tratadas com giberelinas tiveram sua dominância apical promovida (Martin e Thimann, 1972; Pharis *et al*., 1970; Pharis *et al.,* 1965; Goldsmith, 1969).

Vale ressaltar que apesar do aumento no número de gemas laterais e da liberação destas pelo tratamento com paclobutrazol, os estolões pouco se alongavam, com entrenós muito curtos, dificultando assim o isolamento das gemas

laterais para a multiplicação *in vitro* deste material (Figura 13). Ainda que os tratamentos com giberelina não tenham necessariamente resultado em efeitos estimulatórios sobre o alongamento caulinar de plantas de *Dendrobium* “Second Love” crescidas no escuro, de certa forma a presença de paclobutrazol indica a extrema importância da giberelina sobre o alongamento caulinar nesta orquídea, semelhante ao verificado em plantas de *Catasetum fimbriatum* (Suzuki, *et al*. 2004).

As plantas de *Dendrobium* “Second Love” tratadas com 1 e 10 ppm de etileno, ao contrario do observado em plantas tratadas com giberelina e paclobutrazol, estimularam a retomada da atividade meristemática apical a partir do segundo mês experimental, alcançando valores superiores as respectivas plantas controle incubadas apenas na presença de ar sintético. Esse resultado é o oposto ao observado por Cary *et al*. (1995), segundo o qual, o etileno inibiu a atividade do meristema apical caulinar de *Arabdopsis thaliana*. Contudo, corrobora os estudos realizados por Raskin e Kende (1984), Jackson (1985), Emery *et al*. (1994) e Rijnders *et al*. (1997). Além disso, é importante salientar que o etileno apresenta efeito bastante controverso de acordo com a planta em questão, dose e condição ambiental à qual a planta se encontra. Em plantas ribeirinhas adaptadas ao alagamento, por exemplo, o aumento na concentração de etileno nos espaços intercelulares de caules e pecíolos promove o alongamento destas estruturas, sendo tal efeito do tipo dose-resposta. Nesses casos, a redução da disponibilidade de oxigênio aumenta a quantidade de ACC oxidase, ampliando, por consequência, os teores de etileno. Postula-se que o incremento dos teores de etileno aumentaria a sensibilidade dos tecidos à giberelina.

A retomada da atividade meristemática apical das plantas tratadas com 10 ppm de etileno se deu logo ao primeiro mês de incubação, efeito não observado na concentração mais baixa deste hormônio vegetal. O resultado obtido com plantas tratadas na maior concentração de etileno aponta, positivamente, para o envolvimento desse gás na retomada da atividade meristemática apical em plantas de *Dendrobium* “Second Love”.

Um aumento significativo no número de gemas laterais dos estolões das plantas incubadas no escuro, também foi observado em plantas tratadas com etileno a partir do 60º dia de incubação. Isso demonstra que além de possuir efeito sobre o alongamento caulinar, o etileno também parece estimular também a divisão celular em plantas de *Dendrobium* “Second Love”. Kazama *et al*. (2004), observou efeitos promotores do etileno sobre a divisão celular, principalmente para originar tricomas e estômatos em plantas de *Cucumis sativus* incubadas no escuro.

Assim como o observado em *Catasetum fimbriatum* por Chaer (2012), os tratamentos com etileno parecem ter facilitado a quebra da dominância apical exercida pela gema apical de *Dendrobium*, posto que, as plantas tratadas com esse hormônio liberaram duas vezes mais estolões laterais do que as plantas controle a partir do segundo mês de incubação. Esse efeito poderia ser interpretado como uma consequência do etileno sobre o transporte basípeto das auxinas por meio da atividade das proteínas PIN, além de aumentar a conjugação com esse fitormônio, de forma a alterar o balanço hormonal e permitir o desenvolvimento das gemas laterais sob ação das citocininas (Sanyal e Bangerth 1998; Winer *et al*., 2000).

A resposta tríplice do etileno descrita por Abeles *et al*. (1992), postula que além promover o crescimento radial e aumentar o número de ramificações laterais no caule, este gás possuí efeito inibitório sob o alongamento do caule de plantas terrestres. No entanto, como observado no presente trabalho em plantas incubadas no escuro pelo período de três meses, este gás parece ter efeito oposto ao verificado por este autor sobre o alongamento caulinar.

Vale destacar que outros hormônios vegetais atuam em conjunto com o etileno para promover o alongamento do caule, como as auxinas e os brassinosteróides (Vandenbussche *et al.*, 2003; De Grauwe *et al*., 2005). Isto implica que para efeito de uma melhor compreensão do papel do etileno neste evento, deve-se levar em consideração a relação deste hormônio com outros sinalizadores vegetais que não foram propostos neste trabalho.

É conhecido o efeito do etileno sobre a estabilidade das proteínas DELLA, que inibem a transcrição de genes de resposta à giberelina (Achard *et al*., 2003). Como o 1-meticiclopropeno (MCP) inibe a ação do etileno por ligar-se ao seu receptor (Blankenship e Dole, 2003), era de se esperar que no tratamento com esse 1-MCP, as giberelinas atuassem promovendo o alongamento caulinar nas plantas de *Dendrobium*. No entanto, as plantas tratadas com 1-MCP apresentaram um fenótipo muito semelhante ao das plantas mantidas sob fotoperíodo (tratamento claro). Suas folhas mostravam-se vigorosas e clorofiladas, mesmo após o terceiro mês experimental no escuro, sem qualquer sinal de estiolamento (Figura 22).

Além de exibir folhas vigorosas, o tratamento com 1-MCP também resultou em plantas com número de raízes superior aos outros tratamentos, esses fatores somados, podem apontar para uma possível competição por nutrientes (dreno)

entre esses órgãos e o meristema apical caulinar. Considerando o fenótipo observado, pode-se supor que a distribuição de nutrientes favoreceu as folhas e raízes em relação à atividade meristemática, a qual não foi retomada. Tanto as folhas, quanto as raízes, poderiam estar atuando como órgãos dreno, competindo por nutrientes e inibindo a realocação de nutrientes para o meristema apical caulinar.

Até o momento, pouco ainda se sabe sobre os efeitos do óxido nítrico nos vegetais. Esta molécula ainda traz discórdias quanto sua classificação, que oscila entre mensageiro secundário (Magalhães *et al*., 2000; Pagnussat *et al*., 2003; Neill *et al*., 2008) e novo hormônio vegetal (Beligni e Lamattina, 2001; Lamattina *et al*., 2003).

No presente trabalho os tratamentos com óxido nítrico apresentaram resultados surpreendentes no que tange a promoção do crescimento caulinar e o número de gemas laterais nas plantas de *Dendrobium* “Second Love”. As plantas tratadas com 1.000 ppm de NO, além de apresentarem alongamento do estolão apical muito semelhante ao observado em plantas tratadas com 1 e 10 ppm de etileno, também apresentaram o maior número de gemas laterais por estolão e liberaram o maior número de estolões laterais quando comparado com o restante dos tratamentos realizados (Anexos II, III e IV).

Ao contrário do efeito evidenciado por Beligni e Lamatina (2000), em que o NO prevenia o estiolamento, os estolões laterais de *Dendrobium* “Second Love” crescidos na presença de NO, apresentaram maior crescimento quando comparados aos demais tratamentos (Anexo V).

O óxido nítrico apresentou efeito positivo sobre a retomada da atividade meristemática apical de plantas de *Dendrobium* “Second Love” incubadas no escuro, ratificando os resultados observados por Chaer (2012) com plantas de *Catasetum fimbriatum.* Diante do acima exposto, torna-se plausível postular que o óxido nítrico representa uma substância potencialmente promissora para a multiplicação *in vitro* desta orquídea, com evidente importância em processos de regeneração de outras espécies vegetais. A respeito, vale destacar, a importância da relação dose-efeito desta molécula, posto que a concentração de 5.000 ppm mostrou-se altamente deletéria ao desenvolvimento das plantas de *Dendrobium*.

Durante os três meses experimentais, em todos os tratamentos, com exceção das plantas incubadas no claro e das plantas tratadas com 1.000 ppm de óxido nítrico, não foram verificadas alterações significativas quando à massa fresca e seca quando comparados ao controle. Este resultado pode estar relacionado com o fato das plantas de *Dendrobium* apresentarem alongamento caulinar extremamente lento e limitado. Testes preliminares a estes experimentos, indicaram que as plantas de *Dendrobium* começavam a apresentar aumento significativo no estiolamento do caule a partir do 6º mês de incubação no escuro. Tal fato leva-nos a crer que, para observarmos alteração no tamanho dos estolões e na massa das plantas submetidas à diferentes tratamentos no escuro, faz-se necessário um período de observação mais prolongado do que este por nós utilizado.

Quanto aos resultados obtidos com a emissão de etileno pelas plantas de *Dendrobium*, todos os tratamentos apresentaram níveis de emissões superiores a aqueles observados nas plantas cultivadas no claro. Tais resultados indicam que as altas emissões de etileno nos diferentes tratamentos poderiam estar

relacionadas às substâncias utilizadas ou ao fato das plantas encontrarem-se incubadas no escuro.

O envolvimento do etileno com respostas a ferimentos, disponibilidade de água no solo, hipóxia das raízes, poluição química e do ar, salinidade, entre outros, levaram este hormônio vegetal a ser considerado como “hormônio do estresse” (Abeles, 1973).

