

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 iniciais 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, jantãs, 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 durante 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 <i>Dendrobium</i> “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 <i>Catasetum fimbriatum</i> 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. Conclusão.....	20
Resumo.....	21
<i>Abstract</i>.....	24
Referências bibliográficas.....	27

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 (Kerbaudy, 1995). Em função desta vasta distribuição, as orquídeas apresentam diferentes necessidades adaptativas, refletindo tanto na sua diversidade estrutural e morfológica, quanto fisiológica (Vaz e Kerbaudy, 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), imunostimulatórios (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 conseqüentemente 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 intuítos: 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 saudáveis 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, mantêm 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, algumas 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* (Kerbaui *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 possui 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 *Catsetum 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 (C₂H₄) 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 adventícias (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 glutathione, formando a S-nitrosoglutathione (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 (CO₂) é um gás composto por dois átomos de oxigênio ligados covalentemente a um de carbono. Segundo Thoning *et al.* (1989), as concentrações atmosféricas de CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 CO₂ 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. 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 stem 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 CO₂ 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 stem 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" stem 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. CO₂ 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.

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.; GALLEGU-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 CO₂, 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 [CO₂] 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; TUDZYNSKI, 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 fotomorfológicos 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 *Arabidopsis 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 Tissue and Organ Culture. pp. 343-357. Berlin: Springer Verlag.

DAQUINTA, M.; ESPINOSA, P.; ESCALOMA, M. (1999). **Bromeliads micropropagation in temporary immersion system.** In: International 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, Biochemistry 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) **GA₄ 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: McGraw-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 phosphorylated 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/CNPQ. 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 orquídeas.** *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 (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean 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 ananassa* (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 CO₂ 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 A₁ 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.
- MENDELSON, 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 *Catsetum 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*, Springer-Verlag, 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. Noguier, 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 CO₂ 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 *Catsetum*.** 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 *Catsetum 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). **Cultura 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.; WILLEMSSEN, 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.; SEGSCHEIDER, 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.

WITTEWER, 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 vitrification**. *Plant cell Tissue Org. Cult.* 98:179-185.

YUAN, Z.; CHEN, Y.; YANG, Y. (2009). **Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting on epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization**. *World J. Microbial 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.