Nos tratamentos que apresentaram maior emissão deste gás, foi observada uma maior liberação de estolões laterais. Tal fato pode estar relacionado à atuação do etileno no catabolismo e conjugação de auxinas (Sanyal e Bangerth, 1998), alterando assim o balanço auxinas/citocininas na manutenção da dominância apical. Essa mudança nos gradientes de auxina poderia estar ocasionando a quebra de dominância apical, permitindo, assim, o desenvolvimento dos estolões laterais nas plantas deste estudo.

Comparativamente aos resultados obtidos por Chaer (2012) os teores de etileno liberado pelas plantas de *Dendrobium* “Second Love” foram similares a aqueles encontrados em plantas de *Cymbidium* e *Catasetum* quando sob os mesmos tratamentos. No entanto, o efeito autocatalítico pronunciado do etileno sobre sua síntese descrito por Dugardeyn *et al.,* (2008), ainda que tenha sido observado por Chaer (2012), não o foi verificado nas plantas de *Dendrobium*.

Um resultado interessante relacionado com a produção de etileno foi observado no tratamento com 1-metilciclopropeno. A despeito de sua natureza inibitória, a sua presença nos frascos de cultura resultou numa elevação substancial na liberação deste gás. Sabe-se que o 1-MCP se liga ao receptor do etileno, impossibilitando dessa forma, que o hormônio ocupe o sítio a ele

destinado, e não permitindo que o etileno atue normalmente (Sisler e Serek, 2003). Posto isso, vale conjecturar que com os receptores de etileno ocupados com o 1-metilciclopropeno, a planta continuaria a emitir o etileno na tentativa de compensar a falta de percepção. Outra hipótese compensatória à diminuição da sensibilidade ao etileno envolveria um aumento de receptores de etileno pela planta. Como o 1-MCP tem tempo limitado (e desconhecido) de ligação com os receptores de etileno, a planta poderia sintetizar novos receptores para suprir a falta deste gás nos tecidos por esse longo período. Com isso, a planta permitiria que os novos receptores atuassem frente ao etileno acumulado.

Segundo Blankenship e Dole (2003), o 1-MCP possuí ação diferenciada em cada espécie vegetal e depende do tempo de exposição e da temperatura em que as plantas estão submetidas. No presente estudo, a dosagem utilizada, o tempo de exposição ao 1-MCP e a temperatura utilizada, favoreceram a atuação deste inibidor de etileno, resultado em um acúmulo deste gás no interior dos frascos (Anexo VIII).

Quanto à liberação de $CO_2$, as concentrações encontradas nos frascos incubados no escuro foram maiores do que nos frasco mantidos no claro. Apesar das semelhanças fenotípicas encontradas entre as plantas mantidas sob o claro e aquelas tratadas com 100 ppm de 1-MCP, as mesmas divergiram quanto aos níveis das emissões de $CO_2$. Enquanto as plantas tratadas com 1-MCP emitiram elevados níveis deste gás, as plantas tratadas no claro emitiram níveis vinte vezes inferiores do que as primeiras, ao final do terceiro mês de incubação.

Esses resultados apontam para uma possível relação dos níveis de $CO_2$ com a fotossíntese realizada pelas plantas mantidas no claro. Estas, por sua vez, estariam utilizando o dióxido de carbono acumulado no interior dos frascos para

síntese de carboidratos via fixação pela rubisco, diminuindo, assim, os níveis desse gás nesse tratamento. Ou talvez, de modo semelhante ao observado nas emissões de etileno, a elevada emissão de $CO_2$ nas plantas incubadas no escuro, pudesse estar relacionado ao estresse causado pela ausência de luz. Estresse este que as plantas tratadas no claro não foram submetidas.

Não se observou nas plantas de *Dendrobium* “Second Love” um padrão na liberação de $CO_2$ entre os diferentes tratamentos ao longo dos três meses experimentais, situação esta diferente daquela observada em plantas de *Catasetum fimbriatum*, incubadas na luz, onde um aumento significativo na emissão deste gás ocorria no primeiro mês de tratamento, sugerindo uma maior atividade metabólica dessas plantas quando comparadas com as emissões no segundo mês experimental (Chaer, 2012).

Acerca dos resultados obtidos no experimento com plantas de *Dendrobium* incubadas na penumbra e no escuro por 120 dias, observou-se que as primeiras apresentavam-se claramente mais vigorosas e levemente esverdeadas do que as plantas mantidas no escuro ao final do tratamento (Figura 40). No entanto, surpreendentemente, quando os estolões oriundos de plantas mantidas na penumbra foram utilizados como explante para verificar a viabilidade para formação de novas plantas, foi observada uma porcentagem de regeneração inferior em relação aos estolões mantidos no escuro. Duas hipóteses, correlacionadas, podem ser levantadas a partir do resultado obtido neste experimento.

A primeira hipótese baseia-se no componente estrutural de ambas as plantas Enquanto as cultivadas na penumbra originavam folhas maiores com bainhas mais conspícuas do que as plantas incubadas no escuro, suas bainhas

poderiam atuar como uma espécie de barreira física limitadora do contato das gemas laterais com o meio de cultura. Não é de todo descartável, ainda sob esta circunstância, um efeito de “aprisionamento” mecânico das gemas laterais pelos tecidos da bainha.

A segunda hipótese, também relacionada com as folhas, remete à teoria fonte/dreno. As folhas por serem mais alongadas e vigorosas quando incubadas na penumbra, poderiam funcionar como drenos de utilização, realocando como tais, os nutrientes para si ao invés de permitir que fossem canalizados para os tecidos meristemáticos. Infelizmente, são ainda escassos os estudos comparativos de desenvolvimento em plantas submetidas ao escuro e à penumbra.

# VI. Conclusão

Buscou-se no presente estudo dar-se início ao estabelecimento de uma estratégia que permitisse a estimulação do crescimento caulinar continuado de plantas de *Dendrobium* “Second Love” sob condições *in vitro*, a partir do meristema apical ou lateral, utilizando-se para tal fim três tipos de substâncias de crescimento: giberelina, etileno e óxido nítrico.

Os resultados indicaram que ao contrário do que seria esperado, os tratamentos com giberelina não apresentaram, praticamente, nenhum efeito significativo sobre o crescimento das plantas. Por outro lado, de forma também diferente do que se poderia esperar, alguns efeitos estimulatórios importantes sobre o crescimento no escuro foram observados na presença tanto de etileno, quanto de óxido nítrico; neste, mais proeminente do que no primeiro.

Face às respostas incomuns apresentadas por esta orquídea nas condições experimentais empregadas, quer nos parecer que este material abre perspectivas interessantes para abordagens experimentais a respeito do papel do etileno e do óxido nítrico no controle do desenvolvimento das plantas.

# Resumo

A multiplicação de orquídeas *in vitro* vem sendo utilizada há algum tempo com objetivo de elevar a taxa de multiplicação, além de eliminar patógenos e reduzir gastos na produção. Esta ferramenta de trabalho vem sendo rotineiramente utilizada no nosso laboratório, ao longo de mais de duas décadas em nosso laboratório, em pesquisas básicas de fisiologia e de aprimoramento da técnica de clonagem, principalmente de orquídeas. Neste caso,o uso da técnica visa a obtenção de maior estabilidade genética dos regenerantes em cultivos de longa duração. Plantas do gênero Catasetum apresentam atividade indeterminada do meristema apical caulinar quando incubadas no escuro, originando em pouco tempo longos estolões com crescimento indeterminado, comportamento raro no reino vegetal. Cada nó do caule estiolado possui uma gema lateral que, quando isolada e incubada no claro, forma rapidamente uma planta completa, facilitando a micropropagação. Outras espécies de orquídeas valorizadas na floricultura não apresentam tal facilidade na multiplicação, mostrando-se recalcitrantes à micropropagação, como é o caso do gênero *Dendrobium* (Orchidaceae). O objetivo deste estudo foi obter uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos no estiolamento de plantas *Dendrobium* “Second Love”, que apresenta crescimento caulinar limitado quando sob ausência de luz, buscando compreender os efeitos do escuro e dos hormônios etileno e giberelina, bem como do radical livre óxido nítrico e gás carbônico na atividade dos meristemas apicais e laterais dessa orquídea. Como objetivo complementar, buscou-se estimular um estiolamento mais pronunciado, visando com isto um aumento potencial na formação de gemas laterais, paralelamente à quebra da dominância apical e o

crescimento subsequente dos estolões. As plantas de *Dendrobium* utilizadas faziam parte do nosso estoque de germoplasma *in vitro*. Após 120 dias de incubação no claro, as plantas foram transferidas para o escuro e tratadas com diferentes concentrações de ácido giberélico (GA), paclobutrazol (PA - inibidor de biossíntese de giberelina), etileno, 1-metilciclopropeno (1-MCP - inibidor da ação do etileno) e óxido nítrico (NO). Análises mensais dos teores de etileno e CO2 acumulados nos frascos foram realizadas por meio de cromatografia gasosa durante três meses. Após 30, 60 e 90 dias de tratamento no escuro, quantificou-se o número de gemas laterais presentes nos estolões, o número de gemas laterais e apicais que se desenvolviam, o tamanho dos estolões formados, bem como os respectivos valores de massas fresca e seca destes. Por fim, buscou-se avaliar ainda a importância da incubação na penumbra e no escuro sobre o crescimento caulinar, o número de gemas laterais e o desenvolvimento destas após três meses de cultivo. O crescimento no escuro dos caules das plantas de *Dendrobium* "Second Love" mostrou-se extremamente lento e limitado quando comparado ao das plantas de Catasetum fimbriatum. No entanto, quando tratadas com 1.000 µM de óxido nítrico, verificou-se ao final do terceiro mês que o número de gemas laterais era cinco vezes maior do que nas respectivas plantas controle. O tratamento com 10 ppm de etileno apresentou um aumento significativo no número de gemas e de estolões laterais, quando comparados ao controle a partir do segundo mês de incubação. Quanto ao tamanho do estolão apical, os tratamentos com 5 e 50 µM de GA não apresentaram nenhum efeito promotor sobre alongamento caulinar. Mesmo não apresentando a retomada da atividade meristemática apical, o tratamento com 5 µM de PA liberou um número maior de estolões laterais que o controle. Plantas tratadas com 1.000 ppm de NO, a partir do segundo mês de incubação, apresentaram um número elevado de estolões

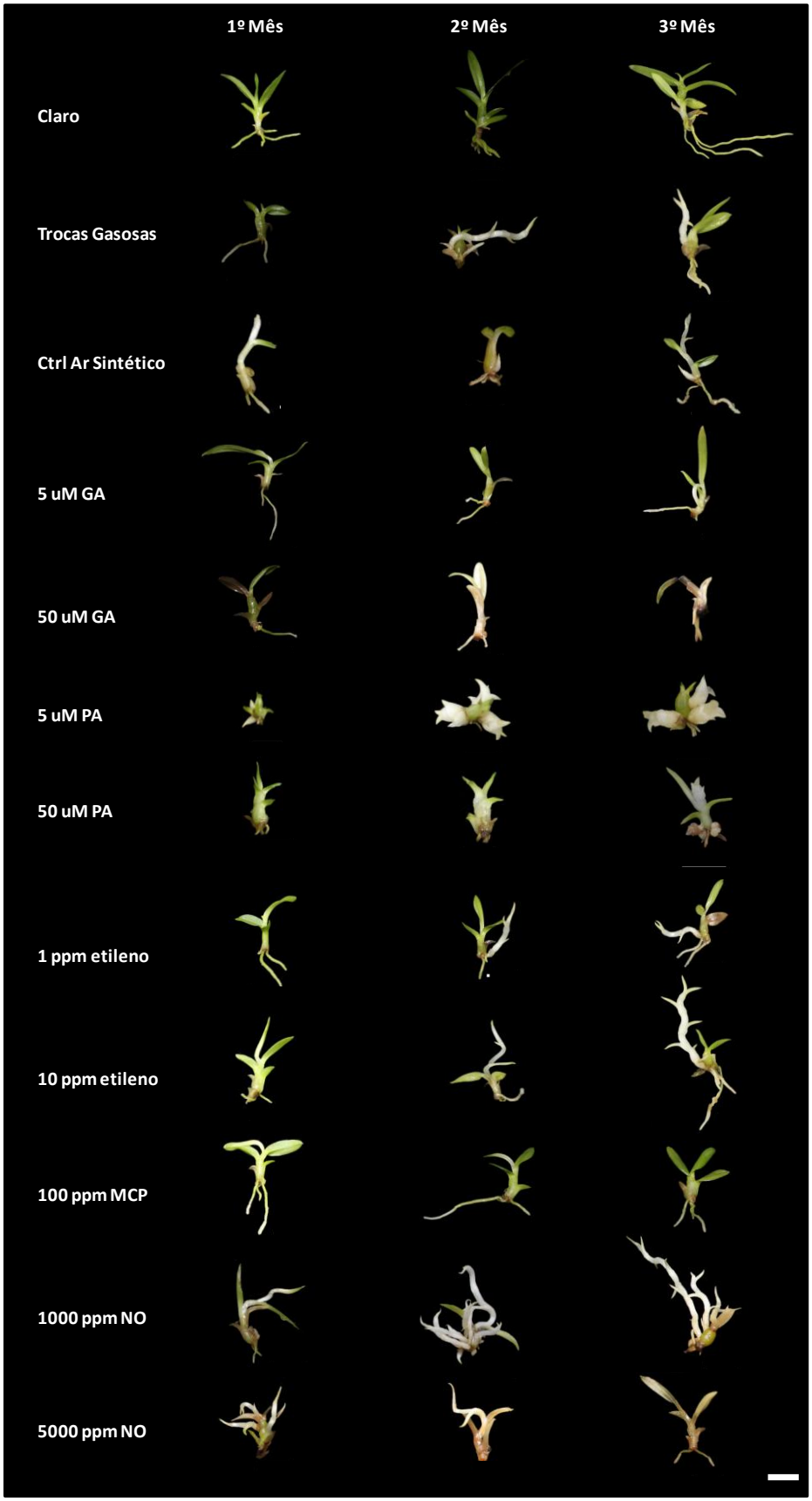
laterais, além dos mesmos apresentarem-se significativamente maiores. O tratamento com 100 ppm de 1-MCP apresentou o mesmo fenótipo das plantas tratadas no claro, ou seja, não estiolaram mesmo sob a ausência de luz. Quanto à emissão de etileno, observou-se que o tratamento com 1-MCP acarretou um aumento significativo na emissão deste gás pela planta, alcançando valores vinte vezes maiores do que no tratamento controle. Já a emissão de CO2 foi menor no tratamento claro quando comparada a maioria dos outros tratamentos no escuro. Os tratamentos em maiores concentrações de GA e NO pareceram promover algum tipo de estresse na planta (evidenciado pela necrose dos tecidos), demonstrando que a espécie em questão pode ser sensível à níveis elevados destas substâncias.

# *Abstract*

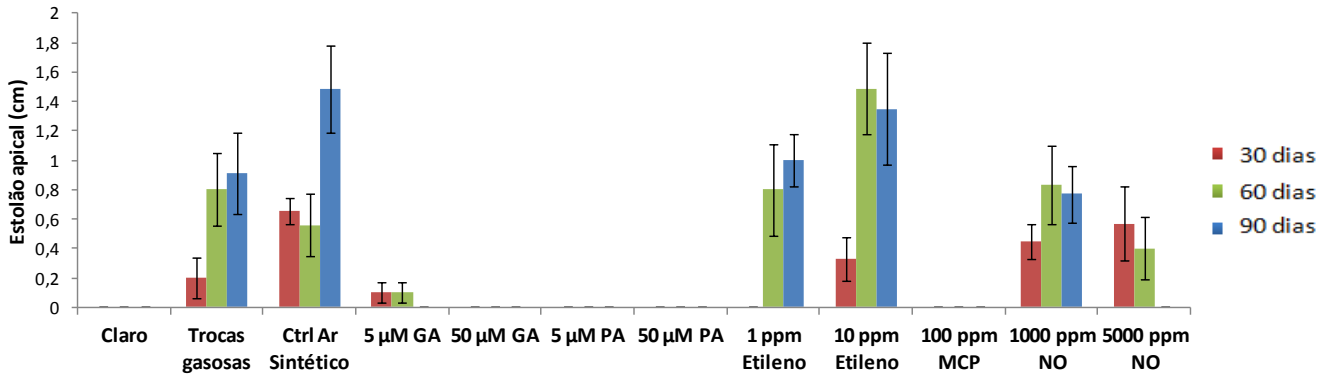
*In vitro* multiplication has been used for some time in order to improve multiplication rate, eliminate pathogens and reduce the production costs. This working tool has been routinely used in our laboratory for over than two decades of basic research in plant physiology and enhancement of cloning technique, especially orchids, aiming to obtain greater genetic stability of regenerants in long term crops. Genus *Catasetum* present indeterminate shoot apical meristem activity when incubated in the dark, resulting, in a short period of time, long stolons with indeterminate growth: rare behavior in the plant kingdom. Each etiolated steam node has a lateral bud that, when isolated and incubated in light, quickly forms a complete plant, facilitating micropropagation. Other species of valued orchids in floriculture, such as genus *Dendrobium* (Orchidaceae), have no such facility in multiplication, being recalcitrant to micropropagation. The goals of this study were to gain a better understanding of the physiological mechanisms involved in plant etiolation in *Dendrobium* "Second Love", which has limited stem growth when in dark: and to understand the effects of dark, gibberellin and ethylene (plant hormones), as well as the free radical nitric oxide and carbon dioxide in the activity of apical and lateral meristems of the orchid. As a complementary objective, we tried to stimulate etiolation, aiming to potentially increase lateral buds formation and to break apical dominance with a subsequent stolons growth. *Dendrobium* plants used in this work were part of our in vitro germplasm stock. After 120 days of incubation in light, the plants were transferred to dark and treated with different concentrations of gibberellic acid (GA), paclobutrazol (PA - gibberellin biosynthesis inhibitor), ethylene, 1-methylcyclopropene (1-MCP - ethylene action inhibitor) and nitric oxide

(NO). During a three months period, monthly analyzes of the accumulated levels of ethylene and $CO_2$ in the flasks were performed using gas chromatography. After 30, 60 and 90 days of dark treatment the number of lateral buds presented in stolons, the number of developed lateral and apical buds, the size of formed stolons, and the respective amounts of fresh and dry mass were quantified. Finally, we evaluated the importance of incubation to steam growth in low light and in the dark, and the number of lateral buds and their development after three months of incubation. The *Dendrobium* "Second Love" steam growth in dark is extremely slow and limited when compared to *Catasetum fimbriatum* plants. However, after three months of treatment with 1.000 µM nitric oxide it was found to have five times more lateral buds than the respective control treatment plants. The treatment with 10 ppm ethylene showed a significant increase in the number of buds and lateral stolons compared to the control treatment from the second month of incubation. Treatments with 5 and 50 µM of GA had no promoting effect on the apical stolon stem elongation. Although not presenting the resumption of apical meristem activity, 5 µM of PA treatment has released a greater number of lateral stolons than the control treatment. Plants treated with 1000 ppm of NO, from the second month of incubation, showed a higher number of lateral stolons, moreover they were significantly larger. Treatment with 100 ppm 1-MCP had the same phenotype as plants treated in light: in other words, they did not etiolate even in light absence. Regarding the ethylene emission, we observed that the treatment with 1-MCP caused a significant increase in the emission of this gas by the plant, reaching values twenty times higher than the control treatment. $CO_2$ emission was lower in light treatment when compared to most of the other treatments in dark. Treatments at higher concentrations of NO and GA seemed to foster some sort of plant stress

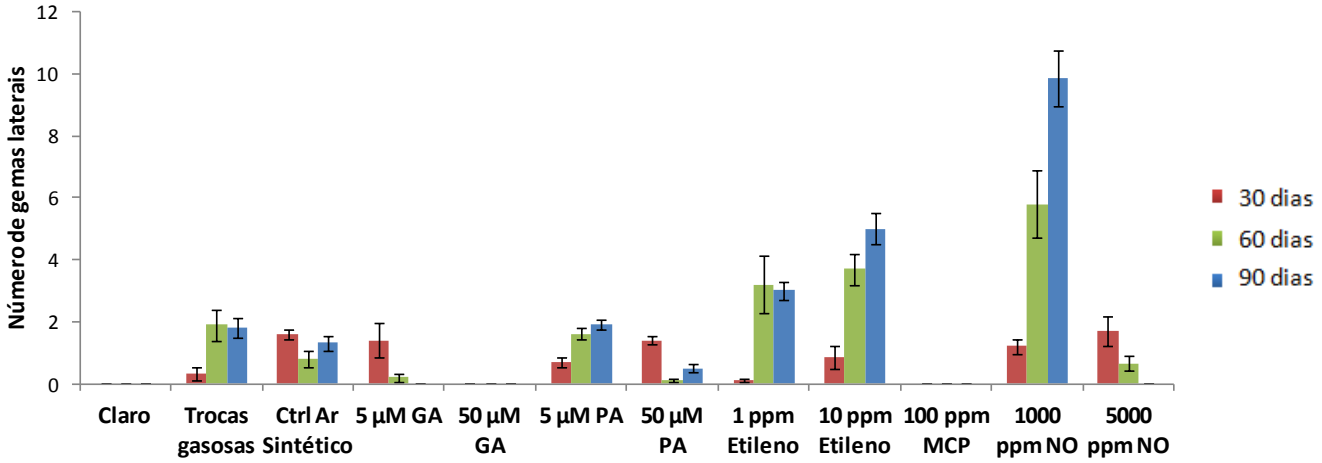
(evidenced by tissue necrosis), demonstrating that the specie in question may be sensitive to high levels of these substances.


1º Mês
2º Mês
3º Mês
Claro
Trocas Gasosas
Ctrl Ar Sintético
5 uM GA
50 uM GA
5 uM PA
50 uM PA
1 ppm etileno
10 ppm etileno
100 ppm MCP
1000 ppm NO
5000 ppm NO

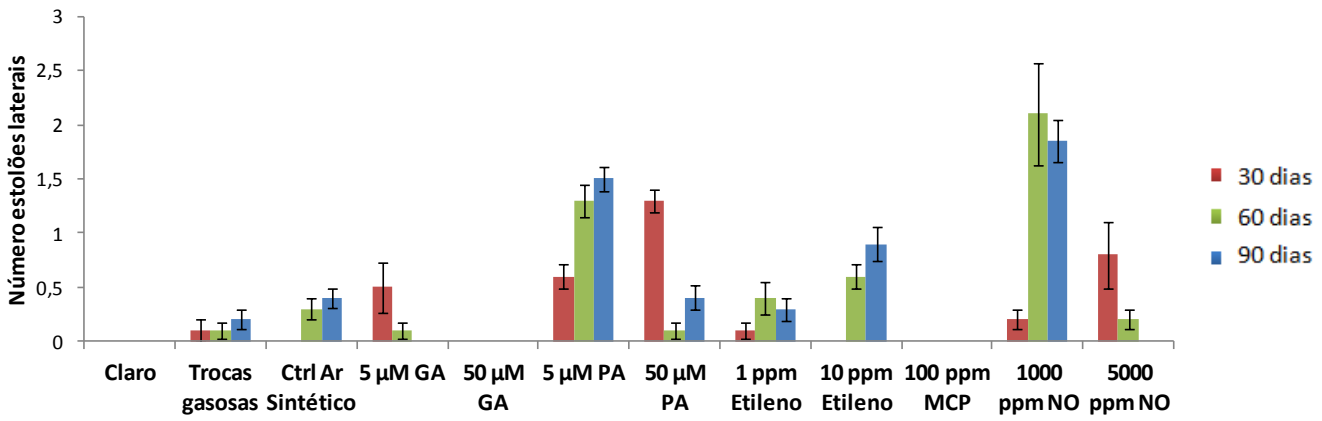
Anexo I. Fenótipos das plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação. Barra indica 1 cm.



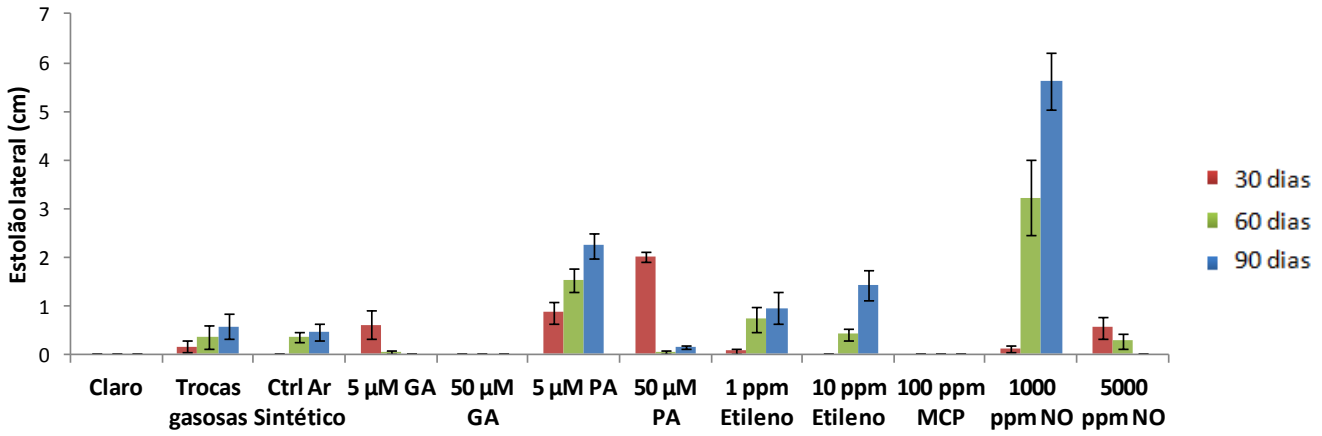

Anexo II. Tamanho do estolão apical de plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.



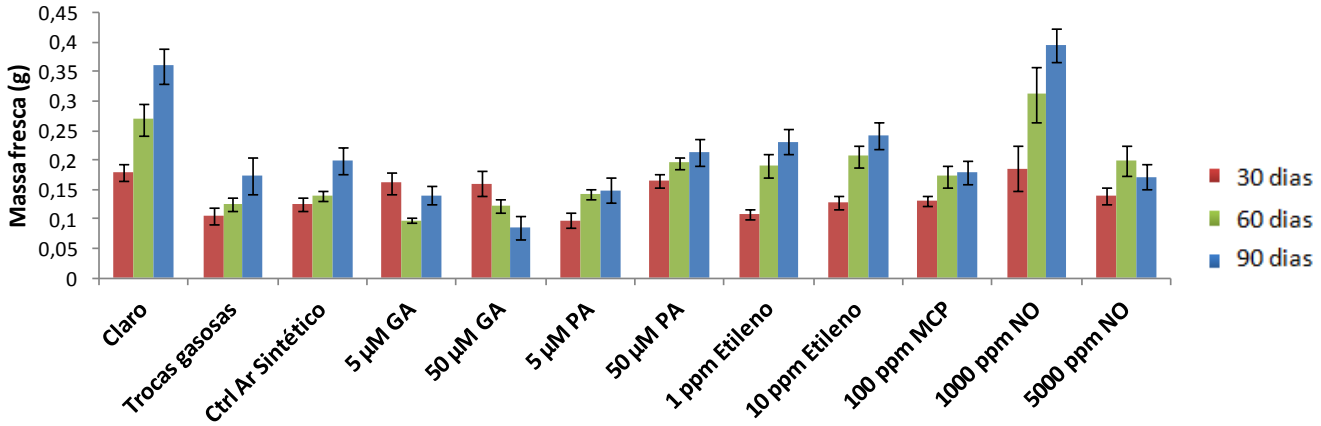

Anexo III. Número de gemas laterais de plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.



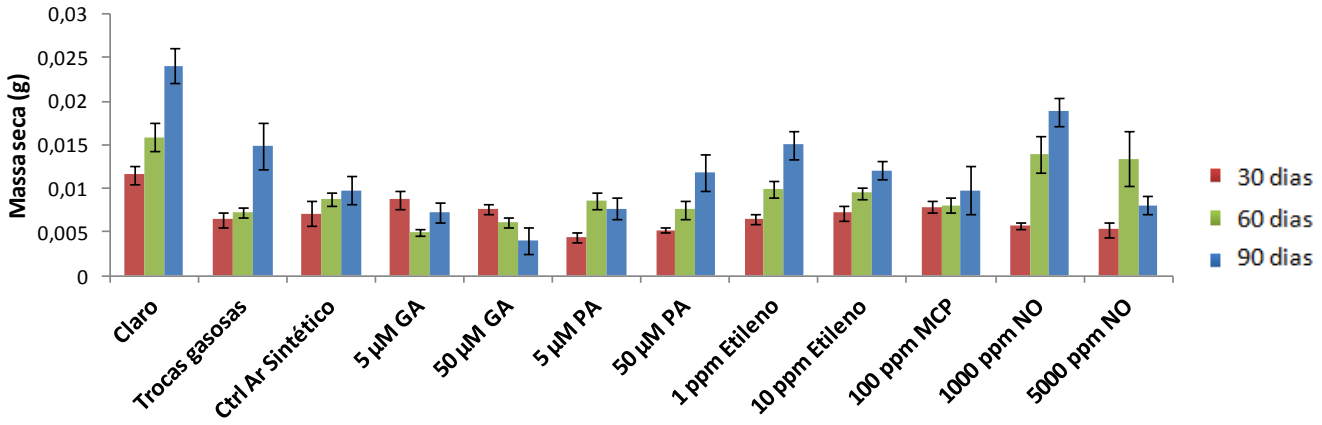

Anexo IV. Número de estolões laterais de plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.



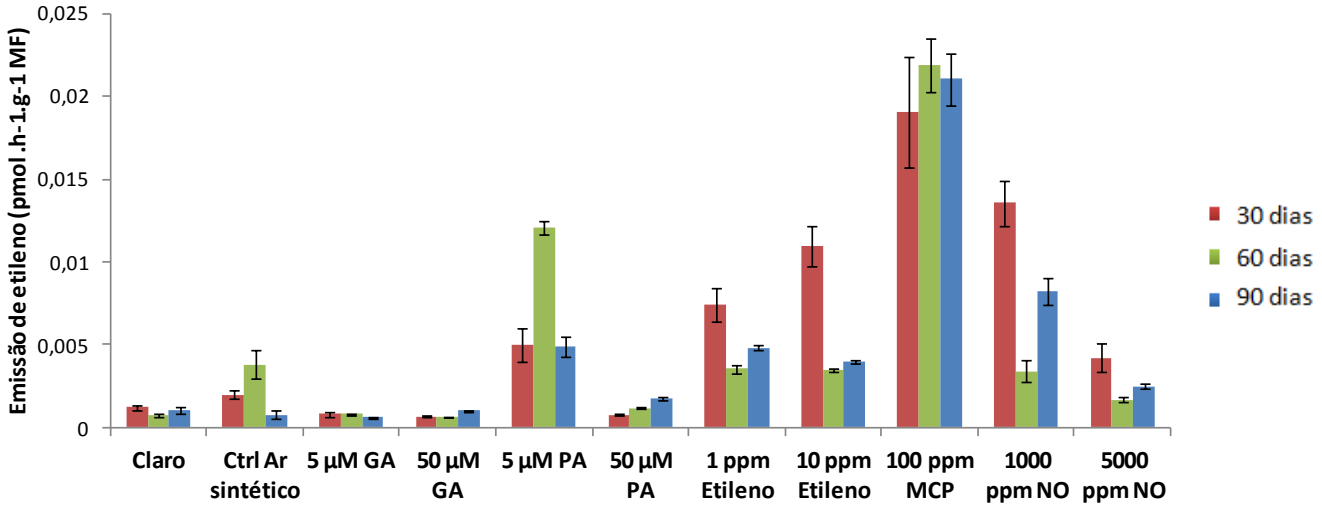

Anexo V. Tamanho dos estolões laterais de plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.



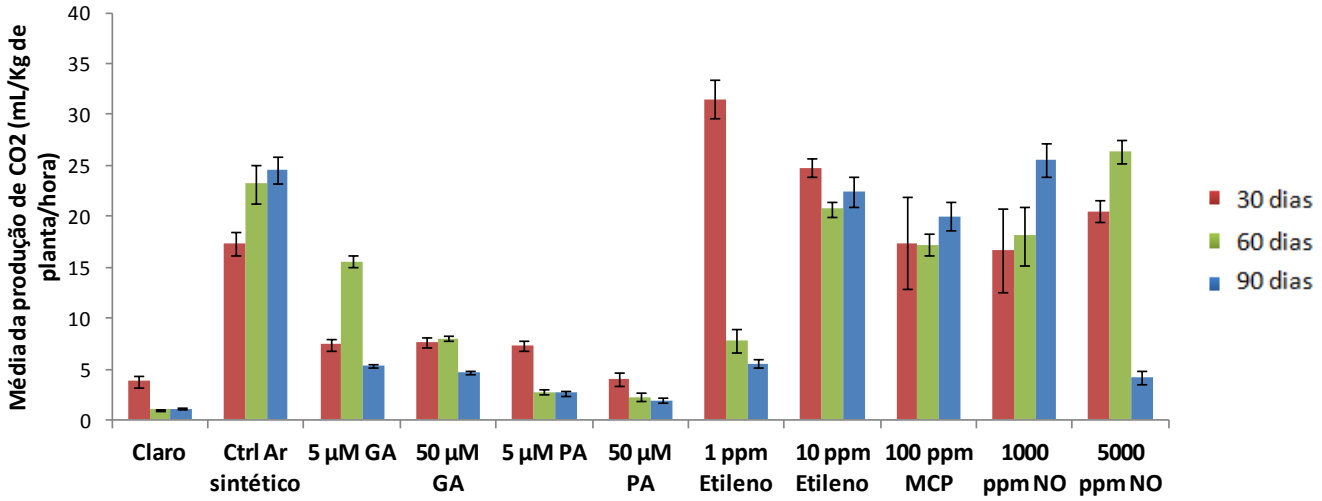
Anexo VI. Massa fresca de plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.




Anexo VII. Massa seca de plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.




Anexo VIII. Emissão de etileno por plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.




Anexo IX. Emissão de $CO_2$ por plantas de *Dendrobium* nos diferentes tratamentos realizados após 30, 60 e 90 dias de incubação.

# Referências bibliográficas


ABELES, F. B. (1973). **Ethylene in plant Biology.** 1st ed. Academic Press, New York, NY, 302 pp.

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, M. E. (1992). **Ethylene in Plant Biology**. 2nd ed. New York: Academic Press.

ACHARD, P.; VRIEZEN, W. H.; VAN DER STRAETEN, D.; HARBERD, N. P. (2003). **Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function**. Plant Cell 15: 2816–2825.

ADAMS, D. O.; YANG, S. F. (1979). **Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:170–74

ALABADÍ, D.; GALLEGO-BARTOLOMÉ, J.; ORLANDO, L.; GARCÍA-CÁRCEL, L.; RUBIO, V.; MARTÍNEZ, C.; FRIGERIO, M.; IGLESIAS-PEDRAZ, J. M.; ESPINOSA, A.; DENG, X. W. (2008). **Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness**. Plant J., 53: 324–335

ALLEN, L. H. JR.; AMTHOR, J. S. (1995). **Plant physiological responses to elevated $CO_2$, temperature, air pollution, and UV-B radiation. In: Biotic Feedbacks in the Global Climatic System: Will the Warming Feed the Warming?** (eds Woodwell GM,Mackenzie FT), pp. 51-84. Oxford University Press , New York.

AMTHOR, J. S. (1995). **Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [$CO_2$] in relation to the global carbon cycle.** Global Change Biology, 1, 243-274.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. (2007). **Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses.** Plant Science 172: 876–887.

ARDITTI, J. C.; CLEMENTS, M. A.; FAST, G.; HADLEY, G.; NISHIMURA, G. (1982). **Orchid seed germination and seedling culture** – a manual. *In*: ARDITTI, J. (ed.). Orchid Biology Reviews and Perspectives II. p. 244-370. Ithaca and London: Cornell University Press.

ARDITTI, J.; ERNEST, R. M. (1993). **Micropropagation of orchids.** New York: John Wiley and Sons, 640 pp.

ARMSTRONG, J. L. (1958). **Research on Gibberellin - 1. Gibberellin Studies on Radishes**. Bios, Vol. 29, No. 3, pp. 139-141.

BASSUK, N.; MAYNARD, B. S. (1987). **Plant etiolation**. Hortscience, v.22, n.5, pp.749-750.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. (2000). **Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants.** *In:* Planta, Vol. 210, pp. 215-221. Oxford: Elsevier.

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

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

BIRNBAUM, K. D.; ALVARADO, A. S. (2008). **Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals**. Cell 132:697-710.

BLAKE, P. S.; TAYLOR, D. R.; CRISP, C. M. (2000). **Identification of endogenous gibberellins in strawberry, including the novel gibberellins GA123, GA124 and GA125**. Phytochemistry, 55: 887–90.

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, Vol. 57, No 15, pp. 4043-4049.

BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. (2003). **1-Methylcyclopropene: a review.** Postharvest Biology and Technology, Vol. 28, Issue 1, pp. 1-25.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. (2000). **ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants**. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16:1–18.

BOLIN, B.; DOOS, B. R. (1989). **Greenhouse effect**. John Wiley and Sons Inc., New York, NY.

BÖMKE, C; TUDZYNSK, B. (2009). **Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria.** Phytochemistry, 70:1876–1893.

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

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

CHAER, L. (2007). **Efeito do estresse hídrico e do ácido abscísico na atividade e conversão do meristema apical radicular de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) em gemas caulinares.** Tese de iniciação científica. Instituto de Biociências. São Paulo: USP.

CHAER, L. (2012). **Estudo para o estabelecimento de uma nova estratégia de clonagem *in vitro* de *Cattleya* e *Cymbidium* (Orchidaceae) por meio da utilização de gemas laterais de caules estiolados.** 108 pp. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHEN, S. C.; TSI, Z. H. (2000). **The orchards of China**. The Chinese Forestry Press, 2nd edition - Beijing, China.

CHENG, H.; QIN, L.; LEE, S.; FU, X.; RICHARDS, D. E.; CAO, D.; LUO, D.; HARBERD, N. P.; PENG, J. (2004). **Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function.** Development, 131, pp. 1055–1064.

CHORY, J.; CHATTERJEE, M.; COOK, R. K.; ELICH, T.; FANKHAUSER, C., LI, J.; NAGPAL, P.; NEFF, M.; PEPPER, A.; POOLE, D.; REED, J.; VITART, V. (1996). **From seed germination to flowering, light controls, plant development via the pigment phytochrome**. Symposium Paper. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 93, p. 12066-12071. PNAS: La Jolla, Disponível: http://www.pnas.org/cgi/reprint/93/22/12066?ck=nck.

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

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. (1988). **Organogenesis *in vitro* as a developmental process.** Hortiscience, Vol. 23, pp. 515-519.

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

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

COWLING, R. J.; KAMIYA, Y.; SETO, H.; HARBERD, N.P. (1998) **Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in *Arabidopsis*.** Plant Physiol. 117, pp. 1195–1203.

CRUZ, A. B. (2009). **Aspectos relacionados à competência organogenética de meristemas caulinares de *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae).** 75 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; ESCALOMA, M. (1999). **Bromeliads micropropagation in temporary immersion system.** In: Internationla workshop on plant biotechnology, pp. 19-23.

DASS, H. C.; RANDHAWA, G. S. (1968). **Response of certain seeded *Vitis vinifera* varieties to gibberellins application at postbloom stage**. Am. J. Enol. Vitic., Vol. 19, No. 1, pp. 56-62.

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

DE GRAUWE, L.; VANDENBUSSCHE, F.; TIETZ, O.; PALME, K.; VAN DER STRAETEN, D. (2005). **Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the *Arabidopsis* hypocotyl**. Plant and Cell Physiology 46, 827–836.

DE LUCAS, M.; DAVIÈRE. J. M.; RODRÍGUEZ-FALCÓN, M.; PONTIN, M.; IGLESIAS-PEDRAZ, J. M.; LORRAIN, S.; FANKHAUSER, C.; BLÁZQUEZ, M. A; TITARENKO, E.; PRAT, S. (2008). **A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation**. Nature 451: 480–484.

DINNENY, J. R.; BENFEY, P. N. (2008). **Plant stem cell niches: standing the test of time.** Cell 132: 553-557.

DOERNER, P. (2003). **Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals**. Current Biology, Vol. 13, pp. 368-374.

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

DUGARDEYN, J.; VANDENBUSSCHE, F.; STRAETEN, D. V. D. (2008). **To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by *in silico* gene expression analysis?** Journal of experimental botany, Vol. 59, No. 1, pp. 1-16.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D. F. (1998). **Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 95, p. 10328-10333.

EMERY, R. J. N.; REID, D. M.; CHINNAPPA, C. C. (1994). **Phenotypic plasticity of stem elongation in two ecotypes of *Stellaria longipes*: the role of ethylene and response to wind**. Plant Cell Environ. 17(6):691–700.

ERIKSSON, S.; BOHLENIUS, H.; MORITZ, T.; NILSSON, O. (2006) **$GA_4$ is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation**. Plant Cell 18(9): 2172–2181.

FENG, S.; MARTINEZ, C.; GUSMAROLI, G.; WANG, Y.; ZHOU, J.; WANG, F.; CHEN, L.; YU, L.; IGLESIAS-PEDRAZ, J. M.; KIRCHER, S.; *et al*. (2008). **Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins**. Nature 451: 475–479.

FERREIRA, W. M. (2003). **Comportamento organogenético de meristemas caulinares de *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro***. 142p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERREIRA, W. M.; KERBAUY, G. B; PIMENTEL, A. P. (2006). **Micropropagation and genetic stability of a *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae)**. *In vitro* Cellular & Develop. Biology-Plant 42:568-571.

FLETCHER, R. A.; GILL, A.; DAVI, T. D.; SANKHLA, N. (2000). **Triazoles as plant growth regulators and stress protectants.** Horticultural Reviews, New York, Vol. 24, pp. 53-138.

FOSKET, D. E. (1994). **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: [s.n.], 580 p.

FURNER, I.; PUMFREY, J. (1992). **Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*.** Development 115, pp. 755-764.

GALLEGO-BARTOLOMÉ, J.; ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M. A. (2011**). DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in *Arabidopsis thaliana.*** PLoS ONE 6: e23918.

GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2001). **Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress.** Plant Physiology, v. 126, p. 1196-1204.

GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2002) **Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells.** Plant Physiology, v. 128, p. 790-792.

GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2003). **Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links?** Trends in Plant Science, v. 8, p. 20-26.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M.; THORPE, T. A. (1996). **Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture.** *In: In vitro* cellular & developmental biology. In: Plant. San Francisco: World Congress on *In vitro* Biology.

GERHARDT, R. (2002). **Encantadores Olhos de Boneca**. Natureza, 178 (10):38-43.

GIBA, Z.; GRUBISIC, D.; TODOROVIC, S.; SAJC, L.; STOJAKOVIC, D.; KONJEVIC, R. (1998). **Effect of nitric oxide - releasing compounds on phytochrome - controlled germination of Empress tree seeds**. Plant Growth Regulation, v. 26, pp. 175-181.

GOESCHL, J. D.; PRATT, H. K.; BONNER, B. A. (1967). **An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings.** Plant Physiol 42: 1077-1080.

GOLDSMITH, M. H. M. (1969). **The physiology of plant growth and development.** London: McGrow-Hill, Ed. M.B. Wilkins, pp. 124-162.

GOMI, K.; SASAKI, A.; ITOH, H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. (2004). **GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex,**

**specifically interacts with phosphorylatd SLR1 protein and regulates the gibberellins-dependent degradation of SLR1 in rice.** Plant J., 37:626-634.

GOUVEA, C.; SOUZA, J. F.; MAGALHAES, A. C. N.; MARTINS, I. S. (1997). **NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments.** Plant Growth Regulation, v. 21, p. 183-187.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. (1998). **Micropropagação**. *In*: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/CNPH. p.183-260.

GRÜN, S.; LINDERMAYR, C.; SELL, S.; DURNER, J. (2006). **Nitric oxide and gene regulation in plants.** Journal of Experimental Botany, v. 57, p. 507-516.

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

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L. (2000). **Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes.** Trends in Plant Science, 5:523–29.

HEW, C. S.; YONG, J. W. K. (1997). **Physiology of tropical orchids in relation to the industry.** Singapore: World Scientific, 331 pp.

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

IRISH, V. F.; SUSSEX, I. M. (1992). **A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem**. Development 115, pp. 745–753.

JACKSON, M. B. (1985). **Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence**. Ann Rev Plant Physiol 36:145–174.

JACOBS, W. P.; CASE, D. B. (1965). **Auxin transport, gibberellin, and apical dominance.** Science, 148(3678):1729-1731.

JEFFERYS, E. G. (1970). **The gibberellin fermentation**. Advances in Applied Microbiology, 13:283–316.

JONES, R. L., PHILLIPS, I. D. J. (1966). **Extractable and diffusible gibberellin from light and dark-grown pea seedlings.** Plant physiol. 43:629-634.

JONES, R. L., PHILLIPS, I. D. J. (1967). **Effect of CCC on the gibberellin content of excised sunflower organs.** Planta, 72, pp. 53-59.

KATO, Y. (1955). **Responses of Plant Cells to Gibberellin**. Botanical Gazette, Vol. 117, No. 1, pp. 16-24.

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

KENDE, H.; VAN DER KNAAP, E.; CHO, H-T. (1998). **Deepwater rice: a model plant to study stem elongation.** Plant Physiol. 118:1105–1110.

KERBAUY, G. B. (1984). **Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of roots tips of *Catasetum* (Orchidaceae)**. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 113: 287-291.

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

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

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

KERBAUY, G. B. (2008). **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, 2ª edição, 431 pp.

KETSA, S.; RUGKONG, A. (2000). **Ethylene production senescence and ethylene sensitivity *Dendrobium* 'Pompadour' flowers following pollination**. J. Hort. Sci. Biotech. 75: 149-153.

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

KLEPPER, L. (1979). **Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide ($NO_2$) emissions from herbicide-treated sybean plants**. Atmospheric Environment 13:537-542.

KOORNNEEF, M.; VAN DER VEEN, J. H. (1980). **Induction and analysis of gibberellins sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh**. Theor Appl Genet 58: 257–263.

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

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

LEITNER, M.; VANDELLE, E.; GAUPELS, F.; BELLIN, D.; DELLEDONNE, M. (2009). **NO signals in the haze: nitric oxide signaling in plant defence.** Current Opinion in Plant Biology 12: 451-458.

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

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

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

LIU, J.; HE; CHUN Z. (2009). **DNA Molecular Identification of Herba Dendrobii and Its Adulterant Species Based on ITS Sequence Analysis**. China Journal of Chinese Materia Medica, Vol. 34, No. 22, pp. 2853-2856.

LIU, JING.; LIU, GUOHUA.; HOU, LIXIA.; LIU, XIN. (2010). **Ethylene-induced nitric oxide production and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* depending on changes in cytosolic pH**. Plant Physiology, Vol.55 No. 22: 2403–2409, doi: 10.1007/s11434-010-4033-3.

LIVERMAN, J. L.; JOHNSON, S. P. (1957). **Arrested fruit growth in tomato by gibberellins**. Science, vol. 125, No. 3257, pp 1086-1087.

LONG, S. P.; DRAKE, B. G. (1992). **Photosynthetic $CO_2$ assimilation and rising atmospheric CO2 concentrations.** *In:* Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants (eds Baker NR, Thomas H), pp. 69-107. Elsevier, New York.

LUO, A. X.; HE, X. J.; ZHOU, S. D.; FAN, Y. J., LUO, A. S.; CHUN, Z. (2010). **Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium* Lindl.** Carbohydrate Polymers, Vol. 79, Issue 4, pp. 1014-1019.

LÜTHI, D.; LE FLOCH, M.; BEREITER, B.; BLUNIER, T.; BARNOLA, J-M.; et al. (2008)**. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000-800,000 years before present**. Nature 453:379–82.

LYNDON, R. F. (1990). **Plant Development – The Cellular basis**. Cambridge: University Press.

MA, G. X.; XU, G. J.; XUAND, L. S.; LI, M. F. (1995). **Survey and identification of commercial example of Shihu (*Dendrobium*) (III). Chin Trad Herbal Drugs**. Chinese Traditional and Herbal Drugs, Vol. 20, pp. 370-373.

MACMILLAN, J.; SUTER, P. J. (1958). **The occurrence of gibberellins $A_1$ in higher plants – isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*).** Naturwissenschaften 45(2):46.

MAGALHÃES, J. R.; PEDROSO, M. C.; DURZAN, D. (1999). **Nitric oxide, apoptosis and plant stress.** Physiology and Molecular Biology of Plants, v. 5, p. 115-125.

MAGALHÃES, J. R.; MONTE, D. C.; DURZAN, D. (2000). **Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis* thaliana**. Physiology and Molecular Biology of Plants, v. 6, pp. 117-127.

MAJEROWICZ, N.; PERES, L. E. P. (2004). **Fotomorfogênese em Plantas.** *In*: Fisiologia Vegetal. London: Kerbauy.

MALIGA, P.; SZ.-BREZNOVITS, A; MARTON, L; JOO, F. (1975). **Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria**. Nature Magazine. n. 225. p. 401-405. New York: Nature Publishing Group.

MARTIN, C.; THIMANN, K. V. (1972). **The role of protein synthesis in the senescence of leaves.** Plant physiol., 49(1):64-71.

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 Horticulture, 108:95-99.

MATSUOKA, M (2003). **Gibberellin Signaling: How Do Plant Cells Respond to GA Signals?** Journal of Plant Growth Regulation, Volume 22, Issue 2, pp 123-125.

MENDELSOHN, R.; ROSENBERG, N. J. (1994). **Framework for integrated assessments of global warming impacts.** Climatic Change, 28, 15-44.

MISHINA, T. E.; LAMB, C.; ZEIER, J. (2007). **Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis***. Plant Cell and Environment, v. 30, p. 39-52.

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. (1995). **Nitric oxide in the inflammation and immune response.** Medical School. University of Tampere, Finland. Annals of Medicine. Vol. 27. p. 359-367. London: Informa Healthcare/Taylor & Francis Group.

NAKAJIMA, K.; SEAN, G.; NAWY, T.; BENFEY, P. N. (2001). **Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning.** Nature 413:307-311.

NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. (2008). **Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress**. Journal of Experimental Botany, v. 59, p. 165-176.

NEILL, S.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; WILSON, I. (2008). **Nitric oxide evolution and perception.** Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 1, pp. 25–35, doi:10.1093/jxb/erm218.

OTVOS, K; PASTERNAK, T. P.; MISKOLCZI, P.; DOMOKI, M.; DORJGOTOV, D.; SZUCS, A.; BOTTKA, S.; DUDITS, D.; FEHER, A. (2005). **Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures.** The Plant J. 43, 849–860.

OGAWA, M.; HANADA, A.; YAMAUCHI, Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. (2003). **Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination.** Plant Cell 15: 1591–1604.

PAGNUSSAT, G. C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; LAMATTINA, L. (2002). **Nitric oxide is required for root organogenesis.** Journal of Plant Physiology. Vol. 129. 954-956. Stanford: American Society of Plant Biologists.

PAGNUSSAT, G. C.; LANTERI, M. L.; LAMATTINA, L. (2003). **Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process**. Plant Physiology, v. 132, pp. 1241-1248.

PAGNUSSAT, G. C.; LANTERI, M. L.; LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. (2004). **Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development.** Plant Physiology, v. 135, p. 279-286.

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

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

PENG, J.; HARBERD, N. P. (1993). **Derivative alleles of the *Arabidopsis* gibberellin-insensitive (gai) mutation confer a wild-type phenotype**. Plant Cell, 5, 351–360.

PERES, L. E. P.; AMAR, S; KERBAUY, G. B.; SALATINO, A; ZAFFAR, G. R.; MERCIER, H. (1999). **Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinins ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae)**. In: Journal of Plant Physiology. Vol.155. p. 551-555. Stanford: American Society of Plant Biologists.

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

PHARIS, R. P.; KUO, C. C.; GLENN, J. L. (1970). **Gibberellin, a primary determinant in the expression of apical dominance, apical control and geotropic movement of conifer shoots.** Plant Growth Substances, Springerverlag, NY, pp. 441-448.

PHARIS, R. P.; RUDDAT, M.; PHILLIPS, C.; HEFTMAN, E. (1965). **Precocious flowering in Arizona cypress with gibberellin.** Con. J. Bot. 43:923-927.

PHILLIPS, I. D. J. (1975). **Apical Dominance.** Ann. Rev. Plant Physiol., 26: 341-367.

PHINNEY, B. O. (1983). **The history of gibberellins.** In: Crozier A (ed.) The Biochemistry and Physiology of Gibberellins, pp. 19–52. New York: Praeger Publishers.

PRENTICE, I. C.; FARQUHAR, G. D.; FASHAM, M. J. R.; et al. (2001). **The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide.** In: Houghton, J. T.; Ding, Y.; Griggs, D. J. Noguer, M.; van der Linden, P. J.; Xiaosu, D.; eds. Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. New York: Cambridge University Press, 183–239.

PURGATTO, E.; 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, pp. 1105-1111.

RAO, A. N. (1997). **Tissue culture in Orchid Industry**. In: Reinert J and Bajaj YPS (edt.). Applied and Fundamental aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Narosa publ. House, New Delhi. pp. 46- 69.

RASKIN, I.; KENDE, H. (1984). **The role of gibberellin in the growth response of submerged deep water rice**. Plant Physiol. 76(4):947–950.

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

REDDY, G. V. (2008). **Live-imaging stem-cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex**. Current Opinion in Plant Biology 11:88-93.

RIJNDERS, J. G. H. M.; YANG, Y.Y.; KAMIYA, Y.; TAKAHASHI, N.; BARENDSE, G. W. M.; BLOM, C. W. P. M.; VOESENEK, L. A. C. J. (1997). **Ethylene enhances gibberellin levels, petiole sensitivity in flooding-tolerant Rumex palustris but not in flooding-intolerant *R. acetosa*.** Planta 203:20–25.

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

ROGERS, H. H.; DAHLMAN, R. C. (1993). **Crop responses to $CO_2$ enrichment.** Vegetatio, 104/105, 117-131.

RUDDAT, M.; PHARIS, R. P. (1966). **Participation of gibberellin in the control of apical dominance in soybean and redwood.** Planta, 71:222-228.

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

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

SAUTER, M.; MEKHEDOV, S. L.; KENDE, H. (1995). **Gibberellin promotes histone H1 kinase-activity and the expression of CDC2 and cyclin genes during the induction of rapid growth in deep-water rice internodes.** Plant J. 7: 623–632.

SCHALLER, E. G. (2012). **Ethylene and the regulation of plant development.** BMC Biology, Journal of Biology, http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/9.

SCHALLER, E. G.; KIEBER, J. J. (2002). **The *Arabidopsis* Book.** American Society of Plant Biologists; DOI: 10.1199/tab.0071.

SCOTT, T. K.; CASE, D. B.; JACOBS, W. P. (1967). **Auxin-gibberellin interaction in apical dominance.** Plant physiol. 42(10):1329-1333.

SEO, M.; NAMBARA, E.; CHOI, G.; YAMAGUCHI, S. (2009**). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds**. Plant Mol Biol 69: 463–472.

SHA, W. L.; LUO, J. Y. (1980). **Study of the Chinese drug Shi-Hu (*Dendrobium*). I. Investigation of Botanical Origin and the Drug.** Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 15, No. 6, pp. 351-357.

SHELDRAKE, A. R. (1973). **The production of hormones in higher plants.** Biol. Rev. Comb. Philos Soc. 48: 509-559.

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

SILVERSTONE, A .L; CHANG, C. W; KROL, E.; SUN, T. P. (1997). **Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana.*** Plant Journal 12(1):9–19.

SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. (2006). **Plant stem cells carve their own niche.** Trends in Plant Science 11:241-246.

SISLER, E. C.; SEREK, M. (2003). **Compounds interacting with ethylene receptors in plants**. Acta Horticulture, Leuven, Vol. 5, pp. 473-480.

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

SRIVASTAVA, L. M. (2002). **Special Features of Plant Development**. In: L.M. Srivastava (eds.). Plant growth and development - Hormones and environment. Academic Press, New York, pp. 3-22.SUGIYAMA, M. (1999). **Organogenesis *in vitro*.** Current Opinion in Plant Biology, Vol. 2, pp. 61-64.

SUN, T. P. (2010). **Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development.** Plant Physiology, 154(2): 567–570.

SUN, T. P.; KAMIYA, Y. (1994). **The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis**. Plant Cell, 6, 1509–1518.

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2009). **Plant Physiology**. 4 ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

THONING, K. W.; TANS, P. P.; KOMHYR, W. D. (1989). **Atmospheric carbon dioxide at Mauna Loa Observatory 2.** Analysis of the NOAA GMCC data, 1974-1985, J. Geophys. Research, vol. 94, 8549-8565.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUZZO, J. A. (1998). **Culturra de tecidos e transformação genética de plantas.** Vol. 1 e 2. Brasília, Embrapa, 864 p.

TSUCHISAKA, A.; THEOLOGIS, A. (2004). **Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate**

**synthase gene family members.** Plant Physiol., 136:2982–3000. [PubMed: 15466221].

UBEDA-TOMAS, S.; SWARUP, R.; COATES, J.; SWARUP, K.; LAPLAZE, L.; BEEMSTER, G.T.; HEDDEN, P.; BHALERAO, R.; BENNETT, M. J. (2008). **Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis**. Nat. Cell Biol. 10, 625–628.

UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; NAKAJIMA, M. (2005). **GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin.** Nature 437(7059): 693–698.

UEGUCHI-TANAKA M.; HIRANO, K.; HASEGAWA, Y.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. (2008). **Release of the repressive activity of rice DELLA protein SLR1 by gibberellin does not require SLR1 degradation in the gid2 mutant**. Plant Cell 20(9): 2437–2446.

UMA, D.; SELVI, S.; DEVIPRIYA, D.; MURUGAN, S.; SUJA, S. (2009). **Antitumor and Antimicrobial Activities and Inhibition of *in vitro* Lipid Peroxidation by *Dendrobium nobile***. African Journal of Biotechnology, Vol. 8, No. 10, pp. 2289-2293.

VANDENBUSSCHE, F.; SMALLE, J.; LE, J. *et al.* (2003). **The *Arabidopsis* mutant alh1 illustrates a cross talk between ethylene and auxin**. Plant Physiology 131, 1228–1238.

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

VAN DEN BERG, C.; WILLEMSEN, V.; HENDRIKS, G.; WEISBEEK, P.; SCHERES, B. (1997). **Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem**. Nature 390, pp. 287–289.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B (2007). ***In vitro* precocious orchid flowering: a strategy for basic research and commercial approaches. Floriculture, Ornamental and Plant: advances and topical issues.** In: Jaime A. Teixeira da Silva. (Org.). Volume 5. Isleworth: Global Science Books, pp. 421-426.

VERDEIL, J-L.; AEMANNO, L.; NIEMENAK, N; TRANBARGER, T. J. (2007). **Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?** Trends in Plant Science 12:245-252.

VERNOUX, T.; BENFEY, P. N. (2005). **Signals that regulate stem cell activity during plant development**. Current Opinion in Genetics & Development 15:388-394.

VON ARNIM, A.; DENG, S. W. (1996). **Light control of seedling development.** Annual Review of Plant Physiology. Molecular Biology. Vol. 47. p. 215-243. Palo Alto: Annual Reviews.

VUYLSTEKE, D. R.; ORTIZ, R. (1996). **Field performance vs. *in vitro* propagules of plantain (*Musa* spp., AAB GROUP).** *In:* Hortiscience. Vol, 31, n.5, pp 862-865. Alexandria: American Society for Horticultural Science/High Wire Press.

WANG, K. L. *et al.* (2002) **Ethylene biosynthesis and signaling networks.** Plant Cell, 14:131–151. [PubMed: 12045274].

WANG, J. H.; LUO, J. P.; ZHA, X. Q.; FENG, B. J. (2010). **Comparison of Antitumor Activities of Different Polysaccharide Fractions from the Stems of *Dendrobium nobile* Lindl**. Carbohydrate Polymers, Vol. 79, No. 1, pp. 114-118.

WANG, J. H.; ZHA, X. Q.; LUO, J. P.; YANG, X. F. (2010). **An Acetylated Galactomannoglucan from the Stems of *Dendrobium nobile* Lindl.** Carbohydrate Research, Vol. 345, No. 8, pp. 1023-1027.

WAREING, P. F. (1982). **Determination and related aspects of plant development.** *In*: SMITH, H. e GRIENSON, D. (ed.). The molecular biology of plant development. Vol. 18. p. 517-541. Oxford: Backwell Scientific.

WEIGEL, D.; JÜRGENS, G. (2002). **Stem cells that make stems.** Nature 415: 751-754.

WENZEL, C. L.; WILLIAMSON, R. E.; WASTENEYS, G.O. (2000). **Gibberellin-induced changes in growth anisotropy precede gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin- responsive dwarf mutant, M489**. Plant Physiol. 124, pp. 813–822.

WILDT, J.; KLEY, D.; ROCKEL, A.P.; SEGSCHNEIDER, H. (1997). **Emission of**

**NO from several higher plant species**. J. Geophys. Res. 102(D5), 5919-5927.

WINER, L.; GOREN, R.; RIOV, J. (2000). **Stimulation of the oxidative decarboxylation of indole-3-acetic acid in citrus tissues by ethylene.** Plant growth Regulation, Vol. 32, pp. 231-237.

WITTWER, S. H. (1995). **Food, Climate, and Carbon Dioxide.** The Global Environment and World Food Production. CRC Press, Boca Raton, FL.

WOODRICK, R.; MARTIN, P. R.; BIRMAN, I.; PICKETT, F. B. (2000). **The *Arabidopsis* embryonic shoot fate map**. Development 127, pp. 813–820.

XU, J.; GUAN, J.; CHEN, X.J.; ZHAO, J.; LI, S.P. (2011). **Comparison of polysaccharides from different *Dendrobium* using saccharide mapping**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55, pp. 977-983.

XUE, D.; FENG, S.; ZHAO, H.; JIANG, H.; SHEN, B.; SHI, N.; LU, J.; LIU, J.; WANG, H. (2010). **The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers**. Journal of genetics and genomics, 37 pp. 197-204.

YAMAUCHI, Y.; OGAWA, M.; KUWAHARA, A.; HANADA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. (2004). **Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds.** Plant Cell 16: 367–378.

YANG, L.; WANG, Z. T.; XU, L. S.; (2006). **Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection.** J. Chromatography, 1104 pp. 230–237.

YIN, M.; HONG, S. (2009). **Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl. Protocorm-like bodies by encapsulation virtification**. Plant cell Tissue Org. Cult. 98:179-185.

YUAN, Z.; CHEN, Y.; YANG, Y. (2009). **Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting on ephiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization.** World J. Micribial Biotechnol, 25:295-303.

ZENTELLA, R.; ZHANG, Z-L.; PARK, M. (2007). **Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis***. Plant Cell 19(10):3037–3057.

ZHA, X. Q.; LUO J. P.; JIANG, S. T. (2007). **Structure Identification of a New Immunostimulating Polysaccharide from the Stems of *Dendrobium huoshanense*.** Carbohydrate Polymers, Vol. 69, No. 1, pp. 86-93.

ZHA, X. Q.; LUO J. P.; JIANG, S. T. (2007). **Induction of Immunomodulating Cytokines by Polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*.** Pharmaceutical Biology, Vol. 45, No. 1, pp. 71-76.

ZHAO, Y.; SON, Y. O.; KIM, S. S., JANG, Y. S.; LEE, J. C. (2007). **Antioxidant and anti-hyperglycemic activity of polysaccharide isolated from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 5, pp. 670-677.

ZHANG, X.; XU, J., WANG, J.; WANG, N., KURIHARA, H., KITANAKA, S., YAO, X. (2007). **Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile*.** J. Nat. Prod., Vol. 70, pp. 24-28.